

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
17 de abril de 2014 (17.04.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2014/057148 A2

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2013/000228
- (22) Fecha de presentación internacional: 10 de octubre de 2013 (10.10.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P201201020
10 de octubre de 2012 (10.10.2012) ES
- (71) Solicitante: UNIVERSIDAD DE SEVILLA [ES/ES]; OTRI - Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias, S/N, E-41013 Sevilla (ES).
- (72) Inventor: RISCO DELGADO, Ramón; Dpto. Física Aplicada III, E.T.S. de Ingeniería C. de los Descubrimientos, s/n., Pabellón Pza. de América, E-41092 Sevilla (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,

BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

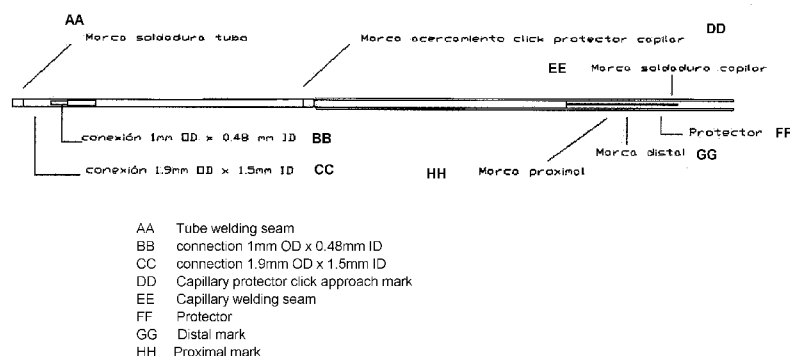
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,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

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) Title: METHOD FOR THE VITRIFICATION OF BIOLOGICAL MATERIAL USING CLOSED THERMOPLASTIC POLYMER MICROCAPILLARIES INTRODUCED INTO CRYOGENIC FLUIDS

(54) Título : PROCEDIMIENTO DE VITRIFICACIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO MEDIANTE MICROCAPILARES DE POLÍMEROS TERMOPLÁSTICOS CERRADOS INTRODUCIDOS EN FLUIDOS CRIOGÉNICOS



(57) Abstract: The invention relates to a novel method for the cryopreservation of biological material, vitrifying the samples with the presence of cryoprotector. The method is based on the use of thermoplastic polymer microcapillaries of reduced dimensions, which are heat sealed (figure 1 and 2) and introduced into liquid nitrogen in order to produce correct vitrification and prevent cross contamination.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de criopreservación de material biológico, que consigue la vitrificación de las muestras con presencia de crioprotector. El procedimiento se basa en el uso de microcapilares de polímeros termoplásticos de reducidas dimensiones y termosellados (figura 1 y 2), introducidos en nitrógeno líquido para conseguir la correcta vitrificación y evitar la contaminación cruzada.



WO 2014/057148 A2

Título

Procedimiento de vitrificación de material biológico mediante microcapilares de polímeros termoplásticos cerrados introducidos en fluidos criogénicos

Objeto de la invención

La patente de invención objeto de la presente memoria se refiere a un nuevo procedimiento de criopreservación de material biológico, que consigue la vitrificación de las muestras con presencia de crioprotector. El procedimiento se basa en el uso de un microcapilar de polímeros termoplásticos de reducidas dimensiones y termosellado (figura 1 y 2), llamado Safespeed, introducido en nitrógeno líquido para conseguir la correcta vitrificación y evitar la contaminación cruzada. La patente se enmarca dentro del sector de la biotecnología, y dentro de éste en el área de la criopreservación celular, es decir, conservación de células a temperaturas criogénicas durante largos períodos de tiempo manteniendo intacta su funcionalidad. Este proceso tiene especial relevancia en la conservación de ovocitos, embriones, células madre, y todo tipo de organismo o material biológico que pueda ser introducido en el capilar. La patente de invención objeto de la presente memoria es una continuación del desarrollo de la técnica del propio autor [15].

Estado de la técnica

Las principales técnicas empleadas para conseguir la conservación celular se basan en la utilización de bajas temperaturas para ralentizar y detener las reacciones bioquímicas responsables del envejecimiento y deterioro de la célula. Dentro de estas técnicas, las más ampliamente utilizadas son las llamadas de enfriamiento lento y las de vitrificación, con un gran número de variantes en ambos casos.

El enfriamiento lento es hasta ahora el procedimiento mas usado. Se basa en el control de la tasa de enfriamiento con el objetivo de crear un delicado equilibrio entre los distintos factores que causan daño celular, entre los que se encuentran la formación de hielo, fracturas y una excesiva deshidratación de la célula.

La vitrificación es un proceso mediante el cual un líquido se solidifica en una fase no cristalina (fase vítrea) con un rápido descenso de la temperatura y un aumento en la viscosidad. La vitrificación elimina completamente la formación de cristales de hielo, los cuales suponen el mayor obstáculo para la criopreservación de células vivas [1] . Esta

técnica ha mejorado en gran medida los resultados obtenidos por el enfriamiento lento, aunque todavía es insuficiente para la criopreservación de determinados tipos celulares, como es el caso de los ovocitos [2], o de las células madre [3], en donde la sensibilidad celular exige una mejora de los métodos utilizados en la actualidad.

Con el objetivo de incrementar la viscosidad de la muestra y evitar la formación de hielo se utilizan los llamados agentes vitrificantes, también llamados crioprotectores, por su relación con la protección celular. Con algunos de ellos, como el dimetilsulfóxido o el etilenglicol se han conseguido buenos resultados [5,6]. Diferentes contenedores han sido aplicados para introducir células en nitrógeno líquido, entre las que encontramos rejillas de cobre utilizadas en microscopía electrónica [7], capilares OPS [8,11], (Open Pulled Straws, capilares de PVC convencionales estirados para tener un menor diámetro interior) o los llamados cryoloops [9,12], lazos de nylon en los que se suspende una película de solución conteniendo las células.

CryoTip [14], o Cryopette son sistemas cerrados termosellables que han sido también ampliamente utilizados en reproducción asistida. Al ser termosellables, la muestra queda aislada en el interior sin contacto alguno con el exterior, minimizando así el riesgo de contaminación durante el proceso de vitrificación, almacenamiento en tanque de nitrógeno, y recalentamiento posterior. Sin embargo, la tasa de supervivencia celular conseguida con la presente invención es muy superior a la obtenida con estos sistemas.

También en los últimos años, han aparecido otros contenedores abiertos como CryoTop [13], o Cryoleaf con buenos resultados en supervivencia ovocitaria pero con la problemática de no asegurar un potencial caso de contaminación cruzada.

DOCUMENTOS RELEVANTES

- [1] Gábor Vajta, Masashige Kuwayama, Improving cryopreservation systems, Theriogenology 65 (2006), 236-244)
- [2] David K. Gardner, In vitro fertilization, a practical approach, Taylor & Francis; Édition: 1 (29 septembre 2006)
- [3] S.S. Gouk, C.K.F. Tan, M.P. Hande, A. Poonepalli, G.S. Dawe and Lilia L. Kuleshova, Protein- and serum-free vitrification of neural stem cells, Cryobiology, Volume 53, Issue 3, December 2006, Page 389

- [4] S. Llavin, A. Arav, Measurement of essential physical properties of vitrification solutions, *Theriogenology* 2007; 67; 81-89.
- [5] Rall WF, Fahy GM: Ice-free cryopreservation of mouse. embryos at -196 by vitrification. *Nature* 1985;313:573-. 575.
- [6] T. Takahashi, A. Hirsh, E. F. Erbe, J. B. Bross, R. L. Steere and R. J. Williams
Vitrification of human monocytes, *Cryobiology*, Volume 23, Issue 2, April 1986, Pages 103-115.
- [7] Martino A, Songsasen N, Leibo S. P, Developement into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling, *Biol Reprod* 1996;54;1059-1069
- [8] Vajta, G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H, Succesful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method, *Cryo-Letters* 1997;18;191-195
- [9] Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK, Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique, *Fertil Steril*, 1999;72;1073-1078
- [10] M.A.Nowshari and G. Bren, Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos, *Human Reproduction* 15 (2001), 2368-2373.
- [11] G. Vajta, P. Holm, T. Greve and H. Callesen, Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method, *Acta Vet.Scand.* 38 (1997) 349-352.
- [12] T. Mukaida, S. Nakamura, T. Tomiyama, S. Wada, M. Kasai and K. Takahashi, Succesful birth after transfer of vitrified human blastocysts with us of a cryoloop containerless technique, *Fertil. Steril.* 76 (2001) 618-620.
- [13] Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. P, Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes, *Reprod Biomed Online*, 2005;11;300-308.
- [14] Kuwayama M, Vajta G, IEda S, Kato O, Vitrification of human embryos using the CryoTip method, *Reprod Biomed Online*, in press RMP Online vol 11. No5.2005.
- [15] R. Risco, A. Olmo, J. L Sánchez, Procedimiento de criopreservación celular por vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector mediante transferencia térmica por convección forzada. P200702565. Universidad de Sevilla, 2008

Descripción del contenido de las figuras

Figura 1. Geometría del microcapilar, pajuela principal y capuchón exterior en posición de uso abierta. Ambos extremos del microcapilar y pajuela principal son termosellables.

El microcapilar de policarbonato (1), termosellado y conteniendo la muestra biológica en el extremo inferior, tiene un recubrimiento (2), que le transfiere rigidez, protección y facilidad en su uso. El capuchón o cobertura (3), se fija a la pajuela principal a través de un cierre mecánico interior del recubrimiento

Figura 2. Geometría del microcapilar, pajuela principal y capuchón exterior en posición cerrada de almacenamiento.

El capuchón o cobertura (3), evita que el capilar roce con las paredes y base del sistema de almacenamiento, protegiendo la muestra.

Descripción de la invención

El dispositivo contenedor objeto de la presente invención (Safespeed) consiste en una pajuela de policarbonato, optimizada como sistema cerrado para los procedimientos de criopreservación. Se compone de un capilar ultra fino (microcapilar) montado sobre una pajuela y una funda protectora.

El dispositivo contenedor objeto de la presente invención (Safespeed) evita la nucleación y el crecimiento del hielo en el proceso de vitrificación de las muestras celulares, obteniendo tasas de supervivencia celular cercanas al 100% y posibilitando el termosellado y aislamiento de la muestra, para evitar la contaminación cruzada de las muestras durante la vitrificación, almacenamiento y recalentamiento,

El nuevo tipo de contenedor celular (Safespeed), en el que se introduce la muestra biológica que se quiere criopreservar, junto con la concentración necesaria de crioprotector y suero, está fabricado por un conjunto de polímeros termoplásticos ensamblados (como por ejemplo policarbonato).

Con el objetivo de incrementar la facilidad en el manejo del microcapilar termoplástico, éste puede ser introducido dentro de otra pajuela de mayor diámetro y rigidez, móvil pero no desmontable, que actuará a su vez de protección para el microcapilar. Esta pajuela de protección podrá descubrir (posición de uso) o recubrir (posición de almacenamiento) el microcapilar a través de un mecanismo de cierre mecánico. La posición de uso permite

optimizar el proceso de vitrificación, y la posición de almacenamiento minimiza o elimina tanto el riesgo de rotura del capilar como el riesgo de pérdida de la muestra celular.

El contenedor consta de las siguientes partes:

- Un capilar de plástico (menor de 250 micras de diámetro) en el que se depositan la(s) muestra(s) biológica(s).
- Una pajuela principal conectada al microcapilar que aporta rigidez y permite que la muestra fluya hasta el capilar mediante la succión por la parte trasera.
- Una pajuela exterior que aporta rigidez y permite manipulación.
- Un tramo de pajuela plana que permite anotar los datos identificativos de cada paciente (nombre, código, etc...).
- Un tramo final trasero de pared delgada que permite la conexión a un sistema de aspiración estándar y también el cierre mediante calor (termoselladora).
- Un protector de plástico que desliza sobre la pajuela exterior y que permite dejar al descubierto el capilar para el momento de la succión de la muestra biológica y la introducción en nitrógeno líquido, y que a su vez permite otra segunda posición de almacenamiento una vez la muestra se encuentra vitrificada, en el que recubre el capilar para que evitar que éste colisione con otros objetos y se dañe la muestra del interior.

Modo de realización de la invención

PROCEDIMIENTO DE VITRIFICACION

Preparar la(s) célula(s) en el medio de enfriamiento de vitrificación recomendado (agentes crioprotectores).

Fijar el extremo ancho de Safespeed a un dispositivo de aspiración (por ejemplo, una jeringa Hamilton, una pipeta automática, un stripper, una pipeta de boca o cualquier otro sistema de aspiración y manipulación de ovocitos), bien directamente o bien con un conector-acoplador adecuado.

Cuando las muestras están listas para cargar en el Safespeed, deslizar la funda plástica protectora a lo largo de la pajuela hasta exponer el microcapilar. Con ayuda del microscopio o la lupa binocular, cargar suavemente las muestras en el Safespeed y ubicarlas entre la 2ª y 3ª marcas del microcapilar por aspiración, controlando la absorción

de las muestras y medio. Estas 2ª y 3ª marcas del microcapilar han sido calculadas al efecto de manera que la velocidad de enfriamiento y recalentamiento en dicha área sea la óptima. Este detalle es crítico. Confirmar que la/s muestra/s está situada/s entre la frontera de la marca de 2ª y 3ª. Precaución: El fallo en la confirmación de la ubicación de la muestra, podría dañar la muestra.

Sellar térmicamente el microcapilar por debajo de la marca 1. A continuación la parte trasera del dispositivo se sella también con el mismo termosellador por la marca de soldadura de tubo, de manera que la muestra se encuentra aislada completamente dentro del contenedor.

Extremadamente rápido, sumergir verticalmente de cara abajo el lado del capilar sellado de Safespeed primero, en un depósito de nitrógeno líquido o cualquier fluido líquido o gaseoso que permita una alta velocidad de enfriamiento. Deslizar la funda protectora de plástico cuidadosamente a lo largo de la pajuela hacia abajo para proteger el microcapilar (figura 3). Asegurarse de que durante este movimiento el capilar queda completamente cubierto por el nitrógeno líquido. Para el transporte, guardar la el dispositivo Safespeed en un cáliz, canister o cryocane (tubo de ensayo metálico o de plástico, que podrá adaptarse a los estándares utilizados en las clínicas u de otro tipo) y llevar al tanque de nitrógeno líquido donde será finalmente almacenado.

PROCEDIMIENTO DE RECALENTAMIENTO

Preparar el medio de calentamiento preferido de recalentamiento (agente eliminador de crioprotector).

Preparar un depósito de agua (por lo menos 15 cm de profundidad) a 37 grados lo más cerca posible (máximo 15 cm) de la cryocane (cáliz o canister).

Deslizar cuidadosamente la funda protectora de plástico a lo largo y hacia arriba de la pajuela asegurando que en todo momento el capilar está completamente sumergido en el nitrógeno líquido, quedando el microcapilar al descubierto.

Extremadamente rápido (menos de 1 segundo), sumergir verticalmente cara abajo el capilar sellado de Safespeed, en el recipiente de agua, agitando a mano durante dos segundos para una mejor transferencia de calor.

Inmediatamente después, sacar Safespeed del agua y secar subviente su exterior (con papel absorbente, por ejemplo). Colocar el Safespeed en una plataforma de corte, posteriormente cortar el Safespeed justo por encima del termosellado en el extremo más ancho.

Conecte el dispositivos de succión (convenientemente acoplado) al extremo ancho de Safespeed. Coloque el Safespeed en una plataforma de corte y posteriormente corte el Safespeed justo debajo de la 1ª marca en el extremo final del microcapilar. Descargar cuidadosamente y expulsar la muestra dentro del medio de calentamiento por vitrificación recomendado.

La longitud total del dispositivo completo será de unos 80-140 mm, lo que se adapta a los estándares de almacenamiento, ajustándose a las prácticas al uso en reproducción asistida, permitiendo una cómoda manipulación y minimización del espacio que ocupan en los stocks.

Ejemplo 1. Procedimiento de conservación celular de ovocitos

Este ejemplo muestra la aplicación práctica del método para la criopreservación de ovocitos de ratona.

Se emplearon ratonas vírgenes C57BL/6 x CBA/Ca (4-8 semanas) mantenidas bajo condiciones controladas (12 horas luz: 12 horas oscuridad) y alimentadas ad libitum. Fueron superovuladas por inyección intraperitoneal con 0.1 ml de PMSG (5 UI). Tras 48-56 horas, se les administró 0.1 ml de HCG (5 UI). Se sacrificaron 14 horas después por dislocación cervical y se extrajeron los oviductos.

Los ovocitos fueron liberados del cúmulo por acción de la hialuronidasa (SIGMA Ref. H4272-30 mg). Tras esto, los ovocitos se lavaron en medio M2 para eliminar los restos de

hialuronidasa. Los ovocitos en metafase II previamente desnudados se transfirieron entonces a una solución de equilibrio, y después a la solución de vitrificación.

Los ovocitos se introdujeron en el microcapilar, que fue termosellado, con la muestra biológica en el extremo inferior. El microcapilar se introdujo en el recipiente de nitrógeno líquido de forma manual, en la posición de uso, como muestra la figura 1.

Una vez la muestra con el capilar alcanzó temperaturas criogénicas, el microcapilar fue puesto en posición de almacenamiento recubierto por el capuchón, y fue transportado en un canister de plástico hasta un tanque de nitrógeno líquido, donde permaneció 24 horas.

En el proceso de recalentamiento, el microcapilar fue introducido en un baño de agua a 37.5 °C, de forma manual, (de nuevo en posición de uso, sin capuchón).

Después de unos minutos, se estudió la viabilidad de los ovocitos, mediante una gama amplia de valoraciones morfológicas y la técnicas de tinción para ver compromiso de la membrana (trypan blue).

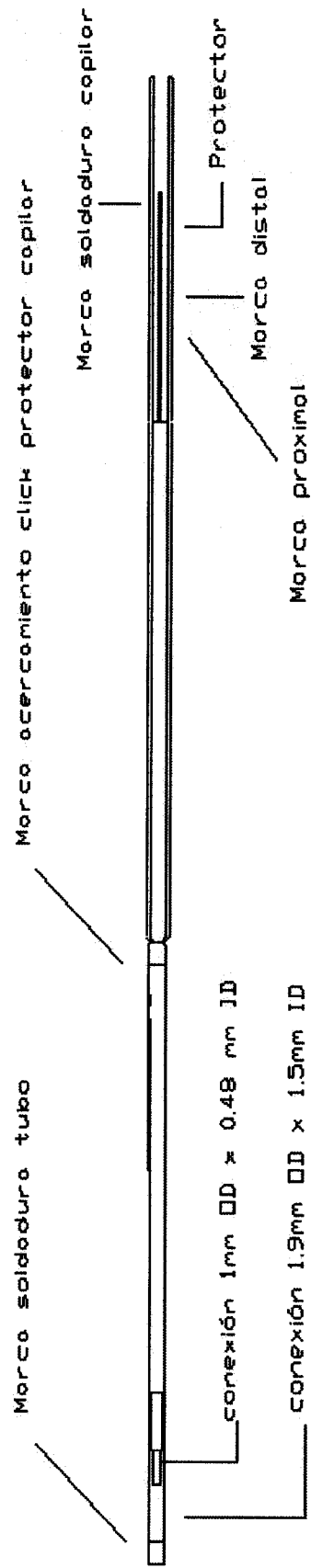
Siguiendo dicho procedimiento se criopreservaron y recalentaron 620 ovocitos de ratona, de los cuales sobrevivieron 595, obteniéndose una supervivencia de ovocitos de un 96%, mucho mayor a otras técnicas de vitrificación que utilizan dispositivos cerrados.

Descrita la naturaleza de la Invención, y la manera de llevarla a la práctica, se hace constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en tanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia de la referida Invención, reservándose los Peticionarios el derecho a obtener los correspondientes certificados de adición por las mejoras o perfeccionamientos que en lo sucesivo pudiera aconsejar la práctica, reivindicándose a título privativo las siguientes particularidades sobre las cuales ha de recaer la concesión del privilegio de la Patente de invención que se solicita.

Reivindicaciones

1. Procedimiento de criopreservación de material biológico mediante vitrificación, caracterizado por el uso de microcapilares poliméricos termoplásticos como contenedores del material biológico, introducidos en fluidos criogénicos para conseguir la vitrificación de la muestra biológica.
2. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1, caracterizado por la utilización de microcapilares poliméricos termoplásticos fabricados con policarbonato, o con cualquier otro material de similares características.
3. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1, caracterizado por la utilización de microcapilares poliméricos termoplásticos termosellables, para evitar la contaminación cruzada de la muestra y que éste quede completamente aislada del exterior.
4. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra celular se introduce previamente bañada en agentes crioprotectores y suero en el interior del microcapilar, a distintas concentraciones dependiendo del tipo celular a criopreservar.
5. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1, en el que el microcapilar polimérico termoplástico está ensamblado sobre un conjunto de pajuelas que le proporcionan rigidez y facilidad en el uso, no desmontables
6. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1 y 5, en el que una de las pajuelas actúa de protector del capilar en su posición de almacenamiento, móvil pero no desmontable.
7. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1 y 5, en el que una de las pajuelas es plana para facilitar la escritura e identificación de los datos del paciente.

8. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1, en el que el microcapilar es introducido en fluidos criogénicos con la parte inferior del microcapilar conteniendo la muestra biológica sin el protector del capilar exterior, para optimizar el proceso de enfriamiento.
9. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1, caracterizado por la utilización de un baño de recalentamiento para el proceso de recalentamiento, en el que el microcapilar polimérico termoplástico termosellado, es introducido con la parte inferior conteniendo la muestra biológica, sin el protector del capilar exterior, para optimizar el proceso de recalentamiento.
10. Procedimiento de criopreservación celular según la reivindicación 1, caracterizado por la utilización de agua a 37° o de un fluido similar para el baño de recalentamiento.



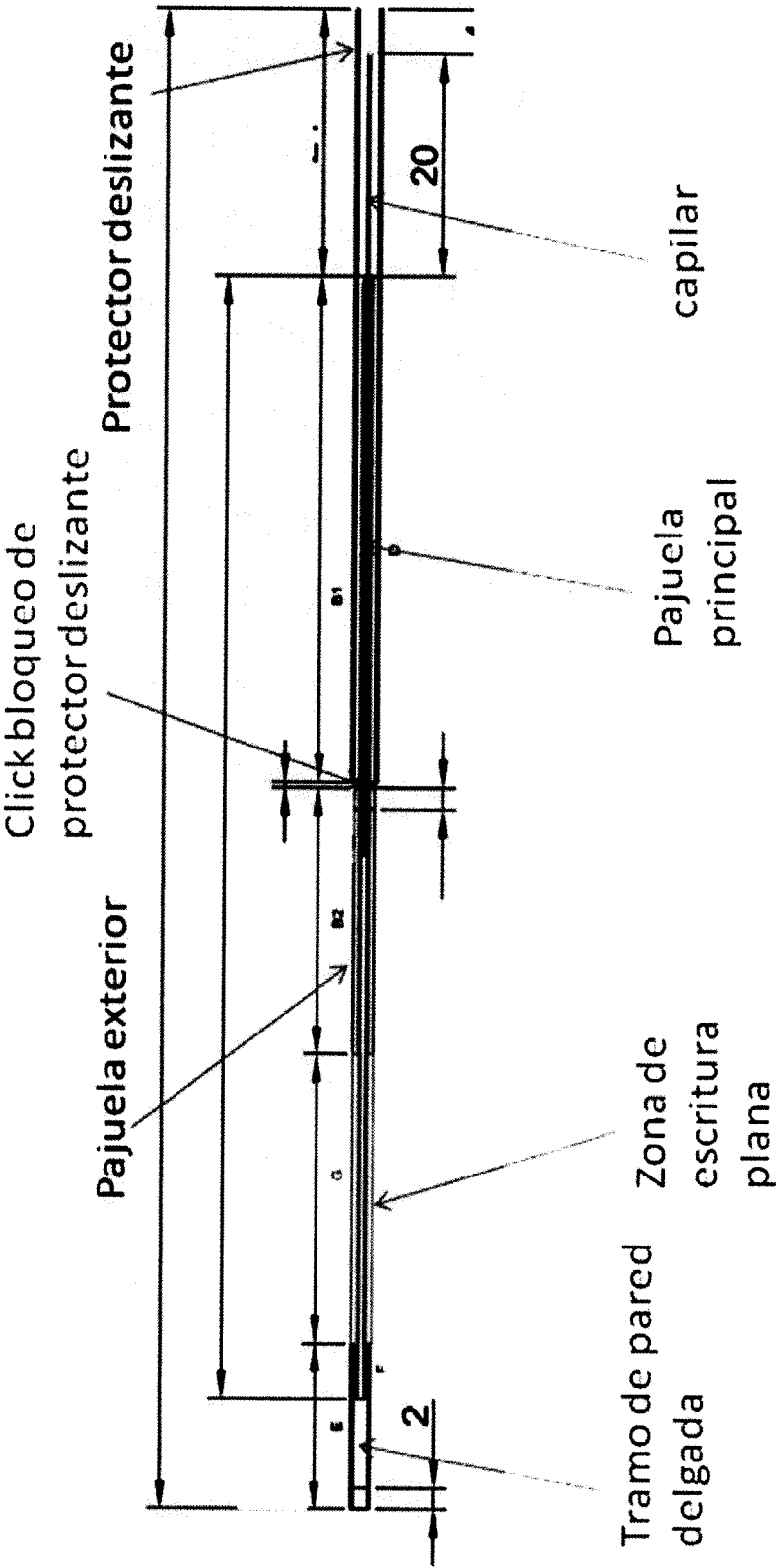


FIGURA 3

