

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 136**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2015** **E 21179466 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2025** **EP 3909427**

54 Título: **Procedimientos y dispositivos de vitrificación asistida por capilaridad**

30 Prioridad:

09.06.2014 US 201462009562 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
12.06.2025

73 Titular/es:

AMBIENT BIOSCIENCES, INC. (100.00%)
1600 Huron Parkway, Bldg. 520, Rm 2390
Ann Arbor, MI 48109, US

72 Inventor/es:

MOHANTY, PRAVANSU S. y
CHAKRABORTY, NILAY

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 3 027 136 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y dispositivos de vitrificación asistida por capilaridad

5 **Campo**

La presente invención se refiere a la vitrificación no criogénica de materiales biológicos, en particular de materiales biológicos vitrificados en un medio de vitrificación mediante secado rápido asistido por capilaridad.

10 **Antecedentes**

La vitrificación es el procedimiento de transición directa de un estado líquido a un estado vítreo amorfo y se utiliza a menudo para conservar materiales biológicos enfriándolos hasta temperaturas criogénicas a altas tasas de enfriamiento. A temperaturas criogénicas, la técnica de vitrificación evita los efectos dañinos de los cristales de hielo, que se sabe que se forman durante la criopreservación convencional usando tasas de enfriamiento lentas. Sin embargo, con el fin de evitar la nucleación de hielo durante el enfriamiento, se requieren concentraciones extremadamente altas y potencialmente tóxicas (6-8 M) de crioprotectores (CPA). Entre los CPA más comúnmente usados están el dimetilsulfóxido (DMSO), el glicerol, el etilenglicol (EG) y el 1,2-propanodiol (PROH). Como resultado, se requieren múltiples etapas y complejos protocolos elaborados para cargar y descargar los CPA en las células. Por tanto, a lo largo de los años se han buscado enfoques alternativos para lograr la vitrificación sin necesidad de exponer los productos biológicos a altas concentraciones de CPA a temperatura no criogénica.

Se sabe que, con el fin de lograr la vitrificación criogénica a concentraciones de CPA más bajas, se requieren tasas de transferencia de calor ultrarrápidas. Las tasas de transferencia de calor pueden aumentarse reduciendo el volumen de la muestra y/o aumentando la tasa de enfriamiento. Se han utilizado varias técnicas para aumentar la tasa de enfriamiento, tales como el empleo de pajitas finas o películas ultrafinas para minimizar el volumen que va a vitrificarse. La solicitud de patente US 2013/0157250 A1, publicada el 20/6/2013, divulga un método para la vitrificación criogénica de espermatozoides humanos en baja concentración de CPA empleando una pajita fina. Más recientemente, aprovechando la alta conductividad térmica de los capilares de cristal de cuarzo (QC), la solicitud de patente US 2013/0260452 A, publicada el 3/10/2013, en la que N. Chakraborty es un inventor habitual, divulga un método para la vitrificación de células de mamíferos en medio de baja concentración de CPA a tasas de enfriamiento ultrarrápidas.

La vitrificación anhidra a temperaturas ambientales también puede ser una estrategia alternativa para conservar materiales biológicos. En la naturaleza, una gran variedad de organismos pueden sobrevivir a la deshidratación extrema, que en muchos casos se correlaciona con la acumulación de grandes cantidades (hasta el 20 % de su peso seco) de azúcares formadores de vidrio, tales como la trehalosa y la sacarosa, en el espacio intracelular. Tales azúcares "formadores de vidrio" tienen que estar presentes en ambos lados de la membrana plasmática para proporcionar protección contra los efectos dañinos de la desecación. Las técnicas de desecación limitan o detienen drásticamente los procesos bioquímicos del material en una matriz vítrea. A pesar del éxito en la vitrificación de muchos materiales biológicos, tales como las proteínas, mediante vitrificación anhidra, las aplicaciones más amplias a los materiales celulares siguen requiriendo que se aumente la tolerancia a la desecación de las células.

Los métodos para potenciar la tolerancia a la desecación incluyen la utilización de un medio de vitrificación mejorado que contenga trehalosa, glicerol y sacarosa. Aunque los métodos mejorados para cargar las células con agentes protectores son útiles, existe una necesidad adicional de desarrollar técnicas para minimizar las lesiones celulares durante la desecación. Las lesiones y la degradación pueden ser el resultado de la alta sensibilidad de las células en general a la exposición prolongada al estrés osmótico durante el procesamiento en seco. El estrés osmótico puede provocar la muerte de las células con un contenido de humedad relativamente alto, incluso en presencia de azúcares protectores tales como la trehalosa.

El enfoque más común para la desecación de células implica el secado en gotas sésiles con células en suspensión. Sin embargo, la desecación usando secado por evaporación de gotas sésiles es intrínsecamente lenta y no uniforme en la naturaleza. Se forma una piel vítrea en la superficie de contacto líquido/vapor de la muestra cuando las células se desecan en disoluciones formadoras de vidrio. Esta piel vítrea ralentiza y, en última instancia, impide una mayor desecación de la muestra más allá de un determinado nivel de sequedad e induce una importante falta de uniformidad espacial del contenido de agua en la muestra. Como resultado, las células atrapadas en la muestra parcialmente desecada bajo la piel vítrea pueden no vitrificarse sino degradarse debido a la alta movilidad molecular.

La patente estadounidense n.º 7.883.664, en la que N. Chakraborty es un inventor habitual, divulga un método para potenciar la tasa de desecación empleando secado por microondas. Además, la patente estadounidense n.º 8.349.252, en la que N. Chakraborty es un inventor habitual, divulga una composición vitrificada que comprende trehalosa para la vitrificación mediante secado por microondas. Sin embargo, el método no puede lograr un secado continuo ya que la temperatura del material biológico aumenta continuamente hasta niveles inseguros y requiere un complicado control del proceso. Chakraborty *et al.* también han empleado la técnica de secado por centrifugación para crear películas ultrafinas y vitrificar con éxito células de ovario de hámster en medio de trehalosa. Sin embargo, este enfoque todavía tiene las limitaciones de que la desecación no puede realizarse de manera uniforme en toda la

superficie de la muestra. Además, la película tiene que ser ultrafina para una vitrificación exitosa.

El artículo "Isothermal vitrification methodology development for non-cryogenic storage of archival human sera" de R. Less *et al.*, Cryobiology, 2013, vol. 66, páginas 176-185, divulga un enfoque que usa un filtro de microfibra de vidrio convencional para adsorber muestras de suero ya dopadas con una disolución lioprotectora para inducir una fuerza capilar en el suero.

El documento US 2004/0081588 A1 divulga un aparato de liofilización que comprende una cavidad dividida en un compartimento de liofilización y un compartimento de procesamiento al vacío, en el que la cara superior del compartimento de liofilización está fabricada con una membrana flexible de tamaño de poro controlado.

El desarrollo de una técnica de desecación rápida y práctica para lograr niveles de humedad finales muy bajos y uniformes en toda la muestra podría superar las deficiencias de las técnicas de vitrificación anhidra. La conservación en seco tiene una importante limitación en el almacenamiento a largo plazo debido a la degradación del material biológico por las tensiones químicas acumulativas que se producen cuando la disolución de vitrificación se concentra en el espacio extracelular. Esto da como resultado un daño celular irreversible antes de que las células y la disolución de vitrificación puedan alcanzar un contenido de humedad adecuadamente bajo para volverse vítreas. Por tanto, existe la necesidad de un medio de vitrificación mejorado para vitrificar los materiales biológicos mediante un secado rápido manteniendo la viabilidad del material. Un método de desecación rápida con una viabilidad celular mejorada facilitará enormemente el almacenamiento a largo plazo de materiales biológicos a temperaturas no criogénicas, así como superará los desafíos asociados a las tecnologías de vitrificación y almacenamiento criogénicas.

Sumario

El siguiente sumario se proporciona para facilitar la comprensión de la presente invención y no pretende que sea una descripción completa. Una apreciación completa de los diversos aspectos de la invención puede obtenerse tomando la memoria descriptiva completa, las reivindicaciones, los dibujos y el resumen como un todo. El alcance de la invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las realizaciones de la presente invención resuelven uno o más problemas de la técnica anterior proporcionando, en al menos una realización, un método para la eliminación rápida y uniforme de la humedad durante la vitrificación no criogénica de materiales biológicos.

En otra realización, que no forma parte de la presente invención, se proporciona una composición de vitrificación preferida para conservar la integridad estructural (fisiológica y/o molecular) del material biológico durante el secado rápido. Dicha composición de vitrificación comprende trehalosa, glicerol y un tampón iónico que contiene uno o más iones orgánicos grandes tales como colina y betina.

En aún otra realización, se proporciona un dispositivo de vitrificación no criogénica. El dispositivo de vitrificación comprende proporcionar un receptáculo con paredes que contienen una pluralidad de canales capilares y una cantidad necesaria de dichos materiales biológicos y un medio de vitrificación operativamente en contacto con las primeras aberturas de los canales capilares, y proporcionar un recinto operativamente en comunicación con las segundas aberturas de los canales capilares, así como con un ambiente externo en el que pueden controlarse la presión, la temperatura y la humedad dentro del recinto.

En aún otra realización adicional, que no forma parte de la presente invención, se proporciona un protocolo de vitrificación y almacenamiento a largo plazo de dichos materiales biológicos vitrificados. El protocolo incluye colocar una cantidad necesaria de dichos materiales biológicos con medio de vitrificación en un receptáculo que comprende una pluralidad de dichos canales capilares, emplear el método de vitrificación de la presente divulgación, empaquetar dicho receptáculo con materiales biológicos vitrificados en un recinto protector y almacenar dicho paquete a temperaturas entre -196 °C y 60 °C para su almacenamiento a largo plazo.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos no son necesariamente a escala; algunas características pueden exagerarse o minimizarse para mostrar detalles de componentes particulares. Por tanto, los detalles estructurales y funcionales específicos divulgados en el presente documento no deben interpretarse como limitativos, sino meramente como una base representativa para enseñar a un experto en la técnica a emplear de forma diversa la presente invención. Los aspectos a modo de ejemplo se entenderán más completamente a partir de la descripción detallada y los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 es un esquema a modo de ejemplo de la vitrificación de una gota sécil mediante desecación en un sustrato impermeable según al menos una técnica conocida;

la figura 2 es un esquema a modo de ejemplo que describe el mecanismo de secado asistido por capilaridad en el que la fuerza capilar actúa de manera opuesta a la gravedad y la segunda abertura está operativamente en comunicación con el ambiente de desecación según al menos una realización de la presente divulgación;

la figura 3 es un esquema a modo de ejemplo que describe el mecanismo de secado asistido por capilaridad en el que la fuerza capilar actúa en la misma dirección de la gravedad y la segunda abertura del canal capilar es hidrófoba y está operativamente en comunicación con el ambiente de desecación según al menos una realización de la presente divulgación;

la figura 4 es un esquema a modo de ejemplo que describe el mecanismo de secado asistido por capilaridad en el que la fuerza capilar actúa en la misma dirección de la gravedad y la segunda abertura del canal capilar es hidrófila y está operativamente en comunicación con el ambiente de desecación;

la figura 5 muestra una realización a modo de ejemplo de la vitrificación asistida por capilaridad de una gota sésil soportada por un sustrato que comprende una pluralidad de canales capilares según las enseñanzas de la presente divulgación;

la figura 6A muestra una realización a modo de ejemplo de un sustrato que comprende una pluralidad de canales capilares formados haciendo agujeros en el sustrato;

la figura 6B muestra una realización a modo de ejemplo de un sustrato que comprende una pluralidad de canales capilares formados por tejido;

la figura 7A muestra un resultado a modo de ejemplo de la desecación de ovocitos de ratón realizada según las presentes enseñanzas, en la que el medio de vitrificación carece del agente formador de vidrio trehalosa;

la figura 7B muestra un resultado a modo de ejemplo de la desecación de ovocitos de ratón realizada según las presentes enseñanzas, en la que la mezcla de vitrificación contiene trehalosa, HEPES, colina y betina;

la figura 8A ilustra la formación de cristales de hielo durante el secado rápido de películas ultrafinas que comprenden células de ovario de hámster chino en ausencia del agente de vitrificación trehalosa;

la figura 8B muestra la vitrificación completa durante el secado rápido de películas ultrafinas que comprenden células de ovario de hámster chino y medio de vitrificación que contiene células de ovario de hámster chino, HEPES 20 mM, ChCl 120 mM, trehalosa 1,8 M, betina 60 mM y agua;

la figura 9 muestra la temperatura de transición vítrea de un medio vitrificado que contiene células de ovario de hámster chino, trehalosa 1,8 M y agua;

la figura 10 muestra la temperatura de transición vítrea de un medio vitrificado que contiene células de ovario de hámster chino, HEPES 20 mM, ChCl 120 mM, trehalosa 1,8 M, betina 60 mM y agua;

la figura 11 demuestra la eficacia del tampón betina de grandes iones orgánicos en comparación con el tampón HEPES en la viabilidad de células de ovario de hámster chino vitrificadas desecadas en una caja seca convencional, donde los puntos brillantes corresponden a células vivas (verde) y los puntos grises más oscuros corresponden a células muertas (rojo);

la figura 12 muestra una realización a modo de ejemplo de un dispositivo de vitrificación asistida por capilaridad según las enseñanzas de la presente divulgación;

la figura 13 muestra otra realización a modo de ejemplo de un dispositivo de vitrificación asistida por capilaridad según las enseñanzas de la presente divulgación, en el que se proporcionan tubos/mechas capilares internos dentro de la mezcla de vitrificación;

la figura 14 muestra aún otra realización a modo de ejemplo de un dispositivo de vitrificación asistida por capilaridad según las enseñanzas de la presente divulgación, en el que se proporcionan múltiples cavidades con espacio de secado entre cavidades y una tapa común;

la figura 15 muestra la eficacia de retención de la integridad de la membrana celular de células de ovario de hámster chino cuando se desecan según las presentes enseñanzas en comparación con el método de desecación en caja seca convencional, donde el nivel de sequedad alcanzado al final del procedimiento se expresa en unidades de $\text{gH}_2\text{O/gdw}$ y 150 se refiere al tampón betina de secado por capilaridad, 154 se refiere al tampón betina, y 152 (círculos abiertos) se refiere al sistema de tampón HEPES-trehalosa;

la figura 16 muestra la capacidad de lograr un nivel de humedad extremadamente bajo mientras se conserva la integridad de la membrana celular de células de ovario de hámster chino cuando se desecan usando los métodos del ejemplo 1, ilustrando los datos 150 de la figura 15 en una escala ampliada donde el nivel de sequedad alcanzado al final del procedimiento se expresa en unidades de $\text{gH}_2\text{O/gdw}$; y

la figura 17 muestra la retención potenciada de la actividad de la insulina cuando se deseca según el método de vitrificación tal como se describe en el presente documento, donde la actividad de la insulina se midió mediante ELISA después de la rehidratación de las muestras, donde 170 ilustra el patrón, 172 ilustra los resultados después de la desecación usando una muestra de insulina 1 μ M, trehalosa 100 mM, glicerol al 5 % y 25 min de tiempo de desecación, y 176 ilustra insulina 1 μ M en trehalosa 100 mM, glicerol al 5 % y 0 min de tiempo de desecación.

Descripción detallada

Según sea necesario, en el presente documento se divulgan aspectos detallados de la presente invención; sin embargo, debe entenderse que los aspectos divulgados son meramente a modo de ejemplo de la invención que pueden realizarse en formas diversas y alternativas. La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Las figuras no son necesariamente a escala.

Se entenderá que, aunque los términos “primero”, “segundo”, “tercero”, etc., pueden usarse en el presente documento para describir diversos elementos, componentes, regiones, capas y/o secciones, estos elementos, componentes, regiones, capas y/o secciones no deben estar limitados por estos términos. Estos términos sólo se usan para distinguir un elemento, componente, región, capa o sección de otro elemento, componente, región, capa o sección. Por tanto, “un primer elemento”, “componente”, “región”, “capa” o “sección” que se menciona a continuación podría denominarse segundo (u otro) elemento, componente, región, capa o sección sin apartarse de las enseñanzas del presente documento.

La terminología usada en el presente documento tiene el propósito de describir únicamente realizaciones particulares y no pretende ser limitativa. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que las formas singulares “un” y “una” incluyan las formas plurales, incluyendo “al menos uno”, a menos que el contenido indique claramente lo contrario. “O” significa “y/o”. Tal como se usa en el presente documento, el término “y/o” incluye todas y cada una de las combinaciones de uno o más de los elementos enumerados asociados. Se entenderá además que los términos “comprende” y/o “que comprende” o “incluye” y/o “que incluye” cuando se usan en esta memoria descriptiva, especifican la presencia de las características, regiones, números enteros, etapas, operaciones, elementos y/o componentes indicados, pero no excluyen la presencia o adición de una o más de otras características, regiones, números enteros, etapas, operaciones, elementos, componentes y/o grupos de los mismos. El término “o una combinación de los mismos” significa una combinación que incluye al menos uno de los elementos anteriores.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos (incluyendo los términos técnicos y científicos) usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con conocimientos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta divulgación. Se entenderá además que los términos, tales como los definidos en los diccionarios de uso común, deben interpretarse con un significado que sea coherente con su significado en el contexto de la técnica pertinente y la presente divulgación, y no se interpretarán en un sentido idealizado o excesivamente formal a menos que se definan expresamente en el presente documento.

En esta memoria descriptiva se usan las siguientes unidades que no son del SI, que pueden convertirse a la unidad del SI o métrica respectiva según la siguiente tabla de conversión:

<i>Nombre de la unidad</i>	<i>Factor de conversión</i>	<i>Unidad del SI o métrica</i>
<i>pulgadas</i>	<i>2,54</i>	<i>cm</i>

Los siguientes términos o expresiones usados en el presente documento tienen los significados a modo de ejemplo enumerados a continuación en relación con al menos un aspecto:

“Amorfo” o “vidrio” se refiere a un material no cristalino en el que no existe un orden de largo alcance de las posiciones de los átomos referido a un parámetro de orden de 0,3 o menos. La solidificación de un sólido vítreo se produce a la temperatura de transición vítrea T_g . En algunos aspectos, el medio de vitrificación puede ser un material amorfo. En otros aspectos, el material biológico puede ser un material amorfo.

“Temperatura de transición vítrea” significa la temperatura por encima de la cual el material se comporta como un líquido y por debajo de la cual el material se comporta de manera similar a la de una fase sólida y entra en estado amorfo/vítreo. No se trata de un punto fijo de temperatura, sino que es variable en función de la escala de tiempo de la medición usada. En algunos aspectos, el estado vítreo puede referirse al estado en el que entra la composición biológica al caer por debajo de su temperatura de transición vítrea. En otros aspectos, el estado vítreo puede referirse al estado en el que entra la mezcla de vitrificación y/o el agente de vitrificación al caer por debajo de su temperatura de transición vítrea. En aún otros aspectos, el estado vítreo puede tener la rigidez mecánica de un cristal, pero la disposición desordenada aleatoria de las moléculas caracteriza a un líquido.

"Cristal" significa una estructura atómica, iónica o molecular tridimensional que consiste en una disposición geométrica específica y ordenada, que se repite periódicamente y que se denomina red cristalina o celda unitaria.

5 "Cristalino" significa la forma de una sustancia que está compuesta por constituyentes dispuestos en una estructura ordenada a nivel atómico, en contraposición a la forma vítrea o amorfa. La solidificación de un sólido cristalino se produce a la temperatura de cristalización T_c .

10 "Vitrificación", tal como se usa en el presente documento, es un procedimiento de conversión de un material en un material amorfo. El sólido amorfo puede estar libre de cualquier estructura cristalina.

"Mezcla de vitrificación", tal como se usa en el presente documento, significa una mezcla heterogénea de materiales biológicos y un medio de vitrificación que contiene agentes de vitrificación y, opcionalmente, otros materiales.

15 "Material biológico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a materiales que pueden aislarse o derivarse de organismos vivos. Los ejemplos de materiales biológicos incluyen, pero no se limitan a, proteínas, células, tejidos, órganos, constructos basados en células, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el material biológico puede referirse a células de mamíferos. En otros aspectos, el material biológico puede referirse a células madre mesenquimatosas humanas, células de fibroblastos murinos, plaquetas sanguíneas, bacterias, virus, membranas de células de mamíferos, liposomas, enzimas, o combinaciones de los mismos. En otros aspectos, el material biológico puede referirse a células reproductoras, incluyendo espermatozoides, espermatoцитos, ovocitos, óvulos, embriones, vesículas germinales, o combinaciones de los mismos. En otros aspectos, el material biológico puede referirse a sangre completa, glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, virus, bacterias, algas, hongos, o combinaciones de los mismos.

25 "Agente de vitrificación", tal como se usa en el presente documento, es un material que forma una estructura amorfa, o que suprime la formación de cristales en otro(s) material(es), a medida que la mezcla del agente de vitrificación y otro(s) material(es) se enfría o se deseca. El/los agente(s) de vitrificación también puede(n) proporcionar protección osmótica o permitir de otro modo la supervivencia de las células durante la deshidratación. En algunos aspectos, el/los agente(s) de vitrificación puede(n) ser cualquier disolución soluble en agua que produzca una estructura amorfa adecuada para el almacenamiento de materiales biológicos. En otros aspectos, el agente de vitrificación puede incorporarse dentro de una célula, un tejido o un órgano.

30 "Que puede almacenarse o almacenamiento", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de un material biológico de conservarse y permanecer viable para su uso en un momento posterior.

35 "Por encima de la temperatura criogénica", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una temperatura por encima de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperatura ambiente, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un intervalo de temperatura de entre $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

40 "Hidrófilo", tal como se usa en el presente documento, significa que atrae o se asocia preferentemente con las moléculas de agua. Los materiales hidrófilos con una afinidad especial por el agua maximizan el contacto con el agua y tienen ángulos de contacto más pequeños con el agua.

45 "Hidrófobo", tal como se usa en el presente documento, significa que carece de afinidad por el agua. Los materiales que son hidrófobos repelen naturalmente el agua, provocando la formación de gotas, y tienen pequeños ángulos de contacto con el agua.

50 "Capilaridad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a o se produce en o como si estuviera en un tubo de calibre fino que tiene un área de sección transversal de $2000\text{ }\mu\text{m}^2$ o menos.

A menudo, los materiales vitrificados se preparan enfriando rápidamente un material líquido, o pequeños volúmenes de materiales biológicos sumergidos directamente en nitrógeno líquido. El enfriamiento reduce la movilidad de las moléculas del material antes de que puedan empaquetarse en un estado cristalino más favorable termodinámicamente. Los aditivos que interfieren con la capacidad de cristalización del constituyente primario pueden producir un material amorfo/vitrificado. En presencia de agentes formadores de vidrio apropiados, es posible almacenar materiales biológicos en una matriz vitrificada por encima de las temperaturas criogénicas y la vitrificación puede lograrse mediante deshidratación.

60 Algunos animales y numerosas plantas son capaces de sobrevivir a una deshidratación completa. Esta capacidad de sobrevivir en estado seco (anhidrobiosis) depende de varios mecanismos genéticos y fisicoquímicos intracelulares complejos. Entre estos mecanismos se encuentra la acumulación intracelular de azúcares (por ejemplo, sacáridos, disacáridos, oligosacáridos) que actúan como protectores durante la desecación. La trehalosa es un ejemplo de disacárido producido de manera natural en los organismos tolerantes a la desecación.

65 Los azúcares tales como la trehalosa pueden ofrecer protección a los organismos tolerantes a la desecación de varias maneras diferentes. Una molécula de trehalosa puede sustituir eficazmente a una molécula de agua ligada por

hidrógeno de la superficie de una proteína plegada sin cambiar su geometría conformacional ni su plegado, debido a la ubicación única de los grupos hidroxilo en una molécula de trehalosa. Una molécula de azúcar también puede evitar la fuga citoplásmica durante la rehidratación al unirse a las cabezas de los fosfolípidos de la bicapa lipídica. Además, muchos azúcares tienen una alta temperatura de transición vítrea, lo que les permite formar un vidrio por encima de la temperatura criogénica o temperatura ambiente con un bajo contenido de agua. El estado "vítrea" altamente viscoso reduce la movilidad molecular, lo que a su vez impide las reacciones bioquímicas degradativas que conducen al deterioro de la función celular y a la muerte.

La vitrificación de materiales biológicos mediante deshidratación en presencia de trehalosa, un azúcar formador de vidrio, se ha divulgado por N Chakraborty, *et al.*, Biopreservation and Biobanking, 2010, 8 (2), 107-114. Con referencia a la figura 1, el sistema 10 es el enfoque más común para deshidratar un material biológico. Una gota 11 sésil se coloca en un sustrato 12 y se deseca por evaporación en un recinto 16 que tiene un ambiente 13 de baja humedad. La humedad, la presión y la temperatura dentro del recinto pueden controlarse operativamente mediante un dispositivo 17 de control. Sin embargo, la desecación usando secado por evaporación de las gotas sésiles del sistema 10 es intrínsecamente lenta y de naturaleza no uniforme. Se forma una piel 15 vítrea en la superficie 14 de contacto líquido/vapor de la muestra cuando los materiales biológicos se desecan en el medio formador de vidrio. Esta piel 15 vítrea ralentiza y, en última instancia, impide una mayor desecación de la muestra más allá de un determinado nivel de sequedad e induce una importante falta de uniformidad espacial del contenido de agua en la muestra. Como resultado, las células atrapadas en la muestra parcialmente desecada bajo la piel vítrea pueden no vitrificarse sino degradarse debido a la alta movilidad molecular.

La patente estadounidense n.º 7.883.664 y la patente estadounidense n.º 8.349.252, en las que N. Chakraborty es un inventor habitual, divulgan métodos para potenciar la tasa de desecación empleando calentamiento por microondas. Sin embargo, el método no puede lograr un secado continuo ya que la temperatura del material biológico aumenta continuamente hasta niveles inseguros y requiere un complicado control del proceso. Chakraborty *et al.* también han empleado la técnica de secado por centrifugación para crear películas ultrafinas y potenciar la tasa de desecación. Sin embargo, este enfoque todavía tiene las limitaciones del sistema 10, de la figura 1, y la desecación no puede realizarse de manera uniforme en toda la superficie de la muestra.

En vista de las limitaciones descritas anteriormente, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para la desecación rápida y uniforme de una mezcla de vitrificación. Un objeto de otro aspecto de la presente invención es proporcionar un dispositivo para realizar el método de manera eficiente.

Con referencia a la figura 2, cuando un capilar 24 de dimensión de sección transversal lineal y uniforme ($2r$, donde r es $\frac{1}{2}$ de la dimensión de sección transversal) se coloca en un medio líquido o una mezcla heterogénea que contiene líquido (por ejemplo, un medio poroso) 22, el nivel del líquido subirá en el capilar hasta una altura h que viene dada por:

$$h = \left(\frac{2\sigma}{\rho g r} \right) \cos \alpha; \quad (\text{Ec. 1})$$

donde, ρ es la densidad del líquido, σ es la tensión superficial, α es el ángulo de contacto, g es la gravedad, y la presión en la superficie de evaporación P_o = presión en el líquido P_i . En el interior del capilar existirá una presión negativa, conocida como potencial de succión, en el líquido. Inmediatamente por debajo del menisco 26, el potencial de succión será equivalente a la altura de la columna de líquido h . Esta es la altura a la que la cabeza gravitacional equilibra la fuerza impulsora capilar máxima que provoca el cese del flujo, y también podría considerarse como la longitud característica para un capilar dado. A medida que el líquido se evapora, el menisco 26 capilar descenderá dando lugar a una caída de cabeza o presión capilar h . El líquido fluirá hacia el capilar para compensar la pérdida de cabeza. La tasa de secado e_0 de uno (o más) capilares con un área de sección transversal total A que depende de la densidad de flujo q que fluye a través del capilar puede expresarse como:

$$e_0 A = q \pi r^2 \quad (\text{Ec. 2})$$

Si la densidad de flujo q no puede mantenerse a la par con la tasa de secado, el aire entra cada vez más profundamente en el capilar y reduce la presión capilar, así como la tasa de secado. Además, a altas tasas de evaporación a través de capilares finos, el flujo de líquido puede implicar una disipación viscosa significativa con una pérdida de cabeza que es proporcional a la velocidad de flujo.

Por tanto, la tasa de evaporación asistida por capilaridad se ve afectada tanto por la demanda atmosférica (humedad, temperatura y velocidad de aire/gas en la superficie de evaporación) como por (i) las características de los canales capilares que generan la fuerza capilar impulsora, (ii) la profundidad del menisco de líquido, y (iii) la resistencia viscosa al flujo a través del capilar. Por consiguiente, las interacciones complejas y altamente dinámicas entre las propiedades capilares, los procedimientos de transporte y las condiciones límite dan como resultado una amplia gama de comportamientos de evaporación. Para el secado rápido, los parámetros clave son: (1) las condiciones que respaldan la formación y sostienen una red de líquido en la superficie de evaporación y (2) las características que promueven la

formación de una presión capilar que induce un flujo suficiente para suministrar agua en la superficie de evaporación. En el aspecto 20 de la figura 2, el gradiente de presión capilar hacia la superficie se opone a las fuerzas gravitacionales y a la disipación viscosa, mientras que el gradiente de presión capilar está respaldado por un diámetro capilar más pequeño, así como por un ángulo de contacto más pequeño o por un material capilar hidrófilo. Hay que tener en cuenta que cuanto menor es el diámetro capilar, mayor es la disipación viscosa. Para lograr una tasa de evaporación óptima, deben equilibrarse cuidadosamente el ángulo de contacto o la humectabilidad, la longitud y el diámetro del canal capilar.

En referencia a la figura 3, el aspecto 30 proporciona un método de secado por capilaridad donde el secado se realiza en un soporte que incluye canales 34 capilares. Por tanto, la fuerza gravitacional, en lugar de oponerse al gradiente de presión capilar, se convierte en aditiva. Como resultado, el diámetro capilar puede ampliarse, reduciendo la disipación viscosa que controla la tasa de evaporación. Además, el menisco de líquido/vapor permanece siempre fuera del capilar, impidiendo la entrada de aire en el mismo, lo que permite un secado constante hasta la desecación completa. Tal como se mencionó anteriormente, un ángulo de contacto menor o un material capilar hidrófilo favorece una mayor cabeza capilar y es preferible. Sin embargo, no se prefiere un material capilar totalmente hidrófilo para un mejor secado. En referencia a la figura 4, en el aspecto 40, un material capilar hidrófilo promovería la propagación del agua en la punta 46 y formaría una capa límite de humedad reduciendo la tasa de evaporación. Por el contrario, un capilar 34 hidrófilo con una punta 36 hidrófoba del aspecto 30 de la figura 3 proporciona características mejoradas para el secado. Sin embargo, todavía puede lograrse un secado significativo en ausencia de esta combinación.

En referencia a la ecuación 1, la altura capilar se estimó basándose en el supuesto de que las presiones a ambos lados de la superficie de contacto son iguales, es decir, $P_o = P_i$. Sin embargo, una presión reducida en la superficie de contacto de evaporación, es decir, $P_o < P_i$, puede ayudar adicionalmente a la fuerza capilar y mejorar la tasa de secado, así como el nivel de secado. Esto es particularmente importante hacia el final del procedimiento, cuando el nivel de humedad es bajo y la fuerza capilar por sí sola no puede mantener una red de líquido en la superficie de evaporación.

En referencia a la figura 5, que ilustra condiciones favorables para el secado asistido por capilaridad, el aspecto 50 divulga un método para la vitrificación de materiales biológicos, comprendiendo el método: proporcionar una pluralidad de canales capilares que forman una placa/membrana 53 capilar, teniendo los canales capilares una primera abertura 54 y una segunda abertura 56; colocar una mezcla 52 de vitrificación en la primera abertura 54, exponiendo además las segundas aberturas 56 y la superficie 59 de la mezcla de vitrificación a una atmósfera 58 circundante que tiene una humedad inferior a la de la mezcla de vitrificación; y desecar dicha mezcla de vitrificación por acción capilar hasta que dicha mezcla de vitrificación entre en un estado vítreo. La química, la humedad, la presión y la temperatura dentro del recinto 55 se controlan mediante un mecanismo 57 de control.

El mecanismo 57 de control se simplifica con propósitos de ilustración únicamente y puede tener múltiples sistemas y mecanismos para lograr las condiciones más favorables para la desecación y vitrificación. En algunos aspectos, una segunda placa/membrana capilar similar a la 53 se coloca directamente encima la mezcla 52 de vitrificación para beneficiarse del método de secado asistido por capilaridad de la presente divulgación en la superficie superior de la mezcla 52 de vitrificación. Sin embargo, la gravedad no favorecerá la fuerza capilar en la parte superior. En algunos aspectos, se proporciona un flujo de gas de baja humedad (menos del 30 % de humedad relativa) a través de las segundas aberturas 56 de la placa/membrana capilar para potenciar el efecto capilar. Como gas de baja humedad pueden usarse gases inertes o relativamente inertes, tales como nitrógeno, argón, xenón, u otros. En algunos aspectos, se mantiene una presión reducida o un vacío dentro del recinto 55. En algunos aspectos, se proporciona una fuerza/presión de succión a través de la segunda abertura 56 para lograr una mayor velocidad de desecación. Cabe señalar que mantener un ambiente de baja humedad (opcionalmente un 5 % de humedad relativa o menos) es esencial para evitar la rehidratación después de la desecación.

En referencia a la figura 6A, en el aspecto 60, la placa/membrana capilar incluye un sustrato 62 con agujeros 64 cilíndricos que forman una pluralidad de canales capilares. Debe observarse que se muestran canales rectos, sustancialmente paralelos, con propósitos de ilustración únicamente, los canales realmente usados pueden tener cualquier forma de sección transversal y configuración adecuadas para el propósito, ilustrativamente ovalada, circular, poligonal, irregular, u otra forma. Con propósitos de ilustración, la figura 6B muestra un aspecto 65 donde los canales 69 de sección transversal cuadrada están formados por hilos 67 de tejido. La placa/membrana de secado por capilaridad es lo suficientemente fina y resistente como para proporcionar una baja disipación viscosa y a la vez contener los materiales biológicos durante el procedimiento de desecación.

Un canal capilar tiene una longitud definida opcionalmente por el grosor de un sustrato que forma los canales o por uno o una pluralidad de los propios canales individuales. Una longitud de canal capilar es opcionalmente de un milímetro o menos, pero no está limitada a esta especificación. Opcionalmente, una longitud de canal capilar está entre 0,1 micrómetros y 1000 micrómetros, o cualquier valor o intervalo entre los mismos. Opcionalmente, una longitud de canal capilar es de 5-100 micrómetros, opcionalmente de 1-200 micrómetros, opcionalmente de 1-100 micrómetros. Una longitud de canal capilar es opcionalmente de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 micrómetros. En algunos aspectos, la longitud de los canales capilares varía a lo largo de una pluralidad de canales capilares, opcionalmente en una variación no uniforme.

El área de sección transversal del/de los canal(es) capilar(es) será de $2000 \mu\text{m}^2$ o menos. Opcionalmente, el área de sección transversal es de desde $0,01 \mu\text{m}^2$ hasta $2000 \mu\text{m}^2$, opcionalmente de $100 \mu\text{m}^2$ a $2000 \mu\text{m}^2$, o cualquier valor o intervalo entre los mismos. Opcionalmente, un área de sección transversal del/de los canal(es) capilar(es) es de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o $2000 \mu\text{m}^2$ o menos. Según la reivindicación 1, cada uno de los canales capilares tiene un área de sección transversal de 0,01 a 100 micrómetros cuadrados.

Opcionalmente, el/los canal(es) capilar(es) de la invención tendrá(n) una dimensión, opcionalmente un diámetro, de sección transversal lineal de 0,1-10 micrómetros, o cualquier valor o intervalo entre los mismos. Para los canales que no son de sección transversal circular, esto correspondería a un área de sección transversal de 0,01 micrómetros cuadrados a 100 micrómetros cuadrados.

La placa/membrana de secado por capilaridad puede estar constituida por un material que no sea tóxico para los biomateriales y que no reaccione química o físicamente con el medio de vitrificación. Puede ser un polímero, un metal, una cerámica, un vidrio, o una combinación de los mismos, adecuado. Se prefieren los polímeros inertes o sus compuestos. En algunos aspectos, la membrana capilar se forma a partir de polidimetilsiloxano (PDMS), policarbonato, poliuretano, poliéster (por ejemplo, poli(tereftalato de etileno)), entre otros. Los ejemplos ilustrativos de una membrana que contiene canales capilares adecuada como superficie en los dispositivos y procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen membranas de filtración hidrófilas tales como las comercializadas por EMD Millipore, Bellerica, MA. Una placa/membrana de secado por capilaridad se forma opcionalmente a partir de un material no reactivo con el material biológico o con el agente de vitrificación, o con otros reactivos/materiales usados en el sistema. Una placa/membrana de secado por capilaridad no reactiva no se unirá a, ni alterará ni producirá de otro modo una asociación química o física con un componente del medio de vitrificación (por ejemplo, una muestra biológica). Opcionalmente, una placa/membrana de secado por capilaridad no está derivatizada. Opcionalmente, los canales capilares pueden formarse en un sustrato de material y grosor deseados mediante técnicas de formación de PDMS, perforación con láser, u otra técnica de formación de orificios conocida en la técnica.

La presencia de agentes de vitrificación adecuados en la mezcla de vitrificación es fundamental a medida que la mezcla se deseca. El método de desecación rápida por sí mismo no garantiza la viabilidad de las células u otro material biológico vitrificado. Se requiere que un material/agente de vitrificación forme cristales, o suprima la formación de cristales en otros materiales. El/los agente(s) de vitrificación también puede(n) proporcionar protección osmótica o permitir de otro modo la supervivencia de las células durante la deshidratación. En referencia a la figura 7A, las estructuras 72 dendríticas indeseables y dañinas que significan cristalización, así como el ovocito 70 comprometido/dañado, pueden verse en la muestra cuando se desecó empleando el método de la presente divulgación en ausencia de cualquier agente de vitrificación formador de vidrio. Los detalles del protocolo experimental se proporcionan en el ejemplo 2.

Los ejemplos ilustrativos de un agente de vitrificación incluyen, pero no se limitan a, dimetilsulfóxido, glicerol, azúcares, polialcoholes, metilaminas, betinas, proteínas anticongelantes, agentes antinucleantes sintéticos, poli(alcohol vinílico), ciclohexanotrioles, ciclohexanodíoles, sales inorgánicas, sales orgánicas, líquidos iónicos, o combinaciones de los mismos. Un medio de vitrificación contiene opcionalmente 1, 2, 3, 4, o más agentes de vitrificación.

El medio de vitrificación incluye un agente de vitrificación a una concentración que depende de la identidad del agente de vitrificación. Opcionalmente, la concentración del agente de vitrificación está a una concentración que está por debajo de la que será tóxica para la muestra biológica que está vitrificándose, cuando la toxicidad es tal que no se logra la viabilidad funcional o biológica en el uso posterior de la muestra. La concentración de un agente de vitrificación es opcionalmente de $500 \mu\text{M}$ a 6 M, o cualquier valor o intervalo entre los mismos. Para el agente de vitrificación trehalosa, la concentración es opcionalmente de 1 M a 6 M. Opcionalmente, la concentración total de todos los agentes de vitrificación cuando se combinan es opcionalmente de 1 M a 6 M.

El medio de vitrificación incluye opcionalmente agua u otro disolvente, un agente de tamponamiento, una o más sales u otros componentes. Un agente de tamponamiento es cualquier agente con un pK_a de 6 a 8,5 a 25°C . Los ejemplos ilustrativos de agentes de tamponamiento incluyen HEPES, TRIS, PIPES, MOPS, entre otros. Un agente de tamponamiento se proporciona a una concentración adecuada para estabilizar el pH del medio de vitrificación a un nivel deseado.

En referencia a la figura 7B, se logró una vitrificación completa cuando los ovocitos de ratón se desecaron empleando el método de la presente divulgación utilizando una mezcla de vitrificación que contenía trehalosa (1,8 M), glicerol, colina y betina (60 mM). La integridad del ovocito 75 es evidente y representa los beneficios del método 77 de vitrificación asistida por capilaridad divulgado en el presente documento. La importancia de un medio de vitrificación apropiado se ilustra además en las figuras 8A y 8B. Incluso a las rápidas tasas de desecación posibles en las películas ultrafinas (secado por centrifugación tal como el que se usa en los métodos anteriores, tal como se ilustra en la figura 1) no se garantiza una vitrificación homogénea, y la figura 8A muestra la formación de cristales 84 de hielo en la mezcla de vitrificación que comprende células de ovario de hámster chino (CHO) pero sin agente formador de vidrio. Por el contrario, el medio de vitrificación que comprende trehalosa, HEPES, ChCl y betina dio como resultado un material 86 biológico uniformemente vitrificado bajo la configuración de películas ultrafinas (secado por centrifugación) tal como

se muestra en la figura 8B. En comparación con el secado por centrifugación, el método de desecación asistida por capilaridad divulgado en el presente documento no restringe la mezcla de material biológico a adaptarse a la forma de película ultrafina para lograr tasas de desecación muy rápidas de 3 gH₂O/gdw/min - 2 gH₂O/gdw/min.

La trehalosa, un azúcar formador de vidrio, se ha empleado en la vitrificación anhidra y puede proporcionar tolerancia a la desecación de varias maneras. En referencia a la figura 9, la calorimetría diferencial de barrido muestra que una trehalosa 1,8 M vitrificada en agua tiene una temperatura 90 de transición vítrea de -15,43 °C. Para lograr la vitrificación por encima del punto de congelación del agua, 0 °C, esta concentración no es ideal y se requieren concentraciones más altas (6-8 M) que podrían ser perjudiciales para los materiales biológicos. En referencia a la figura 10, una mezcla vitrificada que incluye trehalosa 1,8 M, HEPES 20 mM, ChCl 120 mM y betina 60 mM muestra una temperatura 100 de transición vítrea de +9 °C. Además se advierte la influencia de los agentes de tamponamiento. Tal como se muestra en la figura 11, el uso del tampón betina que contiene grandes iones orgánicos muestra una influencia notable en el recuento 110 de células de ovario de hámster chino (CHO) vivas/muertas después de 40 minutos de desecación en una caja seca convencional en comparación con el uso de HEPES 112, que también contiene grandes iones orgánicos. Las placas 114 y 116 lo subrayan adicionalmente en cuanto a recuentos de células vivas y muertas después de 55 minutos.

Un medio de vitrificación a modo de ejemplo para el método de vitrificación asistida por capilaridad divulgado en el presente documento puede incluir trehalosa, y uno o más agentes de tamponamiento que contengan iones orgánicos grandes (>120 kDa) tales como colina o betina o HEPES, así como agente(s) de tamponamiento que contenga(n) iones pequeños tales como K o Na o Cl. La influencia de esta composición del medio de vitrificación en la integridad de la membrana celular bajo el método de desecación rápida de la presente divulgación, donde pueden alcanzarse instantáneamente niveles de humedad ultrabajos (por ejemplo, 0,1 gH₂O/gdw o menos), se ilustra además en las figuras 15 y 16 usando un medio de vitrificación que incluye trehalosa (para conservar/estabilizar las biomoléculas grandes), glicerol (para conservar/estabilizar las biomoléculas pequeñas y evitar la movilidad molecular en los espacios intersticiales), y un tampón cloruro de colina. Esta composición a modo de ejemplo no limita el alcance del uso de formulaciones alternativas para el método divulgado en el presente documento.

El método de vitrificación asistida por capilaridad puede realizarse a una temperatura de desde -80 °C hasta +60 °C. El intervalo de temperatura es opcionalmente donde la movilidad de las moléculas de agua en la muestra es alta y la temperatura no es perjudicial para la salud ni la viabilidad del material biológico. Esto variaría de un material a otro, así como la composición del medio de vitrificación. En algunos aspectos, la temperatura de vitrificación es de 0,1 °C a 40 °C. Opcionalmente, la temperatura de vitrificación es de 4 °C a 26 °C. Opcionalmente, la temperatura de vitrificación es de 25 °C.

El método de vitrificación asistida por capilaridad puede realizarse en una atmósfera o ambiente seco. Un ambiente seco es un ambiente con un nivel de humedad inferior a la saturación. En algunos aspectos, el nivel de humedad del ambiente, tal como el ambiente en el segundo lado del tubo capilar, es del 30 % de humedad relativa o menos, opcionalmente el 20 % o menos, opcionalmente el 10 % o menos, opcionalmente el 5 % o menos. Un ambiente seco tiene opcionalmente una humedad de entre el 1 % y el 30 % o cualquier valor o intervalo entre los mismos, opcionalmente entre el 1 % y el 5 %.

El método de vitrificación asistida por capilaridad puede realizarse en un ambiente de baja presión (menos de 1 atm (760 mmHg)). Un ambiente de baja presión tendrá un impacto favorable en la tasa de vitrificación. La presión ambiental es opcionalmente de 100 mmHg o 0,1 atm. Opcionalmente, la presión ambiental es de desde 10 mmHg hasta 760 mmHg, o cualquier valor o intervalo entre los mismos. Opcionalmente, la presión ambiental es de desde 10 mmHg hasta 200 mmHg.

El método de vitrificación asistida por capilaridad puede realizarse durante un tiempo de desecación. Un tiempo de desecación es un tiempo suficiente para promover un secado adecuado para vitrificar el medio de vitrificación. Un tiempo de desecación es opcionalmente de 1 segundo a 1 hora. Opcionalmente, un tiempo de desecación es de 1 segundo a 50 min, opcionalmente de 5 segundos a 60 min. El tiempo de desecación puede variar según el tipo de muestra o las características físicas y las particularidades de los canales capilares.

Los beneficios del método de vitrificación asistida por capilaridad divulgado en el presente documento se ilustran además en la figura 17. Cuando las muestras de insulina se desecan de forma idéntica en ausencia de agente de vitrificación, se produce una pérdida significativa de actividad, 174, en comparación con las desecadas en presencia de agente de vitrificación, 172. Además, la presencia del propio agente de vitrificación no es suficiente para conservar la actividad de la insulina, 176, sin desecación. En general, puede conservarse un nivel significativo de actividad de la insulina siguiendo el método de vitrificación asistida por capilaridad divulgado en el presente documento. Diversos materiales proteicos pueden estabilizarse siguiendo el método de vitrificación asistida por capilaridad divulgado en el presente documento. Se aprecia que estos materiales biológicos vitrificados pueden sellarse en paquetes protectores, para su transporte y almacenamiento a largo plazo. Además, algunas de las muestras biológicas vitrificadas pueden almacenarse a temperaturas ambientales sin necesidad de una cadena de frío. Pueden utilizarse tras su rehidratación. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, insulina, interleucina 1, interleucina 2, vacunas contra el tétanos y la hepatitis, etc.

En referencia a la figura 12, el aspecto 120 ilustra un dispositivo de vitrificación no criogénica de material biológico a modo de ejemplo para aprovechar los beneficios del método de vitrificación asistida por capilaridad tal como se proporciona en el presente documento, que incluye: un receptáculo 126 constituido por una placa/membrana de secado por capilaridad de la presente divulgación, que tiene una primera abertura capilar en el interior del receptáculo y una segunda abertura capilar en el exterior del receptáculo; una tapa 127 desmontable constituida por una placa/membrana de secado por capilaridad de la presente divulgación para llenar una cantidad necesaria de dicha mezcla 125 de vitrificación dentro del receptáculo en el que dicha mezcla de vitrificación está operativamente en contacto con las primeras aberturas de los canales capilares; y un recinto 121 operativamente en comunicación gaseosa con las segundas aberturas de los canales capilares, así como con un ambiente externo en el que pueden controlarse operativamente la presión, la temperatura y la humedad dentro del recinto. La superficie exterior del receptáculo 126 mantiene un espacio 128 desde el límite del recinto 121 mediante la colocación de separadores 124 perforados para facilitar el flujo de gas y la acción de desecación. Una vista ampliada del separador 124 se muestra en 1245.

El recinto del aspecto 120 es impermeable a la humedad y al gas y tiene entrada(s) 122 y salida(s) 123 sellable(s). La(s) entrada(s) y salida(s) sellable(s) permite(n) el flujo de gas a través de la superficie exterior del receptáculo o mantiene(n) una presión reducida a través de la misma con el fin de potenciar la acción de desecación. Puede haber una o una pluralidad de entradas o salidas. El mecanismo de sellado puede ser mecánico, basado en adhesivo o por consolidación térmica (sellado por calor). El método de vitrificación asistida por capilaridad puede llevarse a cabo *in situ* conectando la(s) entrada(s) y salida(s) a dispositivos adecuados que puedan controlar la humedad, la presión y la temperatura dentro del recinto. Se consigue una desecación muy rápida gracias a un área de contacto capilar más grande con la mezcla de vitrificación desde todos los lados. Esto también permite la vitrificación de mayores volúmenes de mezcla de vitrificación, lo que constituye una grave limitación de los métodos y sistemas anteriores. En general, el grosor de la muestra será de 1 centímetro o menos. Opcionalmente, el grosor será de aproximadamente 1 milímetro o menos. Se entiende que la especificación del grosor del aspecto 120 es a lo largo del eje vertical de la imagen y puede intercambiarse en un constructo tridimensional. El método puede realizarse en un área grande.

Una vez completado el procedimiento de desecación hasta un nivel de humedad deseado, la entrada y la salida se sellan para evitar la rehidratación del material vitrificado. Alternativamente, pero que no forma parte de la presente invención, el receptáculo puede utilizarse para desecar la mezcla de vitrificación en una cámara independiente empleando el método divulgado en el presente documento y luego sellarse en el recinto 121. El dispositivo 120 puede configurarse en un dispositivo portátil en el que, opcionalmente, la tapa 127 superior y el recinto externo a lo largo de la línea 122 y 123 de sello pueden retirarse y adherirse a la superficie de aplicación. Son posibles muchas configuraciones y aplicaciones. Pueden encontrarse ejemplos ilustrativos de un dispositivo portátil en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2011/0054285 A1.

En referencia a la figura 13, se proporciona un potenciamiento adicional al dispositivo en otro aspecto 130, en el que se proporcionan una pluralidad de tubos/mechas 139 capilares en comunicación operativa con la mezcla de vitrificación y el ambiente del recinto con el fin de potenciar la acción de desecación. Esta característica adicional permitiría la desecación de un volumen más espeso de la mezcla de vitrificación. Debe hacerse una distinción entre los canales capilares de la presente divulgación y el tubo 139 capilar. El dispositivo 139 capilar puede ser un cilindro hueco que comprende las características del receptáculo 136 tal como se muestra en 1395. Como tal, un tubo puede imaginarse como un sustrato sustancialmente tubular de canales capilares que se extiende dentro de la muestra para aumentar eficazmente el área de superficie del ambiente externo a la muestra. El extremo del tubo en contacto con la mezcla de vitrificación está opcionalmente cerrado. Alternativamente, también puede utilizarse una mecha que comprenda canales capilares; sin embargo, se prefiere un tubo. La mayoría de las discusiones relativas al aspecto 120 también son aplicables al aspecto 130 y se repiten.

En referencia a la figura 14, se proporciona un aspecto 140 adicional que incluye un receptáculo formado por múltiples cavidades 144 con espacio de secado entre cavidades y una tapa 142 común con el fin de potenciar la acción de desecación. Alternativamente, cada cavidad puede tener también tapas individuales. Las especificaciones 141 y 145 constituyen el recinto externo y 143 es la mezcla de vitrificación que incluye la muestra. Aunque las entradas y salidas del dispositivo no se muestran en la imagen, el dispositivo funciona según las enseñanzas de la presente divulgación y las discusiones relativas al aspecto 120 y 130 son aplicables a este aspecto. Además, los tubos/mechas capilares del aspecto 130 también pueden desplegarse en este aspecto. Los dispositivos de los aspectos 120, 130 y 140 son suficientemente flexibles y reconfigurables para convertirse en un dispositivo portátil.

El tiempo que un material biológico puede permanecer viable en estado vitrificado durante el almacenamiento por encima de la temperatura criogénica puede variar de un material de muestra a otro. En algunos aspectos, un material biológico puede permanecer viable mientras se almacena por encima de la temperatura criogénica durante 2-20 días. En otros aspectos, un material biológico puede permanecer viable mientras se almacena por encima de la temperatura criogénica durante 10 semanas. En otros aspectos, un material biológico puede permanecer viable mientras se almacena por encima de la temperatura criogénica durante hasta un año. En otros aspectos, un material biológico puede permanecer viable mientras se almacena por encima de la temperatura criogénica durante hasta 10 años.

Alternativamente, después de la vitrificación por encima de las temperaturas criogénicas empleando las enseñanzas y los dispositivos de la presente divulgación, el material biológico vitrificado puede almacenarse a temperaturas criogénicas durante periodos muy largos. Para muchos materiales biológicos, este es un enfoque preferido para evitar la criolésion que comúnmente se produce durante la vitrificación directa a temperaturas criogénicas. Un enfoque preferido en un aspecto es vitrificar los materiales biológicos a temperatura ambiente utilizando bajas concentraciones de agentes de vitrificación (por ejemplo, trehalosa <2 M) y luego almacenar inmediatamente a temperaturas criogénicas. Por tanto, dicho dispositivo está opcionalmente constituido por materiales almacenables a una temperatura de entre -196 °C y 60 °C tras la vitrificación según las enseñanzas de la presente divulgación.

Se ilustran beneficios adicionales del método y los dispositivos divulgados en las figuras 15 y 16. En referencia a la figura 15, se compara la integridad de la membrana celular de células de ovario de hámster chino (CHO) desecadas a diferentes niveles de humedad. Los círculos 152 abiertos representan la integridad de la membrana frente al nivel de humedad mientras se deseca una mezcla de vitrificación que comprende trehalosa 1,8 M con tampón HEPES en una caja seca convencional. Tal como puede observarse, la membrana celular está completamente destruida cuando el nivel de humedad alcanza 1 gH₂O/gdw. Cuando se utilizó el tampón betina en el procedimiento de desecación en caja seca, la integridad de la membrana representada por los círculos 154 cerrados mejoró en comparación con el tampón HEPES; sin embargo, las membranas estaban casi destruidas cuando la humedad alcanzó el nivel de 1 gH₂O/gdw. Los beneficios del método de desecación rápida asistida por capilaridad divulgado en el presente documento se ilustran mediante los círculos 150 cerrados que demuestran que la integridad de la membrana se conserva en gran medida incluso cuando el nivel de humedad ha alcanzado un nivel extremadamente bajo que no es factible en los procedimientos de desecación en caja seca convencionales. Los niveles de humedad que pueden alcanzarse mediante el método divulgado se ilustran además en la figura 16. Mientras que el tampón betina ayuda en la conservación de la integridad de la membrana, el procedimiento de desecación rápida de la presente divulgación vitrifica los materiales biológicos incluso antes de darse cuenta, lo que es en gran parte responsable de la conservación de su integridad.

Ejemplos útiles para la comprensión de la invención

1. Experimentos con células de ovario de hámster chino (CHO):

Cultivo de células: se obtuvieron células de ovario de hámster chino (CHO) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA), y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Atlanta Biologicals, Norcross, GA) y penicilina-estreptomicina al 2 % (penicilina G 10 U/ml y sulfato de estreptomicina 10 µg/ml, Invitrogen, Carlsbad, CA). Se mantuvieron los cultivos en matraces T de 25 cm² (Corning Incorporated, NY) a 37 °C y se equilibraron con el 10 % de CO₂-el 90 % de aire. Tras el cultivo de células hasta la confluencia deseada del 70 %, se tripsinizaron las células, se sedimentaron y se volvieron a dispersar para crear una concentración de 1x10⁵ células/ml en DMEM.

Montaje del dispositivo: se creó una colada de PDMS que tenía unas dimensiones de 0,25 pulgadas x 0,38 pulgadas con una cavidad circular central (0,05 pulgadas) y se colocó sobre la misma una membrana de polipropileno (obtenida de Sterlitech Corporation, Kent, WA) que tenía tamaños de poro de 5 µm y un grosor de 100 µm. Estos poros proporcionaban la acción capilar deseada para desecar las células. Se utilizó este montaje como dispositivo capilar. Se alojó toda la configuración dentro de un recinto construido a medida (poliestireno, 6x8x6 pulgadas) que contenía una atmósfera de baja humedad (~2 % de HR) y se purgó con nitrógeno de calidad médica para evitar la captación de humedad a través de la superficie abierta de la muestra. Se colocó una tapa unida a una microbomba controlada por ordenador (Dolomite, Charlestown, MA) en la cavidad para facilitar la rápida eliminación de la humedad de las muestras a través de los canales capilares.

Desecación: tras colocar una muestra de 20 µl de células suspendidas a una concentración de 1x10⁵ células/ml encima del sustrato capilar, se puso en marcha la microbomba (1 ml/min) para desecar la muestra. La desecación de la muestra biológica tuvo lugar en el plazo de 5 segundos. Se realizaron los experimentos de desecación con muestras celulares sin agentes formadores de vidrio tales como la trehalosa, así como con un medio de vitrificación que comprendía HEPES: 20 mM, ChCl: 120 mM, trehalosa: 1,8 M, betina: 60 mM, y se ajustó el pH con sales de potasio a 7,2 (SAMADHI). También se realizaron experimentos comparativos en sustratos de cuarzo sin emplear el dispositivo capilar en una caja seca convencional que contenía poca humedad y se purgó con nitrógeno de calidad médica. Tras la desecación, se extrajeron las muestras celulares y se evaluó la integridad de la membrana.

Cuantificación de la humedad residual: se realizó análisis gravimétrico a granel del contenido de agua de las muestras usando una balanza analítica de alta precisión (Mettler Toledo XP Ultra Microbalance, Columbus, OH). Se midieron los pesos inicial y final de las muestras y se usaron para calcular el contenido de humedad. Se determinaron los pesos secos de las muestras mediante cocción en un horno de vacío a una temperatura inferior a la temperatura de transición vítrea de la trehalosa (~90 °C) durante 8 h.

Evaluación de la viabilidad: se determinó la integridad de la membrana usando ensayos de integridad de la membrana con Syto-13/bromuro de etidio (Molecular Probes, Eugene, OR). Se preparó la disolución madre para la tinción con

Syto-13/bromuro de etidio añadiendo 10 µl de disolución (ac.) de Syto-13 1 mg/ml y 5 µl de disolución (ac.) de bromuro de etidio 1,0 mg/ml a 8 ml de DMEM sin rojo de fenol ni suero (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA). Tras la rehidratación, se añadieron 500 µl de disolución de Syto-13/bromuro de etidio a las células adheridas a los cubreobjetos, y se incubaron las muestras a 37 °C durante 5 min. A continuación, se obtuvieron imágenes de estas muestras con un microscopio invertido (Carl Zeiss Biosystems, Oberkochen, Alemania) usando filtros FITC y PI. Se determinó la viabilidad celular inmediatamente después de la rehidratación con esta técnica contando las células vivas (verde) y muertas (rojo) en siete imágenes representativas tomadas en diferentes lugares del cubreobjetos. En la figura 11 se presentan resultados ilustrativos.

2. Experimentos con ovocitos de ratón:

Animales: se adquirieron ratones hembra B6D2F1 de seis semanas de edad de Charles River Laboratories (Boston, MA, EE. UU.). Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo con la aprobación del comité de cuidado y uso de animales.

Extracción de ovocitos: se superovularon los ratones hembra B6D2F1 de 6 semanas de edad con 7,5 UI de gonadotrofina de suero de yegua preñada (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) y 7,5 UI de gonadotrofina coriónica humana (Sigma-Aldrich) administradas mediante inyecciones intraperitoneales con 48 horas de diferencia. Catorce horas después de la inyección de gonadotrofina coriónica humana, se anestesiaron las hembras con Avertin (Sigma-Aldrich) y luego se sacrificaron por dislocación cervical y se les extirparon los oviductos. Se liberó el complejo cúmulo-ovocito de la región ampular de cada oviducto mediante la punción del oviducto con una aguja de calibre 27. Se retiraron las células del cúmulo mediante la exposición a hialuronidasa (80 UI/ml) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EE. UU.) durante 3 min y se lavaron tres veces con medio de fluido tubárico humano (HTF) (Irvine Scientific) con suero bovino fetal al 10 % (FBS; Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.). Se transfirieron los ovocitos y se cultivaron en medio HTF (Quinn *et al.* 1995) con FBS al 10 % a 37 °C y el 5 % de CO₂ en aire hasta que se vitrificaron por desecación.

Desecación: se realizaron experimentos de desecación empleando el dispositivo capilar descrito en el ejemplo 1 anterior y siguiendo los mismos protocolos.

3. Experimentos con insulina:

Materiales y métodos: la disolución de insulina humana químicamente definida, recombinante a partir de *Saccharomyces cerevisiae*, con una concentración de 10 mg/ml se obtuvo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) y se almacenó a 4 °C. La trehalosa dihidratada de alta pureza y baja concentración de endotoxina se obtuvo de Pfanstiehl (Cleveland, OH) y el glicerol se adquirió de Sigma-Aldrich. Se diluyó la insulina en serie hasta producir una disolución madre con una concentración de insulina de 25 µg/ml en agua destilada UltraPure™ y se añadió la disolución a la disolución a base de trehalosa previamente agitada con vórtex. Una disolución a base de insulina en agua destilada independiente sin trehalosa ni glicerol se designó como grupo de control. Tanto las disoluciones experimentales como las de control se almacenaron a 4 °C. Se usó una membrana hidrófila de EMD Millipore (Billerica, MA) con un tamaño de poro de 0,22 µm como sustrato capilar. Se colocaron todas las muestras en una cámara de vacío que se conectó a una bomba rotativa de paletas Edwards RV3 de dos etapas (Crawley, Reino Unido) y a una columna de desecación Drierite. A continuación, se secaron las muestras a base de insulina continuamente a vacío durante 25 minutos a una presión de entre -27 y -30 pulgadaHg. Tras el secado, se extrajeron las muestras y volvieron a pesarse para determinar la cantidad de pérdida de agua debida al secado. Se calculó la razón de humedad residual (gH₂O/gdw) de todas las muestras desecadas para cuantificar la eficiencia del procedimiento de desecación. Tras la desecación, se rehidrataron todas las muestras en 4 veces la cantidad de agua destilada perdida como resultado del secado. Al mismo tiempo, se rehidrataron las muestras “no desecadas” de la disolución de insulina a base de trehalosa en agua destilada para que sirvieran como punto de referencia de la actividad proteica para las muestras desecadas. Se siguió el protocolo de ELISA proporcionado por el proveedor (Life Technologies), tras el cual se leyó y analizó la placa de microtitulación que contenía los patrones y todos los grupos de muestras mediante el espectrómetro de microplacas Epoch 2 (BioTek Instruments, Winooski, VT) con el software de análisis de datos Gen5 relacionado que genera lecturas de densidad óptica (DO) que representan la actividad proteica. Los resultados se ilustran en la figura 17.

Aunque se han ilustrado y descrito aspectos de la invención, no se pretende que estos aspectos ilustren y describan todas las formas posibles de la invención. Más bien, pueden realizarse diversas modificaciones y sustituciones a los mismos sin apartarse del alcance de la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Bibliografía de documentos de patente

Documento US 6.808.651 B1 10/2004 Katagiri, *et al.*

Documento US 7.883.664 B2 2/2011 G. Elliott; N. Chakraborty.

Documento US 8.349.252 B2 1/2013 G. Elliott; N. Chakraborty.

Documento US 2013/0157250 A1 6/2013 Gutiérrez *et al.*

Documento US 2013/0260452 A1 10/2013 Toner *et al.*

Bibliografía no de patentes

- 5 Chakraborty N, Menze MA, Malsam J, Aksan A, Hand SC, *et al.* (2011) Cryopreservation of Spin-Dried Mammalian Cells, PLoS ONE 6(9): e24916.
- 10 Chakraborty N, Biswas D, Elliott GD (2010) A Simple Mechanistic Way to Increase the Survival of Mammalian Cells During Processing for Dry Storage, Biopreservation and Biobanking, 8 (2), 107-114.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la vitrificación de uno o más materiales biológicos por encima de la temperatura criogénica, comprendiendo el método:
 - a) proporcionar una membrana capilar que comprende una pluralidad de canales capilares, teniendo cada uno de dichos canales capilares una primera abertura (54) y una segunda abertura (56), en el que la pluralidad de canales capilares están alojados en un sustrato y están unidos juntos para formar la membrana capilar y en el que cada uno de dichos canales capilares tiene un área de sección transversal de 0,01-100 micrómetros cuadrados;
 - b) proporcionar una mezcla (52) de vitrificación, comprendiendo dicha mezcla de vitrificación uno o más materiales biológicos y un medio de vitrificación;
 - c) poner en contacto dicha membrana capilar con dicha mezcla de vitrificación de modo que la membrana capilar entre en contacto con una superficie de la mezcla de vitrificación, entrando en contacto la membrana capilar con la mezcla de vitrificación de modo que la primera abertura de dichos canales capilares esté operativamente en contacto con dicha mezcla de vitrificación;
 - d) dichas segundas aberturas de dichos canales capilares operativamente en comunicación con una atmósfera (58) circundante que tiene una humedad inferior a la de dicha mezcla de vitrificación; y
 - e) desecar dicha mezcla de vitrificación por acción capilar hasta que dicha mezcla de vitrificación entre en un estado vítreo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha membrana capilar tiene un grosor de 1 micrómetro a 500 micrómetros.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha mezcla de vitrificación comprende trehalosa, glicerol y betina y/o colina.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además la etapa adicional de proporcionar un flujo de gas a través de dichas segundas aberturas.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho gas es aire o gas inerte con un nivel de humedad relativa del 30 % o menos.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que dicha membrana capilar está constituida por un material hidrófilo.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa adicional de encerrar dicha mezcla de vitrificación en un estado vítreo en un recinto protector, siendo dicho recinto impermeable al agua y al aire, y almacenar dicho recinto protector a una temperatura entre -196 °C y +60 °C durante un tiempo de almacenamiento de 20 días o más.
8. Dispositivo de vitrificación no criogénica que comprende:
 - un receptáculo con paredes que comprenden una pluralidad de canales capilares que tienen, cada uno, una primera abertura y una segunda abertura, en el que la pluralidad de canales capilares están alojados en un sustrato y están unidos juntos para formar una membrana capilar, en el que la membrana capilar está constituida por un material hidrófilo y en el que la membrana capilar está dispuesta de modo que, cuando se coloca una mezcla de vitrificación en el receptáculo, la mezcla de vitrificación está operativamente en contacto con las primeras aberturas de dichos canales capilares; y
 - un recinto operativamente en comunicación con las segundas aberturas de dichos canales capilares, así como con un ambiente externo en el que pueden controlarse la presión, la temperatura y la humedad dentro del recinto.

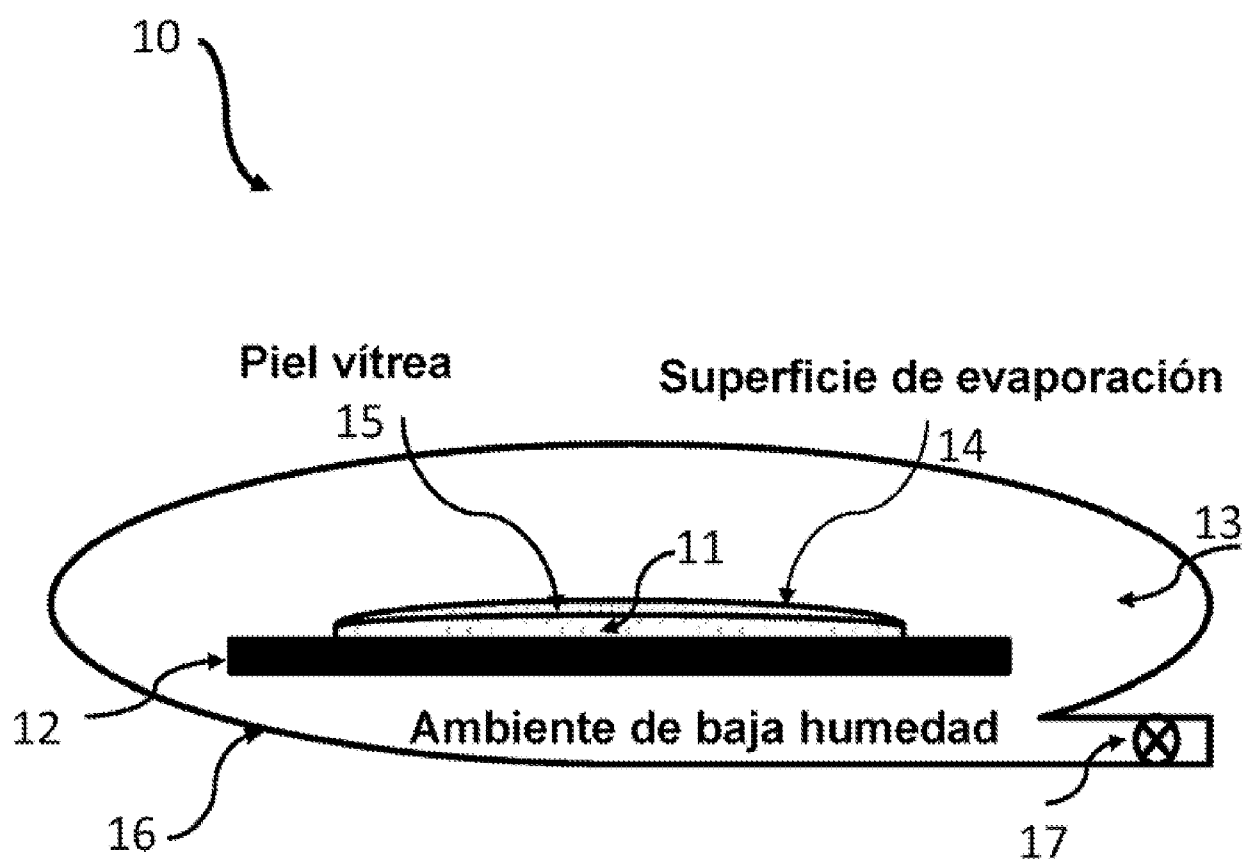


FIG. 1
Técnica anterior

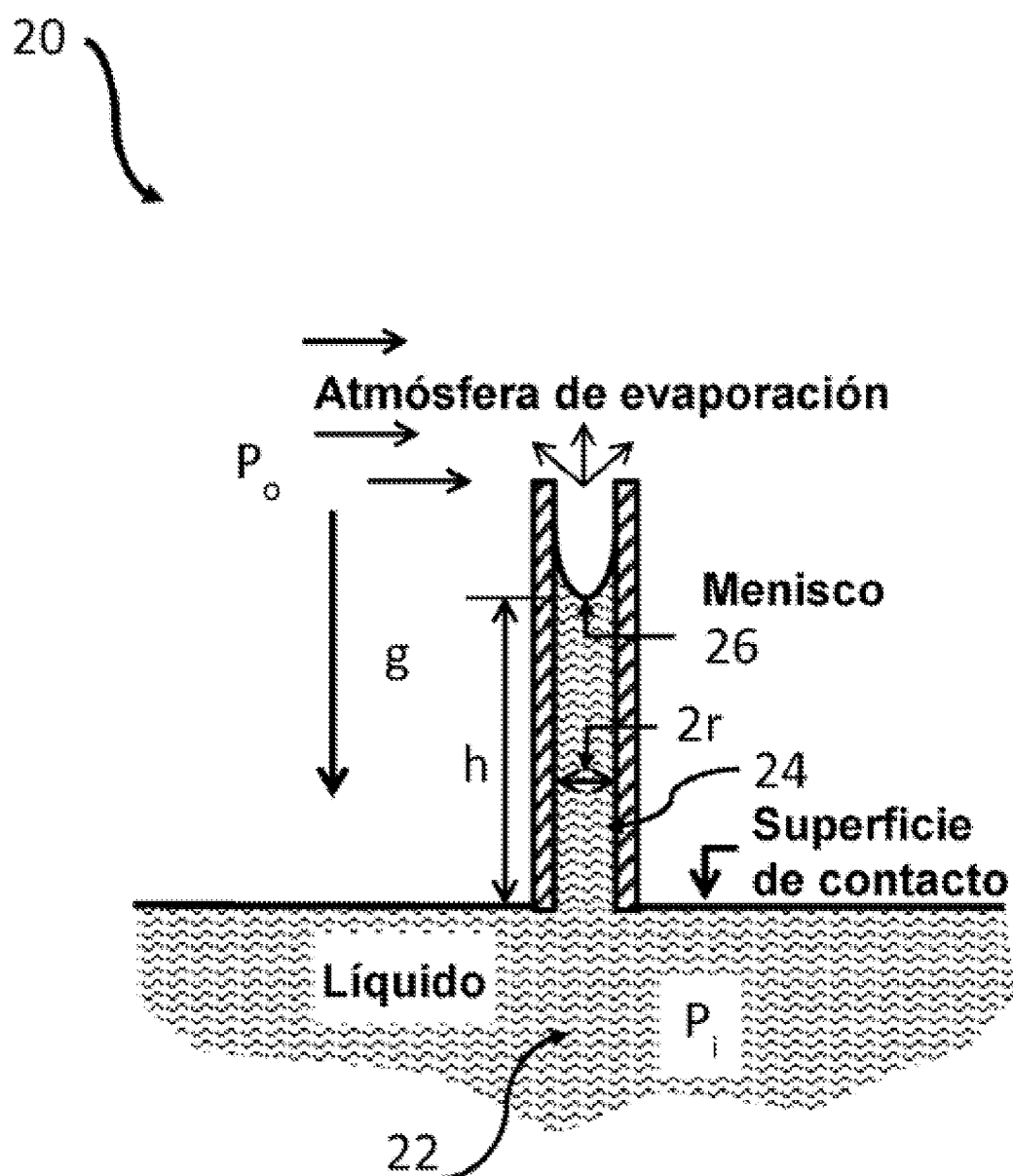


FIG. 2

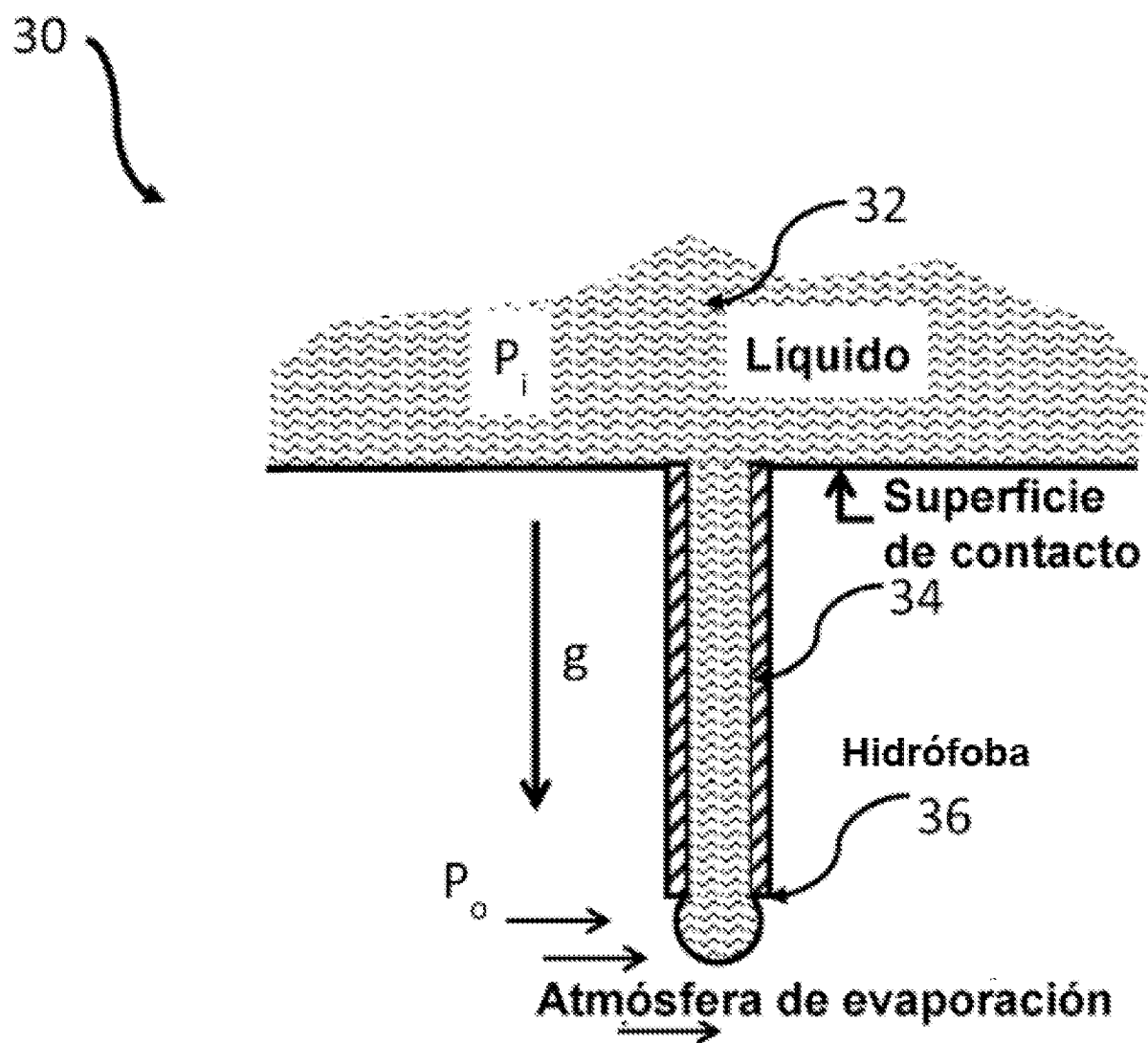


FIG. 3

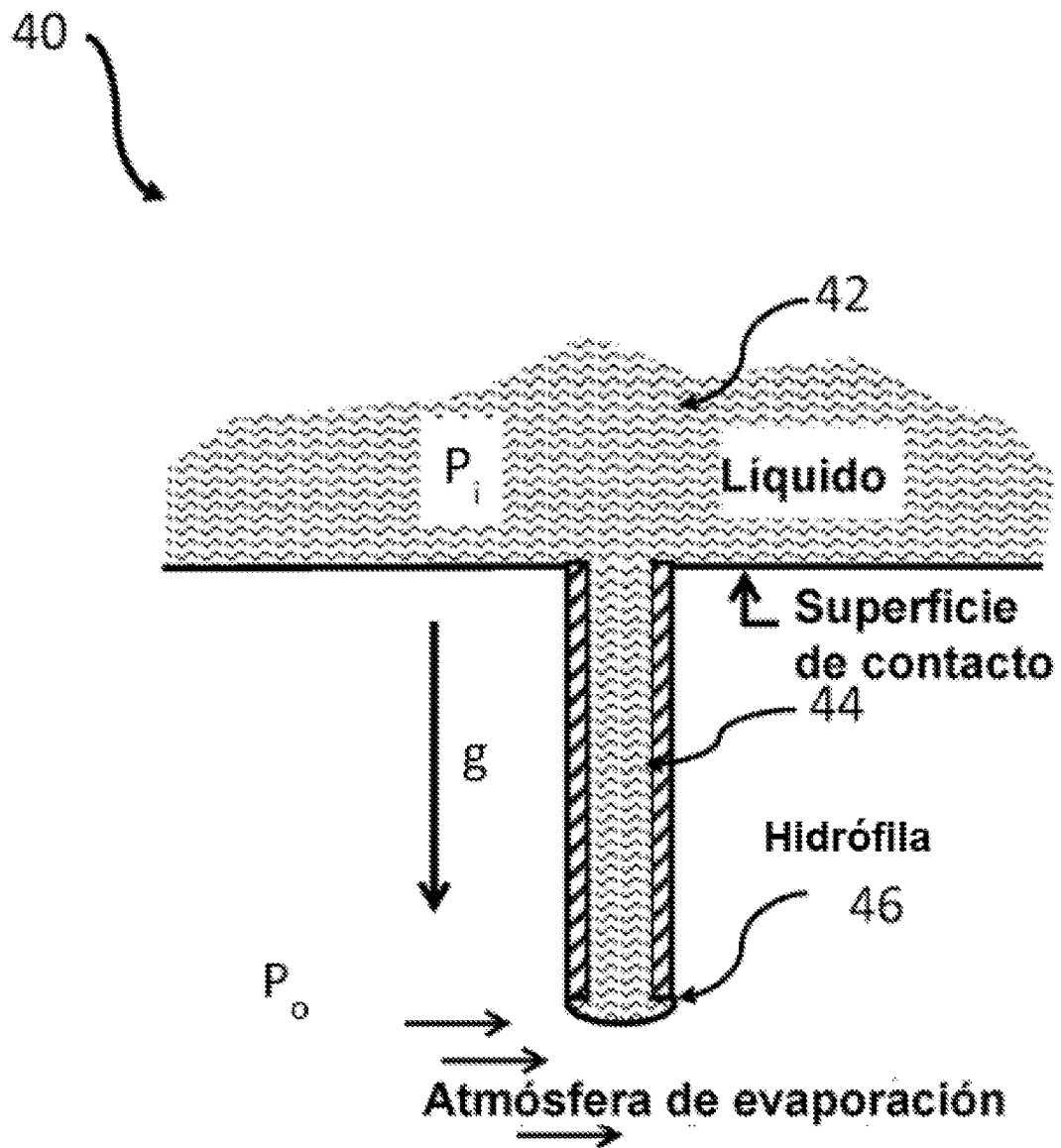


FIG. 4

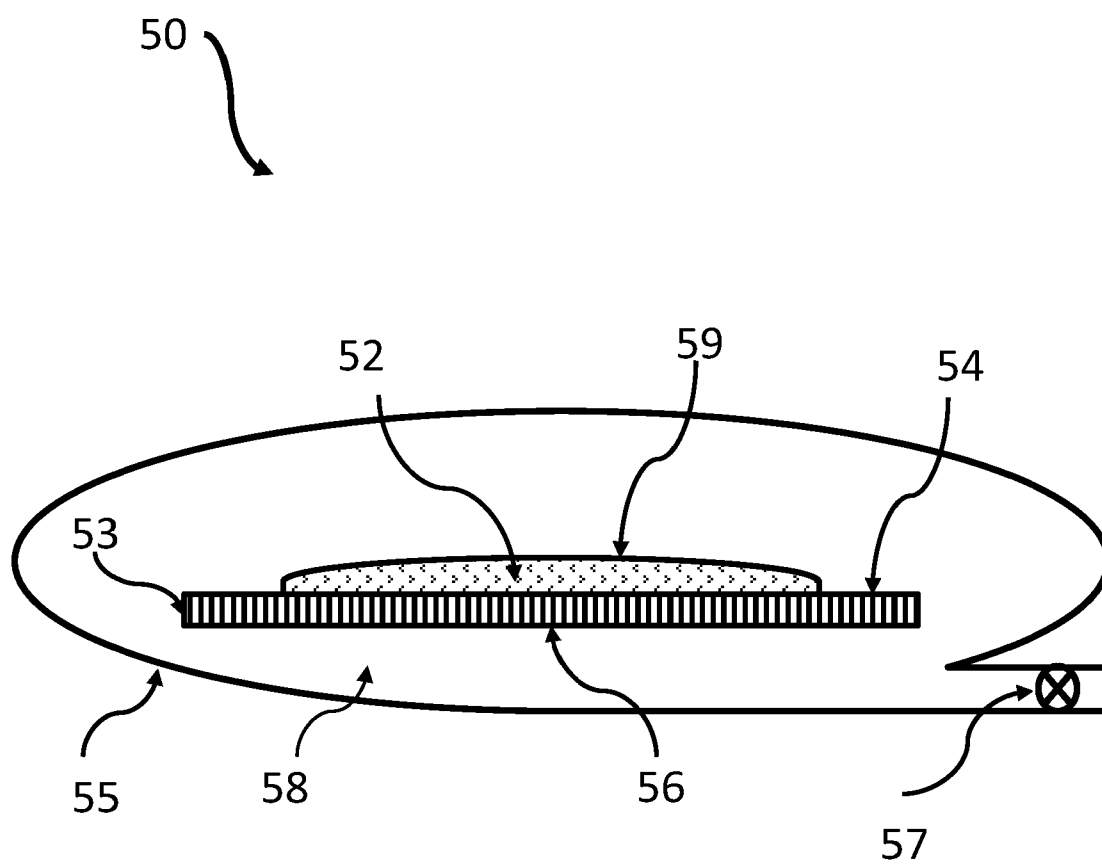


FIG. 5

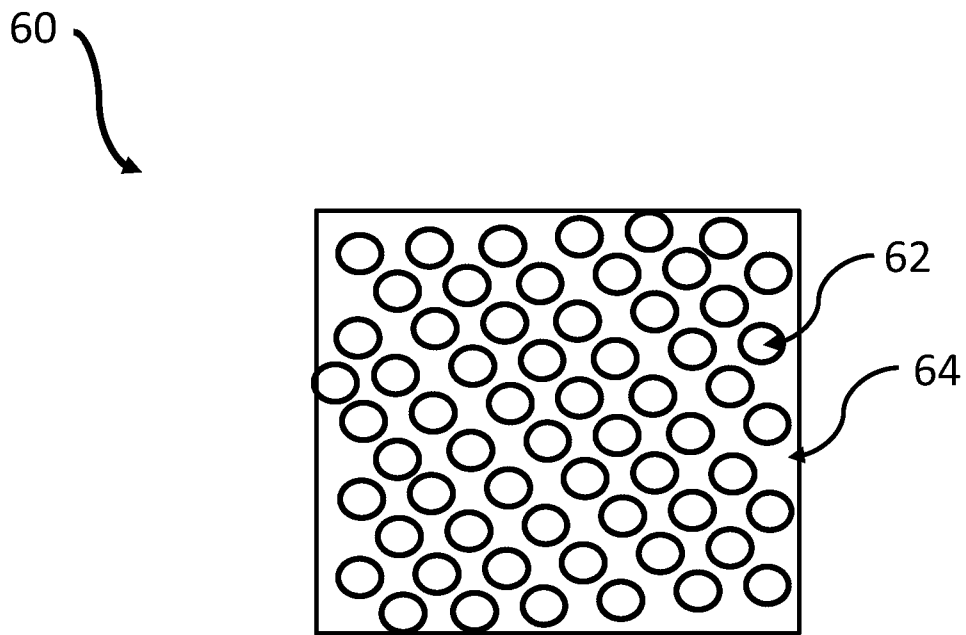


FIG. 6A

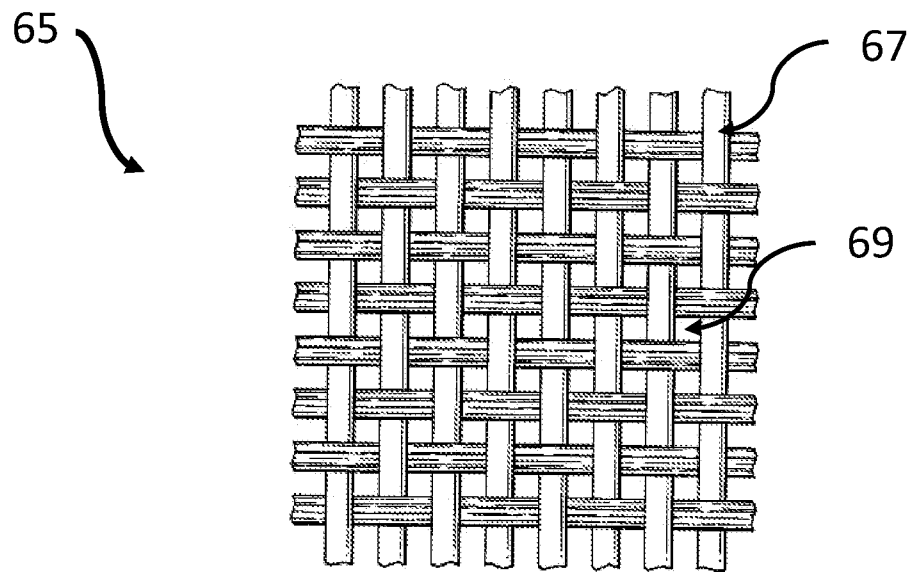


FIG. 6B

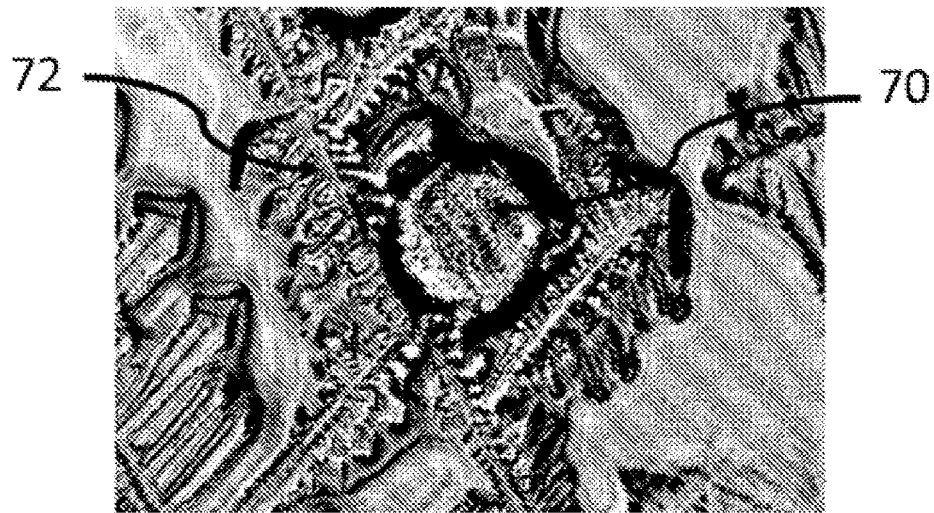


FIG. 7A

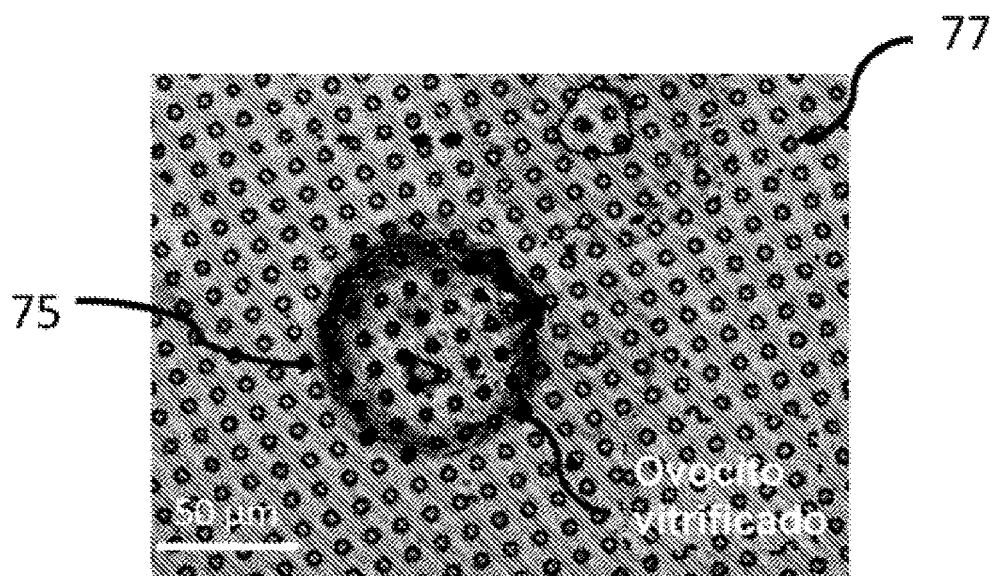


FIG. 7B

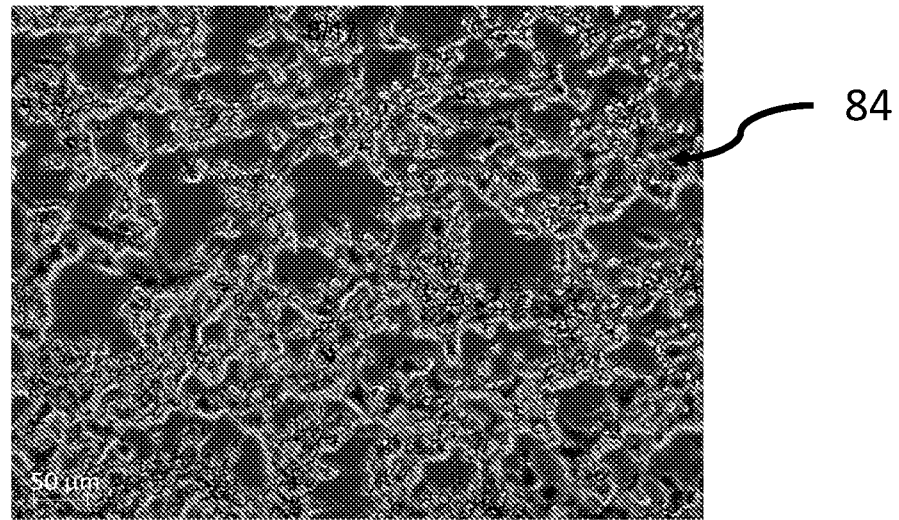


FIG. 8A

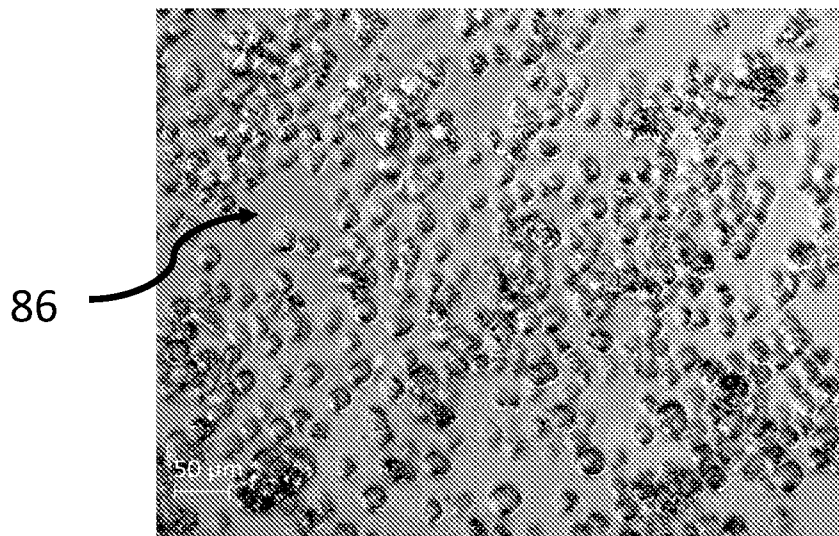


FIG. 8B

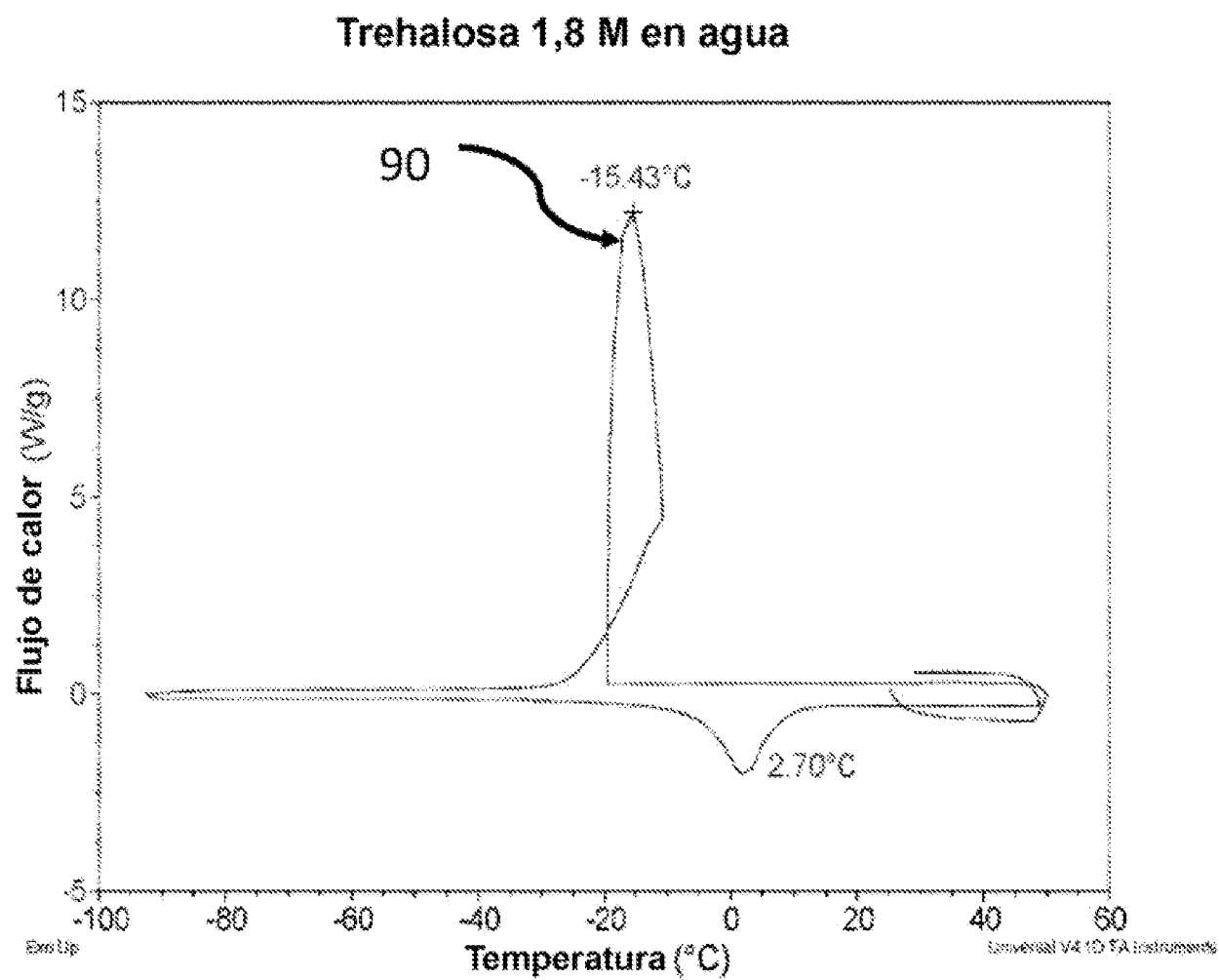


FIG. 9

Trehalosa: 1.8M, HEPES: 20mM, ChCl: 120mM, **Betina**: 60mM

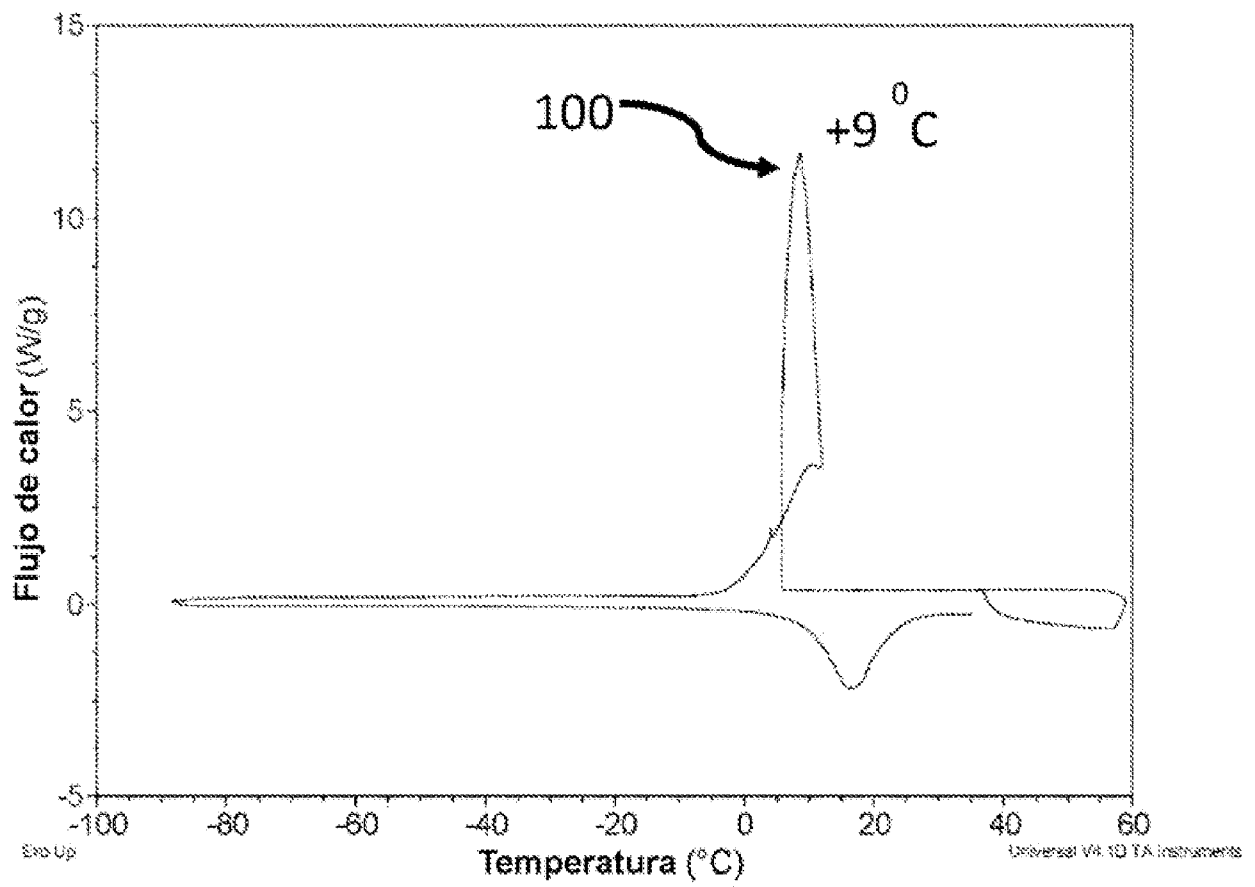


FIG. 10

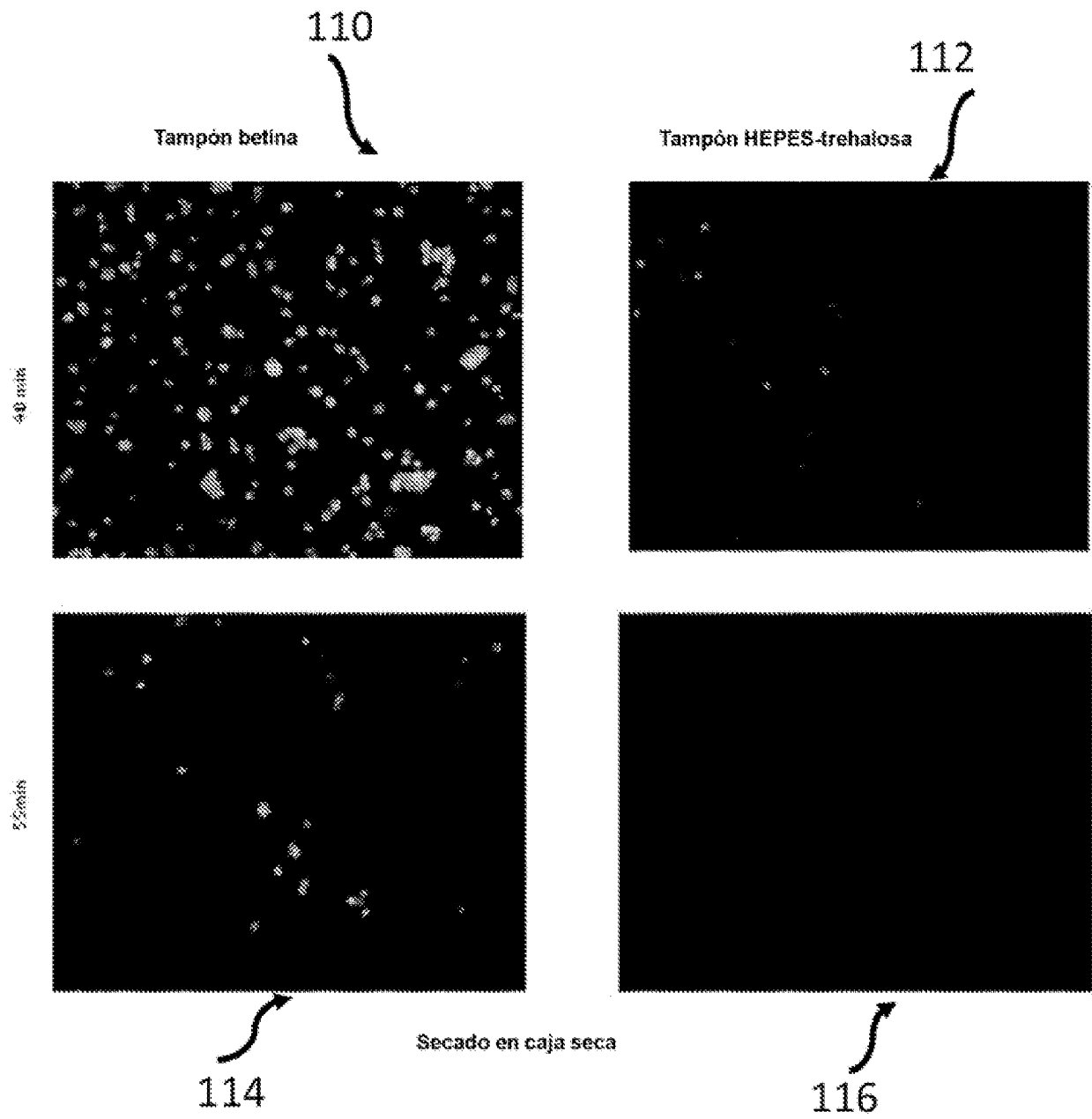


FIG. 11

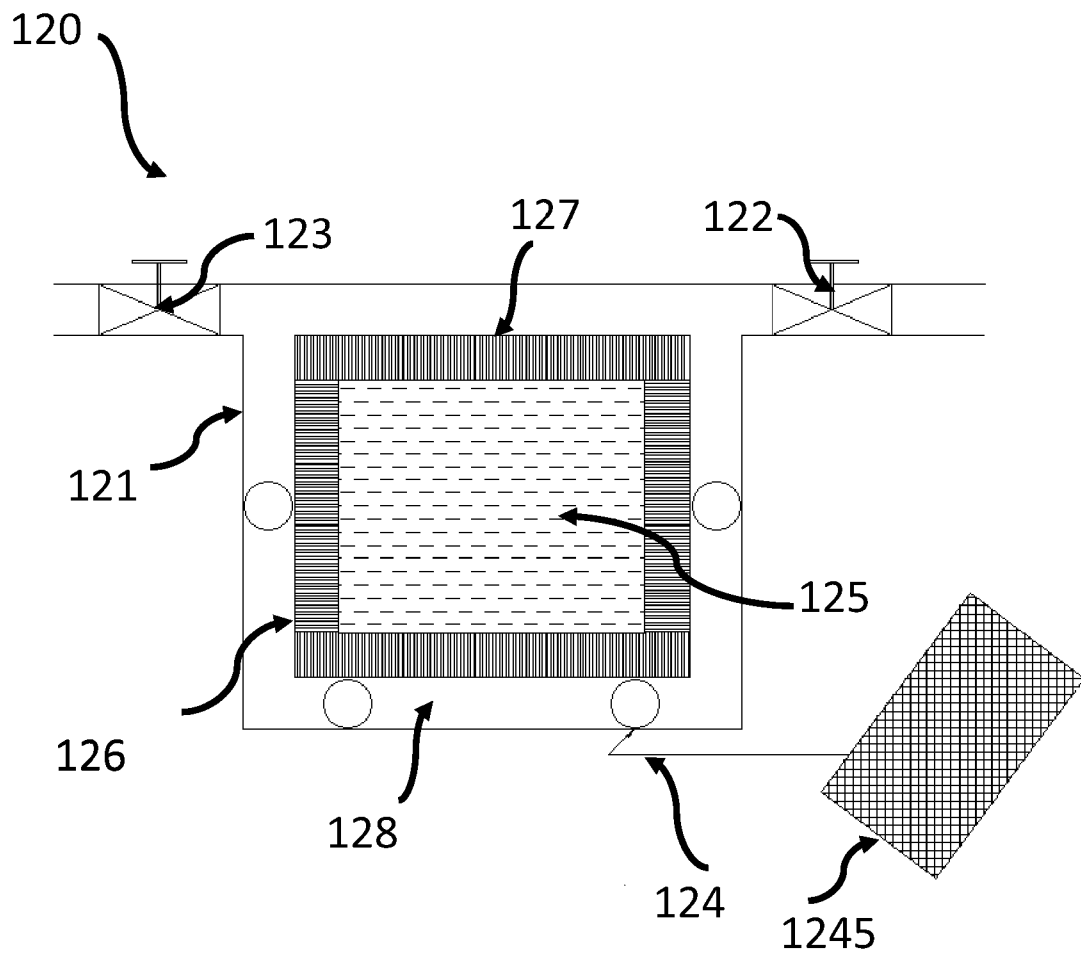


FIG. 12

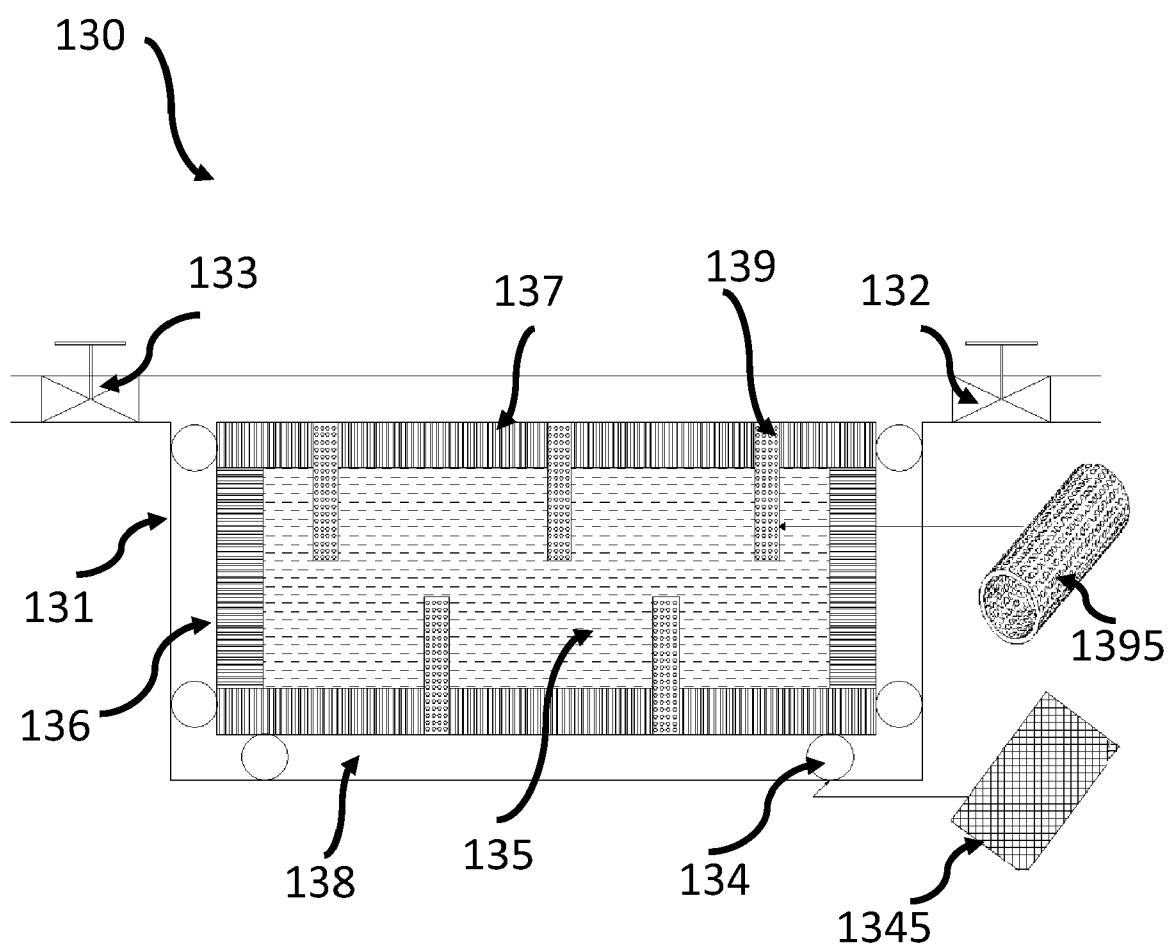


FIG. 13

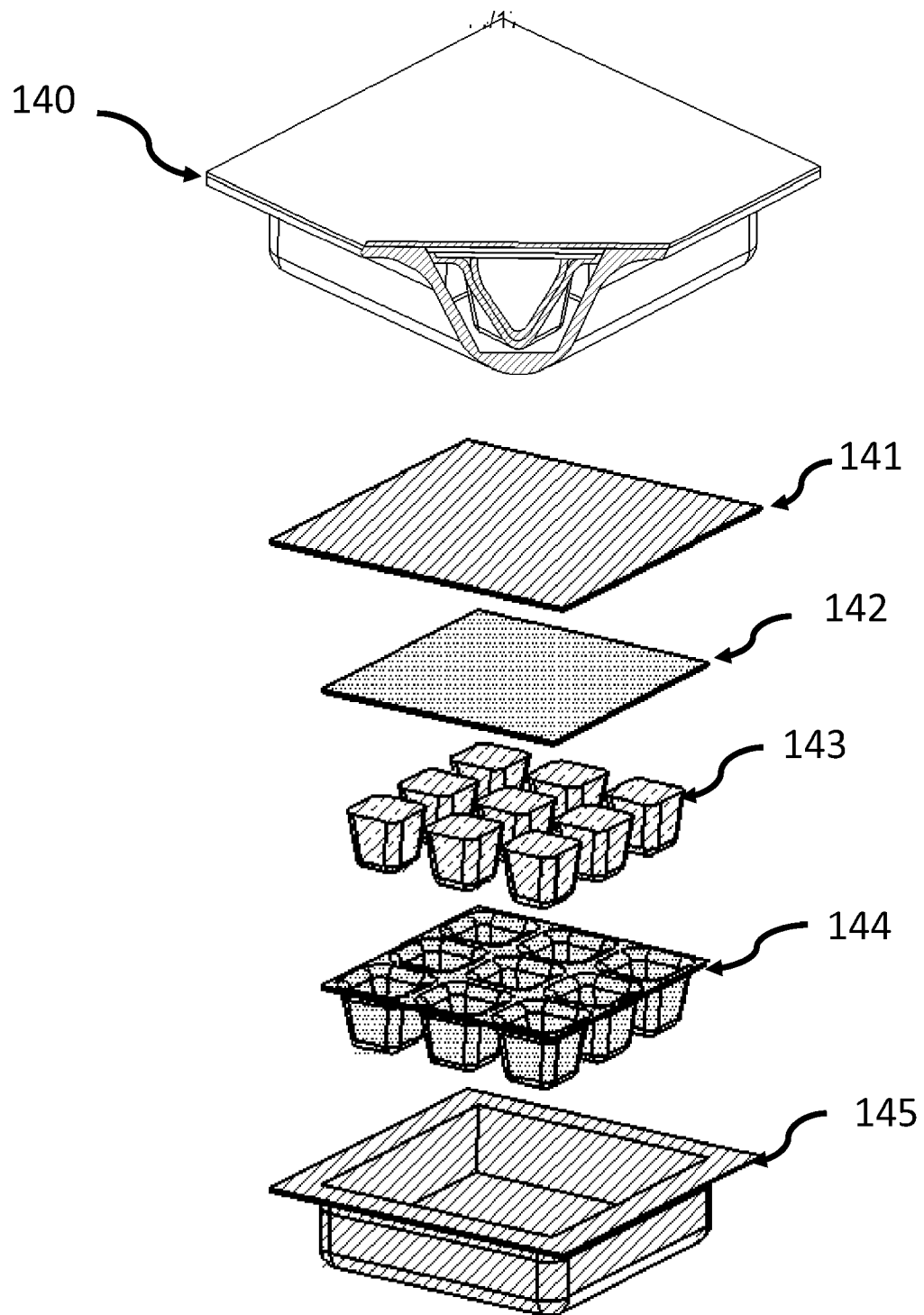


FIG. 14

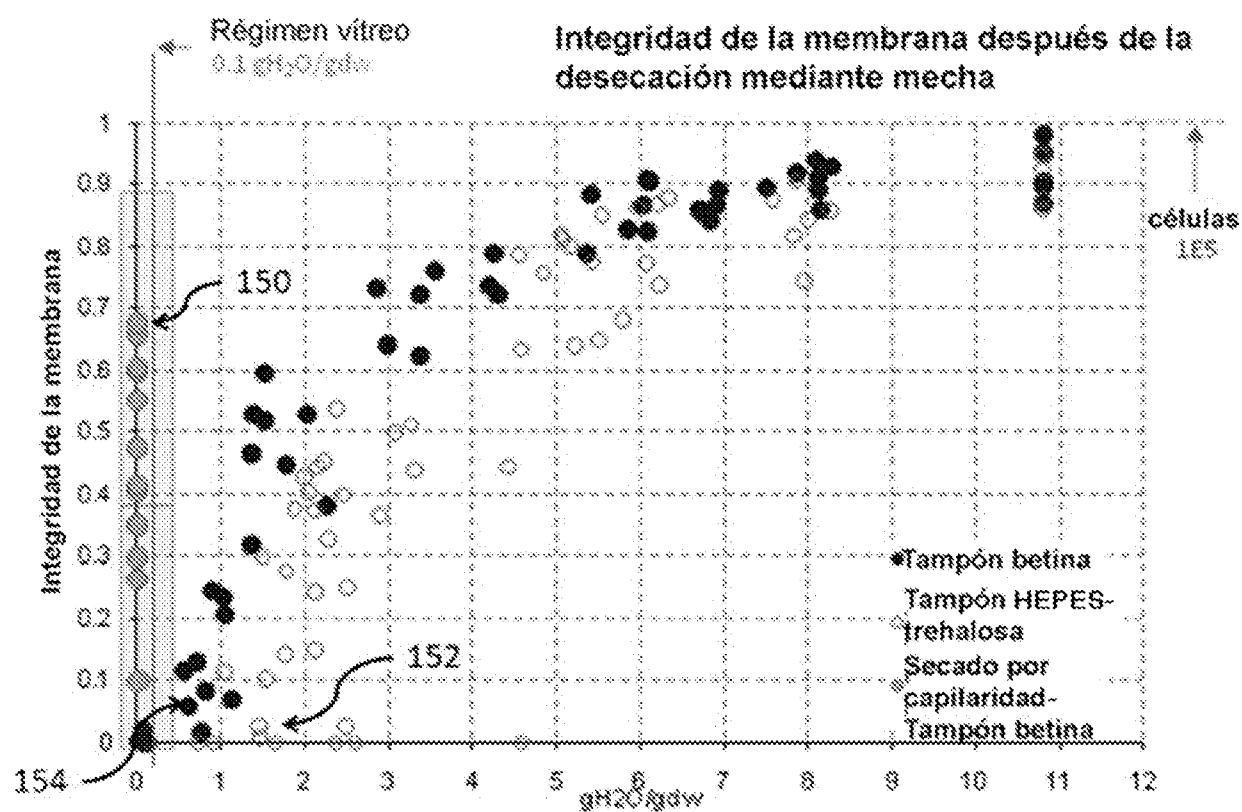


FIG. 15

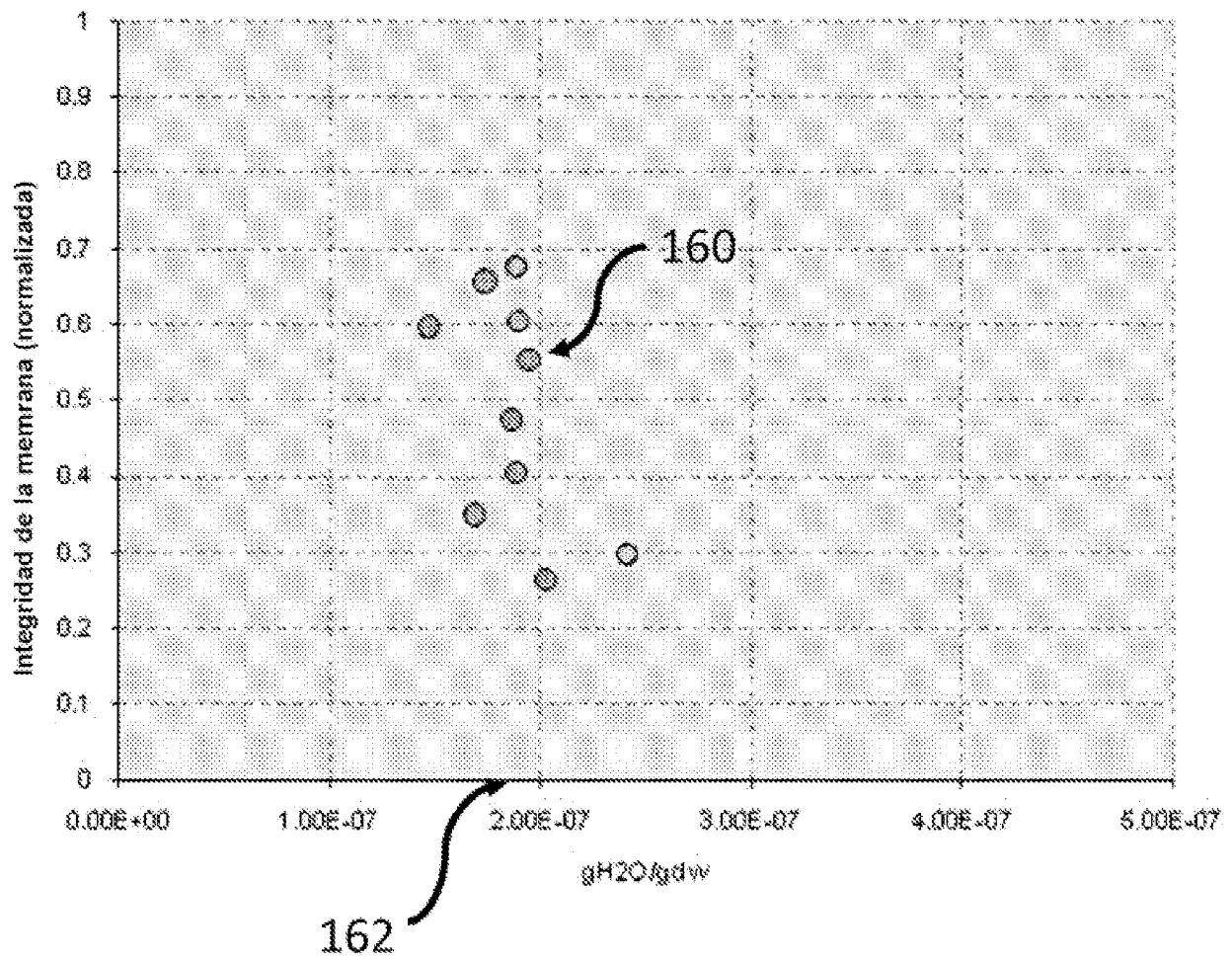


FIG. 16

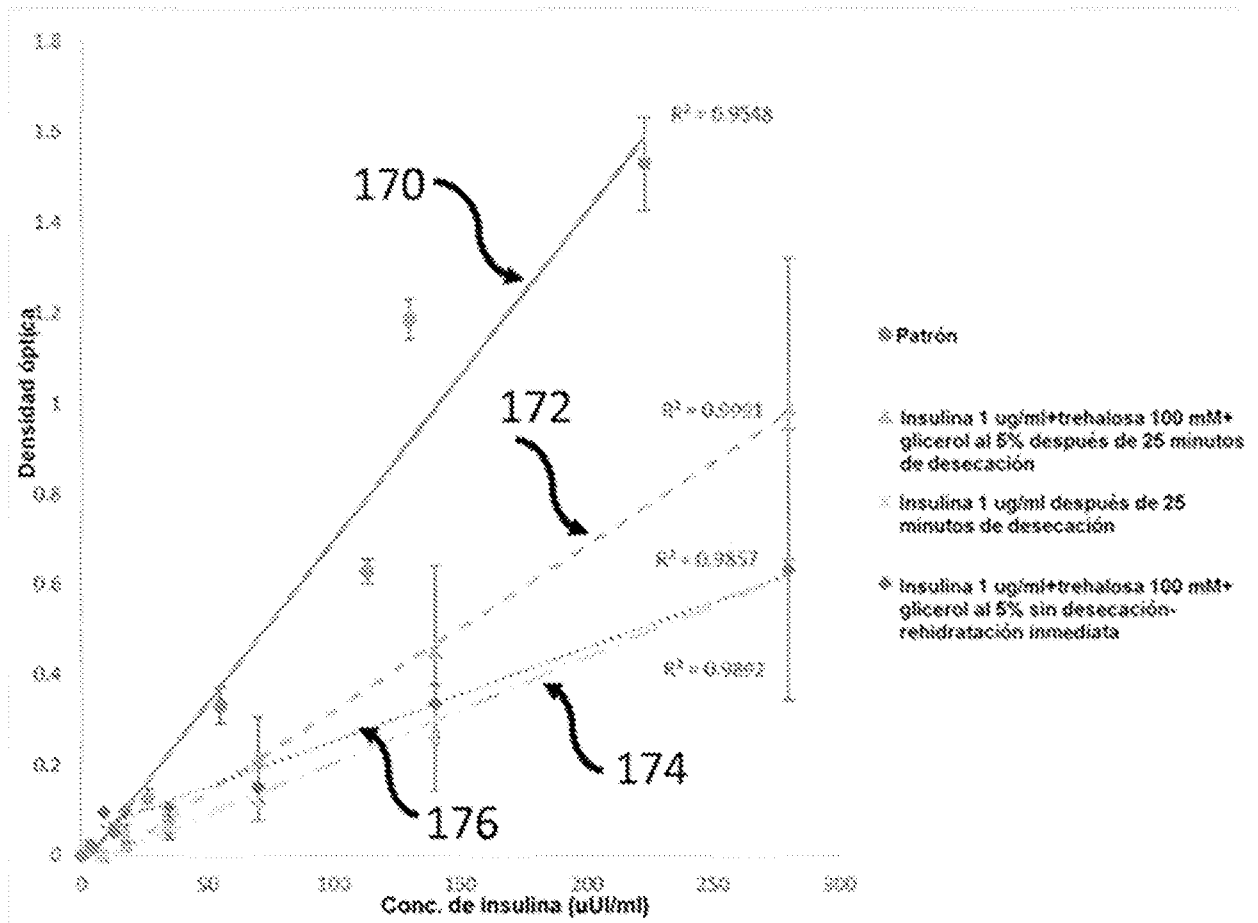


FIG. 17