



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 212 641**

⑤① Int. Cl.7: **A01N 1/02**

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **99951907 .7**

⑧⑥ Fecha de presentación: **13.10.1999**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **1121015**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2001**

⑤④ Título: **Procedimiento de vitrificación de un espécimen biológico.**

③⑩ Prioridad: **14.10.1998 US 104266 P**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.07.2004**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.07.2004**

⑦③ Titular/es: **Katrina T. Forest**  
**1720 Vilas Avenue**  
**Madison, Wisconsin 53711, US**  
**Michelle T. Lane**

⑦② Inventor/es: **Forest, Katrina T. y**  
**Lane, Michelle T.**

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 212 641 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**

Procedimiento de vitrificación de un espécimen biológico.

**5 Apoyo del gobierno**

*Declaración Referente a los Derechos a las Invenciones Realizadas Bajo Investigación y Desarrollo Patrocinados Federalmente.*

10 Parte del trabajo realizado durante el desarrollo de esta invención ha utilizado Fondos del Gobierno de EE.UU., específicamente del National Institute of Child Health and Human Development, Subvención N° HD22023. Por tanto, el Gobierno de EE.UU. tiene ciertos derechos en esta invención.

**Campo técnico**

15 Esta invención se refiere a un método para la vitrificación de un espécimen biológico, de tal manera que el espécimen biológico permanece viable después de ser descongelado.

**Antecedentes de la invención**

20 La capacidad para crioconservar oocitos, embriones, espermatozoides y otros especímenes biológicos similares es crítica para la aplicación generalizada de tecnologías de reproducción asistida. Sin embargo, debido al gran volumen de las células y a la elevada sensibilidad al enfriamiento de los oocitos y de los embriones tempranos, las técnicas de crioconservación no están bien desarrolladas en la mayoría de las especies.

25 Tradicionalmente, los embriones son crioconservados utilizando “técnicas de congelación lenta”. Las bajas concentraciones de crioprotectores y las lentas velocidades controladas de enfriamiento, normalmente en el rango de 0,1-0,3°C/minuto, deshidratan lentamente la célula durante la congelación para impedir la cristalización intracelular. Debido a esto, la crioconservación de oocitos, embriones y otras células susceptibles de desarrollo utilizando tales procedimientos tiene como resultado una capacidad reducida para establecer y mantener el embarazo después de la transferencia. Los oocitos son particularmente susceptibles al daño por crioconservación debido a la alteración de la integridad de los microtúbulos del huso de la metafase durante el enfriamiento.

30 Los métodos de crioconservación anteriores alternativos se han basado en la vitrificación con altas concentraciones de crioprotectores, los cuales cuando se enfrían rápidamente tienen como resultado un estado similar al vidrio. Sin embargo, una desventaja de esta técnica de vitrificación es que los crioprotectores son muy tóxicos para los oocitos, embriones y otras células susceptibles de desarrollo delicadas. La toxicidad de los crioprotectores puede ser minimizada incrementando la velocidad de enfriamiento, lo cual se ha conseguido sumergiendo los oocitos mantenidos sobre rejillas para microscopía electrónica, o dentro de pajuelas de paredes finas (conocidas como pajuelas estiradas abiertas), directamente en nitrógeno líquido. Sin embargo, estos procedimientos son ambos tediosos y la recuperación de los embriones es problemática.

35 Riha y col., Resumen de Biosis, 1991:496738 y en *Zivocisma Vyroba* (1991), 36, 113-119, describen un método de vitrificación en el que embriones bovinos de siete días de edad se dejaron caer gota a gota en nitrógeno líquido por medio de un capilar de manipulación desde una altura de 5 a 7 cm, donde se conservaron en forma de gotas.

40 Por tanto, permanece la necesidad de un método para la vitrificación de un espécimen biológico que sea capaz de maximizar la velocidad de enfriamiento de las células del espécimen; de mantener la viabilidad del espécimen durante la vitrificación y la descongelación posterior; de impedir el estrés mecánico al espécimen y de proporcionar una facilidad de manipulación durante la crioconservación y la recuperación.

**Resumen de la invención**

55 La presente invención se refiere a un método de vitrificación de un espécimen biológico. De acuerdo con el método de la presente invención, un espécimen biológico es expuesto directamente a un material congelante. Después de la exposición al material congelante, el espécimen biológico experimenta vitrificación. El espécimen biológico que ha sido sometido a vitrificación puede ser almacenado durante un periodo de tiempo y posteriormente descongelado en una fecha posterior. El espécimen biológico descongelado permanece viable. Los especímenes biológicos preferidos de acuerdo con la presente invención son células susceptibles de desarrollo.

60 La presente invención está dirigida también a un método de vitrificación de un espécimen biológico, que incluye la utilización de un instrumento de transferencia para colocar el espécimen biológico en un material congelante, tal como nitrógeno líquido, de tal manera que el espécimen biológico es expuesto directamente al material congelante. El espécimen biológico experimenta luego vitrificación mientras está sostenido por el instrumento de transferencia, siendo un instrumento de transferencia preferido un asa. El instrumento de transferencia y el espécimen biológico son luego mantenidos preferiblemente dentro del material congelante y transferidos a un recipiente que contiene un material congelante. El recipiente es preferiblemente un vial. El vial es luego cerrado herméticamente y contiene el

material congelante, el asa y el espécimen biológico vitrificado, y puede ser crioconservado hasta el momento en el que se requiera el espécimen biológico para un uso posterior.

Otro aspecto de la presente invención es el tratamiento del espécimen biológico en un crioprotector antes de la vitrificación.

La invención se refiere también a un método para descongelar un espécimen biológico que haya sido sometido a vitrificación. El método de descongelación comprende la extracción del espécimen biológico del material congelante en el que ha sido crioconservado, y la colocación del espécimen biológico en una solución de descongelación templada. La solución de descongelación puede estar presente en cualquier recipiente adecuado, y está situada preferiblemente en una placa de cultivo o en una pajuela.

Un aspecto más de la presente invención es un método de vitrificación de células susceptibles de desarrollo, en el que una o más células susceptibles de desarrollo son colocadas directamente en un material congelante, de tal manera que cada célula susceptible de desarrollo es expuesta directamente al material congelante, experimentando de este modo vitrificación, en el que las células susceptibles de desarrollo vitrificadas, cuando son descongeladas, cultivadas e implantadas en organismos huésped adecuados, tendrán como resultado una tasa de fertilidad igual a la de las mismas células susceptibles de desarrollo que no han sido vitrificadas. Preferiblemente, las células susceptibles de desarrollo están contenidas en un asa cuando son expuestas al material congelante.

La presente invención se refiere también a un método de vitrificación de un blastocisto de mamífero o de un embrión de mamífero en estadio de división, que comprende la colocación de uno o más blastocistos o embriones en estadio de división directamente en un material congelante, de tal manera que cada blastocisto o embrión en estadio de división es expuesto directamente al material congelante experimentando de este modo vitrificación, en el que al menos un 80 por ciento, y más preferiblemente un 90 por ciento, de los blastocistos o embriones en estadio de división vitrificados serán viables después de ser descongelados y cultivados, preferiblemente en el medio base apropiado. Preferiblemente, el blastocisto o el embrión en estadio de división está contenido en un asa cuando es expuesto al material congelante.

La presente invención se refiere también a un método de vitrificación de un embrión de caballo o de un embrión de cerdo, que comprende la colocación de uno o más embriones directamente en un material congelante, de tal manera que cada embrión es expuesto directamente al material congelante, experimentando de este modo vitrificación, en el que al menos un 25 por ciento, y más preferiblemente un 50 por ciento, de los embriones vitrificados serán viables después de ser descongelados y cultivados, preferiblemente en el medio base apropiado. Preferiblemente, el embrión está contenido en un asa cuando es expuesto al material congelante.

La presente invención se refiere también a un kit para la vitrificación de un espécimen biológico. El kit contendrá generalmente instrucciones que describan la vitrificación de un espécimen biológico, en la que el espécimen es expuesto directamente a un material congelante. El kit incluirá también uno o más ingredientes opcionales incluyendo, pero sin limitarse a, un instrumento de transferencia, muy preferiblemente un asa, un vial que sea del tamaño y la forma apropiados para soportar el asa y el espécimen vitrificado que contiene, un medio base, una solución de transferencia y un crioprotector.

La presente invención está dirigida también a especímenes biológicos que hayan sido sometidos a vitrificación por los métodos de la presente invención.

### Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es una ilustración esquemática de un método de vitrificación de un espécimen biológico de acuerdo con la presente invención.

### Descripción detallada

A lo largo de la presente solicitud, se utilizan los términos siguientes y se definen para los fines de esta solicitud según sigue:

*Medio base*: Una preparación sólida o líquida producida específicamente para el crecimiento, manipulación, transporte o almacenamiento del espécimen biológico presente en la misma.

*Crioconservación*: La conservación de un espécimen biológico a una temperatura extremadamente baja.

*Células susceptibles de desarrollo*: Un elemento reproductor de un organismo que tiene la capacidad de desarrollarse para dar un nuevo organismo individual capaz de existir independientemente. Las células susceptibles de desarrollo incluyen, pero no se limitan a, espermatozoides, oocitos, embriones, mórulas, blastocistos y otras células embrionarias tempranas.

*Expuesto directamente*: Un espécimen biológico, incluyendo blastocistos y embriones, es “expuesto directamente” a un material congelante si la mayoría de la superficie del espécimen biológico, o del medio, solución o material en el

## ES 2 212 641 T3

que reside el espécimen biológico, se deja entrar en contacto directo con el material congelante.

*Material congelante:* Cualquier material, incluyendo pero sin limitarse a, gases líquidos tales como nitrógeno líquido, propano líquido, helio líquido o hielo viscoso de etano, que es capaz de producir la vitrificación de un material biológico.

*Asa:* Un instrumento para la manipulación de muestras biológicas pequeñas que consta generalmente de un mango con forma de varilla que sujeta una porción de hilo de nailon o de metal tal como platino o níquel-acero, etc., que forma un bucle cerrado en el extremo libre.

*Instrumento de transferencia:* Un instrumento utilizado para manipular un espécimen biológico en un material congelante que está estructurado de tal manera que rodea y/o sujeta en su lugar el espécimen biológico y/o el medio, la solución o el material que contiene el espécimen biológico durante el proceso de vitrificación, y/o permite una fácil manipulación del espécimen biológico dentro del material congelante, y donde el instrumento de transferencia permite que el espécimen biológico sea expuesto directamente al material congelante. El instrumento de transferencia puede ser cualquiera de tales instrumentos conocidos generalmente en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, un asa, una redcilla con mango o una paleta con mango. El término "instrumento de transferencia", según se define en la presente, no incluye ni las rejillas de microscopía electrónica ni las pajuelas (incluyendo las pajuelas cerradas herméticamente y las pajuelas estiradas abiertas).

*Viable:* Un espécimen biológico que es capaz de vivir y desarrollarse normalmente durante un periodo de tiempo.

*Vitrificación (vitrificar):* Un fenómeno en el cual un espécimen biológico es enfriado rápidamente a temperaturas muy bajas, de tal manera que el agua contenida en el espécimen forma un estado similar al vidrio sin experimentar cristalización.

La presente invención está dirigida a un método para la vitrificación de especímenes biológicos basado en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos N° 60/104.266.

De acuerdo con el método de la presente invención, un espécimen biológico es colocado directamente en un material congelante, de tal manera que el espécimen biológico es expuesto directamente al material congelante. Después de la exposición al material congelante, el espécimen biológico experimenta vitrificación. El espécimen biológico que ha sido sometido a vitrificación puede ser almacenado durante un periodo de tiempo y descongelado posteriormente en una fecha posterior. El espécimen biológico descongelado permanece viable.

La presente invención tiene por tanto varias utilidades. Puede ser utilizada para cría de animales, investigación en el laboratorio, conservación de especies en peligro de extinción, así como para reproducción asistida en humanos.

El espécimen biológico de la presente invención puede ser cualquier clase de espécimen biológico viable que sea una célula viva, pero preferiblemente son células susceptibles de desarrollo, y más preferiblemente células susceptibles de desarrollo de mamíferos. Tales células pueden incluir, pero no se limitan a, esperma, embriones, blastocistos, mórulas y oocitos. Tales células preferidas pueden derivar de cualquier fuente de mamífero deseada incluyendo, pero no limitándose a, humanos; primates no humanos tales como monos; mamíferos de laboratorio tales como ratas, ratones y hámsteres; ganado agrícola tal como cerdos, ovejas, vacas, cabras y caballos y animales zoológicamente importantes y/o en peligro de extinción, etc. La utilización de otras células susceptibles de desarrollo procedentes de otras criaturas vivas están también dentro del ámbito de esta invención, tales como reptiles, anfibios e insectos tales como *Drosophila*. Otras células adecuadas para ser utilizadas con la presente invención incluyen células madre, incluyendo células madre humanas, y células de tejidos vegetales. Los Ejemplos siguientes describen la utilización de la presente invención con varios tipos celulares diferentes, incluyendo embriones de hámster, que son extremadamente sensibles al daño y constituyen por tanto un buen modelo para cualquier técnica de crioconservación. Los Ejemplos muestran también la eficacia de la presente invención con oocitos y embriones bovinos que se sabe en la técnica que son extremadamente sensibles al daño por enfriamiento.

Preferiblemente, el espécimen biológico es colocado en un instrumento de transferencia antes de la vitrificación. El instrumento de transferencia puede ser cualquier instrumento que permita que el espécimen biológico sea transportado a un material congelante, mientras que permite que el espécimen biológico sea expuesto directamente al material congelante, permitiendo que el espécimen biológico sea enfriado muy rápidamente, permitiendo de este modo que el espécimen biológico sea vitrificado en lugar de formar cristales de hielo dentro de la célula, los cuales a su vez alterarían finalmente las paredes celulares y otros constituyentes celulares vitales.

El método de la presente invención contrasta con los métodos previos de la técnica anterior, en los cuales el espécimen biológico era introducido en un recipiente tal como una pajueta cerrada herméticamente o una pajueta estirada abierta, en lugar de ser expuesto directamente al material congelante.

Adicionalmente, la presente metodología difiere de los métodos previos de la técnica anterior, los cuales colocaban el espécimen biológico sobre placas abiertas tales como rejillas de microscopía, las cuales no permitían una manipulación fácil del espécimen cuando estaba contenido dentro del material congelante, haciendo difícil la manipulación del espécimen y teniendo como resultado finalmente una mala recuperación del espécimen vitrificado. La presente

## ES 2 212 641 T3

invención permite por tanto una mejor manipulación del espécimen biológico durante el proceso de vitrificación, y resuelve de este modo el problema de recuperación del espécimen conocido en los métodos de vitrificación previos con rejillas de microscopía.

5 El instrumento de transferencia de acuerdo con la presente invención rodea y/o mantiene el espécimen biológico en su lugar durante el proceso de vitrificación, a fin de que el material biológico no se pierda durante el proceso. Por tanto, el instrumento de transferencia no sólo permite que el espécimen biológico repose sobre el mismo, como ocurre con las láminas planas o las rejillas de microscopía, sino que realmente puede ayudar a mantener el espécimen en su lugar, como en el caso de un asa, a través de potentes fuerzas de adhesión que rodean al espécimen biológico o al medio, solución o material que contiene el espécimen. Los instrumentos de transferencia preferidos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, asas, pequeñas redcillas con un mango unido y pequeñas espátulas. Las espátulas, redcillas o asas pueden ser modificadas de cualquier forma conocida en la técnica para ayudar a mantener el espécimen biológico en su lugar, incluyendo la colocación de una malla polimérica o rejillas de alambre extras dentro del asa, la redcilla o la espátula. En una realización preferida, el asa tiene un bucle abierto y está unida a través del extremo con forma de varilla directamente al interior del tapón de un vial, teniendo el vial el tamaño y la forma apropiados para permitir que el espécimen biológico vitrificado y el asa sean criopreservados en el mismo. Se ha descubierto sorprendentemente e inesperadamente que la utilización de un asa en la presente metodología de vitrificación permite velocidades de enfriamiento rápidas, facilita la visualización, permite manipulaciones fáciles y una elevada tasa de viabilidad con éxito cuando el espécimen vitrificado es descongelado y cultivado.

20 En una realización preferida, el espécimen biológico es tratado con una pequeña cantidad de un crioprotector antes de la vitrificación. La metodología de la presente invención permite también una disminución del tiempo de exposición del espécimen biológico a la fase en solución del crioprotector utilizado, disminuyendo así la toxicidad del crioprotector hacia el espécimen biológico. Los crioprotectores tales como etilén glicol, polietilén glicol, dime-tilsulfóxido, glicerol, propanodiol, azúcares y metilpentanodiol, así como otros bien conocidos en la técnica, pueden ser tóxicos para células sensibles tales como oocitos y embriones cuando son utilizados en dosis grandes durante la criopreservación. La presente invención permite la utilización de cualquier crioprotector opcional que esté presente en fase de solución en presencia del espécimen biológico durante periodos de tiempo más cortos que los métodos de criopreservación previamente descritos en la técnica.

30 Al permitir tiempos de enfriamiento rápidos, un tiempo reducido de exposición a los crioprotectores en fase de solución, y una retención y manipulación fiables del espécimen biológico, la presente invención resuelve un problema de mucho tiempo en la técnica de la criopreservación con éxito de especímenes biológicos sensibles tales como las células susceptibles de desarrollo. Como se describe adicionalmente en los Ejemplos, la presente invención ha mostrado un nivel de éxito en la vitrificación de blastocistos o de embriones en estadio de división de tal manera que, cuando son descongelados y cultivados en el medio base apropiado, los blastocistos o los embriones en estadio de división criopreservados tienen una tasa de viabilidad del 80 por ciento, preferiblemente del 90 por ciento y preferiblemente mayor del 90 por ciento. Además, la presente invención permite la vitrificación de células susceptibles de desarrollo; en la cual las células susceptibles de desarrollo vitrificadas cuando son descongeladas, cultivadas e implantadas en organismos huésped adecuados, tendrán como resultado una tasa de fertilidad igual a la de células susceptibles de desarrollo que son implantadas de manera similar y que no habían sido criopreservadas. Esto ayuda a resolver el problema que viene de antiguo de las bajas tasas de embarazo resultantes de la utilización de células susceptibles de desarrollo criopreservadas.

45 Adicionalmente, la presente metodología permite la criopreservación de especímenes biológicos que en el pasado se habían resistido a los intentos de criopreservación para dar como resultado un porcentaje útil de especímenes conservados viables. De manera destacable, los embriones de cerdo y los embriones de caballo pueden ser ahora vitrificados de acuerdo con la presente invención, y en la cual al menos un 25, 30, 35, 40 ó 45 por ciento, y más preferiblemente un 50, 55, 60, 65, 70 ó 75 por ciento, de los embriones vitrificados serán viables después de ser descongelados y cultivados.

55 De acuerdo con la presente invención, uno o más especímenes biológicos son recogidos mediante cualquier medio bien conocido en la técnica y son transferidos preferiblemente a un medio base. El medio base puede contener uno o más ingredientes opcionales, tales como un crioprotector para proteger al espécimen biológico del frío y/o un compuesto que incremente la viscosidad para ayudar a mantener el material dentro de un instrumento de transferencia, preferiblemente un asa. El compuesto para incrementar la viscosidad puede ser cualquiera de tales compuestos conocidos en la técnica, incluyendo pero no limitándose a, Ficoll, Percoll, ácido hialurónico, albúmina, polivinil pirrolidona (PVP) y glicerol.

60 De acuerdo con la presente invención, el espécimen biológico es colocado preferiblemente en un instrumento de transferencia. El espécimen puede ser colocado en un medio base y el instrumento de transferencia, tal como un asa o una paleta, puede ser utilizado para sacar el espécimen biológico del medio base. En una realización preferida, el instrumento de transferencia es un asa, y el asa es sumergido preferiblemente en el medio base para formar una fina película del material base sobre el asa, y el material biológico es depositado mediante una pipeta directamente en el asa. Si se utilizan células susceptibles de desarrollo tales como embriones, espermatozoides u oocitos como espécimen biológico, una o más pueden ser colocadas en cada asa.

El instrumento de transferencia que contiene el espécimen biológico es luego colocado rápidamente en un material

## ES 2 212 641 T3

congelante, de tal manera que el espécimen biológico es expuesto directamente al material congelante, permitiendo la vitrificación del espécimen biológico. Preferiblemente, el tiempo entre el pipeteo del espécimen biológico sobre el instrumento de transferencia y la colocación del espécimen biológico en el material congelante es de 45 segundos o menos, más preferiblemente de 30 segundos o menos. El material congelante puede ser nitrógeno líquido, hielo viscoso de etano, o cualquier otro material congelante bien conocido en la técnica. Preferiblemente, el espécimen biológico es mantenido dentro del material congelante durante todas las manipulaciones posteriores a la vitrificación, hasta que el espécimen vaya a ser descongelado.

El espécimen biológico vitrificado es transferido posteriormente a un recipiente de almacenamiento. En una realización preferida, el instrumento de transferencia es un asa que está fijada al interior del tapón de un vial. El vial está lleno de material congelante y reside en el mismo reservorio que el material congelante utilizado para la vitrificación del espécimen biológico. Después de la vitrificación, el espécimen biológico, contenido todavía en el asa, puede ser cerrado herméticamente en el vial sin haber sido extraído del material congelante. El vial cerrado herméticamente, que contiene el espécimen biológico vitrificado y el asa dentro del material congelante, puede ser luego criopreservado indefinidamente.

Posteriormente, el espécimen biológico puede ser descongelado y el espécimen biológico viable puede luego desarrollarse. La descongelación se lleva a cabo extrayendo el vial que contiene el espécimen biológico vitrificado de cualquier tanque de almacenamiento en el que resida, y extrayendo rápidamente del vial el instrumento de transferencia que contiene el espécimen biológico, y sumergiendo el instrumento de transferencia y el espécimen en una solución de descongelación. En una realización preferida, el vial de almacenamiento es colocado en un reservorio que contiene un material congelante, preferiblemente el mismo material congelante que el contenido en el vial. Mientras está dentro del material congelante, el vial es abierto y el instrumento de transferencia que contiene el espécimen biológico es extraído y sumergido rápidamente en la solución de descongelación. La solución de descongelación puede ser cualquier solución o material que sea suficiente para permitir que el espécimen biológico se descongele conservando su viabilidad, incluyendo pero sin limitarse a, un medio conocido en la técnica que sea apropiado como medio base para el espécimen biológico particular. Después de la descongelación, el espécimen biológico puede ser manipulado adicionalmente de cualquier manera apropiada conocida para la especie y para el proceso para el cual el espécimen está siendo utilizado.

Un método preferido de la presente invención está ilustrado adicionalmente de acuerdo con la FIG. 1. Según se muestra en I, una muestra biológica en un medio base apropiado es aplicada directamente a un asa o sacada directamente en el asa. Según se muestra en I, el asa está unida al tapón de un vial magnético. Inmediatamente después, el asa es sumergida directamente en el material congelante contenido en un reservorio, el cual según se ilustra puede ser una caja de material termoaislante llena de nitrógeno líquido. Alternativamente, el material congelante puede ser colocado directamente en el vial y el espécimen biológico puede ser vitrificado al ser expuesto directamente al material congelante en el propio vial, eliminando de este modo la necesidad de un reservorio separado. Mientras está bajo el nitrógeno líquido, el asa está bien sujeta en el vial de almacenamiento, permaneciendo el espécimen biológico vitrificado en el asa. Pueden rellenarse múltiples viales manteniendo los mismos verticalmente en huecos del tamaño del vial dentro del reservorio o, alternativamente, viales individuales pueden ser mantenidos bajo el nitrógeno con unas pinzas o con otra herramienta. Los múltiples viales pueden ser luego criopreservados indefinidamente en cualquier recipiente adecuado, tal como un Dewar estándar, según se ilustra en III. Posteriormente en cualquier momento, el asa puede ser extraída del vial mientras permanece bajo un material congelante tal como nitrógeno líquido, según se muestra en IV, a la inversa exactamente del procedimiento de vitrificación descrito anteriormente. Es conveniente, pero no necesario, utilizar un reservorio de material congelante para rodear el vial antes de descongelar, pero el material congelante contenido en el propio vial debe ser suficiente para mantener el espécimen biológico criopreservado durante la manipulación antes de ser descongelado. El espécimen biológico es sumergido posteriormente directamente en una solución de descongelación. La solución de descongelación puede estar contenida de cualquier manera que sea conveniente, incluyendo una placa de cultivo abierta según se muestra en V, o en una pajuela para ser cargada directamente en una pistola de transferencia. El espécimen biológico es diluido instantáneamente en la solución de descongelación y flota separado del asa. El espécimen biológico puede ser luego cultivado de cualquier manera apropiada conocida en la técnica.

La vitrificación de especímenes biológicos sensibles tales como esperma, oocitos y embriones utilizando el método de la presente invención tiene ventajas sobre los procedimientos convencionales de criopreservación en cuanto a que el presente método carece de cualquier capa aislante entre el espécimen biológico y el material congelante. Este factor, unido al muy pequeño volumen de menos de  $1-5 \mu\text{l}$  para el espécimen biológico típico utilizado, o de medio, o de solución o de otro material que contenga el espécimen biológico utilizado, tiene como resultado un intercambio de calor muy rápido y uniforme durante el enfriamiento. Las altas velocidades de enfriamiento impiden el daño por enfriamiento a células sensibles tales como las células susceptibles de desarrollo. La velocidad de enfriamiento extremadamente rápida obtenida con la presente invención reduce también sustancialmente el tiempo de exposición a cualquier crioprotector opcional utilizado y reduce de este modo su citotoxicidad para el espécimen.

Otros beneficios importantes de los métodos de la presente invención incluyen: un sistema abierto que permite la fácil visualización de la muestra durante la manipulación; la congelación rápida de un gran número de muestras sin necesidad de un equipamiento caro o complicado; un marcaje y almacenamiento muy sencillos; y el calentamiento y la recuperación de la muestra nimios e instantáneos. Para aplicaciones que requieran un sistema cerrado tales como las aplicaciones clínicas humanas, la utilización de crioviales estándar permite que los mismos sean incluidos en

láminas de plástico estándar o, alternativamente, el orificio de liberación del tapón del criovial puede ser sellado herméticamente impidiendo cualquier transmisión vírica cruzada posible.

El ensayo de viabilidad final de los embriones después de la crioconservación es la capacidad para establecer y mantener una preñez que tenga como resultado crías fértiles normales. El hámster es un buen modelo para esto por dos razones. Primeramente, su sensibilidad al entorno *in vitro* hace que sea un modelo muy sensible según es puesto en evidencia por el hecho de que los inventores de la presente invención no conocen ningún artículo de la literatura que haya producido con éxito crías de hámster después de crioconservación utilizando cualquier método. En segundo lugar, el hámster tiene un periodo de gestación de sólo 16 días y la madurez sexual se alcanza después de 3-4 meses. Los Ejemplos siguientes demuestran el éxito de la presente metodología para la crioconservación de embriones viables que pueden ser posteriormente descongelados y utilizados para producir crías normales, teniendo como resultado una tasa de éxito de al menos el 90%.

Se ha descrito que los embriones bovinos, y en particular los oocitos bovinos, son muy sensibles al daño por enfriamiento. Además, el elevado contenido en lípidos del embrión ha sido relacionado con la sensibilidad incrementada de los embriones bovinos a los procedimientos de crioconservación. Según se muestra en los Ejemplos siguientes, la vitrificación utilizando el método de la presente invención con oocitos y embriones en estadio de división de bovinos permitió el desarrollo posterior a la etapa de mórula/blastocisto en cultivo, con un porcentaje elevado de tasas de eclosión con éxito.

La presente invención se refiere también a un kit para la vitrificación de un espécimen biológico. El kit contendrá generalmente instrucciones que describan la vitrificación de un espécimen biológico, en la cual el espécimen es expuesto directamente a un material congelante. El kit incluirá también uno o más ingredientes opcionales, incluyendo, pero sin limitarse a, un instrumento de transferencia, muy preferiblemente un asa, un vial que tenga el tamaño y la forma apropiados para mantener el asa y el espécimen vitrificado que contiene, un medio base, una solución de transferencia y un crioprotector.

Está invención está ilustrada adicionalmente por los Ejemplos no limitantes siguientes.

#### Ejemplo 1

##### *Metodologías y materiales para la vitrificación de oocitos y embriones bovinos y de hámster*

##### A. Medios

El medio utilizado en los Ejemplos siguientes fue Medio de Cultivo para Embrión de Hámster-10 (HECM-10), preparado según está descrito por Lane y col., *Mol. Reprod. Dev.* 50:443-450 (1998). Para la recogida y la crioconservación de embriones, se utilizó una modificación de HECM-10 tamponado con Hepes en el que el NaHCO<sub>3</sub> 20 mM fue sustituido por Hepes 20 mM (pH 7,35). Inmediatamente antes de su utilización se añadieron al medio soluciones crioprotectoras. Los medios para el cultivo de embriones bovinos fueron G1.2 y G2.2, según está descrito por Gardner y col., *Hum. Reprod.* 13:3434-3440 (1998). Todas las sales, carbohidratos, aminoácidos, dimetilsulfóxido (DMSO), etilén glicol y sacarosa fueron adquiridos a Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). La Seroalbúmina Bovina fue adquirida a Bayer Diagnostics.

##### B. Recogida y cultivo de embriones de hámster

Los embriones de hámster fueron recogidos de hembras superovuladas según fue descrito previamente por Lane y col., *Mol. Reprod. Dev.* 50:443-450 (1998). Los embriones de hámster fueron conservados en las etapas de 1 célula o de 2 células pronucleares. Los embriones de hámster fueron cultivados en HECM-10 según está descrito por Lane y col., *Mol. Reprod. Dev.* 50:443-450 (1998). El número de células de los blastocistos resultantes fue determinado mediante tinción con yoduro de propidio después de tratamiento con Triton.

##### C. Maduración *in vitro*/fertilización *in vitro*/cultivo *in vitro* (MIV/FIV/CIV) de embriones bovinos

Se aislaron oocitos bovinos inmaduros de ovarios y se maduraron según está descrito por Krisher y col., *Biol. Reprod.* 60:1345-1352 (1999). Los oocitos maduros fueron vitrificados y descongelados o no fueron sometidos a vitrificación y descongelación cuando se utilizaron como controles, y fueron fertilizados *in vitro* mediante los métodos descritos por Krisher y col., *Biol. Reprod.* 60:1345-1352 (1999). Después de la fertilización, los supuestos cigotos fueron aislados y cultivados en los medios G1.2 y G2.2 secuencialmente durante 72 horas en cada medio. Después de un total de 144 horas, se determinó el desarrollo hacia las etapas de mórula/blastocisto y blastocisto.

##### D. Vitrificación utilizando un asa

Las asas utilizadas para la vitrificación constaban de un asa de nailon (20  $\mu$ m de ancho; 0,5-0,7 mm de diámetro) montada en un tubo de acero inoxidable sujeto mediante epoxi al tapón de un criovial (Hampton Research, Laguna Niguel, CA). Los oocitos y embriones fueron vitrificados utilizando una carga de 2 etapas con crioprotectores. Inicialmente los oocitos y embriones fueron colocados en la solución crioprotectora I que contenía DMSO 10% y etilén glicol 10% durante 1-3 minutos antes de ser transferidos a la solución II, que contenía DMSO 20% y etilén glicol

## ES 2 212 641 T3

20%, 10 mg/ml de Ficoll (PM 400.000) y sacarosa 0,65 M durante 20 segundos aproximadamente. Las células son luego transferidas al asa que había sido sumergida previamente en la solución II para crear una película fina. Para los embriones de hámster, se colocaron en el asa 10-12 embriones, y para los embriones bovinos se colocaron en cada asa 3-6 embriones. Los embriones suspendidos en el asa de nailon fueron luego sumergidos directamente en nitrógeno líquido. Sumergiendo previamente el criovial bajo nitrógeno líquido, el asa que contenía los embriones fue sumergida en el criovial que contenía nitrógeno líquido y el criovial cerrado herméticamente bajo nitrógeno líquido en un movimiento.

Los oocitos y embriones fueron descongelados utilizando una dilución de 2 etapas con sacarosa. Con el criovial sumergido bajo nitrógeno líquido, el vial fue abierto y se extrajo el asa que contenía las células del nitrógeno líquido, y se insertó luego directamente en un pocillo de medio base que contenía sacarosa 0,25 M. Los oocitos/embriones se separaron inmediatamente del asa y pasaron a la solución de descongelación. Los oocitos fueron retirados de esta solución después de 2 minutos y transferidos a medio base que contenía sacarosa 0,125 M durante 5 minutos más. Posteriormente, los oocitos/embriones fueron lavados dos veces en el medio base durante 5 minutos y fueron luego colocados de nuevo en cultivo.

### E. Vitricación utilizando la técnica de la pajueta estirada abierta

Para comparación, se vitrificaron embriones de hámster utilizando la técnica de la pajueta estirada abierta (OPS) descrita por Vajta y col., *Cryo-Letters* 18:191-195 (1997). De diez a doce embriones fueron expuestos a una carga en 2 etapas de crioprotectores que constaban de etilén glicol y DMSO a las mismas concentraciones que anteriormente. Los embriones fueron pipeteados en una gota de 1  $\mu$ l de la segunda solución de crioconservación y cargados posteriormente en una pajueta estirada utilizando la acción capilar, y la pajueta que contenía los embriones fue sumergida directamente en nitrógeno líquido. Para la descongelación, los embriones fueron expulsados de la pajueta por la presión producida durante el calentamiento y descongelados igual que anteriormente.

### F. Transferencia de embriones

Las mórulas/blastocistos de hámster fueron transferidos a receptoras pseudopreñadas en el día 3 (día -1 asíncrono). Se transfirieron 8 embriones a cada cuerno uterino. El día 14 de gestación algunos animales fueron sometidos a eutanasia y se determinaron las tasas de implantación y desarrollo fetal. A las hembras restantes se les dejó parir el día 16 de gestación y se registró el número de crías justo después del nacimiento.

### G. Análisis estadístico

Las diferencias en el desarrollo entre los tratamientos fueron determinadas utilizando regresión lineal-logística cuando la distribución era binomial (Glim 4.0, Numerical Algorithms Group, Oxford, R.U.). El día del experimento fue ajustado como un factor. Las diferencias en el número de células fueron determinadas utilizando Análisis de Varianza, ya que se confirmaron la normalidad Gaussiana y la igualdad de varianzas. Las comparaciones múltiples entre los tratamientos fueron determinadas mediante el procedimiento de Bonferroni para comparaciones múltiples.

## Ejemplo 2

### Vitricación y desarrollo posterior de embriones de hámster

Embriones de hámster de 2 células fueron vitrificados utilizando un asa de acuerdo con el método de la presente invención y comparados con los resultados de embriones control expuestos a crioprotector o de embriones vitrificados utilizando el método OPS, según se describió en el Ejemplo 1. Los embriones de hámster fueron recogidos del oviducto y se asignaron al control, a la vitricación con asa o a la vitricación con OPS. Significativamente más embriones evolucionaron a la etapa de mórula/blastocisto y blastocisto cuando fueron vitrificados en el asa en comparación con los vitrificados utilizando OPS, según se muestra más adelante en la Tabla 1.

Significativamente menos embriones de 2 células fueron capaces de continuar el desarrollo hacia las etapas de mórula/blastocisto o blastocisto en cultivo después de la vitricación mediante cualquier técnica en comparación con los embriones control, según se muestra en la Tabla 1. Sin embargo, el número de células de los blastocistos (un indicador de las tasas de división) resultantes de los embriones de 2 células vitrificados era estadísticamente equivalente al de los embriones de 2 células que no fueron vitrificados, según se muestra en la Tabla 1. Embriones de 2 células de rata fueron también vitrificados con éxito utilizando el asa y pudieron desarrollarse normalmente después de la descongelación con tasas de división del 75%, similares a las de los embriones control (n=10).

Para determinar posteriormente la capacidad para vitricular embriones sensibles, se repitió el experimento con embriones de 1 célula, aunque se redujo la duración del tiempo en el que los embriones de 1 célula estuvieron expuestos a la dilución inicial del crioprotector desde 2 minutos a 1 minuto. Estudios preliminares demostraron que una exposición de 2 minutos (sin vitricación) de embriones de 1 célula a las soluciones crioprotectoras reducía seriamente el desarrollo. De nuevo se recogieron embriones del oviducto y se asignaron al grupo control, a la vitricación con asa o a la vitricación con OPS.

Los embriones de 1 célula de hámster fueron capaces de dividirse y continuar el desarrollo en cultivo hacia la etapa



## ES 2 212 641 T3

de mórula/blastocisto después de la vitrificación con el asa, según se muestra en la Tabla 1. Las tasas de desarrollo después de la vitrificación fueron significativamente mejores para los embriones vitrificados utilizando el asa en comparación con los embriones vitrificados utilizando OPS (Tabla 1). Los oocitos de hámster pudieron ser también vitrificados con éxito utilizando el asa (n=20) y fertilizados y desarrollados posteriormente a la etapa de mórula/blastocisto en tasas del 10% aproximadamente, comparables con las de los oocitos control no crioconservados.

TABLA 1

*Desarrollo de embriones de hámster en cultivo después de la vitrificación*

Etapa de Desarrollo	Tratamiento	M/B (%)	B (%)	Número de Células del Blastocisto (media±esm)
1 célula	Control	79,5	30,1	18,9±3,1
	Asa	39,8 <sup>a</sup>	15,5 <sup>a</sup>	11,9±1,1 <sup>a</sup>
	OPS	22,0 <sup>b</sup>	5,0 <sup>b</sup>	9,2±1,2 <sup>b</sup>
2 células	Control	98,5	94,2	24,1±2,8
	Asa	64,2 <sup>a</sup>	43,1 <sup>a</sup>	19,7±1,8 <sup>a</sup>
	OPS	50,5 <sup>a</sup>	29,6 <sup>b</sup>	19,6±1,4 <sup>a</sup>

M/B: desarrollo a mórula/blastocisto

B: desarrollo a blastocisto

N = al menos 100 embriones cultivados por tratamiento para los embriones de 1 célula (4 replicados) y al menos 400 embriones por tratamiento para los embriones de 2 células (8 replicados)

<sup>a</sup>significativamente diferente del control (P<0,05)

<sup>b</sup>significativamente diferente del control y de la vitrificación con asa (P<0,05).

### Ejemplo 3

#### *Viabilidad de los embriones de hámster de 1 célula y 2 células después de la vitrificación*

Embriones de hámster fueron vitrificados utilizando el método del asa o mediante OPS. Después del calentamiento, los embriones fueron cultivados hasta la etapa de mórula/blastocisto (embriones vitrificados y embriones control) antes de su transferencia a receptoras pseudopreñadas. No hubo diferencia en la viabilidad de los embriones en la etapa de mórula/blastocisto que habían sido previamente vitrificados en la etapa de 2 células para su implantación y desarrollo hacia un feto viable en comparación con los embriones control que no fueron crioconservados, según se muestra a continuación en la Tabla 2. Sin embargo, significativamente menos embriones fueron capaces de implantarse y desarrollarse hasta un feto viable cuando fueron vitrificados utilizando OPS, según se muestra en la Tabla 2. Se dejó parir a dos hembras adicionales que habían recibido mórulas/blastocistos que fueron vitrificados en la etapa de 2 células utilizando el asa y nacieron 5 crías normales. Estas crías se desarrollaron hasta adultos morfológicamente sanos y fértiles.

De manera similar, para los embriones de hámster de 1 célula, la implantación y el desarrollo fetal no se vieron afectados por la vitrificación utilizando el asa, según se muestra en la Tabla 2. No se transfirió ningún embrión vitrificado utilizando OPS debido a las bajas tasas de supervivencia en cultivo observadas en el experimento previo. Una vez más se dejó parir a 2 hembras que habían recibido mórulas/blastocistos vitrificados en la etapa de 2 células utilizando el asa y nacieron un total de 9 crías. Una cría fue comida por la madre de 6 a 9 días después del nacimiento. Las crías restantes se desarrollaron hasta adultos morfológicamente sanos y fértiles.

TABLA 2

*Desarrollo de embriones de hámster in utero después de la vitrificación*

Etapa de Desarrollo para la Vitrificación	n	Método	Implantación N(%)	Fetos N(%)
1 Célula	20	Control	8 (40)	6 (30)
	17	Asa	7 (41)	5 (29)
2 Células	40	Control	34 (85)	26 (65)
	72	Asa	39 (54) <sup>a</sup>	36 (50)
	112	OPS	48 (43) <sup>a</sup>	40 (36) <sup>a</sup>

<sup>a</sup>significativamente diferente de los embriones control (P<0,05).

## Ejemplo 4

*Vitrificación de oocitos bovinos. Embriones en estadio de división y blastocistos*

Con el fin de determinar la capacidad del método de vitrificación de la presente invención para vitrificar con éxito embriones con diferentes propiedades celulares, oocitos y embriones bovinos fueron vitrificados según se describió en el Ejemplo 1 y se determinó su supervivencia y desarrollo posterior, estando mostrados los resultados en la Tabla 3. Los oocitos y embriones fueron asignados al grupo control o al grupo de vitrificación con asa utilizando la metodología de la presente invención. Blastocistos bovinos producidos *in vitro* fueron vitrificados con éxito utilizando el asa, con más de un 80% de blastocistos expandidos capaces de reexpandirse y eclosionar después de la vitrificación, según se muestra en la Tabla 3. El cultivo de blastocistos control tuvo como resultado un 100% de eclosión después de 48 horas de cultivo. Además, el 75% de blastocistos completamente eclosionados pudo ser también vitrificado con éxito utilizando la vitrificación con asa. Embriones bovinos de ocho células vitrificados utilizando el método de vitrificación de la presente invención pudieron ser vitrificados y calentados con tasas de supervivencia subsiguientes (determinadas por el desarrollo hacia las etapas de mórula/blastocisto y blastocisto) equivalentes a las obtenidas para embriones frescos que no habían sido crioconservados, según se muestra en la Tabla 3. La vitrificación de embriones en el estadio de 4 células tuvo como resultado tasas de supervivencia ligeramente reducidas en comparación con los embriones frescos, sin embargo muchos fueron capaces de completar el desarrollo normal hacia la etapa de mórula/blastocisto, según se muestra en la Tabla 3. Los oocitos bovinos son extremadamente sensibles al daño por enfriamiento y pocos artículos han demostrado éxito después de la crioconservación. Oocitos bovinos MII madurados *in vitro* fueron vitrificados con éxito utilizando el asa. Los oocitos vitrificados y calentados fueron fertilizados posteriormente y de éstos, un 33% continuaron el desarrollo hacia la etapa de mórula/blastocisto (n=42).

## ES 2 212 641 T3

TABLA 3

*Desarrollo de embriones bovinos en cultivo después de la vitrificación*

Etapa de Desarrollo	Tratamiento	8 Células a las 72 horas (%)	M/B a las 144 horas (%)	B a las 144 horas (%)	BE a las 168 horas (%)
4 Células	Control	0	46	15	n/d
	Asa	4	24	16	n/d
8 Células	Control	n/a	59	50	n/d
	Asa	n/a	52	41	n/d
Blastocisto	Control	n/a	n/a	n/a	100
	Asa	n/a	n/a	n/a	80,5

M/B: desarrollo a mórula/blastocisto

B: desarrollo a blastocisto

BE: desarrollo a blastocisto eclosionado

n/a: no aplicable

n/d: no determinado.

### Ejemplo 5

#### *Metodologías y materiales para la vitrificación de blastocistos humanos y de ratón*

##### *A. Medios de cultivo*

Los medios para el cultivo de embriones fueron G1.2 y G2.2 (IVF Sciences Scandinavian, Gothenburg, Suecia). El medio para la recogida de embriones fue una modificación de G1.2 con HEPES (H-G1.2) y el medio base para criopreservación y descongelación fue una modificación de G2.2 tamponado con HEPES sin aminoácidos ni vitaminas (H-G2.2). En ambos casos los medios fueron modificados sustituyendo el  $\text{NaHCO}_3$  20 mM por HEPES 20 mM y ajustados a pH 7,35.

##### *B. Ratones*

Se recogieron embriones de hembras F1 (C57BL6xCBA) de 4-6 semanas de edad. Las hembras fueron estimuladas con 5 UI de gonadotropina de yegua preñada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 48 horas más tarde con 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Sigma Chemical Co.). Después de la inyección de hCG, las hembras fueron colocadas con machos de la misma cepa y a la mañana siguiente la presencia de un tapón vaginal indicaba que había tenido lugar el apareamiento. Los cigotos fueron recogidos a las 22 horas después de la hCG y despojados del cumulus circundante mediante incubación en H-G1.2 con 0,5 mg/ml de hialuronidasa durante menos de 1 minuto. Los cigotos fueron lavados dos veces en H-G1.2 y colocados en cultivo.

##### *C. Cultivo de embriones de ratón*

Los cigotos de ratón fueron cultivados en grupos de 10 en gotas de 20  $\mu\text{l}$  de medio G1.2 a 37°C en una atmósfera humidificada de un 5% de  $\text{CO}_2$  en aire. Después de 48 horas de cultivo, los embriones de 8 células fueron lavados 3 veces en medio G2.2 y cultivados durante 48 horas más en gotas de 20  $\mu\text{l}$  de medio G2.2. El desarrollo a blastocistos fue determinado después de 96 horas de cultivo.

##### *D. Cultivo de embriones humanos*

El sistema de cultivo para el crecimiento de blastocistos fue realizado de acuerdo con Gardner y col., *Hum. Reprod.* 13:3434-40 (1998). Después de la recuperación de los oocitos, los oocitos incluidos en el cumulus fueron incubados

## ES 2 212 641 T3

en F-10 de Ham suplementado con suero del cordón fetal (FCS) para la inseminación. El semen fue preparado con un gradiente discontinuo 50-70-95 o mediante el método de minigradiente (Pure Sperm, Nidacon, Gothenburg), dependiendo de los parámetros iniciales del semen. La pella resultante fue lavada en F-10 de Ham. Para la inseminación normal, se añadieron a cada oocito 50-100.000 espermatozoides/ml. Cuando se llevó a cabo una inyección intracito-  
5 plásmica (ICSI), los oocitos fueron despojados del cumulus utilizando hialuronidasa y pipetas estiradas. Cada oocito maduro fue colocado en una gotita de 6  $\mu$ l de solución salina tamponada con fosfato suplementada con un 15% de FCS. El espermatozoide de la pareja fue colocado en una gotita de 6  $\mu$ l de PVP (IVF Sciences Scandinavian). Todas las gotitas fueron cubiertas con Ovoil (IVF Sciences Scandinavian). La ICSI fue realizada en un microscopio invertido Nikon con micromanipuladores Narishige. Los oocitos inyectados fueron lavados posteriormente y colocados en tubos de G1.2  
10 hasta que se determinó la fertilización. La fertilización fue determinada 15-18 horas después de la inseminación o de la ICSI. El cumulus y las células de la corona fueron extraídos por disección con agujas desechables de 27 gauges en una placa de cultivo de órganos. Los embriones de 2 células pronucleares resultantes fueron bien lavados y cultivados posteriormente en grupos de 2-3 en medio G1.2 en tubos de cultivo Falcon de 1 ml en un 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

15 Después de 48 horas de cultivo los embriones fueron lavados 3 veces y cultivados durante 72 horas más. Los blastocistos del día 6 que fueron considerados de calidad no suficientemente buena para criopreservación mediante métodos previos conocidos en la técnica, esto es que no se expandían totalmente o que tenían un pobre desarrollo de la masa celular interna, fueron donados para vitrificación mediante el método de la presente invención.

### 20 E. Vitrificación utilizando un asa

Las asas utilizadas para vitrificación constaban de un asa de nailon (20  $\mu$ m de ancho; 0,5-0,7-mm de diámetro) montada en un tubo de acero inoxidable insertado en el tapón de un criovial. Las asas fueron compradas ya montadas (Hampton Research, Laguna Niguel, CA) y luego fijadas con epoxi a los viales. Un inserto de metal en el tapón permite  
25 la utilización de un mango con un pequeño imán para la manipulación del asa, si se desea.

Los blastocistos fueron vitrificados utilizando una carga de 2 etapas con crioprotectores. Los blastocistos iniciales fueron colocados en la solución crioprotectora I que contenía DMSO 10% y etilén glicol 10% durante 2 minutos antes de ser transferidos a la solución II, que contenía DMSO 20% y etilén glicol 20%, 10 mg/ml de Ficoll (PM  
30 400.000) y sacarosa 0,65 M durante 20 segundos aproximadamente. Se había demostrado previamente que estas concentraciones de crioprotectores y la duración de la exposición eran óptimas para la vitrificación de embriones de roedores y de animales domésticos utilizando el procedimiento del asa. Mientras los blastocistos están en la solución crioprotectora I, el asa es sumergida en la solución crioprotectora II con el fin de crear una fina película sobre el asa. Los blastocistos fueron luego transferidos desde la solución II a la película de crioprotector sobre el asa. El asa  
35 que contenía el blastocisto fue luego sumergida en el criovial que estaba sumergido en y lleno de, nitrógeno líquido. Sumergiendo previamente el criovial en nitrógeno líquido, el asa que contenía los blastocistos podía ser sumergida en el criovial que contenía nitrógeno líquido y sellada bajo nitrógeno líquido en un movimiento. Los viales fueron almacenados en tanques estándar.

40 Los blastocistos fueron descongelados utilizando una dilución de dos etapas con sacarosa. Con el criovial sumergido bajo nitrógeno líquido, se abrió el vial y se extrajo el asa que contenía los blastocistos del nitrógeno líquido y se colocó directamente en un pocillo de medio base que contenía sacarosa 0,25 M. Los blastocistos se desprendían inmediatamente del asa a la solución de descongelación. Los blastocistos fueron retirados de esta solución después de 2 minutos y transferidos a medio base que contenía sacarosa 0,125 M durante 3 minutos adicionales. Posteriormente,  
45 los blastocistos fueron lavados dos veces en el medio base durante 5 minutos y luego se volvieron a colocar en cultivo.

Después de la vitrificación, los blastocistos de ratón y humanos fueron cultivados en medio G2.2 durante 6 horas para determinar la reexpansión antes de la determinación del crecimiento de los blastocistos. Se eligió una incubación de 6 horas, ya que éste es el periodo de tiempo normal utilizado para la verificación de los blastocistos descongelados  
50 antes de la transferencia.

### F. Determinación del crecimiento de los blastocistos

Se determinó el crecimiento de los blastocistos de ratón y humanos como marcador de la viabilidad posterior. Los  
55 blastocistos fueron transferidos a medio G2.2 suplementado con un 10% de suero de cordón fetal para determinar la fijación y el crecimiento de los blastocistos. Los blastocistos fueron cultivados en placas de 4 pocillos (Nunclon, Dinamarca) revestidas previamente con gelatina 0,1% en gotas de 500  $\mu$ l a 37°C en un 5% de CO<sub>2</sub> en aire durante 48 horas. La eclosión y la fijación de los blastocistos se determinaron después de 24 horas, y el crecimiento se determinó después de 24 horas más de cultivo. Al crecimiento de la masa celular interna (MCI) y del trofotodermo se le dio una  
60 puntuación de entre 0 y 3 sobre la base del nivel de crecimiento, donde 0 indicaba no crecimiento y 3 era crecimiento considerable, según está descrito por Spindle y Pederson, *J. Exp. Zool.* 186:305-318 (1972).

### G. Determinación de la viabilidad de los blastocistos en ratones

65 La viabilidad de los blastocistos de ratón después de la vitrificación fue determinada mediante transferencia a receptoras pseudopreñadas. Después del calentamiento, los blastocistos fueron cultivados durante 6 horas en medio G2.2 antes de la transferencia. Todos los blastocistos que se reexpandieron después del periodo de 6 horas fueron agrupados y se seleccionaron aleatoriamente los blastocistos para la transferencia. Se transfirieron 6 blastocistos a

cada cuerno uterino. El día 15 de gestación, se determinaron la implantación, el desarrollo fetal y los pesos de los fetos. Blastocistos no criopreservados sirvieron como control.

#### H. Análisis estadístico

5

Las diferencias en eclosión, fijación y viabilidad después de la vitrificación fueron determinadas mediante el análisis de Chi cuadrado con la Corrección de Yates. Los datos de crecimiento de la MCI y del trofotodermo fueron sometidos inicialmente a un análisis de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de los datos. Se utilizó luego un análisis F para determinar que los dos grupos de datos tenían varianzas iguales. Una vez que se establecieron la normalidad y la igualdad de las varianzas, las diferencias en el crecimiento se determinaron mediante el análisis t de Student.

10

#### Ejemplo 6

#### 15 Vitrificación de blastocistos de ratón

Un total de 160 blastocistos de ratón fueron vitrificados utilizando un asa de acuerdo con la presente invención. Después de la vitrificación, el 100% de estos blastocistos eran capaces de reexpandirse en cultivo. No había diferencia en la capacidad de los blastocistos vitrificados para eclosionar y fijarse en cultivo en comparación con los embriones control, según se muestra en la Tabla 4. De manera similar, no había diferencia en la capacidad de la MCI o del trofotodermo para crecer en cultivo entre los blastocistos control y los blastocistos vitrificados, según se demuestra en la Tabla 4.

20

Después de la vitrificación y la descongelación, 60 blastocistos fueron transferidos a receptoras pseudopreñadas y su viabilidad se comparó con la de blastocistos control hermanos que no fueron criopreservados. No había diferencia en la capacidad de los blastocistos vitrificados para implantarse y desarrollarse a un feto en comparación con los blastocistos control. Los pesos de los fetos resultantes eran también similares para los blastocistos que fueron vitrificados ( $0,245 \pm 0,021$  g) en comparación con los blastocistos control ( $0,250 \pm 0,017$  g). Todos los fetos resultantes de los blastocistos vitrificados y de los blastocistos control eran morfológicamente normales. Adicionalmente, se dejó parir a una hembra receptora que había recibido 8 blastocistos vitrificados (4 por cuerno uterino). Nacieron tres crías morfológicamente normales.

25

30

TABLA 4

35

*Efecto de la vitrificación con asa de blastocistos de ratón sobre la reexpansión y el crecimiento*

40

45

50

55

60

Tratamiento	Grupo de Estudio	
	Control	Blastocistos Vitrificados <sup>1</sup>
Reexpansión (%)	-	100
Eclosión (%)	87,5	95,5
Fijación (%)	78,1	85,9
Crecimiento de la MCI (media $\pm$ ESM)	2,21 $\pm$ 0,10	2,17 $\pm$ 0,09
Crecimiento del trofotodermo (media $\pm$ ESM)	2,00 $\pm$ 0,09	2,14 $\pm$ 0,09

<sup>1</sup>no había diferencia entre los blastocistos control y vitrificados para ningún parámetro medido.  $n \geq 100$ , para los blastocistos control y los vitrificados.

65

## Ejemplo 7

*Vitrificación de blastocistos humanos*

5 Dieciocho blastocistos humanos entre mínimamente expandidos a semiexpandidos fueron vitrificados utilizando un asa de acuerdo con la metodología de la presente invención. De éstos, 11 (83,3%) se reexpandieron en cultivo. La capacidad para eclosionar en cultivo y el crecimiento de la MCI y del trofotodermo fueron similares para los blastocistos que habían sido vitrificados y para los blastocistos control que no habían sido crioconservados, según se muestra en la Tabla 5.

10

TABLA 5

*Efecto de la vitrificación con asa de blastocistos humanos sobre la reexpansión y el crecimiento*

15

Tratamiento	Grupo de Estudio	
	Control n = 12	Blastocistos Vitrificados <sup>1</sup> n = 18
Reexpansión (%)	-	83,3
Eclosión (%)	63,6	73,3
Fijación (%)	36,0	60,0
Crecimiento de la MCI (media ± ESM)	2,0±0,2	1,7±0,2
Crecimiento del trofotodermo (media ± ESM)	1,7±0,2	2,0±0,2

20

25

30

35

40

45 no había diferencia entre los blastocistos control y vitrificados para ningún parámetro medido.

## Ejemplo 8

*Vitrificación de blastocistos bovinos en el día ocho*

50

En este Ejemplo se utilizaron las soluciones siguientes:

*Soluciones de congelación*

55

Solución 1: Medio base (según se describió en el Ejemplo 1) conteniendo etilén glicol 10% y DMSO 10%.

Solución 2: Medio base conteniendo sacarosa 0,65 M y etilén glicol 20% y DMSO 20% y 10 mg/ml de Ficoll.

*Soluciones de descongelación*

60

Solución 1: Medio base con sacarosa 0,25 M.

Solución 2: Medio base con sacarosa 0,125 M.

65

Solución 3: Medio base.

Solución 4: Medio base.

## ES 2 212 641 T3

Los blastocistos bovinos fueron producidos de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1. Los blastocistos fueron todos expandidos hasta cierto grado antes de la vitrificación. Los blastocistos fueron pipeteados utilizando el equipamiento estándar sobre un asa que había sido sumergida en la Solución de Congelación 2. Cada asa contenía un solo blastocisto. Las asas que contenían los blastocistos fueron luego tratadas durante 2 minutos en la Solución de Congelación 1, seguido por 30 segundos de tratamiento en la Solución de Congelación 2 que incluía una solución de Ficol1 para aumentar la viscosidad e inmediatamente después fueron sumergidas directamente en nitrógeno líquido y los blastocistos fueron vitrificados. Los blastocistos se mantuvieron congelados en nitrógeno líquido durante 30-90 minutos y luego se descongelaron.

Para descongelar los blastocistos, los blastocistos y el asa en la que fueron vitrificados fueron colocados durante cinco minutos en cada una de las Soluciones de Descongelación 1-4 secuencialmente.

De los 13 blastocistos que fueron vitrificados y descongelados de acuerdo con la presente invención, 9 de los blastocistos eclosionaron después de ser cultivados durante 48 horas.

Un segundo grupo de 4 blastocistos fueron vitrificados, descongelados y cultivados según se describió anteriormente, y los 4 blastocistos eclosionaron todos con éxito después de haber sido cultivados durante 48 horas.

Se produjo un tercer grupo de blastocistos bovinos de 8 días mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1. Se utilizaron un total de 12 blastocistos y se colocaron 2 blastocistos expandidos en cada asa. Los blastocistos fueron sometidos a vitrificación, descongelación y cultivo según se ha descrito, excepto en que el proceso de descongelación fue llevado a cabo de acuerdo con el régimen siguiente. Dos minutos en la Solución 1; 5 minutos en la Solución 2; 5 minutos en la Solución 3 y 5 minutos en la Solución 4. Después de ser cultivados durante 48 horas, 11 de los blastocistos habían eclosionado.

### Ejemplo 9

#### *Vitrificación de blastocistos bovinos en el día nueve*

Se produjeron blastocistos bovinos de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1 y se vitrificaron según se describió en el Ejemplo 8. Los blastocistos fueron luego descongelados y cultivados según se describió en el Ejemplo 8. Después de 48 horas, había eclosionado el 80% de los blastocistos.

### Ejemplo 10

#### *Vitrificación de blastocistos bovinos en el día siete*

Se produjeron blastocistos bovinos de siete días según se describió en el Ejemplo 1 y se cultivaron utilizando G1.2/G2.2 según se describió en el Ejemplo 1. Un total de 20 blastocistos fueron vitrificados y descongelados de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 8 y congelados durante 2 horas con 2 a 3 blastocistos por asa. Los blastocistos fueron luego descongelados y cultivados según se describió en el Ejemplo 8. Después de que los blastocistos descongelados fueran cultivados durante 48 horas, 15 de los 20 blastocistos habían eclosionado y 2 se habían reexpandido.

Se llevó a cabo un segundo experimento con blastocistos de siete días de acuerdo con los procedimientos anteriormente descritos, con 1 a 2 blastocistos por asa. Después de 48 horas de cultivo, 29 de los 33 blastocistos vitrificados habían eclosionado.

### Ejemplo 11

#### *Vitrificación de oocitos bovinos*

En este Ejemplo, la vitrificación de oocitos bovinos utilizando la metodología de la presente invención fue comparada con oocitos que fueron vitrificados utilizando la conocida metodología de la pajueta estirada abierta (OPS) y también con oocitos control que no habían sido congelados. Los oocitos que iban a ser vitrificados fueron tratados durante 35 segundos en la Solución 1 y durante 30 segundos en la Solución 2 sola o en la Solución 2 más una solución de viscosidad, utilizando las soluciones descritas en el Ejemplo 8. Los oocitos fueron luego congelados, 1-3 por pajueta o de 1 a 3 por asa, sumergiéndolos en nitrógeno líquido. Después de la vitrificación, todos los oocitos fueron descongelados de acuerdo con el régimen siguiente: 1 minuto en la Solución 1; 5 minutos en la Solución 2; 5 minutos en la Solución 3 y 5 minutos en la Solución 4, utilizando las soluciones del Ejemplo 8. Los oocitos bovinos se volvieron a poner luego en el medio de maduración durante 2 horas y posteriormente se fertilizaron de la manera normal. Después de un día, los oocitos se cambiaron a medio G1.2 según se describió en el Ejemplo 1. Después de 4 días, los embriones divididos se cambiaron a medio G1.2 fresco, según se describió en el Ejemplo 1. Los oocitos control mostraron un 37,5% de división, los oocitos que habían experimentado la vitrificación de acuerdo con la presente metodología presentaban un 19% de división y los que habían sido vitrificados utilizando la metodología OPS mostraban un 14% de división. Los oocitos fueron luego cambiados a medio G2.2 fresco y cultivados durante 4 días adicionales. Al final de los 8 días, solamente 2 de los 24 oocitos control originales despojados del cumulus habían alcanzado la etapa de desarrollo de mórula. En comparación, 3 de los 16 oocitos que habían sido vitrificados de acuer-

## ES 2 212 641 T3

do con la presente invención habían alcanzado la etapa de desarrollo de mórula. En comparación, de los 28 oocitos que habían sido sometidos a vitrificación utilizando la metodología OPS, ninguno de ellos había alcanzado la etapa de desarrollo de mórula, sobreviviendo solamente 4 de tales oocitos, habiendo progresado el único ejemplo con más éxito del método OPS hasta la etapa de 16-32 células.

### 5 Ejemplo 12

#### *Metodologías y materiales para la vitrificación de oocitos de ratón y humanos*

##### 10 A. Medios

Los medios para el cultivo de embriones fueron G1.2 y G2.2 suplementados con 5 mg/ml de seroalbúmina humana (Gardner y col., *Hum. Reprod.* 13:3434-40 (1998)). El medio para la recogida y vitrificación de los embriones fue una modificación de G1.2 sin EDTA tamponado con HEPES, modificado sustituyendo el NaHCO<sub>3</sub> 20 mM por HEPES 20 mM y ajustado a pH 7,35.

##### B. Ratones

Se recogieron oocitos de hembras F1 (C57BL6xCB<sub>a</sub>) de 4-5 semanas de edad. Las hembras fueron estimuladas con 5 UI de gonadotropina de yegua preñada (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y 53 horas más tarde con 5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG; Sigma Chemical Co.). Los oocitos fueron recogidos a las 14 horas post-hCG y despojados del cumulus circundante mediante incubación en H-G1.2 con 0,5 mg/ml de hialuronidasa durante menos de 1 minuto. Los oocitos fueron lavados dos veces en H-G1.2 e inseminados o criopreservados.

##### 25 C. Recogida de oocitos humanos

Las pacientes fueron estimuladas para que produjeran múltiples oocitos de acuerdo con Gardner y col., *Hum. Reprod.* 13:3434-40 (1998). Los oocitos fueron extraídos de los folículos y colocados en cultivo en G1.2 durante 4 horas. Los oocitos fueron despojados del cumulus circundante mediante incubación en G1.2 con hialuronidasa. Los oocitos inmaduros fueron luego colocados en cultivo en G2.2 con suero de cordón fetal durante 24 horas. Los oocitos maduros MII fueron luego asignados al grupo control o fueron vitrificados utilizando el asa.

##### D. Vitrificación con asa de oocitos de ratón y humanos

Los oocitos fueron vitrificados utilizando una carga de 2 etapas con crioprotectores. Inicialmente, los oocitos fueron colocados en la solución crioprotectora I que contenía DMSO 10% y etilén glicol 10% durante 1 minuto antes de ser transferidos a la solución II, que contenía DMSO 20% y etilén glicol 20%, 10 mg/ml de Ficoll (PM 400.000) y sacarosa 0,65 M durante 20 segundos aproximadamente. Los oocitos fueron luego transferidos al asa que había sido sumergida previamente en la solución II con el fin de crear una película fina, y sumergidos directamente en nitrógeno líquido. Sumergiendo previamente el criovial bajo nitrógeno líquido, el asa que contenía los oocitos podía ser sumergida en el criovial que contenía nitrógeno líquido y sellada bajo nitrógeno líquido en un movimiento. Los viales fueron almacenados en tanques estándar.

Los oocitos fueron descongelados utilizando una dilución de 2 etapas con sacarosa. Con el criovial sumergido bajo nitrógeno líquido, el vial fue abierto y se extrajo el asa que contenía las células del nitrógeno líquido y se colocó directamente en un pocillo de medio base H-G1.2 que contenía sacarosa 0,25 M. Los oocitos se desprendieron inmediatamente del asa a la solución de descongelación. Los oocitos fueron retirados de esta solución después de 2 minutos y transferidos al medio base H-G1.2 que contenía sacarosa 0,125 M durante 3 minutos más. Posteriormente, los oocitos fueron lavados dos veces en H-G1.2 durante 5 minutos y se volvieron luego a poner en cultivo.

##### 50 E. Fertilización *in vitro* y cultivo de los embriones de oocitos de ratón

Se aspiraron espermatozoides del epidídimo de ratones macho F1 (C57BL6xCB<sub>a</sub>) de 12-16 semanas de edad en medio FG1 (según está descrito por Gardner y Lane, 1997, *Hum. Reprod. Update* 3:367-382) suplementado con 1 mg/ml de glutatión y 5 mg/ml de HSA (Scandinavian IVF Sciences, Gothenburg, Suecia). Los espermatozoides fueron capacitados durante 1,5 horas antes de la inseminación. Antes de que los oocitos fueran inseminados, se realizó un pequeño orificio (5  $\mu$ m) en la zona de los oocitos utilizando un haz de láser enfocado de 670 nm Fertilase y un haz de láser colimado de 1,48  $\mu$ m (MTM Medical Technologies, Montreux, Suiza). Los oocitos fueron colocados en gotas de 100  $\mu$ l de FG1 y coincubados con 1 x 10<sup>4</sup> espermatozoides aproximadamente durante 4 horas. Los oocitos fueron lavados dos veces y cultivados en gotas de 20  $\mu$ l de G1.2 a 37°C en CO<sub>2</sub> 6%, O<sub>2</sub> 5% y N<sub>2</sub> 89%. La fertilización fue confirmada por la presencia de embriones de 2 células la mañana siguiente. Todos los embriones de 2 células fueron cambiados a gotas frescas de G1.2. Después de 48 horas de cultivo, los embriones fueron lavados bien en G2.2 y cultivados durante 48 horas más en medio G2.2 hasta la etapa de blastocisto.

##### 65 F. Determinación de la viabilidad de los oocitos humanos

La viabilidad de los oocitos humanos fue determinada mediante exclusión de colorante. Los oocitos fueron colocados en H-G1.2 que contenía 25  $\mu$ g/ml de yoduro de propidio durante 10 minutos y luego lavados en H-G1.2 durante



5 minutos. Los oocitos que no habían sobrevivido al procedimiento de vitrificación tenían una tinción positiva del material de los núcleos, mientras que los oocitos supervivientes no mostraban tinción.

#### G. Análisis estadístico

5 Las diferencias en el desarrollo entre los tratamientos fueron determinadas utilizando regresión lineal-logística cuando la distribución era binomial (Glim 4.0, Numerical Algorithms Group, Oxford, R.U.). El día del experimento fue ajustado como un factor. Las diferencias en el número de células fueron determinadas utilizando Análisis de Varianza, ya que se habían confirmado la normalidad Gaussiana y la igualdad de varianzas. Las comparaciones múltiples entre los tratamientos fueron realizadas mediante el procedimiento de Bonferroni para comparaciones múltiples.

#### Ejemplo 13

##### *Desarrollo en cultivo de oocitos de ratón después de la crioconservación*

15 Los oocitos vitrificados utilizando el método de la presente invención tenían tasas de supervivencia significativamente más elevadas en comparación con los oocitos crioconservados utilizando el procedimiento de congelación lenta, según se muestra en la Tabla 6. De manera similar, las tasas de fertilización fueron significativamente más elevadas en los oocitos que habían sido vitrificados utilizando el método de la presente invención en comparación con el procedimiento de congelación lenta, según se muestra en la Tabla 6. Los oocitos vitrificados utilizando el presente método tenían tasas de fertilización equivalentes a las de los oocitos control frescos que fueron inseminados, según se muestra en la Tabla 6. Las tasas de fertilización fueron significativamente más bajas en los oocitos crioconservados utilizando el procedimiento de congelación lenta, según se muestra en la Tabla 6. Los embriones control que no fueron congelados, se desarrollaron a la etapa de blastocisto en proporciones del 70,0% de los oocitos totales o del 95,4% de los embriones de 2 células. No había diferencia en las tasas de desarrollo a blastocisto de los oocitos que fueron vitrificados utilizando el asa en comparación con los oocitos control, según se muestra en la Tabla 6. En contraste, las tasas de desarrollo a blastocisto a partir de los oocitos totales o a partir de los embriones de 2 células estaban significativamente reducidas en los oocitos que habían sido crioconservados mediante congelación lenta, según se muestra en la Tabla 6.

TABLA 6

*Efecto de la crioconservación de oocitos de ratón sobre la fertilización y el desarrollo del embrión de ratón*

Tratamiento	Supervivencia (%)	Fertilización (%)	Blastocistos/Total (%)	Blastocistos/2 Células (%)
Control	100	73,4	70,0	95,4
Asa	99,2	69,8	67,4	96,5
Congelación lenta	80,9*	39,5**	25,7**	65,1**

N = al menos 300 embriones por tratamiento

\*significativamente diferente de todos los demás tratamientos (P<0,05)

\*\*significativamente diferente de todos los demás tratamientos (P<0,01).

#### Ejemplo 14

##### *Viabilidad posterior de los oocitos de ratón después de la crioconservación*

55 Blastocistos derivados de oocitos frescos o crioconservados (bien por vitrificación con la presente metodología o mediante congelación lenta) fueron transferidos a receptoras pseudopreñadas y se determinaron la implantación y el desarrollo fetal, y los resultados se presentan en la Tabla 7. Los blastocistos que derivaban de oocitos que fueron vitrificados utilizando el método de la presente invención tenían tasas de implantación similares a las de los oocitos frescos, sin embargo, el desarrollo fetal era ligeramente inferior. En contraste, los oocitos que fueron congelados utilizando el procedimiento de congelación lenta, tenían tasas de implantación y desarrollo fetal significativamente reducidas en comparación con los oocitos control o con los oocitos vitrificados utilizando el método de la presente invención. Adicionalmente, se dejaron parir 2 hembras que tenían cada una 8 blastocistos transferidos que derivaban de oocitos que habían sido vitrificados. De estas hembras nacieron 11 crías (7 y 4) y todas se desarrollaron a ratones adultos morfológicamente normales y fértiles. De las 11 crías nacidas, 8 fueron hembras y 3 machos.

65

## ES 2 212 641 T3

TABLA 7

*Efecto de la crioconservación sobre la viabilidad en ratón después de la transferencia*

Tratamiento	Implantación (%)	Desarrollo Fetal (%)	Desarrollo Fetal/Implantación (%)
Control	86 <sup>a</sup>	68,0 <sup>a</sup>	79,1 <sup>a</sup>
Asa	88,0 <sup>a</sup>	56,5 <sup>b</sup>	64,2 <sup>b</sup>
Congelación lenta	52,4 <sup>b</sup>	26,2 <sup>c</sup>	50,0 <sup>b</sup>

N = al menos 50 blastocistos transferidos por grupo de tratamiento  
a-c: las letras diferentes son significativamente diferentes (P<0,05).

### Ejemplo 15

*Tasas de supervivencia de oocitos humanos después de la crioconservación*

Se determinó la viabilidad de oocitos humanos después de vitrificación por la presente metodología. Se observaron tasas elevadas de supervivencia, según se muestra en la Tabla 8.

TABLA 8

*Tasas de supervivencia de oocitos humanos después de la crioconservación*

Tratamiento	Número de Embriones	Supervivencia (%)
Oocitos frescos	12	100
Oocitos vitrificados	21	81,9

### Ejemplo 16

*Vitrificación de embriones de ratón en estadio de división*

Se recogieron embriones de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1. Embriones de 1 célula fueron vitrificados utilizando el asa inmediatamente después de su recogida, mientras que se obtuvieron embriones de 2 células después de 24 horas de cultivo de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 1.

Embriones de 1 célula y de 2 células fueron vitrificados utilizando el asa de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 12. No había diferencia en la capacidad de los embriones de ratón de 1 célula o de 2 células para desarrollarse a la etapa de blastocisto en cultivo en comparación con los embriones frescos que no fueron crioconservados. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 9.

TABLA 9

*Desarrollo de embriones de ratón de 1 célula y 2 células después de vitrificación de acuerdo con la presente invención*

Tratamiento <sup>#</sup>	Número de Embriones	Blastocisto (%)
1 Célula frescos	20	95,0
1 Célula vitrificados	20	90,0
2 Células frescos	30	96,7
2 Células vitrificados	30	93,3

<sup>#</sup>No había diferencia en la capacidad de los embriones de 1 célula o 2 células vitrificados con el asa para desarrollarse en cultivo en comparación con los embriones frescos.

## ES 2 212 641 T3

### Ejemplo 17

#### *Vitrificación de espermatozoides de ratón utilizando la presente invención*

5 Se recogieron espermatozoides maduros de ratón de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 12.

Una gota de 1  $\mu$ l de solución crioprotectora I que contenía DMSO 10% y etilén glicol 10% fue colocada en la tapa de una placa Petri. Se añadió 1  $\mu$ l de solución de esperma a la gota de solución I. Después de 20 segundos, se añadió 1  $\mu$ l de solución II, que contenía DMSO 20% y etilén glicol 20%, 10 mg/ml de Ficoll (PM 400.000) y sacarosa 0,65 M, y la gota completa fue colocada sobre un asa que estaba sumergida en nitrógeno líquido. Para la descongelación, el asa fue colocada en 20  $\mu$ l de medio base que contenía sacarosa 0,25 M durante 30 segundos, cuando se añadieron a la gota 20  $\mu$ l de medio base durante 1 minuto más; finalmente se añadieron 2 ml de medio base. Después de este procedimiento, pudo obtenerse esperma viable según se determinó por la motilidad.

15 Se comprende que la invención no está limitada a las realizaciones particulares presentadas en la presente como ilustrativas, sino que incluye todas las formas modificadas de las mismas de cualquier modo dentro del ámbito de las reivindicaciones siguientes.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 212 641 T3

## REIVINDICACIONES

1. Un método de vitrificación de un espécimen biológico que comprende:

5 (a) la colocación del espécimen biológico en un instrumento de transferencia; y

10 (b) la colocación del instrumento de transferencia y del espécimen biológico directamente en un material congelante, en el que el instrumento de transferencia no es una rejilla de microscopía electrónica ni una pajuela, y en el que además el espécimen biológico es expuesto directamente al material congelante experimentando de este modo la vitrificación, y en el que además el espécimen biológico será viable después de que el espécimen biológico sea descongelado.

15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el espécimen biológico es seleccionado del grupo que consta de un embrión, un espermatozoide, un oocito, un blastocisto y una mórula.

3. El método de la reivindicación 1, en el que el instrumento de transferencia es seleccionado del grupo que consta de un asa, una redcilla y una paleta.

20 4. El método de la reivindicación 1, en el que (a) comprende además:

(i) el tratamiento del espécimen biológico con un crioprotector antes de la vitrificación.

5. El método de la reivindicación 1, que comprende además:

25 (c) la descongelación del espécimen biológico que ha experimentado la vitrificación.

6. El método de la reivindicación 1, en el que (b) comprende además:

30 (i) la transferencia del espécimen biológico que ha experimentado la vitrificación a un recipiente de almacenamiento, conteniendo el recipiente de almacenamiento un material congelante; y

(ii) el almacenamiento del recipiente de almacenamiento que contiene el espécimen biológico que ha experimentado la vitrificación hasta que el espécimen biológico esté listo para ser descongelado.

35 7. El método de la reivindicación 5, en el que (c) comprende además:

(i) la extracción del espécimen biológico del material congelante; y

40 (ii) la colocación del espécimen biológico en una solución de descongelación.

8. El método de la reivindicación 7, en el que la solución de descongelación está contenida en una placa de cultivo.

9. El método de la reivindicación 7, en el que la solución de descongelación está contenida en una pajuela.

45 10. El método de la reivindicación 1, en el que (a) comprende además:

50 (i) la colocación del espécimen biológico en un medio base, donde el espécimen biológico es seleccionado del grupo que consta de un embrión, un oocito, un espermatozoide, un blastocisto y una mórula, en el que el instrumento de transferencia es seleccionado del grupo que consta de un asa, una redcilla y una paleta; y en el que además (b) comprende también:

55 (i) la colocación del instrumento de transferencia que contiene el espécimen biológico en el material congelante, en el que el material congelante está colocado en un recipiente, de tal manera que el espécimen biológico experimente vitrificación; y

(ii) el cierre hermético del recipiente que contiene el material congelante, el instrumento de transferencia y el espécimen biológico.

60 11. El método de la reivindicación 10, en el que el medio base contiene uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consta de un crioprotector y un compuesto para incrementar la viscosidad.

12. El método de la reivindicación 10, que comprende además:

65 (c) la descongelación del espécimen biológico que ha experimentado vitrificación.

13. El método de la reivindicación 12, en el que (c) comprende además:

## ES 2 212 641 T3

(i) la extracción del espécimen biológico del material congelante; y

(ii) la colocación del espécimen biológico en una solución de descongelación.

5 14. El método de la reivindicación 12, en el que la solución de descongelación está contenida en una placa de cultivo.

15. El método de la reivindicación 12, en el que la solución de descongelación está contenida en una pajuela.

10 16. Un espécimen biológico que ha experimentado vitrificación producida mediante el método de la reivindicación 1.

17. Un espécimen biológico que ha experimentado vitrificación producida mediante el método de la reivindicación 11.

15 18. Un método de vitrificación de un espécimen biológico que comprende:

(a) la colocación del espécimen biológico en un medio base, en el que el espécimen biológico es seleccionado del grupo que consta de un embrión, un oocito, un espermatozoide, un blastocisto y una mórula;

20 (b) la utilización de un instrumento de transferencia para llevar el espécimen biológico a un material congelante situado en un recipiente, de tal manera que el espécimen biológico es expuesto directamente al material congelante y experimenta vitrificación, en el que el instrumento de transferencia no es una rejilla de microscopía electrónica ni una pajuela;

25 (c) el cierre hermético del recipiente que contiene el material congelante, el instrumento de transferencia y el espécimen biológico;

(d) el sometimiento del recipiente cerrado herméticamente a almacenamiento;

30 (e) la extracción del espécimen biológico del recipiente cerrado herméticamente; y

(f) la colocación del espécimen biológico en una solución de descongelación.

35 19. El método de la reivindicación 18, en el que el instrumento de transferencia es un asa.

20. Un método para vitrificar células susceptibles de desarrollo, que comprende:

40 (a) la colocación de una o más células susceptibles de desarrollo directamente en un material congelante, en el que las células susceptibles de desarrollo son seleccionadas del grupo que consta de embriones, espermatozoides, oocitos, mórulas y blastocistos; se utiliza un asa para transportar las células susceptibles de desarrollo en el material congelante, de tal manera que cada célula susceptible de desarrollo es expuesta directamente al material congelante, experimentando de este modo vitrificación, y en el que además las células susceptibles de desarrollo vitrificadas, cuando son descongeladas, cultivadas e implantadas en organismos huésped adecuados, tendrán como resultado una

45 tasa de fertilidad igual a la de células susceptibles de desarrollo que no hayan experimentado vitrificación.

21. El método de la reivindicación 20, en el que (a) comprende además:

(i) el tratamiento del espécimen biológico con un crioprotector antes de la vitrificación.

50 22. Un método de vitrificación de un blastocisto de mamífero o de un embrión de mamífero en estadio de división que comprende:

55 (a) la colocación de uno o más blastocistos o embriones en estadio de división directamente en un material congelante, de tal manera que cada blastocisto o embrión en estadio de división es expuesto directamente al material congelante experimentando de este modo vitrificación, en el que al menos el 80 por ciento de los blastocistos o embriones en estadio de división vitrificados serán viables después de ser descongelados y cultivados.

60 23. El método de la reivindicación 22, en el que al menos un 90% de los blastocistos o de los embriones en estadio de división vitrificados serán viables después de ser descongelados y cultivados.

24. El método de la reivindicación 22, en el que se utiliza un asa para transportar el blastocisto o el embrión en estadio de división al material congelante.

65 25. El método de la reivindicación 22, en el que (a) comprende además:

(i) el tratamiento del blastocisto o del embrión en estado de división con un crioprotector antes de la vitrificación.

## ES 2 212 641 T3

26. El método de la reivindicación 22, en el que el mamífero es seleccionado del grupo que consta de humanos, roedores y bovinos.

27. Un método para vitrificar un embrión de caballo o un embrión de cerdo, que comprende:

(a) la colocación de uno o más embriones directamente en un material congelante, de tal manera que cada embrión es expuesto directamente al material congelante experimentando de este modo vitrificación, en el que al menos el 25 por ciento de los embriones vitrificados serán viables después de ser descongelados y cultivados.

28. El método de la reivindicación 27, en el que al menos el 50 por ciento de los embriones vitrificados serán viables después de ser descongelados y cultivados.

29. El método de la reivindicación 27, en el que se utiliza un asa para transportar el embrión al material congelante.

30. El método de la reivindicación 27, en el que (a) comprende además:

(i) el tratamiento del embrión con un crioprotector antes de la vitrificación.

31. Un kit para la vitrificación de un espécimen biológico, que comprende:

(a) un medio base;

(b) instrucciones para vitrificar un espécimen biológico, donde el espécimen es expuesto directamente a un material congelante;

(c) un asa; y

(d) un vial, donde el vial es de un tamaño y forma apropiados para almacenar el asa que contiene un espécimen biológico vitrificado.

32. El kit de la reivindicación 31, que comprende además:

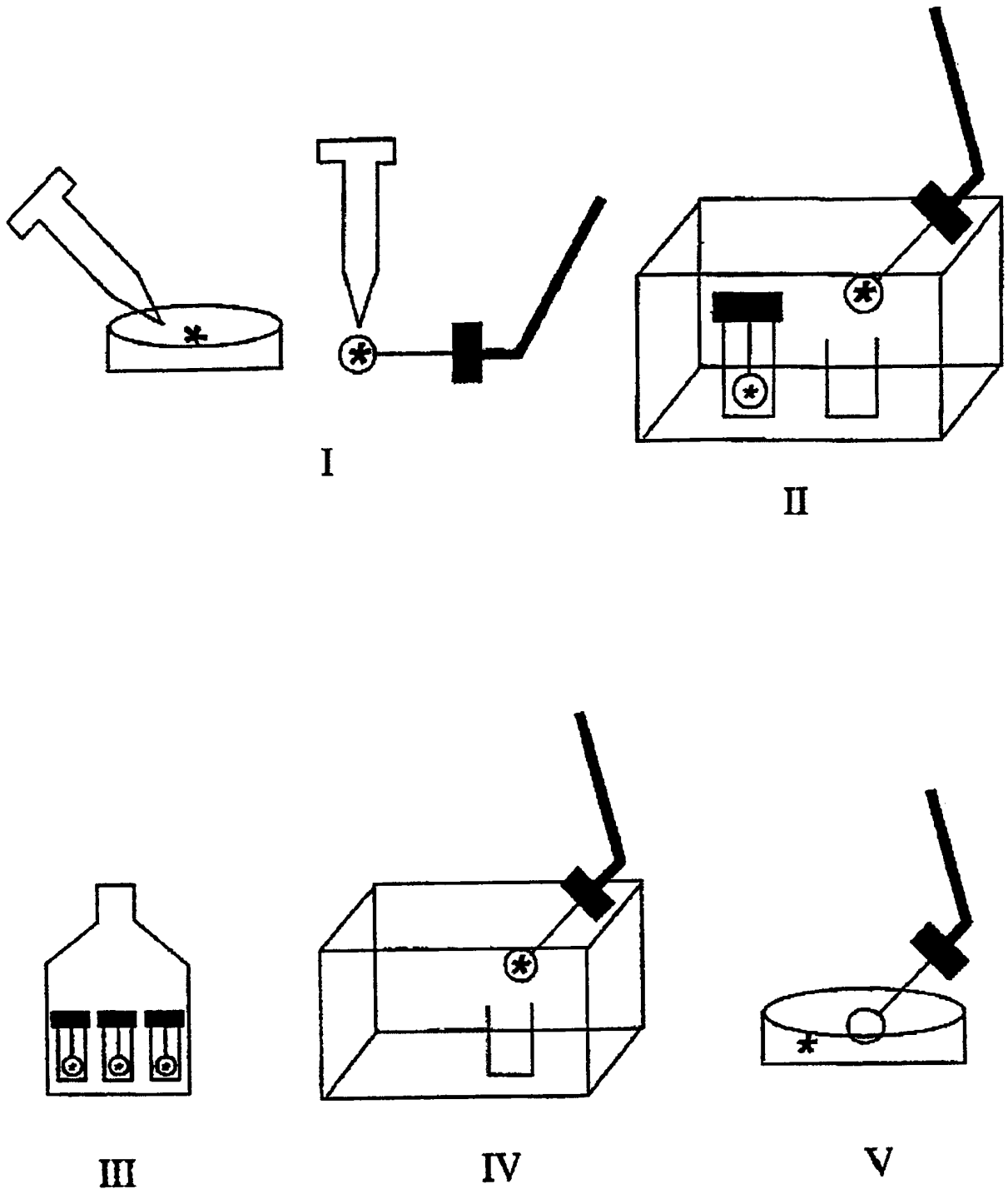
(e) un crioprotector.

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

---



**Fig. 1**