

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 319 714**

21 Número de solicitud: 200702565

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **27.09.2007**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2009**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
11.05.2009

71 Solicitante/s: **Universidad de Sevilla
OTRI-Pabellón de Brasil
Paseo de las Delicias, s/n
41013 Sevilla, ES**

72 Inventor/es: **Risco Delgado, Ramón;
Olmo Fernández, Alberto y
Sáenz Cuesta, Jaime Luis**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Criopreservación celular por vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector.**

57 Resumen:

Criopreservación celular por vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector.

El objeto de la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de criopreservación celular, que consigue la vitrificación de las muestras biológicas con presencia de bajas concentraciones de crioprotector. El procedimiento se basa en el uso de la convección forzada con el objetivo de aumentar la transferencia de calor y alcanzar muy altos ritmos de enfriamiento y recalentamiento que eviten la nucleación y el crecimiento de cristales de hielo.

ES 2 319 714 A1

DESCRIPCIÓN

Criopreservación celular por vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector.

5 **Objeto de la invención**

El objeto de la presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de criopreservación celular, que consigue la vitrificación de las muestras biológicas con presencia de bajas concentraciones de crioprotector. El procedimiento se basa en el uso de la convección forzada con el objetivo de aumentar la transferencia de calor y alcanzar muy altos ritmos de enfriamiento y recalentamiento que eviten la nucleación y el crecimiento de cristales de hielo.

Estado de la técnica

Dos técnicas son las que actualmente se han desarrollado, con multitud de variantes, con el objetivo de conseguir la conservación celular: el enfriamiento lento y la vitrificación.

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

En los últimos años ha aparecido otra técnica, la vitrificación, que mejora en gran medida la técnica del enfriamiento lento, pues elimina completamente la formación de cristales de hielo, los cuales suponen el mayor obstáculo para la criopreservación de células vivas. Actualmente, se considera la vitrificación como el futuro de la criopreservación celular [Gábor Vajta, Masashige Kuwayama, *Improving cryopreservation systems, Theriogenology 65 (2006), 236-244*]. Sin embargo, la técnica todavía necesita ser mejorada para muchos tipos celulares, como por ejemplo oocitos, en los que su vitrificación y posterior fertilización ha resultado hasta el momento en tan sólo 16 nacimientos de niños [David K. Gardner, *In vitro fertilization, a practical approach, Taylor & Francis; Edition: 1 (29 september 2006)*]. La vitrificación de células madre, otro de los tipos celulares más interesantes de criopreservar, de un gran potencial para la medicina regenerativa, apenas ha empezado a llevarse a la práctica [S.S. Gouk, C.K.F. Tan, M.P. Hande, A. Poonepalli, G.S. Dawe and Lilia L. Kuleshova, *Protein and serum free vitrification of neural stem cells, Criobiology, Volume 53, Sigue 3, December 2006, Page 389*] y una gran experimentación será necesaria antes de que pueda ser utilizada eficientemente.

La vitrificación es un proceso mediante el cual un líquido se solidifica en una fase no cristalina (fase vítrea) con un rápido descenso de la temperatura y un aumento en la viscosidad. Varios factores afectan la probabilidad de conseguir una adecuada vitrificación: viscosidad de la muestra, ritmo de enfriamiento y calentamiento, y volumen de la muestra [S. Llavín, A. Arav, *Measurement of essential physical properties of vitrification solutions, Theriogenology 2007; 67; 81-89*].

Con el objetivo de incrementar la viscosidad de la muestra se utilizan los llamados agentes vitrificantes, también llamados crioprotectores, por su relación con la protección celular. Con algunos de ellos, como el dimetilsulfóxido o el etilenglicol se han conseguido buenos resultados [(Rall WF, Fahy GM: *Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 by vitrification. Nature 1985;313:573-575*); (T. Takahashi, A. Hirsh, E. F. Erbe, J. B. Bross, R. L. Steere and R. J. Williams *Vitrification of human monocytes, Cryobiology, Volume 23, Issue 2, April 1986, Pages 103-115*)]. Sin embargo, las altas concentraciones necesarias de estos agentes crioprotectores para alcanzar la vitrificación resultan en una alta toxicidad que impide su viabilidad en muchos protocolos de criopreservación celular.

El incremento del ritmo de enfriamiento y calentamiento aumenta la probabilidad de una adecuada vitrificación, y hace necesario unas menores concentraciones de agentes crioprotectores. La técnica más usada para conseguir altas velocidades de enfriamiento ha sido la inmersión de la muestra en nitrógeno líquido. Es necesario conseguir una eficiente transmisión de calor entre el nitrógeno líquido y el material celular, para maximizar la velocidad de enfriamiento. Con este objetivo, diferentes contenedores han sido aplicados para introducir células en nitrógeno líquido, entre las que encontramos rejillas de cobre utilizadas en microscopia electrónica [Martino A, Songsasen N, Leibo S. P, *Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultrarapid cooling, Biol Reprod 1996;54;1059-1069*], capilares OPS [Vajta, G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H, *Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method, Cryo-Letters 1997;18;191-195*] (Open Pulled Straws, capilares de PVC convencionales estirados hasta tener un diámetro interior de 0.800 mm y un espesor de la pared de 0.075 mm) o los llamados cryoloops [Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK, *Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique, Fertil Steril, 1999;72;1073-1078*], lazos de nylon en los que se suspende una película de solución conteniendo las células. Sin embargo, la velocidad de enfriamiento conseguida mediante estos procedimientos necesita aún una alta concentración de crioprotectores para producir la vitrificación [Gábor Vajta, Masashige Kuwayama, *Improving cryopreservation systems, Theriogenology 65 (2006), 236-244*]. Para conseguir unos mejores resultados en la vitrificación se puede utilizar nitrógeno líquido subenfriado, llamado "slush", el cual está a una temperatura de -210°C, inferior al nitrógeno líquido, y en el que se consigue disminuir el efecto Leidenfrost (formación de una capa de vapor alrededor de la muestra que impide una eficiente transferencia de calor). La introducción de los contenedores celulares anteriormente nombrados en slush suponen una velocidad de enfriamiento de 10.000°C/min o unos 20.000°C/min (dependiendo del autor, [M.A. Nowshari and G. Bren, *Effect of freezing rate and exposure time to cryoprotectant on the development of mouse pronuclear stage embryos, Human Reproduction 15*

(2001), 2368-2373]; [G. Vajta, P. Holm, T. Greve and H. Callesen, *Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method*, *Acta Vet. Scand.* 38 (1997) 349-352] para OPS, y similares resultados para el caso de cryoloops [T. Mukaida, S. Nakamura, T. Tomiyama, S. Wada, M. Kasai and K. Takahashi, *Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique*, *Fertil. Steril.* 76 (2001) 618-620] o rejillas de cobre [P. L. Steponkus, S. P. Myers and D. V. Lynch, et al, *Cryopreservation of Drosophila melanogaster embryos*, *Nature* 345 (1990) 170-172], resultados que, aunque interesantes, siguen sin ser suficientes para conseguir una adecuada vitrificación para muchos tipos celulares.

El proceso de recalentamiento es incluso más conflictivo. Todos los procesos de recalentamiento se basan en el traspaso del contenedor celular desde el nitrógeno líquido (donde se ha mantenido la muestra por tiempo indefinido) hasta un recipiente contenedor de una solución de recalentamiento (normalmente a 37.5°), pasando por el aire entre ambos contenedores. Este paso por el aire supone un grave inconveniente, pues durante este paso el recalentamiento tiene lugar a una velocidad muy lenta, en la que es imposible evitar la formación y el crecimiento de cristales de hielo.

La probabilidad de una adecuada vitrificación depende, finalmente, del volumen de la muestra. Minimizando el volumen de la muestra se consigue minimizar la cantidad de líquido susceptible de nucleación, y por lo tanto se aumentan las probabilidades de una correcta vitrificación. Con esta filosofía, muy relacionada también con la maximización de la velocidad de enfriamiento comentada anteriormente, nacieron las “técnicas de mínimo volumen”, como Cryotop [Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. P, *Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes*, *Reprod Biomed Online*, 2005;11;300-308] o, más recientemente, CryoTip [Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O, *Vitrification of human embryos using the CryoTip method*, *Reprod Biomed Online*, in press], que han cosechado algunos éxitos en vitrificación de tipos celulares complicados de criopreservar. Sin embargo, la dificultad para manejar la muestra en dichos contenedores (en el caso de Cryotop), o la necesidad de velocidades de enfriamiento más elevadas (12.000°C/min en el caso de CryoTip, y ligeramente mayores en el caso de Cryotop) hacen necesario la invención de nuevos procedimientos.

Descripción de las figuras

Figura 1. Montaje experimental para el desarrollo de los experimentos. El nitrógeno líquido contenido en el recipiente cilíndrico es puesto en movimiento mediante un agitador vertical con la paleta situada a unos 2 cm del borde inferior. La velocidad de giro de este agitador podía ser controlada entre 0 y 2700 rpm (medida con un sensor de efecto Hall y un osciloscopio)

Figura 2. A). Enfriamiento de capilar de cuarzo al ser introducido en nitrógeno líquido, agitado a 2700 rpm. B) Enfriamiento de capilar OPS al ser introducido en nitrógeno líquido, sin convección forzada.

Figura 3. Incremento de la velocidad de enfriamiento con la velocidad de agitación.

Descripción de la invención

El procedimiento objeto de la presente invención viene a solucionar los inconvenientes anteriormente comentados, manteniendo las ventajas de los contenedores tipo “straw” y consiguiendo velocidades de enfriamiento superiores a ninguna otra técnica, evitando la nucleación y el crecimiento del hielo en el proceso de vitrificación, con la consiguiente reducción en la toxicidad generada por el uso de altas concentraciones de crioprotector.

El procedimiento trata de la aplicación al problema concreto de criopreservación celular de una técnica usada ampliamente en ingeniería para aumentar la transferencia de calor (convección forzada), la cual es complementada con un nuevo contenedor celular, los capilares de cuarzo (usados frecuentemente para difracción de rayos X), y el uso de mezclas criogénicas alternativas al nitrógeno líquido, como slush (nitrógeno líquido subenfriado procedente del cambio de fase de nitrógeno líquido) o slurry (mezcla de nitrógeno líquido con diferentes partículas como cobre en polvo o cloruro de sodio, dependiendo de las características de la muestra a criopreservar). En el proceso de recalentamiento se hace uso de las propiedades físicas del cambio de fase del slush a nitrógeno líquido, complementado igualmente con la técnica de convección forzada con el fluido de recalentamiento, con el mismo objetivo de conseguir una alta transferencia de calor.

La convección forzada se produce como consecuencia del movimiento relativo del capilar de cuarzo con respecto al fluido refrigerante (o de recalentamiento). Puede ser implementada de muchas formas: movimiento del capilar, movimiento del fluido refrigerante (o de recalentamiento) mediante un estrechamiento del flujo, sometimiento a un gradiente de presiones, mediante agitación, etc. La forma técnicamente más sencilla de implementar la convección forzada y más fácilmente repetible es mediante agitación del fluido refrigerante o de recalentamiento, por lo que ésta ha sido la forma elegida para la realización de los experimentos expuestos en los ejemplos posteriores.

El proceso de enfriamiento requiere en primer lugar de la elección del contenedor celular y el fluido refrigerante en el que será introducido. Como contenedor celular se usan capilares de cuarzo, y como líquido refrigerante se pueden usar nitrógeno líquido, slush o slurry.

El uso de los capilares de cuarzo para conseguir altas velocidades de enfriamiento y recalentamiento viene motivado por la gran conductividad térmica que posee el cuarzo (sobre $6.5 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$, comparado con el PVC de los

ES 2 319 714 A1

capilares OPS, unos $0.19 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$), al igual que por el reducido diámetro interior (sobre unos $0.100 \text{ mm} - 0.200 \text{ mm}$) y por las reducidas dimensiones de la pared que pueden ser conseguidas con el estado actual de la técnica para este material (unos 0.010 mm). Otros materiales podrían ser igualmente empleados, como plata u otros metales de alta conductividad térmica, siempre y cuando las dimensiones fuesen similares a las de los capilares de cuarzo comentados aquí.

Como fluido refrigerante se puede escoger entre nitrógeno líquido, slush o slurry.

Las oportunas medidas de seguridad han de tomarse para el manejo de la mezcla criogénica.

La forma de obtener slush (nitrógeno líquido subenfriado) es mediante vacío. Una simple bomba de vacío consigue en unos pocos minutos la solidificación de parte del nitrógeno líquido (otra parte se pierde debida a evaporación). Al volver a la presión atmosférica normal, el nitrógeno colapsa y se forma un nitrógeno líquido subenfriado, con algunas partículas sólidas en él, que recibe este nombre de “*slush*”.

Si el líquido refrigerante elegido es slurry, el volumen de las partículas elegidas será sobre unas tres cuartas partes del volumen total (el resto se rellena con nitrógeno líquido), dependiendo este volumen de la naturaleza de la partícula elegida. Las partículas elegidas pueden ser de una gran variedad. Se han obtenido buenos resultados con partículas de cobre en polvo y con cloruro de sodio. Es necesario homogeneizar el slurry para conseguir una buena mezcla entre el nitrógeno líquido y las partículas contenidas en él.

El proceso de enfriamiento propiamente dicho consiste en la introducción del capilar de cuarzo, contenedor de las células que queremos criopreservar, en el seno de un flujo de fluido criogénico elegido entre las opciones ya comentadas (nitrógeno líquido, slush o slurry). El objetivo es incrementar la velocidad de enfriamiento de las células contenidos en el capilar para conseguir una adecuada vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector. La convección forzada se produce como consecuencia del movimiento relativo del capilar de cuarzo con respecto al fluido criogénico. Tiene una doble ventaja con respecto a la simple inmersión:

- 1) Sustitución de capas de fluido refrigerante calentadas por la introducción de la muestra por otras capas más frías y en consecuencia con una mayor capacidad refrigerante.
- 2) Desestabilización y/o eliminación de la capa de vapor de Leidenfrost, en caso de formarse, que impide un buen contacto térmico entre el contenedor celular y el fluido refrigerante.

La convección forzada puede ser implementada de muchas formas, movimiento del capilar, movimiento del fluido refrigerante mediante un estrechamiento del flujo, mediante agitación, etc. La forma técnicamente más sencilla de implementar la convección forzada y más fácilmente repetible es mediante agitación del fluido refrigerante, por lo que ésta ha sido la forma elegida para la realización de los experimentos expuestos en los ejemplos.

Una vez la muestra haya alcanzado su temperatura mínima, el capilar deberá ser trasladado, junto con un reservorio lleno de nitrógeno líquido, hasta el contenedor final de nitrógeno líquido, donde permanecerá durante todo el tiempo que dure la criopreservación.

El procedimiento de criopreservación se completa con el proceso de recalentamiento, en el que se trata, igualmente, de aumentar la transferencia de calor. En primer lugar, se hace uso de las propiedades físicas del cambio de fase de slush a nitrógeno líquido para evitar los inconvenientes del paso del contenedor celular por el aire que separa los contenedores de nitrógeno líquido y de la solución de recalentamiento. Para ello se sustituye el nitrógeno líquido en donde se ha mantenido vitrificada la muestra celular por nitrógeno líquido slush. No hay problema en realizar dicha sustitución puesto que el nitrógeno líquido slush posee una mayor densidad y el nitrógeno líquido se evapora rápidamente. El slush, durante el tiempo que transcurre desde que se extrae el capilar de cuarzo de él hasta que se introduce en la solución de recalentamiento, mantiene constante la temperatura de la muestra celular a -196°C , como consecuencia del cambio de estado de dicho slush, adherido al capilar de cuarzo, a nitrógeno líquido.

Este mantenimiento de la temperatura, consigue impedir la formación de hielo (la muestra vitrificada es tan viscosa que a -196°C sigue sin poder formar cristales de hielo) y permite que la temperatura de la muestra celular pueda aumentar de forma brusca y repentina al ser introducida en la solución de recalentamiento.

El proceso de recalentamiento se completa finalmente con el uso de convección forzada, en una solución de recalentamiento con fluidos adecuados, como agua a $37,5^\circ\text{C}$ u otros fluidos con una mayor difusividad térmica, a la que puede añadirse partículas de cobre en polvo para aumentar la conducción térmica.

ES 2 319 714 A1

Modo de realización de la invención

Ejemplo 1

5 *Medida velocidad de enfriamiento*

Contenedor celular: Capilares de cuarzo (Capillary Tube Supplies Ltd. UK), con las siguientes características:

10 Diámetro interior 0.200 mm.

Espesor de la pared de 0.010 mm.

Longitud del capilar: 90 mm.

15 Fluido refrigerante: nitrógeno líquido. Este fluido refrigerante se vierte en un recipiente aislante (que minimice la evaporación del nitrógeno líquido). El volumen de fluido refrigerante existente en dicho recipiente debe ser lo suficientemente elevado como para cubrir la mayor parte del capilar de cuarzo al ser éste introducido.

20 Procedimiento de convección forzada utilizado: agitación del fluido refrigerante (nitrógeno líquido) en el recipiente anterior mediante un agitador vertical que rota sobre su eje de simetría (ver figura 1) a una velocidad de giro de 2700 rpm.

25 Velocidad de entrada del capilar en el nitrógeno líquido: 1250 mm/s (medida con el dispositivo barrera fotoeléctrica de horquilla con contador, Phywe 11207.30).

Resultados

30 Velocidad de enfriamiento: 122.500°C/minuto (entre -10°C y -170°C).

La medida fue realizada con un termopar tipo T (Omega Engineering Inc), de diámetro 0.025 mm, introducido en el capilar con la unión a 0,5 cm del extremo inferior. La Tarjeta de adquisición (Measurement Computing, USB-1208LS) muestreaba a 600 muestras por segundo.

35 *Conclusiones*

Esta velocidad de enfriamiento conseguida (en la figura 2A se muestra el perfil de enfriamiento de este experimento) supera en gran medida las velocidades de enfriamiento conseguidos por el resto de métodos. (Como ejemplo, en la figura 2B se muestra el perfil de enfriamiento para un capilar OPS convencional introducido en nitrógeno líquido sin un proceso de convección forzada, medida realizada con otro termopar tipo T de Omega Engineering Inc., de medidas coincidentes con el anterior y la misma tarjeta de adquisición).

45 En la figura 3 se muestra se muestra la velocidad de enfriamiento de los capilares de cuarzo al ser introducidos en nitrógeno líquido en el setup mostrado en la figura 1 con distintas velocidades de agitación. Estos resultados sugieren que la velocidad de agitación del líquido refrigerante durante la introducción del capilar de cuarzo conteniendo éste el material celular, debe de ser lo más elevada como sea posible y permitan los medios técnicos.

50 Este ritmo de enfriamiento es mayor que el conseguido con ninguna otra técnica utilizada hasta el momento, y permite unas concentraciones de crioprotector más bajas, y, por consiguiente, menos tóxicas que las utilizadas hasta ahora.

Ejemplo 2

55 *Procedimiento de conservación celular*

Contenedor celular: Capilares de cuarzo (Capillary Tube Supplies Ltd. UK), con las siguientes características:

60 Diámetro interior 0.200 mm.

Espesor de la pared de 0.010 mm.

65 Células a criopreservar: fibroblastos de ratón (3T3). El medio de cultivo empleado es DMEM con un 10% de Suero Fetal Bovino y un 2% de Penicilina y Estreptomicina. La incubación se realiza en una atmósfera con un 5% de CO₂ a 37°C y en condiciones de humedad de saturación.

ES 2 319 714 A1

Solución crioprotectora: 1.5 M de 1,2 propanodiol y 0.3 M de sacarosa en PBS (solución tampón que mantiene constante el PH).

5 Fluido refrigerante: slush. El procedimiento de fabricación del slush fue mediante una bomba de vacío (Telstar 2F3), que convirtió un volumen de 390 ml de nitrógeno líquido en slush en 34 minutos. El slush fue vertido en el mismo recipiente que en la figura 1, con el mismo volumen que el mostrado en la figura 1.

10 Procedimiento de convección forzada utilizado: agitación del fluido refrigerante (slush) en el mismo recipiente anterior mediante un agitador vertical que rota sobre su eje de simetría (igual que en el ejemplo anterior, ver figura 1) a una velocidad de giro de 500 rpm.

Velocidad de entrada del capilar en el nitrógeno líquido slush: 1250 mm/s (medida con el dispositivo barrera fotoeléctrica de horquilla con contador, Phywe 11207.30).

15 Recalentamiento: Uso de las propiedades físicas del cambio de fase del slush adherido al capilar de cuarzo a nitrógeno líquido. Inmersión del capilar en baño de agua a 37.5°C sin convección forzada

20 *Resultados*

Velocidad de enfriamiento: 158.000°C/minuto (medida con termopar tipo T Omega Engineering Inc, de diámetro 0.025 mm y tarjeta de adquisición Measurement Computing, USB-1208LS a 600 muestras/s).

25 Supervivencia de fibroblastos: 95% (técnica trypan blue).

Cuando el líquido refrigerante elegido es slush, la bomba de vacío debe trabajar el tiempo suficiente como para obtener una buena calidad del slush (el nitrógeno líquido debe ser solidificado), pero un tiempo inferior al que produzca tanta evaporación de nitrógeno líquido como para que el slush resultante no cubra la mayor parte del capilar de cuarzo al ser éste introducido en el recipiente contenedor.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Criopreservación celular por vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector **caracterizado** porque consiste en la introducción del contenedor celular a criopreservar en un fluido refrigerante para incrementar la velocidad de enfriamiento de las células y posterior recalentamiento por convección forzada.

10 2. Criopreservación celular por vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector según reivindicación 1, **caracterizado** porque el contenedor celular es un capilar de cuarzo y el fluido refrigerante es nitrógeno líquido, slush ó slurry.

15 3. Criopreservación celular por vitrificación con bajas concentraciones de crioprotector según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la convección forzada se produce por movimiento del capilar de cuarzo respecto al fluido refrigerante.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

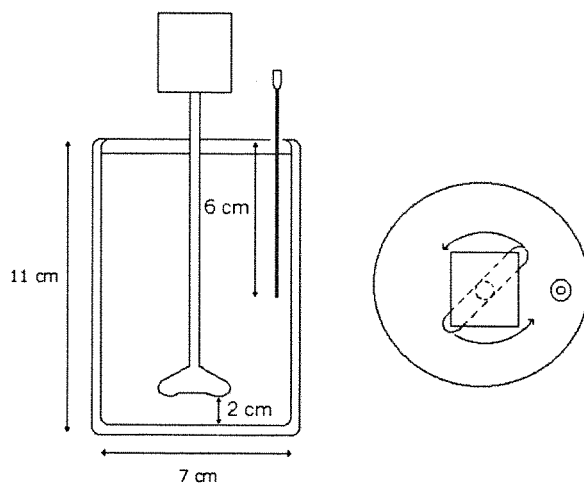


Figura 1

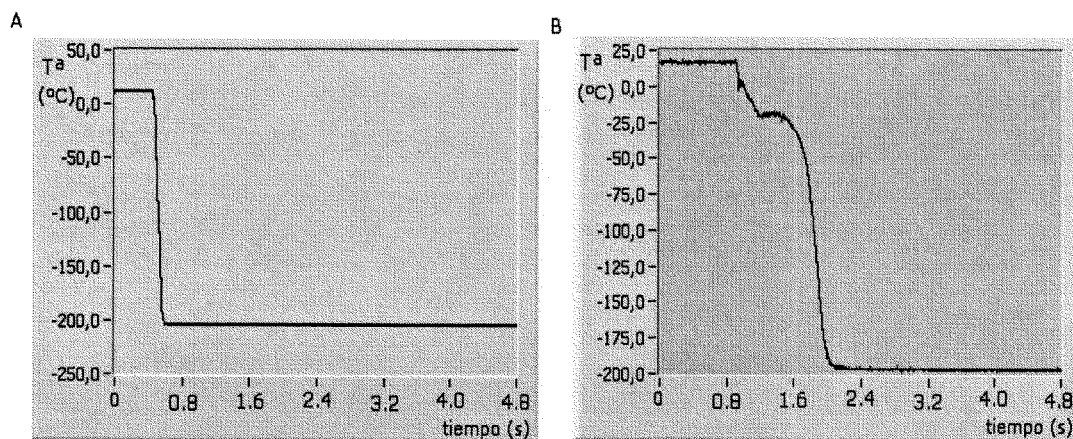


Figura 2

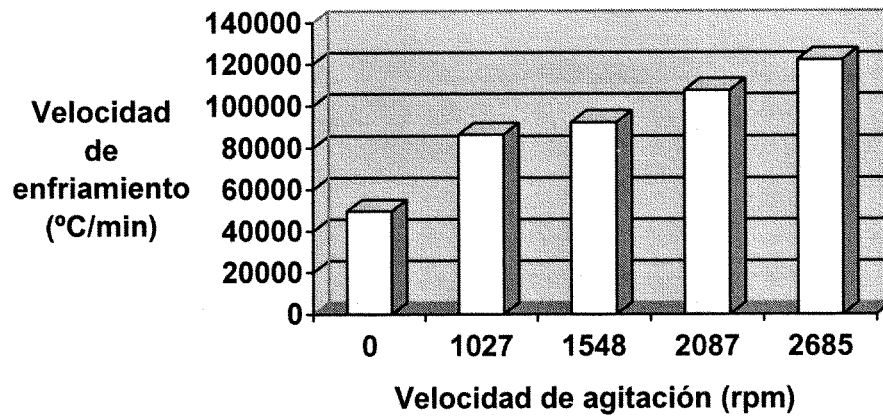


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 319 714

② Nº de solicitud: 200702565

③ Fecha de presentación de la solicitud: 27.09.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12N 5/00** (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2212641 T3 (FOREST, KATRINA T. y LANE, MICHELLE T.) 16.07.2004, todo el documento.	1-3
A	US 20060046243 A1 (JAMES JOSEPH STACHECKI y STEEN MALTE WILLADSEN) 02.03.2006, todo el documento.	1-3
A	EP 1131998 A1 (DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL INDUSTRY, MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES) 12.09.2001, todo el documento.	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

16.04.2009

Examinador

A. Amaro Roldán

Página

1/4

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

C12N, A01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, PAJ

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.04.2009

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-3	SÍ
	Reivindicaciones		NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-3	SÍ
	Reivindicaciones		NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2212641 T3	16-07-2004
D02	US 2006/0046243 A1	02-03-2006
D03	EP 1131998 A1	12-09-2001

Observaciones sobre documentos:

El documento D01 se refiere a un método para la vitrificación de un espécimen biológico que comprende: a) la colocación del espécimen biológico en un instrumento de transferencia; y b) la colocación del mismo directamente en un material congelante y en el que el espécimen biológico es expuesto directamente al material congelante experimentando de este modo la vitrificación.

El documento D02 describe un método para la vitrificación de células procedentes de mamíferos que, después de ser tratadas con un crioprotector, se depositan en un contenedor, que puede ser una paja, un vial o una ampolla, que posteriormente es cerrado y se expone a un material vitrificante, de forma que posteriormente las células se puedan recuperar. También se proporciona un kit para llevar a cabo el proceso.

El documento D03 reivindica un método de criopreservación de células en el que dichas células se introducen en nitrógeno líquido en presencia de un fluido formador de cristales

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

Ninguno de los documentos citados, considerados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-3. Además en los documentos citados no existen sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-3 cumple los requisitos de novedad, actividad inventiva y aplicación industrial de acuerdo con los Artículos 6-9 de la Ley de Patentes 11/1986.