

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 721**

51 Int. Cl.:

G01N 1/42 (2006.01)

B01L 7/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2001** **E 01999796 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2012** **EP 1340062**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para el criomacernamiento**

30 Prioridad:

07.12.2000 DE 10060889

12.09.2001 DE 10144925

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

11.03.2013

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (100.0%)**

**Hansastraße 27c
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**FUHR, GÜNTER;
HAGEDORN, ROLF y
ZIMMERMANN, HEIKO**

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 397 721 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 y dispositivo para el crioalmacenamiento

La presente invención se refiere a un procedimiento para el crioalmacenamiento de muestras, en particular, para la preparación, el almacenamiento y la manipulación de muestras biológicas en el estado crioconservado o descongelado, como p. ej. un procedimiento de crioalmacenamiento para células biológicas. La invención se refiere, en particular, a procedimientos para la escritura y lectura de datos. La invención se refiere también a un criosustrato para el crioalmacenamiento de muestras biológicas, como p. ej. células o partes de células. La invención se refiere también a aplicaciones de la crioconservación de muestras biológicas.

La crioconservación es un procedimiento generalmente conocido para conservar, en particular, materiales biológica o médicamente relevantes. Estos materiales comprenden, por ejemplo, tejidos y órganos, líquidos corporales o también células individuales o partes de células. La crioconservación se realiza según determinados procedimientos en recipientes o en sustratos, cuya forma está adaptada al material o a la muestra. Se conocen recipientes para la crioconservación, por ejemplo para tejidos y órganos (véanse las patentes DE-OS 1992231, EP-A 0853238, DE-OS 19725768, DE-OS 19905163), para componentes de la sangre (véase p. ej. la patente DE-OS 19826350) y para muestras crioconservadas en forma de células o de gotas (véanse p. ej. las patentes US-A-5275016, EP-B 0475409, DE-OS 19921236, EP-B 0804073).

Un deseo general en la crioconservación de muestras biológicas está en la identificabilidad de las muestras. Las muestras crioconservadas deben ser identificables con gran seguridad respecto a su procedencia y sus propiedades, sin que sea necesaria una descongelación. En el caso de las muestras macroscópicas esto no presenta ningún problema, puesto que los recipientes para los órganos o la sangre pueden ser provistos de un etiquetado. La localización de las muestras crioconservadas se realiza en función del sistema de archivo del criobanco correspondiente.

En el caso de muestras crioconservadas pequeñas, en forma de gotas en suspensión, células, agregados de células o partes de células congelados, la identificación de las muestras crioconservadas es considerablemente más problemática. Una muestra crioconservada sería despreciablemente pequeña en comparación con el etiquetado. En muchos casos existe un interés en la crioconservación de una multitud de muestras microscópicamente pequeñas. El almacenamiento y la identificación de muestras crioconservadas pequeñas con etiquetado no serían practicables. Además, las muestras de células crioconservadas se presentan en un estado no ordenado si se aplican las técnicas de conservación habituales, basadas en la pulverización de suspensiones de células en superficies enfriadas (véase p. ej. la patente EP-B 0475409). Sólo pueden conservarse de forma conjunta y no especificada cantidades relativamente grandes de muestras individuales.

En las técnicas de conservación descritas en las patentes EP-B 0804073 y DE-OS 19921236 es posible un depósito ordenado y un tratamiento específico incluso de muestras microscópicas en criosustratos. El depósito de muestras se realiza por ejemplo usándose un dispositivo de inyección de microgotas, el cual se dirige basándose en determinadas coordenadas del blanco. Las muestras se encuentran en posiciones definidas en el sustrato, en las que también es posible una medición específica de propiedades de las muestras y una identificación de las muestras. El sustrato puede estar provisto de una marca para definir las posiciones de las muestras en el sustrato. Por ejemplo en la patente DE-OS 19921236 se propone para el depósito a modo de matriz de muestras crioconservadas en líneas y columnas rectas proveer el sustrato de una denominación de las columnas y líneas. Esta técnica de marcado se muestra en la figura 27 (Estado de la Técnica).

El marcado convencional de criosustratos según la figura 27 presenta los siguientes inconvenientes. Si bien es posible la identificación de muestras, con ello sólo se indica una información acerca de la posición. El contenido limitado de información del marcado del sustrato representa, no obstante, un problema, puesto que además de la identificación de la muestra, también deben estar disponibles datos adicionales, p. ej. acerca de la condición o los antecedentes de la muestra o acerca de los resultados de medición. Si bien los datos pueden almacenarse en una base de datos la cual se utiliza paralelamente, el servicio separado de criobancos y bases de datos representa, no obstante, un riesgo considerable para la seguridad de la asignación de características a las distintas muestras. Este riesgo es crítico, en particular en aplicaciones de la medicina humana, puesto que una confusión de las muestras puede poner en peligro el éxito de una utilización posterior de la muestra crioconservada. Además, el marcado del sustrato presenta el inconveniente que una identificación de la muestra sólo es posible en combinación con el criosustrato. Cuando se procede a una toma de muestra, como se describe por ejemplo en la patente DE-OS 19921236, tras la separación del criosustrato, una identificación de la muestra ya sólo puede realizarse mediante una medición complicada de propiedades de la muestra en el estado descongelado.

Por la patente DE-OS 19752085 es conocido un portamuestras para exámenes microscópicos en una multitud de muestras. El portamuestras convencional está constituido por un sustrato mostrado en la figura 28 (Estado de la Técnica) en una vista en planta desde arriba esquemática con una multitud de espacios de alojamiento de las muestras. El sustrato presenta, por ejemplo, la forma de un almacén en disco (p. ej. CD). Entre un orificio pasante que se encuentra en el centro del sustrato y los espacios de alojamiento de muestras dispuestos a modo de matriz está constituida una zona anular. Por la patente DE-OS 19752085 es conocido configurar esta zona anular para el

almacenamiento de datos de muestras. El portamuestras convencional presenta el inconveniente de estar concebido sólo para el alojamiento de muestras líquidas y no para la crioconservación. Además, el almacenamiento de datos de las muestras en el anillo interior presenta los mismos inconvenientes que el marcado del sustrato arriba indicado. Si bien es posible almacenar más datos, tampoco es posible realizar una asignación a las distintas muestras sin errores.

Además de los inconvenientes indicados de las técnicas convencionales, existe además el siguiente motivo para la aplicación hasta ahora poco desarrollada de la crioconservación, en particular en la biotecnología celular. Cuando se realiza una congelación directa de muestras biológicas en una fase de enfriamiento líquida (por ejemplo nitrógeno), existe un riesgo de contaminación. Mediante la fase de enfriamiento pueden transmitirse virus a las muestras. Para evitar este riesgo, debe evitarse el contacto con la fase líquida o debe prepararse una cubierta estanca de las muestras. No obstante, esto no se ha realizado de una manera practicable.

Por la técnica de laboratorio son conocidos portamuestras, p. ej. en forma de recipientes de muestras (p. ej. la patente EP 0706825 A1), portaobjetos o placas de microtitración, que están provistos de memorias de datos. Estos portamuestras convencionales no son adecuados para un crioalmacenamiento. En primer lugar, sólo están concebidos para una utilización a temperatura ambiente o una temperatura de frigorífico por encima del punto de congelación del agua. Hasta ahora, no estaba prevista una utilización a temperaturas más bajas. En segundo lugar, los portamuestras convencionales están previstos como sustratos para muestras. En los sustratos se realiza por ejemplo un tratamiento, una manipulación o un cultivo de muestras. No obstante, los portamuestras convencionales no son adecuados para un almacenamiento o una conservación en el estado conservado. Para ello se han utilizado, hasta la fecha, recipientes para la crioconservación, tal como se han indicado anteriormente. Finalmente, los portamuestras convencionales no son adecuados para un almacenamiento y una manipulación efectiva de las muestras. Por lo general, deben transportarse manualmente, siendo imposible un almacenamiento con una densidad elevada.

La invención presenta el objetivo de indicar un procedimiento mejorado para la crioconservación con el que se superen los inconvenientes de las técnicas convencionales, que tenga un campo de aplicación más amplio y que sea adecuado, en particular, para instalaciones de conservación automatizadas. El nuevo procedimiento para la crioconservación debe permitir, en particular, que los datos de las muestras se asignen en mayor cantidad y con una mayor seguridad de datos (es decir, con una mayor seguridad de la asignación de datos de muestras a muestras determinadas) a las muestras. La invención también debe permitir una asignación de datos altamente específicos a muestras crioconservadas individuales. El objetivo de la invención es también indicar un dispositivo para la realización de un procedimiento de crioconservación mejorado de este tipo.

Estos objetivos se consiguen con el procedimiento o los dispositivos con las características según las reivindicaciones 1 y 9. En las reivindicaciones subordinadas se indican modos de realización y aplicaciones ventajosas de la invención.

Una característica de la invención es disponer al menos una muestra en un sustrato y realizar en el sustrato un almacenamiento de datos de muestras, los cuales son característicos para las propiedades de la muestra crioconservada. El almacenamiento de los datos de las muestras se realiza de manera específica según la posición en una memoria de datos de muestras, preferiblemente en la posición de depósito de la muestra correspondiente. Gracias al depósito de muestras y datos de muestras en posiciones conjuntas o estrechamente adyacentes o contiguas del sustrato, se consiguen una serie de ventajas. Los datos de las muestras están asignados mediante su posición de depósito de manera unívoca a las muestras correspondientes. Es imposible una confusión en la asignación de las muestras. Al tomar muestras pueden leerse simultáneamente en el lugar de depósito los datos correspondientes o se retiran junto con el medio de almacenamiento del sustrato, de modo que también tras una retirada de la muestra queda garantizada la identificación de la muestra y la asignación de los datos de la muestra en el tratamiento subsiguiente. Puede realizarse una retirada de muestras individuales a cualquier temperatura, en particular también en el estado congelado.

Un progreso esencial que se consigue con la invención consiste en que se indican por primera vez un procedimiento y unos dispositivos adecuados, los cuales están preparados de modo óptimo para un almacenamiento, una conservación o un almacenamiento de muestras biológicas durante largos períodos (meses y años) a bajas temperaturas (p. ej. por debajo de -50 °C). Con la invención se ofrece un nuevo campo de aplicación para la utilización de memorias de datos a temperaturas de servicio, el cual no se utilizó con anterioridad a la invención.

En función de la aplicación, pueden realizarse el depósito de muestras y el almacenamiento de datos a temperatura ambiente con posterior enfriamiento hasta alcanzar la temperatura de conservación respectivamente necesaria o también en el estado enfriado. Los inventores han detectado sorprendentemente que es posible tanto una escritura como una lectura de datos en o de medios de almacenamiento de por sí conocidos (p. ej. memorias ópticas, memorias magnéticas, memorias electromagnéticas, memorias FLASH) o en medios de almacenamiento concebidos especialmente para los objetivos del crioalmacenamiento, incluso a temperaturas de conservación por debajo del punto de congelación del agua. Los juegos de datos de las muestras pueden leerse de modo fiable en todas las fases de un proceso de crioconservación. La legibilidad de las memorias de datos a temperaturas tan bajas, que, dado el caso, no permiten una escritura, representa una ventaja que han detectado los inventores, la cual contribuye a una aplicabilidad más amplia del crioalmacenamiento según la invención.

La invención presenta ventajas especiales en el caso de un depósito de una multitud de muestras en un sustrato de almacenamiento común con un almacenamiento específico según la posición de una multitud de juegos de datos de muestras. El sustrato de almacenamiento sirve, al mismo tiempo, como criosustrato con portamuestras para la retirada, el almacenamiento y la liberación de muestras crioconservadas y como soporte de datos, que tal como un medio de almacenamiento conocido para la técnica de ordenadores, almacena una multitud de datos en las posiciones del sustrato según las posiciones de las muestras correspondientes. Las muestras se aplican en porciones (p. ej. gota a gota) y de forma aislada entre ellas como volúmenes de células en suspensión (p. ej. como gota de células en suspensión) encima o en el interior del portamuestras del criosustrato. Cada portamuestras tiene asignada una memoria de datos de muestras, en la que se depositan los datos correspondientes. El depósito simultáneo de muestras y datos de muestras se realiza de forma estable a largo plazo y sin riesgo de confusión. Por analogía con el almacenamiento de datos electrónicos, la crioconservación según la invención se denomina crioalmacenamiento. Según la invención, el criosustrato (denominado también sustrato de almacenamiento) comprende un tablero de circuitos impresos con una multitud de receptáculos.

Según un modo preferible de realización de la invención, el crioalmacenamiento se efectúa en un sustrato de almacenamiento con una multitud de elementos de crioalmacenamiento. Cada elemento de crioalmacenamiento comprende un portamuestras y una memoria de datos de muestras, que constituyen por lo tanto un componente integral, el cual puede separarse de modo reversible o irreversible del sustrato. El portamuestras y la memoria de datos de muestras constituyen un conjunto fijo, que para el crioalmacenamiento está fijado de modo separable en el sustrato de almacenamiento. Para retirar una muestra del sustrato de almacenamiento, se separa todo el elemento de crioalmacenamiento del sustrato de almacenamiento. Un sustrato de almacenamiento queda constituido según la invención por un cuerpo base, el cual presenta preferiblemente una forma plana, con una multitud de elementos de crioalmacenamiento. El sustrato de almacenamiento puede presentar en función de la aplicación una forma geométrica predeterminada de 2 ó 3 dimensiones. Según modos de realización preferibles de la invención, el cuerpo base del sustrato de almacenamiento presenta la forma de al menos un tablero de circuitos impresos, en el cual los elementos de crioalmacenamiento están colocados tal como circuitos eléctricos (chips).

También se describe un procedimiento para el funcionamiento de un criobanco con una multitud de sustratos de almacenamiento. En al menos un sustrato de almacenamiento se depositan una multitud de muestras, las cuales pertenecen por ejemplo a un organismo (sujeto de experimentación). Las muestras comprenden, por ejemplo, una o varias células específicas del sujeto de experimentación (p. ej. células madre, células de tejido). El depósito de las muestras se realiza en primer lugar de manera conjunta con los datos específicos de la muestra, en particular datos para la identificación del tipo de las muestras y del sujeto de experimentación, del momento de conservación y de los datos de medición disponibles en el momento de la conservación. Durante el funcionamiento del criobanco se retiran muestras de manera conjunta con los datos de muestras correspondientes para fines de medición, tareas diagnósticas o procedimientos terapéuticos y/o se completan con más muestras o datos de muestras. Los datos de muestras comprenden en general todas las características y parámetros de las muestras y del donante de las muestras y, dado el caso, información adicional para el depósito de datos en el sustrato de almacenamiento. Una memoria de datos de muestras utilizada según la invención presenta, por ejemplo, una capacidad de almacenamiento de al menos 4 megabytes.

Gracias a las siguientes características ventajosas del crioalmacenamiento según la invención se superan los inconvenientes de los sustratos planares o tridimensionales convencionales. Las muestras (p. ej. volúmenes de células en suspensión congelados) son accesibles en cualquier momento de manera específica. Esto también es válido para el estado de temperaturas bajas. En posiciones definidas en el sustrato pueden disponerse volúmenes de muestras mínimas, que presentan dimensiones características del orden de mm o inferiores, aunque preferiblemente tamaños típicos de $10^3 \mu\text{m}^3$ ($10 \cdot 10 \cdot 10 \mu\text{m}^3$) hasta varios 10 nm^3 . Las muestras pueden contener, por ejemplo, una célula o una multitud de células (10^5 a 10^6 células), partes de células, objetos biológicamente relevantes (como p. ej. vesículas de membrana, materiales de ADN, macromoléculas) y/u otros agregados de células. Las muestras pueden disponerse con una elevada densidad; el crioalmacenamiento presenta una mayor efectividad.

Las muestras pueden retirarse de manera selectiva en el estado congelado del sustrato de almacenamiento, sin que se interrumpa el enfriamiento de las demás muestras. Para la retirada de las muestras y la lectura de datos no es necesario descongelar todo el sustrato de almacenamiento.

Los datos de muestras pueden escribirse o leerse de modo automático y de manera asistida por ordenador. La asignación de memorias de datos de muestras y portamuestras es unívoca. Las muestras se depositan sin riesgo de confusión. La asignación de las muestras retiradas a los datos de las muestras y también al sustrato de almacenamiento se mantiene, de manera que puede recapitularse el historial de una muestra. Esto representa una ventaja especial en las aplicaciones médicas de la invención.

Los elementos de crioalmacenamiento se fabrican preferiblemente utilizándose material de plástico compatible con bajas temperaturas, el cual constituye, por un lado, el portamuestras y, por otro lado, una incorporación para la memoria de datos de muestras. El material de plástico puede tolerar repetidos cambios de temperatura sin sufrir alteraciones ni daños. Se utiliza preferiblemente un material de plástico cuya capacidad de absorción de agua < 1% de la masa propia, en particular < 0,1% de la masa propia. Los elementos de crioalmacenamiento según la invención están basados, por ejemplo, en poliuretano, politetrafluoroetileno o polietileno. Los sustratos de almacenamiento según la

invención presentan ventajosamente una elevada estabilidad mecánica y una elevada durabilidad. El crioalmacenamiento según la invención permite por primera vez un depósito seguro de muestras biológicas durante decenios. Un criobanco puede hacerse funcionar de manera fiable durante toda la vida de un sujeto de experimentación, p. ej. durante la duración de la vida de una persona. El sustrato de almacenamiento presenta una estructura relativamente sencilla, la cual permite un uso masivo de sustratos de almacenamiento en criobancos.

La invención presenta también ventajas respecto al riesgo de contaminación indicado. Los sustratos de almacenamiento según la invención permiten una serie de medidas que se explicarán más adelante, con las que se impide que un refrigerante líquido entre directamente en contacto con las muestras. Se evita una contaminación viral a través de la fase de enfriamiento. También se impide la condensación de agua o de otras sustancias en las muestras.

Otra ventaja importante de los sustratos de almacenamiento según la invención consiste en que las muestras depositadas son accesibles en el estado crioconservado o descongelado para los métodos de medición y análisis habituales (p. ej. mediciones ópticas, observaciones microscópicas) manteniéndose al mismo tiempo la legibilidad de los juegos de datos. Los datos en las memorias de datos de muestras se mantienen también en el caso de repetirse varias veces procesos de congelación o de descongelación.

El crioalmacenamiento se realiza en condiciones de conservación que se eligen en función de la aplicación. La temperatura del crioalmacenamiento y el transcurso del descenso o aumento de la temperatura se eligen en función de la tarea de conservación y del material. La temperatura de conservación está situada en el intervalo de temperaturas por debajo de la temperatura ambiente, preferiblemente por debajo del punto de congelación del agua a presión normal y en las aplicaciones de larga duración preferibles, por debajo de -80°C . La criotemperatura se ajusta preferiblemente mediante un refrigerante líquido (nitrógeno) o el vapor del refrigerante.

La invención presenta la ventaja de que se someten volúmenes de muestras mínimos a una crioconservación. Esto permite rápidos cambios de la temperatura, condiciones de conservación reproducibles y una manipulación, un tratamiento o una medición individual de las muestras.

A continuación, se describirán otras ventajas y detalles de la invención haciéndose referencia a los dibujos adjuntos. Muestran:

- la fig. 1 una vista en sección esquemática de una parte de un sustrato de almacenamiento (no es un modo de realización de la invención);
- la fig. 2 una representación esquemática de la retirada de una muestra de un sustrato de almacenamiento según la fig. 1;
- las figs. 3 a 7 vistas en planta desde arriba esquemáticas de distintas configuraciones de disposiciones de muestras y de memorias en un sustrato de almacenamiento;
- la fig. 8 una vista en sección esquemática de una parte de un sustrato de almacenamiento (no es un modo de realización de la invención)
- la fig. 9 vistas esquemáticas de distintas disposiciones geométricas de elementos de crioalmacenamiento;
- la fig. 10 una vista en sección esquemática de una parte de un sustrato de almacenamiento (no es un modo de realización de la invención)
- la fig. 11 una representación de la retirada de elementos de crioalmacenamiento de un sustrato de almacenamiento (no es un modo de realización de la invención)
- la fig. 12 una representación esquemática de una cubierta en forma de lámina en un sustrato de almacenamiento;
- la fig. 13 una vista en sección esquemática de una parte de un sustrato de almacenamiento (no es un modo de realización de la invención)
- la fig. 14 vistas en perspectiva esquemáticas de sustratos de almacenamiento según un modo de realización de la invención;
- la fig. 15 una vista en perspectiva esquemática de un elemento de crioalmacenamiento del sustrato de almacenamiento según la fig. 14 y
- la fig. 16 una vista en perspectiva esquemática de una variante del elemento de crioalmacenamiento según la fig. 15;
- las figs. 17 a 20 vistas en perspectiva esquemáticas de elementos de crioalmacenamiento según la invención según otros modos de realización de la invención;

- las figs. 21 y 22 representaciones esquemáticas de la alimentación de portamuestras y de la retirada de muestras;
- las figs. 23 a 26 vistas en perspectiva esquemáticas de sustratos de almacenamiento (no son modos de realización de la invención) y
- 5 las figs. 27 y 28 vistas en planta desde arriba de portamuestras convencionales (estado de la técnica).

10 Según la invención, al menos una muestra está dispuesta en un portamuestras en un sustrato y en el sustrato se realiza un almacenamiento de datos de muestras, los cuales son característicos para las propiedades de la muestra crioconservada. El almacenamiento de los datos de muestras se realiza de manera específica según la posición en una memoria de datos de muestras, preferiblemente en la posición de depósito de la muestra correspondiente. El conjunto de un portamuestras para el alojamiento de una muestra crioconservada y una memoria de datos de muestras para el depósito de los datos de muestras correspondientes se denomina elemento de crioalmacenamiento. Un sustrato de almacenamiento según la invención está constituido por un cuerpo base que presenta preferiblemente una forma plana, con una multitud de elementos de crioalmacenamiento.

15 En el sustrato de almacenamiento 100 representado en la fig. 1 (no es un modo de realización de la invención), está previsto un cuerpo base 110 que porta una multitud de elementos de crioalmacenamiento 120. El cuerpo base 110 (representado sólo por partes) presenta dimensiones típicas como p. ej. un disco de almacenamiento apto para lectura/escritura óptica (en lo sucesivo: CD, diámetro p. ej. aproximadamente 12 cm). Para el alojamiento de los elementos de crioalmacenamiento 120, el cuerpo base 110 presenta unos orificios pasantes 111, en los que los elementos de crioalmacenamiento están asentados a modo de un ajuste prensado. En un lado del cuerpo base 110 está dispuesto un medio de almacenamiento 112 en forma de capa. El medio de almacenamiento 112 es una capa de datos, como es conocida por los CDs convencionales y que es adecuada para la escritura y lectura de datos. El medio de almacenamiento 112 está concebido preferiblemente para la escritura óptica ("grabado") y la lectura de datos. No obstante, puede estar previsto también un medio de almacenamiento magnético o topográfico. En el medio de almacenamiento 11 está prevista, dado el caso, una capa protectora (no representada).

25 El medio de almacenamiento 112 comprende zonas de capas, las cuales se apoyan en el cuerpo base 110 y sirven de memoria base 113 y zonas, las cuales pertenecen a los elementos de crioalmacenamiento 120 y sirven de memorias de datos de muestras 122. La memoria base 113 y la memoria de datos de muestras 122 pueden constituir en primer lugar una capa cerrada del medio de almacenamiento 112, la cual se interrumpe, dado el caso, tras las retiradas de muestras (véase la fig. 2). La memoria base 113 contiene preferiblemente datos de sustrato que hacen referencia, por ejemplo, al modo de la disposición de los elementos de crioalmacenamiento y la identificación del sustrato. Las memorias de datos de muestras 122 contienen datos de muestras (véase más adelante).

30 Los elementos de crioalmacenamiento 120 están constituidos, respectivamente, por un portamuestras 121 y la memoria de datos de muestras 122. El portamuestras 121 es una pieza preformada de plástico con una forma en T o en forma de plato/seta. El portamuestras puede estar fabricado en lugar de plástico de un material biocompatible e inerte (p. ej. material semiconductor). El portamuestras 121 comprende un alojamiento de muestra 123 en forma de disco y un perno de soporte 124. La forma interior de los orificios pasantes 111 y la forma exterior del perno de soporte 124 están adaptadas unas a otras para la formación de un ajuste prensado. Entre los bordes de los alojamientos de muestras 123 están creadas distancias 125. Las distancias 125 reducen el riesgo de una contaminación mutua entre las muestras. Además, simplifican la retirada de elementos de crioalmacenamiento. Con los pernos de soporte 124 está unida respectivamente de manera fija una memoria de datos de muestras 122.

40 En los alojamientos de muestras 123 se encuentran las muestras crioconservadas 130, en particular en forma de gotas de líquido congeladas. Las gotas son células en suspensión o también muestras de referencia, p. ej. con muestras de medios de cultivo, soluciones de colorantes para marcar o muestras de sonda. Las muestras de sonda son muestras de referencia que contienen sustancias, las cuales reaccionan sensiblemente a un cambio de las condiciones críticas del entorno. Como muestras de sonda pueden utilizarse por ejemplo compuestos químicos, que son sensibles a la radiación radioactiva o a aumentos de temperatura no deseados. Un control de las muestras de sonda permite una comprobación del estado de almacenamiento del sustrato de almacenamiento en un criobanco.

45 Encima de las muestras crioconservadas 130 está dispuesta una lámina de cubierta 114 que sirve para evitar contaminaciones procedentes del refrigerante o del entorno. Las dimensiones típicas de los alojamientos de muestras 123 son por ejemplo de 0,1 a 3 mm. El espesor total del sustrato de almacenamiento 100 es por ejemplo aproximadamente de 2 mm.

50 Para el crioalmacenamiento de muestras, un sustrato de almacenamiento 100 (sin la lámina de cubierta 114) es alimentado en primer lugar con las muestras crioconservadas y, dado el caso con muestras de referencia. La alimentación se realiza por ejemplo con un dispositivo de inyección de microgotas, tal como está descrito en la patente EP-B 0804073. Las muestras se inyectan como microgotas en el estado enfriado del sustrato de almacenamiento 100 de manera selectiva en los alojamientos de las muestras 123, donde se congelan al incidir en ellos. También en el estado congelado del sustrato de almacenamiento 100 se produce una escritura p. ej. grabado) de primeros datos de las muestras en la memoria de datos de muestras 122. Después de la alimentación del sustrato, se produce la colocación de la lámina de cubierta 114 y la

incorporación del sustrato de almacenamiento 100 en un soporte, en las condiciones de refrigeración respectivamente existentes del sistema de crioconservación utilizado.

En la figura 2 se muestra la retirada de muestras del sustrato de almacenamiento 100. La retirada de muestras se realiza mediante la separación del elemento de crioalmacenamiento 120 correspondiente del cuerpo base 110. La separación se realiza con un dispositivo de estampado 140 en cooperación con un dispositivo de punzonado 150. El dispositivo de estampado presenta una herramienta de corte 141 hueca, cuyo filo 142 está adaptado a la forma exterior del alojamiento de muestra 123. La herramienta de estampado puede estar constituida, por ejemplo, por un capilar hueco con un extremo esmerilado. El dispositivo de punzonado 150 presenta un punzón 151 con el que la memoria de datos de muestras 122 se separa del medio de almacenamiento 112 restante, pudiendo expulsarse a presión el perno soporte 124 del orificio pasante 111. En el extremo del punzón 151 está prevista, dado el caso, también una herramienta de corte para una mejor separación del medio de almacenamiento 112. Los dispositivos de estampado y punzonado 140, 150 pueden estar refrigerados de una manera activa o pasiva para mantener una temperatura determinada del sustrato de almacenamiento 100.

La fig. 2 muestra que con el dispositivo de estampado 140, se retira la muestra 130 del elemento de crioalmacenamiento 120, sin que se abran otros depósitos de muestras. La muestra 130 sigue estando unida a la memoria de datos de muestras 122 incluso después de la retirada. Puede realizarse una transferencia de la muestra a otro sustrato de almacenamiento y/o un dispositivo de medición en condiciones criogénicas o a una temperatura elevada. Los datos de muestras se completan, p. ej. en función de un resultado de medición, en la memoria de datos de muestras 122 (acumulación de datos).

Las figuras 3 a 7 muestran sustratos de almacenamiento (p. ej. según la figura 1, que no es un modo de realización de la invención) en una vista en planta desde arriba esquemática. Un sustrato de almacenamiento 100 está constituido como un CD convencional y presenta en particular en el centro un orificio pasante 101 para la fijación del sustrato de almacenamiento en el dispositivo de crioconservación y/o en un sistema de escritura/lectura. Los alojamientos de muestras 123 de los portamuestras presentan una forma rectangular en este modo de realización. Presentan dimensiones de superficie típicas de aproximadamente $0,1$ a 30 mm^2 . Los alojamientos de muestras 123 están dispuestos por grupos en sectores 102. Al retirarse muestras con los elementos de crioalmacenamiento correspondientes, el cuerpo base 110 con los orificios pasantes 111 libres permanece allí.

La figura 4 muestra una variante modificada con alojamientos de muestras 123 circulares. En cada alojamiento de muestras 123 puede depositarse una gota con un volumen de varios mm^3 . Cada gota puede contener hasta 10^5 células. En todo el sustrato de almacenamiento con un diámetro de aproximadamente 12 cm pueden depositarse, por lo tanto, hasta 10^8 células.

La figura 5 muestra una configuración modificada con un alojamiento de muestras 123 circular, la cual, en comparación con la figura 4, presenta diámetros más pequeños (p. ej. $0,01$ a 1 mm). De este modo aumenta el número total de elementos de crioalmacenamiento en el sustrato de almacenamiento 100. Aumenta la variabilidad en la retirada de muestras.

Las memorias base 113 mostradas en la figura 1 pueden estar dispuestas también de manera selectiva según pistas determinadas en el medio de almacenamiento. Esto se muestra en las figuras 6 (pistas de memoria anulares) y 7 (pistas de memoria orientadas de forma radial). Con las memorias base 113 se produce una fragmentación adicional del sustrato de almacenamiento.

La figura 8, la cual no representa un modo de realización de la invención, muestra detalles de una forma modificada de un sustrato de almacenamiento 200 con un cuerpo base 210, el cual está constituido por los portamuestras 221 de los elementos de crioalmacenamiento. Los portamuestras 221 presentan en un lado las memorias de datos de muestras 222 y en el lado opuesto los alojamientos de muestras 223. Los portamuestras 221 son piezas preformadas, p. ej. de plástico o de un material semiconductor, en las cuales están realizados los alojamientos de muestras 223 tales como escotaduras. Los portamuestras 221 están unidos entre sí mediante puntos de rotura controlada 224. Las memorias de datos de muestras 222 constituyen una capa del medio de almacenamiento dispuesta en el lado inferior del cuerpo base 210. En el lado superior del sustrato de almacenamiento está prevista una lámina de cubierta 214 con la que se recubren las muestras 230. La lámina de cubierta 214 envuelve el cuerpo base 210 en su canto exterior con un saliente 215 circunferencial.

La utilización del sustrato de almacenamiento 200, en particular la alimentación y el almacenamiento de datos se realizan según los principios arriba explicados. Para la retirada de muestras, los elementos de crioalmacenamiento 220 se separan respectivamente con un portamuestras 221 y una memoria de datos de muestras 222 con una herramienta adecuada del sustrato de almacenamiento 200 (p. ej. se retiran rompiendo, cortando o de un modo similar). En función de la aplicación, los puntos de rotura controlada 224 están realizados con una geometría determinada, como se muestra en la figura 9.

En la figura 9, las líneas blancas muestran la extensión de los puntos de rotura controlada 224. En las zonas enmarcadas con una línea negra se encuentran los portamuestras, en particular con los alojamientos de muestras. Los alojamientos de muestras pueden presentar distintas geometrías en el interior del sustrato de almacenamiento 200, p. ej. pueden volverse más estrechos hacia el interior (imagen parcial izquierda) o más delgados (imagen parcial derecha).

Otro sustrato de almacenamiento 300 se muestra en la figura 10 (no es un modo de realización de la invención). El sustrato de almacenamiento presenta un cuerpo base 310 en forma de disco, formando una placa plana, uniforme. En este modo de realización no están previstas inserciones o puntos de rotura controlada. Los elementos de crioalmacenamiento 320 constituyen en esta configuración sólo una unidad mientras las muestras 230 estén dispuestas en el sustrato de almacenamiento 300. Como portamuestras 321 está prevista una capa de alojamientos de muestras para cada muestra. La capa de alojamientos de muestras está fabricada de un material de plástico que presenta poca adherencia al cuerpo base 310 (p. ej. de PTFE o caucho). La adherencia reducida existe en particular en el intervalo de temperaturas bajas.

Para la separación de una muestra 330, la muestra se separa con la capa de alojamientos de muestras con una herramienta adecuada del cuerpo base 310 (p. ej. se levanta, se cepilla, se desplaza o se desprende). La memoria de datos de muestras 322 permanece en el lado inferior del sustrato.

También en esta variante, las muestras 330 están protegidas contra contaminaciones mediante una cubierta 314. La cubierta 314 está constituida por una tapa que está estanqueizada respecto al cuerpo base 310 mediante una junta anular 315.

En la figura 11 está representada en la imagen parcial superior en una vista en perspectiva un detalle de un sustrato de almacenamiento 400 (no es un modo de realización de la invención). En este sustrato de almacenamiento, los elementos de crioalmacenamiento 420 están previstos en forma de una perforación previa o un ajuste prensado en el cuerpo base 410. El cuerpo base 410 y los elementos de crioalmacenamiento 420 constituyen una placa plana, en cuyo lado inferior está dispuesto en forma de capa el medio de almacenamiento 412. El medio de almacenamiento 412 (lámina de soporte de datos) también puede estar perforado previamente y se encuentra en el lado inferior del cuerpo base 410 con la planaridad necesaria para la escritura y lectura óptica de datos.

En la imagen parcial inferior de la figura 11, el elemento de crioalmacenamiento 420 está representado en una vista a escala ampliada. En el lado superior del cuerpo base 410, que constituye aquí el portamuestras 421, está prevista una escotadura como alojamiento de muestras 423. En el alojamiento de muestras está dispuesta la muestra crioconservada 430 (p. ej. una gota en suspensión). Con la lámina de cubierta 414, la muestra 430 queda protegida contra la contaminación. También en la lámina de cubierta 414 pueden estar previstas perforaciones según la forma exterior del elemento de crioalmacenamiento 420. De manera general, la cubierta o la lámina de cubierta también pueden estar constituidas como medio de almacenamiento. Al retirar el elemento de crioalmacenamiento 420 del sustrato de almacenamiento 400 con una herramienta que presenta una estructura análoga a la representación en la figura 2, la muestra 430 se retira con el portamuestras 421, la memoria de datos de muestras 422 y el recorte de la lámina de cubierta 414. El sustrato de almacenamiento 400 se fija en un soporte y se separa con el punzón 451 exactamente ajustado (dado el caso, con filo 452) y el dispositivo de estampado 440 del cuerpo base 410. El dispositivo de estampado 440 está provisto de un punzón 441 móvil que, tras la separación del elemento de crioalmacenamiento 420, lo empuja para retirarlo del dispositivo de estampado.

La figura 12 muestra una variante modificada en comparación con la figura 11 de un ejemplo de un elemento de crioalmacenamiento 420 individual con el portamuestras 421 y el alojamiento de muestras 423. En esta configuración, la cubierta 414 está constituida por una lámina de dos capas. En el portamuestras 421 descansa una capa porosa 415 como cubierta. Encima de la misma está dispuesta una capa estanca 416 con una prolongación 417 que sobresale del plano del sustrato. La prolongación 417 puede retirarse manualmente o con una herramienta correspondiente del sustrato. Durante este proceso, se deja al descubierto la capa inferior 415 en el portamuestras 421. Este procedimiento puede realizarse en el estado congelado o descongelado. El alojamiento de muestras 423 se abre temporalmente en parte. Puede tener lugar un cambio rápido del líquido al alojamiento de muestras 423. Pueden lavarse por ejemplo crioprotectores de la suspensión de células.

La cubierta 414 también puede contener datos o marcas para la identificación de la muestra. Según unas configuraciones modificadas, puede estar prevista una estructura de la cubierta 414 constituida por otras capas.

El principio de la cubierta de varias capas también se muestra en la figura 13 en el ejemplo de otra variante. El sustrato de almacenamiento 500 (no es un modo de realización de la invención) comprende a su vez un cuerpo base 510 con salientes 511 en forma de setas, en los que están dispuestos los portamuestras 521. Los portamuestras 521 son piezas preformadas con respectivamente un alojamiento de muestras 523 en el lado superior y una escotadura de fijación 524 en el lado inferior. Las escotaduras de fijación 524 y los salientes 511 cooperan como botones de presión, tal como uniones mecánicas separables. En el lado opuesto a los portamuestras 521 se encuentra como medio de almacenamiento 512 una capa de soporte de datos, la cual constituye las memorias de datos de muestras 522, las cuales están asignadas a los portamuestras 521 correspondientes. La cubierta 514 está realizada según el principio de capa doble, que se muestra en la figura 12.

Para la retirada de un portamuestras 521 en el estado congelado del sustrato de almacenamiento 500, una herramienta en forma de cepillo o cuña se coloca por debajo del portamuestras 521. Con la herramienta se separa la unión entre el saliente 511 correspondiente y la escotadura de fijación 524. La muestra se separa de esta manera con el portamuestras 521 y partes de la cubierta 514 del sustrato de almacenamiento 500. También en esta variante se pierde durante la separación la unión a la memoria de datos de muestras 522. No obstante, también pueden estar previstos datos de muestras en la parte correspondiente de la cubierta 514.

Los modos de realización de la invención representados en las figuras 14 a 26 se caracterizan porque el sustrato de almacenamiento 600 está constituido por al menos un tablero de circuitos impresos 610, que corresponde al cuerpo base y en el cual están colocados uno o varios elementos de almacenamiento 620, tal como circuitos eléctricos (chips). El tablero de circuitos impresos 610 porta conexiones 611 eléctricas (circuitos impresos) u ópticas (fibras ópticas), las cuales conectan respectivamente un receptáculo 612 para el alojamiento de un elemento de almacenamiento con un dispositivo de control (no representado) externo. El receptáculo corresponde sustancialmente al zócalo de un soporte de circuito impreso convencional, en el cual se insertan los contactos del elemento de almacenamiento (véase p. ej. la figura 15). En los receptáculos 612 pueden estar previstos de manera adicional respectivamente circuitos para la adaptación de señales, la transformación de señales o la detección de señales de datos suministradas en las líneas de conexión 611 o por fibras ópticas.

Las líneas de conexión 611 pueden estar previstas en el lado superior del tablero de circuitos impresos 610 con los receptáculos 612 (imagen parcial superior de la figura 14) o en el lado opuesto (imagen parcial inferior de la figura 14). En el caso indicado en último lugar, los receptáculos 612 pueden estar dispuestos con mayor densidad. La imagen parcial inferior de la figura 14 muestra, además, que en el tablero de circuitos impresos 610 puede estar previsto también un circuito de cálculo 613 para el mando de los elementos de almacenamiento, dado el caso, con una memoria RAM separada.

Cada receptáculo 612 está preparado para el alojamiento de un elemento de almacenamiento 620. Cada elemento de almacenamiento 620 comprende de manera análoga a las funciones anteriormente explicadas un portamuestras 621, el cual está conectado con la memoria de datos de muestras 622. Según un modo de realización especialmente ventajoso de la invención, el elemento de almacenamiento está constituido por un circuito integrado de por sí conocido (p. ej. bloque de memoria). El circuito contiene como memoria de datos de muestras 622 al menos una memoria RAM. El elemento de almacenamiento 620 también puede contener un circuito de cálculo completo, con el que se administra la función del elemento de almacenamiento y mediante el cual el elemento de almacenamiento comunica con el exterior. El portamuestras 621 está constituido preferiblemente en la cubierta de plástico o en el encapsulado del circuito integrado o en combinación con este.

Por ejemplo, según la figura 15, el alojamiento de muestras 623 es una escotadura en la cubierta de plástico. En el caso de un chip convencional con un tamaño de 7 a 14 mm, el alojamiento de muestras 623 puede presentar una superficie base de aproximadamente 4 · 10 mm con una profundidad de 1 mm. Con estas medidas, en el elemento de almacenamiento 620 pueden alojarse hasta cinco millones de células.

En el fondo del alojamiento de muestras 623 pueden estar previstos dispositivos de control adicionales para la manipulación de la muestra o dispositivos sensores y/o de visualización 624. Los dispositivos de control comprenden dado el caso elementos de refrigeración y calefacción, p. ej. elementos Peltier, elementos de calefacción por resistencia, para el enfriamiento o calentamiento controlado de la muestra o materiales con una capacidad térmica más elevada para la reducción de la carga térmica de la muestra durante un transporte del chip. Como dispositivo de visualización puede estar prevista una fuente luminosa, la cual señala por ejemplo un estado determinado del elemento de almacenamiento 620 o de la muestra o que sirve como fuente luminosa de medición para mediciones en la muestra 630. Adicionalmente, el elemento de almacenamiento 620 está provisto de una cubierta 614, que protege la muestra de contaminación, evaporación y sublimación. La cubierta 614 es, por ejemplo, una tapa de plástico, una lámina soldada u otro componente en forma de capa que establece una unión estanca, separable con el portamuestras 621.

El portamuestras 621 sirve también como guía para los pies de contacto 625 del elemento de almacenamiento. Los pies de contacto están conectados, en particular, con la memoria de datos de muestras 622 y, dado el caso, con los dispositivos de control y de visualización 624.

A diferencia de los chips de diagnóstico conocidos por la biotecnología celular, en el elemento de almacenamiento 620 no hay ninguna conexión entre la muestra 630 y la memoria de datos de muestras 622, los dispositivos de control y/o de visualización 624 que esté orientada a una captación de parámetros eléctricos de las células congeladas en la muestra.

La cubierta 614 según la figura 15 puede ser sustituida también por un recipiente criogénico 615 según la figura 16. Con el recipiente criogénico 615 queda constituido el lado superior del portamuestras 621 como recipiente, el cual presenta una estructura análoga a un recipiente criogénico convencional. En particular, puede estar prevista una tapa 616 con una unión roscada estanqueizada para el cuerpo del recipiente 617 cilíndrico. El recipiente criogénico 615 está fabricado de un material de plástico resistente al frío. El modo de realización representado en la figura 16 de la invención presenta la ventaja de que el recipiente criogénico 615 puede alimentarse también de una manera manual, p. ej. mediante pipeteado.

Los detalles de otros modos de realización de elementos de almacenamiento 620 según la invención se muestran en las figuras 17 a 22. El elemento de almacenamiento 620 según la figura 17 comprende un portamuestras 621 y una memoria de datos de muestras 622. La memoria de datos de muestras 622 presenta una estructura tal como un chip de memoria electrónico de por sí conocido con electrodos de contacto 625 y un encapsulado 626, en el cual están dispuestos un circuito de memoria y, dado el caso, un circuito de cálculo. El encapsulado 626 está fabricado normalmente de un material de plástico.

El portamuestras 621 está fijado en el lado superior del encapsulado 626 o está constituido como parte del

encapsulado 626. El portamuestras 621 está fabricado a partir de un bastidor de plástico 627, en el que está integrado al menos un recipiente criogénico 615 para el alojamiento de muestras. El bastidor de plástico 627 es por ejemplo una pieza moldeada por inyección con un tamaño según la superficie del encapsulado 626. Las partes de bastidor laterales están provistas de taladros, en los que están dispuestos los recipientes criogénicos 615.

Cada recipiente criogénico 615 crea al menos una cámara de muestras alargada. La al menos una cámara de muestras presenta una forma alargada de tal manera que la sección transversal interior es sustancialmente más pequeña que su extensión longitudinal. Como cámaras de muestras están previstas, por ejemplo, tubos flexibles, agujas huecas, capilares o similares. El diámetro interior de una cámara de muestras está situado, por ejemplo, en el intervalo de 5 µm a 4 mm. La longitud puede elegirse, por ejemplo, en el intervalo de 0,5 cm a 10 cm. El cociente del diámetro de la sección transversal y la longitud de una cámara de muestras es preferiblemente inferior a 1/10. La preparación de al menos un recipiente criogénico 615 en forma de tubo o de tubo flexible presenta las ventajas de una alimentación o un vaciado rápido de las cámaras de muestras, una elevada capacidad de miniaturización y una elevada velocidad de congelación.

En el modo de realización mostrado en la figura 17 de la invención, está constituido en primer lugar un recipiente criogénico 615 por un tubo flexible (representado en parte) colocado en forma de meandro en el bastidor 627. Después de la alimentación del recipiente criogénico 615 mediante los extremos del tubo flexible (véanse las flechas), las partes dibujadas con línea de trazo interrumpido del tubo flexible pueden cortarse, de modo que permanecen los tramos dibujados con un trazo continuo como recipientes criogénicos separados (p. ej. 616). Todos los recipientes criogénicos 615 se alimentan de modo uniforme con una muestra 630 común, que de modo ventajoso está dividida en muestras parciales. Con un dispositivo de separación 400 mecánico, las muestras parciales (p. ej. 616) pueden ser separadas del crioelemento 620 en el estado congelado o descongelado, sin que se influya en las muestras parciales restantes.

En la superficie del encapsulado 626 y/o en el bastidor 627 del alojamiento de muestras 623 pueden estar previstos dispositivos de control adicionales para la manipulación de la muestra y/o dispositivos sensores y/o de visualización 624. Los dispositivos de control comprenden, dado el caso, elementos de refrigeración y calefacción, p. ej. elementos Peltier, elementos de calefacción por resistencia o similares. Sirven para la refrigeración o el calentamiento controlado de la muestra o de materiales con una capacidad térmica elevada para la reducción de la carga térmica de la muestra, p. ej. durante un transporte del chip. Los dispositivos sensores y/o de visualización pueden presentar una fuente luminosa, que señala por ejemplo un estado determinado del elemento de criomacacenamiento 620 o de la muestra o que sirve como fuente luminosa de medición para mediciones en la muestra 630.

Adicionalmente, cada extremo de un recipiente criogénico 615 puede estar provisto de una cubierta 614, que protege la muestra de contaminación, evaporación y sublimación. La cubierta 614 es, por ejemplo, una tapa de plástico, una lámina soldada u otro componente que establece una unión estanca con los extremos del recipiente criogénico 615 correspondiente. Cuando está previsto un tubo flexible como recipiente criogénico, la cubierta también puede estar constituida por una parte del tubo flexible propiamente dicho, cerrándose el mismo por apriete en sus extremos.

En lugar de un tubo flexible continuo y, dado el caso, recortado según la fig. 17, como alojamiento de muestras 623 también pueden estar previstos una multitud de recipientes criogénicos 615 tubulares de un material rígido, los cuales están orientados en dirección transversal (fig. 17) o en paralelo (fig. 18) respecto a la extensión longitudinal del crioelemento 620. En el modo de realización según la fig. 18, están integrados (encerrados) por ejemplo 5 recipientes criogénicos 615 en el encapsulado 626. Esto puede realizarse mediante una colada de los recipientes criogénicos 615 en el material de encapsulado o un pegamento. Los recipientes criogénicos 615 están constituidos por agujas huecas o capilares.

La alimentación de un recipiente criogénico 615 se realiza aplicándose una depresión en un extremo y alojándose la muestra crioconservada mediante el extremo de entrada 617 opuesto. En lugar de ejercer la depresión, también puede estar previsto un alojamiento de muestras con la acción de fuerzas capilares en el interior del recipiente criogénico 615. En particular, en la configuración según la fig. 18, en los distintos recipientes criogénicos 615 pueden alojarse muestras crioconservadas 631, 632, ... iguales o distintas. Los recipientes criogénicos 615 están dispuestos preferiblemente a una distancia entre sí tal que los extremos de entrada 617 estén orientados de forma correspondiente al formato de una placa de microtitración o nanotitración.

Según un modo de realización alternativo, mostrado en la fig. 19 del crioelemento 620 según la invención, el recipiente criogénico 615 del portamuestras 622 está constituido por un tubo flexible, cuyo diámetro es variable en la dirección longitudinal del tubo flexible. Alternan los tramos 618 con un diámetro reducido y las cámaras parciales 619, en las cuales el tubo flexible está considerablemente ensanchado. El recipiente criogénico 615 comprende una multitud de cámaras parciales 619, que pueden separarse de modo ventajoso con un dispositivo de separación 400 mecánico del crioelemento 620. El recipiente criogénico está fijado en el encapsulado 626 de la memoria de datos de muestras 622 (p. ej. mediante pegamento o parcialmente fundido en bloque). La alimentación del recipiente criogénico 615 se realiza ejerciéndose una depresión de tal modo que mediante el extremo de entrada 617 se aspira la muestra crioconservada suspendida en el recipiente criogénico 615.

Según la fig. 20, el recipiente criogénico 615 también puede estar constituido por un tubo flexible, que sólo presenta una cámara parcial 619, la cual se alimenta o se vacía, tal como está representado mediante un tramo de tubo flexible 618 o de forma alternativa mediante varios tramos de tubo flexible. La cámara parcial 619 según la fig. 20 está constituida, por ejemplo, por un material de lámina, que está pegado en el encapsulado 626.

A diferencia de los chips de diagnóstico conocidos por la biotecnología celular, en el elemento de crioalmacenamiento 620 no existe ninguna conexión entre la muestra 630, por un lado, y la memoria de datos de muestras 622 y/o los dispositivos de control, sensores y/o de visualización 624, por otro lado, que esté orientada a una captación de parámetros eléctricos de las células congeladas en la muestra.

En las figuras 21 y 22 se muestran otros detalles de la alimentación y la retirada de muestras de crioelementos 620. La alimentación se realiza, según la fig. 21, por ejemplo, con un dispositivo de carga que presenta, por un lado, una multitud de depósitos de muestras 710 y, por otro lado, un dispositivo de presión 720. El elemento de crioalmacenamiento 620 comprende, de modo análogo al modo de realización mostrado en la fig. 17, un portamuestras 621 en forma de bastidor, en el que están dispuestos una multitud de recipientes criogénicos 615 en forma de capilares o tubos flexibles, cuyos extremos de entrada 617 se asoman a los depósitos de muestras 710. Los depósitos de muestras 710 son, por ejemplo, depósitos de reserva, en los que se encuentran las muestras después de haberlas obtenido de un sujeto de experimentación. El dispositivo de presión 720 comprende una pieza sobrepuesta de presión 721, la cual puede colocarse de manera estanca a la presión en los extremos opuestos de los recipientes criogénicos 615 y una línea de conexión 722, mediante la cual pueden solicitarse todos los recipientes criogénicos 615 con una depresión. Los extremos de los recipientes criogénicos 615 están fijados preferiblemente en una parte del bastidor, de manera preparada para el alojamiento común de la pieza adicional de presión 621. Pueden desembocar por ejemplo en la superficie del bastidor 627. Bajo la acción de la depresión se aspiran muestras 630 al interior del recipiente criogénico.

Después de la alimentación del portamuestras 621, el elemento de crioalmacenamiento 620 es separado del dispositivo de carga. Los extremos de entrada 617 son acortados, dado el caso, hasta el bastidor 627. El elemento de crioalmacenamiento 620 se coloca en un sustrato de almacenamiento 610 (véase la fig. 14) y se traslada con este a un entorno con temperatura reducida, p. ej. un recipiente criogénico en un criobanco.

En la fig. 22 se muestra una posibilidad de la retirada de muestras de un elemento de crioalmacenamiento 620 con un recipiente criogénico 615 guiado en forma de meandro. Las muestras parciales 616 son separadas con un dispositivo de separación mecánico 400, p. ej. un dispositivo de corte. Esto puede realizarse de manera ventajosa en un estado de temperatura reducida, de modo que la muestra restante permanezca sin cambios.

En las figs. 23 a 26 se muestran elementos de crioalmacenamiento 620 (no son modos de realización de la invención) en los que, a diferencia de los modos de realización arriba descritos, el portamuestras 621 no está integrado en un encapsulado del circuito de memoria sino en el material del sustrato del mismo. La fig. 23 muestra, por ejemplo, una parte de un elemento de crioalmacenamiento 620 (sin encapsulado y sin pies de contacto). Está representado en forma de detalles de un circuito de memoria 800 con un sustrato 810 y componentes integrados 820. El sustrato es, por ejemplo, una plaquita semiconductora, tal como se utiliza habitualmente para la fabricación de circuitos integrados. En el lado superior del sustrato 810 se procesan los componentes 820 con los métodos de por sí conocidos de la tecnología de semiconductores. En el lado inferior del sustrato 810 están realizadas cámaras de muestras 623 en forma de canales como alojamientos de muestras, las cuales están cerradas con una capa de cubierta. Las cámaras de muestras 623 presentan medidas de por ejemplo 400 μm (dimensión de la sección transversal) y 20 mm (longitud). Las cámaras de muestras 623 también pueden estar constituidas en una capa de sustrato estructurada, que está dispuesta en el sustrato (véase la fig. 24). La capa de cubierta 830 está fabricada de un material de plástico, vidrio o de un material semiconductor.

También pueden estar previstos varios planos con cámaras de muestras 623, como se muestra en la fig. 24. En el sustrato 810 puede estar prevista una primera capa de sustrato 811 estructurada con cámaras de muestras 623 y una primera capa de cubierta 830. En la primera capa de cubierta 830 puede estar prevista al menos otra capa de sustrato 812 estructura con cámaras de muestras 623 y otra capa de cubierta 831. En esta variante, se aloja un volumen de muestra aumentado en la memoria de datos de muestras correspondiente. El llenado o el alojamiento de muestras en los elementos de crioalmacenamiento 620 según las figs. 23 y 24 se realiza mediante racores de empalme, que están integrados en el encapsulado de los soportes de datos de muestras 622 y que se cortan o se desconectan tras la utilización.

En las figs. 25 y 26 se muestran esquemáticamente distintas geometrías de los alojamientos de muestras 623 en forma de canales en los sustratos 810. Pueden estar previstas, por ejemplo, formas de canal en forma de meandros o en forma de U con distintas dimensiones de las secciones transversales, las cuales están dispuestas unas encajadas en las otras.

Los modos de realización de la invención representados en las figs. 14 a 22 presentan una serie de ventajas. El elemento de crioalmacenamiento está constituido por un chip electrónico que, como memoria de datos de muestras, contiene una memoria en la que puede escribirse electrónicamente desde el exterior y que es legible desde el exterior. No es necesario un ajuste de una cabeza de lectura/escritura en función de la temperatura, tal como por ejemplo en caso de un lector de CD. En el chip se encuentra al menos un alojamiento de muestras para una o varias muestras. El chip y/o el receptáculo pueden estar provistos de un circuito electrónico para el mando de elementos funcionales, sensores y/o sistemas de alarma adicionales. La estructura mostrada en la fig. 14 puede fabricarse como crio-sustrato de varios niveles tridimensional, en el que están apilados varios tableros de circuitos impresos 610 con una multitud de elementos de crioalmacenamiento, unos encima de los otros.

Los elementos de almacenamiento en forma de chip pueden retirarse sin problema en el estado congelado del tablero de circuitos impresos y transferirse a otros tableros de circuitos impresos, dispositivos de medición o estaciones de

tratamiento, sin que se pierdan los datos de las muestras. Los elementos de criomacacenamiento pueden ser direccionados de manera electrónica desde el exterior.

Además, los elementos de criomacacenamiento pueden estar provistos de una o varias identificaciones, marcas de color legibles de manera automática o que pueden ser controladas visualmente para que dispongan de una protección múltiple. Los elementos de criomacacenamiento según la fig. 15 pueden miniaturizarse aún más en comparación con las dimensiones de circuitos integrados convencionales. En el caso de una miniaturización es preferible un mando óptico en lugar de contactos eléctricos.

El al menos un tablero de circuitos impresos de un sustrato de almacenamiento puede estar conectado con un sistema de bus de ordenador, con el cual se realiza una consulta y un mando individual de los distintos elementos de criomacacenamiento. La forma de los elementos de almacenamiento representada en la fig. 15 puede modificarse en función de la aplicación (p. ej. portamuestras redondos o poligonales).

A continuación, se resumirán las características importantes de la invención.

Los sustratos de almacenamiento según la invención combinan un alojamiento de material con una grabación de datos específica según la muestra. Durante el almacenamiento a temperaturas bajas, es posible la retirada selectiva de material (células, células en suspensión) y la lectura/el almacenamiento de datos y/o material de datos.

La identificación de datos se protege de manera múltiple estando dispuestas las muestras y las memorias de datos de muestras en las mismas posiciones en el sustrato o en posiciones directamente adyacentes en el sustrato. Adicionalmente, puede estar teñido el sustrato de almacenamiento, de modo que sólo por el color del elemento de criomacacenamiento y del cuerpo base puede detectarse de qué sustrato de almacenamiento procede la muestra en cuestión.

Los elementos de criomacacenamiento pueden desinfectarse y reutilizarse fácilmente. Constituyen, además, una protección para las memorias de datos de muestras frente a condiciones del entorno en la crioconservación según la invención.

Además, es posible proveer de manera uniforme los cuerpos base y los elementos de criomacacenamiento de un sustrato de almacenamiento de un tono de color o de un dibujo de identificación digital o analógico que permita en cualquier momento una asignación unívoca de las dos partes. Esto ofrece ventajas para un control óptico que puede ser automatizado (p. ej. detección de colores y de códigos).

En el dispositivo de criomacacenamiento según la invención pueden almacenarse por primera vez datos de muestras del orden de kilobytes a megabytes. Esto es una ventaja, en particular en el almacenamiento de resultados de medición.

Durante el período de utilización de un sustrato de almacenamiento pueden completarse datos en cualquier momento (acumulación de datos). De este modo pueden documentarse todos los datos adquiridos de las muestras o todas las manipulaciones, mediciones, tratamientos o similares realizados sin laguna alguna de forma específica según la muestra.

Pueden realizarse tratamientos específicos de las muestras, en particular en los elementos de almacenamiento en forma de chip de una manera selectiva con una programación y un almacenamiento del procedimiento. En el marco de una crioconservación puede ejecutarse, por ejemplo, un programa de calefacción, refrigeración, medición, control y alarma/visualización determinado y documentarse en la memoria de datos de programas. En el estado congelado, distintos elementos del dispositivo de criomacacenamiento pueden ejecutar distintos programas de temperaturas o de mediciones. Puede iniciarse p. ej. una descongelación local para realizar una medición en la muestra. Los elementos de calefacción arriba indicados pueden utilizarse en todos los modos de realización de sustratos de almacenamiento según la invención para un calentamiento local de medios de almacenamiento. A los medios de almacenamiento puede accederse en caso de un calentamiento local, mientras que la muestra correspondiente permanece en el estado crioconservado.

Según la invención puede estar previsto que el sustrato de almacenamiento se haga funcionar en combinación con una base de datos puramente electrónica, en la que los datos de muestras del sustrato de almacenamiento están depositados de manera especularmente simétrica.

La cubierta de los alojamientos de muestras puede ser parcial o completamente transparente. A través de esta capa se acoplan procedimientos de medición ópticos y de otro tipo al alojamiento de muestras. Las muestras pueden representarse, por ejemplo, en forma de imágenes. Son posibles mediciones de la fluorescencia, mediciones dieléctricas y/o representaciones por ultrasonido.

Una base de datos criogénicos comprende una multitud de los sustratos de almacenamiento indicados, un dispositivo de control y un dispositivo de tratamiento para la manipulación de los sustratos de almacenamiento y para la retirada de muestras.

Las características de la invención dadas a conocer en la descripción anteriormente expuesta, en las reivindicaciones y los dibujos pueden tener su importancia tanto individualmente como en cualquier combinación para la realización de la invención en sus distintas configuraciones.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la crioconservación, en el que en un criosustrato (600) están dispuestas una multitud de muestras (430), almacenándose de forma específica según la posición de los datos de muestras, los cuales son característicos para las propiedades de respectivamente una muestra (430), estando dispuesta respectivamente una muestra (430) en un portamuestras (621) de un elemento de crioalmacenamiento (620) y almacenándose los datos de muestras correspondientes en una memoria de datos de muestras (622) del elemento de crioalmacenamiento (620), caracterizado porque el criosustrato (600) comprende un tablero de circuitos impresos (610) con una multitud de receptáculos (612), respectivamente, para el alojamiento de uno de los elementos de crioalmacenamiento (620), porque respectivamente un portamuestras (621) y una memoria de datos de muestras (622) del elemento de crioalmacenamiento (620) constituyen un componente compuesto que puede separarse del tablero de circuitos impresos (610) para la retirada de muestras, estando previsto como elemento de crioalmacenamiento (620) un chip de memoria con un circuito integrado, electrodos de contacto (625) y un encapsulado (626), el cual está provisto de al menos un portamuestras (621) para el alojamiento de una muestra (430), estando fijado el portamuestras en un lado superior del encapsulado (626) o estando realizado como parte del encapsulado (626).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que como datos de muestras se almacena información para la identificación de las muestras, información acerca de características sustanciales de las muestras (430), resultados de medición y/o etapas del tratamiento.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que los datos de muestras se leen y/o escriben en estado congelado del tablero de circuitos impresos (610).
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que una muestra se retira del tablero de circuitos impresos (610) en combinación con los datos de la muestra almacenados y se transfiere a otro sustrato o a un dispositivo de medición o de tratamiento.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que las muestras comprenden suspensiones de al menos una célula, partes de células, agregados de células y/o tejidos.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que las muestras comprenden adicionalmente muestras de referencia y de sonda.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que en una muestra congelada, calentada o descongelada se realiza en el estado enfriado del tablero de circuitos impresos (610) restante una medición y/o un tratamiento, almacenándose los resultados de medición como datos de la muestra.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones anteriores, en el que un control del estado de al menos una muestra se realiza en el tablero de circuitos impresos (610) con un circuito de cálculo asignado a la muestra.
9. Criosustrato para la crioconservación de una multitud de muestras (430) que contiene una multitud de elementos de crioalmacenamiento (620), los cuales están constituidos respectivamente por un componente compuesto (621, 622) en forma de un portamuestras (621) y una memoria de datos de muestras (622), **caracterizado porque** el criosustrato (600) comprende un tablero de circuitos impresos (610) con una multitud de receptáculos (612), respectivamente para el alojamiento de uno de los elementos de crioalmacenamiento (620) y porque como elemento de crioalmacenamiento (620) está previsto un chip de memoria con un circuito integrado, electrodos de contacto (625) y un encapsulado (626), el cual está provisto de al menos un portamuestras (621) para el alojamiento de una muestra (430), estando fijado el portamuestras en un lado superior del encapsulado (626) o estando realizado como parte del encapsulado (626).
10. Criosustrato según la reivindicación 9, en el que cada elemento de crioalmacenamiento está dispuesto de manera separable en un cuerpo base del tablero de circuitos impresos (610).
11. Criosustrato según una de las reivindicaciones 9 o 10, en el que como elemento de crioalmacenamiento está prevista una pieza preformada que comprende el portamuestras y la memoria de datos de muestras.
12. Criosustrato según una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el portamuestras está integrado en la estructura del circuito integrado.
13. Criosustrato según la reivindicación 12, en el que el portamuestras presenta un recipiente criogénico.
14. Criosustrato según la reivindicación 12, en el que el portamuestras presenta al menos una cámara de muestras en forma de tubo flexible, capilar o canal.

- 5
15. Criosustrato según la reivindicación 12, en el que el portamuestras está previsto como alojamiento de muestras en forma de canal en un sustrato del circuito integrado.
 16. Criosustrato según la reivindicación 12, en el que el elemento de crioalmacenamiento contiene un circuito de cálculo con el que se administra la función del elemento de crioalmacenamiento y mediante el cual el elemento de crioalmacenamiento comunica con el exterior.

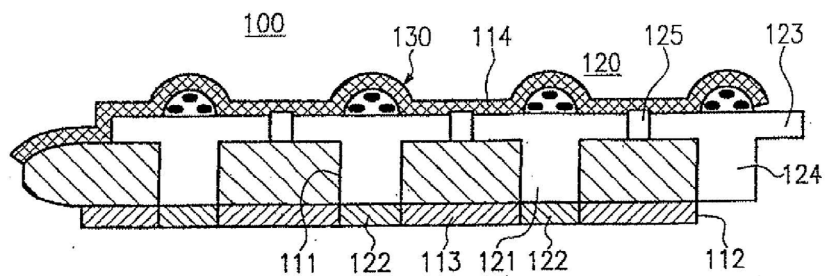


FIG.1

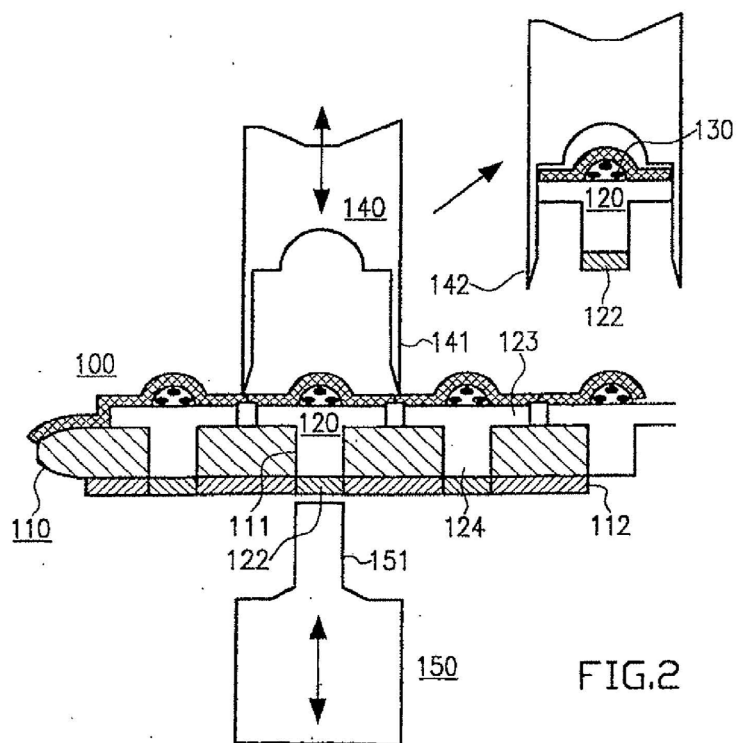


FIG.2

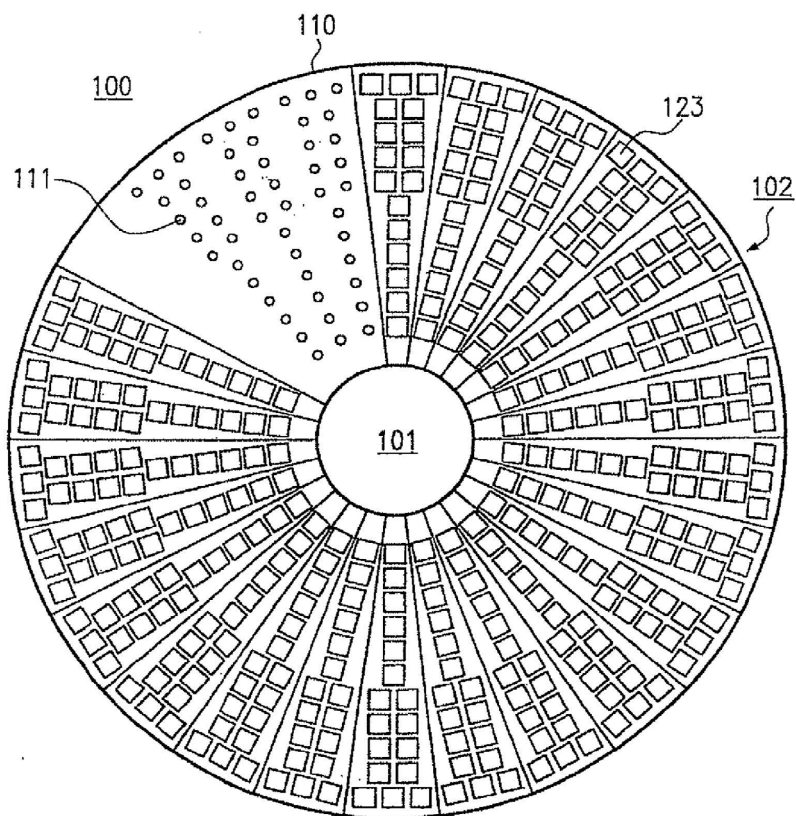
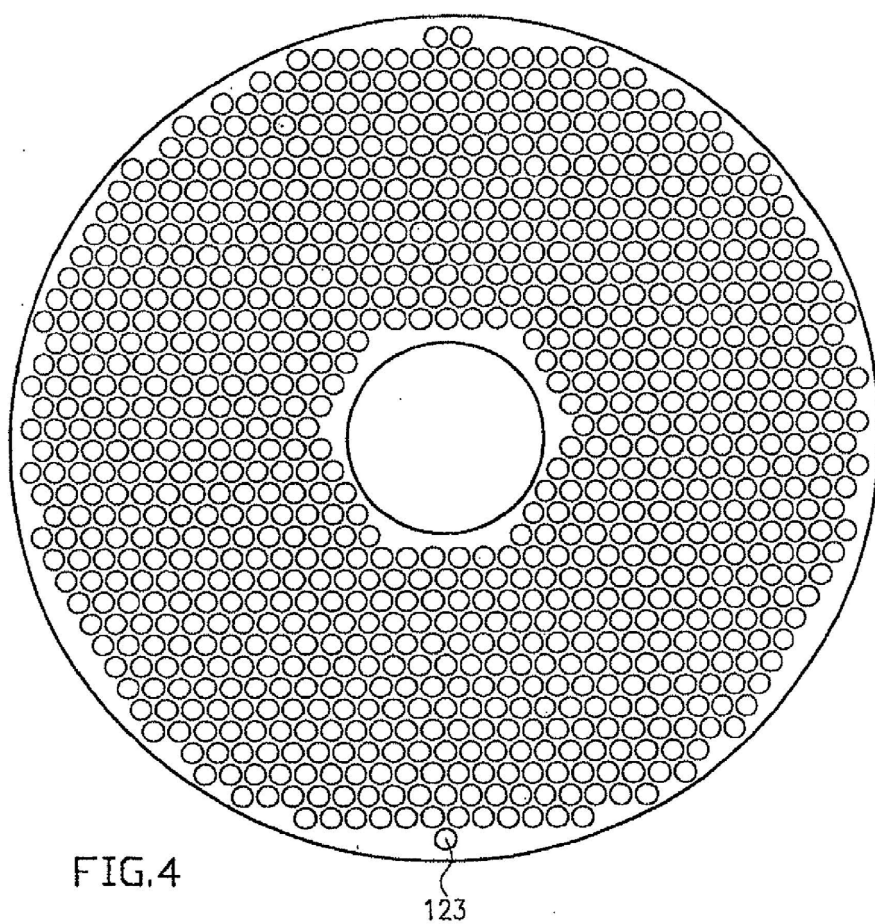
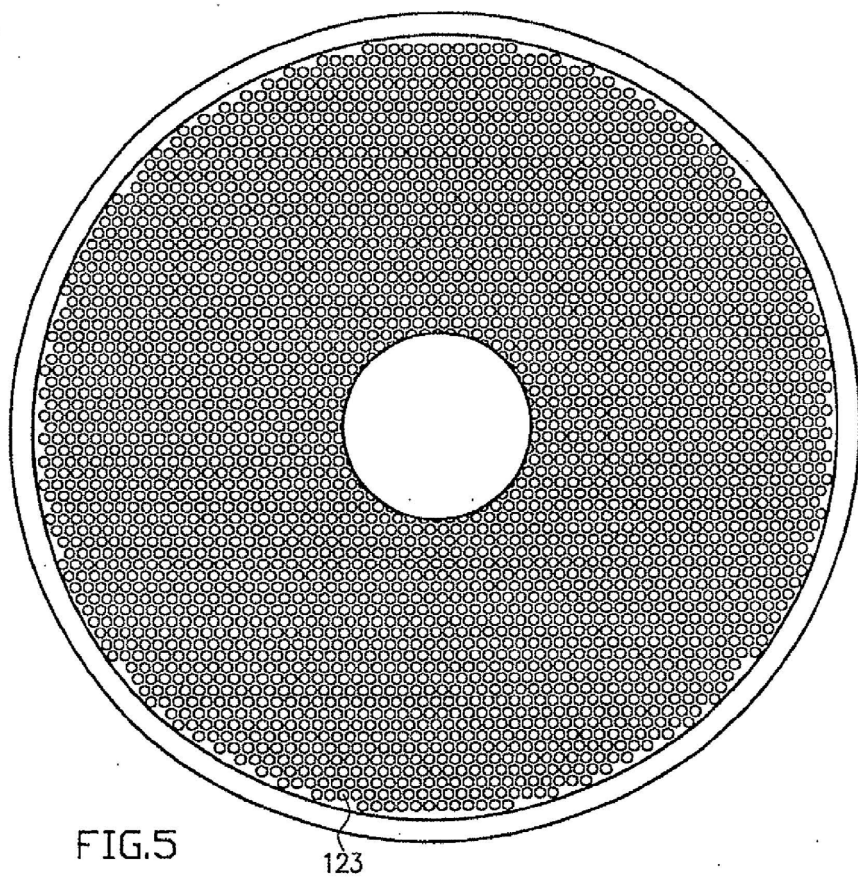


FIG.3





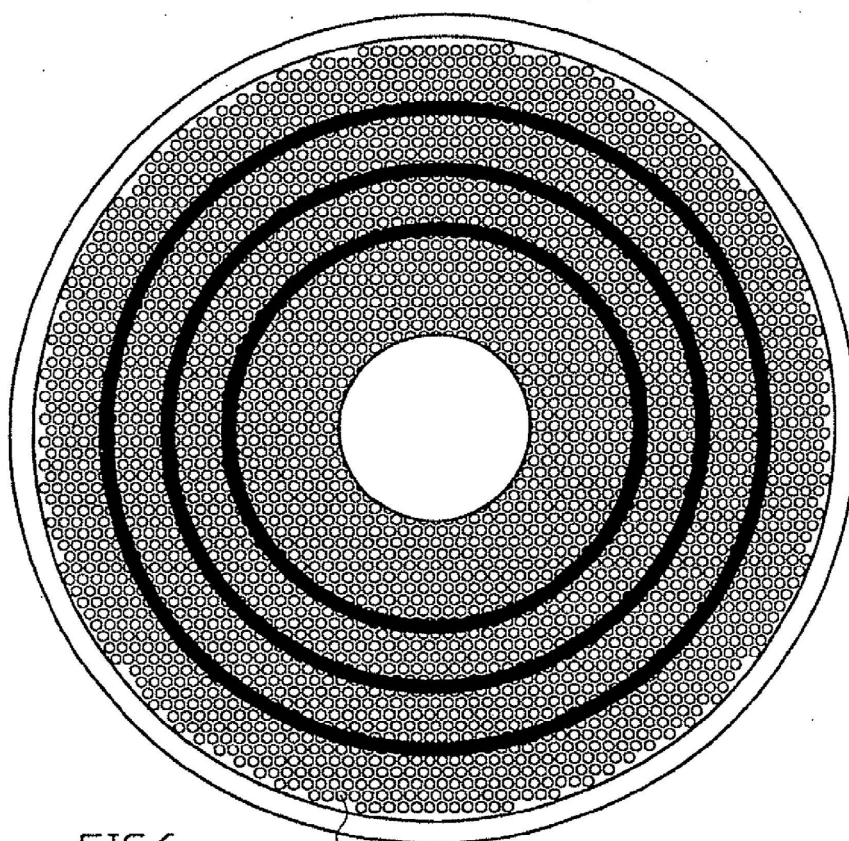


FIG.6

123

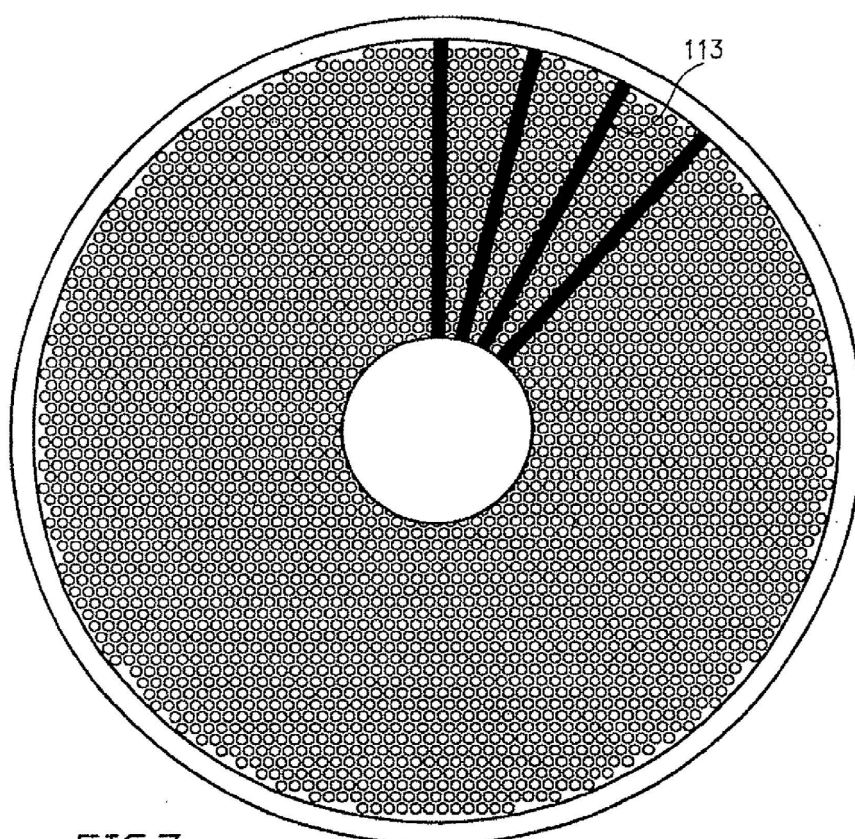


FIG. 7

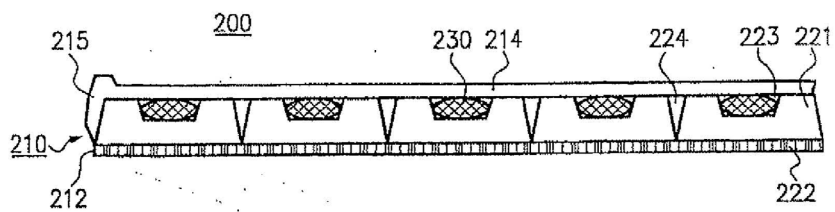


FIG. 8

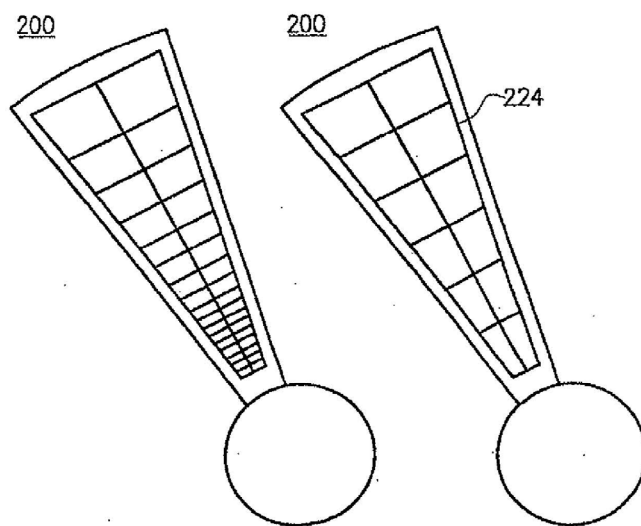


FIG. 9

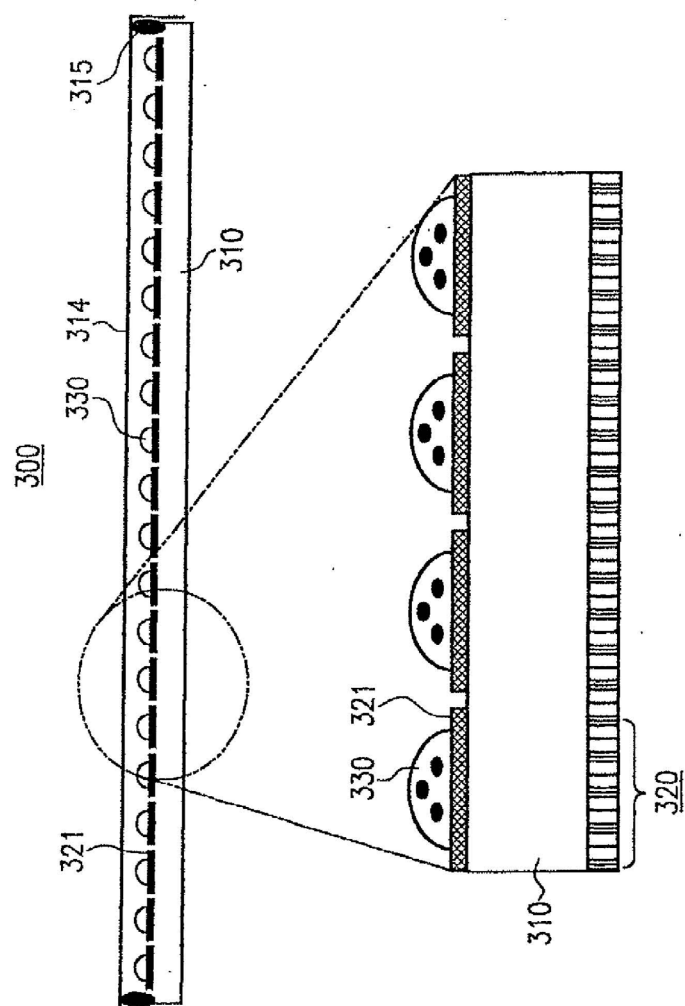
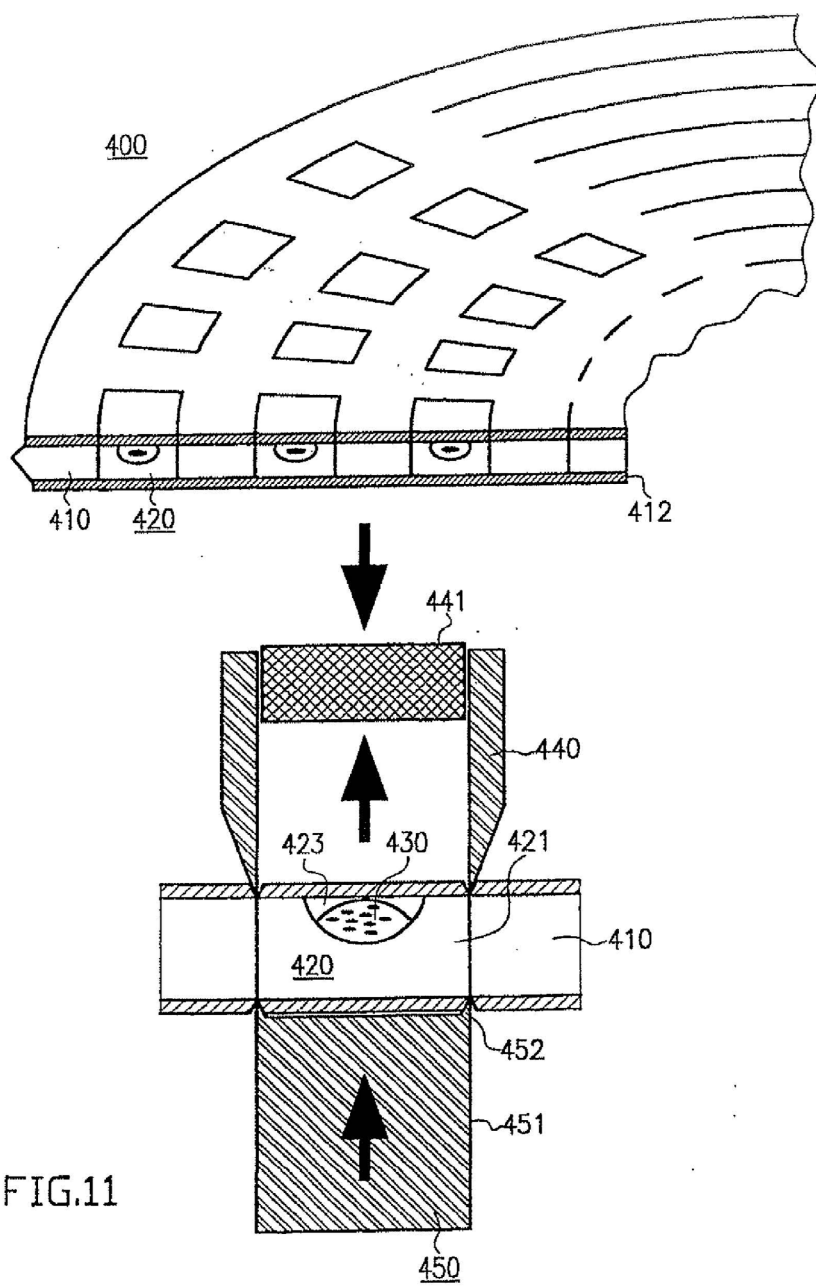


FIG.10



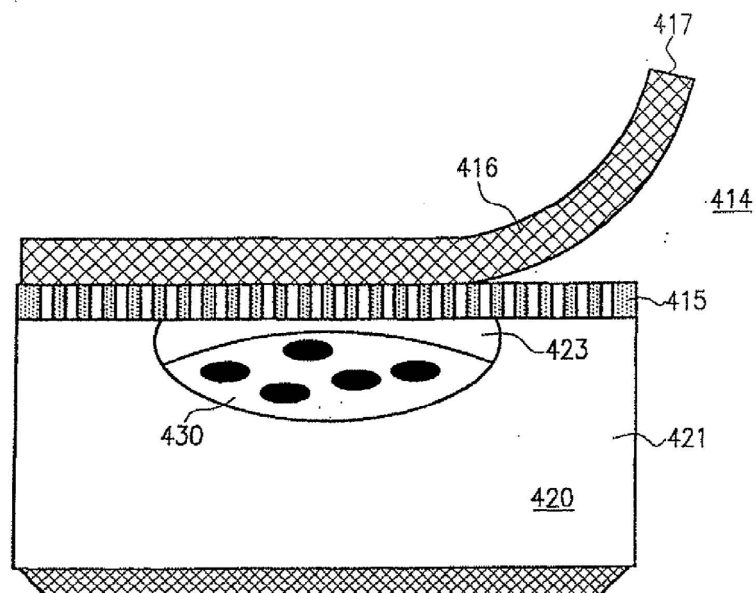


FIG. 12

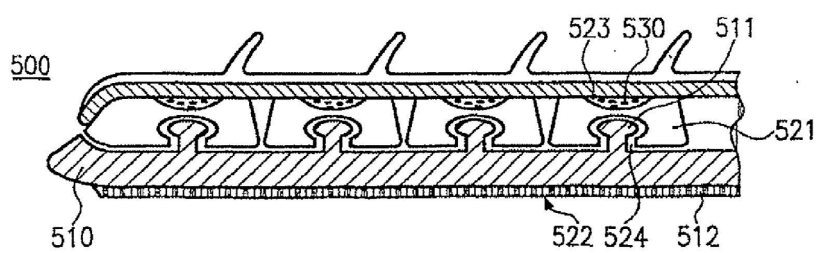


FIG. 13

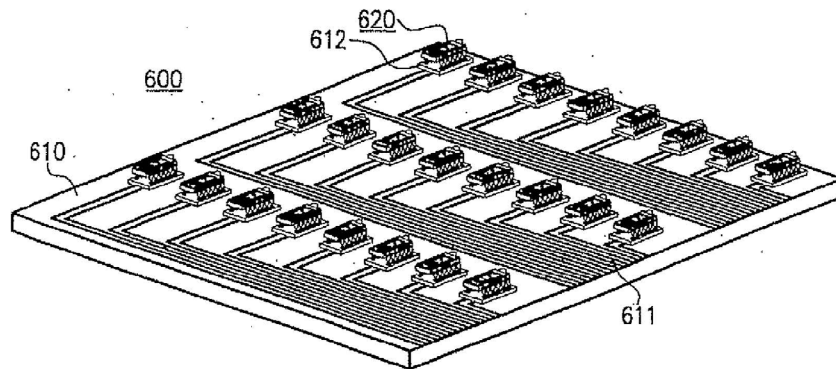
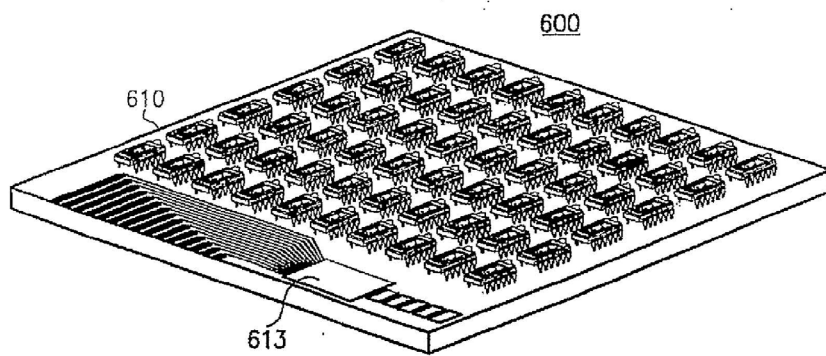
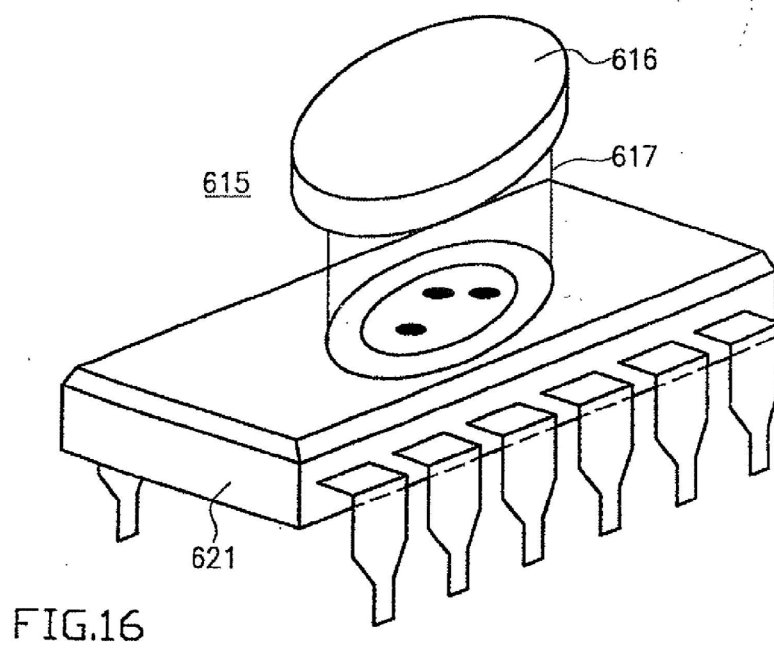
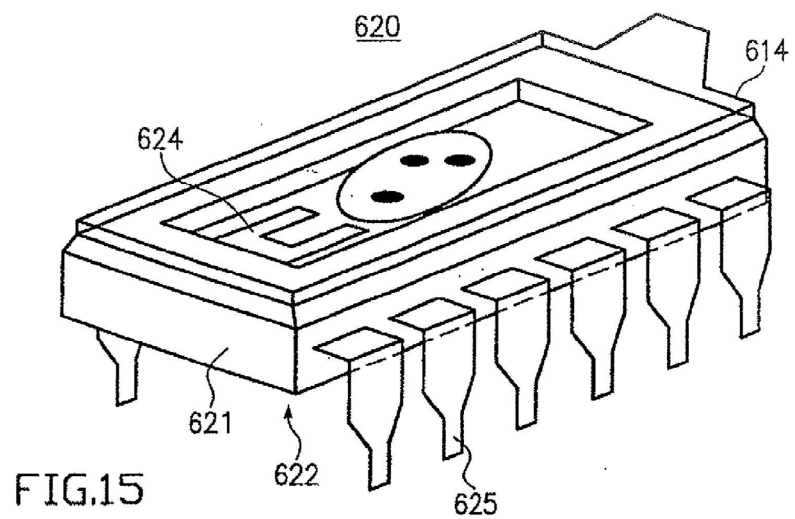


FIG. 14





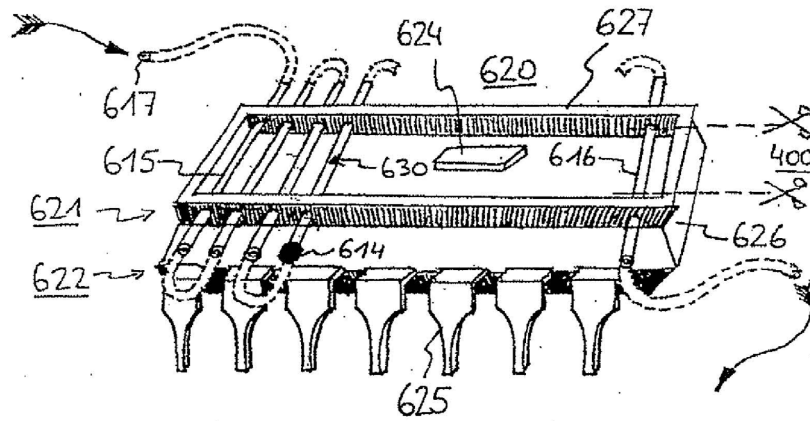


FIG. 17

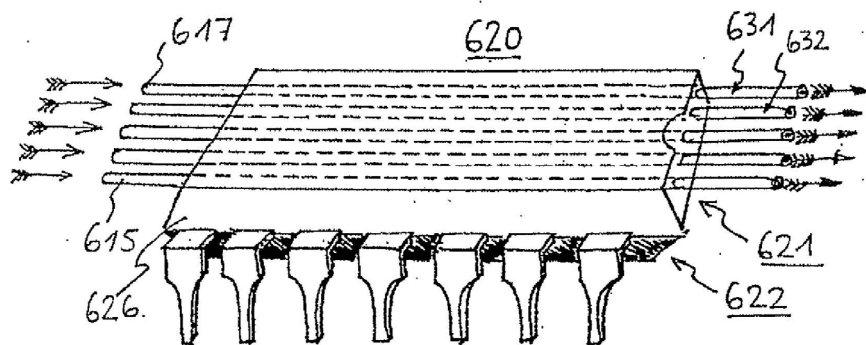


FIG. 18

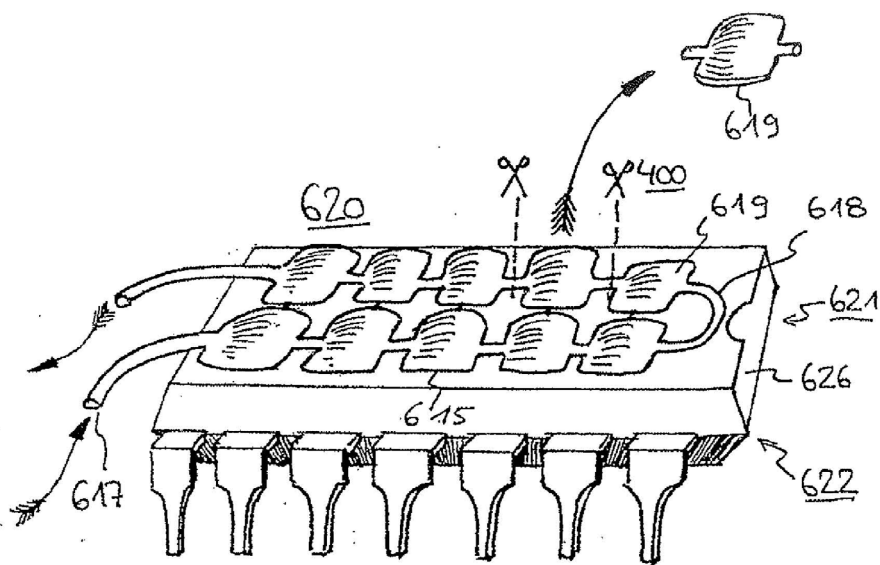


FIG. 19

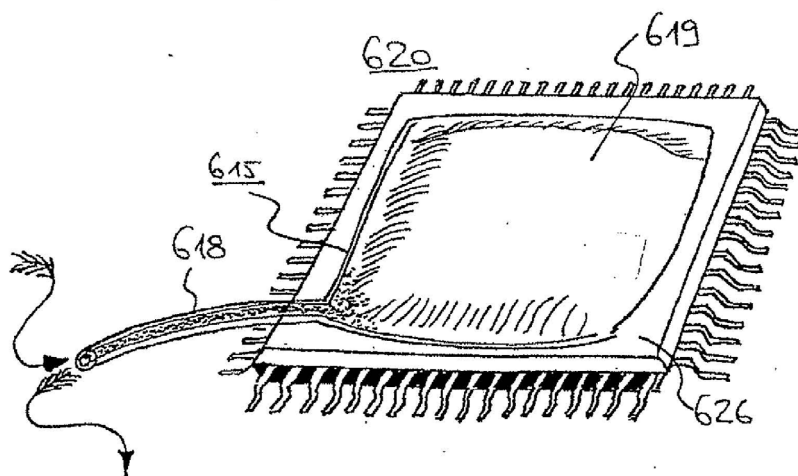
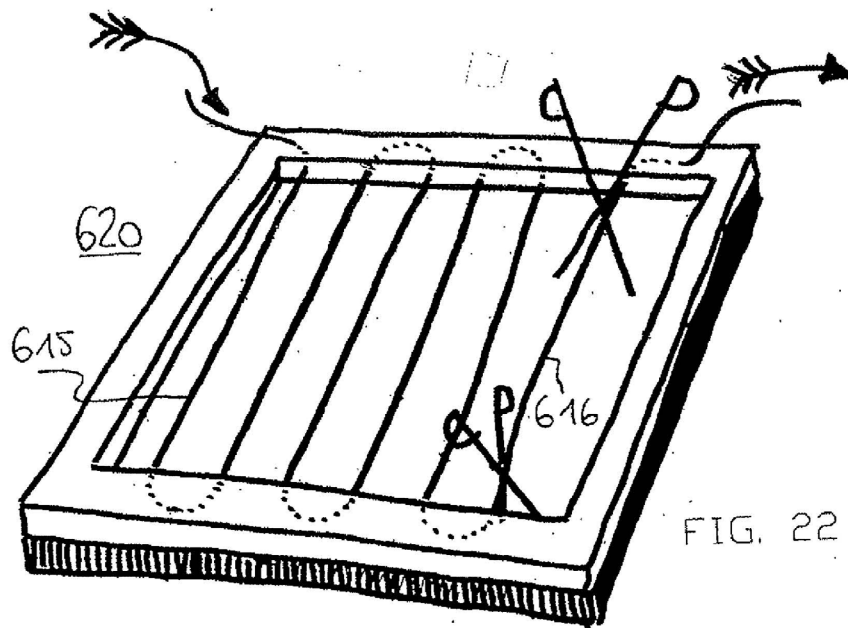
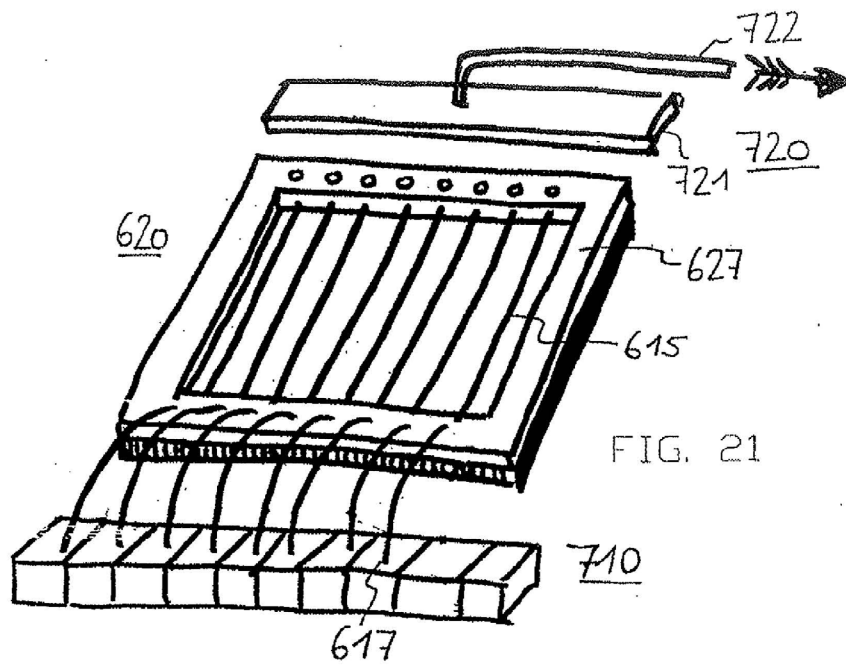
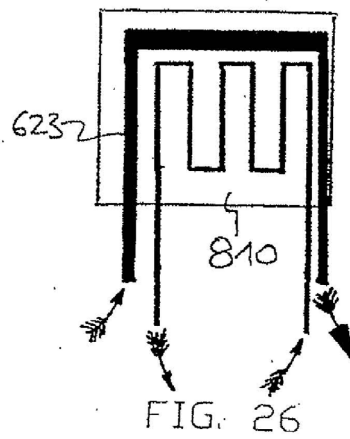
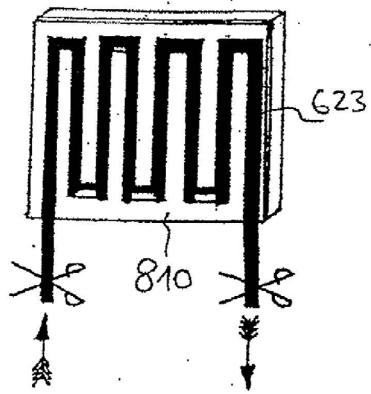
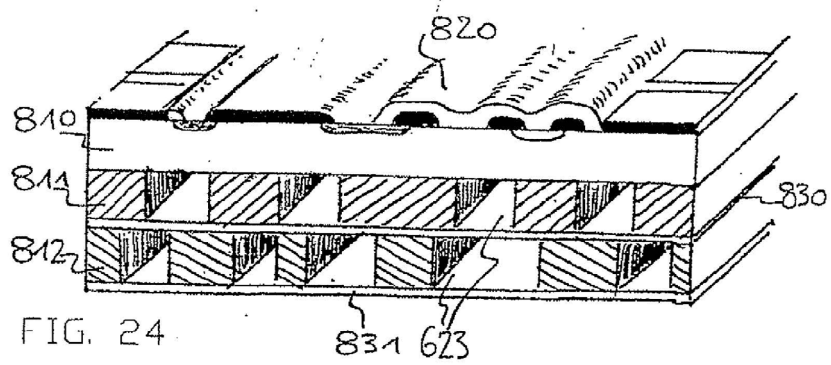
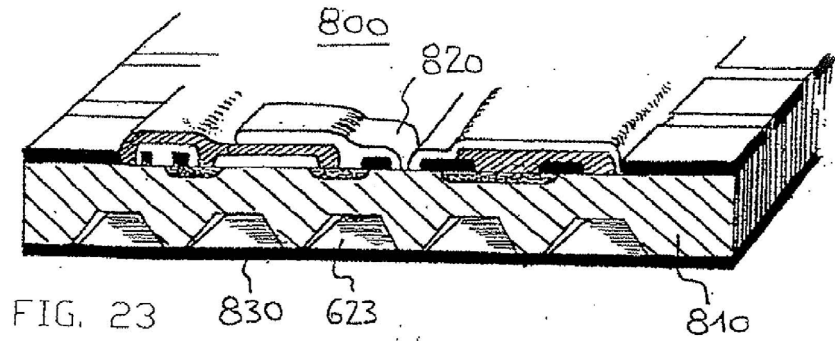


FIG. 20





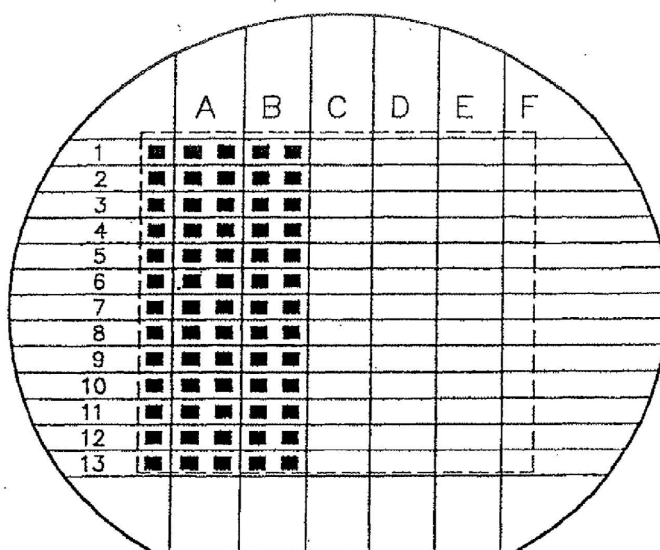


FIG. 27

Estado de la Técnica

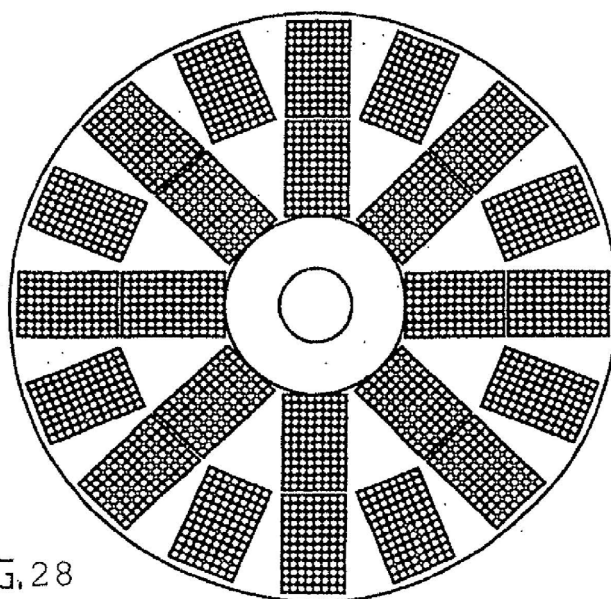


FIG. 28

Estado de la Técnica

DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

- 5 En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

Documentos de patente indicados en la descripción

- | | |
|--------------------------|--|
| • DE OS1992231 A [0002] | • EP 0475409 B [0002] [0004] |
| • EP 0853238 A [0002] | • DE OS19921236 A [0002] [0005] [0006] |
| • DE OS19725768 A [0002] | • EP 0804073 B [0002] [0005] [0033] |
| • DE OS19905163 A [0002] | • DE OS19752085 A [0007] |
| • DE OS19826350 A [0002] | • EP 0706825 A1 [0009] |
| • US 5275016 A [0002] | |

10