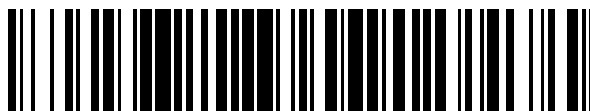


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 491**

51 Int. Cl.:

**B23K 26/00** (2006.01)

**B23K 26/24** (2006.01)

**A01N 1/00** (2006.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2009 E 09722035 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2012 EP 2265406**

54 Título: **Procedimiento industrial de encapsulación de material biológico con vistas a una conservación a temperatura ambiente con ensayo de estanqueidad bajo vacío del encapsulado**

30 Prioridad:

**11.03.2008 FR 0851565**

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

**19.03.2013**

73 Titular/es:

**IMAGENE (100.0%)  
2 Allée du Doyen Georges Brus, Parc Scientifique  
Unitec 1  
33600 Pessac, FR**

72 Inventor/es:

**TUFFET, SOPHIE y  
DE SOUZA, DAVID GEORGES**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 398 491 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 industrial de encapsulación de material biológico con vistas a una conservación a temperatura ambiente con ensayo de estanqueidad bajo vacío del encapsulado.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento industrial de encapsulación de material biológico, en particular del ADN, más particularmente con vistas a una conservación a temperatura ambiente.

10 Se conoce la patente EP 1 075 515 que describe un procedimiento de conservación del ADN de larga duración en una cápsula metálica, inoxidable y estanca.

15 El documento WO 2004/033729, que representa el estado de la técnica más próximo, describe un procedimiento de preparación de una muestra de material biológico en un contenedor con vistas a su conservación, a su recuperación y a su utilización ulterior, que comprende las etapas siguientes: preparación del material biológico, marcado del contenedor con registro de la identificación, introducción de este material biológico en dicho contenedor bajo atmósfera controlada, deshidratación del material biológico, cierre del contenedor bajo atmósfera controlada, y puesta en estación de almacenamiento cuando el ensayo es favorable.

20 Este ADN se encapsula en atmósfera neutra y con un grado de higrometría muy bajo, con el fin de permitir la conservación a temperatura ambiente, evitando así la utilización de medios de refrigeración y/o congelación complejos y costosos.

25 Este procedimiento se puede aplicar a cualquier material biológico de origen humano, animal o vegetal y comprende en particular: los tejidos; las células; los microorganismos tales como las bacterias, los hongos, las algas monocelulares; los virus; las proteínas; los ácidos nucleicos tales como ADN, ARN.

30 El material biológico se utiliza para aplicaciones cada vez más numerosas, tanto en el campo de la investigación como en otros muchos campos, tales como las biotecnologías, la salud, el medioambiente, el agroalimenticio, la identificación, la justicia, la criminalística, y se vuelve imperativo constituir unos bancos de muestras de material biológico o biotecas.

Un banco de muestras exige una clasificación y una identificación de un rigor absoluto.

35 De hecho, un tratamiento manual posible a escala de laboratorio no está adaptado para la constitución de dichas biotecas.

40 Conviene por lo tanto concebir unas cadenas automatizadas para la realización de muestras de material biológico partiendo del material biológico inicial hasta su utilización. Esta utilización puede ocurrir en un intervalo de tiempo muy variable, hasta varias décadas más tarde.

45 Dicha cadena debe prever las etapas siguientes: preparación de la muestra de material biológico y control de su calidad, colocación en un contenedor y conservación de dicha muestra, y después recuperación del material biológico con vistas a su utilización a partir de la muestra de material biológico así conservada. Durante todas estas etapas, es necesario asegurar el dominio de la calidad y el seguimiento de todas las muestras.

Para ello, es necesario prever un contenedor idéntico para todas las muestras con el fin de permitir las manipulaciones llevadas a cabo por los diferentes autómatas y los intercambios de muestras entre usuarios, por ejemplo.

50 Es necesario asimismo asegurar la conservación a temperatura ambiente en condiciones que limitan las degradaciones del material biológico, permitir un marcado para clasificar estas muestras y clasificarlas, alcanzando al mismo tiempo el objetivo principal: hacer posible la recuperación del material biológico y su utilización.

55 Este contenedor debe permitir una manipulación mediante el procedimiento según la invención, de manera automatizada, y en particular gracias a unos soportes de tipo gradilla que respetan el formato de las microplacas en el estándar denominado SBS, marca depositada por la compañía SBS.

60 El procedimiento según la presente invención consiste en recurrir a este contenedor y en prever una sucesión de etapas con el fin de tratar el material biológico de manera industrial.

El procedimiento según la presente invención se describe ahora en detalle según un modo de realización particular y optimizado.

65 El procedimiento de preparación de muestras de material biológico según la presente invención se define en la reivindicación 1.

El procedimiento según la presente invención cubre asimismo la utilización de la muestra preparada después de la realización de las etapas anteriores de la reivindicación 1.

Este procedimiento de utilización consiste en la sucesión de las etapas siguientes:

- 5
- identificación de un contenedor determinado dispuesto sobre una gradilla mediante lectura del marcado,
  - apertura por punzonado del tapón del contenedor,
  - redisolución de material biológico en el contenedor,
  - extracción del material biológico recuperado, y
  - 10 - utilización en particular con fines de análisis.

La invención se describe ahora en detalle.

15 El procedimiento según la presente invención consiste por lo tanto en preparar el material biológico, en purificarlo y en ponerlo en disolución.

Si es necesario, este material biológico se reparte en varias muestras de menor volumen en función de las necesidades y del volumen inicial de material disponible, es la operación de alicuotado durante la cual, o previamente, se controla la calidad de la muestra. Además, se clasifica cada muestra y/o cada alícuota.

20 El control de calidad del material biológico es, por ejemplo, la combinación de técnicas tales como una medición de densidad óptica, una medición de fluorescencia, un gel de electroforesis, una dosificación de proteínas o una amplificación molecular. Cada muestra controlada y que cumple los criterios de calidad debe ser introducida en un contenedor.

25 Los parámetros relativos a este contenedor son muy importantes.

Para la aplicación del procedimiento, el contenedor elegido es metálico y de forma cilíndrica, obtenido por deformación de metal, de tipo embutición profunda. El metal es ventajosamente acero inoxidable 304L, o referenciado de manera más metalúrgica bajo la calidad Z2CN18-10.

Las dimensiones de este contenedor, en este caso un diámetro de 7 mm, una longitud de 18 mm de envolvente cilíndrica y un grosor de pared de 0,25 mm, se seleccionan por numerosas razones.

35 En primer lugar, estas dimensiones se definen para que cada contenedor pueda ser recibido en el pocillo de una microplaca estándar, en particular una microplaca en el estándar SBS.

Además, la calidad de acero inoxidable permite, además de las cualidades intrínsecas relacionadas con el material, tal como la resistencia a la corrosión, por un lado una excelente deformabilidad que permite una producción de este tipo de contenedor por embutición profunda con una gran precisión y una total reproducibilidad, y esto a un coste muy ventajoso y, por otro lado, una buena aptitud para la soldadura.

45 Evidentemente, un contenedor cilíndrico se podría obtener a partir de un cilindro y de un primer tapón soldado, pero este modo de realización sería sólo un equivalente técnico. Tendría como inconveniente necesitar una soldadura suplementaria y presentaría un riesgo suplementario de fuga, razón por la cual la presente invención elige un contenedor obtenido de manera monolítica a partir de una sola pieza deformada mecánicamente.

Además, el contenedor debe ser referenciado antes de recibir el material biológico, en el sentido en el que es necesario en un procedimiento automatizado como el de la presente invención permitir un seguimiento total.

50 Este marcado se realiza preferentemente mediante un láser. Éste puede efectuar un marcado únicamente por contraste en la superficie del material por un cambio de estado de esta superficie, muy legible a primera vista, y sobre todo por cualquier ojo electrónico. Es posible asimismo grabar, es decir atacar la materia.

55 Más particularmente, el marcado se posiciona en el fondo exterior del contenedor y comprende, a título de identificador, un código matricial Data Matriz y/o una cadena de caracteres alfanuméricos.

Otra solución consiste en recurrir a una etiqueta RFID, que utiliza las ondas de radiofrecuencias para identificar cada contenedor y para añadir otras informaciones si fuese necesario.

60 Se debe señalar que dicho marcado aplicado comprende una etiqueta que asegura la protección de la antena RFID, siendo la antena el elemento activo y por lo tanto protegido. Este marcado puede ser considerado como perenne.

65 El contenedor así marcado se posiciona en una gradilla en un lugar cuyas coordenadas están grabadas asimismo, además de las de la gradilla.

El contenedor está listo para recibir el material biológico previamente identificado, de modo que un autómata puede depositar el material biológico en el contenedor referenciado con el fin de disponer de las referencias asociadas al material biológico y al contenedor que lo recibe.

5 En el caso del ADN, el líquido en el que está disuelto está preferentemente introducido en un inserto de vidrio, previamente posicionado a su vez en el contenedor.

10 El contenedor y el material biológico que ha recibido, se someten a unos medios de deshidratación de tipo evaporador-concentrador. Unos medios conocidos consisten en utilizar una puesta bajo vacío con el fin de deshidratar el material biológico que forma entonces un depósito seco sobre el inserto de vidrio.

Esta deshidratación es fuerte con el fin de llevar el material biológico a un porcentaje de deshidratación adecuado para evitar cualquier degradación por el agua, del orden del 1%, para dar un orden de idea en el caso del ADN.

15 El contenedor y el material biológico deshidratado son entonces sometidos a una atmósfera controlada, por ejemplo un gas inerte o una mezcla de gases inertes, argón, helio, secos, para evitar cualquier reacción de hidrólisis química o enzimática y de oxidación.

20 El contenedor recibe un tapón con el fin de aprisionar el gas inerte en el contenedor, evitando así la presencia de oxígeno y de agua atmosféricos y protegiendo el material biológico de la luz susceptible de inducir unas modificaciones en el caso del ADN por ejemplo.

25 Este tapón es ventajosamente cilíndrico, de escasa longitud, 3 mm por ejemplo, previsto para ser introducido en la envolvente cilíndrica. Así, una vez introducido, el borde periférico del tapón está yuxtapuesto al borde periférico del contenedor. Es el encajado de un cilindro en un cilindro.

30 Simultáneamente, bajo atmósfera controlada, el tapón se suelda sobre el contenedor con el fin de hacer estanco el contenedor y garantizar el mantenimiento del contenido biológico deshidratado, bajo esta atmósfera controlada y protegido de la luz.

35 La soldadura es una soldadura sin aportación de metal y sin aportación de calor de tipo soldadura por haz láser o haz de electrones, siendo el haz láser preferido por su sencilla realización y su precio. Además, y esto es muy importante, la soldadura por haz láser es preferentemente de tipo láser YAG pulsado, que limita mucho la elevación de temperatura fuera de la zona de soldadura, al punto de considerarla como despreciable con respecto al contenedor. El escaso grosor de las paredes necesita asimismo una potencia limitada y también un tiempo de intervención muy corto.

40 Se entiende por los términos "sin aportación de calor" que el calor liberado está localizado, es muy reducido y que el material biológico no sufre ninguna degradación, aún más si está colocado en un inserto de vidrio que lo aísla en parte del contenedor metálico.

El procedimiento permite así obturar de manera estanca unos contenedores de forma muy rápida y fiable, de manera automática, ya que el diámetro es constante y perfectamente reproducible.

45 Sin embargo, con el fin de verificar que el contenedor es estanco y que el material biológico conservará su integridad, el procedimiento según la invención prevé un ensayo sistemático de estanqueidad a los gases después de la soldadura.

50 Este ensayo consiste en colocar el contenedor soldado en un recinto colocado bajo vacío, recinto en el que se coloca un sensor apto para detectar el gas o la mezcla de gases de la atmósfera controlada introducida y aprisionada en el contenedor.

55 En caso de defecto de estanqueidad de la soldadura, unas moléculas del o de los gases aprisionadas en el contenedor se escapan durante la despresurización del recinto, y serán detectadas por el sensor, generando una desclasificación de la muestra con, como consecuencia, la salida de la cadena del contenedor defectuoso.

60 El material biológico puede ser recuperado y recolocado en un nuevo contenedor. En el caso en el que el ensayo de fuga parece satisfactorio, el contenedor obturado de manera estanca se reposiciona en su gradilla y los diferentes contenedores pueden ser almacenados en una bioteca, por ejemplo.

65 Se dispone entonces de gradillas referenciadas de tipo de microplacas en cada uno de los pocillos, de los cuales se encuentra un contenedor referenciado y su material biológico, asimismo referenciado.

Es por lo tanto fácil clasificar estas muestras así realizadas.

La conservación se realiza a temperatura ambiente para la mayoría de las muestras.

5 Sin embargo, gracias al procedimiento según la invención, se constata que ciertas muestras de material biológico frágil que convendría conservar a temperaturas de congelación inferiores o iguales a  $-20^{\circ}\text{C}$ , pueden ahora ser conservadas a temperaturas próximas a cero, mediante la realización del procedimiento según la invención, lo cual es una ventaja considerable sobre todo en periodos largos de conservación.

El procedimiento según la presente invención prevé asimismo la recuperación y la utilización de este material biológico, ya que es la esencia misma de la presente invención: conservar para utilizar.

10 Para ello, el procedimiento prevé unos medios de redisolución en un disolvente del material biológico con el fin de permitir su utilización con fines de análisis por ejemplo.

El procedimiento prevé por lo tanto la recogida de la o de las muestras buscadas y clasificadas en la bioteca.

15 Una vez identificada la muestra, el contenedor puede ser abierto por simple punzonado del tapón. Este punzonado evita ventajosamente la introducción de metal y de otras partículas que podrían proceder de una apertura por mecanización mecánica. Además, por un efecto de memoria de forma relacionado con la embutición profunda realizada, las partes recortadas se curvan dejando una abertura perfectamente libre y accesible para los medios de extracción tales como pipetas automatizadas.

20 La posición de la punzonado está perfectamente controlada y centrada en el tapón, de modo que los desplazamientos de las pipetas de los autómatas pueden ser perfectamente programados.

25 Las diferentes etapas del procedimiento, tal como se ha descrito, pueden ser realizadas sucesiva o paralelamente. Así, el marcado del contenedor puede ser realizado paralelamente a la preparación del material biológico de manera que el material pueda ser introducido en el contenedor dedicado así marcado.

El marcado se podría realizar también previamente a la preparación del material según la organización de la cadena.

30

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de preparación de una muestra de material biológico en un contenedor con vistas a su conservación, a su recuperación y a su utilización ulterior, que comprende la sucesión de las etapas siguientes:
- preparación del material biológico con puesta en disolución,
  - control de la calidad del material biológico así preparado,

10 - marcado del contenedor con registro de la identificación,

  - introducción de este material biológico en dicho contenedor bajo atmósfera controlada,
  - deshidratación del material biológico,

15 - cierre del contenedor bajo atmósfera controlada y protegido de la luz,  - ensayo de estanqueidad del contenedor colocando el contenedor cerrado en un recinto colocado bajo vacío, detectando el gas o la mezcla de gases de la atmósfera controlada introducida y aprisionada en el contenedor que se escapa del contenedor bajo el efecto del vacío, y

20 - puesta en estación de almacenamiento cuando el ensayo es favorable.
- 25 2. Procedimiento de preparación de una muestra de material biológico según la reivindicación 1, caracterizado porque siendo el contenedor metálico y comprendiendo un tapón, el cierre está asegurado por soldadura de este tapón sin calentamiento térmico.
- 30 3. Procedimiento de preparación de una muestra de material biológico según la reivindicación 2, caracterizado porque la soldadura se efectúa mediante soldadura con la ayuda de un haz láser de tipo láser YAG pulsado.
- 35 4. Procedimiento de preparación de una muestra de material biológico según la reivindicación 3, caracterizado porque la atmósfera controlada está compuesta por un gas inerte o por una mezcla de gases inertes secos para evitar cualquier reacción de hidrólisis química o enzimática y de oxidación de dicho material biológico.
- 40 5. Procedimiento de preparación de una muestra de material biológico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la puesta en estación de almacenamiento prevé la colocación de cada contenedor sobre una gradilla, una identificación de la gradilla y un registro de la posición de dicho contenedor sobre la gradilla.
- 45 6. Procedimiento de preparación de una muestra de material biológico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la deshidratación se realiza bajo una puesta bajo vacío.
- 50 7. Procedimiento de utilización de la muestra preparada, después de la realización del procedimiento de preparación de la muestra según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque comprende las etapas siguientes:
- identificar un contenedor determinado, dispuesto en una gradilla, mediante lectura del marcado,
  - abrir por punzonado del tapón del contenedor,
  - volver a disolver el material biológico en el contenedor,
  - extraer el material biológico así recuperado, y
  - utilizar el material biológico extraído, en particular con fines de análisis.