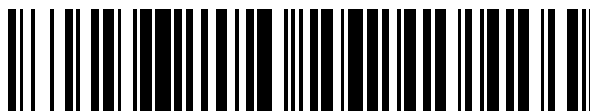


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 133**

51 Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

F25B 9/14 (2006.01)

F25D 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2014** **E 14193239 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2018** **EP 3020276**

54 Título: **Método y aparato para la crioconservación de especímenes biológicos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2018

73 Titular/es:
MILESTONE S.R.L. (100.0%)
Via Fatebenefratelli, 1/5
24010 Sorisole (BG), IT

72 Inventor/es:
VISINONI, FRANCESCO;
BELLINI, MARCO y
BELLINI, MICHELE

74 Agente/Representante:
UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 662 133 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

Método y aparato para la crioconservación de especímenes biológicos

- 5 La presente invención se refiere a un método, así como a un aparato, para la crioconservación de especímenes biológicos, tales como tejidos humanos y animales, tipos de células y materiales subcelulares para crioconservación de muestras para biobancos y estudios moleculares. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método y aparato innovadores para mejorar y estandarizar el procedimiento de congelación instantánea al recoger muestras para biobancos y estudios moleculares.
- 10 Un biobanco es un tipo de biodepósito que guarda muestras biológicas (generalmente humanas) para uso en investigación. Desde finales de la década de 1990, los biobancos se han convertido en un recurso importante en investigación médica al soportar muchos tipos de investigación contemporánea tal como genómica y medicina personalizada.
- 15 Los biobancos dan a los investigadores acceso a datos que representan mayores cantidades de personas de las que podrían analizarse antes. Además, las muestras de los biobancos y los datos derivados de dichas muestras pueden ser usados a menudo por múltiples investigadores para múltiples fines. Las grandes colecciones de muestras que representan decenas o cientos o incluso miles de individuos son necesarias para realizar estos tipos de estudios de modo que los investigadores puedan realizar tales estudios solamente con gran número de muestras. Muchos investigadores han luchado por adquirir suficientes muestras antes de la llegada de los biobancos.
- 20 Los biobancos son de diseño y uso heterogéneo, y su tamaño varía. Pueden contener datos y muestras obtenidos de estudios de familias, o de pacientes con una enfermedad específica, o pueden ser parte de colecciones epidemiológicas a gran escala, o colecciones de pruebas clínicas de nuevas intervenciones médicas. Las muestras recogidas incluirán típicamente sangre entera y fracciones de la misma, ADN genómico extraído, ARN de células enteras, orina, así como, de varias formas, saliva, recortes de uñas, vello y otros varios tejidos y material relevante para el diseño de estudios específicos.
- 25 Inevitablemente, los datos y las muestras son recogidos en condiciones diferentes para diferentes estándares y para fines diferentes. Algunos biobancos efectúan un acercamiento altamente centralizado a la recogida, el procesado y el archivo de muestras, pero son enviadas a una entidad central de procesado y almacenamiento. Al mismo tiempo que asegura un control robusto de la calidad y la integridad de los datos y la seguridad, este acercamiento introduce inevitablemente un retardo entre la recogida y la crioconservación que puede dar lugar a la pérdida de especies lábiles en las muestras. A la inversa, otros grandes estudios tendrán la finalidad de recoger y procesar muestras de participantes lo más rápidamente posible. Aquí, las muestras son recogidas en eventos de recaudación de fondos y en entornos de trabajo y son procesadas dentro de unas pocas horas por laboratorios locales antes del archivo a baja temperatura. Los retos que esto supone son mantener la coherencia de la recogida, el envío y el procesado. Se sigue un acercamiento híbrido en otros estudios donde una proporción de las muestras participantes es procesada y almacenada localmente, almacenándose un segundo conjunto en un archivo centralizado.
- 30 El primer y más importante proceso de estabilizar material biológico a temperaturas criogénicas adecuadas para estudios moleculares se denomina crioconservación, una aplicación práctica de la criobiología, o el estudio de la vida a bajas temperaturas. Los avances realizados en tecnología de crioconservación han conducido a métodos que permiten el mantenimiento a baja temperatura de una variedad de tejidos, tipos de células y materiales subcelulares. Se dispone de técnicas para la conservación de microorganismos, tejidos, células primarias, líneas celulares establecidas, pequeños organismos multicelulares, estructuras celulares complejas tales como embriones, así como ácido nucleico y proteínas.
- 35 El objeto de la crioconservación es minimizar el daño de los materiales biológicos durante la congelación y el almacenamiento a baja temperatura. El objetivo último es proporcionar una fuente continua de tejidos y células vivas genéticamente estables para varios fines, incluyendo la investigación y los procesos biomédicos.
- 40 El agua, el componente principal de todas las células vivas, debe estar presente para que se produzcan reacciones químicas dentro de una célula. Durante la crioconservación, el agua se convierte en hielo y el metabolismo celular cesa. También tiene lugar deshidratación, que cambia la concentración de sales y otros metabolitos y crea un desequilibrio osmótico que puede ser perjudicial para la recuperación celular.
- 45 El proceso de congelación implica fenómenos complejos que, incluso después de décadas de investigación, todavía no se entienden por completo. Estudios criobiológicos han conducido a la especulación de qué tiene lugar durante la congelación de células vivas y cómo pueden superarse fenómenos adversos.
- 50 Dado que el agua es el componente principal de todas las células vivas y debe estar disponible para que se produzcan los procesos químicos de la vida, el metabolismo celular se detiene cuando toda el agua del sistema se convierte en hielo. El hielo se forma a diferentes velocidades durante el proceso de enfriamiento.
- 55
- 60
- 65

El enfriamiento lento da lugar a congelación externa a la célula antes de que empiece a formarse hielo intercelular. Cuando se forma hielo externo a la célula, se quita agua del entorno extracelular y tiene lugar un desequilibrio osmótico a través de la membrana celular dando lugar a migración del agua fuera de la célula. El aumento de la concentración de solutos fuera de la célula, así como intracelular cuando sale agua de la célula, puede ser perjudicial para la supervivencia de la célula. Si queda demasiada agua dentro de la célula, pueden producirse daños debido a la formación de cristales de hielo y a la recristalización durante el calentamiento y por lo general son letales.

El enfriamiento rápido minimiza los efectos de la concentración de solutos puesto que el hielo se forma de manera uniforme, pero da lugar a la formación de más hielo intracelular dado que el agua no sale de la célula. Como ya se ha mencionado, el enfriamiento lento, por otra parte, da lugar a una mayor pérdida de agua de la célula y a la formación de menos hielo interno, pero da lugar a un aumento de los efectos de solución. La permeabilidad celular afecta a la tasa de pérdida de agua; las células más permeables son capaces de tolerar el enfriamiento rápido mejor que las células menos permeables. La literatura científica indica que la formación de cristales de hielo y el efecto de la solución desempeñan un papel en el daño celular.

Por estas razones, se supone que un elemento clave de un buen programa de criopreservación es la estandarización de los procesos empleados. A causa de la complejidad del proceso de conservación, pequeñas variaciones en el procesado y almacenamiento pueden dar lugar a cambios sutiles en los materiales biológicos. Estandarizando las metodologías hay una mayor certeza de que los resultados de la investigación serán consistentes y comparables. Por lo tanto, una vez establecido un régimen de criopreservación exitoso, se deberán hacer esfuerzos en la documentación y metodología esmeradas.

Hoy día, la congelación instantánea es una técnica de criopreservación estándar en la que una muestra es congelada rápidamente. Se realiza por lo general usando hielo seco, una suspensión de hielo seco/etanol o nitrógeno líquido. La congelación instantánea reduce la posibilidad de que el agua presente en la muestra forme cristales de hielo durante el proceso de congelación, y mantiene mejor la integridad de la muestra. En el caso de tejidos, la congelación instantánea ralentiza las acciones de las proteasas y las nucleasas inhibiendo la degradación de moléculas tales como ARN o proteínas. Típicamente, la congelación instantánea se realiza directamente en hielo seco o en un baño conteniendo hielo seco con etanol o isopropanol. También se usa comúnmente nitrógeno líquido para la congelación instantánea de fragmentos de tejido.

El principal inconveniente de los actuales procesos de congelación instantánea es la tasa de enfriamiento no controlada, puesto que los tejidos caen de repente a un entorno a temperatura muy baja, típicamente de aproximadamente -80°C. US 2006/0063141 A1 describe un método de criopreservación, donde las células son enfriadas a una primera temperatura de entre -3°C y -30°C, seguido de enfriamiento a una segunda temperatura inferior a -60°C en 0,1 a 5 minutos usando perfiles lineales o no lineales.

Por ello, un objeto de la presente invención es proporcionar un método y un aparato para la criopreservación de muestras de tejidos biológicos para criopreservación en biobancos que optimizan las técnicas actualmente conocidas y que pueden dar lugar a un procedimiento técnico estandarizado para recoger tejidos humanos y animales para biobancos y estudios moleculares.

Este objeto se logra con la materia de las reivindicaciones independientes. Se definen realizaciones preferidas en las reivindicaciones dependientes. Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método definido en la reivindicación 1.

En un primer paso, el espécimen se coloca en un fluido de enfriamiento puesto previamente a una primera temperatura predeterminada de entre -10°C y -60°C para la congelación instantánea, es decir, congelación rápida, del espécimen. En una realización preferida, la primera temperatura predeterminada se pone a entre -20°C y -50°C, más preferiblemente a entre -35°C y -45°C, muy preferiblemente a -40°C. En una realización muy preferida, la primera temperatura predeterminada se pone a una temperatura de entre -20°C y -40°C. Se indica que la primera temperatura predeterminada se pone según el tipo de muestra (células, tejidos, etc) a criopreservar para permitir una congelación rápida (instantánea) del espécimen. La temperatura del espécimen antes de ser colocado en el fluido de enfriamiento puesto previamente a la primera temperatura predeterminada es por lo general la temperatura ambiente.

En un segundo paso del método según la invención, la temperatura del fluido de enfriamiento se reduce a una segunda temperatura predeterminada que es adecuada para conservar dicho espécimen. En otros términos, la segunda temperatura predeterminada es inferior a la primera temperatura predeterminada y es preferiblemente de entre -70°C y -90°C, más preferiblemente de entre -75°C y -85°C, y muy preferiblemente de aproximadamente -80°C.

Según la invención, la reducción de la temperatura en el segundo paso del método se realiza por un perfil de enfriamiento predeterminado. El perfil de enfriamiento predeterminado se realiza con una tasa de enfriamiento

predeterminada de entre 0,5°C por minuto y 3°C por minuto, preferiblemente de 1°C por minuto. El perfil de enfriamiento predeterminado puede ser lineal, no lineal o gradual.

5 En una realización preferida, la temperatura del fluido de enfriamiento y/o preferiblemente el espécimen se mide directa o indirectamente, midiéndose preferiblemente de forma continua. La reducción de temperatura en el segundo paso del método es controlada por un algoritmo PID (algoritmo proporcional integral derivativo) usando un controlador PID. Usando el algoritmo PID y en base a las temperaturas medidas y almacenadas, se determinará un punto de control o valor de control que será transferido después a un control de encendido/apagado del proceso de enfriamiento; es decir, un control de encendido/apagado de un medio de enfriamiento correspondiente.

10 En el primer paso, el espécimen se coloca directamente en el fluido de enfriamiento o se coloca en un depósito como un criovial o cesta, hecho preferiblemente de PDPE, que después se coloca en el fluido de enfriamiento.

15 El primer paso del método novedoso también puede incluir el paso de colocar una pluralidad de especímenes sucesivamente o todos a la vez en el fluido de enfriamiento (directa o indirectamente), y el segundo paso del método se lleva a cabo solamente después de haber colocado un número predefinido de especímenes (preferiblemente todos los especímenes) en el fluido de enfriamiento preenfriado para la congelación instantánea del espécimen hasta la primera temperatura predeterminada.

20 El fluido de enfriamiento es preferiblemente un líquido refrigerante. Dicho líquido de enfriamiento no se congela preferiblemente durante el proceso. El fluido o líquido de enfriamiento puede ser isopentano o un líquido de enfriamiento sucedáneo no inflamable como NOVEC™ 7000 de 3M™.

25 El método según la invención consiste así en mantener el fluido de enfriamiento inicial o agente de congelación en un medio de enfriamiento como un depósito o recipiente (aluminio), a una primera temperatura preestablecida. Esta temperatura preestablecida puede ponerse a una temperatura que permita la congelación instantánea o la congelación rápida del espécimen. Según el tipo de la muestra (célula, tejidos, etc) a crioconservar, esta primera temperatura predeterminada y preestablecida inicial se puede poner, preferiblemente, a entre -20°C y -40°C. Tan pronto como las muestras son sumergidas o al menos colocadas en el agente de congelación almacenado en un medio de recepción de un aparato correspondiente, y preferiblemente no antes de que llegue a una temperatura deseada (de congelación) en el espécimen, se lleva a cabo el segundo paso del método, por ejemplo, en el que el operador puede activar un procedimiento de enfriamiento predefinido mediante una interfaz de software. Entonces, el control del aparato, por el software PID, baja la temperatura del agente de congelación a aproximadamente -80°C o cualquier otra temperatura adecuada para conservar dicho espécimen con un perfil de enfriamiento predeterminado que tiene preferiblemente una tasa de enfriamiento controlada de 1°C por minuto. Para facilitar el manejo y las operaciones, las muestras pueden colocarse en crioviales (es decir, para tejidos o células frágiles) o en una cesta de PTFE dedicada o análogos y entonces dejarse caer al líquido de enfriamiento.

40 El método incluye así la posibilidad de crear un protocolo estandarizado de congelación instantánea con una temperatura preestablecida inicial para congelar el espécimen y un perfil de enfriamiento siguiente a la temperatura de almacenamiento final deseada con una tasa de enfriamiento exacta de, por ejemplo, 1°C por minuto para superar los inconvenientes de la técnica conocida. Por lo tanto, es posible, por el paso inicial de congelación instantánea, enfriar el espécimen hasta una temperatura deseada para reducir la posibilidad de que el agua presente en la muestra forme cristales de hielo durante el proceso de congelación, manteniendo así mejor la integridad de la muestra mientras que, por otra parte, el perfil de enfriamiento controlado posterior con tasas de enfriamiento predeterminadas permite la minimización de las variables de baja recuperación celular debido a hidratación o formación de cristales de hielo para asegurar la máxima viabilidad de una amplia variedad de células. Las tasas de enfriamiento uniforme programadas son efectivas para una variedad de aplicaciones de congelación, incluyendo células pluripotenciales, embriones, válvulas duras y sangre del cordón umbilical. Por lo tanto, los efectos perjudiciales actualmente conocidos al congelar materiales biológicos con diferentes técnicas pueden minimizarse o incluso superarse con el método según la presente invención.

55 Según otro aspecto, la presente invención se refiere a un aparato como el definido en la reivindicación 9. El aparato incluye un medio de recepción para recibir un fluido de enfriamiento y dicho espécimen, así como un medio de enfriamiento para enfriar dicho fluido en dicho medio receptor. Según la presente invención, el aparato incluye además un controlador que está configurado para mantener la temperatura de dicho fluido de enfriamiento a una primera temperatura predeterminada de entre -10°C y -60°C para la congelación instantánea, es decir, la congelación rápida, de dicho espécimen cuando dicho espécimen se coloca en dicho medio receptor conteniendo dicho fluido de enfriamiento. El controlador está configurado además para reducir, en un paso posterior después del primer paso, la temperatura de dicho fluido de enfriamiento a una segunda temperatura predeterminada adecuada para conservar dicho espécimen con un perfil de enfriamiento predeterminado después de que el espécimen ha sido colocado en el medio de recepción. El controlador está configurado para controlar el medio de enfriamiento con un algoritmo PID como ya se ha definido anteriormente y por ello es un controlador PID.

65 El medio de recepción incluye preferiblemente al menos uno o una pluralidad de depósitos para recibir el fluido de enfriamiento y también para recibir un espécimen y/o un depósito como un criovial o una cesta, hecho

preferiblemente de PTFE, que contiene el espécimen y para colocarlo en el fluido de enfriamiento. Además, el medio de recepción puede incluir un medio de trabajo como una placa de trabajo que está en contacto (térmico y preferiblemente también físico) con el al menos único depósito y, preferiblemente, también con el medio de enfriamiento. Según una alternativa, el depósito está formado integralmente con el medio de trabajo. Según otra alternativa, el depósito se coloca preferiblemente de forma extraíble o se monta en el medio de trabajo. Además, es posible una combinación de estas dos alternativas en el mismo medio de trabajo. Preferiblemente, el medio de recepción puede incluir además un medio de transferencia que conecte térmicamente el medio de trabajo y el medio de enfriamiento y/o el depósito o los depósitos. El medio de enfriamiento puede estar así alternativa o adicionalmente en contacto (físico directo o al menos contacto térmico) con el depósito o los depósitos.

El medio de recepción se puede hacer de un material que tiene una alta conductividad térmica. Tales materiales pueden ser, por ejemplo, metales como aluminio o acero inoxidable, aunque la presente solicitud no se limita a estos materiales.

En una realización preferida, el medio de enfriamiento es un refrigerador Stirling que usa preferiblemente gas argón. El medio de enfriamiento, preferiblemente el refrigerador Stirling, puede tener una parte de enfriamiento que está en contacto térmico con al menos una parte del medio de recepción o al menos el depósito o los depósitos, preferiblemente en contacto físico directo con ellos. La utilización de un refrigerador Stirling más bien que un compresor común tiene la ventaja de que los ciclos de temperatura de los compresores comunes pueden oscilar varios grados puesto que el mecanismo de enfriamiento es lento, mientras que un refrigerador Stirling permite un ajuste exacto de la temperatura que solamente tiene una desviación de temperatura de a lo sumo +/- 1°C.

Además, el aparato puede incluir una tapa para proporcionar una zona de trabajo cerrada que encierra al menos el medio de recepción o el depósito o los depósitos y para mantener la zona de trabajo térmicamente aislada del entorno externo. El aparato puede incluir además una disposición de descongelación como una bomba de aire y un elemento de calentamiento inverso para descongelar la zona de trabajo preferiblemente en ciclos preestablecidos.

Según la presente invención, se facilita así un aparato específico para llevar a cabo dicho método y que se facilita con el fin de gestionar rápidamente la condición de temperatura y el perfil de enfriamiento del fluido de enfriamiento (es decir, líquido de enfriamiento o agente de congelación), tal como isopentano o sucedáneos alternativos no inflamables, contenido preferiblemente en un depósito dedicado como un recipiente.

Un componente del hardware del aparato es el medio de enfriamiento que es preferiblemente un refrigerador Stirling (motor), es decir, un tipo específico de compresor que es capaz de poner rápidamente y mantener una temperatura preestablecida preferiblemente mediante la utilización de gas argón en un cilindro de pistón sellado.

Para seguir exactamente el perfil de temperatura de enfriamiento, el medio de enfriamiento o refrigerador Stirling es controlado preferiblemente por un algoritmo PID de un software de sistema dedicado del aparato.

Con el fin de transmitir rápidamente la baja temperatura generada por el medio de enfriamiento, una parte de enfriamiento, por ejemplo, la punta superior del cilindro del refrigerador Stirling, está en contacto directo (térmico o incluso físico) con preferiblemente todas las superficies a enfriar, en particular con los depósitos o recipientes (dedicados) donde se almacena el agente de congelación. Para asegurar una transferencia y control de temperatura muy rápidos, las partes en contacto térmico directo o incluso en contacto físico con el depósito del cilindro del refrigerador de motor Stirling son preferiblemente de material de aluminio o cualquier otro material adecuado para alta conducción térmica.

El refrigerador Stirling puede tener una capacidad de enfriamiento de aproximadamente 80 vatios en caso de un volumen de muestra total (medio de enfriamiento líquido y espécimen) de 50 ml. El espécimen podría tener entonces un volumen total de aproximadamente 1 ml o 1 mg.

Más ventajas y características específicas se describirán ahora con respecto a las figuras acompañantes, en las que:

La figura 1 es una vista en perspectiva de un aparato según una primera realización de la presente invención.

La figura 2 es una vista lateral en sección del aparato según la figura 1.

La figura 3 es una vista en perspectiva de un aparato según una segunda realización de la presente invención.

Y la figura 4 es una pantalla de un aparato según la presente invención.

Las figuras 1 a 2 muestran una primera realización del aparato 1 para la crioconservación de especímenes biológicos tal como tejidos humanos y animales, tipos de células y materiales subcelulares para crioconservación en biobancos según la presente invención. El aparato 1 incluye un medio de recepción 2 para recibir un fluido de enfriamiento y un espécimen. El fluido de enfriamiento puede ser un líquido refrigerante (en adelante, fluido de

enfriamiento y líquido de enfriamiento se utilizan de forma intercambiable, pero los dos se refieren a un fluido de enfriamiento correspondiente; aunque se usa preferiblemente un líquido refrigerante). El fluido o líquido de enfriamiento no se congela preferiblemente durante el proceso. El líquido de enfriamiento puede ser isopentano o cualquier otro líquido de enfriamiento sucedáneo no tóxico y/o no inflamable como NOVEC™ 7000 de 3M™

El medio de recepción 2 puede incluir al menos uno o incluso una pluralidad de depósitos 3 para recibir el fluido de enfriamiento. Un primer tipo de tal depósito 3 podría ser un recipiente 30. Este recipiente 30 puede taparse con una tapa 31 que se hace, preferiblemente, de PTFE. En este recipiente 30, el fluido de enfriamiento puede disponerse/almacenarse al menos durante el proceso y preferiblemente también para conservación de un espécimen concreto.

El espécimen puede colocarse en el fluido de enfriamiento (almacenado en el recipiente de enfriamiento 30) directamente o se coloca en una cesta 32, hecha preferiblemente de PTFE, que soporta el espécimen y que está adaptada para colocarse en el fluido de enfriamiento, por ejemplo, para ponerse en el recipiente 30. Esta disposición se ilustra en la figura 1 en el lado izquierdo. Alternativamente, también es posible que el espécimen se almacene/coloque en un depósito receptor 36 como un vial que contenga el espécimen y que también esté adaptado para colocarse en el fluido de enfriamiento, por ejemplo, para ponerse en el recipiente 30. Esta disposición se usa en general para tejidos o células frágiles. Un número dedicado o predeterminado de crioviales también puede soportarse en/sobre un soporte (no representado) que esté adaptado para colocarse en el fluido de enfriamiento, por ejemplo, para ponerse en el recipiente 30. Por lo tanto, múltiples crioviales pueden ser manejados conjuntamente, facilitando así el manejo del sistema y acelerando el proceso/método.

También se puede disponer un receptáculo 35 para recibir los recipientes 36 (por ejemplo, crioviales) que contienen los especímenes que se colocaron o se colocarán en el fluido de enfriamiento en el depósito 3, 30. El receptáculo 35 puede facilitarse como un bloque. El receptáculo sirve así como una zona de almacenamiento para un número concreto de recipientes 36. Según la figura 1, el aparato 1 o el receptáculo 35 tiene una zona de almacenamiento de hasta 12 crioviales 36, aunque la solicitud no se limita a un número o tipo concreto de tales recipientes 36. La zona de almacenamiento permite al operador mantener momentáneamente una pluralidad de muestras de espécimen a la temperatura de almacenamiento correcta, que se puede poner independientemente, antes de que finalice la recogida final. El receptáculo 35 puede definirse así como una zona de almacenamiento preferiblemente para mantener los especímenes en los crioviales, preferiblemente previamente congelados al valor establecido mínimo en el fluido de enfriamiento del depósito 3, 30. Consecuentemente, la temperatura de mantenimiento del receptáculo 35 puede definirse como la temperatura mínima del protocolo de enfriamiento correspondiente/presente/predeterminado diseñado para almacenamiento del espécimen dentro del sistema/aparato 1.

El medio de recepción 2 puede incluir así al menos uno o una pluralidad de depósitos 3, 30 para recibir el fluido de enfriamiento y para recibir el espécimen y/o un depósito como un criovial 36 o una cesta 32, hechos preferiblemente de PTFE, que contiene el espécimen y que puede colocarse en el fluido de enfriamiento almacenado en el depósito respectivo 3, 30.

Como se representa en las figuras 1 y 2, el medio de recepción 2 puede incluir además un medio de trabajo 4 como una placa de trabajo. Este medio de trabajo 4 forma al menos la parte inferior de una zona de trabajo W para realizar el proceso según la invención. El medio de trabajo o la placa de trabajo 4 está preferiblemente en contacto térmico con al menos un depósito 3, 30 y preferiblemente también el receptáculo 35. Según esta realización, el depósito 3, 30 (y el receptáculo 35) puede colocarse o montarse en el medio de trabajo 4 y se coloca preferiblemente de forma extraíble en él. Si el depósito 3, 30 (y el receptáculo 35) se coloca de forma extraíble en el medio de trabajo 4, el medio de trabajo 4 y el depósito 3 (y el medio de trabajo 4 y el receptáculo 35) están preferiblemente en contacto térmico (y físico) uno con otro por o mediante zonas planas de contacto.

Según otra realización alternativa, el depósito 3 también puede estar formado integralmente con el medio de trabajo 4. Por lo tanto, el medio de trabajo 4 puede incluir indentaciones, es decir, puede tener uno o más rebajes que forman los depósitos 3 para recibir el fluido de enfriamiento.

Dentro de la zona de trabajo W y preferiblemente encima del medio de trabajo 4 puede disponerse un elemento de trabajo 12. Este elemento de trabajo 12 se puede hacer de PTFE o análogos. El elemento de trabajo 12 se coloca preferiblemente de forma extraíble en el medio de trabajo 4. El elemento de trabajo 12 puede usarse para colocar encima de él la cesta 32 o cualquier otro elemento antes, durante o después del proceso. El elemento de trabajo 12 puede incluir una porción de borde sobresaliente 120 como una protección contra escapes o rebosamiento.

El aparato 1 incluye además un medio de enfriamiento 5 que se representa en la figura 2 y que está adaptado para enfriar el fluido en el medio de recepción 3 y por ello también un espécimen colocado en el fluido de enfriamiento. El medio de enfriamiento 5 es preferiblemente un refrigerador Stirling que utiliza un gas, preferiblemente gas argón, en un cilindro de pistón para crear el necesario intercambio de temperatura. El refrigerador Stirling o motor 5 es específicamente adecuado para temperaturas inferiores a -40°C, tiene mejor eficiencia que los compresores convencionales y también se puede disponer en dimensiones bastante compactas. Habiendo gas argón en el

cilindro de sellado, no hay necesidad de regenerarlo con mantenimiento periódico como en un compresor de gas estándar ordinario.

5 Para asegurar una transferencia de temperatura rápida y exacta del medio de enfriamiento 5 al fluido de enfriamiento y por ello al espécimen a tratar, una parte de enfriamiento 50 del medio de enfriamiento 5 está preferiblemente en contacto térmico con al menos una parte del medio de recepción 2 o al menos el depósito 3, 30, preferiblemente en contacto físico directo con él. A efectos de almacenamiento, también el receptáculo 35 puede estar en contacto térmico o incluso en contacto físico directo con la parte de enfriamiento 50. Para permitir una transferencia térmica suficiente, la parte de enfriamiento 50 está preferiblemente en contacto plano con los
10 elementos a enfriar 3, 30, 35. Por razones de diseño u otras, también puede ser adecuado que el medio de recepción 2 incluya además un medio de transferencia 6 para conectar térmicamente el medio de enfriamiento 5 (o su parte de enfriamiento 50) y el medio de trabajo 4 y/o los depósitos 3, 30 y/o el receptáculo 35. Por lo tanto, todas las partes respectivas están preferiblemente en contacto físico plano una con otra. Además, todas las partes en contacto térmico una con otra, como el medio de recepción 2 incluyendo los depósitos 3, 30, el receptáculo 35, el
15 medio de trabajo 4 y el medio de transferencia 6 se hacen preferiblemente de un material que tiene alta conductividad térmica. Tales materiales pueden ser, por ejemplo, metales como aluminio o acero inoxidable, aunque la presente aplicación no se limita a estos materiales.

20 Como se puede deducir de las figuras 1 y 2, el aparato 1 puede incluir además una tapa 7 para proporcionar una zona de trabajo cerrada W que encierra al menos el medio de recepción 2 o el depósito 3, 30 y preferiblemente también el receptáculo 35. La tapa 7 puede incluir además un elemento de aislamiento correspondiente 70 dispuesto al menos parcialmente alrededor de la zona de trabajo W en caso de que la tapa 7 esté en una posición cerrada. La tapa 7 puede disponerse así para mantener la zona de trabajo W térmicamente aislada del entorno externo.

25 Para mover fácilmente la tapa entre dicha posición cerrada y una posición abierta para acceder a la zona de trabajo W, la tapa 7 puede soportarse pivotantemente. Por lo tanto, la tapa 7 se conecta preferiblemente de forma pivotante mediante bisagras 71 o análogos a una base 8. La tapa 7 puede incluir un mango 73 para manipular fácilmente, es decir, abrir y cerrar, la tapa 7.

30 La base 8 puede soportar la mayor parte de los componentes del aparato 1 como el medio de recepción 2 y el medio de enfriamiento 5. Para proporcionar una zona de trabajo W cerrada suficientemente aislada cuando la tapa 7 está en su posición cerrada, la base 8 también puede incluir un elemento de aislamiento 80 que rodea al menos parcialmente o encierra el medio de recepción 2 y tiene una abertura superior 81 para acceder a la zona de trabajo W. El elemento de aislamiento 80 también puede incluir una abertura inferior a través de la que se extiende una
35 parte del medio de recepción 2 (por ejemplo, el medio de transferencia 6) y/o el medio de enfriamiento 5 (por ejemplo, la parte de enfriamiento 50). Además, el elemento de aislamiento 80 de la base puede incluir una porción de borde perfilada 82 que corresponde preferiblemente a una porción de borde perfilada correspondiente 72 del elemento de aislamiento 70 de la tapa 7 para proporcionar una zona de trabajo W sellada cuando la tapa 7 está en su posición cerrada.

40 Por razones de diseño, la base 8 puede incluir una caja 83 para cubrir el interior del aparato 1. Al menos uno de los lados de la base 8 puede incluir un elemento de pared abrible 84 para acceder al interior del aparato 1 donde, por ejemplo, está el medio de enfriamiento 5. También se puede proporcionar ranuras de ventilación 85 para permitir el intercambio de aire de la zona interna de la base 8 que encierra, por ejemplo, el medio de enfriamiento 5.

45 El aparato 1 incluye además un controlador 10 que está configurado para mantener la temperatura del fluido de enfriamiento a una primera temperatura predeterminada de entre -10°C y -60°C para congelación (inmediata o rápida) del espécimen cuando el espécimen está colocado en el medio de recepción 2 (es decir, el depósito 3, 30 o análogos) conteniendo dicho fluido de enfriamiento. El controlador 10 está configurado además de tal manera que, después de colocar el espécimen en el medio de recepción 2, se reduzca, con un perfil de enfriamiento predeterminado, la temperatura del fluido de enfriamiento a una segunda temperatura predeterminada adecuada para conservar el espécimen. El controlador 10 está configurado para controlar el medio de enfriamiento 5 por un algoritmo PID que realiza un perfil de enfriamiento predeterminado con una tasa de enfriamiento de entre 0,5°C por minuto y 3°C por minuto, preferiblemente 1°C por minuto. El aparato 1, incluyendo el medio de enfriamiento 5 así
50 como el controlador 10, es movido por una fuente de alimentación 9.

55 El aparato 1 puede incluir además una pantalla 11 que tiene preferiblemente una pantalla táctil para controlar el aparato 1. Tal pantalla 11 se representa de forma ejemplar en la figura 4. La pantalla 11 puede incluir diferentes zonas de visualización que muestran, por ejemplo, la temperatura real (zona A1), la temperatura establecida (zona A2) así como el tiempo establecido para la tasa de enfriamiento, por ejemplo 1°C por tiempo introducido en la pantalla (zona A3). También se puede disponer un botón de "Inicio" A4 para iniciar el primer y/o el segundo paso del método. Además, también pueden facilitarse botones para aumentar o disminuir la temperatura establecida (A5) o el tiempo (A6). La pantalla 11 de la figura 4 es solamente ejemplar, pero puede variar y modificarse de varias formas que sean más adecuadas para los requisitos concretos.
60
65

- Dado que la mayoría de las partes del aparato 1, en particular las partes enfriadas como el medio de recepción 2, se hacen de material metálico, estas partes metálicas, cuando se enfrían a temperaturas muy bajas (como de -40°C a -80°C) y se exponen además a aire ambiente, están expuestas a rápida generación de humedad y condensaciones. Las condensaciones pueden crear problemas prácticos para realizar el procedimiento de congelación de la invención. Para evitar este problema, el aparato 1 puede incluir además un dispositivo de descongelación como una bomba de aire y un elemento de calentamiento inverso para descongelar la zona de trabajo W preferiblemente en ciclos preestablecidos. Estos componentes del dispositivo de descongelación también pueden ser activados por la fuente de alimentación 9.
- Con respecto a la figura 3, se representa otra realización del presente aparato 100. Este aparato 100 es bastante similar al aparato según la primera realización. Los mismos elementos llevan los mismos números de referencia. Para evitar la repetición innecesaria, solamente se describen aquí los elementos diferentes de los de la primera realización.
- El aparato 100 según la segunda realización incluye dos zonas de trabajo separadas W, aunque también son posibles solamente una (primera realización) o incluso tres o más. Estas zonas de trabajo W pueden ser procesadas simultáneamente. También es posible utilizar una de las zonas de trabajo W1 (en la figura 3 la zona de trabajo izquierda) para el primer paso del método y la otra de las zonas de trabajo W2 (en la figura 3 la zona de trabajo derecha) para el segundo paso del método. Cada una de las zonas de trabajo puede estar provista de una tapa individual o de una tapa combinada. Además, se puede disponer una pantalla o pantalla táctil 11 para cada una de las zonas de trabajo W o una para todas las zonas de trabajo W.
- A continuación, se describe un método para la crioconservación de especímenes biológicos, tal como tejidos humanos y animales, tipos de células y materiales subcelulares para crioconservación en biobancos.
- En un primer paso de este método, se coloca un espécimen en un fluido de enfriamiento puesto previamente a una primera temperatura predeterminada de entre -10°C y -60°C para la congelación instantánea, es decir, la congelación rápida, del espécimen. En una realización preferida, la temperatura predeterminada se pone a una temperatura de entre -20°C y -50°C, más preferiblemente de entre -35°C y -45°C, muy preferiblemente a aproximadamente -40°C. Se indica que el efecto deseado de la presente invención solamente puede obtenerse si el espécimen se ha enfriado suficientemente (congelado) en el primer paso. Es bien conocido que hasta aproximadamente -5°C, las células y su medio circundante permanecen sin congelarse principalmente a causa de superenfriamiento, pero también a causa de la depresión del punto de congelación por los solutos protectores que hay frecuentemente. Por lo tanto, se requiere una temperatura suficiente de (o caída de temperatura a) una temperatura deseada dentro del rango de temperatura dado (dependiendo del tipo de muestra) a la que el espécimen se congele al menos parcialmente para obtener las ventajas de la congelación instantánea sin las desventajas de una repentina caída de temperatura a una temperatura (de conservación) muy baja.
- El espécimen puede colocarse directamente en el fluido de enfriamiento de, por ejemplo, un depósito extraíble 3 como el recipiente 30 representado en la figura 1, o puede colocarse en un depósito 32, 36 como un criovial 36 o una cesta 32, hecho preferiblemente de PTFE, que después se coloca en el fluido de enfriamiento que, por ejemplo, puede almacenarse en el recipiente 30 (por ejemplo, para recibir la cesta 32) o un receptáculo correspondiente (de aluminio) o bloque que tenga un número correspondiente de zonas de recepción o aberturas (por ejemplo, para recibir los crioviales 36).
- Según un segundo paso del método, después del primer paso del método, la temperatura del fluido de enfriamiento se reduce a una segunda temperatura predeterminada adecuada para conservar dicho espécimen que ha sido colocado en el fluido de enfriamiento en el primer paso del método. Esta segunda temperatura predeterminada puede ser una temperatura de entre -70°C y -90°C, preferiblemente de entre -75°C y -85°C, muy preferiblemente de aproximadamente -80°C. La reducción de la temperatura en el segundo paso del método se lleva a cabo con un perfil de enfriamiento predeterminado que se realiza con una tasa de enfriamiento predeterminada de entre 0,5°C por minuto y 3°C por minuto, preferiblemente de 1°C por minuto.
- Preferiblemente, en el primer paso del método, el operador coloca el espécimen en el fluido de enfriamiento y, a continuación, el operador puede iniciar el proceso de enfriamiento del segundo paso del método (por ejemplo, pulsando manualmente un botón correspondiente en la pantalla/pantalla táctil 11).
- La temperatura del fluido de enfriamiento se mide preferiblemente de forma constante. Por lo tanto, se dispone un número dedicado de sensores de temperatura en el aparato 1 para medir constantemente la temperatura del fluido de enfriamiento y/o el espécimen colocado en él. La temperatura puede medirse directa o indirectamente con sensores correspondientes. Así, también es posible que el segundo paso del método se inicie automáticamente una vez que el fluido de enfriamiento o espécimen haya alcanzado la temperatura deseada o una vez que el espécimen haya sido colocado en el fluido de enfriamiento; si es necesario o se requiere después de que haya transcurrido un tiempo predeterminado después de colocar el espécimen en el fluido de enfriamiento y/o después de alcanzar la temperatura deseada.

- 5 La reducción de temperatura en el segundo paso del método es controlada por un algoritmo PID del controlador PID 10. El perfil de enfriamiento predeterminado puede ser lineal, no lineal o gradual. Esto depende del tipo de muestra a crioconservar. Las partes refrigeradas pueden mantener así o ponerse a una temperatura exacta. Gracias a al perfil de enfriamiento predeterminado y por ello al circuito dedicado de supervisión de temperatura y preferiblemente también al refrigerador Stirling, el software (PID) del controlador unitario 10 es preferiblemente capaz de mantener la temperatura deseada dentro de, por ejemplo, +/- 1°C, lo que hace posible asegurar una perfecta reproducibilidad del procedimiento. El uso del método que tiene los dos pasos dedicados y el perfil de enfriamiento predeterminado para el segundo paso hace posible, cuando se trata de crioconservaciones, asegurar la perfecta reproducibilidad del procedimiento y por ello una estandarización de este proceso.
- 10 Según una realización preferida de la invención, el primer paso del método incluye colocar una pluralidad de especímenes sucesivamente o todos a la vez en el fluido de enfriamiento y solamente después de colocar un número predefinido de especímenes en el fluido de enfriamiento preenfriado, se lleva a cabo el segundo paso.
- 15 La presente invención no se limita a las realizaciones descritas anteriormente. La invención se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la crioconservación de especímenes biológicos, tal como tejidos humanos y animales, tipos de células y materiales subcelulares para crioconservación en biobancos, incluyendo los pasos de:
- 5 i) colocar dicho espécimen en un fluido de enfriamiento puesto previamente a una primera temperatura predeterminada de entre -10°C y -60°C para la congelación instantánea el espécimen, y
- 10 ii) reducir la temperatura de dicho fluido de enfriamiento a una segunda temperatura predeterminada adecuada para conservar dicho espécimen,
- 15 donde la reducción de la temperatura en el paso ii) es realizada por un perfil de enfriamiento predeterminado, y donde el perfil de enfriamiento predeterminado se realiza con una tasa de enfriamiento predeterminada de entre 0,5°C por minuto y 3°C por minuto.
- 20 2. El método según la reivindicación 1, donde dicha primera temperatura predeterminada se pone a entre -20°C y -50°C, preferiblemente a entre -35°C y -45°C, muy preferiblemente a -40°C y/o donde dicha segunda temperatura predeterminada es de entre -70°C y 90°C, preferiblemente de entre -75°C y -85°C, muy preferiblemente -80°C.
3. El método según alguna de las reivindicaciones precedentes, donde el perfil de enfriamiento predeterminado se realiza con una tasa de enfriamiento predeterminada de 1°C por minuto.
4. El método según alguna de las reivindicaciones precedentes, donde dicho perfil de enfriamiento predeterminado es lineal, no lineal o gradual.
- 25 5. El método según alguna de las reivindicaciones precedentes, donde la temperatura del fluido de enfriamiento y/o el espécimen se mide preferiblemente de forma continua y directa o indirectamente y la reducción de temperatura en el paso ii) es controlada por un algoritmo PID.
- 30 6. El método según alguna de las reivindicaciones precedentes, donde el espécimen se coloca directamente en el fluido de enfriamiento o se coloca en un depósito (32, 36) como un criovial (36) o una cesta (32), hecho preferiblemente de PTFE, que se coloca en el fluido de enfriamiento.
- 35 7. El método según alguna de las reivindicaciones precedentes, donde el paso i) incluye colocar una pluralidad de especímenes sucesivamente o todos a la vez en el fluido de enfriamiento y el paso ii) se lleva a cabo solamente después de haber colocado un número predefinido de especímenes en el fluido de enfriamiento preenfriado.
- 40 8. El método según alguna de las reivindicaciones precedentes, donde dicho fluido de enfriamiento es un líquido refrigerante que preferiblemente no se congela durante el proceso, donde dicho líquido de enfriamiento es preferiblemente isopentano o un líquido de enfriamiento sucedáneo no inflamable como NOVEC™ 7000.
9. Un aparato (1, 100) para la crioconservación de especímenes biológicos tal como tejidos humanos y animales, tipos de células y materiales subcelulares para crioconservación en biobancos, incluyendo:
- 45 un medio de recepción (2) para recibir un fluido de enfriamiento y dicho espécimen, y
- un medio de enfriamiento (5) para enfriar dicho fluido en dicho medio receptor (2), donde el aparato (1, 100) incluye además un controlador (10) configurado para
- 50 i) mantener la temperatura de dicho fluido de enfriamiento a una primera temperatura predeterminada de entre -10°C y -60°C para la congelación instantánea de dicho espécimen cuando dicho espécimen está colocado en dicho medio receptor (2) conteniendo dicho fluido de enfriamiento, y
- 55 ii) reducir la temperatura de dicho fluido de enfriamiento a una segunda temperatura predeterminada adecuada para conservar dicho espécimen con un perfil de enfriamiento predeterminado, y
- iii) controlar el medio de enfriamiento (5) con un algoritmo PID que realiza el perfil de enfriamiento predeterminado con una tasa de enfriamiento de entre 0,5°C por minuto y 3°C por minuto.
- 60 10. El aparato (1, 100) según la reivindicación 9, donde el controlador (10) está configurado para controlar el medio de enfriamiento (5) con un algoritmo PID que realiza preferiblemente el perfil de enfriamiento predeterminado con una tasa de enfriamiento de 1°C por minuto.
- 65 11. El aparato (1, 100) según las reivindicaciones 9 o 10,
- donde dicho medio receptor (2) incluye:

- 5 - al menos uno o una pluralidad de depósitos (3, 30) para recibir el fluido de enfriamiento y para recibir el espécimen y/o un recipiente como un criovial (36) o una cesta (32), hecho preferiblemente de PTFE, que contiene el espécimen y a colocar en el fluido de enfriamiento, y
- 5 - un medio de trabajo (4) como una placa de trabajo que está en contacto térmico con el al menos único depósito (3, 30), donde el depósito (3, 30) está formado integralmente con el medio de trabajo (4) y/o el depósito (3, 30) se coloca preferiblemente de forma extraíble o monta en el medio de trabajo (4), y
- 10 - preferiblemente un medio de transferencia (6) que conecta térmicamente el medio de enfriamiento (5) y el medio de trabajo (4) y/o el depósito (3, 30).
12. El aparato (1, 100) según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde dicho medio receptor (2) se hace de un material que tiene una alta conductividad térmica como metales, por ejemplo, aluminio o acero inoxidable.
- 15 13. El aparato (1, 100) según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde dicho medio de enfriamiento (5) es un refrigerador Stirling que usa preferiblemente gas argón.
- 20 14. El aparato (1, 100) según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde dicho medio de enfriamiento (5) tiene una parte de enfriamiento (50) que está en contacto térmico con al menos una parte del medio de recepción (2) o al menos el depósito (3, 30), preferiblemente en contacto físico directo con él.
- 25 15. El aparato (1, 100) según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, incluyendo además una tapa (7) para proporcionar una zona de trabajo cerrada (W) que encierra al menos el medio de recepción (2) o el depósito (3, 30) y para mantener la zona de trabajo (W) térmicamente aislada del entorno externo, donde dicho aparato (1, 100) también incluye preferiblemente un dispositivo de descongelación como una bomba de aire y un elemento de calentamiento inverso para descongelar la zona de trabajo (W) preferiblemente en ciclos preestablecidos.

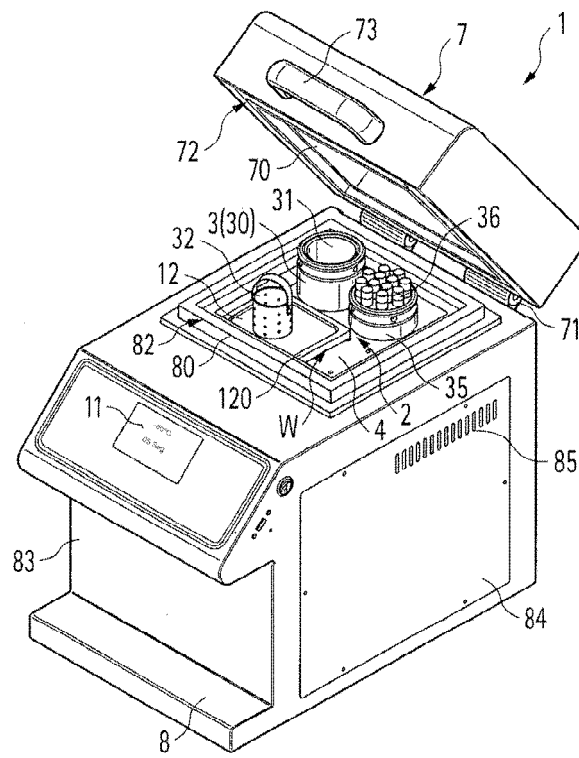


Fig. 1

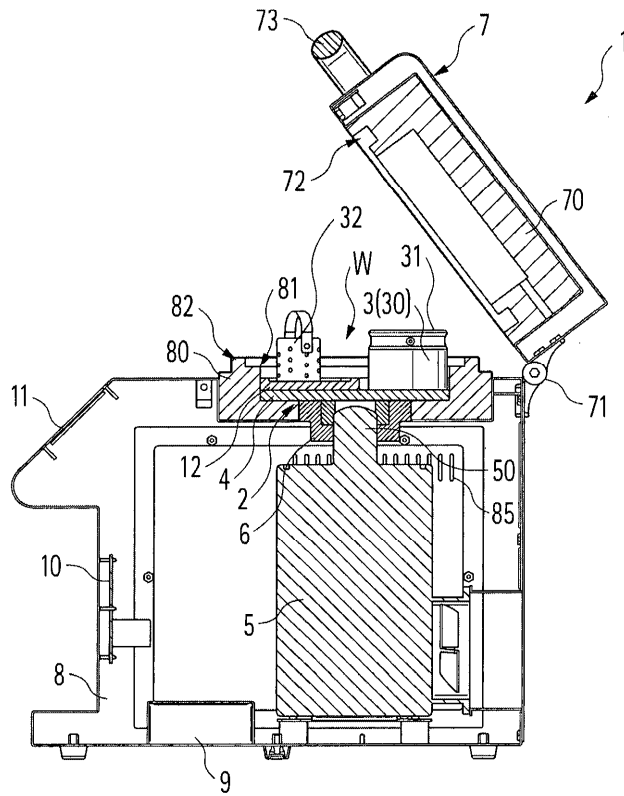


Fig. 2

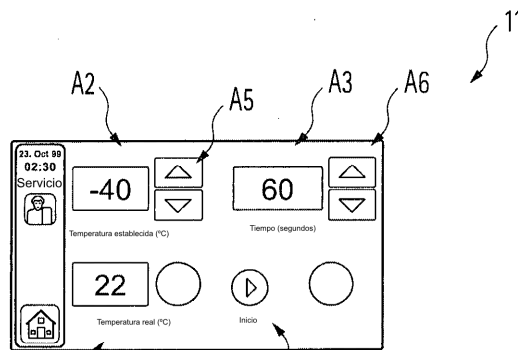


Fig. 4

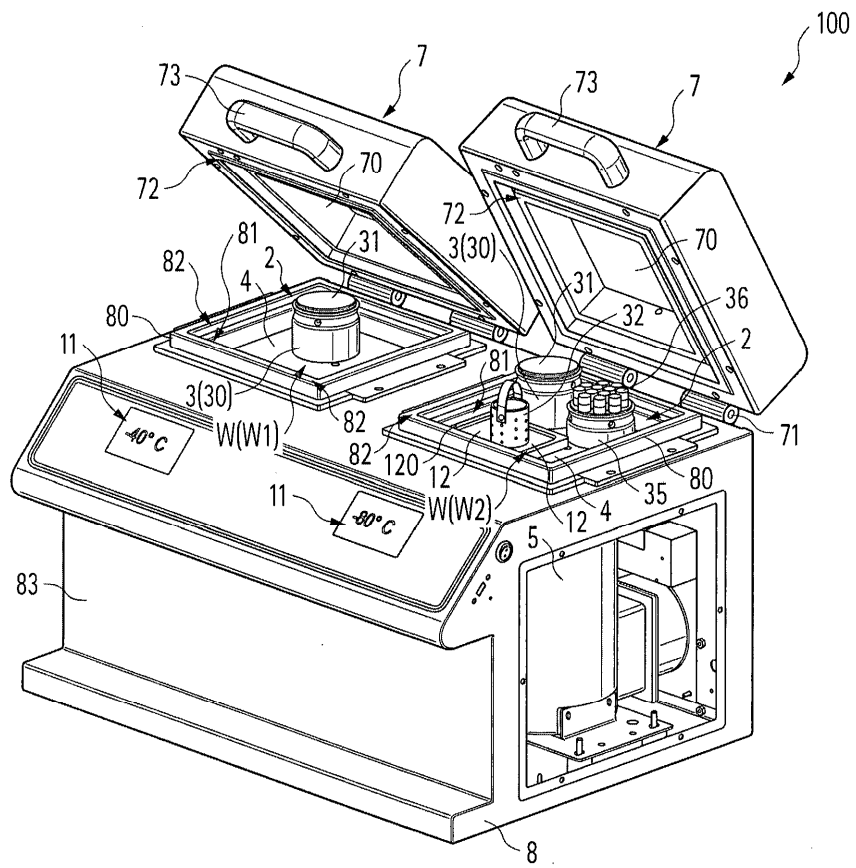


Fig. 3