

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 834

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A01N 1/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-445**
(22) Přihlášeno: **02.08.2017**
(40) Zveřejněno: **13.02.2019**
(Věstník č. 7/2019)
(47) Uděleno: **02.05.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **12.06.2019**
(Věstník č. 24/2019)

(56) Relevantní dokumenty:

US 2011196358 A; XY 055008217; WO 2014001819 A1; KR 101254950 B1; EP 181235 B1; EP 2156735 A1; EP 1774852 A2; DE 102004027792 A1.

(73) Majitel patentu:

Bioinova, s.r.o., Praha 4, Krč, CZ

(72) Původce:

Tomáš Groh, Ph.D., Ústí nad Labem, CZ
MUDr. Peter Bauer, Ph.D., Praha 12, Modřany, CZ

(74) Zástupce:

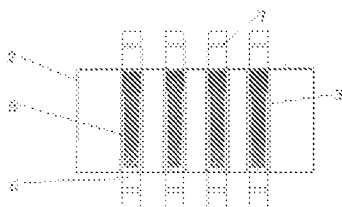
Ing. Jaroslav Potužník, U třetí baterie 1057/1,
162 00 Praha 6, Břevnov

(54) Název vynálezu:

**Způsob úpravy zmrazených vzorků
biologických materiálů a zařízení pro
provádění tohoto způsobu**

(57) Anotace:

Při způsobu úpravy zmrazených vzorků biologických materiálů pro dlouhodobé uchování, se zmrazený vzorek (8) v primárním obalu vloží do sekundárního obalu (6), který se nejméně polovinou své vnější plochy uvede do styku s chlazenou plochou (3) tělesa chladiče (2) mající teplotu nižší než je teplota okolí, provede se utěsnění sekundárního obalu (6), a zmrazený vzorek (8) v utěsněném sekundárním obalu (6) se odebere ze styku s chladičem (2). Zařízení na utěsňování sekundárního obalu (6) zahrnuje chladič (2), v jehož tělese je vytvořena alespoň jedna chlazená plocha (3), uzpůsobená pro uvedení do styku a přidržování alespoň jednoho sekundárního obalu (6) obsahujícího zmrazený vzorek (8) v primárním obalu, a dále zahrnuje přípravek (5) pro vytváření spoje (7) k utěsnění sekundárního obalu (6).



CZ 307834 B6

Způsob úpravy zmrazených vzorků biologických materiálů a zařízení pro provádění tohoto způsobu

5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu úpravy zmrazených vzorků biologických materiálů pro dlouhodobé uchování, při kterém se biologický materiál uložený v primárním obalu zmrazuje a poté se opatřuje sekundárním obalem. Dále se vynález týká zařízení na utěsňování sekundárního obalu pro dlouhodobé uchování zmrazených vzorků biologických materiálů.

Dosavadní stav techniky

15 Vzorky biologické povahy (buňky, tkáně, orgány, protilátky apod.) jsou pro dlouhodobé skladování kontrolované mrazeny na teplotu přibližně -60 až -80 °C a dlouhodobě uchovávány hluboce zmrazené, nejčastěji v tekutém dusíku či jeho parách, kde je teplota okolo -196 °C a pohyb molekul výrazně zpomalen.

20 Pro zamezení křížové kontaminace či bakteriální kontaminace vzorků se ve farmaceutickém průmyslu používají sekundární obaly kryozkumavek a jiných primárních obalů.

Například mesenchymální kmenové buňky (MSC) jsou často mrazeny spolu s objemově 7,5% dimethylsulfoxidem (DMSO). DMSO v mrazicím médiu chrání buňky před tvorbou nebezpečných krystalů a zvyšuje tak viabilitu buněk obsažených ve vzorku po rozmrazení. Zároveň je DMSO v kapalném stavu pro buňky toxické. Jak uvádí Xin Wang a kolektiv (Cryobiology, 2007), viabilita buněk při běžné teplotě okolí v roztoku obsahujícím DMSO klesá. Proto je nutné tuto fázi eliminovat na co možná nejkratší dobu. Je tedy výhodné aplikovat sekundární obal na kryozkumavky až v momentě, kdy je DMSO v pevném skupenství, tedy na vzorek zmrazený. Pro mrazení biologických vzorků může být alternativně použito také dalších médií s obsahem kryoprezervačních molekul jiných než DMSO, nicméně velmi často také cytotoxických při běžné teplotě okolí.

Optimalizované a kontrolované mrazení buněk zajišťují různá zařízení. Jsou to například: CoolCell[®] (Biocision), IceCube (SYLAB), Mr. Frosty[™] (Thermo Fisher Scientific). Tato zařízení nejsou kompatibilní s žádným běžně používaným sekundárním obalem kryozkumavek.

Proto je nutné aplikovat sekundární obal na kryozkumavku až po zamrazení vzorku na požadovanou teplotu. Nicméně jakákoliv manipulace s kryozkumavkou mimo mrazicí box výrazně zvyšuje teplotu vzorku, což přímo ovlivňuje jeho finální kvalitu. Výkyvy teplot akcelerují tvorbu nežádoucích krystalů a snižují viabilitu a kvalitu následně rozmražených buněk.

Způsob balení vzorků do termoplastického obalu popisuje patentová přihláška (US 4501108) z roku 1985. Obdobně také přístroj popsán v patentu US 2006/137824 popisuje krytí kryozkumavek termoplastickým filmem. Po zahřátí obalu dojde k jeho smrštění a zatažení.

V patentové přihlášce US 2008220507 je popsán proces vitrifikace a aplikace přidružených obalů vzorku ve formě plastických stébel.

50 Také patentová přihláška US 2011196358 popisuje proces vitrifikace oocytů, spermií a embryí v křemíkové mikrokapiláře obalené ochranným sekundárním obalem. Sekundární obal chrání vzorky před kontaminací z tekutého dusíku. Samotná vitrifikace probíhá přímo v sekundárním obalu a jeho zatažení probíhá po evaporaci tekutého dusíku. Nicméně v tomto případě hrozí riziko kontaminace právě v kroku mrazení vzorku.

55

Tato řešení, ač efektivní, vyžadují relativně složité technologické zázemí a specificky kvalifikovaný personál s ohledem na rizika spojená s manipulací v přímém kontaktu s tekutým dusíkem. Popsaná řešení nezohledňují možné výkyvy teplot v průběhu aplikace sekundárního obalu.

5

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje nový způsob úpravy zmrazených vzorků biologických materiálů, při kterém se biologický materiál uložený v primárním obalu zmrazuje a poté se opatřuje sekundárním obalem před uložením do nízkých teplot. Tento nový způsob udržuje vzorky v požadované teplotě a umožňuje aplikaci sekundárního obalu na již zmrazené vzorky v kryozkumavkách nebo v jiných primárních obalech. Vynález zamezuje nežádoucím fluktuacím teploty při aplikaci sekundárního obalu.

15

Způsob úpravy zmrazených vzorků podle vynálezu se provádí přímo v chladicí části zařízení na utěšňování sekundárního obalu podle vynálezu. Chladicí část zahrnuje chladič, který má alespoň jednu chlazenou plochu. Zmrazený vzorek v primárním obalu se vloží do sekundárního obalu, který se nejméně polovinou své vnější plochy (což odpovídá polovině délky v případě, že sekundární obal je trubice válcovitého tvaru) uvede do styku s chlazenou plochou tělesa chladiče mající teplotu nižší, než je teplota okolí, s výhodou -60 až -80 °C, provede se utěsnění sekundárního obalu a zmrazený vzorek v utěsněném sekundárním obalu se odebere ze styku s chladičem.

25 Sekundární obal, zachycený na obrázcích 2 a 3 jako průhledná část, může být z termoplastického materiálu, například polyethylenová trubice. Utěsnění sekundárního obalu se provádí vytvořením spojů, například zatavením jednoho nebo obou konců sekundárního obalu v místě, kde není ve styku s chlazenou plochou chladiče. Ve výhodném provedení zařízení podle vynálezu obsahuje tavicí lišty pro vytvoření spoje sekundárního obalu zatavením.

30

Ve výhodném provedení vynálezu je chladicí část tvořena chladičem, který má pasivně chlazené těleso vytvořené z materiálu schopného vychlazení na teplotu -60 až -80 °C, s tepelnou kapacitou dostatečnou pro uchování chladu alespoň po dobu nezbytnou k vytvoření spoje sekundárního obalu. Před vložením zmrazených vzorků se chladič uloží do mrazáku na nejméně 35 2 hodiny při teplotě -60 až -80 °C.

V jiných provedeních vynálezu má chladič pasivně chlazené těleso vytvořené z materiálu schopného vychlazení na teplotu nižší než -30 °C. Vychlazení pasivně chlazeného tělesa chladiče může být provedeno jiným než výše uvedeným postupem, v jiných časových a teplotních rozmezech, například za použití suchého ledu nebo tekutého dusíku a jeho par.

45 Chladič může být monolitický chladicí blok opatřený otvory, které vytvářejí chlazenou plochu pro styk s vkládanými vzorky, nebo ve výhodném provedení může chladič obsahovat alespoň dva oddělitelné díly pro snadnější vkládání vzorků. Spojení dílů může být zajištěno například panty, drážkami či hroty. Chladicí plocha chladiče pro styk se zmrazenými vzorky je s výhodou komplementární tvaru a velikosti použitého primárního obalu, například kryozkumavek. Výhodné provedení zařízení podle vynálezu zahrnuje množství otvorů pro vkládání vzorků, což umožňuje utěšňovat sekundární obaly většího počtu zmrazených vzorků současně, přičemž mezi chladičem a primárním obalem vzorku (například kryozkumavkou) je jen minimální prostor, což 50 umožňuje udržet požadovanou teplotu vzorku po nezbytně dlouhou dobu.

Pro výrobu tělesa chladiče je možné použít různé slitiny kovů, keramiku, gelovou náplň a jiné materiály s vysokou tepelnou kapacitou. Vnější povrch chladiče může být chráněn například 55 plastem, gumou či pěnovým materiálem pro lepší a bezpečnější manipulaci.

V dalších provedeních vynálezu je chladicí část tvořena aktivně chlazeným chladičem. Aktivní chlazení zajišťuje například mrazicí jednotka cirkulací chladicího média skrze kanálky uvnitř tělesa chladiče, přičemž tato jednotka může být součástí provedení.

- 5 Ve zvláště výhodných provedeních zařízení podle vynálezu obsahuje kromě komponent uvedených ve výše popsaných provedeních také další komponenty, jako například teplotní čidlo, časovač či zapisovací jednotku průběhu teploty. Zařízení podle vynálezu může zahrnovat i další komponenty, které nemění princip popisovaného způsobu řešení technického problému. Jedná se například o komponentu pro hlasové ovládání apod.

10

Zařízení podle vynálezu se s výhodou skládá z komponent, které je možné umístit do čistých prostor farmaceutické výroby léčivých přípravků. Všechny jeho části jsou jednoduše sanitovatelné. Čistitelnosti, dezinfikovatelnosti, zamezení zachycování nečistot a průniku nežádoucích částic se dosahuje použitím vhodných materiálů, povrchových úprav, postupů

15

Způsob a zařízení podle vynálezu je možné využít nejen pro vzorky biologické povahy, ale pro jakýkoli termolabilní materiál, který je třeba upravovat, například opatřovat obalem, při zajištění minimální fluktuace teploty.

20

Objasnění výkresů

25

Na připojených vyobrazeních jsou nákresy zařízení podle vynálezu a výsledky testování vynálezu.

Obrázky ilustrují:

30

obr. 1 schematické znázornění výhodného provedení zařízení podle vynálezu,

obr. 2 schematické znázornění chladiče vč. vzorků a sekundárního obalu,

obr. 3 schematické znázornění chladiče v podélném řezu vč. vzorků a sekundárního obalu,

35

obr. 4 diagram průběhu teplot vzorků při utěšňování sekundárního obalu za použití vynálezu a bez jeho použití.

Příklady uskutečnění vynálezu

40

Příklad 1: Kultivace a mrazení MSCs z kostní dřevě (BM–MSCs)

45

Kultivace buněk byla prováděna při teplotě $37 \pm 0,5$ °C. V průběhu kultivace buněk byla prováděna průběžná výměna kompletního kultivačního média s případným oplachem buněk pomocí 10 ml pufru PBS na jednu láhev o kultivační ploše 75 cm². Dle množství rostoucích buněk bylo prováděno jejich pasážování, tedy řízené enzymatické odloučení adhezujících buněk a jejich přenesení na větší kultivační plochu. Optimální pro růst kultury bylo dosažení 80 až 90 % pokrytí buněk kultivačního dna. Pro pasážování byl použit roztok enzymu TrypLE Select CTS.

50

Po trypsinizaci byla suspenze buněk promíchána jemným nasátím a vysátím z pipety a promyta pufrům PBS a centrifugována (230 g, 5 minut). Konečná peleta buněk byla resuspendována v pufru PBS a smíchána v poměru 1:1 s vychlazeným roztokem obsahujícím 10 % objemových lidského sérového albuminu, 15 % objemových DMSO a fyziologický roztok. Takto připravená směs byla řízeně zamrazená v kryozkumavkách Nunc™ (Thermo Fisher Scientific) o objemu

55

1,5 ml pomocí zařízení CoolCell® (Biocision) dle protokolu výrobce. Obsah mrazených

kmenových buněk byl zpravidla 5×10^5 až 1×10^7 MSCs/ml. Při postupu mrazení buněk byla přidána do každého zmrazeného vzorku 8 v primárním obalu, do kryozkumavky, teplotní sonda (termočlánek typu K). Teplota vzorků byla paralelně monitorována pomocí dataloggeru TM-947SD (Lutron). Vzorky 8 byly zamrazeny na teplotu -63 °C. Následně byly z mrazáku přeneseny a opatřeny sekundárním obalem 6 Cryoflex™ (Thermo Fisher Scientific) při běžné teplotě okolí (průběh 21 teploty vzorků při utěšňování sekundárního obalu bez použití vynálezu). Druhá skupina vzorků byla opatřena sekundárním obalem 6 za použití pasivně chlazeného kovového chladiče 2 dle vynálezu (průběh 22 teploty vzorků při utěšňování sekundárního obalu za použití vynálezu).

Výsledek šesti nezávislých měření pomocí šesti sond je zachycen na obrázku 4. Tento diagram zahrnuje tři černé křivky (průběh 22 teploty vzorků) zobrazující průměrné hodnoty teplot uvnitř vzorků 8 při aplikaci sekundárního obalu 6 za použití vynálezu. Šedé křivky (průběh 21 teploty vzorků) zobrazují průměrné hodnoty teplot uvnitř vzorků 8 při aplikaci sekundárního obalu 6 bez použití vynálezu.

Pro utěšňování sekundárního obalu 6 pro uchování zmrazených vzorků 8 biologických materiálů při provádění vynalezeného způsobu bylo vyvinuto zařízení, které zahrnuje chladič 2, v jehož tělese je vytvořena alespoň jedna chlazená plocha 3, uzpůsobená pro uvedení do styku a přidržování alespoň jednoho sekundárního obalu 6 obsahujícího zmrazený vzorek 3 v primárním obalu, a dále zahrnuje přípravek 5 pro vytváření spoje 7 k utěsnění sekundárního obalu 6.

Dvoudílný chladič 2, který byl použit v tomto příkladu provedení vynálezu, měl celkové rozměry $250 \times 60 \times 50$ mm (d x v x š) a byl vysoustružený z ploché ocelové tyče tažené za studena (EN 10278, úchylka h11, rozměr 50x30; Feron). Velikost vysoustružených otvorů, chlazených ploch 3 pro uložení zmrazených vzorků 8 v primárních obalech, v kryozkumavkách, chráněných sekundárním obalem 6, byla 15 mm.

Dvoudílný chladič 2 podle příkladu provedení má čtyři chlazené plochy 3. Utěsnění sekundárního obalu 6 se provádí zatavením obou konců sekundárního obalu 6 v místě, kde není ve styku s chlazenou plochou 3, to znamená v místech kde jsou po zatavení vytvořeny spoje 7 k utěsnění sekundárního obalu 6, jak je nejlépe vidět na obr. 3.

Použití chladiče 2 dle vynálezu při aplikaci sekundárního obalu 6 zamezilo prudkému nárůstu teploty uvnitř vzorku 8. Naopak u vzorků, kde vynálezu použito nebylo, došlo ke skokovému nárůstu teploty. Po opatření vzorků 8 sekundárním obalem 6 byly všechny zmrazené vzorky 8 uloženy do -196 °C (viz obrázek 4).

Příklad 2: Porovnání kvality mrazených buněk

Buňky byly připraveny dle příkladu 1 a mrazeny na teplotu -63 °C. Celkem bylo připraveno osm vzorků. Paralelně byly zamrazeny dva sady po čtyřech zmrazených vzorcích 8 v primárních obalech, ve zkumavkách. Jeden set vzorků byl z mrazáku přenesen a jednotlivé vzorky 8 opatřeny sekundárním obalem 6 při běžné teplotě okolí (set A). Druhý set (set B) vzorků 8 byl opatřen sekundárním obalem 6 za použití pasivně chlazeného kovového chladiče 2 dle vynálezu. Právě opatření sekundárním obalem 6 za použití chladiče 2 dle vynálezu zamezilo prudkému nárůstu teploty uvnitř vzorku 8 (viz příklad 1). Po opatření vzorků 8 sekundárním obalem 6 byly všechny vzorky 8 uloženy do Dewarovy nádoby s tekutým dusíkem o teplotě -196 °C. Po nejméně 48 hodinovém uskladnění vzorků při konstantní teplotě -196 °C byly vzorky 8 rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Suspenze buněk byla dále analyzována pomocí průtokové cytometrie a také následnou kultivací buněk.

100 μ l suspenze buněk bylo smícháno s 5 μ l propidium jodidu a kultivováno chráněně před světlem po dobu 10 minut. Následně byla směs analyzována pomocí průtokového cytometru FACSCanto II (Beckton Dickinson). Procento buněk, které jsou negativní při barvení propidium

jodidem, je vyjádřeno v tabulce č. 1. Viabilita stanovená barvením propidium jodidem odráží životaschopnost jednotlivých buněk v suspenzi. Propidium jodid je látka, která neprostupuje membránou živých buněk. U poškozených a neživotaschopných buněk se propidium jodid váže na DNA a buňky jsou vyhodnoceny jako pozitivní.

5

Tabulka č. 1, životaschopnost rozmrazených buněk

Set A	% živých (propidium jodid negativních) buněk	Set B	% živých (propidium jodid negativních) buněk
I.	74,6	I.	87,1
II.	76,7	II.	86,3
III.	77,9	III.	85,3
IV.	78,4	IV.	85,1
průměr	76,9	průměr	86,0
směrodatná odchylka	1,5	směrodatná odchylka	0,8

10

Z uvedených výsledků vyplývá, že životaschopnost rozmrazených buněk obsažených ve vzorcích 8, které byly opatřeny sekundárním obalem 6 za použití vynálezu, je průměrně o 9,1 % vyšší než při úpravě vzorků 8 bez použití vynálezu (76,9 % vs. 86,0 %).

15

Výsledky z následné kultivace buněk po rozmražení všech vzorků 8 jsou shrnuty v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2, adheované buňky po rozmražení

Set A	počet adheovaných buněk	Set B	počet adheovaných buněk
I.	143000	I.	171000
II.	143500	II.	144000
III.	109500	III.	146000
IV.	127500	IV.	153000
průměr	130875	průměr	153500
směrodatná odchylka	13917	směrodatná odchylka	10642

20

Adherence na kultivační plastik je základní vitální vlastností použitých mesenchymálních kmenových buněk. Po rozmražení byla část suspenze testovaných buněk nasazena na kultivační lahve o ploše 25 cm². Po 24 hodinové kultivaci byla buněčná kultura enzymaticky odloučena a suspenze buněk analyzována automatickou počítačkou buněk Luna II™ (Logos Biosystems).
 25 Výsledné počty shrnuté v tabulce č. 2 ukazují převahu množství adherentních buněk zamrazených postupem využívajícím vynález (průměrně o 22625 více adheovaných buněk). Tato metoda se shoduje s trendem měření uvedeným v tabulce č. 1.

30

Z uvedených výsledků vyplývá, že kvalita vzorků 8 (viabilita a schopnost adherence následně rozmrazených buněk) je přímo ovlivněna způsobem úpravy zmrazených vzorků 8. Popisovaný vynález zvýšil kvalitu vzorků 8 o přibližně 15 %.

Průmyslová využitelnost

5 Způsob úpravy zmrazených vzorků podle vynálezu a popsané zařízení na provádění tohoto způsobu mohou být využity zejména tam, kde je vyžadována trvale nízká teplota zmrazených vzorků a kde, byť jen krátká manipulace se vzorky například při běžné teplotě okolí, nebo při vyšších teplotách spojených s úpravou vzorků, může způsobit významné zhoršení jeho kvality, například snížení následné viability buněk po rozmražení.

10 Předložený vynález není omezen na zde popsaná konkrétní provedení, ale může být využit i k jiným účelům, v jiných odvětvích průmyslu.

15 Způsob a zařízení podle vynálezu poskytují levné, jednoduché, pro personál bezpečné a účinné řešení výše popsaného technického problému.

PATENTOVÉ NÁROKY

20 1. Způsob úpravy zmrazených vzorků (8) biologických materiálů pro dlouhodobé uchování, při kterém se biologický materiál uložený v primárním obalu zmrazuje a zmrazený vzorek (8) v primárním obalu se poté opatřuje sekundárním obalem (6), **vyznačující se tím**, že zmrazený vzorek (8) v primárním obalu se vloží do sekundárního obalu (6), který se nejméně polovinou své vnější plochy uvede do styku s chlazenou plochou (3) tělesa chladiče (2) mající teplotu nižší než je teplota okolí, provede se utěsnění sekundárního obalu (6), a zmrazený vzorek (8) v utěsněném sekundárním obalu (6) se odebere ze styku s chladičem (2).

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že sekundární obal (6) je z termoplastického materiálu.

30 3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že utěsnění sekundárního obalu (6) se provádí zatavením.

35 4. Způsob podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že sekundární obal (6) má tvar trubice, přičemž při uvedení do styku s chlazenou plochou (3) se nejméně polovinou své délky uvede do styku s komplementárně vytvořenou chlazenou plochou (3).

40 5. Způsob podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že utěsnění sekundárního obalu (6) se provádí zatavením jednoho nebo obou konců sekundárního obalu (6) v místě nacházejícím se mimo styk s chlazenou plochou (3).

45 6. Způsob podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že těleso chladiče (2) se ochlazuje na teplotu nižší, než je teplota okolí, pasivně, umístěním do prostředí nízké teploty po dobu dostatečnou k vychlazení tělesa chladiče (2).

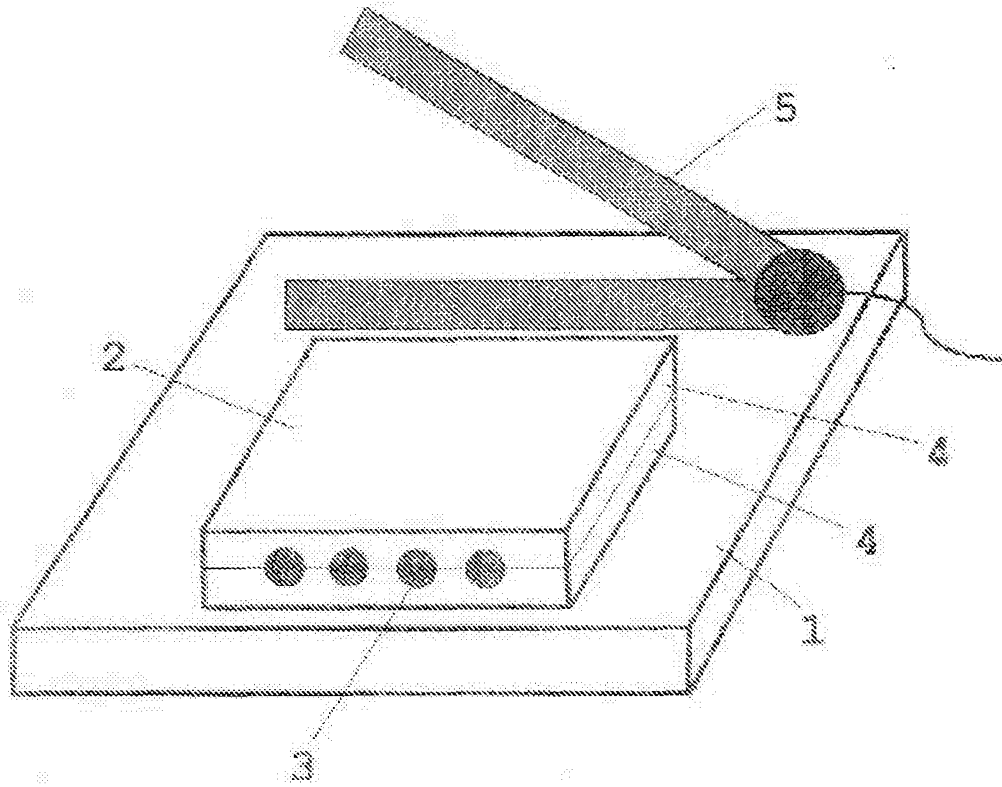
7. Způsob podle některého z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že těleso chladiče (2) se ochlazuje na teplotu nižší, než je teplota okolí, aktivně, cirkulační chladičím médiem skrze kanálky uvnitř tělesa chladiče (2).

50 8. Způsob podle některého z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že předtím, než se sekundární obal (6) uvede do styku s chlazenou plochou (3), se těleso chladiče (2) ochlazuje na teplotu nižší než $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, s výhodou na teplotu -60 až $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

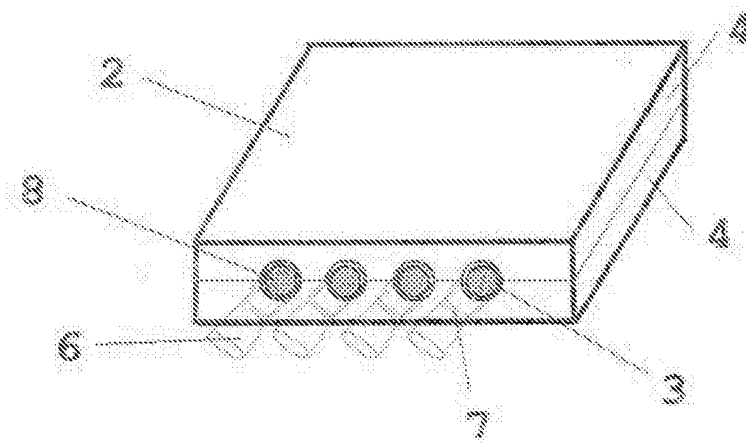
9. Způsob podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že při utěsňování sekundárního obalu (6) je zmrazený vzorek (8) se sekundárním obalem (6) přidržován pouze chlazenou plochou (3) a po utěsnění sekundárního obalu (6) se od chlazené plochy (3) uvolní.
- 5 10. Zařízení pro provádění způsobu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že zahrnuje chladič (2), v jehož tělese je vytvořena alespoň jedna chlazená plocha (3), uzpůsobená pro uvedení do styku s nejméně polovinou vnější plochy alespoň jednoho sekundárního obalu (6) obsahujícího zmrazený vzorek (8) v primárním obalu a pro přidržování tohoto sekundárního obalu (6), a dále zahrnuje 10 přípravek (5) pro vytváření spoje (7) k utěsnění sekundárního obalu (6).
11. Zařízení podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že uvnitř tělesa chladiče (2) jsou kanálky pro cirkulaci chladicího média, přičemž zařízení dále zahrnuje mrazicí jednotku uspořádanou pro chlazení cirkulujícího chladicího média.
- 15 12. Zařízení podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že chladič (2) má pasivně chlazené těleso vytvořené z materiálu schopného vychlazení na teplotu nižší než $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, s výhodou na teplotu -60 až $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, s tepelnou kapacitou dostatečnou pro uchování chladu alespoň po dobu nezbytnou k vytvoření spoje (7) k utěsnění sekundárního obalu (6).
- 20 13. Zařízení podle některého z nároků 10 až 12, **vyznačující se tím**, že těleso chladiče (2) zahrnuje jeden monolitický blok opatřený uvedenou alespoň jednou chlazenou plochou (3), nebo zahrnuje alespoň dva oddělitelné díly (4), mezi nimiž je uvedená alespoň jedna chlazená plocha (3) uzavřena.
- 25 14. Zařízení podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že těleso chladiče (2) zahrnuje dva oddělitelné díly (4), které jsou otočně nebo tvarově oddělitelně spojeny.
15. Zařízení podle nároku 13 nebo 14, **vyznačující se tím**, že těleso chladiče (2) zahrnuje dva oddělitelné díly (4), mezi nimiž je uzavřena více než jedna chlazená plocha (3) komplementárně 30 uzpůsobená pro více než jeden sekundární obal (6) tvaru trubice obsahující zmrazený vzorek (8) v kryozkumavce válcovitého tvaru.
16. Zařízení podle nároku 13 nebo 14, **vyznačující se tím**, že těleso chladiče (2) zahrnuje dva oddělitelné díly (4), mezi nimiž je uzavřena více než jedna chlazená plocha (3) komplementárně 35 uzpůsobená pro více než jeden sekundární obal (6) tvaru trubice obsahující zmrazený vzorek (8) v kryozkumavce kónického tvaru.
17. Zařízení podle některého z nároků 10 až 16, **vyznačující se tím**, že těleso chladiče (2) je 40 vyrobeno z kovu nebo kovové slitiny, přičemž vnější povrch tělesa chladiče (2) je s výhodou potažen ochranným povlakem, s výhodou plastem.
18. Zařízení podle některého z nároků 10 až 17, **vyznačující se tím**, že přípravek (5) pro 45 vytváření spoje (7) k utěsnění sekundárního obalu (6) je tavicí lišta pro vytváření spojů zatavením.

Seznam vztahových značek

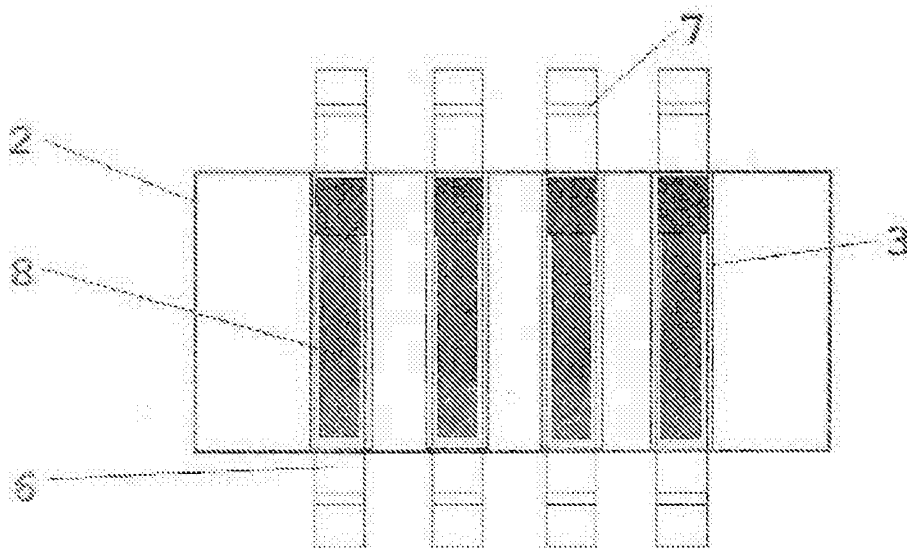
- 1 podstavec
- 2 chladič
- 3 chlazená plocha
- 4 oddělitelný díl
- 5 přípravek pro vytváření spoje sekundárního obalu
- 6 sekundární obal
- 7 spoj k utěsnění sekundárního obalu
- 8 zmrazený vzorek v primárním obalu
- 21 průběh teploty vzorku při utěsňování sekundárního obalu bez použití vynálezu
- 22 průběh teploty vzorku při utěsňování sekundárního obalu za použití vynálezu



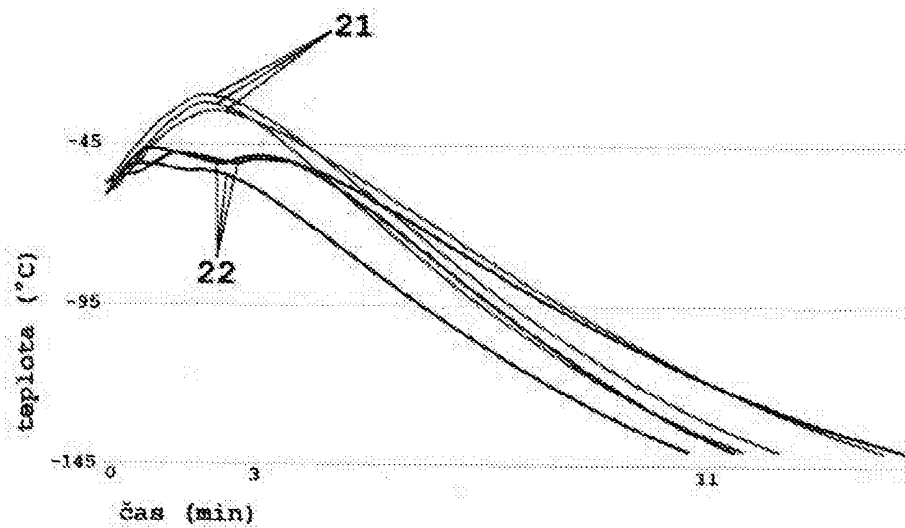
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4