

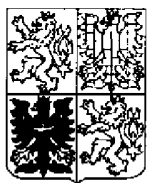
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 5

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24.03.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **08.07.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19729028**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **15.11.2000**
(Věstník č. 11/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/DE98/00864**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/02958**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

G 01 N 1/28

C 12 M 3/08

(71) Přihlašovatel:

FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E. V., München, DE;

(72) Původce:

Dobler Hannes, Leonberg, DE;
Kuhn Claus, Dürmau, DE;
Lindner Hans, Stuttgart, DE;
Kiesewetter Stefan, Ostfildern, DE;
Bernhagen Jürgen, Tübingen, DE;
Tolle Gabriele, Ludwigsburg, DE;
Tovar Günter, Stuttgart, DE;

(74) Zástupce:

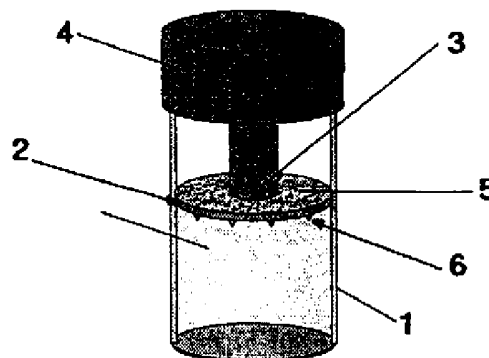
Smola Josef Ing., Mendlovo nám. 1a, Brno, 60300;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Zařízení a způsob izolování materiálu
obsahujícího buňky ze svazku tkání a/nebo z
kapaliny**

(57) Anotace:

Zařízení sestává z nádoby (1) s otevřenou horní stranou, do které je možno uložit materiál obsahující buňky, jako je svazek tkání nebo kapalina. Zařízení obsahuje oddělovací zařízení tvaru razníku obsahujícího plochý oddělovací kotouč (2), jehož kruhový okraj vodotěsně dosedá na vnitřní stěnu nádoby a je opatřen alespoň jedním průchodem, který je překryt filtrační membránou (5). Oddělovací zařízení se do nádoby (1) zakládá tak, že stlačuje uvedený materiál obsahující buňky spolu se svazkem tkání a/nebo s kapalinou a aktivuje jej otáčivými pohyby, jimiž se vyvozují střizné síly. Buňky a/nebo jejich obaly procházejí póry filtru tvořeného filtrační membránou (5), zatím co zbytky tkáně zůstávají zadrženy v nádobce (1).





Zařízení a způsob izolování materiálu obsahujícího buňky ze svazku tkání a/nebo z kapaliny

Oblast techniky

Vynález se týká zařízení a způsobu izolování materiálu obsahujícího buňky ze svazku tkání a/nebo z kapaliny.

Dosavadní stav techniky

Při lékařské diagnóze chorob, jakož i při vědeckém výzkumu zejména v oblasti biomedicíny, se provádí analýza jednotlivých buněk nebo svazků buněk. Předpokladem možné analýzy buněk je jejich izolace ze svazku tkání popřípadě z kapalin, v nichž se jednotlivé buňky nacházejí v přirozené formě. V mnoha případech se buňky určené pro vyšetření odebírají z biologické měkké tkáně, například ze sleziny, z jater, avšak také z tvrdší tkáně, například z pokožky nebo z vlasů. Často se také buňky izolují z kapaliny při vyšetřování krve nebo moče, u nichž se například zjišťuje přítomnost původce nemoci. Taková vyšetření se provádějí také u tělesných výměšků, výtěrů nebo jiných tělesných kapalin obsahujících buňky, které je však třeba z jednotlivých svazků tkání popřípadě z příslušných kapalin izolovat stejně, jako ve výše zmíněných případech.

V současné době však nejsou známy žádné standardní způsoby izolace buněk. Izolace se dosud převážně provádí manuálním oddělováním jednotlivých buněk nebo jejich konglomerátů ze svazků tkáně a/nebo z kapalin, takže extrakce buněk nebo jejich konglomerátů ze tkáně, například ze sleziny, se provádí různými individuálně vyvinutými a zručnosti příslušné prováděcí osoby přizpůsobenými manuálními metodami. Časem se tak vyvinuly různé techniky izolace buněk, které se v každé laboratoři provozovaly jinak. V příslušné odborné literatuře také nejsou uvedeny žádné pracovní postupy, z nichž by bylo možno získat znalosti o všeobecně



platných nebo dokonce normalizovaných způsobech univerzálního provádění izolace buněk.

Pro výrobu suspenze obsahující jednotlivé buňky za účelem vyšetření určitého typu buňky je třeba provést několik za sebou následujících pracovních postupů, které se až do této doby provádějí výhradně manuálně.

Pro provedení analýzy buněk, které se vyskytují ve svazku tkání, musí být nejdříve kousek tkáně, například ze sleziny nebo z jater, oddělen v potřebné velikosti. Odebraný vzorek se obvykle dává do prostředí, které se spolu se vzorkem ukládá do petrifikační misky. Nato se vzorek tkáně, nacházející se v tomto prostředí, pomocí vhodných nástrojů mechanicky roztlačí a zmenší, takže buňky, které se mají analyzovat, se ze tkáně mohou lépe vyloučit. Buňky, popřípadě konglomeráty obsahující buňky, které se v uvedeném prostředí obohacují a jsou odloučeny z jednotlivých malých částí tkáně, jater popřípadě z konglomerátů, se pak odebírají z prostředí, které se nachází v petrifikační misce. Tento postup oddělování se obvykle provádí pomocí pipety, jejíž otvor se však může snadno ucpat oddělenými menšími kousky tkáně. Při pipetování buněčné suspenze je proto třeba, aby provádějící pracovník měl zvláštní řemeslnou zručnost, neboť izolované buňky se vyskytují společně s kousky tkáně v prostředí získaném oddělováním buněk při mechanickém zmenšování kousků tkáně. Pipetováním získaná suspenze buněk se znovu zavádí do nádoby, ve které se mohou usazovat malé kousky tkáně odebrané s buňkami, proto, že mají větší hmotnost. Nato se znovu opakuje výše uvedený způsob pipetizace, jíž je možno získat suspenzi obohacenou buňkami. Podle druhu, velikosti a podílu malých kousků oddělené tkáně, obsažených v suspenzi, je třeba častěji opakovat dělicí proces spočívající na sedimentaci. Tento proces je také možno provádět použitím odstředivky.



Za účelem dělení svazků buněk na jednotlivé buňky se suspenze obohacená buňkovým materiálem několikrát pipetizuje tak, aby v suspenzi zůstalo pokud možno co nejvíce buněk v izolovaném stavu. Takto z jednotlivých izolovaných buněk ze svazků tkáně získaná suspenze se obvykle zavádí do další nádoby, do které se například přidává chlorid amonný pro odstranění červených krvinek.

Výše popsany způsob izolace buněk, například z kousků tkáně jako jsou játra, ukázal, že je třeba provádět větší počet za sebou následujících oddělovacích řezů pro získání jednotlivých izolovaných buněk. Nicméně, při jednotlivých dělicích řezech vzniká určitý odpad, například suspenzačních kapalin potřebných pro nástroje užívané pro oddělování, jako jsou hroty pipet, popřípadě oddělovací zařízení a příslušné používané nádoby.

Pro snížení nákladů na práce spojené s oddělováním buněk se v mnohých laboratořích, například v diagnostických PCR-laboratořích, neprovádí specifická výroba suspenzí obsahujících jednotlivé buňky a místo toho se otevírá celý svazek tkáně. Tento postup sice může být spojen s úsporou času, má však tu nevýhodu, že při něm vznikají nejednotné homogenizáty s velkým počtem typů buněk, úlomků tkáně a často také s látkami, které představují zábranu pro následnou analýzu.

Podstata vynálezu

Úkolem vynálezu je proto vytvořit zařízení a způsob pro izolování buňkového materiálu ze svazku tkání a/nebo z kapaliny tak, aby se snížil počet manuálních úkonů, které je třeba provést, a aby bylo možno dalekosáhle normalizovat provádění izolace buněk tak, aby bylo možno dosáhnout spolehlivé reprodukovatelnosti výsledků analýz buněk spojených s jejich izolováním. Navíc má být novým řešením redukován odpad spojený s každým jednotlivým oddělovacím procesem, jako jsou například

Řešení úkolu, které je podkladem tohoto vynálezu, je uvedeno v nároku 1, ve kterém je popsáno zařízení podle vynálezu. V nároku 14 je popsán způsob izolování buňkového materiálu podle vynálezu ze svazku tkání a/nebo z kapaliny. Znaky, vytvořené podle myšlenky vynálezu, jsou předmětem závislých nároků.

Podstatou řešení podle vynálezu je myšlenka vytvořit soustavu nosných zkušebních vzorků, která by integrovala všechny funkce izolování buněk ze tkáně a/nebo z kapaliny, do které lze zavádět buňkový materiál, který se má izolovat ze svazku tkání a/nebo z kapaliny. Dále je zde uspořádáno oddělovací zařízení tvaru razníku, u něhož je uspořádán plošný oddělovací kotouč, jehož obvodový okraj vodotěsně dosedá na vnitřní stěny nádržky a je opatřen alespoň jedním propouštěcím, filtrační membránou překrytým otvorem. Dělicí zařízení může být do nádržky zaváděno shora tak, že oddělovací kotouč působí tlakem na buňkový materiál včetně svazku tkáně a/nebo kapaliny a otáčením na něj působí střižnými silami. Přitom je oddělovací kotouč vytvořen tak, že je na své dolní straně s výhodou opatřen třecími prvky, čímž se buňkový materiál při otáčení oddělovacího kotouče v nádržce rozděluje na menší kousky.

Pomocí zařízení podle vynálezu, po odnětí vzorku například u lékaře, je možno zavádět do nádržky podle vynálezu činidla potřebná pro přepravu. Odpovídající velikostí nádržky může tak současně být stanovena velikost vzorku tkáně, takže je možno tímto způsobem pomocí značek, provedených na nádobce, naznačit lékaři, jaký objem tkáně je zapotřebí pro příslušné vyšetření. Toto opatření má na zřeteli také požadavek standardizace vyšetřování takových tkání.

Když vzorek tkáně v uzavřené nádobce dojde do laboratoře pro analýzu, mohou být v laboratoři použita odpovídající reagenční činidla pro následující oddělovací proces. Pro izolování buněk slouží razídlkové oddělovací zařízení, které se shora zavádí do dutiny nádoby. Podle vynálezu je oddělovací zařízení opatřeno oddělovacím kotoučem, který dosedá na vnitřní stranu nádoby a prostřednictvím ovládacího tělesa je směrem dolů svisle zasouvateľný do nádoby. Oddělovací kotouč je přitom opatřen průchozími otvory, které jsou přidavně potaženy filtrační membránou. Filtrační membrána je opatřena otvory, které odpovídají velikosti buněk, popřípadě velikosti svazku buněk, které se mají izolovat. Spuštěním oddělovacího zařízení do prostoru nádoby ve směru k vzorku tkáně obsaženému v roztoku, je možno dosáhnout toho, že se roztok, jakož i buňky vyloučené ze vzorku tkáně, popřípadě svazky buněk, dostanou přes filtrační membránu do horní oblasti nádoby. Tímto způsobem se v nádobce vytvoří dvě prostorové oblasti, navzájem od sebe oddělené oddělovacím kotoučem. Pod oddělovacím kotoučem je kousek tkáně, nacházející se v roztoku, a naproti tomu se nad oddělovacím kotoučem nachází suspenze izolovaných buněk, popřípadě svazků buněk.

Je výhodné, jsou-li na dolní straně oddělovacího kotouče uspořádány třecí prvky tvaru hrotů, popřípadě hranatých výstupků, které po spuštění a otáčení oddělovacího kotouče vzorek tkáně zpravidla roztrhají, takže buňky, obsažené ve vzorku tkáně, popřípadě svazky buněk, vlastně vytvoří suspenzi, která v této formě může pronikat filtrační membránou, uspořádanou v horní části nádoby.

Pomocí ovládacího vřetena, které je vytvořeno na oddělovacím kotouči jako centrální držák nebo jako dutý váleček, který svým obvodovým okrajem uzavírá oddělovací kotouč, může tento kotouč být kontrolovaně spouštěn do



nádobky a uváděn do otáčivého pohybu, čímž je možno vyvozovat na vzorky tkáně, obsažené v roztoku, potřebné tlakové a střížné síly. S podporou třecích prvků uspořádaných na oddělovacím kotouči, je tak možno provádět vysoce účinné oddělování buněk, popřípadě svazků buněk, které se mají ze vzorku tkáně izolovat.

Prostorovým oddělením buněk a svazků buněk obsažených v suspenzi od kousků tkáně, které se nacházejí pod oddělovacím kotoučem, je možno pomocí běžných pipet odebrat suspenzi buněk, nacházející se nad oddělovacím kotoučem nádoby, aniž by docházelo k tomu, že malé kousky tkáně ucpou otvor pipety. Po odběru suspenze buněk pipetováním, popřípadě po dekantaci, je možno zbytek hmoty tkáně nacházející se pod oddělovacím kotoučem a reagentie včetně nádoby odstranit a vyčistit.

Zařízení podle vynálezu tak umožňuje vytvoření soustavy nosiče vzorku a izolace buněk, která je přes vysoké požadavky na sterilitu vhodná jak pro získávání vzorků tkáně, přepravu do zkušební laboratoře, pro celý izolační proces, tak i pro následující závěrečný proces likvidace a čištění. Tím, že je možno předem stanovit vhodný objem nádoby, je možno lépe normalizovat analýzy tkání, takže výsledky analýz jsou spolehlivěji reprodukovatelné.

Pomocí oddělovacího zařízení podle vynálezu je na jedné straně možno značně zvýšit rychlost procesu izolování buněk a na druhé straně snížit náročnost manuálního provádění izolace buněk. Vzhledem k tomu, že celý proces izolování se provádí v téže nádobce, mohou na minimum být snížena rizika spojená s křížovou kontaminací s jinými vzorky, osobami nebo předměty.

Je výhodné, je-li ovládací vřeteno oddělovacího zařízení obsluhováno jak manuálně, tak i automaticky. Kromě možnosti oddělitelného upevnění ovládacího vřetena na uzavíracím víku nádoby, jakož i na realizaci

jednoduchého manuálního ovládacího oddělovacího zařízení, může ovládací vřeteno také být opatřeno přírubou umožňující automatické ovládání pomocí vhodného zařízení, například pomocí ramena robotu. Pomocí pohybového automatu je možné použitím této nosné soustavy vzorků izolovat buňky zcela automaticky. Tím se také přibližuje cíl vynálezu, jímž je standardní metoda izolování buněk s jejich vysokou reprodukovatelností.

Se zřetelem ke zvyšujícím se nárokům na ochranu životního prostředí také soustava nosiče vzorku podle vynálezu přispívá k tomu, že se použitím jediné nádoby minimalizují odpadní produkty.

Přehled obrázků na výkresech

Příkladné provedení vynálezu je znázorněno na připojených výkresech, kde na obr. 1 je znázorněna konstrukce nosiče vzorku a na obr. 2 je znázorněno postupné použití tohoto nosiče vzorku.

Příklady provedení vynálezu a průmyslové využití

Nosná soustava vzorku sestává z válcovité nádoby 1, která stejně jako kalíšek je nahoře opatřena otvorem. Horním otvorem nádoby 1, který je ve znázorněném příkladu opatřen šroubovacím uzavíracím víkem 4, je zakládátné oddělovací zařízení sestávající z oddělovacího kotouče 2 a z ovládacího dříku 3. Ovládací dřík je centricky uspořádán na oddělovacím kotouči 2 a je s ním pevně spojen. Na druhé straně je ovládací dřík 3 oddělitelně pevně spojitelný se šroubovacím uzavíracím víkem 4, které vodotěsně uzavírá nádobu 1. Je výhodné, je-li na horní ploše uzavíracího víka 4 uspořádána přepážka, umožňující propíchnutí dutou pipetovací jehlou pro odběr buňkové suspenze.

Prostřednictvím ovládacího dříku 3 mohou být na oddělovací kotouč 2 přenášeny cílené silové momenty tak, že se ovládací dřík 3 otáčí okolo své

osy a/nebo se posouvá ve svislém směru. Zejména je vhodné na horní část ovládacího dříku 3 napojit adaptér, popřípadě přírubu pro ovládání pomocí automatických ovládacích zařízení, jako jsou například ramena robotů (což není znázorněno na obr. 1). Oddělovací kotouč 2 je na svém prstencovitém povrchu opatřen propustnými otvory, které jsou překryty filtrační membránou 5. Velikost těchto pórů filtrační membrány 5 je závislá na velikosti výchozí tkáně a velikosti buněk a pro vyšetřování jaterných buněk činí asi 100 m.

Na dolní části oddělovacího kotouče jsou uspořádány třecí prvky 6, které jsou u znázorněného provedení vytvořeny jako zahrocené okraje. Tyto třecí prvky 6 se při odpovídajícím snížení oddělovacího zařízení zavrtávají do kousku tkáně, který se nachází pod oddělovacím kotoučem 2 (není znázorněno na obr. 1) a zmenšují materiál tkáně tak, že jsou buňky obsažené ve tkáni a konglomeráty buněk jsou z nich přednostně uvolnitelné.

Nádobka znázorněná na obr. 1 je vyrobena z plastu, který lze snadno sterilizovat a je průhledný, aby bylo možno pozorovat oddělovací proces, k němuž dochází ve vnitřním prostoru.

Pokud jde o geometrii ovládacího dříku 3 znázorněného na obr. 1, může tento ovládací dřík 3 být alternativně proveden jako dutý válec připojený k vnějšímu okraji oddělovacího kotouče 2. Při takovém provedení ovládacího dříku je pro oddělovací proces využitelná celá plocha oddělovacího kotouče 2, tedy i ta, která u znázorněného příkladného provedení je překryta na oddělovacím kotouči 2 centricky uspořádaným ovládacím dříkem 3, čímž i tato část může splňovat funkci filtru.

Na obr. 2 je znázorněn výhodný způsob provádění izolace buněk podle vynálezu. Na prvním obrázku je znázorněno uložení kousků tkáně G, jejíž analýzu je třeba provést, do nádobky 1. Nato se do nádobky 1 přidává



kapalina pro uvolňování buněk, popřípadě svazků buněk nacházejících se v materiálu tkáně, například roztok solanky a/nebo roztok chloridu amonného pro odstranění červených krvinek.

V druhé fázi se vzorek tkáně, uložený do nádoby 1 včetně roztoku, uzavře vodotěsným víkem 4, čímž je nádoba 1 připravena k přepravě do laboratoře.

Do nádoby 1 je také možno přidávat další činidla. Přitom je třeba buď sejmout s nádoby 1 vodotěsné víko 4 a jako u třetího znázorněného postupu se pomocí pipetovacího zařízení 7 mohou zavést do prostoru nádoby 1 vhodná další činidla. Alternativně může být závěrné vodotěsné víko 4 opatřeno přepážkou, kterou je možno propíchnout dutou jehlou, již je možno do dutiny nádoby 1 zavést kapalinu, aniž by došlo ke kontaminaci obsahu nějakými zárodky.

Ve čtvrté fázi se oddělovací zařízení buď ručně nebo automaticky pomocí ramena robotu stlačí dolů do nádoby 1 a současně se uvádí do rotace, čímž se kousky tkáně, které se nacházejí na dně nádoby 1, namáhají na tlak a působením střížných sil se zmenšují. V důsledku toho, že vnější obvod oddělovacího kotouče 2 vodotěsně dosedá na vnitřní stěnu nádoby 1, tekutina nacházející se v nádobce 1, jakož i buňky, popřípadě konglomeráty buněk, vyloučené z tkáně, vystupují do horní části nádoby 1 výlučně přes filtrační membránu 5, uspořádanou na oddělovacím kotouči 2.

V páté fázi se suspenze buněk, nacházející se nad oddělovacím kotoučem 2, odpipetovává. Přitom není nebezpečí ucpání otvoru pipety kousky tkáně, neboť filtrační membránou nemohou pronikat žádné makroskopické částice tkáně.

V závěrečné šesté fázi analýzy nádobka 1, včetně oddělovacího zařízení i s materiálem tkáně, který v ní zůstal jako nepotřebný, představuje odpad.

.

.

.

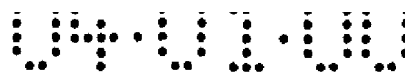
.



PATENTOVÉ NÁROKY

(pro další řízení = podklad pro mezinárodní průzkum)

1. Zařízení pro izolování materiálu obsahujícího buňky, ze svazku tkání a/nebo z kapaliny, se shora otevřenou nádobkou pro zakládání materiálu obsahujícího buňky, který se zavádí jako svazek tkání a/nebo ve formě kapaliny, **vyznačující se tím**, že je v něm uspořádáno oddělovací zařízení vytvořené jako razník, které je opatřeno ovládacím dříkem, na kterém je upevněn plošně vytvořený oddělovací kotouč, jehož obvodový okraj vodotěsně dosedá na vnitřní stěny nádobky a který je opatřen alespoň jedním propustným otvorem překrytým filtrační membránou a je shora zasouvatelný do nádobky, přičemž jsou na oddělovacím kotouči uspořádány třecí prvky, jimiž jsou otáčením oddělovacího kotouče do materiálu zaveditelné střížné síly.
2. Zařízení podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že nádobka je opatřena vodotěsně uzavírajícím víkem.
3. Zařízení podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že oddělovací kotouč působí tlakem na materiál obsahující buňky včetně svazku tkáně a/nebo na kapalinu.
4. Zařízení podle některého z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že ovládací dřík je uspořádán soustředně na oddělovacím kotouči.
5. Zařízení podle některého z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že oddělovací zařízení je v rovině obvodu oddělovacího kotouče opatřeno ovládacím dříkem tvaru dutého válce.
6. Zařízení podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že pohon oddělovacího zařízení je odvozen od ovládacího dříku pro otáčivé a/nebo svislé pohyby.



7. Zařízení podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím**, že horní konec ovládacího dříku je oddělitelně nebo neoddělitelně upevnitelný na uzavíracím víku.
8. Zařízení podle některého z nároků 5 až 7, **vyznačující se tím**, že na ovládacím dříku je uspořádána manipulační příruba pro automatické nebo manuální ovládání.
9. Zařízení podle některého z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že třecí prvky jsou uspořádány na straně oddělovacího kotouče, která je přivrácena ke dnu nádoby.
10. Zařízení podle některého z nároků 2 až 9, **vyznačující se tím**, že uzavírací víko je vytvořeno jako šroubovací uzávěr.
11. Zařízení podle některého z nároků 2 až 10, **vyznačující se tím**, že uzavírací víko je opatřeno přepážkou umožňující její propíchnutí dutou jehlou.
12. Zařízení podle některého z nároků 1 až 11, **vyznačující se tím**, že nádoba je zhotovena z plastické hmoty.
13. Zařízení podle některého z nároků 1 až 12, **vyznačující se tím**, že filtrační membrána je opatřena póry, které umožňují prostupování jednotlivých buněk a/nebo svazků buněk a zadržení zbývající tkáně.
14. Zařízení podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že póry mají velikost přibližně 100 nm.
15. Způsob izolování buněk ze svazku tkání a/nebo z kapaliny použitím zařízení podle některého z nároků 1 až 14, **vyznačující se tím**, že
- materiál obsahující buňky a integrovaný ve svazku tkání a/nebo v kapalině se vloží do otevřené nádoby,

16. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že se před zavedením oddělovacího zařízení nebo po jeho zavedení přidávají do nádobky reagenční činidla.

— — — — —

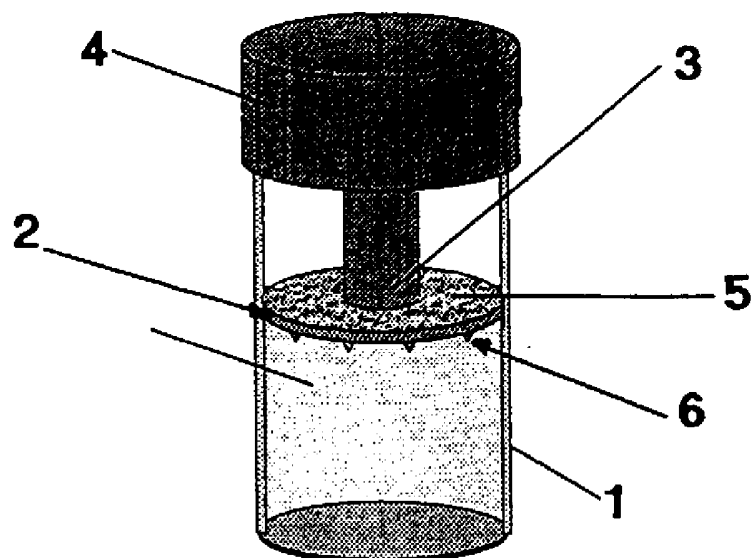


Fig. 1

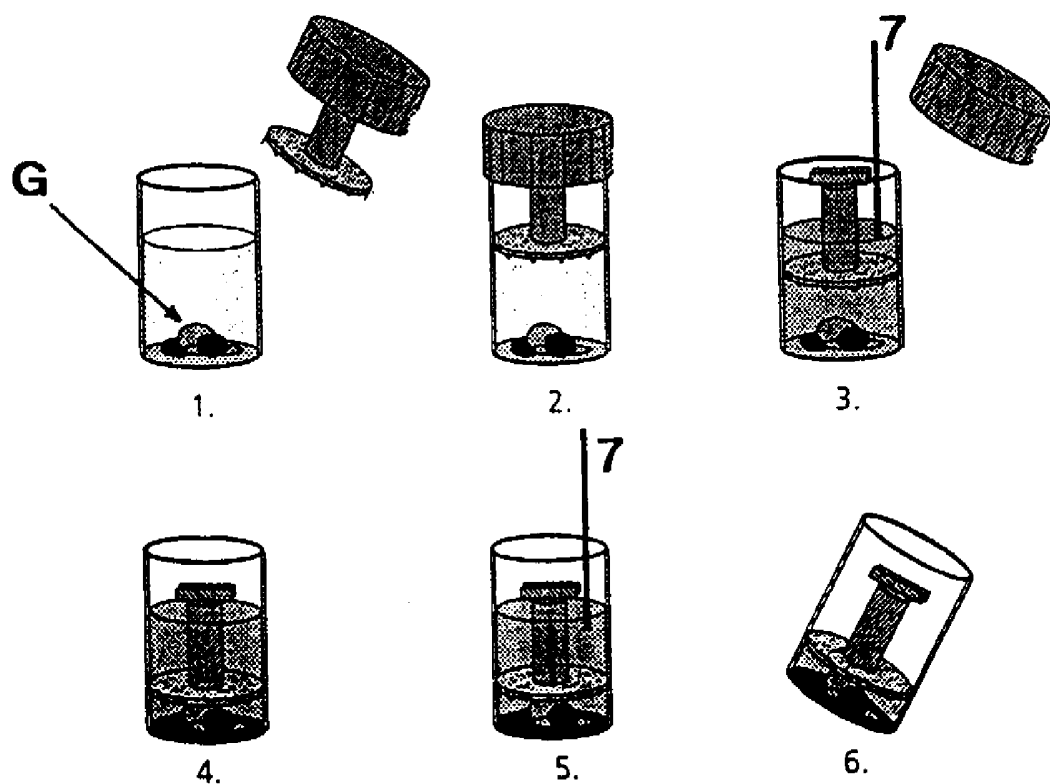


Fig. 2