

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
02. November 2017 (02.11.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2017/186331 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:  
A01N 1/02 (2006.01) G01K 11/06 (2006.01)  
G01K 3/04 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/000404

(22) Internationales Anmeldedatum:  
31. März 2017 (31.03.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102016005075.6 27. April 2016 (27.04.2016) DE

(71) Anmelder: FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Hansastr. 27 C, 80686 München (DE). UN-

IVERSITÄT DES SAARLANDES [DE/DE]; Campus, 66123 Saarbrücken (DE).

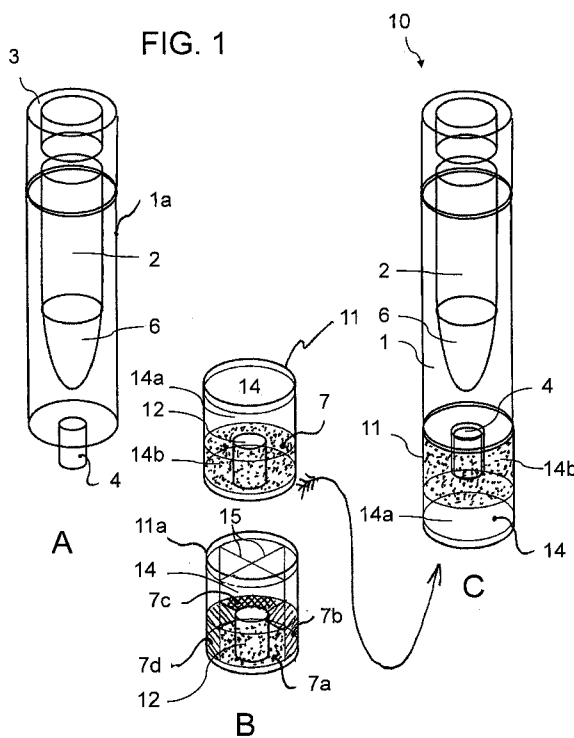
(72) Erfinder: FUHR, Günter R.; Eintrachtstrasse 2, 13187 Berlin (DE). ZIMMERMANN, Heiko; Pfarrer-Fröhlich-Strasse 17, 97295 Waldbrunn (DE).

(74) Anwalt: REICHERT, Christian; v. Bezold & Partner Patentanwälte - PartG mbB, Akademiestr. 7, 80799 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA,

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THE TEMPERATURE MONITORING OF A CRYOPRESERVED BIOLOGICAL SAMPLE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR TEMPERATURÜBERWACHUNG EINER KRYOKONSERVIERTEN BIOLOGISCHEN PROBE



(57) Abstract: The invention relates to a device for the temperature monitoring of a cryopreserved biological sample, comprising a sample container having an accommodating space (2) for accommodating the sample and comprising an indicating apparatus, which can be arranged on the outside of the sample container, for monitoring at least one temperature limit value. The indicating apparatus has at least one cavity, which is only partially filled with an indicating substance, the melting temperature of which lies in a range from -20 °C to -140 °C. The indicating apparatus can be designed, in particular, as a cylindrical body, which can be fastened to a cryotube as a bottom part, or alternatively as a double-walled hollow cylinder, which can be slid onto an outer lateral surface of the cryotube. The indicating apparatus can also be fastened to a lateral outer wall of the sample container, e.g. as a hollow body that can be inserted into a sleeve or insertion pocket.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe, umfassend einen Probenbehälter mit einem Aufnahmeraum (2) zur Aufnahme der Probe, und eine außen am Probenbehälter anordenbare Indikatoreinrichtung zur Überwachung mindestens eines Temperaturgrenzwertes. Die Indikatoreinrichtung weist mindestens einen Hohlraum auf, der lediglich zum Teil mit einer Indikatorsubstanz gefüllt ist, deren Schmelztemperatur in einem Bereich von -20 °C bis -140 °C liegt. Die Indikatoreinrichtung kann insbesondere als ein zylinderförmiger Körper ausgeführt sein, der als Bodenteil an einem Kryoröhrchen befestigbar ist, oder alternativ als doppelwandiger Hohlzylinder, der auf eine äußere Mantelfläche des Kryoröhrchens aufschiebbar ist. Die Indikatoreinrichtung kann auch an einer seitlichen Außenwand des Probenbehälters befestigt sein, z.B. als in eine Hülse oder Einstecktasche einsteckbarer Hohlkörper.

WO 2017/186331 A1

SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

**(84) Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

## VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR TEMPERATURÜBERWACHUNG EINER KRYOKONSERVIERTEN BIOLOGISCHEN PROBE

5

### BESCHREIBUNG

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe. Die Erfindung betrifft ferner eine Vorrichtung zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe.

Die Tieftemperaturkonservierung (Kryokonservierung) von Zellen ist bisher die einzige Möglichkeit, Lebensprozesse auf zellulärer Ebene reversibel (vitalitätserhaltend) so anzuhalten, dass sie nach einer Erwärmung auf physiologische Temperaturen wieder anlaufen können. Die Kryokonservierung hat sich über große Biobanken in den letzten Jahrzehnten zu einem unverzichtbaren Element für Kliniken, Pharmaunternehmen, die Arterhaltung, den Umweltschutz und die Gesundheitsvorsorge entwickelt. Gelagert wird biologisches Material in tieftemperaturverträglichen Probenbehältern (Kryobehältern), z. B. Röhrchen, Straws und Beuteln, unterschiedlicher Größe. Bei der Kryokonservierung sind die gelagerten Biomaterialien unter Aufrechterhaltung der Vitalität des Probenmaterials gefroren, zumeist bei Temperaturen unterhalb  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , für Lebendsammlungen unter  $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur Temperatur des flüssigen Stickstoffs. Für eine kryokonservierte Probe oder eine für die Kryokonservierung vorgesehene Probe wird nachfolgend auch der Begriff „Kryoprobe“ verwendet.

25

Für makroskopische Proben, wie z. B. Blut oder Gewebe, sind zahlreiche Techniken zur Probenlagerung bei tiefen Temperaturen entwickelt worden. In der modernen Medizin, Gentechnik und Biologie besteht die Tendenz, zunehmend kleine Proben einer Kryokonservierung zu unterziehen. Es werden beispielsweise kleine Suspensionsvolumina (Milliliter oder darunter) mit suspendierten Zellen oder Zellgruppen eingefroren. Die Kryokonservierung von Zellen aus In-vitro-Kulturen erfolgt in überwiegendem Maße in einer Suspension. Die meisten der biomedizinisch relevanten Zellen benötigen jedoch zu ihrer

30

Vermehrung und geordneten Entwicklung einen Substratkontakt. Daher werden Proben ggf. nach einer Kultivierung im substratgebundenen Zustand eingefroren.

Die Qualität der Proben ist von ausschlaggebender Bedeutung, da sie für Zelltherapien in Kliniken, die Entwicklung von Pharmaka und biotechnologischen Produkten, als nationale Ressourcen und vieles mehr Anwendung finden. Die Lagerzeit liegt bei einigen Tagen bis zu Jahrzehnten, mit einer Tendenz zur Langzeitlagerung. Die Proben werden in gekühlten Behältern gelagert, befinden sich zumeist in Metalleinschüben und Racks, mit denen sie bei neuen Einlagerungen oder Entnahmen Temperaturschwankungen unterliegen. Bei Lebendablagen (Zellen, Zellsuspensionen und Gewebeteilen) spielt nicht nur die ununterbrochene Kühlkette eine entscheidende Rolle, sondern auch die Vermeidung großer Temperatursprünge in der Tiefkühlphase. Da es bei der Entnahme gar nicht so selten vorkommt, dass Kryobehälter sich auf Temperaturen von  $-80\text{ °C}$  bis  $-20\text{ °C}$  erwärmen, treten, obwohl sie noch gefroren sind, Qualitätsminderungen unerkannt auf, die nicht nur den Wert der Probe mindern, sondern auch bei ihrer Verwendung im klinischen Bereich zu lebensgefährlichen Situationen führen können. Selbst kurzzeitig aufgetauten Proben sieht man im wiedergefrorenen Zustand nicht an, dass sie dem Originalzustand nicht mehr entsprechen. Es geht aber vornehmlich nicht nur darum, ein Auftauen der Biomaterialien zu erkennen, sondern das Überschreiten einer Grenztemperatur im Bereich zwischen  $-140\text{ °C}$  und  $-20\text{ °C}$  zu dokumentieren. Eine Temperaturkontrolle und -dokumentation für jede Probe ist die Forderung und bislang nur selten – und wenn, dann mit hohem technischen Aufwand - zu erfüllen. Hinzu kommen umfangreiche Laboruntersuchungen nach dem Auftauen, die ebenfalls wertvolles Probenmaterial verbrauchen und selbst im Falle inzwischen wertlos gewordener Kryoproben Kosten erzeugen.

Es ist somit eine Aufgabe der Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe bereitzustellen, mit dem Nachteile herkömmlicher Techniken vermieden werden können und das sich durch eine vereinfachte Verfahrensführung auszeichnet. Eine weitere Aufgabe ist es, eine Vorrichtung zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe bereitzustellen, mit der Nachteile herkömmlicher Techniken vermieden werden können.

Eine weitere Aufgabe ist es, eine Möglichkeit bereitzustellen, um an einem möglichst einfachen Marker oder Kennzeichen erkennen zu können, ob eine Kryoprobe sich über eine definierbare Grenztemperatur, und wenn auch nur kurzzeitig, erwärmt hat. Die Grenztemperatur muss im Bereich zwischen  $-20\text{ °C}$  und  $-140\text{ °C}$  vor dem Einfrieren festlegbar sein. Dies sollte an jeder einzelnen Kryoprobe und an damit Millionen von Proben rasch und leicht erkennbar möglich sein, darf die Biomaterialien nicht verändern und sollte bereits im tiefgefrorenen Zustand erfolgen. Wenn möglich, sollte der Zustand der Probe auch im Lagerbehälter erfassbar sein, da jede Aus- und Einlagerung die Gefahr der Probenveränderung einer Vielzahl von Proben im Lagergut mit sich bringt, da in der Regel ganze Racks aufgezogen werden. Die Vorrichtung bzw. das Verfahren sollte leicht handhabbar, tieftemperaturtolerant und einstellbar sein. Es darf nur wenig oder keine Energie verbrauchen und möglichst nur geringste Kosten verursachen, da die Lagerung einer Bioprobe im gekühlten Zustand in ihren Gesamtaufwendungen nur wenige Euros kosten sollte. Diesem Anspruch müssen auch die einsetzbaren Materialien gerecht werden.

Diese Aufgaben werden durch Vorrichtungen und Verfahren mit den Merkmalen der unabhängigen Ansprüche gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen und werden in der folgenden Beschreibung unter teilweiser Bezugnahme auf die Figuren näher erläutert.

Gemäß einem ersten Gesichtspunkt der Erfindung werden die genannten Aufgaben durch ein Verfahren zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe gelöst. Zur Durchführung des Verfahrens wird eine Vorrichtung zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe bereitgestellt.

Gemäß einem zweiten Gesichtspunkt der Erfindung soll die Vorrichtung zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe als Gegenstand per se offenbart und beanspruchbar sein. Die Ausführungen betreffend die Vorrichtung, insbesondere deren vorteilhafte Ausführungsvarianten, sollen somit zur Vermeidung von Wiederholungen als rein vorrichtungsgemäß offenbart und als verfahrensgemäß offenbart gelten und beanspruchbar sein.

Die Vorrichtung zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe umfasst einen Probenbehälter mit einem Aufnahme-  
raum (Probenreservoir) zur Aufnahme einer Probe, insbesondere einer biologischen Probe. Die Vorrichtung umfasst ferner  
eine außen am Probenbehälter anordenbare und/oder angeordnete Indikatoreinrichtung  
zur Überwachung mindestens eines Temperaturgrenzwertes. Die Indikatoreinrichtung  
weist mindestens einen Hohlraum auf, der lediglich zum Teil mit einer Indikatorsubstanz  
gefüllt ist, deren Schmelztemperatur bei Normaldruck, also bei 1013,25 mbar, in einem  
Bereich von -20 °C bis -140 °C liegt. Die Schmelztemperatur kann auch in einem Bereich  
von -20 °C bis -100 °C liegen. Der mindestens eine Hohlraum ist mit dem Aufnahme-  
raum des Probenbehälters nicht fluidisch verbunden, so dass die Indikatorsubstanz nicht in di-  
rekten Kontakt mit einer im Aufnahme-  
raum befindlichen Probe treten kann. Der Begriff  
„anordenbar und/oder angeordnet“ soll umfassen „befestigbar und/oder befestigt“,  
„koppelbar und/oder gekoppelt“, „verbindbar und/oder verbunden“.

Durch die Indikatoreinrichtung der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird mindestens ein  
Zusatzkompartiment bereitgestellt, das durch die partielle Füllung mit der Indikatorsub-  
stanz als Indikatorelement verwendet werden kann, um eine unerwünschte Überschrei-  
tung der Grenztemperatur anzuzeigen.

Der Probenbehälter ist ein für eine Kryokonservierung geeigneter Behälter, beispielsweise  
ein Röhrchen, ein Straw (auch als Samenröhrchen bezeichnet), ein Beutel zur Blut- oder  
Stammzellenlagerung, eine Box oder ein anderer für eine Kryokonservierung geeigneter  
Behälter. Derartige Behälter werden entsprechend auch als Kryoröhrchen, Kryostraw,  
Kryobeutel, Kryobox oder allgemein als Kryobehälter bezeichnet.

Kryoröhrchen (engl. cryogenic tubes) werden auch als Biobank- oder Kryobankröhrchen  
bezeichnet. Kryoröhrchen weisen einen Aufnahme-  
raum auf, der einen inneren Hohlraum  
zur Aufnahme einer biologischen Probe ausbildet. Das Kryoröhrchen weist ferner übli-  
cherweise einen Deckel zum Verschließen des Aufnahme-  
raums auf. Der Deckel kann ei-  
nen Eingriff aufweisen, über den der Deckel mit einem Werkzeug gedreht werden kann.  
Das Kryoröhrchen kann auch ein Bodenelement aufweisen, das eine Kennung, z. B. in  
Form eines maschinenlesbaren Codes, aufweist.

Das Verfahren umfasst ferner das Einfrieren der Indikatorsubstanz(en), wobei der mindestens eine Hohlraum der Indikatoreinrichtung während des Einfrierens der Indikatorsubstanz(en) in eine erste Lage gebracht wird. In der ersten Lage fließt die Indikatorsubstanz im flüssigen Zustand in ein erstes Teilvolumen des Hohlrums der Indikatoreinrichtung und gefriert dort. Nach dem Einfrieren, insbesondere vor und während der Überwachungsphase der Kryolagerung, wird der mindestens eine Hohlraum mit der jeweils darin gefrorenen Indikatorsubstanz und bei einer Temperatur der Indikatorsubstanz(en) unterhalb der Schmelztemperatur in eine zweite Lage gebracht, in der ein Schmelzen der Indikatorsubstanz durch den Einfluss der Schwerkraft zu einer zumindest teilweisen Konfigurationsänderung der Indikatorsubstanz in dem jeweiligen Hohlraum führt.

Die Konfigurationsänderung kann eine zumindest teilweise Veränderung der Lage der Indikatorsubstanz und/oder der Form der Indikatorsubstanz, z. B. der Oberflächenform, sein. Schmilzt die Indikatorsubstanz in der zweiten Lage, wird sie unter dem Einfluss der Schwerkraft in ein zweites Teilvolumen fließen und, falls die Temperatur wieder unter den Schmelzpunkt fällt, dort wieder gefrieren.

Mit anderen Worten wird die Indikatorsubstanz in einer solchen Geometrie oder Lage eingefroren und der mindestens eine Hohlraum der Indikatoreinrichtung in seiner Lage im tiefgefrorenen Zustand, z. B. bei der Lagertemperatur oder zumindest unterhalb der festgelegten Grenztemperatur bzw. Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz, verändert, so dass ein Schmelzen der Indikatorsubstanz nach der Lageveränderung zu einer sichtbaren Verlagerung der Flüssigkeit oder ihrer Begrenzungsgeometrie führt. An dieser Veränderung der Flüssigkeit, die z. B. gefärbt oder anderweitig gut erkennbar gemacht werden kann, kann sofort durch Anschauen oder auch technisch automatisiert festgestellt werden, ob die Grenztemperatur überschritten wurde.

Gemäß dem Verfahren besteht nun die Möglichkeit, die Vorrichtung, aufweisend den Probenbehälter mit einer darin befindlichen kryokonservierten Probe und die Indikato-

reinrichtung, zur Kryokonservierung, zu lagern, wobei die Indikatoreinrichtung so am Probenbehälter angeordnet ist, dass der mindestens eine Hohlraum sich in der zweiten Lage befindet.

- 5 Zu einem späteren Zeitpunkt kann geprüft werden, ob eine Konfigurationsänderung der gefrorenen Indikatorsubstanz, z. B. eine zumindest teilweise Verlagerung und/oder eine Formänderung der Indikatorsubstanz, stattgefunden hat.

10 Ist dies der Fall, kann auf ein Überschreiten der Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz und somit der zu überwachenden Grenztemperatur geschlossen werden, insbesondere auch dann, wenn die Überschreitung nur kurzzeitig aufgetreten ist.

15 Ein besonderer Vorzug der Erfindung liegt somit darin, dass eine Konfigurationsänderung der Indikatorsubstanz direkt anzeigt, ob eine Kryoprobe sich über eine definierbare Grenztemperatur, und wenn auch nur kurzzeitig, erwärmt hat. Dies kann durch visuelle Sichtprüfung oder auch technisch automatisiert mittels einer entsprechend eingerichteten Messeinrichtung schnell und einfach festgestellt werden, ohne dass die Probe aus dem Probenbehälter entnommen oder aufgetaut werden muss.

20 Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann die Indikatoreinrichtung eine Mehrzahl von Hohlräumen aufweisen, die jeweils lediglich zum Teil mit einer Indikatorsubstanz, deren Schmelztemperatur in einem Bereich von  $-20\text{ °C}$  bis  $-140\text{ °C}$  liegt, gefüllt sind, wobei die Indikatorsubstanzen in den Hohlräumen sich ihren Schmelztemperaturen unterscheiden. Damit können unterschiedliche Temperaturgrenzwerte überwacht werden, wobei jede Indikatorsubstanz so ausgewählt und/oder deren Mischungsverhältnis so eingestellt ist, dass ihr Schmelzpunkt einem der zu überwachenden Temperaturgrenzwerte entspricht. Diese Ausführungsform bietet den Vorteil, dass sich die erreichten Temperaturintervalle, in die die Probe gelangt ist, genauer eingrenzen lassen.

30 Ferner kann die Indikatoreinrichtung oder zumindest der mindestens eine Hohlraum der Indikatoreinrichtung lösbar am Probenbehälter befestigbar und/oder befestigt sein, beispielsweise mittels mindestens einer Steckverbindung, Rastverbindung, Klemmverbin-



5 dung, Schraubverbindung und/oder Klickverbindung. Dies bietet den Vorteil, dass die Indikatoreinrichtung räumlich getrennt vom Probenbehälter gelagert und vorbereitet (z. B. Gefrieren der Indikatorsubstanz in der ersten Lage) werden kann. Unter einer lösba-  
ren Befestigung soll insbesondere auch ein Aufschieben, Aufkleben oder Aufstecken der Indi-  
katoreinrichtung auf den Probenbehälter umfasst sein.

10 Ferner kann die Indikatoreinrichtung an mindestens einer Stelle transparent oder semi-transparent sein, so dass der mindestens eine Hohlraum bzw. eine Konfigurationsänderung einer im Hohlraum befindlichen Indikatorsubstanz von außen beobachtbar ist. Hier-  
zu kann insbesondere eine Wandung des mindestens einen Hohlraums an mindestens  
einer Stelle transparent oder semi-transparent sein. Vorzugsweise ist die gesamte Wan-  
dung des mindestens einen Hohlraums transparent oder semi-transparent ausgeführt.

15 Zur besseren Erkennbarkeit kann die Indikatorsubstanz einen Indikatorzusatz enthalten,  
der eine Detektierbarkeit einer physikalischen Eigenschaft der Indikatorsubstanz erhöht.  
Der Indikatorzusatz kann beispielsweise ein Farbstoff sein, so dass die Indikatorsubstanz  
farbig oder gefärbt, d. h. nicht transparent, ist und so deren Form und/oder Lage besser  
optisch erkennbar ist.

20 Als Farbstoff kommt grundsätzlich jeder Farbstoff in Frage, welcher mindestens die fol-  
genden Bedingungen erfüllt:

- intensives Färbevermögen auch in kleinen Mengen und Konzentrationen (z. B. ausge-  
hend von einer gesättigten Farblösung Zugabe im Bereich < 1 Volumen-%, in der Regel im  
Promille- oder Subpromille-Bereich).

25 - frosttolerant

- lichtecht bei den Versand- als auch den relevanten tiefen Temperaturen

- löslich in allen Bestandteilen der Indikatorsubstanz

- kein Entmischen beim Einfrieren

- keine Reaktion mit Kunststoffmaterialien, welche in Kontakt mit der Indikatorsubstanz

30 kommen.

Vorzugsweise ist der Farbstoff aus der Gruppe ausgewählt, welche Triphenylmethanfarbstoffe, Rhodaminfarbstoffe, insbesondere Xanthene, Azofarbstoffe sowie Phenazin- und Phenothiazinfarbstoffe umfasst.

5 In spezielleren Ausführungsformen ist der Farbstoff aus der Gruppe ausgewählt, welche Oil Red, Methylrot, Brillantgrün, Rhodamin B, Neutralrot, Methylenblau oder andere Farbstoffe, die zur Anfärbung von Zellen in der Zytologie verwendet werden, umfasst.

Der Indikatorzusatz können Partikel, insbesondere Nanopartikel sein, die eine Streuwirkung und/oder Polarisationswirkung der Indikatorsubstanz für auf die Indikatorsubstanz auftreffende elektromagnetische Strahlung erhöhen. Dadurch kann eine Konfigurationsänderung der Indikatorsubstanz mittels einer optischen Transmissionsmessung, Streumessung und/oder Polarisationsmessung zuverlässiger detektiert werden. Der Indikatorzusatz können leitfähige Partikel sein. Durch Beimischen von leitfähigen Partikel kann die Leitfähigkeit oder Impedanz der Indikatorsubstanz beeinflusst werden. Auf diese Weise kann eine Konfigurationsänderung der Indikatorsubstanz mittels einer Leitfähigkeitsmessung oder Impedanzmessung detektiert werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform kann die Vorrichtung eine Messeinrichtung aufweisen, die ausgebildet ist, eine Lage der Indikatorsubstanz(en) in dem mindestens einen Hohlraum zu erfassen. Die Messeinrichtung kann eine optische oder optisch-elektrische Messeinrichtung sein, um z. B. mit einer optischen Transmissions-, Streulicht- oder Reflektionsmessung eine Konfigurationsänderung der Indikatorsubstanz festzustellen.

25 Als Indikatorsubstanz kann eine Substanz ausgewählt werden, deren Schmelztemperatur einer vorbestimmten Grenztemperatur, deren Überschreiten überwacht werden soll, entspricht. Die Indikatorsubstanz ist eine Flüssigkeit oder eine Mischung verschiedener Flüssigkeiten, deren Schmelzpunkt der gewünschten Grenztemperatur entspricht. Lediglich beispielhaft kann als Indikatorsubstanz eine Mischung aus Wasser (H<sub>2</sub>O) und Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), eine Mischung aus Wasser (H<sub>2</sub>O) und Kaliumhydroxid (KOH) oder eine Mischung aus Wasser und einem Gefrierschutzmittel gewählt werden. Das Mischungsverhältnis

wird dabei gemäß dem jeweiligen Schmelzdiagramm, das den Verlauf des Schmelzpunktes in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis angibt, so eingestellt, dass der Schmelzpunkt des Flüssigkeitsgemisches den gewünschten Wert, nämlich die zu überwachende Grenztemperatur, aufweist.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Indikatorsubstanz mindestens einen Alkohol, welcher aus der Gruppe, die Octan-1-ol, Nonan-1-ol, Propan-1,2-diol, Propan-1,3-diol, Butan-1,2-diol, Butan-1,3-diol, Butan-2-ol, Pentan-1,5-diol, Pentan-1-ol, Cyclopentanol, Benzylalkohol umfasst, ausgewählt ist. Besonders bevorzugt ist der mindestens eine Alkohol aus Propan-1,3-diol, Propan-1,2-diol und Butan-2-ol ausgewählt.

10

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform umfasst die Indikatorsubstanz mindestens zwei verschiedene Alkoholkomponenten:

a) einen Alkohol, ausgewählt aus der Gruppe, die Octan-1-ol, Nonan-1-ol, Propan-1,2-diol, Propan-1,3-diol, Butan-1,2-diol, Butan-1,3-diol, Butan-2-ol, Pentan-1,5-diol, Pentan-1-ol, Cyclopentanol, Benzylalkohol umfasst;

15

b) einen Alkohol, ausgewählt aus der Gruppe, die Octan-1-ol, Nonan-1-ol, Propan-1,2-diol, Propan-1,3-diol, Butan-1,2-diol, Butan-1,3-diol, Butan-2-ol, Pentan-1,5-diol, Pentan-1-ol, Cyclopentanol, Benzylalkohol umfasst, mit einem niedrigeren Schmelzpunkt als der Alkohol der Komponente a);

20

wobei das Mischungsverhältnis der Komponenten a) und b) so eingestellt ist, dass die Schmelztemperatur der Mischung innerhalb eines Temperaturbereichs von -20 °C bis -160 °C, insbesondere von -25 °C bis -160 °C oder -50 °C bis -150 °C, liegt.

25

Speziellere Ausführungsformen sind dadurch gekennzeichnet, dass die Indikatorsubstanz eine der folgenden Kombinationen der Komponenten a) und b) umfasst:

- Octan-1-ol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
- Octan-1-ol und Pentan-1-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
- Octan-1-ol und Propan-1,2-diol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
- Nonan-1-ol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
- Nonan-1-ol und Propan-1,2-diol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
- Nonan-1-ol und Pentan-1-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;

30

- Propan-1,2-diol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Propan-1,2-diol und Propan-1,3-diol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Propan-1,2-diol und Butan-1,2-diol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Propan-1,3-diol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - 5 - Propan-1,3-diol und Butan-1,2-diol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Pentan-1,5-diol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Benzylalkohol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Pentan-1-ol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Pentan-1-ol und Methanol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - 10 - Cyclopentanol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Cyclopentanol und Propan-1,2-diol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Cyclopentanol und Pentan-1-ol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
  - Cyclopentanol und Butan-1,2-diol in einem Mischungsverhältnis von 5 bis 95 Vol.-%;
- wobei der angegebene Wert des Mischungsverhältnisses sich jeweils auf den Anteil der
- 15 erstgenannten Komponente in der Mischung aus beiden Komponenten bezieht.

In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst diese Indikator Mischung beispielsweise Propan-1,2-diol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 40 bis 60 Vol.-% (ergibt eine Schmelztemperatur von ca. - 90 °C), Propan-1,2-diol und Propan-1,3-

20 diol in einem Mischungsverhältnis von 30 bis 70 Vol.-%, oder Propan-1,3-diol und Butan-2-ol in einem Mischungsverhältnis von 30 bis 70 Vol.-%.

Vorzugsweise umfasst die Indikatormischung neben dem mindestens einen Alkohol noch mindestens einen Farbstoff wie oben beschrieben. Besonders bevorzugt ist dieser Farbstoff aus der Gruppe ausgewählt, welche Oil Red, Methylrot, Brillantgrün und Rhodamin B

25 umfasst.

Eine noch speziellere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Indikatorsubstanz zwei Alkohole a) und b), die aus Propan-1,3-diol, Propan-1,2-diol und Butan-2-ol

30 ausgewählt sind, vorzugsweise in einem Mischungsverhältnis wie oben angegeben, sowie einen Farbstoff, der aus Gruppe ausgewählt ist, welche aus Oil Red, Methylrot, Brillantgrün und Rhodamin B besteht, umfasst.

Die Konzentration des Farbstoffs in der Alkoholkomponente kann je nach Farbstoff und Alkohol stark variieren.

5 In der Regel soll die Konzentration bei intensiver Färbung so niedrig wie möglich gehalten werden, damit die Farbmoleküle das Gefrier- und Schmelzverhalten der Alkohole, in denen sie gelöst werden, nicht verändern oder deren Viskosität erhöhen. Die Farbstoffkonzentration liegt dabei typischerweise in einem Bereich von < 10 Volumen-%, insbesondere < 1 % oder < 0,1 %, also im Prozent- oder Promille- bzw. Subpromillebereich.

10

In einer Variante der vorliegenden Erfindung entspricht die zu überwachende Grenztemperatur nicht direkt der Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz, sondern vielmehr derjenigen Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur, bei der die Viskosität der geschmolzenen Substanz soweit abgenommen hat, dass der erforderliche Flüssigkeitstransport stattfinden kann.

15

Diese Temperatur wird hier auch als Schwellentemperatur bezeichnet und liegt typischerweise in einem Temperaturbereich von 3-30 °C oder 5-30°C, beispielsweise 3-10 °C, 3-20 °C, 5-10 °C oder 5-20 °C, oberhalb der nominellen Schmelztemperatur.

20

In einer vorteilhaften Ausführungsform ist die Indikatorsubstanz daher dadurch gekennzeichnet, dass die flüssige Mischung in einem Temperaturbereich von 3-30 °C oder 5-30 °C oberhalb der Schmelztemperatur eine Viskosität in einem Bereich von 10 bis 10<sup>6</sup> mPa\*s, vorzugsweise 10 bis 10<sup>4</sup> mPa\*s, aufweist.

25

Vorstehend wurde bereits erwähnt, dass der Probenbehälter ein Kryoröhrchen sein kann. Gemäß dieser Variante kann die Indikatoreinrichtung beispielsweise als ein zylinderförmiger Körper ausgeführt sein, der als Bodenteil am Kryoröhrchen befestigbar ist. Dies bietet den Vorteil, dass die Indikatoreinrichtung zusätzlich die Funktion eines an sich bekannten Bodenteils eines Kryoröhrchen übernimmt, das eine vertikale Standfestigkeit des Kryoröhrchen gewährleistet. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Indikatoreinrichtung, wenn diese ein herkömmliches Bodenteil ersetzt, keinen zusätzlichen Bauraum beansprucht.

30

Hierbei ist besonders vorteilhaft, wenn der zylinderförmige Körper den gleichen Außendurchmesser wie das Kryoröhrchen aufweist, so dass die Vorrichtung in herkömmlichen Lageraufnahmen einer Kryolagereinrichtung für Kryoröhrchen gelagert werden kann. Der zylinderförmige Körper kann transparent oder semi-transparent ausgeführt sein, d. h. aus einem transparenten oder semi-transparenten Material gefertigt sein.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Indikatoreinrichtung als ein allseitig geschlossener Hohlzylinder ausgeführt sein, der an der Unterseite des Probenbehälters, z. B. in Form eines Kryoröhrchens, vorgesehen ist und der insbesondere an der Unterseite des Probenbehälters lösbar befestigbar ist. Der Innenraum des Hohlzylinders bildet mindestens einen Hohlraum aus.

Der Innenraum kann als lediglich ein Hohlraum, der partiell mit der Indikatorsubstanz gefüllt ist, ausgeführt sein. Der Innenraum kann alternativ auch in mehrere voneinander fluidisch getrennte Teilhöhlräume unterteilt sein, die jeweils partiell mit einer Indikatorsubstanz gefüllt sind. Vorzugsweise unterscheiden sich die Indikatorsubstanzen der Teilhöhlräume zumindest in ihrer Schmelztemperatur, so dass durch jeden Teilhohlraum das Überschreiten eines unterschiedlichen Temperaturgrenzwertes überwacht werden kann.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die Indikatoreinrichtung als Bodenteil am Probenbehälter, z. B. als Bodenteil eines Kryoröhrchens, befestigt sein und an ihrer Unterseite mindestens eine Einstecköffnung aufweisen, in der ein Behälter, insbesondere ein stiftförmiger Behälter, der lediglich zum Teil mit der Indikatorsubstanz gefüllt ist, lösbar gehalten ist. Dies bietet den Vorzug, dass die Indikatoreinrichtung schnell und flexibel mit mindestens einem, die Indikatorsubstanz enthaltenden Behälter bestückt werden kann. Der Behälter kann beispielsweise in die Einstecköffnung eingesteckt und in der eingesteckten Stellung arretiert sein.

Weist der Probenbehälter eine zylinderförmige äußere Mantelfläche auf, z. B. im Falle eines Kryoröhrchens, sieht eine weitere vorteilhafte Möglichkeit der erfindungsgemäßen Realisierung vor, dass die Indikatoreinrichtung als ein Hohlzylinder ausgeführt ist, der zur Befestigung am Probenbehälter auf eine äußere Mantelfläche des Probenbehälters auf-

schiebbar ist und/oder aufgeschoben ist. Der Hohlzylinder ist doppelwandig mit einer Innenwandung und einer Außenwandung ausgeführt. Ein Zwischenraum zwischen der Innenwandung und der Außenwandung, die den mindestens einen Hohlraum ausbildet, ist zum Teil mit der Indikatorsubstanz gefüllt.

5

Ein Vorteil dieses Ausführungsbeispiels liegt darin, dass ein herkömmlicher Probenbehälter verwendet werden kann, ohne dass Modifikationen zur Anordnung der Indikatoreinrichtung vonnöten sind.

10

Der Hohlraum des Hohlzylinders kann wiederum entweder als lediglich ein Hohlraum, der partiell mit der Indikatorsubstanz gefüllt ist, ausgeführt sein oder in mehrere voneinander fluidisch getrennte Teilhöhlräume unterteilt sein, die jeweils partiell mit einer Indikatorsubstanz gefüllt sind.

15

Gemäß einer Variante dieses Ausführungsbeispiels können der Hohlzylinder aus einem ersten Kunststoffmaterial und der Probenbehälter aus einem zweiten Kunststoffmaterial hergestellt sein. Hierbei weist das erste Kunststoffmaterial bei einer Temperaturverringering, zumindest in einem Temperaturbereich unterhalb der Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz, eine größere thermische Kontraktion als das zweite Kunststoffmaterial

20

auf.

25

Mit anderen Worten können die Ausdehnungskoeffizienten der Plastikmaterialien des Probenbehälters und des Hohlzylinders unterschiedlich gewählt werden, und zwar so, dass ein Aufbringen des Hohlzylinders leicht unterhalb der Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz oder leicht unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur bei Verwendung mehrerer unterschiedlicher Indikatorsubstanzen erfolgt und dass der Hohlzylinder bei der Lagertemperatur mit dem Probenbehälter verkeilt und damit schwerer abzulösen ist. Erwärmt nun jemand die Probe unerlaubt, müsste er sofort den Zylinder austauschen, was dadurch vermieden werden kann, dass diese Zylinder nicht frei an den Kryotanks verfügbar sind. Somit kann ein unberechtigtes Austauschen der Indikatoreinrichtung vermieden oder zumindest erschwert werden.

30

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist die Indikatoreinrichtung mindestens einen Hohlkörper, insbesondere einen länglichen Hohlkörper, auf, der lediglich zum Teil mit der Indikatorsubstanz gefüllt ist und an einer seitlichen Außenwand des Probenbehälters befestigt ist.

5

Hierbei besteht einerseits die Möglichkeit, dass der Hohlkörper mittels einer Steck-, Klick- oder Rastverbindung am Probenbehälter befestigt ist. Dies ermöglicht ein schnelles Anbringen des Hohlkörpers mit der Indikatorsubstanz am Probenbehälter. Ferner kann der Hohlkörper drehbar am Probenbehälter befestigt sein. Dadurch kann der Hohlkörper in einem am Probenbehälter befestigten Zustand sowohl in die erste als auch in die zweite Lage gebracht werden.

10

Ferner besteht andererseits die Möglichkeit, dass an einer seitlichen Außenwand des Probenbehälters eine Aufnahme vorgesehen ist, beispielsweise in Form einer Hülse oder Einstecktasche, in die der Hohlkörper zur Halterung am Probenbehälter einsteckbar und/oder eingesteckt ist.

15

Mit dem Begriff Probenbehälter wird insbesondere ein für eine Kryokonservierung ausgelegter Behälter bezeichnet. Der Probenbehälter ist vorzugsweise unter Verwendung tief-temperaturverträglichen Kunststoffmaterials für Temperaturen unter  $-140\text{ °C}$  hergestellt. Das Kunststoffmaterial kann ohne Veränderung und ohne Schaden wiederholte Temperaturwechsel tolerieren. Es wird vorzugsweise ein Kunststoffmaterial verwendet, dessen Wasseraufnahmefähigkeit  $< 1\%$  der Eigenmasse, insbesondere  $< 0.1\%$  der Eigenmasse beträgt. Erfindungsgemäße Kryospeicherelemente basieren beispielsweise auf Polyurethan oder Polyethylen.

20

25

Mit dem Begriff „biologische Probe“ wird biologisches Material wie Zellen, Gewebe, Zellbestandteile, biologische Makromoleküle etc. bezeichnet, welches im Probenbehälter der Kryokonservierung unterzogen wird - ggf. in einer Suspension und/oder im Verbund mit einem Substratmaterial. Im Aufnahmebereich kann somit ein Substrat angeordnet sein, das zur adhären Aufnahme biologischer Zellen, die Teil der biologischen Probe sind, eingerichtet ist.

30



Die zuvor beschriebenen bevorzugten Ausführungsformen und Merkmale der Erfindung sind miteinander kombinierbar. Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden im Folgenden unter Bezug auf die beigefügten Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

5

FIG. 1-6 schematische Ansichten verschiedener Ausführungsbeispiele eine Vorrichtung zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe;

10

FIG. 7 ein Ablaufdiagramm zur Illustration eines Ausführungsbeispiels eines Verfahrens zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe;

FIG. 8A, 8B, 9A jeweils ein Schmelzdiagramm eines Flüssigkeitsgemisches;

15

FIG. 9B eine Tabelle mit Schmelzpunkten einiger reiner Flüssigkeiten; und

FIG. 10 eine Mischbarkeitsmatrix von Lösemitteln.

20

Gleiche oder funktional äquivalente Elemente sind in allen Figuren mit denselben Bezugszeichen bezeichnet und werden zum Teil nicht gesondert beschrieben.

Figur 1A zeigt einen Probenbehälter in Form eines Kryoröhrchens (Tube) 1a. Es umfasst ein Aufnahmevolumen 2 für die Bioprobe, in dem sich die Biomaterialien befinden. Die

25

Bioprobe kann beispielsweise eine Zellsuspension 6 sein. Das Kryoröhrchen 1a umfasst ferner einen Deckel 3, der das Gefäß verschließt. Der Deckel kann an seiner Oberseite

einen Eingriff 4 besitzen, über den der Deckel 3 mit einem Werkzeug (jeweils nicht gezeigt) im Fall der Automatisierung gedreht werden kann. An sich bekannte Kryoröhrchen,

wie beispielsweise das in Figur 2 gezeigte, können auch einen Boden 5 enthalten, in den

30

optional ein Barcodeviereck oder eine andere Kennung eingefügt ist. Eine Besonderheit des in Figur 1 gezeigten Ausführungsbeispiels liegt darin, dass das Bodenelement des Kryoröhrchens 1a gleichzeitig als Indikatoreinrichtung 11 dient.

Das zylinderförmige Bodenteil bzw. die Indikatoreinrichtung 11 weist einen abgeschlossenen Hohlraum 14 auf, der partiell mit einer Indikatorsubstanz 7 in Form einer Flüssigkeit oder einer Flüssigkeitsmischung befüllt ist, deren Gefrierpunkt/Schmelzpunkt im Bereich von  $-20\text{ °C}$  bis  $-100\text{ °C}$  über das Mischungsverhältnis gewählt ist. Dies wird nachfolgend noch anhand der Figuren 8 bis 10 näher erläutert.

Das Bodenteil 11 wird in einer ersten Lage, hier auf dem Kopf stehend, auf die Lagertemperatur, die unterhalb der Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz 7 liegt, gebracht und erst an dem Kryoröhrchen 1a befestigt, wenn auch dieses die Lagertemperatur erreicht hat. Die erste Lage ist in Figur 1B dargestellt. Die Indikatorsubstanz nimmt ein erstes Teilvolumen 14b innerhalb des Hohlraums 14 ein.

Das Bodenteil wird in einer zweiten Lage am Kryoröhrchen befestigt. Hierzu wird das Bodenteil 11 um  $180^\circ$  ausgehend von der ersten Lage gedreht, so dass sich die gefrorene Indikatorsubstanz 7 nunmehr oberhalb des freien Volumens 14a befindet, wie in Figur 1C dargestellt. Die Befestigung des Bodenteils 11 am Kryoröhrchens erfolgt über einen Zapfen 4, der an der Unterseite des Kryoröhrchens 1a abragt und in Eingriff mit einer formkorrespondierenden Aufnahme 12 der Indikatoreinrichtung 11 gebracht wird. Selbstverständlich können alternativ andere zweckmäßig ausgeführte Befestigungsmöglichkeiten vorgesehen sein, wie Gewinde, Rast- oder Klemmverbindungen etc., um die Indikatoreinrichtung 11 als Bodenteil am Kryoröhrchen 1a zu befestigen.

In der in Figur 1C gezeigten Anordnung, zumeist senkrecht in Aufnahmen stehend, wird die Vorrichtung 10, umfassend das Kryoröhrchen und die daran befestigte Indikatoreinrichtung 11, in einem Tieftemperaturbehälter, z. B. einem Kryotank, gelagert.

Im Falle einer Überschreitung der Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz 7 fließt diese auf den Boden des Volumens 14 im Teilbereich 14a, was leicht erkennbar oder detektierbar ist. Ist die Probe 6 stets unter dem Gefrierpunkt der Indikatorsubstanz 7 gehalten worden, ergibt sich stattdessen der Zustand wie in Figur 1C gezeigt. Auf diese Weise ist leicht eine unstatthafte Erwärmung der Probe 6 erkennbar. Die Vorrichtung 10, insbeson-

dere die Indikatoreinrichtung 11, ermöglicht auf diese Weise die Überwachung, ob ein Temperaturgrenzwert (Schmelztemperatur) bei der Kryolagerung überschritten wurde.

Eine weitere Ausführungsvariante der Indikatoreinrichtung bzw. des Bodenteils 11a ist im unteren Teil von Figur 1B dargestellt. Wie erkennbar ist, kann das Volumen 14 des Bodenteils 11a auch in zueinander abgeschlossene Teilbereiche unterteilt werden, hier abgetrennt durch die Trennwände 15. Jeder der Teilbereiche ist wiederum mit einer Indikatormaterialsubstanz 7a, 7b, 7c, 7d teilgefüllt, wobei die Indikatormaterialsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d verschiedene Schmelzpunkte aufweisen, z. B. -50 °C, -60 °C, -70 °C und -100 °C.

Die Anbringung am Kryoröhrchen 1a erfolgt wie bereits für die Indikatoreinrichtung 11 beschrieben. Je nachdem, welche Indikatormaterialsubstanz oder Indikatormaterialsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d sich später am Boden des Hohlraums 14 befinden, zeigt dies an, welche Temperaturen überschritten wurden. Befinden sich alle Indikatormaterialsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d im oberen Bereich des Volumens 14, ist die Probe unverändert und korrekt gelagert worden.

Die Bodenteile 11, 11a sind aus einem transparenten Material gefertigt, so dass die Lage der Indikatormaterialsubstanz(en) im Volumen 14 von außen einfach beobachtbar ist. Die Lage der Indikatormaterialsubstanz 7 bzw. der Indikatormaterialsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d innerhalb des Bodenteils 11 bzw. des Bodenteils 11a ist optisch durch Ansehen, aber auch mittels einer zweckmäßig ausgebildeten Messeinrichtung optoelektrisch und automatisiert detektierbar. Ist die Indikatormaterialsubstanz gefärbt, erleichtert dies die Lagebestimmung. Ein weiterer Vorteil der Vorrichtung 10 ist die Wiederverwendbarkeit der Bodenteile 11, 11a und die Verwendung von als Indikatormaterialsubstanz 7 verwendeten Markerflüssigkeiten mit einem frei wählbaren Gefrierpunkt. Für Lebendablagen empfiehlt sich eine Schmelztemperatur um -80 °C, da hier eine deutliche Rekristallisation des Eises in den Zellen und um diese herum auftritt, die zu einer Qualitätsminderung der Kryoprobe führt. Für biologische Flüssigkeiten und Lagerung von genetischem Material, das bei -80 °C gelagert wird, ist ein Schmelzpunkt um -30 °C zu empfehlen.

Figur 2 zeigt ein Ausführungsbeispiel einer Vorrichtung 20, die ein Kryoröhrchen 1 und eine Indikatoreinrichtung 21 aufweist. Die Indikatoreinrichtung 21 ist als Hohlzylinder

ausgeführt, der von unten (oder oben) auf ein Kryoröhrchen 1 im tiefkalten Zustand aufgeschoben werden kann. Hierbei kann ein in an sich bekannter Weise ausgeführtes Kryoröhrchen 1, das beispielhaft in Figur 2A gezeigt ist, verwendet werden. Hierbei unterscheidet sich das in Figur 2A gezeigte Kryoröhrchen von dem in Figur 1A gezeigten lediglich dadurch, dass ein herkömmliches Bodenteil 5 verwendet wird, das nicht mit Indikat

5     tortsubstanz teilgefüllt ist.

Der Hohlzylinder ist doppelwandig mit einer Innenwandung 23 und einer Außenwandung 22 ausgeführt, wobei ein Zwischenraum 24 zwischen der Innenwandung 23 und der Außenwandung 22 zum Teil mit der Indikatortsubstanz gefüllt ist.

10

Figur 2B zeigt als beispielhafte Ausführungsvariante des Zylinders 22 ein Vierkammersystem mit vier verschiedenen Indikatortsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d. Der Zwischenraum 24 ist hierbei durch Trennwände 25 in vier Teilhöhlräume unterteilt, die jeweils mit einer Indikatortsubstanz teilgefüllt sind. Die verschiedenen Indikatortsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d sind hierbei so ausgewählt, dass ihre Schmelzpunkte verschieden sind und jeweils einem zu überwachenden Temperaturgrenzwert entsprechen.

15

Die Indikatorteinrichtung 21 wird in der in Figur 2B gezeigten ersten Lage auf die Lagertemperatur abgekühlt, wobei die Indikatorflüssigkeiten 7a, 7b, 7c, 7d jeweils im unteren Teilvolumen 24b des Zwischenraums 24 festfrieren.

20

Die Indikatorteinrichtung 21 wird nach dem Abkühlen auf die Lagertemperatur um 180° gedreht (zweite Lage) auf das Kryoröhrchen 1 aufgeschoben, was in Figur 2C dargestellt ist.

25

Ist nach der Lagerung oder auch während der Lagerung die in Figur 2C gezeigte Verteilung der Indikatortsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d, d. h., alle Indikatortsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d befinden sich im oberen Teil 24b des Zwischenraums 24 des Zylinders 21, festzustellen, ist keine der Schmelztemperaturen der Indikatortsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d erreicht worden. Befindet sich eine Indikatortsubstanz dagegen in dem Teilbereich 24a, wurde zwischenzeitlich ihr Schmelzpunkt überschritten.

30

Zur Vermeidung eines unberechtigten Austausches können die Ausdehnungskoeffizienten der Plastikmaterialien des Kryoröhrchens 1 und des Zylinders 21 unterschiedlich gewählt werden, und zwar so, dass ein Aufbringen des Zylinders 21 leicht unterhalb der niedrigsten Schmelztemperatur der Indikatorsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d erfolgt und dass bei der Lagertemperatur der Zylinder 21 mit der Außenwandung des Kryoröhrchens 1 verkeilt und damit schwerer abzulösen ist. Erwärmt nun jemand die Probe unerlaubt, müsste er sofort den Zylinder 21 austauschen, was dadurch vermieden werden kann, dass diese Zylinder 21 nicht frei an den Kryotanks verfügbar sind.

Figur 3 zeigt eine weitere Vorrichtung 30 zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe. Die Vorrichtung 30 weist analog zu Figur 2 einen hohlwandigen Zylinder 31 auf, der von unten oder oben auf ein Kryoröhrchen 1 aufgebracht werden kann. Der Unterschied zu der in Figur 2 gezeigten Variante liegt darin, dass der Zylinder 31 nur mit einer Indikatorsubstanz 7 partiell gefüllt ist. Der Zwischenraum 34 zwischen Außenwandung 22 und Innenwandung 23 des doppelwandigen Zylindermantels ist somit nicht wie in Figur 2 in fluidisch voneinander getrennte Teilräume unterteilt. Auch hier erfolgt das Einfrieren und Aufstecken in um 180° gedrehter Position, wie in Figur 3B und Figur 3C gezeigt. Sowohl der Zylinder 31 als auch die darin enthaltene Indikatorsubstanzmenge 7 können weitaus kürzer als auch geringer im Volumen ausgeführt werden als hier gezeigt ist, typischerweise 1/3 bis 1/5 der gezeigten Länge.

Figur 4 zeigt eine weitere Vorrichtung 40 zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe. Der Probenbehälter ist wiederum als Kryoröhrchen 1b ausgeführt. Am Kryoröhrchen 1b ist ein Bodenteil 43 befestigt, das vier Aufnahmezylinderöffnungen 45 aufweist, in die mit einer Indikatorsubstanz 7a, 7b, 7c, oder 7d partiell befüllte Stifte 42 mit einem zylindrischen Innenvolumen 44 eingefügt werden können. Das Einfrieren und Einfügen erfolgt analog zu den in Figur 2 und 3 gezeigten Ausführungsbeispielen, d. h. in jeweils um 180° zueinander gedrehten Lagen, und ergibt bei korrekter Lagerung das in Figur 4C gezeigte Bild. Sowohl die Aufnahmezylinder 45 als auch die Stifte 42 sind so ausgeführt, dass sie beim Einfügen arretiert werden.

Im Falle einer Überschreitung der jeweiligen Schmelztemperatur einer der Indikatorsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d fließt diese auf den Boden des Volumens 44, was leicht erkennbar oder detektierbar ist. Ist die Probe 6 stets unter den Schmelzpunkten der Indikatorsubstanzen 7a, 7b, 7c, 7d gehalten worden, ergibt sich stattdessen der Zustand wie in Figur 4C gezeigt. Auf diese Weise ist leicht eine unstatthafte Erwärmung der Probe 6 erkennbar.

Figur 5 zeigt zwei weitere Vorrichtungen 50 und 50a zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe.

Die Figur 5A zeigt ein Ausführungsbeispiel eines Kryoröhrchens 1, an dessen Seite eine Indikatoreinrichtung 51 drehbar befestigt ist. Die Indikatoreinrichtung 51 weist einen Hohlzylinder 52 auf, dessen Hohlraum 54 partiell mit einer Indikatorsubstanz 7 gefüllt ist. Der Hohlzylinder 52 ist über eine Achse 53 drehbar am Kryoröhrchen 1 befestigt. Der Durchmesser des Hohlzylinders 52 ist kleiner als der der Kryoröhrchens 1.

Um die Vorrichtung 50 zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe verwenden zu können, werden nun das Kryoröhrchen 1 und die Indikatoreinrichtung 51 in der in Figur 5A gezeigten Position (erste Lage) auf die Lagertemperatur gebracht. Die Indikatorsubstanz gefriert dabei im unteren Teilvolumen 54b des Hohlzylinders 52.

Die nunmehr vollständig gefrorene Indikatoreinrichtung 51 wird um 180° gedreht, wie in der vergrößerten Darstellung der Figur 5B illustriert ist, so dass die gefrorene Indikatorsubstanz 7 sich oben und der flüssigkeitsfreie Teil 54a unten befindet (zweite Lage).

In der in Figur 5C gezeigten zweiten Lage führt ein Schmelzen der Indikatorsubstanz durch den Einfluss der Schwerkraft dazu, dass die flüssig gewordene Indikatorsubstanz nach unten in den Teilbereich 54a fließt. An diesem Zustand kann somit analog wie in den Beispielen der vorherigen Figuren erkannt werden, ob eine unerwünschte, wenn auch nur zeitweise Erwärmung der Kryoprobe 6 stattgefunden hat.

Der partiell mit Indikatorsubstanz 7 gefüllte Hohlzylinder 52 kann entweder drehbar fest am Kryoröhrchen 1 befestigt sein oder mittels wenigstens einer Steckverbindung, Rastverbindung, Klemmverbindung, Schraubverbindung und/oder Klickverbindung drehbar und lösbar am Kryoröhrchen 1 befestigbar sein. In Figur 5B ist beispielhaft eine einklickbare Variante gezeigt.

Figur 5D zeigt eine weitere Variante 50a, die sich von der Vorrichtung 50 dadurch unterscheidet, dass nicht nur ein mit Indikatorsubstanz 7 gefüllter Hohlzylinder seitlich am Kryoröhrchen befestigt ist, sondern mehrere, wobei sich die Indikatorsubstanzen 7a, 7b, 7c in den Hohlzylindern 52a, 52b, 52c in ihren Schmelzpunkten unterscheiden, so dass verschiedene Temperaturgrenzwerte überwacht werden können.

Figur 6 zeigt zwei weitere Vorrichtungen 60 und 60a zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe. Figur 6 zeigt in der oberen Reihe A eine zylindrische Aufnahme 63 an der Außenwand des Kryoröhrchens 1, in die ein Hohlzylinder 61, dessen Innenraum 64 mit einer Indikatorsubstanz 7 teilgefüllt ist, hineingesteckt werden kann, wie es ganz rechts gezeigt ist. Die Scheibe 65 verhindert das Hindurchrutschen des Zylinders 61.

Analog zu den vorherigen Ausführungsvarianten wird die Indikatoreinrichtung in Form des teilgefüllten Hohlzylinders in einer ersten Lage unter den Schmelzpunkt der Indikatorflüssigkeit 7 abgekühlt. Figur 6A zeigt den Hohlzylinder 61 auf der Scheibe 65 stehend in dieser ersten Lage. Die Indikatorflüssigkeit fließt in den Teilbereich 64b und gefriert dort. Zur Kryolagerung wird der Hohlzylinder um 180° gedreht (zweite Lage) in die Aufnahme 63 eingesteckt, was rechts oben in Figur 6 dargestellt ist. In dieser Anordnung kann dann wieder geprüft werden, ob sich bei der Kryolagerung eine Lageveränderung der Indikatorsubstanz 7 im Innenraum 64 einstellt oder eingestellt hat.

Figur 6B zeigt, wie dieses Prinzip vervielfacht werden kann. Bei der Vorrichtung 60a sind mehrere Hohlzylinder 61 am Kryoröhrchen 1 befestigt, wobei sich die Indikatorsubstanzen in den Hohlzylindern 52a, 52b, 52c in ihren Schmelzpunkten unterscheiden, so dass verschiedene Temperaturgrenzwerte überwacht werden können.

Figur 7 illustriert anhand eines Ablaufdiagramms ein Verfahren zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe. In Schritt S1 wird eine Vorrichtung zur Temperaturüberwachung bereitgestellt, beispielsweise eine der Vorrichtungen 10, 20, 30, 40, 50, 50a, 60 oder 60a. Hierbei ist je nach Temperaturgrenzwert, der bei der Kryolagerung überwacht werden soll, eine geeignete Flüssigkeit oder ein Flüssigkeitsgemisch als Indikatorsubstanz 7 auszuwählen.

Über die Auswahl geeigneter Flüssigkeiten und das Mischungsverhältnis von Flüssigkeiten kann deren Schmelzpunkt auf einen gewünschten Wert in einem Bereich von  $-20\text{ °C}$  bis  $-140\text{ °C}$  festgelegt werden.

Beispielhaft ist in Figur 8A der Verlauf des Schmelzpunktes als Funktion des Mischungsverhältnisses aus einem Alkohol und Wasser angegeben, mit dem bei moderater Viskositäts-  
erhöhung mit abfallender Temperatur ein Temperaturbereich zwischen  $0\text{ °C}$  und  $-118\text{ °C}$  abgedeckt werden kann. Soll z. B. ein Temperaturgrenzwert von  $-118\text{ °C}$  überwacht werden, kann der Ethanol-Anteil auf 93,5 % festgelegt werden. Schmelzpunkte bis zu einem Wert von knapp unter  $-60\text{ °C}$  können auch durch Zumischung von Kaliumhydroxid (KOH) zu Wasser eingestellt werden, was in Figur 8B anhand eines Schmelzdiagramms  
gezeigt ist. Auch eine Mischung aus Wasser und Gefrierschutzmittel kann als Indikatorsubstanz verwendet werden, was durch das Schmelzdiagramm der Figur 9A illustriert ist. Die Tabelle der Figur 9B führt Gefrierpunkte/Schmelzpunkte weiterer reiner Flüssigkeiten auf, die alleine oder als Mischung mit einer anderen Flüssigkeit als Indikatorsubstanz verwendet werden können. Weitere als Indikatorsubstanz geeignete Flüssigkeitsgemische sind  
Chloroform-Zyklohexan-Gemische oder andere mischbare Flüssigkeiten, die z. B. aus der Mischbarkeitsmatrix von Lösemitteln der Figur 10 entnommen werden können.

Vornehmlich werden Flüssigkeiten und Plastikmaterialien mit guter Benetzbarkeit und niedriger Viskosität bei niedrigen Temperaturen ausgewählt, um die Lageveränderung möglichst umfangreich und die Zusatzkompartimente klein zu gestalten.



Falls mehrere Temperaturgrenzwerte bei der Kryolagerung überwacht werden sollen bzw. falls die erreichten Temperaturintervalle, in die die Probe gelangt ist, genauer eingegrenzt werden sollen, können entsprechend mehrere verschiedene Indikatorsubstanzen mit verschiedenen Schmelzpunkten verwendet werden, die dann in verschiedenen Hohlräumen bzw. Kammern am Probenbehälter angebracht werden.

In Schritt S2 wird dann die Indikatorsubstanz in dem Hohlraum der Indikatoreinrichtung eingefroren, wobei der Hohlraum während des Einfrierens der Indikatorsubstanz in eine erste Lage gebracht wird. Bei verschiedenen Indikatorsubstanzen und mehreren Hohlräumen werden diese analog jeweils in die erste Lage gebracht und eingefroren.

Danach wird in Schritt S3 der mindestens eine Hohlraum mit der gefrorenen Indikatorsubstanz in eine zweite Lage gebracht und, falls der mindestens eine Hohlraum noch nicht am Probenbehälter angeordnet ist, an diesem angeordnet. Die zweite Lage verändert die räumliche Lage der gefrorenen Indikatorsubstanz zumindest so weit, dass ein Schmelzen nach der Lageveränderung zu einer sichtbaren Verlagerung der Flüssigkeit oder ihrer Begrenzungsgeometrie in dem Hohlraum führt.

In diesem Zustand kann die Vorrichtung mit einer Kryoprobe im Aufnahmeraum des Probenbehälters bei einer Lagertemperatur unterhalb der Schmelztemperatur gelagert werden (Schritt S4).

Nachfolgend kann mittels der Indikatorsubstanz zu einem beliebigen Zeitpunkt während des Lagervorgangs überprüft werden, ob eine unerwünschte, wenn auch nur zeitweise Erwärmung der Kryoprobe stattgefunden hat (Schritt S5). Hierzu wird geprüft, ob eine durch einen Schmelzvorgang verursachte zumindest teilweise Verlagerung und/oder Formänderung der Indikatorsubstanz(en) stattgefunden hat. Ist dies der Fall, kann auf ein Überschreiten der zu überwachenden Grenztemperatur(en) geschlossen werden.

Obwohl die Erfindung unter Bezugnahme auf bestimmte Ausführungsbeispiele beschrieben worden ist, ist es für einen Fachmann ersichtlich, dass verschiedene Änderungen ausgeführt werden können und Äquivalente als Ersatz verwendet werden können, ohne den Bereich der Erfindung zu verlassen. Folglich soll die Erfindung nicht auf die offenbarten

Ausführungsbeispiele begrenzt sein, sondern soll alle Ausführungsbeispiele umfassen, die in den Bereich der beigefügten Patentansprüche fallen. Insbesondere beansprucht die Erfindung auch Schutz für den Gegenstand und die Merkmale der Unteransprüche unabhängig von den in Bezug genommenen Ansprüchen.

## ANSPRÜCHE

- 5 1. Vorrichtung (10; 20; 30; 40; 50; 50a; 60; 60a) zur Temperaturüberwachung einer kryokonservierten biologischen Probe, umfassend
- a) einen Probenbehälter (1; 1a; 1b) mit einem Aufnahmeraum (2) zur Aufnahme einer biologischen Probe (6); und
- b) eine außen am Probenbehälter anordenbare und/oder angeordnete
- 10 Indikatoreinrichtung (11; 11a; 21; 31; 41; 51; 61) zur Überwachung mindestens eines Temperaturgrenzwertes, aufweisend mindestens einen Hohlraum (14; 24; 34; 44; 54; 64), der lediglich zum Teil mit einer Indikatorsubstanz (7) gefüllt ist, deren Schmelztemperatur in einem Bereich von -20 °C bis -140 °C liegt.
- 15 2. Vorrichtung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Indikatoreinrichtung (11; 11a; 21; 31; 41; 51; 61) oder der zumindest eine Hohlraum der Indikatoreinrichtung
- a) lösbar am Probenbehälter (1; 1a; 1b) befestigbar und/oder befestigt ist; und/oder
- b) mittels wenigstens einer Steckverbindung, Rastverbindung, Klemmverbindung, Schraubverbindung und/oder Klick-Verbindung lösbar am Probenbehälter befestigbar ist.
- 20 3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Indikatoreinrichtung (11; 11a; 21; 31; 41; 51; 61) an mindestens einer Stelle transparent oder semi-transparent ist, so dass der mindestens eine Hohlraum (14; 24; 34; 44; 54; 64) von außen beobachtbar ist.
- 25 4. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Probenbehälter (1; 1a; 1b) ein Kryoröhrchen ist.
5. Vorrichtung (10) nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die
- 30 Indikatoreinrichtung (11, 11a) als ein zylinderförmiger Körper ausgeführt ist, der als Bodenteil am Kryoröhrchen (1a) befestigbar ist.

6. Vorrichtung (10) nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Körper

- a) den gleichen Außendurchmesser wie das Kryoröhrchen (1a) aufweist und/oder
- b) transparent oder semitransparent ausgeführt ist.

5

7. Vorrichtung (10) nach einem der vorherigen Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Indikatoreinrichtung (11, 11a) als ein allseitig geschlossener Hohlzylinder ausgeführt ist, der an der Unterseite des Probenbehälters lösbar befestigbar ist und dessen Innenraum (14) den mindestens einen Hohlraum ausbildet.

10

8. Vorrichtung (40) nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Indikatoreinrichtung (41) als Bodenteil am Probenbehälter (1b) befestigt ist und an ihrer Unterseite mindestens eine Einstecköffnung (45) aufweist, in der ein Behälter, insbesondere ein stiftförmiger Behälter (42), der lediglich zum Teil mit der Indikatorsubstanz gefüllt ist, lösbar gehalten ist.

15

9. Vorrichtung (30) nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Indikatoreinrichtung als ein Hohlzylinder (21) ausgeführt ist, der zur Befestigung am Kryoröhrchen auf eine äußere Mantelfläche des Kryoröhrchens (1) aufschiebbar ist und/oder aufgeschoben ist, wobei der Hohlzylinder (21) doppelwandig mit einer Innenwandung (23) und einer Außenwandung (22) ausgeführt ist, wobei ein Zwischenraum (24) zwischen der Innenwandung (23) und der Außenwandung (22), die den mindestens einen Hohlraum ausbildet, zum Teil mit der Indikatorsubstanz gefüllt ist.

20

25 10. Vorrichtung (30) nach Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Hohlzylinder (21) aus einem ersten Kunststoffmaterial und das Kryoröhrchen (1) aus einem zweiten Kunststoffmaterial hergestellt sind, wobei das erste Kunststoffmaterial bei einer Temperaturverringerung, zumindest in einem Temperaturbereich unterhalb der Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz, eine größere thermische Kontraktion als das  
30 zweite Kunststoffmaterial aufweist.

11. Vorrichtung (50; 50a) nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Indikatoreinrichtung (51) mindestens einen Hohlkörper, insbesondere einen länglichen Hohlkörper (52), aufweist, der lediglich zum Teil mit der Indikatorsubstanz (7) gefüllt ist und an einer seitlichen Außenwand des Probenbehälters (1) befestigt ist.

5

12. Vorrichtung nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Hohlkörper (52)

- a) drehbar am Probenbehälter (1) befestigt ist; und/oder
- b) mittels einer Steck-, Klick- oder Rast-Verbindung (53) am Probenbehälter (1) befestigt ist.

10

13. Vorrichtung (60) nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, dass an einer seitlichen Außenwand des Probenbehälter (1) eine Aufnahme (63), beispielsweise eine Hülse oder Einstecktasche, befestigt ist, in die der Hohlkörper (61) zur Halterung am Probenbehälter einsteckbar und/oder eingesteckt ist.

15

14. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **gekennzeichnet durch** eine optische oder optoelektrische Messeinrichtung, die ausgebildet ist, eine Lage und/oder Form der Indikatorsubstanz in dem mindestens einen Hohlraum der Indikatoreinrichtung zu erfassen.

20

15. Verfahren zur Temperaturüberwachung von kryokonservierten Proben, umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen einer Vorrichtung zur Temperaturüberwachung nach einem der vorhergehenden Ansprüche (S1);

25 b) Einfrieren der Indikatorsubstanz(en), wobei

der mindestens eine Hohlraum der Indikatoreinrichtung während des Einfrierens der Indikatorsubstanz(en) in eine erste Lage gebracht wird (S2) und nach dem Einfrieren und bei einer Temperatur der Indikatorsubstanz(en) unterhalb der Schmelztemperatur in eine zweite Lage gebracht wird (S3), in der ein Schmelzen der Indikatorsubstanz(en) durch den Einfluss

30 der Schwerkraft zu einer zumindest teilweisen Verlagerung und/oder Formänderung der Indikatorsubstanz in dem mindestens einen Hohlraum führt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, **dadurch gekennzeichnet**, dass eine Substanz Indikatorsubstanz ausgewählt wird, deren Schmelztemperatur oder deren Schwellentemperatur, bei der die Viskosität der geschmolzenen Indikatorsubstanz einen bestimmten Zielwert unterschreitet, einer vorbestimmten Grenztemperatur, deren Überschreiten überwacht werden soll, entspricht.
17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, **gekennzeichnet durch** a) das Lagern einer kryokonservierten Probe in dem Probenbehälter (S4); und  
b) das Feststellen, ob eine durch ein zeitweises Überschreiten der Schmelztemperatur der Indikatorsubstanz erfolgte Änderung der Form, Anordnung, insbesondere Lage, der Indikatorsubstanz stattgefunden hat (S5).
18. Vorrichtung oder Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Indikatorsubstanz mindestens einen Alkohol, welcher aus der Gruppe, die Octan-1-ol, Nonan-1-ol, Propan-1,2-diol, Propan-1,3-diol, Butan-1,2-diol, Butan-1,3-diol, Butan-2-ol, Pentan-1,5-diol, Pentan-1-ol, Cyclopentanol, Benzylalkohol umfasst, ausgewählt ist, sowie optional mindestens einen Farbstoff umfasst.
19. Vorrichtung oder Verfahren nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, dass der Farbstoff aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Triphenylmethanfarbstoffe, Rhodaminfarbstoffe, insbesondere Xanthene, Azofarbstoffe sowie Phenazin- und Phenothiazinfarbstoffe umfasst.
20. Vorrichtung oder Verfahren nach Anspruch 18 oder 19, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Indikatorsubstanz mindestens zwei Alkoholkomponenten, welche aus der Gruppe, die Octan-1-ol, Nonan-1-ol, Propan-1,2-diol, Propan-1,3-diol, Butan-1,2-diol, Butan-1,3-diol, Butan-2-ol, Pentan-1,5-diol, Pentan-1-ol, Cyclopentanol, Benzylalkohol umfasst, ausgewählt sind, umfasst und/oder die Indikatorsubstanz mindestens einen Farbstoff umfasst, der aus der Gruppe ausgewählt ist, welche Oil Red, Methylrot, Brillantgrün, Rhodamin B, Neutralrot, Methyleneblau oder andere Farbstoffe, die zur Anfärbung von Zellen in der Zytologie verwendet werden, umfasst.

FIG. 1

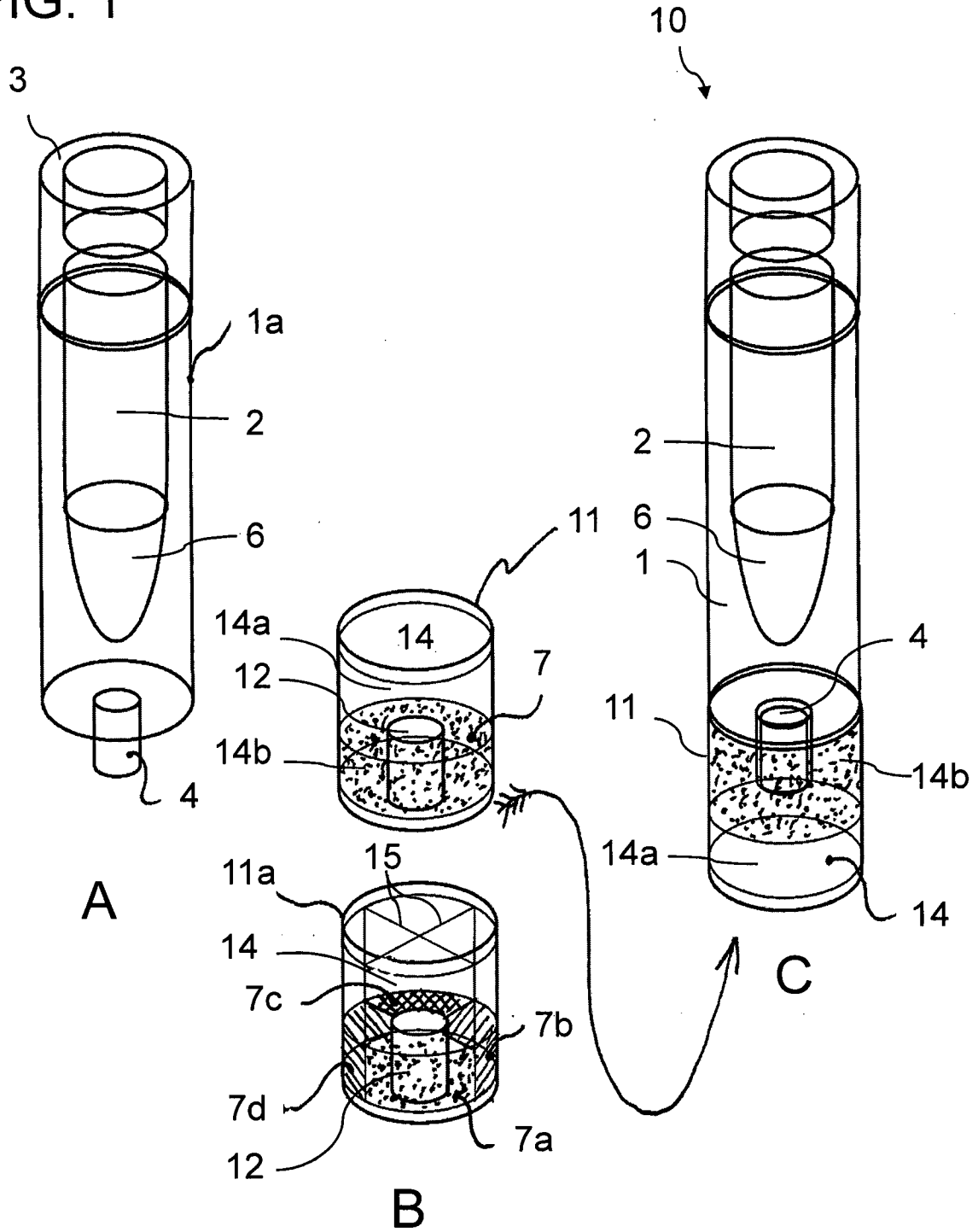


FIG. 2

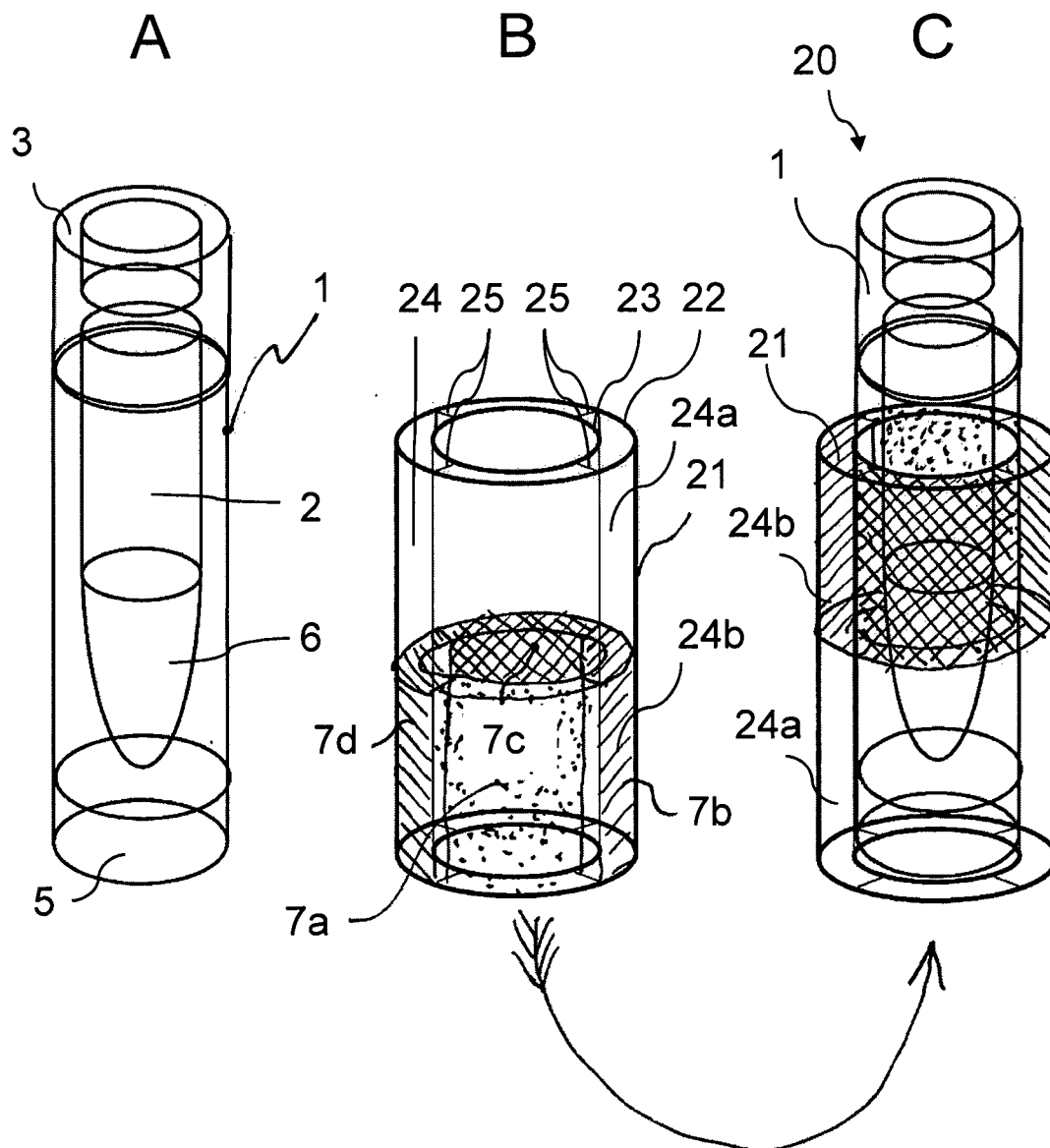




FIG. 3

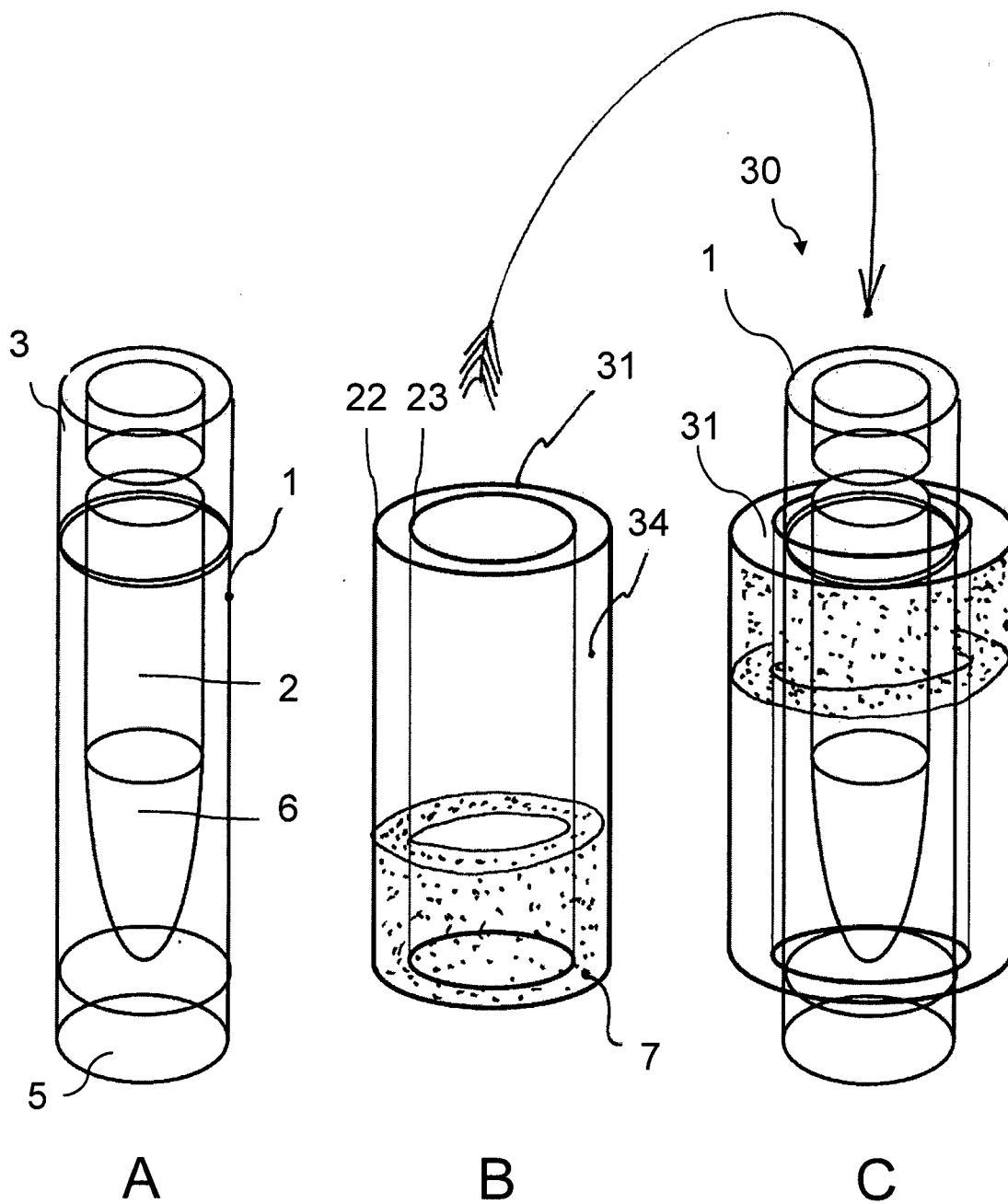


FIG. 4

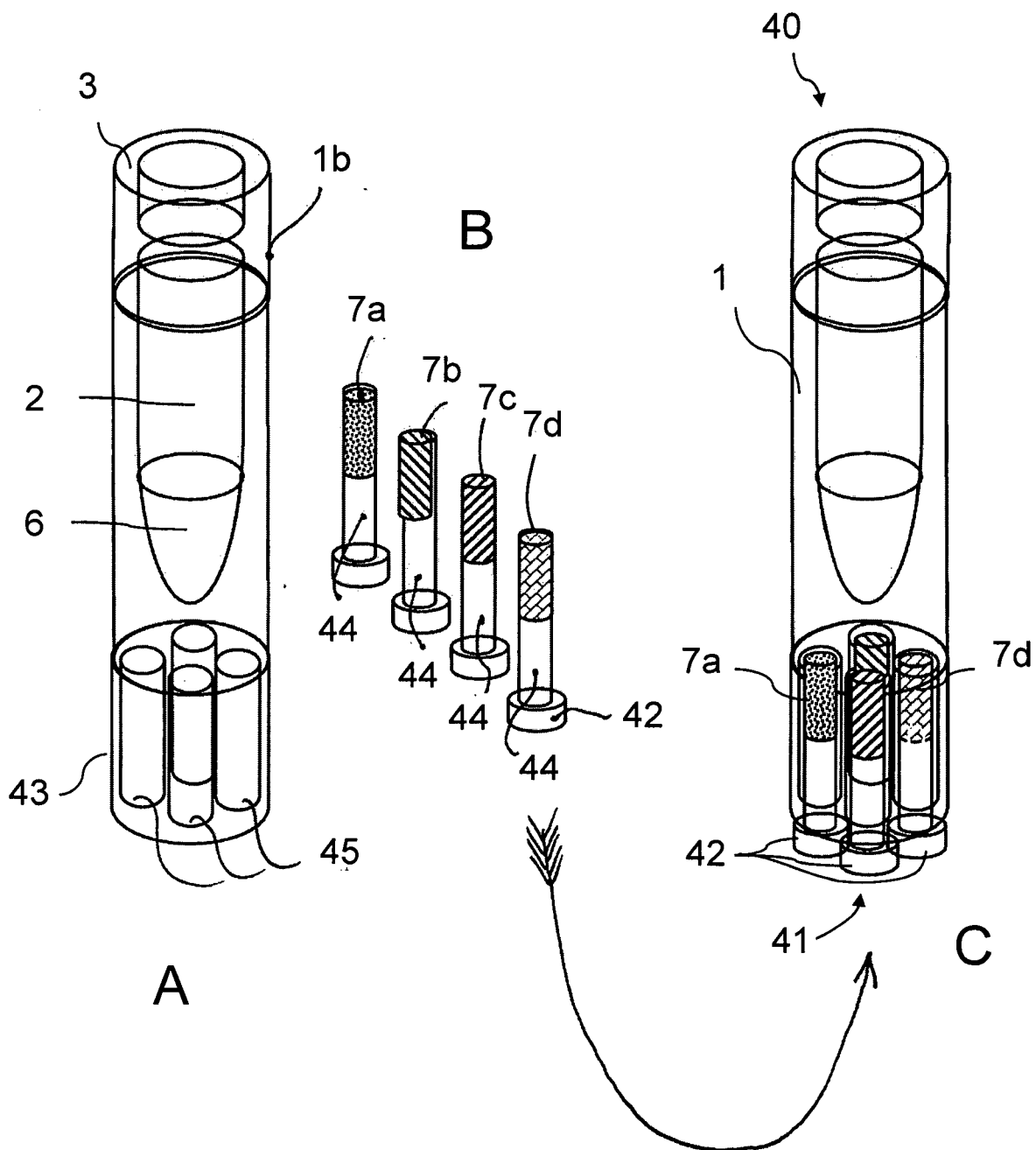


FIG. 5

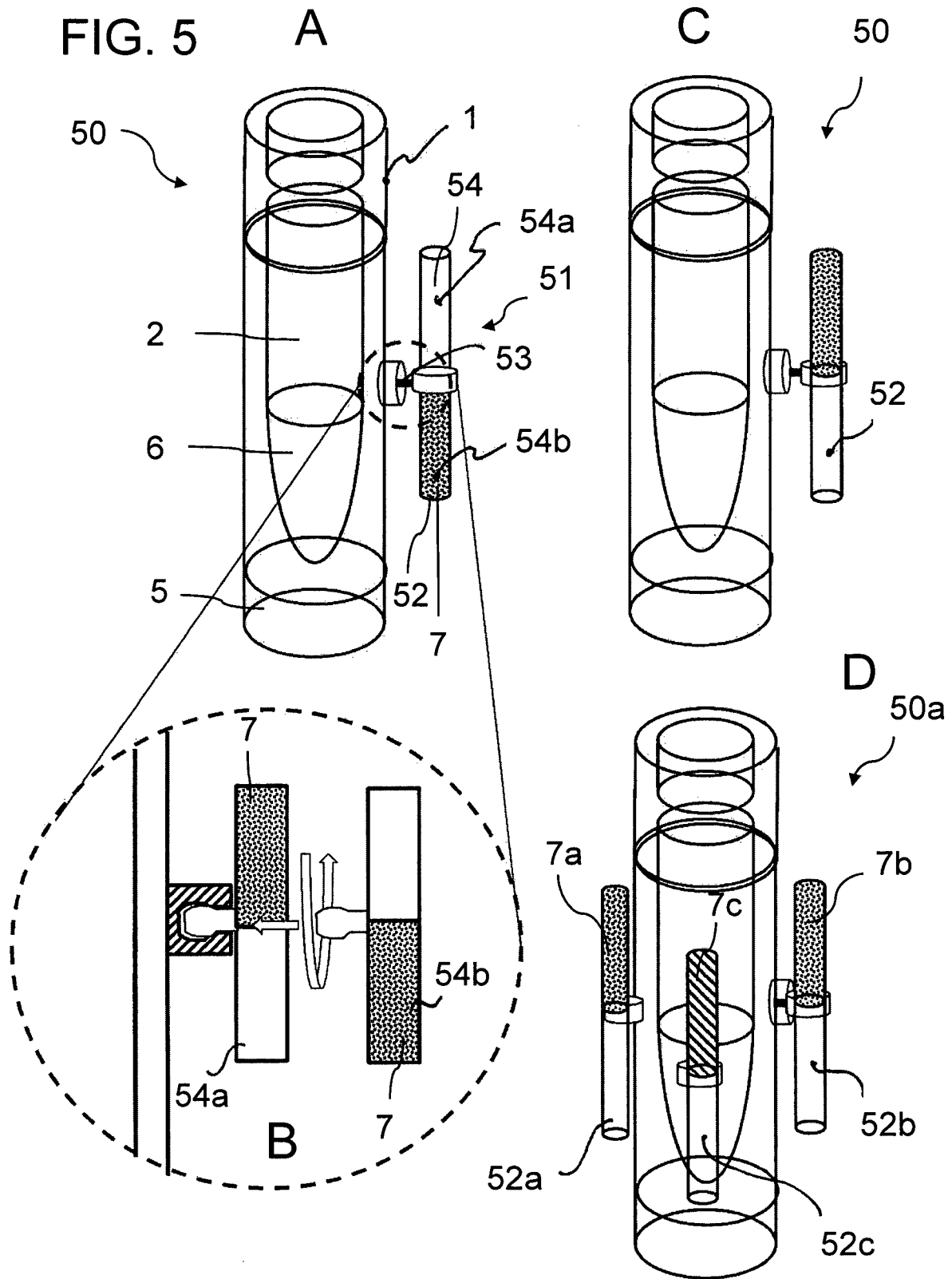


FIG. 6

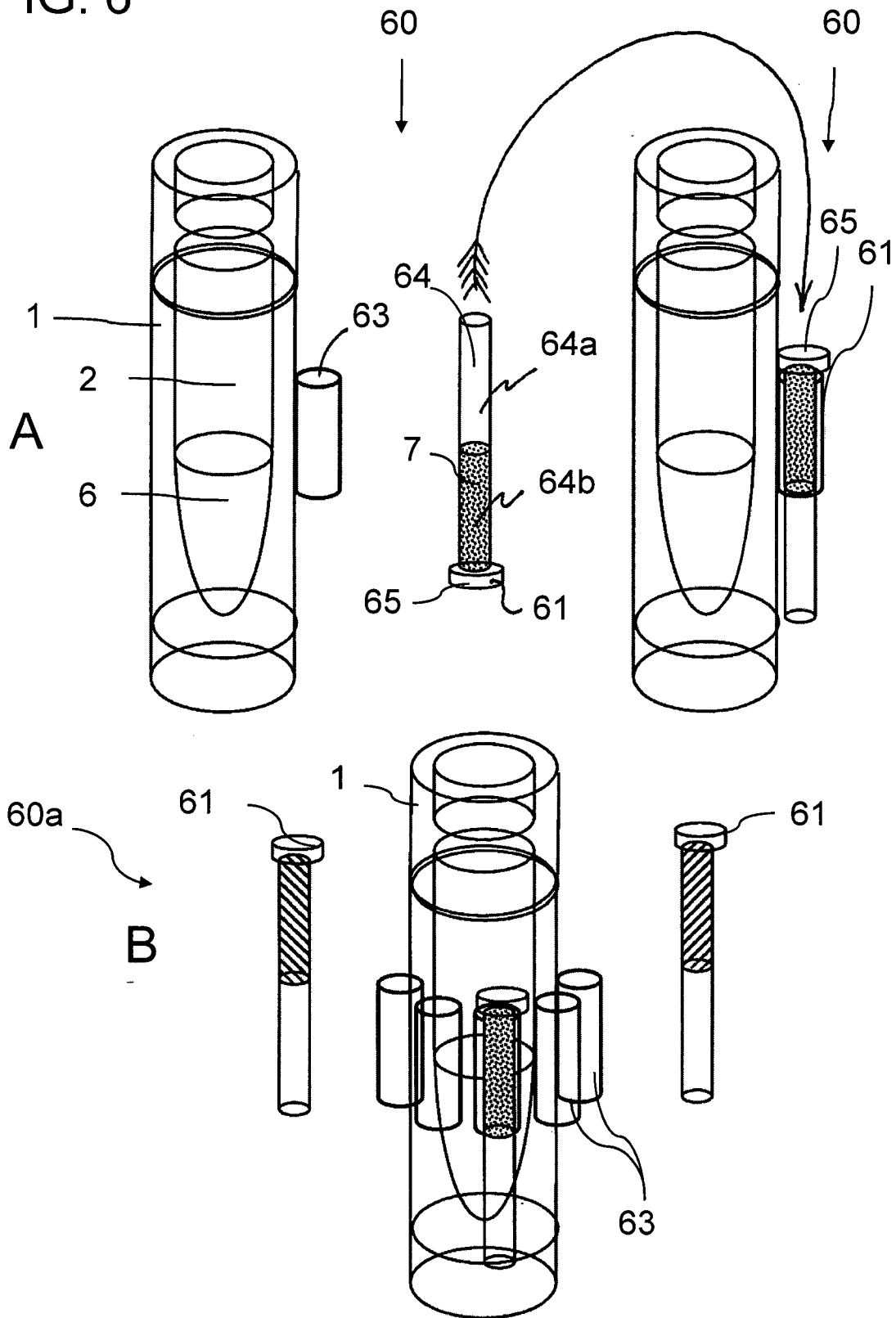


FIG. 7

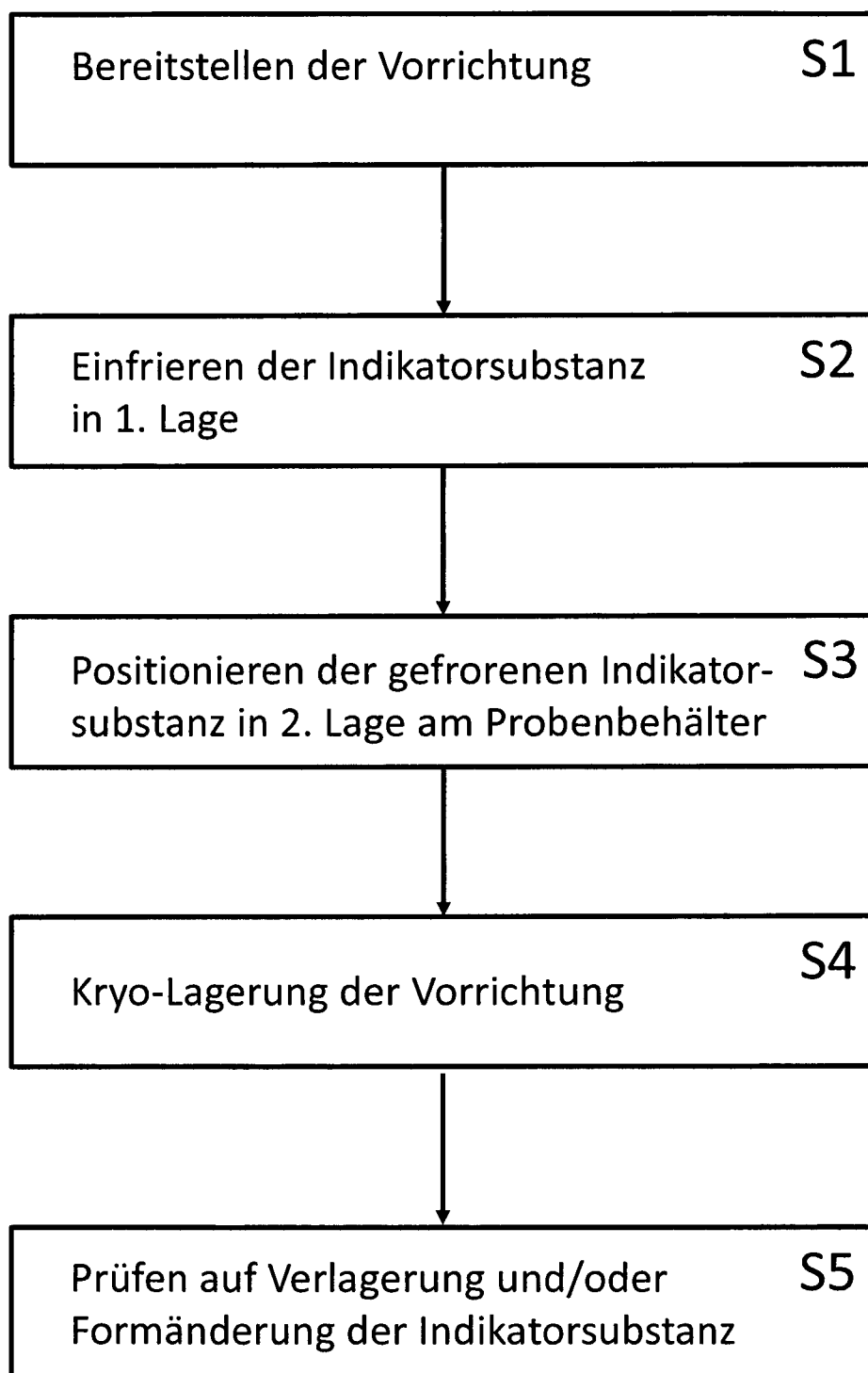


FIG. 8A

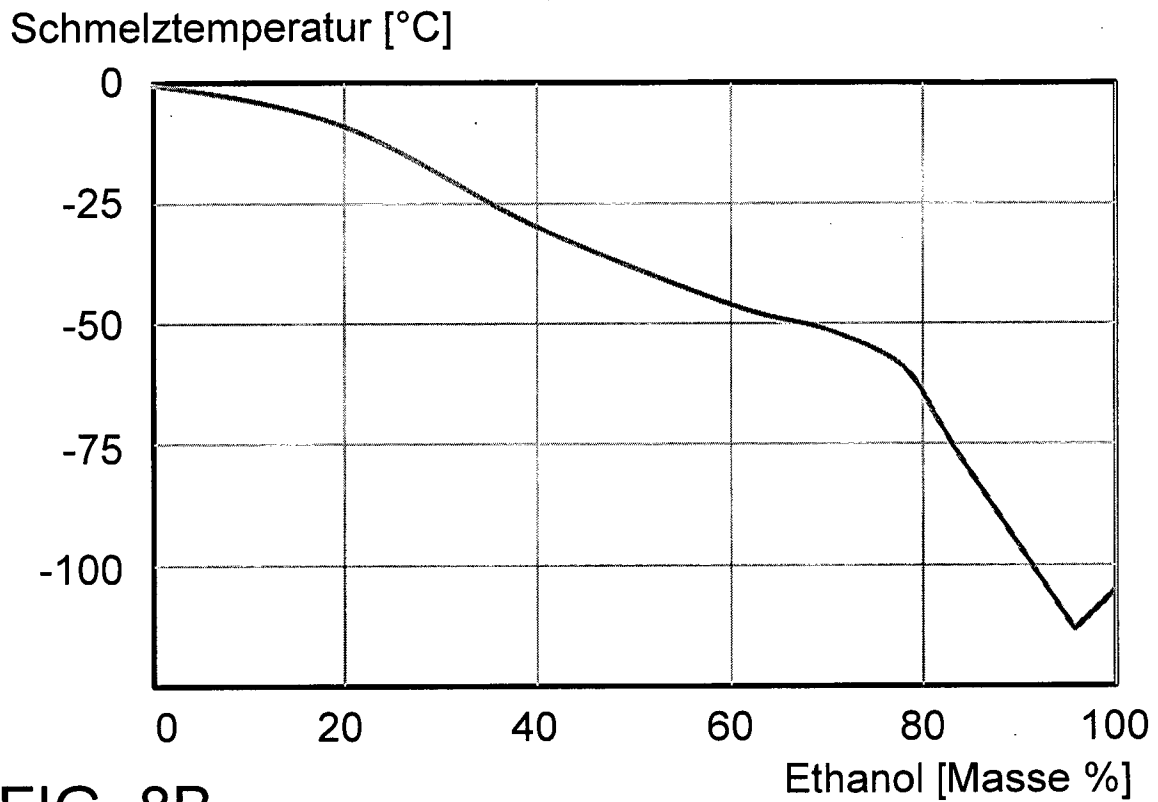


FIG. 8B

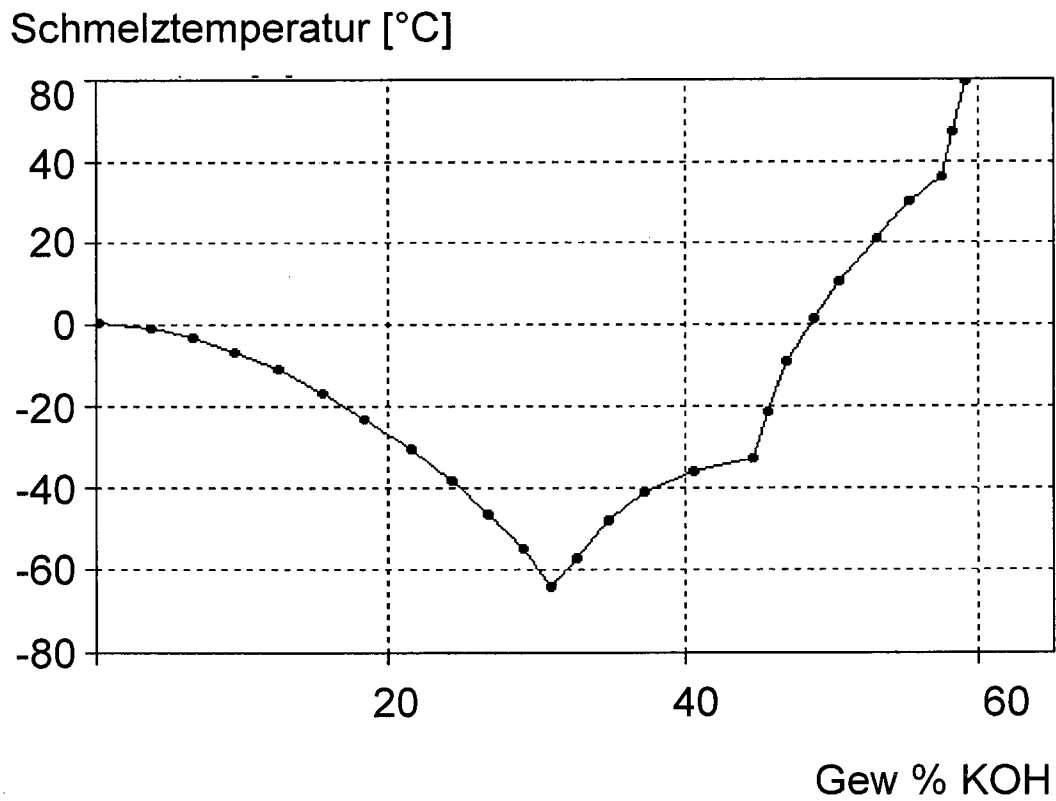


FIG. 9A

Schmelztemperatur [°C]

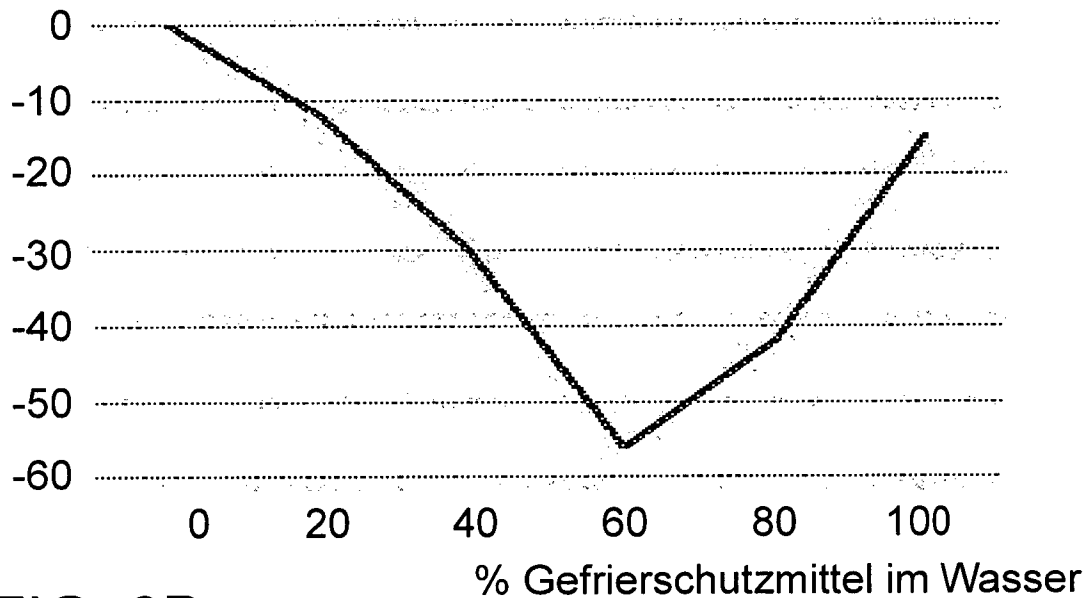


FIG. 9B

Ammoniak	-77,8
Ethylalkohol	-114,5
Benzol	+ 5,5
Brom	-7,3
Chloroform	-63,5
Diethylether	-116,3
Essigsäure	+ 16,7
Glycerin	-18,0
Isopentan	-160,0
Methylalkohol	-97,9
Propylalkohol	-127,0
Quecksilber	-38,9
Schwefelkohlenstoff	-111,6
Tetrachlorkohlenstoff	-22,9
Toluol	-94,5

FIG. 10

	Aceton	Acetonitril	Tetrachlorkohlenstoff	Chloroform	Cyclohexan	1,2 Dichlorethan	Dichlormethan	Diethylether	Dimethylformamid	Dimethylsulfoxid	1,4-Dioxan	Ethanol	Ethylacetat	Heptan	Hexan	Methanol	Methyl-tert-butylether	Pentan	Propan-1-ol	Propan-2-ol	Tetrahydrofuran	Toluol	2,2,4-Trimethylpentan	Wasser	
Aceton	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Acetonitril	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Tetrachlorkohlenstoff	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Chloroform	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Cyclohexan	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1,2 Dichlorethan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Dichlormethan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Diethylether	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Dimethylformamid	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Dimethylsulfoxid	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
1,4-Dioxan	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ethylacetat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Heptan	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Hexan	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Methanol	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Methyl-tert-butylether	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pentan	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Propan-1-ol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propan-2-ol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tetrahydrofuran	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Toluol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
2,2,4-Trimethylpentan	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Wasser	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/000404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. A01N1/02  
ADD. G01K3/04 G01K11/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
A01N G01K A61D A61M A61J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 5 282 684 A (HOLZER WALTER [DE]) 1 February 1994 (1994-02-01) the whole document	1-7, 11-20 8-10
X	WO 00/47964 A1 (TEMP TELL LIMITED [GB]; TESTER RICHARD [GB]) 17 August 2000 (2000-08-17) page 5 page 10 - page 17 page 30; figure 1	1-3,7, 11,13-20
A	US 3 701 282 A (PETERSON JOHN B) 31 October 1972 (1972-10-31) the whole document	1-20
A	US 2006/078036 A1 (WIEDER HORST K [US]) 13 April 2006 (2006-04-13) the whole document	1-20
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  26 June 2017	Date of mailing of the international search report  11/07/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Küster, Gunilla

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2017/000404

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR 3 013 836 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 29 May 2015 (2015-05-29) the whole document -----	1,3,4, 14-20
X	WO 2007/085385 A1 (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG [DE]; FUHR GUENTER R [DE]; ZIMMERMANN HEIKO []) 2 August 2007 (2007-08-02) page 23, line 8 - page 24, line 16; figures -----	1-4, 14-20
X	DE 37 16 972 A1 (HOLZER WALTER [DE]) 1 December 1988 (1988-12-01) the whole document -----	1,3, 14-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/EP2017/000404
---

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5282684	A	01-02-1994	DE 3712201 A1 01-09-1988 US 5282684 A 01-02-1994
-----			
WO 0047964	A1	17-08-2000	AU 2448200 A 29-08-2000 CA 2362037 A1 17-08-2000 EP 1159593 A1 05-12-2001 US 7036452 B1 02-05-2006 WO 0047964 A1 17-08-2000
-----			
US 3701282	A	31-10-1972	NONE
-----			
US 2006078036	A1	13-04-2006	NONE
-----			
FR 3013836	A1	29-05-2015	FR 3013836 A1 29-05-2015 WO 2015078767 A1 04-06-2015
-----			
WO 2007085385	A1	02-08-2007	AT 519365 T 15-08-2011 AT 535142 T 15-12-2011 DE 102006003995 A1 09-08-2007 DE 102006055331 A1 09-08-2007 EP 1976374 A1 08-10-2008 EP 2108258 A1 14-10-2009 ES 2375752 T3 06-03-2012 JP 5057343 B2 24-10-2012 JP 2009524806 A 02-07-2009 KR 20080096752 A 03-11-2008 US 2009029341 A1 29-01-2009 WO 2007085385 A1 02-08-2007
-----			
DE 3716972	A1	01-12-1988	DE 3716972 A1 01-12-1988 JP S6453124 A 01-03-1989 US 4998827 A 12-03-1991
-----			

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. A01N1/02 ADD. G01K3/04 G01K11/06		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole ) A01N G01K A61D A61M A61J		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X A	US 5 282 684 A (HOLZER WALTER [DE]) 1. Februar 1994 (1994-02-01) das ganze Dokument -----	1-7, 11-20 8-10
X	WO 00/47964 A1 (TEMP TELL LIMITED [GB]; TESTER RICHARD [GB]) 17. August 2000 (2000-08-17) Seite 5 Seite 10 - Seite 17 Seite 30; Abbildung 1 -----	1-3,7, 11,13-20
A	US 3 701 282 A (PETERSON JOHN B) 31. Oktober 1972 (1972-10-31) das ganze Dokument -----	1-20
A	US 2006/078036 A1 (WIEDER HORST K [US]) 13. April 2006 (2006-04-13) das ganze Dokument -----	1-20
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
26. Juni 2017		11/07/2017
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Küster, Gunilla

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR 3 013 836 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 29. Mai 2015 (2015-05-29) das ganze Dokument -----	1,3,4, 14-20
X	WO 2007/085385 A1 (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG [DE]; FUHR GUENTER R [DE]; ZIMMERMANN HEIKO [DE]) 2. August 2007 (2007-08-02) Seite 23, Zeile 8 - Seite 24, Zeile 16; Abbildungen -----	1-4, 14-20
X	DE 37 16 972 A1 (HOLZER WALTER [DE]) 1. Dezember 1988 (1988-12-01) das ganze Dokument -----	1,3, 14-20

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/000404

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5282684	A	01-02-1994	DE 3712201 A1 01-09-1988 US 5282684 A 01-02-1994
WO 0047964	A1	17-08-2000	AU 2448200 A 29-08-2000 CA 2362037 A1 17-08-2000 EP 1159593 A1 05-12-2001 US 7036452 B1 02-05-2006 WO 0047964 A1 17-08-2000
US 3701282	A	31-10-1972	KEINE
US 2006078036	A1	13-04-2006	KEINE
FR 3013836	A1	29-05-2015	FR 3013836 A1 29-05-2015 WO 2015078767 A1 04-06-2015
WO 2007085385	A1	02-08-2007	AT 519365 T 15-08-2011 AT 535142 T 15-12-2011 DE 102006003995 A1 09-08-2007 DE 102006055331 A1 09-08-2007 EP 1976374 A1 08-10-2008 EP 2108258 A1 14-10-2009 ES 2375752 T3 06-03-2012 JP 5057343 B2 24-10-2012 JP 2009524806 A 02-07-2009 KR 20080096752 A 03-11-2008 US 2009029341 A1 29-01-2009 WO 2007085385 A1 02-08-2007
DE 3716972	A1	01-12-1988	DE 3716972 A1 01-12-1988 JP S6453124 A 01-03-1989 US 4998827 A 12-03-1991