



(19)  
**Bundesrepublik Deutschland**  
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 10 2007 054 691 A1** 2009.05.20

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2007 054 691.4**

(22) Anmeldetag: **14.11.2007**

(43) Offenlegungstag: **20.05.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12M 1/40 (2006.01)**

**C12M 1/26 (2006.01)**

**C12M 3/04 (2006.01)**

(71) Anmelder:

**Leibniz-Institut für Neue Materialien  
 gemeinnützige GmbH, 66123 Saarbrücken, DE**

(74) Vertreter:

**Patentanwaltskanzlei Vièl & Wieske, 66119  
 Saarbrücken**

(72) Erfinder:

**Veith, Michael, Prof. Dr., 66386 St. Ingbert, DE;  
 Narz, Frank, Dr., 58456 Witten, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu  
 ziehende Druckschriften:

**DE10 2006 013484 A1**

**WO 07/0 82 302 A2**

**WO 06/0 27 274 A1**

**WO 04/0 80 578 A1**

**WO 04/0 31 721 A2**

**WO 04/0 29 221 A2**

**EP 18 97 936 A1**

**KWON, K.W., et.al.: Label-free, microfluidic separati  
 on and enrichment of human breast cancer cells  
 by**

**adhesion difference. In Lab Chip**

**7, 2007, S. 1461-1468**

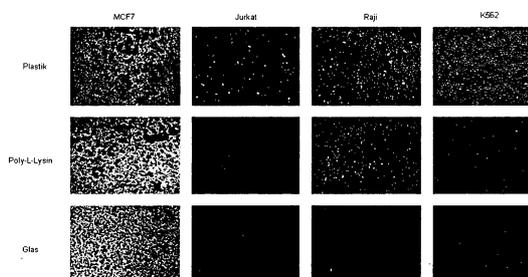
**\$Fig. 6A, S. 26-29\$;**

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Verwendung von nanostrukturierten Oberflächen und Verfahren zum Anreichern oder Isolieren  
 von zellulären Subpopulationen**

(57) Hauptanspruch: Verwendung von nanostrukturierten  
 Oberflächen zur Isolierung und/oder Anreicherung von zel-  
 lulären Subpopulationen aus einer komplexen Mischung.



**Beschreibung**

**[0001]** Die Erfindung betrifft die Verwendung von nanostrukturierten Oberflächen. Sie betrifft ebenfalls ein Verfahren zum Anreichern oder Isolieren von zellulären Subpopulationen.

**[0002]** Das Anreichern oder Isolieren von zellulären Subpopulationen aus einer komplexen Mischung (z. B. T-Zellen aus Blut) ist ein bedeutender Schritt bei der voranalytischen Probenzubereitung. Es erfolgt derzeit unter Verwendung von Antikörpern, die gegen ein bestimmtes Oberflächenprotein gerichtet sind und magnetischen Partikeln, um die gebundenen Zellen aus der Probe zu entfernen, was jedoch mit folgenden Nachteilen verbunden ist:

- Die interessierenden Zellen müssen ein spezifisches Oberflächenprotein ausdrücken.
- Ein Antikörper gegen dieses Protein muß zur Verfügung stehen.
- Die Aufbewahrung der Antikörper ist problematisch.
- Antikörper sind teuer.
- Beim Binden des Antikörpers an das Oberflächenprotein kann die Zellphysiologie verändert werden.

**[0003]** Statt der magnetpartikelbasierten Isolierung können auch fluoreszierende Antikörper in Verbindung mit einem FACS (fluorescence associated cell sorter, fluoreszenzbasierter Zellsortierer) verwendet werden. Auch hier stellt sich das Problem der Kosten und zudem das der komplexen apparativen Mittel.

**[0004]** Weiter können physikalische Parameter, wie beispielsweise die Zelldichte (HEXAL Oncoquick, [http://www.hexal-gentech.com/products/man\\_e.pdf](http://www.hexal-gentech.com/products/man_e.pdf)) oder die Zellgröße (Am. J. Pathol, 2000, (1), 156, 57–63, Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells, Giovanna Vona et. al.) verwendet werden. Da jedoch nicht jeder Zelltyp charakteristische physikalische Parameter aufweist, ist dies nur möglich, wenn die interessierenden Zellen charakteristische physikalische Parameter aufweisen.

**[0005]** Aufgabe der Erfindung ist es, ein einfaches, vielseitig verwendbares und spezifisches Verfahren zum Anreichern oder Isolieren von zellulären Subpopulationen aus einer komplexen Mischung zu schaffen.

**[0006]** Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Verwendung von nanostrukturierten Oberflächen zur Isolierung und Anreicherung von zellulären Subpopulationen aus einer komplexen Mischung gelöst.

**[0007]** Es hat sich im Rahmen der Erfindung überraschend gezeigt, dass auf derartigen nanostrukturierten Oberflächen bestimmte zelluläre Subpopulationen selektiv und in bisher nicht bekannter Effizienz

deutlich besser als andere Substrate anhaften.

**[0008]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bestehen solche nanostrukturierten Oberflächen aus eindimensionalen Nanodrähten, wie sie in der DE 10 2006 013 484 A1 beschrieben sind. Hierbei bestehen die Nanodrähte aus einem metallischen Kern und sind ummantelt mit einer keramischen Hülle und eignen sich in besonderer Weise zum Anreichern oder Isolieren von zellulären Subpopulationen aus einer komplexen Mischung erreicht.

**[0009]** Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass die verzweigten Nanostrukturen eindimensionale Kompositstrukturen mit zwei Dimensionen im Submikrometerbereich sind und diese Kompositstrukturen aus dem Kern eines Materials, insbesondere Metall, und einer Hülle eines anderen Materials, insbesondere aus Keramik, aufgebaut sind und durch thermolytische Zersetzung von Verbindungen der allgemeinen Struktur  $Ei(OR)_2$ ,  
 – in der Ei die Elemente Al, Ga, In und Tl bedeutet und  
 – R für ein Alkyl (C3–C10) oder ein Cycloalkyl (C5–C8) steht, gemäß der DE 10 2006 013 484 A1 herstellbar sind.

**[0010]** Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass die zellulären Subpopulationen bestimmte humane oder veterinäre Zellen sind und dass die komplexe Mischung Plasma ist.

**[0011]** Eine Ausbildung der Erfindung besteht darin, dass das Plasma Humanplasma ist.

**[0012]** Eine bevorzugte Ausbildung der Erfindung besteht darin, dass die selektiv adsorbierten Blutzellen nicht intrinsisch anhaftende Zellen, insbesondere Jurkatzellen sind.

**[0013]** Unter nicht intrinsisch anhaftenden Zellen werden solche Zellen verstanden, die normalerweise in einer Suspension leben. Das Kultivieren solcher Zellen auf einem Substrat ist in der Regel sehr problematisch.

**[0014]** Im Rahmen der Erfindung liegt auch ein Verfahren zum Anreichern oder Isolieren von zellulären Subpopulationen, wobei die zellulären Subpopulationen sich an nanostrukturierten Oberflächen anreichern.

**[0015]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die nanostrukturierten Oberflächen aus eindimensionalen Nanodrähten aufgebaut, bestehend aus einem metallischen Kern und ummantelt mit einer keramischen Hülle, wie sie in der DE 10 2006 013 484 A1 beschrieben sind. Auf diesen Strukturen adhären Zellen selektiv, reichern sich somit an.

**[0016]** Es liegt im Rahmen der Erfindung, dass die zellulären Subpopulationen bestimmte Blutzellen sind und dass die komplexe Mischung Plasma ist.

**[0017]** Zur Erfindung gehörig ist, dass das Plasma Humanplasma ist.

**[0018]** Schließlich ist es erfindungsgemäß vorgesehen, dass die zellulären Subpopulationen nicht intrinsisch anhaftende Zellen, insbesondere Jurkatzellen sind.

**[0019]** Nachfolgend wird die Erfindung näher anhand von Versuchen in nicht einschränkender Weise erläutert. Die Versuchsergebnisse sind in den Figuren dargestellt.

**[0020]** Es zeigen

**[0021]** [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von verschiedenen Zellkulturen auf verschiedenen Substraten sowie nach Trypsination,

**[0022]** [Fig. 2](#) eine EDX-Aufnahme der nanokristallinen Oberfläche gemäß der Erfindung.

**[0023]** Beobachtet wurde das Wachstum von eukaryotischen Zellen auf Uhrgläsern, die mit eindimensionalen Kompositstrukturen im Submikrometerbereich beschichtet sind und die einen Kern eines Materials und eine Hülle eines anderen Materials aufweisen

**[0024]** Es wurden runde Uhrgläser (Menzel-Gläser, Deutschland, No. CB00120RA1, 12 mm Durchmesser, 0,13–0,16 mm Stärke, Los Nr. 4710486) verwendet.

**[0025]** Ein Teil dieser Uhrgläser wurden mit einer eindimensionalen Kompositstruktur gemäß der DE 10 2006 013 484 A1 auf Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Basis beschichtet.

**[0026]** Um Verunreinigungen zu entfernen, wurden sowohl die beschichteten als auch die nicht beschichteten Uhrgläser wie folgt behandelt:

- Die Uhrgläser werden (gegebenenfalls mit der beschichteten Seite nach oben) in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit 24 Plätzen eingebracht
- Es werden 500 µl 70%iger Ethanol zugegeben und 5 min in den Uhrgläsern belassen
- Es wird 3 mal mit je 500 µl sterilem Wasser gespült
- Es wird 3 mal mit je 500 µl sterilem PBS (phosphatpufferter Salzlösung) gespült

**[0027]** Es werden mit sterilem Poly-Lysin (BD Biosciences, 352085) beschichtete Uhrgläser und nicht hiermit beschichtete Uhrgläser verwendet, wobei erstere nur gewaschen wurden. Zusätzlich wurden Zellen

ohne Uhrgläser direkt in der 24-plätzigem Zellkulturplatte kultiviert.

**[0028]** Die Zellen wurden in 1 ml Serum, das Zellkulturmedium enthält, in geeigneter Dichte (typischerweise 4–8 · 10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung) aufgegeben und bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

**[0029]** Die Zellen wurden bis zu 72 h kultiviert und täglich mittels eines Lichtmikroskops inspiziert. Anschließend wurden nichtanhaftende Zellen weggewaschen, indem die Vertiefungen und Uhrgläser zweimal mit 1000 µl PBS gespült wurden. Die verbleibenden anhaftenden Zellen wurden durch Zugabe von 500 µl 100%igem Ethanol (5 min, RT) fixiert. Nach dem Entfernen des Ethanols wurden die Zellkerne durch Zugabe von 500 µl Hoechst 33342 (Invitrogen, 0,1% in PBS) gefärbt. Mikroskopische Aufnahmen wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops gefertigt.

**[0030]** Es wurde die folgende Versuchsreihe durchgeführt:

#### Versuch

**[0031]** In diesem Versuch wurden (07D.0031 pp38; CK) wurden Jurkat-(humane T-Zell Linie in Suspension), Raji Zellen (humane Macrophagenzelllinie in Suspension), K562-(humane B-Zell Linie in Suspension) und MCF7-Zellen (adhärente humane Brustkrebszelllinie) auf Uhrgläsern aus Kunststoff (Bezeichnung in [Fig. 1a](#): Plastik), auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Uhrgläsern (Bezeichnung in [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#): Poly-L-Lysin), auf Uhrgläsern aus Glas sowie auf mit Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-beschichteten (Bezeichnung in [Fig. 1b](#): Al/AIO) Uhrgläsern und kultiviert.

**[0032]** Nach 24 h wurden die Zellen abgewaschen und die Zellkerne gefärbt, ohne dass die Zellen mit Ethanol fixiert wurden. Mikroskopische Aufnahmen wurden vorgenommen und die Zellen wurden durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung (Bezeichnung in [Fig. 1b](#): nach T/E) (Invitrogen) gelöst. Nach Waschen mit PBS wurden die verbleibenden Zellen erneut photographiert. In diesem Versuch wurde die erhöhte Haftung von Jurkatzellen (als Beispiel nicht intrinsisch adhärenter Zellen) auf der Al/AIO<sub>x</sub>-Beschichtung beobachtet. Die anhaftenden Zellen konnten lebend von den Beschichtung durch Trypsination abgelöst werden, was auf eine proteingestützten Haftungsmechanismus hinweist.

**[0033]** Die Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen gemäß den [Fig. 1a](#) und [Fig. 1b](#) zeigen, daß die Intensität der Fluoreszenz bei den mit Al/AIO<sub>x</sub> beschichteten Uhrgläsern etwas geringer ist, da die Beschichtung Licht absorbiert. Dennoch ist es offensichtlich, daß auch nicht intrinsisch anhaftende Zellen, wie Jurkat-

zellen, sich auf den mit Al/AIO<sub>x</sub> beschichteten Uhrgläsern deutlich besser als auf den anderen Substraten anreichern und, wie in weiteren Versuchen festgestellt, auch über längere Zeiträume (mehr als 72 h) voll funktionsfähig überleben. Aufgrund der Tatsache, daß sich diese Zellen auch lebend ablösen lassen (und somit weiter kultiviert bzw. verarbeitet werden können), kann eine zyklische Anreicherung auch geringster Mengen solcher Zellen auf diesem Substrat erfolgen. Darüber hinaus ist die Zellverteilung gleichmäßig und nicht zu dicht, so daß die Zellmorphologie im Rahmen beispielsweise einer mikroskopischen Untersuchung gut beobachtbar ist, womit eine Stadienbestimmung möglich ist.

**[0034]** Das Anhaften und das Wachstum von intrinsisch adhären Zellen wie MCF7 wird durch die Al/AIO<sub>x</sub>-Beschichtung nicht gestört.

**[0035]** Die EDX-Aufnahme ([Fig. 2](#)) der erfindungsgemäßen nanokristallinen Oberfläche zeigt, daß diese keine signifikanten Mengen an Kohlenstoff enthält und somit als anorganisches Substrat anzusehen ist.

**ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**Zitierte Patentliteratur**

- DE 102006013484 A1 [[0008](#), [0009](#), [0015](#), [0025](#)]

**Zitierte Nicht-Patentliteratur**

- HEXAL Oncoquick, [http://www.hexal-gentech.com/products/man\\_e.pdf](http://www.hexal-gentech.com/products/man_e.pdf) [[0004](#)]  
- Am. J. Pathol, 2000, (1), 156, 57–63, Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells, Giovanna Vona et. al. [[0004](#)]

**Patentansprüche**

1. Verwendung von nanostrukturierten Oberflächen zur Isolierung und/oder Anreicherung von zellulären Subpopulationen aus einer komplexen Mischung.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die nanostrukturierten Oberflächen aus eindimensionalen Nanodrähten aufgebaut sind, bestehend aus einem metallischen Kern und ummantelt mit einer keramischen Hülle, wie sie aus der DE 10 2006 013 A1 bekannt sind.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zellulären Subpopulationen bestimmte Blutzellen sind und dass die komplexe Mischung Plasma ist.

4. Verwendung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Plasma Humanplasma ist.

5. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die zellulären Subpopulationen nicht intrinsisch anhaftende Zellen, insbesondere Jurkatzellen sind.

6. Verfahren zum Anreichern oder Isolieren von zellulären Subpopulationen, dadurch gekennzeichnet, daß die zellulären Subpopulationen sich an nanostrukturierten Oberflächen anreichern.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die zellulären Subpopulationen sich an nanostrukturierten Oberflächen, die aufgebaut sind aus eindimensionalen Nanodrähten, bestehend aus einem metallischen Kern und ummantelt mit einer keramischen Hülle, wie sie in der DE 10 2006 013 484 A1 beschrieben sind, anreichern.

8. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die zellulären Subpopulationen bestimmte Blutzellen sind und dass die komplexe Mischung Plasma ist.

9. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Plasma Humanplasma ist.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die zellulären Subpopulationen nicht intrinsisch anhaftende Zellen, insbesondere Jurkatzellen sind.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

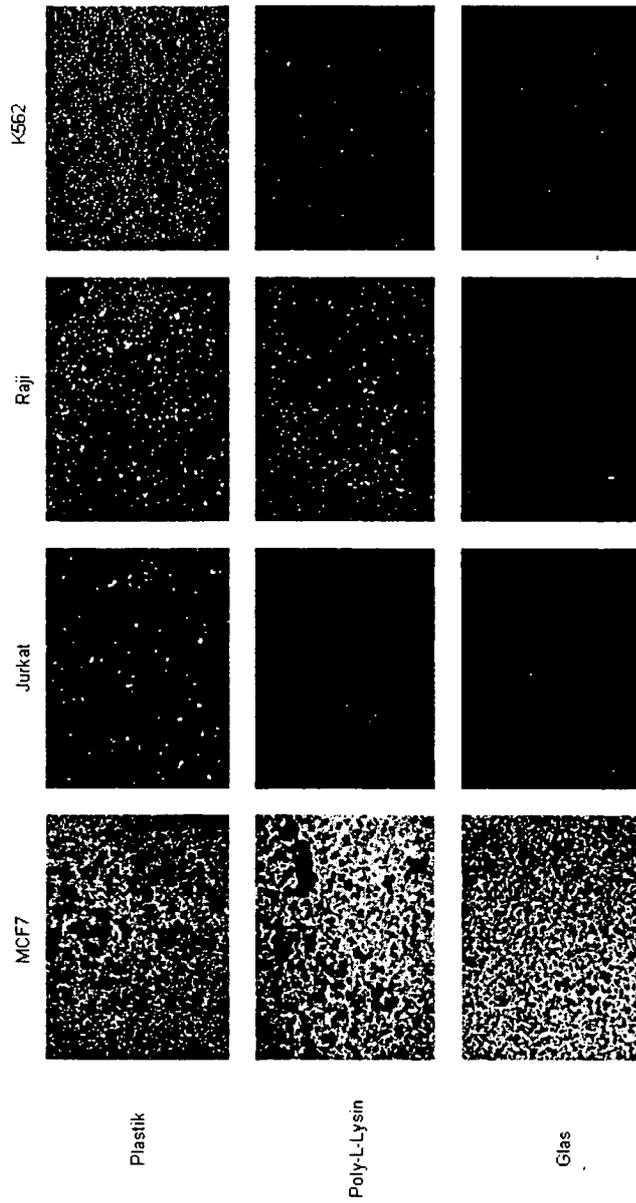


Fig. 1a

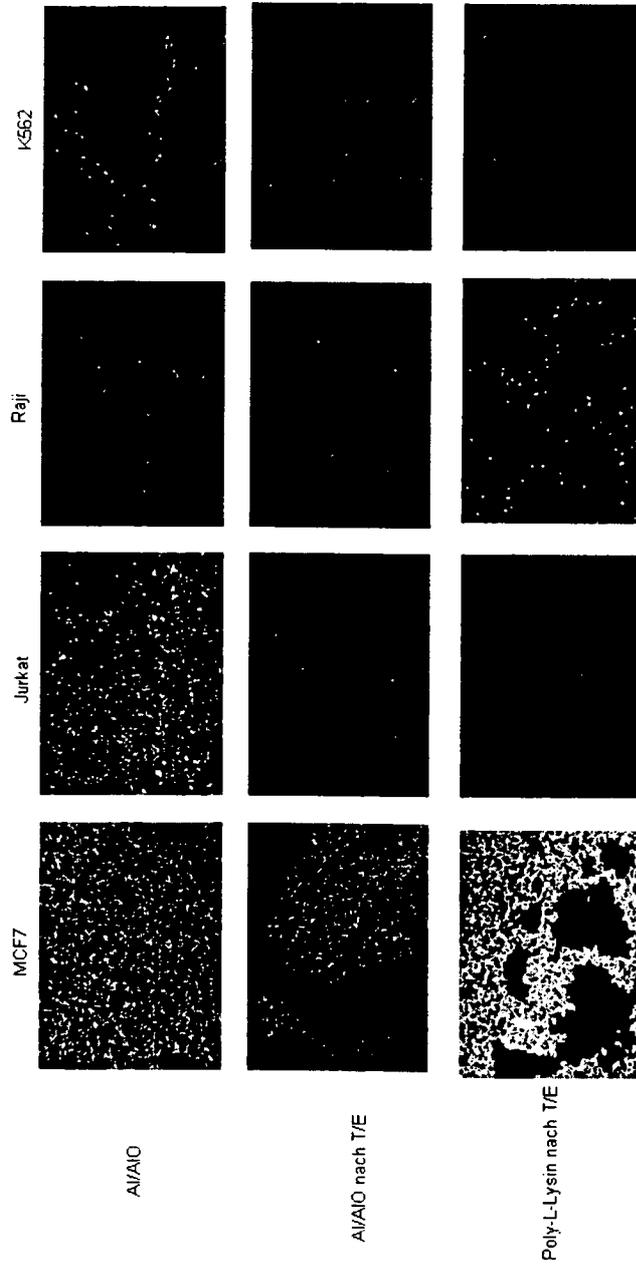
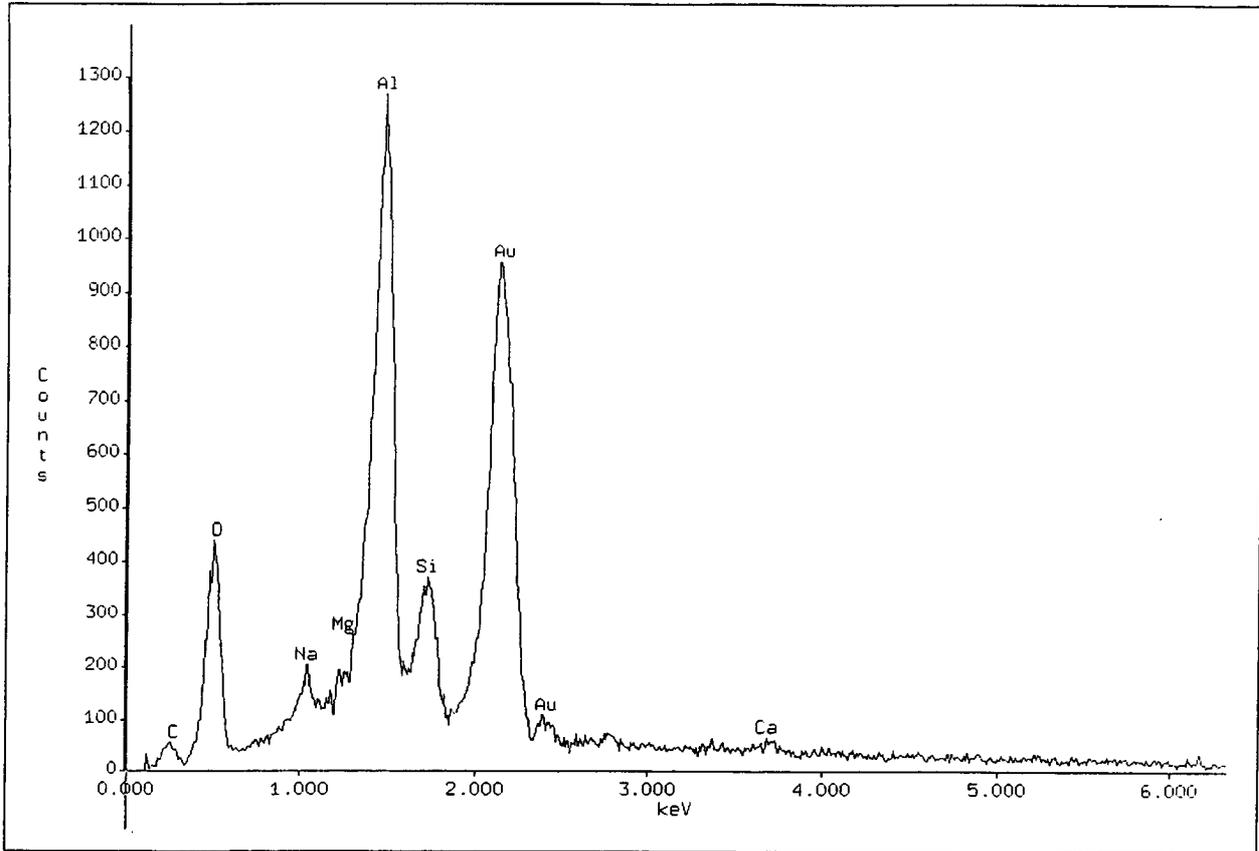


Fig. 1b



**Bolz, 15 keV, 2, Draht**

Accelerating Voltage	10 keV	Take Off Angle	32.6655°
Live Time	200 s	Dead Time	11.541 s
Date:		2-Nov-07	

**Peak Identification Results:**

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)	No. of Cations
Al-K	0.2843	1.253	24.71	35.63	+/- 0.54	7.876
O -K	0.4756	1.354	75.29	64.37	+/- 0.84	---
Total			100.00	100.00		7.876

Fig. 2