

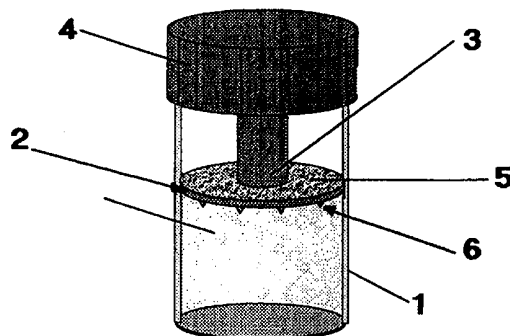


PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 1/28, C12M 3/08		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/02958 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. Januar 1999 (21.01.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/00864 (22) Internationales Anmeldedatum: 24. März 1998 (24.03.98) (30) Prioritätsdaten: 197 29 028.0 8. Juli 1997 (08.07.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FRAUN- HOFER GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leon- rodstrasse 54, D-80636 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DOBLER, Hannes [DE/DE]; Hölderlinstrasse 29, D-71229 Leonberg (DE). KUHN, Claus [DE/DE]; Gammelshauser Strasse 8, D-73105 Dürnau (DE). LINDNER, Hans [DE/DE]; Viereichenweg 29, D-70567 Stuttgart (DE). KIESEWETTER, Stefan [DE/DE]; Wagenmannsteige 5, D-73760 Ostfildern (DE). BERNHAGEN, Jürgen [DE/DE]; Friedrich-Schaal-Strasse 6, D-72074 Tübingen (DE). TOLLE, Gabriele [DE/DE]; Friedrich-Naumann-Strasse 8, D-71636 Ludwigsburg (DE). TOVAR, Günter [DE/DE]; Oberer Grundweg 25, D-70563 Stuttgart (DE).			(74) Anwalt: RÖSLER, Uwe; Wilhelm-Mayr-Strasse 11, D-80689 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: CA, CZ, HU, IL, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR ISOLATING CELL MATERIAL OUT OF A TISSUE MEDIUM AND/OR A LIQUID

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG SOWIE VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON ZELLMATERIAL AUS EINEM GEWEBEBEVBAND UND/ODER EINER FLÜSSIGKEIT



(57) Abstract

The invention relates to a tank (1) with open top, into which cell material in a tissue medium and/or a liquid can be placed. The device comprises a separator in the form of a stamp comprising a flat-shaped separating disk (2), the ring edge of which is sealed water-proof to the inner walls of the tank and presents at least one passage covered by a membrane (5). The separating disk can be inserted from above into the tank (1) so that it can put under pressure said cell material together with the tissue medium and/or the liquid and activate the cell material by rotation by exerting shear forces. The cells and/or cell envelopes go through the pores of the membrane filter (5), while tissue residues are retained.

(57) Zusammenfassung

Beschrieben wird eine Vorrichtung sowie Verfahren zur Isolierung von Zellmaterial aus einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit. Die Erfindung zeichnet sich durch ein oben offenes Behältnis (1) aus, in das das zu isolierende Zellmaterial im Gewebeverband und/oder in der Flüssigkeit einbringbar ist. Die Vorrichtung sieht eine stempelartig ausgebildete Trennvorrichtung vor, die eine flächig ausgebildete Trennscheibe (2) aufweist, deren Umfangsrand fluiddicht mit den Behältnisinnenwänden abschließt und wenigstens eine Durchlaßöffnung aufweist, die von einer Filtermembran (5) überdeckt ist, und die von oben in das Behältnis (1) einbringbar ist, so daß die Trennscheibe das Zellmaterial samt Gewebeverband und/oder Flüssigkeit druckbeaufschlagt und durch Rotation mit Scherkräften beaufschlagt. Hierbei treten die Zellen und/oder Zellverbände durch die Poren der Filtermembran (5) hindurch, wohingegen das Restgewebe zurückgehalten wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Vorrichtung sowie Verfahren zur Isolierung von Zellmaterial aus einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit.

Technisches Gebiet

Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zur Isolierung von Zellmaterial aus einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit.

Stand der Technik

Zur medizinischen Diagnose von Krankheitsbildern sowie auch zu wissenschaftlichen Untersuchungszwecken, insbesondere im biomedizinischen Bereich, werden einzelne Zellen oder Zellverbände analysiert. Voraussetzung für die an Zellen durchzuführenden Analyseverfahren ist die Isolation einzelner Zellen aus Gewebeverbänden bzw. aus Flüssigkeiten, in denen die einzelnen Zellen in ihrer natürlichen Form vorkommen. In vielen Fällen werden Zellen für die Zelluntersuchung aus biologischem Weichgewebe, wie beispielsweise der Milz, Leber sowie auch aus härterem Gewebe, der Haut oder Haaren entnommen. Häufig werden auch bei der Blut- oder Urinuntersuchung Zellen aus Flüssigkeiten isoliert, die anschließend beispielsweise auf Krankheitserreger hin untersucht werden. Derartige Untersuchungen erstrecken sich auch auf in Körpersekreten, Abstrichen oder sonstigen körpereigenen Flüssigkeiten enthaltenen Zellen, die jedoch, wie in allen vorstehend genannten Fällen, aus den einzelnen Gewebeverbänden bzw. Flüssigkeiten zu isolieren sind.

Gegenwärtig sind jedoch keine standardisierten Verfahren zur Zellisolierung bekannt. Bislang bedient man sich vorwiegend der manuellen Abtrennung einzelner Zellen oder Zellkonglomeraten aus Gewebeverbänden und/oder Flüssigkeiten, so daß zur Extraktion von Zellen aus Gewebe, beispielsweise aus der Milz, verschiedene, individuell entwickelte und dem Geschick der jeweils durchführenden Person angepaßte

manuelle Methoden angewendet werden. Auf diese Weise haben sich im Laufe der Zeit unterschiedliche Zellisolierungstechniken ausgebildet, die sich von Labor zu Labor unterschiedlich entwickelt haben. Auch sind aus der einschlägigen Literatur keine hilfreichen Hinweise zu entnehmen, aus denen allgemein übliche oder gar genormte Verfahren zur universellen Zellisolierung abgeleitet werden können.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension für die Untersuchung eines bestimmten Zelltypes sind eine Reihe von hintereinander durchzuführenden Arbeitsschritten erforderlich, die bis heute ausschließlich manuell erfolgen.

Zur Analyse von Zellen, die in Gewebeverbänden vorkommen, muß zunächst ein Gewebestück, beispielsweise aus Milz oder Leber, in einer gewünschten Größe abgetrennt werden. Die entnommene Gewebeprobe wird für gewöhnlich in ein Medium gegeben, das zusammen mit der Probe in eine Petrischale eingebracht wird. Nachfolgend wird die in dem Medium befindliche Gewebeprobe mit Hilfe geeigneter Werkzeuge mechanisch zerdrückt und zerkleinert, wodurch die zu analysierenden Zellen besser aus dem Gewebe herausgelöst werden können. Die sich in dem Medium anreichernden, aus den einzelnen zerkleinerten Gewebestückchen herausgelösten Zellen bzw. Zellkonglomerate, sind nun als Suspension aus dem in der Petrischale befindlichen Medium zu entnehmen. Dieser Trennvorgang erfolgt für gewöhnlich unter Verwendung einer Pipette, deren Öffnung jedoch leicht durch abgetrennte kleinere Gewebestückchen verstopft werden kann. Das Abpipettieren der Zellsuspension erfordert von der jeweiligen Person daher ein besonderes handwerkliches Geschick, da die isolierten Zellen zusammen mit den durch den mechanischen Herauslösevorgang zerkleinerten Gewebestückchen in dem Medium vorliegen.

Die durch Abpipettieren gewonnene Zellsuspension wird abermals in ein Gefäß verbracht, in dem die zusammen mit den Zellen entnommenen kleineren Gewebestückchen aufgrund Ihrer größeren Masse am Gefäßboden durch Sedimentationsprozesse absitzen können. Abermals wird der vorstehend beschriebene Pipettiervorgang wiederholt, um auf diese Weise eine an Zellen angereicherte Suspension zu erhalten. Je nach Art, Größe und Anteil von in der Suspension vorliegenden, abgetrennten

kleinen Gewebestückchen muß der auf Sedimentation beruhende Trennvorgang öfters wiederholt werden. Dieser Vorgang kann auch durch den Einsatz von Zentrifugen unterstützt werden.

Zum Auflösen und Trennen von in der Suspension vorliegenden Zellverbänden in einzelne Zellen wird die an Zellmaterial angereicherte Suspension mehrmals ein- und abpipettiert, so daß möglichst viele Zellen im isolierten Zustand in der Suspension vorliegen. Die auf diese Weise gewonnene Suspension von einzelnen, isolierten Zellen aus einem Gewebeverband werden für gewöhnlich in ein weiteres Gefäß verbracht, in das beispielsweise zum Entfernen der in der Suspension ebenfalls vorliegenden roten Blutkörperchen Ammoniumchlorid zugegeben wird.

Die vorstehend beschriebene Vorgehensweise zur Zellisolation beispielsweise von Zellen aus einem Gewebestückchen beispielsweise der Leber, hat gezeigt, daß eine Vielzahl von manuell hintereinander durchzuführenden Trennschritten durchzuführen sind, bis einzelne, isolierte Zellen erhalten werden können. Mit jedem der einzelnen Trennschritte fällt jedoch schwer zu entsorgender Restmüll an, beispielsweise die Suspensionsflüssigkeiten, die für den Trennvorgang benötigten Werkzeuge wie Pipettierspitze bzw. Trennvorrichtungen sowie auch die verwendeten Gefäße.

Zur Reduzierung des mit dem Trennvorgang verbundenen Aufwandes werden in vielen Labors, beispielsweise in diagnostischen PCR-Labors, auf die spezifische Herstellung von Einzelzellsuspensionen verzichtet und statt dessen der Gesamtgewebeverband aufgeschlossen. Dies mag zwar eine Zeitersparnis mit sich führen, ist jedoch mit dem Nachteil verbunden, daß uneinheitliche Homogenisate mit einer Vielzahl von Zelltypen, Gewebebruchstücken und häufig Hemmstoffen für die nachfolgende Analytik entstehen.

Darstellung der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zur Isolierung von Zellmaterial aus einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit derart anzugeben, daß die Anzahl der durchzuführenden manuellen Prozeß-

schritte reduziert und die Durchführung der Zellisolierung weitgehend standardisiert wird, so daß eine zuverlässige Reproduzierbarkeit der mit der Zellisolation verbundenen Analyseergebnisse erhalten werden kann. Die mit jedem einzelnen Trennvorgang verbundenen Abfälle, wie beispielsweise Petrischale sowie allgemeine Gefäße und Werkzeuge, sollen überdies reduziert werden. Insbesondere soll die mit dem herkömmlichen Verfahren verbundene Kontamination des Arbeitsplatzes weitgehend vermieden werden.

Die Lösung der der Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe ist im Anspruch 1 angegeben, in der eine erfindungsgemäße Vorrichtung beschrieben ist. Im Anspruch 14 ist ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Isolierung von Zellmaterial aus einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit angegeben. Den Erfindungsgedanken vorteilhaft ausbildende Merkmale sind Gegenstand der Unteransprüche.

Der Erfindung liegt die Idee zugrunde, ein Probenträgersystem zu schaffen, das sämtliche Funktionen zur Zellisolation aus einem Gewebe sowie zur Anreicherung von Zellen aus einer Flüssigkeit integriert.

Erfindungsgemäß weist die Vorrichtung zur Isolation von Zellmaterial aus einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit ein oben offenes Behältnis auf, in das das zu isolierende Zellmaterial im Gewebeverband und/oder in der Flüssigkeit einbringbar ist. Ferner ist eine stempelartig ausgebildete Trennvorrichtung vorgesehen, die eine flächig ausgebildete Trennscheibe vorsieht, deren Umfangsrand fluiddicht mit den Behältnisinnenwänden abschließt und wenigstens eine Durchlaßöffnung aufweist, die von einer Filtermembran überdeckt ist. Die Trennvorrichtung ist von oben in das Behältnis einbringbar, so daß die Trennscheibe das Zellmaterial samt Gewebeverband und/oder Flüssigkeit druckbeaufschlagt und durch Rotation mit Scherkräften beaufschlagt. Hierbei ist die Trennscheibe derart ausgebildet, vorzugsweise an ihrer Unterseite mit Reibelementen versehen, so daß das Zellmaterial bei Rotation der Trennscheibe innerhalb des Behältnisses zerkleinert wird.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist es möglich, daß nach Probenentnahme, beispielsweise bei einem Arzt, die entnommene Probe sowie gegebenenfalls, den Prozeß unterstützende Reagenzien in das erfindungsgemäße Behältnis zum Transport einbringbar sind. Durch entsprechende Größengestaltung des Behältnisses kann zugleich die Größe der zu entnehmenden Gewebeprobe vorbestimmt werden, so daß auf diese Weise durch entsprechend am Gefäß anzubringende Markierungen dem Arzt angezeigt wird, wieviel Gewebevolumen für die jeweilige Untersuchung notwendig ist. Diese Maßnahme trägt ebenso dem Wunsch nach Standardisierung bei der Durchführung derartiger Gewebeuntersuchungen Rechnung.

Ist die Gewebeprobe in dem verschließbaren Behältnis im Analyselabor eingetroffen, so können im Labor entsprechende Reagenzien für den nachfolgenden Trennvorgang in das Behältnis eingebracht werden. Zur Zellisolation dient die stempelartig ausgebildete Trennvorrichtung, die von oben in das Gefäßinnere eingebracht wird. Die Trennvorrichtung ist erfindungsgemäß mit einer Trennscheibe ausgebildet, die bündig an der Gefäßinnenwand anliegt und über einen Betätigungsschaft senkrecht nach unten in das Gefäß absenkbar ist. Die Trennscheibe ist dabei derart ausgebildet, daß sie Durchlaßöffnungen aufweist, die jeweils mit einer Filtermembran zusätzlich überzogen sind. Die Filtermembran weist Membranöffnungen auf, die der Größe der jeweils zu isolierenden Zellen bzw. Zellverbänden entsprechen. Durch Absenken der Trennvorrichtung innerhalb des Behältnisses in Richtung der in einer Lösung vorliegenden Gewebeprobe, können die Lösung sowie die aus der Gewebeprobe herausgelösten Zellen bzw. Zellverbände durch die Filtermembran hindurch in den oberen Bereich des Behältnisses gelangen. Auf diese Weise werden in dem Behältnis zwei Raumbereiche geschaffen, die durch die Trennscheibe voneinander abgetrennt werden. Unterhalb der Trennscheibe befindet sich das in der Lösung vorliegende Gewebestück, wohingegen oberhalb der Trennscheibe die in Suspension vorliegenden isolierten Zellen bzw. Zellverbände enthalten sind.

Vorzugsweise sind an der Unterseite der Trennscheibe Reibelemente in Form von spitzen bzw. kantigen Fortsätzen angebracht, die durch Absenken und durch Rotati-

on der Trennscheibe die Gewebeprobe regelrecht zerreißen, so daß die in der Gewebeprobe befindlichen Zellen bzw. Zellverbände möglichst vollständig als Suspension vorliegen und auf diese Weise durch die Filtermembran in den oberen Teil des Behältnisses hindurchtreten können.

Über den Betätigungsschaft, der sowohl als zentraler Haltestiel auf der Trennscheibe angebracht ist oder als Hohlzylinder ausgebildet ist, der mit dem peripheren Umfangsrand der Trennscheibe abschließt, kann die Trennscheibe kontrolliert in das Behältnis abgesenkt und in Rotation versetzt werden, so daß gezielte Druck- und Scherkräfte auf die in der Lösung befindliche Gewebeprobe ausgeübt werden können. Unterstützt durch die an der Trennscheibe befindlichen Reibelemente kann eine höchst effiziente Trennung der zu isolierenden Zellen bzw. Zellverbände von der Gewebeprobe realisiert werden.

Durch die räumliche Trennung der in Suspension vorliegenden Zellen und Zellverbände von der unter der Trennscheibe befindlichen zerkleinerten Gewebestücke kann mit Hilfe üblicher Pipetten die Zellsuspension oberhalb der Trennscheibe aus dem Behältnis entnommen werden, ohne der Gefahr zu unterliegen, daß kleine Gewebestücke die Pipettenöffnung verstopfen. Nach entsprechender Entnahme der Zellsuspension durch Pipettierung bzw. Dekantierung können die im Behältnis unterhalb der Trennscheibe befindlichen Gewebereststoffe und –reagenzien samt dem Behältnis entsorgt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung ermöglicht auf diese Weise ein Proben-träger- und Zellenisolier-System, das trotz hoher Sterilitätsanforderungen sowohl für die Gewebeprobenaufnahme, den Transport in ein Untersuchungslabor, den gesamten Isolierungsprozeß sowie die abschließende Entsorgung geeignet ist. Durch die Vorgabe geeigneter Volumengrößen der Behältnisse können Gewebeanalysen besser standardisiert werden, so daß die Analysenergebnisse mit einer zuverlässigeren Reproduzierbarkeit erreicht werden können.

Durch die erfindungsgemäß ausgebildete Trennvorrichtung ist es zum einen möglich, die Prozeßgeschwindigkeit, mit der die Zellisolierung durchgeführt wird, erheblich zu steigern und zum anderen, den manuellen Aufwand zum Durchführen der Zellisolierung zu verringern. Da der gesamte Isolierungsvorgang in ein- und demselben Behältnis stattfindet, können Risiken zur Kreuzkontamination mit anderen Proben oder Personen oder Gegenständen auf ein Minimum reduziert werden.

In vorteilhafter Weise ist der für das Handhaben der Trennvorrichtung vorgesehene Betätigungsschaft sowohl manuell als auch automatisiert zu bedienen. Neben der Möglichkeit, den Betätigungsschaft lösbar fest an einer, das Behältnis abschließenden Verschlusskappe anzubringen und auf diese Weise eine vereinfachte, manuelle Handhabung der Trennvorrichtung zu realisieren, kann der Betätigungsschaft zudem einen Flansch zur automatischen Betätigung mittels einer geeigneten Handhabungsvorrichtung, bspw. ein Roboterarm, vorsehen. Mit Hilfe des Einsatzes von Bewegungsautomaten ist es möglich, unter Verwendung des erfindungsgemäßen Proben-trägersystems die Zellisolierung vollautomatisch durchzuführen. Dies wiederum kommt dem Ziel einer standardisierten Methode zur Zellisolierung und damit verbunden mit einer hohen Reproduzierbarkeit näher.

Auch im Hinblick des steigenden Umweltbewußtseins trägt das erfindungsgemäße Proben-trägersystem dazu bei, die zu entsorgenden Abfallprodukte durch Verwendung nur eines einzigen Behältnisses zu minimieren.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Die Erfindung wird anhand eines Ausführungsbeispiels unter Bezugnahme auf die Zeichnung exemplarisch beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 Darstellung des Proben-trägersystems und

Fig. 2 Sequenzdarstellungen zur Anwendung des Proben-trägersystems.

Beschreibung eines Ausführungsbeispiels und gewerbliche Anwendbarkeit

Das erfindungsgemäße Probenträgersystem besteht aus einem vorzugsweise zylindrisch ausgebildeten Behältnis 1, das gleichsam einem Becher eine obere Öffnung aufweist. Durch die obere Öffnung des Behältnisses 1, die im gezeigten Ausführungsbeispiel mit einem Schraubdeckel 4 abgeschlossen ist, ist eine Trennvorrichtung einbringbar, die aus einer Trennscheibe 2 und einem Betätigungsschaft 3 besteht. Der Betätigungsschaft 3 sitzt zentrisch auf der Trennscheibe 2 und ist mit dieser fest verbunden. Auf der anderen Seite des Betätigungsschaftes 2 ist dieser lösbar fest mit dem Schraubdeckel 4 verbindbar, der das Behältnis 1 fluiddicht abschließt. Vorzugsweise weist der Schraubdeckel 4 an seiner oberen Fläche ein Septum auf, das zum Durchstechen von Pipettiernadeln zur Entnahme der Zellsuspension geeignet ist.

Vermittels des Betätigungsschaftes 3 können auf die Trennscheibe 2 gezielte Kraftmomente übertragen werden, indem der Betätigungsschaft 3 rotatorisch um seine Schaftachse und/oder vertikal angetrieben wird. Insbesondere ist am oberen Bereich des Betätigungsschaftes 3 ein Adapter bzw. ein Flansch für automatische Bediengeräte, wie beispielsweise Roboterarm, angebracht (nicht in der Fig. 1 dargestellt).

Die Trennscheibe 2 weist auf ihrer ringförmigen Oberfläche Durchlaßöffnungen auf, die mit einer Filtermembran 5 überdeckt sind. Die Porengröße der Filtermembran richtet sich je nach Ausgangsgewebe und Zellgröße und beträgt üblicherweise zur Untersuchung von Leberzellen ca. 100 µm.

An der Unterseite der Trennscheibe 2 sind Reibelemente 6 angebracht, die in der gezeigten Figur als spitze Kanten ausgebildet sind. Die Reibelemente 6 bohren sich durch entsprechendes Absenken der Trennvorrichtung in das unter der Trennscheibe 2 befindliche Gewebestück ein (nicht in Fig. 1 dargestellt) und zerkleinern das Gewebematerial derart, daß die im Gewebe enthaltenen Zellen und Zellkonglomerate bevorzugt aus diesen herauslösbar sind.

Das in der Fig. 1 dargestellte Behältnis ist aus leicht sterilisierbarem Kunststoff hergestellt, das zur besseren Visualisierung der im Behältnisinnern erfolgenden Trennvorgänge lichttransparent ausgebildet ist.

Alternativ zu der in der Fig. 1 ausgeführten Geometrie des Betätigungsschaftes 3 kann dieser als Hohlzylinder ausgebildet werden, der bündig am peripheren Außenumfang der Trennscheibe 2 anschließt. Durch eine derartige Ausgestaltung des Betätigungsschaftes kann die gesamte Fläche der Trennscheibe 2 für den Trennvorgang genutzt werden, d.h., auch der, in dem gezeigten Ausführungsbeispiel von dem zentrisch angebrachten Betätigungsschaft auf der Trennscheibe überdeckte Bereich wirkt als Filter.

In den Sequenzdarstellungen gemäß Fig. 2 ist eine vorteilhafte Verwendungsweise des erfindungsgemäßen Probenträgersystems dargestellt. In der ersten Sequenzdarstellung sind in das Innere des Behältnisses 1 zu analysierende Gewebestücke G eingebracht. Zusätzlich ist eine Flüssigkeit zum Lösen der in dem Gewebematerial befindlichen Zellen bzw. Zellverbände eingebracht, wie beispielsweise eine Saline-Lösung und/oder eine Ammoniumchloridlösung zum Entfernen roter Blutkörperchen.

Im zweiten Schritt wird die in das Behältnis verbrachte Gewebeprobe samt Lösung, durch eine Verschlusskappe fluiddicht verschlossen und steht für den Transport in ein Analysenlabor bereit.

Gegebenenfalls können zur Verbesserung der Trennreaktionen weitere Reagenzien in das Behältnis eingegeben werden. Hierzu ist entweder die Verschlusskappe von dem Behältnis abzunehmen und wie im gezeigten Beispiel gemäß Sequenzdarstellung 3 die weiteren Reagenzien mittels einer Pipettiervorrichtung 7 in das Innere des Behältnisses einzubringen. Alternativ ist die Verschlusskappe mit einem Septum ausgestattet, das mit Hilfe geeigneter spitz zulaufender Kanülen durchstoßen werden kann, um auf diese Weise unter Vermeidung von Keimkontamination eine Flüssigkeit in das Innere des Behältnisses einzubringen.

In der Sequenzdarstellung 4 wird die erfindungsgemäße Trennvorrichtung entweder manuell oder automatisiert mit Hilfe eines Roboterarmes im Behälter nach unten gesenkt und zugleich in Rotationsbewegung versetzt, so daß die auf dem Boden des Behälters befindlichen Gewebestücke druckbeaufschlagt und unter Einwirkung von Scherkräften zerkleinert werden. Da der Außenumfang der Trennscheibe 2 fluiddicht an der Gefäßwandinnenseite anliegt, tritt die im Behältnis befindliche Flüssigkeit sowie die aus dem Gewebematerial ausgelösten Zellen bzw. Zellkonglomerate ausschließlich durch die auf der Trennscheibe aufgebrauchten Filtermembran in den oberen Bereich des Behälters.

In der Sequenz 5 wird die oberhalb der Trennscheibe befindliche Zellsuspension abpipettiert. Die Gefahr des Verstopfens der Pipettenöffnung durch Gewebestückchen besteht jedoch nicht, da durch die Filtermembran keine makroskopischen Gewebestückchen gelangen können.

Schließlich fällt am Ende der Analyse gemäß Sequenz 6 lediglich das Behältnis nebst Trennvorrichtung mit dem darin befindlichen Gewebematerial als Restmüll an.

BEZUGSZEICHENLISTE

1	Behältnis
2	Trennscheibe
3	Betätigungsschaft
4	Schraubdeckel
5	Filtermembran
6	Reibelemente
7	Pipettiervorrichtung
G	Gewebestücke

PATENTANSPRÜCHE

1. Vorrichtung zur Isolierung von Zellmaterial aus einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit mit
 - einem oben offenen Behältnis, in das das zu isolierende Zellmaterial im Gewebeverband und/oder in der Flüssigkeit einbringbar ist,
 - einer stempelartig ausgebildeten Trennvorrichtung, die eine flächig ausgebildete Trennscheibe vorsieht, deren Umfangsrand fluiddicht mit den Behältnisinnenwänden abschließt und wenigstens eine Durchlaßöffnung aufweist, die von einer Filtermembran überdeckt ist, und die von oben in das Behältnis einbringbar ist, und
 - daß die Trennscheibe derart ausgebildet ist, daß durch Rotation der Trennscheibe Scherkräfte in das Material einbringbar sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch **gekennzeichnet**, daß eine Verschlusskappe vorgesehen ist, die das Behältnis fluiddicht abschließt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Trennscheibe das Zellmaterial samt Gewebeverband und/oder Flüssigkeit druckbeaufschlagt.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Trennvorrichtung einen mittig an der Trennscheibe angebrachten Betätigungsschaft vorsieht.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch **gekennzeichnet**, daß die Trennvorrichtung bündig zum peripheren Umfangsrand einen Betätigungsschaft von hohlzylindrischer Gestalt aufweist.

6. Vorrichtung nach Anspruch 5,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Trennvorrichtung über den Betätigungsschaft für rotatorische und/oder vertikale Bewegungen antreibbar ist.
7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch **gekennzeichnet**, daß das obere Ende des Betätigungsschaftes lösbar fest oder fest an der Verschlusskappe anbringbar ist.
8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 7,
dadurch **gekennzeichnet**, daß der Betätigungsschaft einen Flansch zur automatischen oder manuellen Betätigung mittels einer Handhabungsvorrichtung vorsieht.
9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Trennscheibe an der dem Boden des Behältnisses zugewandten Seite Reibelemente vorsieht.
10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 9,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Verschlusskappe als Schraubdeckel ausgebildet ist.
11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 10,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Verschlusskappe ein Septum zum Einstechen mittels Kanülen vorsieht.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch **gekennzeichnet**, daß das Behältnis aus Kunststoff gefertigt ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Filtermembran derart beschaffen ist, daß sie Poren aufweist, die den Durchtritt einzelner Zellen und/oder Zellverbände durch die Membran gewährleisten und das übrige Gewebe zurückhalten.

14. Vorrichtung nach Anspruch 13,
dadurch **gekennzeichnet**, daß die Poren eine Größe von etwa 100 µm aufweisen.

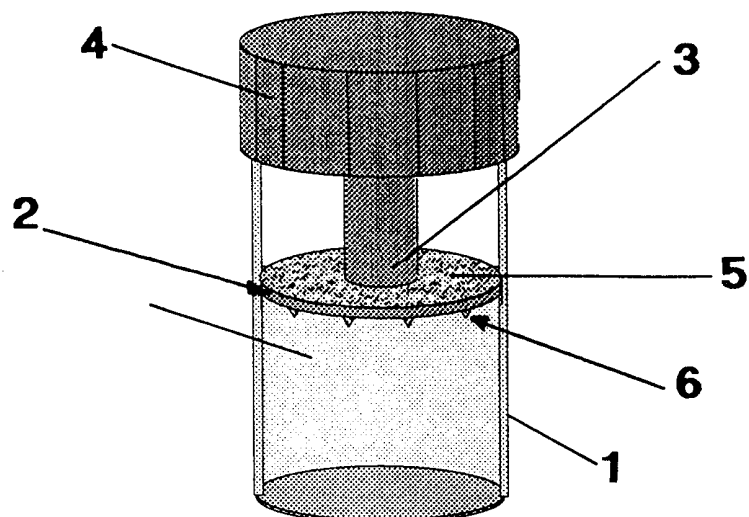
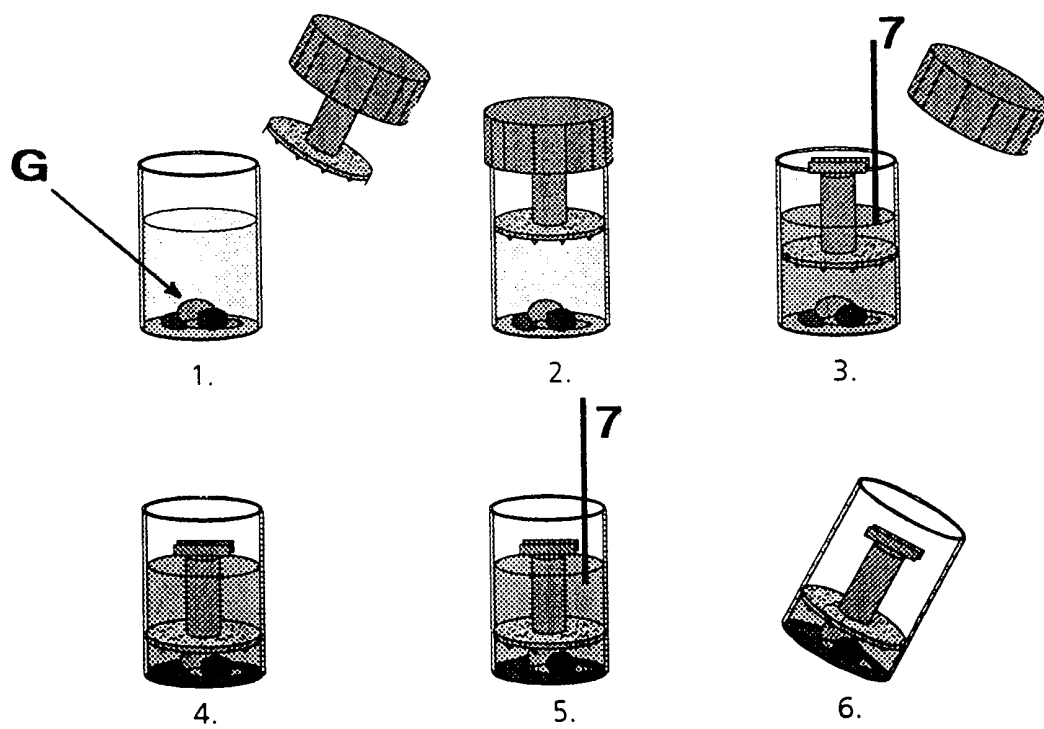
15. Verfahren zur Isolierung von Zellmaterial aus einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit unter Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 14,

gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- das zu isolierende Zellmaterial, das in einem Gewebeverband und/oder einer Flüssigkeit integriert ist, wird in das offene Behältnis gegeben,
- die Trennvorrichtung wird derart von oben auf das Zellmaterial samt Gewebeverband und/oder Flüssigkeit in das Behältnis eingebracht, daß die Trennscheibe das Zellmaterial, das in einem Gewebeverband und/oder in einer Flüssigkeit integriert ist, druckbeaufschlagt und mittels rotatorischer Bewegungen das Zellmaterial derart mit Scherkräften beaufschlagt, daß das Zellmaterial zerkleinert wird,
- durch Absenken der Trennscheibe in dem Behältnis wird Zellmaterial durch die Durchlassöffnungen auf die Oberseite der Trennscheibe gedrückt, übrige Gewebeanteile und/oder Flüssigkeit werden von der Filtermembran im unteren Bereich der Behältnisses zurückgehalten,
- das über der Trennscheibe isolierte Zellmaterial wird mittels Pipettierverfahren und/oder Dekantieren aus dem Behältnis entnommen.

16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch **gekennzeichnet**, daß vor oder nach Einführen der Trennvorrichtung in das Behältnis Reagenzien zugegeben werden.

1/1

**Fig. 1****Fig. 2**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

tional Application No

PCT/DE 98/00864

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N1/28 C12M3/08		
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) IPC 6 G01N C12M		
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 practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ^o	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 590 504 A (HOFFMANN LA ROCHE) 6 April 1994 see abstract; figures 3,10-13 see page 2, column 1, line 28 - page 5, column 8, line 39	1-3,5,6, 10,12-14
A	---	8,9,15, 16
Y	US 3 941 317 A (KANOR STEVEN E) 2 March 1976 see abstract; figures 1-3 see column 1, line 56 - column 4, line 64	1-3,5,6, 10,12-14
A	---	4,9,15
A	US 4 350 768 A (TIHON CLAUDE ET AL) 21 September 1982 see abstract; figures 1-3 see column 2, line 4 - column 6, line 6	1-16
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
^o Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">28 August 1998</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">04/09/1998</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Runser, C</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 98/00864

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GB 2 100 137 A (COULTER ELECTRONICS) 22 December 1982 see abstract; figures 1,2 see page 1, line 53 - page 2, line 86 -----	1,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/00864

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0590504 A	06-04-1994	US 5356814 A CA 2105826 A,C DE 69315521 D DE 69315521 T ES 2111680 T JP 6213788 A	18-10-1994 30-03-1994 15-01-1998 18-06-1998 16-03-1998 05-08-1994
US 3941317 A	02-03-1976	NONE	
US 4350768 A	21-09-1982	US 4413059 A	01-11-1983
GB 2100137 A	22-12-1982	CA 1178183 A DE 3218079 A FR 2505870 A JP 57194355 A NL 8201972 A	20-11-1984 02-12-1982 19-11-1982 29-11-1982 01-12-1982

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/00864

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 G01N1/28 C12M3/08		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 G01N C12M		
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)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 590 504 A (HOFFMANN LA ROCHE) 6. April 1994 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 3,10-13 siehe Seite 2, Spalte 1, Zeile 28 - Seite 5, Spalte 8, Zeile 39	1-3,5,6, 10,12-14
A	---	8,9,15, 16
Y	US 3 941 317 A (KANOR STEVEN E) 2. März 1976 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 1-3 siehe Spalte 1, Zeile 56 - Spalte 4, Zeile 64	1-3,5,6, 10,12-14
A	---	4,9,15
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
² Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, 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 erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen 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 28. August 1998		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts 04/09/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Runser, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ionales Aktenzeichen

PCT/DE 98/00864

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 4 350 768 A (TIHON CLAUDE ET AL) 21. September 1982 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 1-3 siehe Spalte 2, Zeile 4 - Spalte 6, Zeile 6 ---	1-16
A	GB 2 100 137 A (COULTER ELECTRONICS) 22. Dezember 1982 siehe Zusammenfassung; Abbildungen 1,2 siehe Seite 1, Zeile 53 - Seite 2, Zeile 86 -----	1,15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

ionales Aktenzeichen

PCT/DE 98/00864

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0590504	A	06-04-1994	US	5356814 A	18-10-1994
			CA	2105826 A,C	30-03-1994
			DE	69315521 D	15-01-1998
			DE	69315521 T	18-06-1998
			ES	2111680 T	16-03-1998
			JP	6213788 A	05-08-1994

US 3941317	A	02-03-1976	KEINE		

US 4350768	A	21-09-1982	US	4413059 A	01-11-1983

GB 2100137	A	22-12-1982	CA	1178183 A	20-11-1984
			DE	3218079 A	02-12-1982
			FR	2505870 A	19-11-1982
			JP	57194355 A	29-11-1982
			NL	8201972 A	01-12-1982
