



(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) EP 0 800 867 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
15.10.1997 Patentblatt 1997/42

(51) Int. Cl.⁶: B04B 5/04

(21) Anmeldenummer: 97104626.3

(22) Anmeldetag: 18.03.1997

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC
NL PT SE

(30) Priorität: 26.03.1996 DE 19611940

(71) Anmelder:
Nees, Stephan, Prof.Dr.rer.nat. Dr.med.habil
81375 München 70 (DE)

(72) Erfinder:
Nees, Stephan, Prof.Dr.rer.nat. Dr.med.habil
81375 München 70 (DE)

(74) Vertreter:
Haft, von Puttkamer, Berngruber, Czybulka
Patentanwälte
Franziskanerstrasse 38
81669 München (DE)

(54) Verfahren zur zentrifugationstechnischen Durchführung von Partikeltrennungen, insbesondere auf biologischem Sektor

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur zentrifugationstechnischen Durchführung von Partikeltrennungen, insbesondere auf biologischem Sektor, bei dem in einen Zentrifugenbehälter (1) eine zu fraktionierende Probe (26) über eine Kanüle (5) eingebracht wird, die mit ihrem freien Ende (51) zur Minimierung unerwünschter Auswirkungen der Corioliskraft zur Spitze (1') eines sich zur Spitze (1') hin stark verjüngenden Zentrifugenbehälters (1) verläuft, wobei über die Kanüle (5) nachfolgend eine Gradientenlösung (7) mit sich zunehmend kontinuierlich oder stufenweise vergrößern-

der Dichte eingebracht wird, wobei aus der Probe (26) Partikel durch die Wirkung der Gleichgewichts- und/oder Sedimentationszentrifugation in die Gradientenlösung (7) wandern und wobei nach einer vorbestimmten Zentrifugationszeit über eine weitere Kanüle (17) ein Druckfluid in das Innere des verschlossenen Zentrifugenbehälters (1) eingebracht wird, um die die fraktionierten Partikel der Probe (26) enthaltende Gradientenlösung (7) über die Kanüle (5) auszubringen.

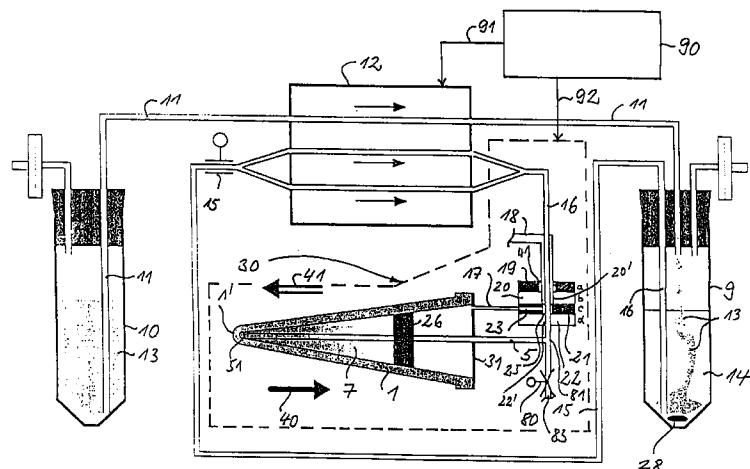


Fig. 3

EP 0 800 867 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur zentrifugationstechnischen Durchführung von Partikeltrennungen nach dem Oberbegriff des Patentanspruches 1.

Längst hat sich die Erforschung von Organfunktionen auf zellulärer Ebene enorm verbreitet. Im Zentrum der physiologischen Grundlagenforschung steht heute die Beschreibung spezifischer Funktionen differenzierter und spezialisierter Zelltypen, die die einzelnen Gewebearten bilden und im Zusammenwirken schließlich die zentralen Aufgaben der Körperorgane bedingen.

Die wichtigste Voraussetzung für die weitere Entwicklung dieser wichtigen Forschungsrichtung ist die Verfügbarkeit immer effizienterer Zelltrennungsmethoden. Dafür scheinen sich heute zunächst einmal vielversprechende immunologische Trennverfahren anzubieten. Deren Grundlage ist stets die Expression typischer zellulärer Antigene, die mit Hilfe hochspezifischer Antikörper erkannt und schließlich für die Trennung ausgenutzt werden. Werden die Antikörper z.B. auf magnetischen Körnchen verankert, so kann es über diese Proteine auch zur Bindung der Zellen an die Partikel kommen. Im Idealfall läßt sich dieser Vorgang mit Hilfe eines Magneten auf bestechend einfache Weise für die Abtrennung der gebundenen Zellen auswerten.

Zellspezifische Antikörper sind aber oft auch extrem speziespezifisch (und daher oft nicht verfügbar) und außerdem sehr teuer. Abgesehen von diesen in der Praxis oft entscheidenden Limitationen stößt die Auswertbarkeit antigener Strukturen für erfolgreiche Zelltrennungen aber auch immer dann rasch auf unüberwindbare Grenzen, wenn sie für die Separation von Zellarten - die nicht etwa wie die Zellen des Blutes in einer physiologischen Suspension vorliegen, sondern in Gewebearten zunächst fest miteinander verbunden sind - herangezogen werden sollen.

Denn die wichtigste Vorbedingung dafür ist zunächst die komplette Dissoziation und Suspendierung solcher Zellen aus dem nativen Gewebeverband. Dies kann nur durch Einwirkung komplexer proteolytischer Gemische erreicht werden, die während ihres Angriffs unvermeidbarerweise auch das Antigenmuster der Gewebezellen substantiell verändern können. Bei der Proteolyse oft abgelöste bzw. maskierte oder auch unspezifisch neu entfaltete oder exprimierte Antigene machen das anschließende immunologische Trennverfahren rasch ineffizient und zahlreiche Fremdzellen schleichen sich typischerweise in die schließlich erhaltenen Suspension der "gereinigten" Zielzellart ein. Zur Zeit erleben wir eine Inflation entsprechend falscher Mitteilungen in der Fachliteratur.

Wesentlich zuverlässiger als immunologisch erkennbare Zelleigenschaften überstehen bestimmte physikalische bzw. physikalisch-chemische Zellmerkmale die Einwirkung der Proteasen. Dazu gehören die Größe, Form und Aggregabilität der Zellen auf der einen Seite und ihr spezifisches Gewicht, das unter

gegebenen physiologischen Bedingungen sehr von der Ionen- und Wasserpermeabilität ihrer Zellmembranen bzw. von dem in ihnen vorliegenden osmotischen Druck abhängt, auf der anderen Seite. Jede dieser physikalischen bzw. physikalisch-chemischen Größen kann als Trennparameter für eine erfolgreiche Zellseparation eingesetzt werden, wenn die Zellen in das Schwerefeld einer geeigneten Zentrifuge eingebracht werden. Üblicherweise erfolgt die Zellseparation in Zentrifugengefäßen in Flüssigmedien bestimmter Dichte, die auch als sogenannte "diskontinuierlich oder kontinuierliche Dichtegradienten" eingeschichtet werden. Diese Medien haben zunächst die Aufgabe, die angestrebten Zelltrennungen gegen thermische Konvektion und mechanische Vibration zu stabilisieren. Die Sedimentationsgeschwindigkeit v hängt von dem folgenden formelmaßigen Zusammenhang ab

$$v = \frac{d^2 (\rho_Z - \rho_M)}{18 \mu} \cdot \omega^2 \cdot r$$

wobei d den Zellradius, ρ_Z bzw. ρ_M die spezifische Dichte der Zellen bzw. des Mediums, μ die Viskosität des Trennmediums, ω die Winkelgeschwindigkeit und r den Rotorradius bezeichnen.

Auf dieser Grundlage werden bis heute bei Zentrifugationsverfahren grundsätzlich wahlweise, aber nicht mit aller Konsequenz kombinierbar die folgenden zwei Techniken ausgeübt:

1. Zonenzentrifugationen

Hierbei erfolgt die Trennung der Zellen in einem in Sedimentationsrichtung immer dichter werdenden, aber doch relativ flachen kontinuierlichen oder stufenförmigen Gradienten des ausgewählten Trennmediums (verschiedene Produkte auf dem Markt, z.B. Ficoll, Metrizamid, Percoll etc.), so daß keine der Zellarten einen isopyknischen (ihrer eigenen spezifischen Dichte entsprechenden) Dichtebereich auffinden kann. Als Konsequenz würden sich alle Zellarten am Boden des Separationsgefäßes wieder ansammeln, falls die Zentrifugation nicht rechtzeitig unterbrochen würde. Eine Trennung erfolgt vor allem auf Grund der unterschiedlichen Größe der Zellarten (siehe obige Formel).

2. Isopyknische Zentrifugationen

In diesen Fällen wird ein Dichtegradient eingefüllt, der auch Bereiche gleicher spezifischer Dichte wie die der Zellen enthält. Erreicht eine Zellart den für sie "isopyknischen" Bereich des Gradienten, geht ihre Sedimentationsgeschwindigkeit gegen Null (siehe obige Formel) und Zellen verschiedenen spezifischen Gewichts trennen sich dann im Gradienten, wenn dessen Profil im Zentrifugengefäß einen geeigneten räumlichen Verlauf hat. Je nach Trennproblem werden besser lineare, oder konvexe, oder konkave Gradienten

eingefüllt.

Aus der DE-OS 34 04 236 geht die Konstruktion eines für derartige Zellseparationen geeigneten Rotors hervor, der es gestattet, die kurz geschilderten Zentrifugationsmethoden auch dadurch auszunützen, daß das Innere des Separationsgefäßes während der gesamten laufenden Zentrifugation zugänglich bleibt und der Gradient über eine entsprechende Kanüle abgesaugt werden kann. Ein zusätzlicher Vorteil ist auch die Autoklavierbarkeit des gesamten Rotors und dadurch die Schaffung von Voraussetzungen zum sterilen (aseptischen) Arbeiten und eine sich eventuell anschließende, langfristige Kultivation der getrennten Zellen im Gewebelabor.

Die jahrelange Erfahrung mit diesem Rotor hat bewahrenswerte, konstruktive Merkmale deutlich gemacht, aber auch die folgenden Probleme und Einschränkungen dieser Konstruktion aufgezeigt:

a) In den Zentrifugengefäßen wirken sich Corioliskräfte aus, wie dies die Figur 1 zeigt. Im rotierenden (Pfeil 4) Zentrifugenbehälter 1 würde sich ein Körper entlang der beabsichtigten Linie 2 bewegen, wenn die genannte Corioliskraft außer acht bleibt. Tatsächlich wirkt diese jedoch so auf den Körper ein, daß dieser sich entlang der Linie 2 bewegt. Dies hat zur Folge, daß die im Gradienten 7 getrennten Zellbanden 6, 8 gemäß Figur 2 beschaffen bzw. verformt sind. Werden diese Zellbanden 6, 8 über die Spitze einer am Ende des Zentrifugenbehälters 1 endenden Kanüle 5 fraktioniert, kommt es zur teilweisen Verschmierung der Zelltrennung. Die volle, prinzipiell mögliche Trennleistung des Systems wird daher im Endeffekt nicht nützbar, weil Teile der Bande 6 immer noch eluiert werden, wenn die Bande 8 bereits an der Spitze angekommen ist.

b) Die Konstruktion der Kanülenführung läßt eine Fraktionierung der getrennten Banden nur durch Absaugung zu. Bei laufender Zentrifuge muß der dazu notwendige Sog die Zentrifugalkraft übertreffen. Da letztere möglichst hoch sein soll, um eine Verwirbelung der getrennten Zellen zu vermeiden, muß der für die Absaugung der Zellen entwickelte Unterdruck so beträchtlich sein, daß es teilweise zum "Ausgasen" im Zellinneren physikalisch gelöster physiologischer Gase (Sauerstoff, Kohlendioxid, Stickstoff) kommen kann, was mit einer Zellsehädigung verbunden sein kann. Außerdem läßt sich eine kontinuierliche Elution aus praktischen Gründen kaum erreichen. Der Einsatz von peristaltischen Pumpen zum kontinuierlichen Abpumpen von Zellen wäre jedenfalls deletär für fast alle Zellarten. Es besteht außerdem ständig die Gefahr von Verwirbelungen, wenn beim Abziehen von häufig zum Ansaugen des Gradienten eingesetzten Spritzen vom Kanülenansatz in der Kanüle befindliches Volumen wieder in die Spitze des Zentrifugenglasses zurückgeschleudert wird.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zur Zentrifugation zu schaffen, bei dem eine optimale Trennschärfe erreichbar ist und eine Schädigung bei der Partikelfraktionierung vermieden wird.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den Merkmalen des Patentanspruches 1 gelöst.

Die Erfindung schafft vorteilhafterweise darüber hinaus ein völlig neues Zentrifugationsverfahren unter 10 Kombination der beiden grundsätzlichen, oben erläuterten Zentrifugentechniken miteinander, wobei zur Trennung zusätzlich ein Flüssigkeitsstrom einsetzbar ist.

Der ungünstige Einfluß der Coriolis-Kräfte wird durch einen durchgehend konischen Zentrifugenbehälter 15 minimiert. Im Falle von Glasgefäßen wird die Innenseite hydrophob beschichtet, z.B. mit Standartverfahren silikonisiert. Im Falle von Plastikgefäßen empfiehlt sich Teflon oder Polycarbonat als Wandmaterial. Die hydrophoben Wandinnenschichten führen zum Abstoßen der hydrophilen Zellen und verhindern deren direkten 20 Wandkontakt.

Eine luftdicht abdichtbare Doppelkanüle, deren vertikale Achse genau durch den Rotormittelpunkt verläuft, erlaubt vorteilhafterweise die Einführung einer zentralen Kanüle wie beim vorbekannten Rotortyp, schafft aber noch einen zweiten gas- und flüssigkeitsabdichtbaren Zugang zum Separationsgefäß. Über diesen Weg kann am Ende des Trennprozesses ein Druckmedium eingebbracht und dadurch der Gradient über die 25 Zentralkanüle ausgedrückt und mit Hilfe eines ebenfalls zur optimalen Ausrüstung dieses Zentrifugensystems gehörenden Fraktionensammlers fraktioniert werden. Diese Fraktionierungstechnik erlaubt die vollkommene Aufrechterhaltung der im konisch immer dünner werdenden Zentrifugengefäß optimal weit auseinandergesetzten Zelltrennungen im Verlauf der durch die nahezu punktförmige Abführung unterstützten Gradientenfraktionierung.

Schließlich bringt das erfindungsgemäße Zentrifugationsverfahren gleich mehrere typische Zellparameter für den Trennprozess ins Spiel und resultiert in nicht mehr steigerbaren Trennschärfen. Dabei wird zu allererst die Probe über die innere zentrale Kanüle in den Zentrifugenbehälter eingetragen. Zweckmäßigerweise wird sie mit Gradientenmedium auf eine spezifische Dichte gebracht, die gerade über der leichten Zellart im Gemisch liegt. Diese schwimmt bei der weiteren Zentrifugation deshalb bereits in reiner Form als oberste Bande auf.

Grundlegend für die Optimierung des erfindungsgemäßen Zentrifugationsverfahrens ist nun weiterhin, daß sowohl eine jeweils elektronisch stufenlos regulierbare Pumpeneinrichtung und Zentrifugeneinrichtung in Kombination mit dem neu entwickelten Rotor eingesetzt 50 werden, beide Geräte sind deshalb auch programmiert koordinierbar. Wird nun - programmgesteuert - mit dem Einpumpen des meist aus zwei Lösungen gemischten Gradienten begonnen, so wirken zwei Kräfte auf das zu trennende Zellgemisch gleichzeitig ein, die Zentrifugal-

kraft und die Strömungskraft. Erstere führt in diesem Stadium der Zentrifugation vor allem zur Trennung von Zellen auf Grund ihrer unterschiedlichen Zelldurchmesser und spezifische Dichte, letztere erfaßt vor allem sperrig geformte Zellen oder Aggregate, während kompakt gebaute, schwere Einzelzellen kaum beeinflußt werden. Zusätzlich kann die Wanderungsrichtung der Zellen noch dadurch gezielt beeinflußt werden, daß die Osmolarität des Gradientenmediums durch Beimischen entsprechender Salzkonzentrationen über das Programm rasch verändert wird (Erythrozyten schrumpfen, z.B. rasch in hypertonen Medien und erhalten so ein größeres spezifisches Gewicht und sedimentieren deshalb rascher). Programm-gesteuert können außerdem bald so hohe Dichtegradientenbereiche eingefüllt sein, daß bestimmte Zellarten der Ausgangsprobe im Bereich einer für sie isopyknischen Dichte anlangen und dann gemäß der oben angegebenen Formel liegen bleiben. Andere Zellarten wandern unter den jeweils gegebenen Bedingungen eventuell noch weiter und sammeln sich erst in weiter von der Zentrifugenachse entfernt gelegenen Gradientenbereichen. Durch jedes Zellgemisch anpaßbare Geschwindigkeiten der Pumpeneinrichtung bzw. Zentrifugenrotation lassen sich Zelltrennungen bisher nie erreichter Schärfen und in kürzesten Zeiträumen (teilweise nur in wenigen Minuten) erreichen. Dies kann für die Vitalität biologischer Präparate entscheidend sein. Das geschilderte Verfahren ist außerdem extrem anpassungsfähig und billig.

Im folgenden werden die Erfindung und deren Ausgestaltungen im Zusammenhang mit den Figuren näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 und 2 Darstellungen zur Erläuterung des Prinzips des erfindungsgemäßen Zentrifugationsverfahrens und

Fig. 3 und 4 eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Zentrifugationsverfahrens.

In der Figur 3 ist eine Einrichtung zur Durchführung des vorliegenden Verfahrens dargestellt. Im wesentlichen umfaßt diese Einrichtung ein erstes Behältnis 10 für eine dichtere Gradientenlösung, ein zweites Behältnis 9 für eine vergleichsweise dünnere Gradientenlösung, eine Pumpeneinrichtung 12, eine Zentrifogeneeinrichtung 30, die später näher erläutert werden wird, und eine Recheneinrichtung 90. In der Zentrifogeneeinrichtung 30 wird ein Zentrifugenbehälter 1 gehalten und in Drehung versetzt, der die aus der Figur 3 ersichtliche, sich verjüngende bzw. konische Form besitzt, durch die die Einwirkung von Coriolis-Kräften vermieden wird. Außerdem wird durch die speziell konische Form erreicht, daß die Trennung der Fraktionen im Bereich der Spitze 51 der zentralen Kanüle 5 besser erfolgen kann, weil die einzelnen Fraktionen im Bereich des kleinen Durchmessers an der Spitze 51 auseinandergezogen werden. In das Innere des Zentrifugenbehälters 1 ragt die entlang der Achse des

Zentrifugenbehälters 1 verlaufende zentrale Kanüle 5 derart hinein, daß ihr freies Ende 51 unmittelbar vor der Spitze 1' des konischen Zentrifugenbehälters 1 endet. Das gesamte Ende 51 ist vorzugsweise gemäß Figur 4 spitz ausgebildet. In den Zentrifugenbehälter 1 ragt ferner an einem Ort außerhalb der Längsachse desselben eine weitere Kanüle 17 hinein, die etwa am Ende des durch ein Deckelteil 31 verschlossenen Zentrifugenbehälters 1 endet.

Die Recheneinrichtung 90 ist über Leitungen 91 bzw. 92 mit der Pumpeneinrichtung 12 und der Zentrifogeneeinrichtung 30 verbunden, so daß diese durch ein in der Recheneinrichtung 90 gespeichertes Programm im Hinblick auf die Förderleistung bzw. die Drehzahl gesteuert werden können.

Mit der beschriebenen Einrichtung wird in der folgenden Weise gearbeitet.

In einem ersten Schritt wird eine Gradientenlösung einer gewünschten Dichte hergestellt. Zu diesem Zweck wird in einer genau programmierten Weise, durch die Recheneinrichtung 90 gesteuert, aus dem ersten Behältnis 10 über die Leitung 11 mit der Hilfe der Pumpeneinrichtung 12 eine dichtere Gradientenlösung 13 in das zweite Behältnis 9 eingeführt, in der sich eine dünnere Gradientenlösung 14 befindet. Vorteilhafterweise mit der Hilfe eines bekannten Magnetrührers 28 werden die eingeführte dichtere Gradientenlösung 13 und die im Behältnis 9 befindliche dünnere Gradientenlösung 14 fortlaufend gemischt, bis ein gewünschter Dichtegrad hergestellt ist. Nach dem Öffnen der Schlauchklemme 15 oder eines anderen Verschlusses wird mit der Hilfe der Pumpeneinrichtung 12 über die Leitung 16 die gemischte Gradientenlösung 7 der gewünschten Dichtigkeit über die zentrale Kanüle 5 in das Innere des Zentrifugenbehälters 1 im Bereich der Spitze 1' desselben eingeführt. In dem Behälter 1 befindet sich zu diesem Zeitpunkt bereits im Bereich der Spitze 1' die zu fraktionierende Probe 26, da die Gradienteneinschichtung nach dem Einbringen der Probe 26 erfolgt. Beim Einbringen der Gradientenlösung 7 wird die Probe 26 in der Richtung des Pfeiles 40 gegen die Zentrifugalkraft 41 verschoben, wobei die Zellpartikel der Probe 26 in die Gradientenlösung 7 einwandern. Die Gradientenlösung 7 kann rechnergesteuert fortlaufend im Hinblick auf ihre Dichte so variiert werden, daß die Dichte in einem genau vorbestimmten Maße kontinuierlich oder stufenweise zunimmt.

Dies hat zur Folge, daß die Fraktionierung durch die während der Zentrifugation ablaufenden Prozesse der Gleichgewichtszentrifugation, bei der die Partikel der Probe 26 solange wandern, bis sie die ihnen entsprechende Gradientendichte erreichen, und der Sedimentationszentrifugation erreicht wird, bei der die Zellpartikel der Probe 26 in Abhängigkeit von ihrer Form und/oder Größe und/oder Aggregation in unterschiedliche Partikelzonen (Banden) aufgetrennt werden.

Wie dies bereits erwähnt wurde, wird dabei durch die Konizität des Zentrifugenbehälters 1 verhindert, daß die entstehenden Fraktionen gemäß Figur 2 infolge der

auftrtenden Corioliskraft verschmiert werden, da deren Auswirkungen bei den durch die Verjüngung erzielten kleinen Behälterdurchmessern nicht relevant sind.

Da Möglichkeiten der Zugabe eines im Hinblick auf die zunehmende Dichte programmiert gesteuerten Lösungsgradienten 7 durch Bestimmung des Mischungsverhältnisses in dem Behältnis 9 durch Ansteuerung der Pumpeneinrichtung 12 sowie der Regelung der Drehzahl der Zentrifugeneinrichtung 30 bestehen, kann die Fraktionentrennung in einem bisher nicht erreichten Ausmaß gestaltet werden.

Nach der Trennung wird Druckmedium, vorzugsweise Druckluft über die Leitung 18 und die Kanüle 17 in das Innere des Zentrifugenbehälters 1 zum gezielten Ausbringen der erzeugten Fraktionen über die zentrale Kanüle 5 eingebracht. Diese werden durch den im Inneren des Zentrifugenbehälters 1 erzeugten Druck gegen die Zentrifugalkraft 41 über die Spitze 51 der zentralen Kanüle 5 (vorzugsweise bei verminderter Drehzahl) punktförmig abgesaugt und mit einer bisher nicht erreichbaren Schärfe ausgebracht. Vorzugsweise zweigt die zentrale Kanüle 5 über ein T-Stück 81 zu einer dann geöffneten Schlauchklemme 80 oder einen anderen Verschluß ab, so daß die Fraktionen über die Leitung 83 entnommen werden können.

Im folgenden wird im Zusammenhang mit der Figur 4 der konstruktive Aufbau des Rotors der Zentrifugeneinrichtung 30 im Hinblick auf die bevorzugte Leitungsführung der zentralen Kanüle 5 sowie der weiteren Kanüle 17 näher erläutert. Dabei ist der Körper dieses Rotors, an dem der Zentrifugenbehälter 1 befestigt ist, mit 50 bezeichnet.

Vorzugsweise sind die Zuführleitungen 18 für die zentrale Kanüle 5 und 16 für die weitere Kanüle 17 koaxial zueinander in der Form einer Doppelkanüle angeordnet. Dabei verlaufen beide Leitungen 16 und 18, wobei sich die Leitung 18 im Inneren der Leitung 16 befindet, zunächst durch eine obere Platte 19, in deren Mitte sich eine Bohrung 41 befindet, durch die die genannte Doppelkanüle verläuft. Unterhalb der vorzugsweise aus Stahl bestehenden Platte 19 befindet sich eine Dichtungsscheibe 20 für die äußere Leitung 16, die vorzugsweise aus Silikongummi besteht. Das Ende der Leitung 16 endet in einer mittigen Bohrung 20' der Dichtungsscheibe 20. Unterhalb der Dichtungsscheibe 20 befindet sich eine weitere Platte 21, die vorzugsweise aus Stahl besteht und durch deren Bohrung 25 die innere Leitung 18 verläuft. Das Ende der Leitung 16, das durch die Dichtungsscheibe 20 abgedichtet ist, steht daher dicht mit der Bohrung 25 in Verbindung, die wiederum über einen radial in der Platte 21 verlaufenden Durchgang 23 mit der Kanüle 17 in Verbindung steht. Die durch die Bohrung 25 hindurch verlaufende Leitung 18 vorläufig durch eine mittige Bohrung 22' einer weitere Dichtungsscheibe 22, die vorzugsweise ebenfalls aus Silikongummi besteht und die Leitung 18 an ihrem Außenumfang abdichtet. Vorzugsweise besteht die Dichtungsscheibe 22 aus einem weicheren Silikongummi als die Dichtungsscheibe 20. Das Ende

der Leitung 16 ragt in eine im Körper 50 des Rotors der Zentrifugeneinrichtung 30 befindliche Bohrung 51 hinein, die in radialer Richtung über einen Durchgang 52 mit der zentralen Kanüle 5 in Verbindung steht. Die genannten Platten 19 und 21 sowie die genannten Dichtungen 20 und 22 werden durch eine in eine Bohrung 53 des Körpers 50 eingeschraubte Schraube 54 aneinander gepreßt, durch deren Axialbohrung 55 die genannten Leitungen 16 und 18 nach außen verlaufen. Beim Betrieb der Zentrifugeneinrichtung 30 drehen sich der Körper 50, die Schraube 54, die Platten 19 und 21 sowie die Dichtungen 20 und 22, während die Leitungen 16 und 18 nichtdrehende Teile sind, die über nicht dargestellte Kugellager in Bezug auf die drehenden Teile abgestützt sind.

Es hat sich herausgestellt, daß Silikongummi als Material für die genannten Dichtungsscheiben 20 und 22 besonders vorteilhaft ist, weil der an den Außenumfängen der Leitungen 16 bzw. 18 auftretende Verschleiß beim Drehen der Zentrifugeneinrichtung 30 minimal ist. Die Silikongummi-Dichtungsscheiben 20 und 22 können nach erfolgtem Verschleiß durch einfaches Aufdrehen der Schraube 54 und Entnahme der Platten 19 und 21 besonders leicht ausgewechselt werden.

Vorzugsweise kann das Ankoppeln von unterschiedlichen zentralen Kanülen 5 an den Durchgang 52 über eine abgedichtete Schraubverbindung 56 erfolgen.

Zweckmäßigerweise kann die sich nicht drehende Doppelkanüle 16, 18 bei laufender Zentrifugeneinrichtung 30 entfernt werden. Dadurch können extrem hohe Umdrehungszahlen, ohne Abrieb an den Dichtungen erreicht werden, bei denen auch subzelluläre Partikel fraktionierbar sind. Zum Zwecke der späteren Gradientenentnahme bei geringeren Drehzahlen wird die Doppelkanüle wieder eingesetzt.

Das oben genannte Deckelteil 31 des Zentrifugenbehälters 1 kann dadurch realisiert werden, daß der Behälterrund 1" gegen einen Dichtungsring 32 gedrückt wird, der in einer Aussparung 33 des Rotorkörpers 50 enthalten ist. In diesem Fall führt der die weitere Kanüle 17 bildende Durchgang des Rotorkörpers 50 zum Boden der Aussparung 33 innerhalb des Dichtungsrings 32 und wird die zentrale Kanüle 5 mit der Hilfe der bereits genannten Schraubverbindung 56 am Rotorkörper 50 befestigt.

Vorzugsweise wird ein Zentrifugenbehälter 1 verwendet, dessen Länge von der Spitze 1' bis zur Öffnung etwa 10 bis 15 cm beträgt und dessen Öffnung einen Durchmesser von etwa 3 bis 8 cm aufweist.

Am folgenden Beispiel wird im Vergleich mit konventionellen Zentrifugationssystemen gezeigt, wie sich alle dieser Parameter kombinieren und im Hinblick auf die Reindarstellung von neutrophilen Granulozyten aus Meerschweinchenblut (gegen die es keine käuflichen Antikörper zur Ausnutzung immunologischer Trennmethode gibt) optimieren lassen. Es handelt sich dabei bekanntlich um kernhaltige Zellen des Blutes, die neben anderen kernhaltigen Zellen (andere Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) - zu den "weißen Blutkörper-

chen" bzw. "Leukozyten" gehören. Die Gesamtheit aller Leukozyten macht nur ca. 0,1 - 0,2 % aller Blutzellen aus, die neutrophilen Granulozyten sogar nur 0,03 - 0,09 %. Neben den Thrombozyten (ca. 4 % aller Blutzellen) besteht Blut zu ca. 96 % vorwiegend aus Erythrozyten. Die Reinigung der Granulozyten durch Zentrifugation stellt also ein Extrembeispiel dar, das noch zusätzlich erschwert wird durch die Tatsache, daß Erythrozyten die schwersten Blutzellen darstellen. Sie wandern also am weitesten in eigenen Dichtegradienten ein und müssen deshalb als erste (völlig überladene) Bande eluiert werden.

Das zweite Beispiel soll deutlich machen, daß sich eine derartige Trenneffizienz zentrifugaler Methodik auch für Zellgemische anwenden läßt, die erst durch aufwendige proteolytische Dissoziationsverfahren aus nativen Organen herausgelöst werden müssen. Es handelt sich beim konkreten Beispiel um die schwierige Aufgabe, die im Herzmuskel extrem zahlreich und multidispersen Mikrogefäß mit Begleitzellen von den Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) komplett abzutrennen. Die Kardiomyozyten besitzen einen zellspezifischen Stoffwechsel, der nur bei ihrer vollkommenen Reindarstellung richtig erfaßt werden kann.

Diese für die pharmakologischen Zielsetzungen in der Medizin wichtige Aufgabe wird durch eine extreme Empfindlichkeit der Herzmuskelzellen erschwert, die sich bekanntlich schnell kontrahieren können und im isolierten Zustand dann irreversibel absterben.

Patentansprüche

1. Verfahren zur zentrifugationstechnischen Durchführung von Partikel trennungen, insbesondere auf biologischem Sektor, bei dem in einen Zentrifugenbehälter (1) eine zu fraktionierende Probe (26) über eine Kanüle (5) eingebracht wird, die mit ihrem freien Ende (51) zur Minimierung unerwünschter Auswirkungen der Corioliskraft zur Spitze (1') eines sich zur Spitze (1') hin stark verjüngenden Zentrifugenbehälters (1) verläuft, wobei über die Kanüle (5) nachfolgend eine Gradientenlösung (7) mit sich zunehmend kontinuierlich oder stufenweise vergrößernder Dichte eingebracht wird, wobei aus der Probe (26) Partikel durch die Wirkung der Gleichgewichts- und/oder Sedimentationszentrifugation in die Gradientenlösung (7) wandern, und wobei nach einer vorbestimmten Zentrifugationszeit über eine weitere Kanüle (17) ein Druckfluid in das Innere des verschlossenen Zentrifugenbehälters (1) eingebracht wird, um die die fraktionsierten Partikel der Probe (26) enthaltende Gradientenlösung (7) über die Kanüle (5) auszubringen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gradientenlösung (7) aus wenigstens einer Gradientenlösung (13) einer größeren Dichte und einer Gradientenlösung (14) einer vergleichsweise kleineren Dichte zur Erzielung einer

gewünschten Dichte zusammengemischt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Gradientenlösung (13) der größeren Dichte einem ersten Behältnis (10) entnommen und mit der Hilfe einer Pumpeneinrichtung (12) in ein die Gradientenlösung (14) der kleineren Dichte enthaltendes zweites Behältnis (9) befördert wird, daß die in dem zweiten Behältnis (9) enthaltenen Gradientenlösungen (13, 14) fortlaufend miteinander vermischt und aus dem zweiten Behältnis (9) der Kanüle (5) über eine weitere Pumpeneinrichtung (12) zugeführt werden.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Pumpeneinrichtung (12) durch das Programm einer Recheneinrichtung (90) fortlaufend gesteuert wird, um fortlaufend eine vorbestimmte Dichte der Gradientenlösung zu erhalten.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuführung der Gradientenlösung (7) durch Ansteuerung der weiteren Pumpeneinrichtung (12) durch das in der Recheneinrichtung (90) enthaltene Programm zur vorbestimmten Änderung der Zufuhraten erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Zentrifugenbehälter (1) verwendet wird, bei dem die Kanüle (5) in dem Zentrifugenbehälter (1) zentral verläuft.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß ein Zentrifugenbehälter (1) verwendet wird, bei dem die weitere Kanüle (17) außerhalb der Längsachse des Zentrifugenbehälters (1) verläuft.
8. Einrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zentrifugeneinrichtung (30) mit einem Zentrifugenbehälter (1) mit einer zentralen Kanüle (1) vorgesehen ist, deren freies Ende (51) bis zur Spitze (1') des sich verjüngenden Zentrifugenbehälters (1) verläuft, daß eine weitere Kanüle (17) in das Innere des Zentrifugenbehälters (1) zum Zuführen eines Druckfluids führt, daß die zentrale Kanüle (5) und die weitere Kanüle (17) mit einer Leitungsanordnung verbunden sind, die in Bezug auf den Rotorkörper (50) der Zentrifugeneinrichtung (30) drehfest angeordnet ist.
9. Einrichtung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Leitungsanordnung eine innere Leitung (18) und eine diese umgebende äußere Leitung (16) aufweist.
10. Einrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß in einer Ausnehmung des Rotorkör-

pers (50) eine erste Dichtungsscheibe (22), darauf eine erste Platte (21), auf dieser eine zweite Dichtungsscheibe (20) und auf dieser eine zweite Platte (19) angeordnet sind, daß die Leitungen (16, 18) durch eine Aussparung (41) der zweiten Platte (19) verlaufen, daß die äußere Leitung (18) in einer Aussparung (20') der zweiten Dichtungsscheibe (20) dicht endet, daß die innere Leitung (18) durch eine Aussparung (25) der ersten Platte (21) verläuft und in einer Aussparung (22') der ersten Dichtungsscheibe (22) abgedichtet ist, daß die Aussparung (25) der ersten Platte (21) über einen Durchgang (23) in der ersten Platte (21) und einen die weitere Kanüle bildenden Durchgang (17) in dem Rotorkörper (50) mit dem Inneren des Zentrifugenbehälters (1) in Verbindung steht, daß die Aussparung (22') der ersten Dichtung (22) mit einem weiteren Durchgang (52) in dem Rotorkörper (50) in Verbindung steht, der zur Kanüle (5) führt.

5

10

15

20

11. Einrichtung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichtungsscheiben (20, 22) aus Silikongummi bestehen.
12. Einrichtung nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die zweite Dichtungsscheibe (20) aus einem weniger harten Material besteht als die erste Dichtungsscheibe (22).
13. Einrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Platten (19, 21) Stahlplatten sind.
14. Einrichtung nach einem der Ansprüche 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Dichtungen (20, 22) und die Platten (19, 20) durch ein im Rotorkörper (50) verschraubtes Schraubenelement (54) in die Ausnehmung des Rotorkörpers (50) gedrückt werden, und daß die Leitungsanordnung durch eine Bohrung (55) des Schraubenelements (54) verlaufen.
15. Einrichtung nach einem der Ansprüche 8 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge des Zentrifugenbehälters (1) etwa 10 bis 15 cm beträgt und die Öffnung desselben einen Durchmesser von etwa 3 bis 8 cm besitzt.

35

40

45

50

55

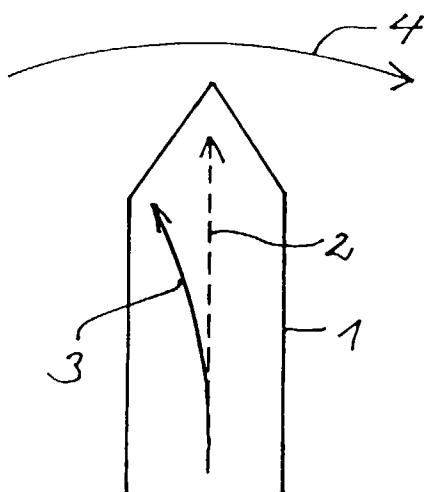


Fig. 1

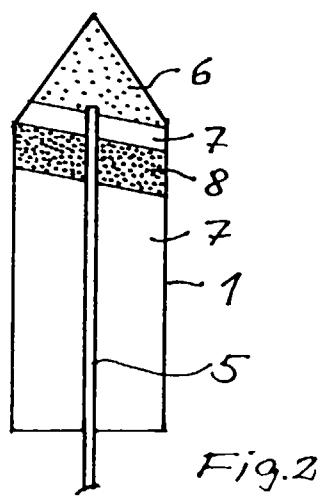


Fig. 2

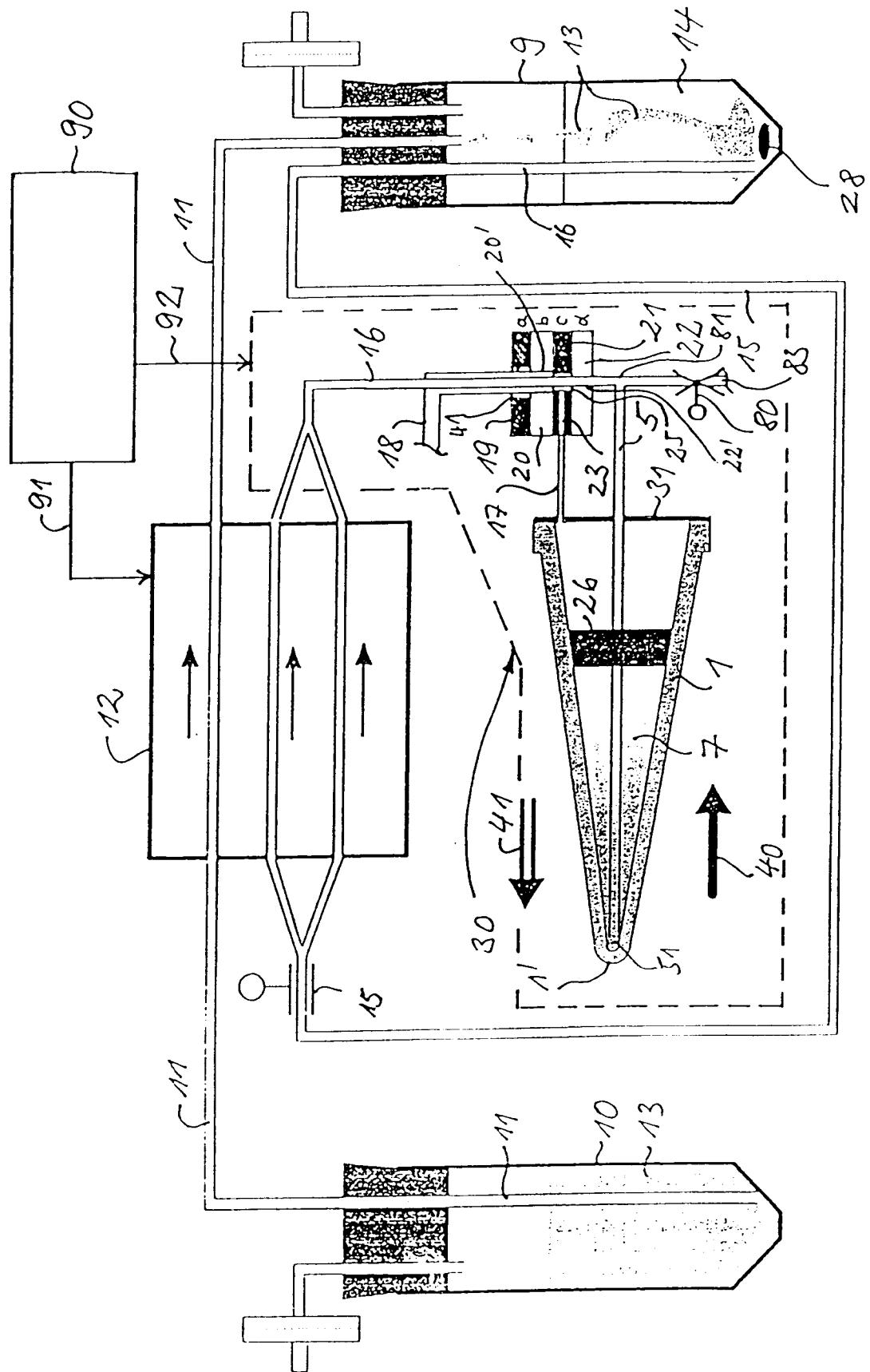


Fig. 3

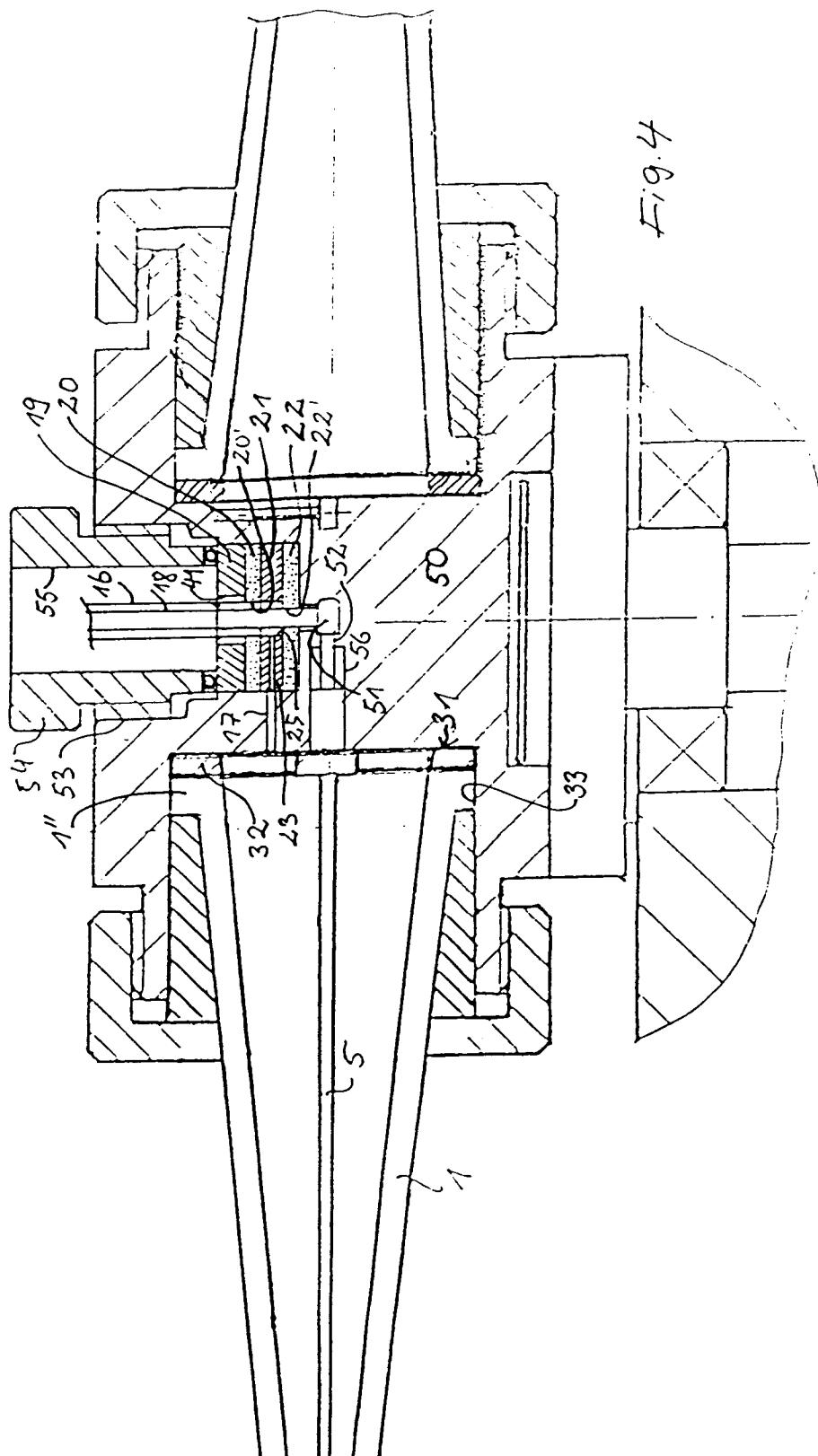


Fig. 4



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 97 10 4626

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betreff Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
A,D	DE 35 04 205 A (S. NEES) * das ganze Dokument * -----	1,8	B04B5/04
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.6)
			B04B
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p>			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	7.Juli 1997	Leitner, J	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmelde datum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			