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

(11) **EP 2 192 987 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
22.04.2020 Patentblatt 2020/17

(21) Anmeldenummer: **08804473.0**

(22) Anmeldetag: **19.09.2008**

(51) Int Cl.:
B03C 1/033 *(2006.01)* ***B03C 1/28*** *(2006.01)*
B03C 1/01 *(2006.01)*

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/EP2008/062539

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 2009/040312 (02.04.2009 Gazette 2009/14)

(54) **VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUM BEHANDELN VON FLÜSSIGKEITEN MIT MAGNETISCHEN PARTIKELN**

APPARATUS AND METHOD FOR THE TREATMENT OF LIQUIDS WITH MAGNETIC PARTICLES

DISPOSITIF ET PROCÉDÉ DE TRAITEMENT DE LIQUIDES AVEC DES PARTICULES MAGNÉTIQUES

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR

(30) Priorität: **21.09.2007 DE 102007045474**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
09.06.2010 Patentblatt 2010/23

(73) Patentinhaber: **Qiagen GmbH**
40724 Hilden (DE)

(72) Erfinder:
- **HIMMELREICH, Ralf**
40724 Hilden (DE)
- **ROTHMANN, Thomas**
40724 Hilden (DE)

(74) Vertreter: **Banse & Steglich**
Patentanwälte PartmbB
Patentanwaltskanzlei
Herzog-Heinrich-Straße 23
80336 München (DE)

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A-99/42832
WO-A-2004/035217
WO-A-2007/063174
WO-A1-03/072531

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 2 192 987 B1

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum Behandeln von Flüssigkeiten mit magnetischen Partikeln. Die Vorrichtung sowie das Verfahren sind beispielsweise für Anwendungszwecke in der Biochemie, klinischen Chemie, Molekularbiologie, Mikrobiologie, medizinischen Diagnostik oder forensischen Medizin geeignet.

Technischer Hintergrund

[0002] Im Stand der Technik ist eine Vielzahl von Verfahren zum Behandeln von Flüssigkeiten mit magnetischen Partikeln bekannt, wobei sich diese meist auf das Abtrennen von Nukleinsäuren oder anderen biologisch oder biochemisch relevanten Stoffen aus einer Lösung beziehen.

[0003] Verfahren, die auf der magnetischen Abtrennung unter Verwendung von spezifisch und/oder unspezifisch bindenden, magnetischen Partikeln beruhen, haben im Bereich der Probenvorbereitung für diagnostische oder analytische Untersuchungen, insbesondere für die Isolierung von Nukleinsäuren, Proteinen und Zellen, zunehmende Bedeutung erlangt.

[0004] Dies gilt insbesondere für automatisierte Verfahren, da auf diese Weise eine große Anzahl von Proben innerhalb kurzer Zeit vorbereitet werden können und auf arbeitsaufwendige Zentrifugationsschritte verzichtet werden kann. Dadurch werden die Voraussetzungen für einen effizienten und hohen Probendurchsatz geschaffen. Dies ist von enormer Bedeutung, da eine rein manuelle Handhabung von sehr großen Probenzahlen praktisch nicht zu bewältigen ist.

[0005] Das Grundprinzip der magnetischen Abtrennung von Substanzen aus komplexen Gemischen beruht darauf, dass magnetische Partikel z.B. durch chemische Behandlung ihrer Oberfläche mit spezifischen Bindungseigenschaften für die abzutrennenden Zielsubstanzen ausgestattet werden. Die Größe solcher Magnetpartikel liegt im Allgemeinen im Bereich von ca. 0,05 bis 500 μm, so dass sie eine große Oberfläche für die Bindungsreaktion bereitstellen. In Abhängigkeit von ihrer Größe und Beschaffenheit können die magnetischen Partikel eine Dichte aufweisen, die ähnlich der Dichte der Flüssigkeit ist, in der sie suspendiert sind. In diesem Fall kann eine Sedimentierung der magnetischen Partikel durchaus einige Stunden dauern.

[0006] Bei bekannten Trennverfahren werden die Magnetpartikel durch Anwendung magnetischer Kräfte bzw. eines Magnetfeldes, beispielsweise mittels eines Permanentmagneten, an einer Stelle immobilisiert. Diese Ansammlung der Magnetpartikel wird auch als Pellet oder Magnetsediment bezeichnet. Nachfolgend wird der flüssige Überstand beispielsweise durch Absaugen oder Dekantieren abgetrennt und verworfen. Da die Magnetpartikel durch die magnetischen Kräfte immobilisiert sind, wird weitgehend verhindert, dass magnetische Partikel zusammen mit dem Überstand abgetrennt werden.

[0007] Typischerweise werden die immobilisierten Magnetpartikel anschließend resuspendiert. Zur Anreicherung der gebundenen Zielsubstanzen wird eine Elutionsflüssigkeit bzw. ein Elutionspuffer verwendet. Die Bindung zwischen der Zielsubstanz und den Magnetpartikeln wird gelöst und die Zielsubstanz-Moleküle von den Magnetpartikeln freigesetzt. Die Zielsubstanz-Moleküle können dann zusammen mit der Elutionsflüssigkeit abgetrennt werden, während die Magnetpartikel durch Einwirkung eines Magnetfeldes immobilisiert werden. Durch Verringerung des Volumens an Elutionsflüssigkeit in Bezug zum primären Ausgangsvolumen zur Bindung, können die Zielsubstanz-Moleküle nicht nur angereichert, sondern auch konzentriert werden. Vor dem Elutionsschritt können ein oder mehrere Waschschritte durchgeführt werden.

[0008] Für die Durchführung solcher Trennverfahren mittels magnetischer Partikel sind verschiedenartige Vorrichtungen beschrieben worden. So beschreibt US 2001/0022948 eine Vorrichtung, bei der ein magnetischer Stab in ein erstes Reaktionsgefäß eintaucht, das in Flüssigkeit suspendierte magnetische Partikel enthält.

[0009] Dort zieht der magnetische Stab die magnetischen Partikel an, so dass die Magnetpartikel an dem Stab anhaften. Der magnetische Stab wird dann zusammen mit den daran anhaftenden magnetischen Partikeln aus dem Reaktionsgefäß gezogen und in ein zweites Reaktionsgefäß eingeführt. Dort wird dann die Magnetkraft des Stabes verringert bzw. abgeschaltet, so dass sich die magnetischen Partikel von dem Stab lösen und in einer im Reaktionsgefäß befindlichen Flüssigkeit suspendiert werden. Ähnliche Verfahren sind auch aus der US 6,065,605 und der WO 2005/005049 bekannt.

[0010] Hingegen ist aus der EP 0 965 842 eine Vorrichtung bekannt, bei der die magnetischen Partikel zusammen mit der Flüssigkeit, in der sie suspendiert sind, in einer Pipette aufgezogen werden. Die Pipettenspitze weist einen speziellen Separationsbereich auf, der durch einen Magneten mit einem Magnetfeld beaufschlagt werden kann. Dadurch werden die Magnetpartikel als Pellet oder Magnetsediment an der Innenseite der Pipettenspitze immobilisiert. Anschließend wird die aspirierte Flüssigkeit durch die Pipettierfunktion der Vorrichtung aus der Pipettenspitze entfernt.

[0011] Danach kann das Magnetfeld im Separationsbereich wieder entfernt werden, wodurch die im Pellet immobilisierten Magnetpartikel wieder freigegeben werden. Ein ähnliches Verfahren und eine ähnliche Vorrichtung sind in der US 6,187,270 beschrieben.

[0012] Ein anderes Prinzip zur Abtrennung magnetischer Partikel beschreibt die EP 015 905 520. Dabei verbleiben die magnetischen Partikel in demselben Reaktionsgefäß während die Flüssigkeit in diesem Gefäß ausgetauscht wird. Die Magnetsedimente können zur Anpassung an einen jeweiligen Prozessschritt in einer ge-

wünschten Höhe an der Seitenwand des Reaktionsgefäßes immobilisiert werden. Dies erfolgt durch Bereitstellung von Magneten, die auf verschiedenen Armen eines drehbar gelagerten Trägers in jeweils unterschiedlicher Entfernung von der Drehachse angeordnet sind. Durch Drehen des Trägers kann jeweils ein bestimmter Arm - und damit ein bestimmter Magnet - in die Nähe der Seitenwand des Reaktionsgefäßes gebracht werden. An dieser Stelle werden dann die Magnetpartikel als Pellet immobilisiert.

[0013] WO 2007/063174-A beschreibt eine Anreicherungseinheit für biologische Komponenten, bei der ein Magnetstab durch eine Öffnung in einen Beutel eingeführt wird.

[0014] WO 99/42832-A beschreibt ein Verfahren zur Übertragung von magnetischen Partikeln mit Hilfe eines von außen in ein Gefäß eingeführten Magneten.

[0015] WO 2004/035217-A beschreibt ein Verfahren zur Dosierung von magnetischen Partikeln mit Hilfe eines von außen in ein Gefäß eingeführten Magneten. WO 03/072531-A1 beschreibt eine Vorrichtung und ein Verfahren zur Gewinnung magnetischer Teilchen in einem Aufschlämmungsphasenreaktor, in dem die in einer Flüssigkeit aufgeschlämmten Magnetpartikel an Magnetstäben vorbeigeführt werden.

[0016] Die genannten herkömmlichen Vorrichtungen und Verfahren weisen alle die gemeinsame Eigenschaft auf, dass sie als so genannte "offene Systeme" ausgebildet sind, da gemäß ihrem jeweiligen Funktionsprinzip magnetische Stäbe oder Pipetten ein- oder mehrmals in das Reaktionsgefäß eingeführt werden müssen. Dadurch besteht bei diesen herkömmlichen Vorrichtungen und Verfahren das Risiko einer Kreuzkontamination anderer Reaktionsgefäße durch Aerosol- und/oder Tropfenbildung. Untersuchungsergebnisse können verfälscht oder sogar unbrauchbar werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung

[0017] Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, die beschriebenen, sich aus dem Stand der Technik ergebenden Nachteile zu überwinden und insbesondere für eine weite Spanne von Anwendungen eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zu schaffen, bei dem ein Behandeln von Flüssigkeiten mit magnetischen Partikeln auf einfache Weise möglich ist.

[0018] Die Aufgabe wird durch eine Vorrichtung gemäß Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung gelöst. Demgemäß wird eine Vorrichtung zum Behandeln von einer Flüssigkeit mit magnetischen Partikeln beansprucht, umfassend ein Gefäß, enthaltend die Flüssigkeit und eine Vielzahl von in der Flüssigkeit angeordneten magnetischen Partikeln sowie mindestens ein stab-, hantel- und/oder ellipsoidförmig ausgebildetes magnetisches und/oder magnetisierbares Zentralelement, wobei das Verhältnis des längsten Durchmessers d2 des mindestens einen Zentralelements zum Verhältnis des durchschnittlichen Durchmessers dl der magnetischen Partikel mindestens

$$d2\ (mm) \geq 15 * d\ 1\ (mm)$$

beträgt, wobei sich das Zentralelement vollständig im Inneren des Gefäßes befindet, wobei die Vorrichtung zusätzlich mindestens einen externen Magneten umfasst, der zur Interaktion mit dem mindestens einen Zentralelement ausgebildet ist, so dass das Zentralelement durch den externen Magneten bewegbar ist.

[0019] Unter dem Begriff "Zentralelement" wird im Sinne der vorliegenden Erfindung insbesondere jeder Gegenstand verstanden, welcher in der Lage ist, durch Magnetfeldeinwirkung - ggf. unter Einwirkung eines weiteren, "externen" Magneten (wie im Folgenden beschrieben) - im Ruhezustand zumindest die Mehrzahl der magnetischen Partikel an sich zu binden.

[0020] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das mindestens eine Zentralelement einen Magneten, bevorzugt einen Permanentmagnet; gemäß einer alternativen, bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das mindestens eine Zentralelement ein magnetisierbares Material, wie z.B. Eisen.

[0021] Unter dem Begriff "Flüssigkeiten" werden - aber nicht darauf beschränkt - im Sinne der vorliegenden Erfindung insbesondere wässrige Lösungen, Suspensionen und/oder zweiphasige Emulsionen mit Wasser als einer Phase, die Biomoleküle enthalten verstanden.

[0022] Unter dem Begriff "Behandeln" im Sinne der vorliegenden Erfindung wird insbesondere verstanden, dass in einem Separationsschritt bestimmte Biomoleküle sich an die Magnetpartikel anlagern können; die vorliegende Erfindung ist jedoch ausdrücklich nicht darauf beschränkt.

[0023] Unter dem Begriff "Durchmesser" der Magnetpartikel ist insbesondere, wenn die Magnetpartikel nicht kugelförmig oder im wesentlichen kugelförmig sind, der jeweils längste Durchmesser der Magnetpartikel gemeint.

[0024] Unter dem Begriff "durchschnittlicher Durchmesser" ist insbesondere das arithmetische Mittel der Durchmesser der Magnetpartikel gemeint, welches insbesondere (aber nicht darauf beschränkt) stichprobenartig gemessen werden kann.

[0025] Eine derartige Vorrichtung bietet für eine weite Spanne von Anwendungen innerhalb der vorliegenden Erfindungen mindestens einen der folgenden Vorteile:

- Dadurch, dass mindestens ein Zentralelement vorgesehen ist, ist eine Homogenisierung der Magnetpartikel wie auch eine Separierung der Magnetpartikel von der Lösung auf einfache Weise möglich, wie u.a. nachfolgend beschrieben.
- Die Vorrichtung erlaubt den Einsatz in "geschlossenen" Systemen;

- Es sind keine weiteren Mittel (wie ein Stabmagnet etc.) notwendig, die direkt in die Flüssigkeit eintauchen und somit eine potentielle Kontaminationsquelle darstellen.
- Es ergibt sich für die meisten Anwendungen eine sehr schnelle und leichte Homogenisierung der Magnetpartikel.
- Weiterhin ist meist eine sehr schnelle Separation der Magnetpartikel möglich.
- Neben dem einfachen Aufbau der Vorrichtung ist gleichzeitig der zu betreibende technische Aufwand meist sehr gering.

[0026] Vorteilhafterweise ist das Verhältnis des längsten Durchmessers d2 des mindestens einen Zentralelements zum Verhältnis des durchschnittlichen Durchmessers d1 der magnetischen Partikel d2 (mm) ≥ 50 *d1 (mm), noch bevorzugt d2 (mm) ≥ 100 *d1 (mm), ferner bevorzugt d2 (mm) ≥ 200 *d1 (mm), sowie am meisten bevorzugt d2 (mm) ≥ 300 *d1 (mm).

[0027] Dies hat sich für eine breite Spanne von Anwendungen innerhalb der vorliegenden Erfindung als vorteilhaft herausgestellt, da so die gewünschten erfinderischen Effekte oftmals auf einfache Weise erzielt werden können.

[0028] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Verhältnis des Volumens V2 des mindestens einen Zentralelements zum Verhältnis des durchschnittlichen Volumens V1 der magnetischen Partikel

$$V2\ (mm^3) \geq 10 * V1\ (mm^3).$$

[0029] Dies hat sich ebenfalls als günstig herausgestellt, da so insbesondere sichergestellt werden kann, dass nach einer Homogenisierung (Resuspendierung) der Magnetpartikel diese sich wieder an den Magneten anlagern.

[0030] Vorteilhafterweise ist das Verhältnis des Volumens V2 des mindestens einen Zentralelements zum Verhältnis des durchschnittlichen Volumens V1 der magnetischen Partikel V2 (mm^3) ≥ 100 *V1 (mm^3), noch bevorzugt V2 (mm^3) ≥ 1000 *V1 (mm^3) sowie am meisten bevorzugt V2 (mm^3) ≥ 10^5 *V1 (mm^3).

[0031] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung beträgt die Anzahl der magnetischen Partikel pro Zentralelement ≥10^4, vorteilhafterweise bis ≤10^8, bevorzugt ≥5 x 10^5 bis ≤ 5 x 10^6.

[0032] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung beinhalten die magnetischen Partikel ein Material, ausgewählt aus der Gruppe paramagnetische Materialien, superparamagnetische Materialien, ferromagnetische Materialien, ferrimagnetische Materialien sowie Mischungen daraus.

[0033] Vorteilhafterweise beträgt die durchschnittliche Sättigungsmagnetisierung der magnetischen Partikel ≥1 Am^2/kg und 250 Am^2/kg, bevorzugt ≥10 Am^2/kg und 240 Am^2/kg, sowie am meisten bevorzugt ≥20 Am^2/kg und 235 Am^2/kg. Dies hat sich für viele Anwendungen der vorliegenden Erfindung als vorteilhaft herausgestellt.

[0034] Das mindestens eine Zentralelement ist stab-, hantel- und/oder ellipsoidförmig ausgebildet und das Verhältnis des längsten Durchmessers a zum Verhältnis des kürzesten Durchmessers b ist vorteilhafterweise von a/b ≥ 1.1 bis a/b ≤10.

[0035] Dies hat sich insbesondere für eine einfache Homogenisierung der Magnetpartikel bei vielen Anwendungen als günstig herausgestellt. Vorteilhafterweise ist das Verhältnis des längsten Durchmessers a zum Verhältnis des kürzesten Durchmessers b von a/b ≥ 1.5 bis a/b ≤8, bevorzugt a/b ≥ 2 bis a/b ≤5.

[0036] Vorteilhafterweise sind die magnetischen Partikel und das mindestens eine Zentralelement in einem geschlossenen Gefäß angeordnet.

[0037] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung betragen das addierte Volumen V_m der magnetischen Partikel sowie das des mindestens einen Zentralelements ≥0,25% bis ≤50% des Gesamtvolumens V_G des Gefäßes. Dies hat sich für viele Anwendungen als günstig herausgestellt.

[0038] Bevorzugt betragen das addierte Volumen V_m der magnetischen Partikel sowie das des mindestens einen Zentralelements ≥0,5% bis ≤20%, noch mehr bevorzugt ≥1% bis ≤15%, des Gesamtvolumens V_G des Gefäßes.

[0039] Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst weiterhin mindestens einen externen Magneten, welcher zur Interaktion mit dem mindestens einen Zentralelement ausgebildet ist. Für den Fall, dass es sich bei dem Zentralelement um einen Permanentmagneten handelt, ist gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung das Verhältnis der Magnetstärke H_3 des mindestens einen externen Magneten zur Magnetstärke H_2 des mindestens einen Zentralelements

$H_3 \geq 1.1^* H_2$ bis $H_3 \leq 10^* H_2$

[0040] Dies hat sich als günstig herausgestellt, da so der mindestens eine Zentralelement auf der einen Seite erfindungemäß häufig sehr gut beeinflusst werden kann, auf der anderen Seite die Homogenisierung bzw. Anlagerung der Magnetpartikel an das mindestens eine Zentralelement nicht unnötig beeinflusst wird.

[0041] Vorteilhafterweise ist das Verhältnis der Magnetstärke H_3 des mindestens einen externen Magneten zur Magnetstärke H_2 des mindestens einen Zentralelements $H_3 \geq 1.5^* H_2$ bis $H_3 \leq 8^* H_2$, noch mehr bevorzugt $H_3 \geq 2^* H_2$ bis $H_3 \leq 5^* H_2$.

[0042] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist und/oder umfasst der mindestens eine externe Magnet ein(en) Elektromagnet(en), der zur Homogenisierung der magnetischen Partikel unter Wechselspannung betrieben wird. In dieser Ausführung ist dann bevorzugt das Zentralelement ein (Permanent-) Magnet.

[0043] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform

der Erfindung ist und/oder umfasst der mindestens eine externe Magnet ein(en) Permanentmagnet(en).

[0044] Die vorliegende Erfindung bezieht sich nach Anspruch 9 außerdem auf ein Verfahren zum Behandeln von Flüssigkeiten mit magnetischen Partikeln mit einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, umfassend die Schritte

a) Verteilen der magnetischen Partikel in der Flüssigkeit sowie nachfolgend
b) Anlagern der magnetischen Partikel an das mindestens eine Zentralelement.

[0045] Das Zentralelement verbleibt während des gesamten Vorgangs in dem Behälter.

[0046] Ein derartiges Verfahren bietet für eine weite Spanne von Anwendungen innerhalb der vorliegenden Erfindungen mindestens einen der folgenden Vorteile:

- Dadurch, dass mindestens ein Zentralelement vorgesehen ist, ist eine Homogenisierung der Magnetpartikel wie auch eine Separierung der Magnetpartikel von der Lösung auf einfache Weise möglich, wie u.a. nachfolgend beschrieben.
- Das Verfahren erlaubt den Einsatz in "geschlossenen" Systemen.
- Es sind keine weiteren Mittel (wie ein Stabmagnet etc.) notwendig, die in die Flüssigkeit eintauchen und somit eine potentielle Kontaminationsquelle darstellen.
- Es ergibt sich für die meisten Anwendungen eine sehr schnelle und leichte Homogenisierung der Magnetpartikel.
- Weiterhin ist meist eine sehr schnelle Separation der Magnetpartikel möglich.
- Neben dem einfachen Aufbau des Verfahrens ist gleichzeitig der zu betreibende technische Aufwand meist sehr gering.

[0047] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst Schritt a) eine Resuspendierung der magnetischen Partikel in der Flüssigkeit.

[0048] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung waren vor dem Schritt a) die magnetischen Partikel zumindest teilweise, bevorzugt fast vollständig, an das mindestens eine Zentralelement angelagert und Schritt a) erfolgt durch Einwirkung einer externen Kraft auf das mindestens eine Zentralelement, welches während des gesamten Verfahrens in dem Behälter verbleibt.

[0049] Vorteilhafterweise wird Schritt b) mittels eines weiteren, externen Permanentmagneten unterstützt. Dabei geschieht dies bevorzugt dergestalt, dass ein externer Permanentmagnet in die Nähe des Gefäßes gebracht wird, in der sich die Magnetpartikel und das mindestens eine Zentralelement befinden. Dadurch kann bei vielen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung das Anlagern der Magnetpartikel an das mindestens eine Zentralelement deutlich schneller gestaltet werden. Diese Ausführungsform hat sich auch insbesondere dann als vorteilhaft herausgestellt, wenn das mindestens eine Zentralelement kein Permanentmagnet ist.

[0050] Gemäß Anspruch 12 bezieht sich die vorliegende Erfindung außerdem auf die Verwendung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung und/oder eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur zumindest teilweisen Abtrennung von Biomolekülen aus/in einer vorzugsweise wässrigen Lösung.

[0051] Unter dem Term "Biomoleküle" werden - aber nicht darauf beschränkt - im Sinne der vorliegenden Erfindung sämtliche Biomoleküle, wie z. B Lipide, Kohlenhydrate, Metabolite, Stoffwechselprodukte, alle Arten von Nukleinsäuren, alle Arten von Peptiden und Proteinen, auch substutierte oder funktionalisierte Peptide und/oder Proteine verstanden.

[0052] Unter dem Term "Biomoleküle" werden weiterhin - aber nicht darauf beschränkt - im Sinne der vorliegenden Erfindung sämtlich in biologischen Proben natürlicherweise vorkommende oder künstlich eingebrachte Moleküle verstanden.

[0053] Vorteilhafterweise wird die erfindungsgemäße Vorrichtung und/oder das erfindungsgemäße Verfahren zur zumindest teilweisen Abtrennung von Nukleinsäuren aus/in einer vorzugsweise wässrigen Lösung verwendet.

[0054] Unter dem Term "Nukleinsäure" im Sinne der vorliegenden Erfindung wird insbesondere - aber nicht darauf beschränkt - natürliche, vorzugsweise isolierte, lineare, verzweigte oder zirkuläre Nukleinsäuren wie RNA, insbesondere mRNA, siRNA, miRNA, snRNA, tRNA, hnRNA oder Ribozyme, DNA und dergleichen, synthetische oder modifizierte Nukleinsäuren, beispielsweise Oligonukleotide, insbesondere für die PCR verwendete Primer, Sonden oder Standards, mit Digoxigenin, Biotin oder Fluoreszensfarbstoffen markierte Nukleinsäuren oder sogenannte PNAs (*"peptide nucleic acids*") verstanden.

[0055] Die vorgenannten sowie die beanspruchten und in den Ausführungsbeispielen beschriebenen, erfindungsgemäß zu verwendenden Komponenten unterliegen in ihrer Größe, Formgestaltung, Materialauswahl und technischen Konzeption keinen besonderen Ausnahmebedingungen, so dass die in dem Anwendungsgebiet bekannten Auswahlkriterien uneingeschränkt Anwendung finden können.

[0056] Weitere Einzelheiten, Merkmale und Vorteile des Gegenstandes der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen sowie aus der nachfolgenden Beschreibung der zugehörigen Figuren und Beispiele, in denen - beispielhaft - mehrere Ausführungsbeispiele sowie Einsatzmöglichkeiten der vorliegenden Erfindung dargestellt sind.

Fig. 1 zeigt eine sehr schematische Ansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung gemäß eines Ausführungsbeispiels der Erfindung vor "Homogenisierung" der Magnetpartikel;

Fig. 2 zeigt die Vorrichtung aus Fig. 1 nach "Homogenisierung"; sowie

Fig. 3 eine UV-Kurve einer DNA-Elutionslösung nach Durchführung einer Präparation von genomischer DNA gemäß Beispiel I.

[0057] Fig. 1 zeigt eine sehr schematische Ansicht einer erfindungsgemäßen Vorrichtung gemäß einem Ausführungsbeispiel. Es sei angemerkt, dass Fig. 1 und 2 hochgradig schematisch sind und bei den meisten Anwendungen der Erfinder die tatsächlichen Verhältnisse (sei es Größenverhältnisse wie die Anzahl der Magnetpartikel) anders sein werden.

[0058] Die Vorrichtung umfasst mehrere erste Magnetpartikel 10, die im "Ruhezustand" an ein Zentralelement 20 angelagert sind. Magnetpartikel 10 und zentraler Magnet 20 sind dabei in einem (vorzugsweise geschlossenen) Gefäß 100 angeordnet, welches wahlweise über (schematisch strichartig angedeutete) Ein- und Ablässe 110 bzw. 120 verfügen kann. Das Gefäß 100 ist vorzugsweise mit einer Flüssigkeit 150 so hoch gefüllt, dass sich die Magnetpartikel 10 und das Zentralelement 20 in der Flüssigkeit befinden.

[0059] In der vorliegenden Ausführungsform ist das Zentralelement 20 ein Permanentmagnet; dies ist jedoch nicht beschränkend. Wie bereits geschildert kann das Zentralelement 20 auch ein magnetisierbares Material wie Eisen enthalten.

[0060] Durch Bewegen des Zentralelements 20 (z.B. durch Drehen in Richtung des Pfeils A oder alternativ durch Rütteln), welches vorzugsweise mittels eines weiteren (in der Fig. nicht gezeigten) Magneten erfolgt, ist es möglich, die Magnetpartikel von dem Zentralelement 20 zu "lösen" (quasi "abzuschütteln") und im Gefäß zu verteilen, so dass sich (abhängig von der konkreten Anwendung) z.B. Biomoleküle an die Magnetpartikel anlagern können.

[0061] Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass es sich bei vielen Anwendungen der vorliegenden Erfindung als günstig erwiesen hat, dass, wenn eine Kreis- (oder kreisartige) Bewegung des Zentralelements 20 stattfindet, der Mittelpunkt dieses "imaginären" Kreises sich nicht in der Nähe des Mittelpunktes des Gefäßes 100 befindet. Durch diese Anordnung wird oftmals bewirkt, dass die Magnetpartikel 10 bei der Homogenisierung vom Zentralelement 20 regelrecht "weggeschleudert" werden, was den Schritt der Homogenisierung nochmals erleichtert. Somit stellt dies eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung dar.

[0062] Eine weitere Ausführungsform zur Bewegung des mindestens einen Zentralelements ist eine eindimensionale oszillierende Bewegung. Durch die Auswirkung eines Magnetfeldes, das sich auf einer Linie vor- und zurückbewegt, wird das mindestens eine Zentralelemente alternierend an die gegenüberliegenden Gefäßwände "gehauen", wodurch die Magnetpartikel von dem Zentralelement 20 auch effektiv abgeschüttelt werden.

[0063] Eine Rüttelbewegung des mindestens einen Zentralelements kann auch mittels eines Elektromagneten erfolgen wenn dieser unter Wechselspannung betrieben wird und sich die Magnetfeld-Polung alternierend ändert, insofern stellt dies ebenfalls eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar. Ändert man die Betriebsart auf Gleichstrom so findet eine Magnetseparation statt.

[0064] Der Zustand nach dieser "Homogenisierung" ist sehr schematisch in Fig. 2 gezeigt.

[0065] Wird die Bewegung des Zentralelements 20 gestoppt, so lagern sich die Magnetpartikel 10 wieder an das Zentralelement 20 an, so dass (im Wesentlichen) der Zustand der Fig. 1 wieder erreicht wird. Die Flüssigkeit 150 kann nun z.B. aus dem Gefäß entfernt werden oder es können weitere Reagenzien zugegeben werden, je nach konkreter Anwendung.

[0066] Die Erfindung wird nachfolgend ebenfalls anhand von Beispielen erläutert. Es versteht sich, dass diese rein illustrativ zu betrachten sind und keine Einschränkung der vorliegenden Erfindung darstellen sollen, welche ausschließlich durch die Ansprüche festgelegt wird.

[0067] Es sei insbesondere explizit angemerkt, dass das vorliegende Beispiel auch im Hinblick auf die beschriebenen Größen-/Volumen-/Mengenangaben bzw. die geometrischen Gestaltungsformen des Reaktionsgefäßes rein illustrativ zu verstehen ist. Die vorliegende Erfindung ist, wie sich bei vielen Anwendungen und Ausführungsbeispielen gezeigt hat, innerhalb einer weiten Größenordnung anwendbar und ein Fachmann wird dementsprechend andere Dimensionen bzw. Anordnungen wählen. Neben dem Vorteil das Verfahren als geschlossenes System zu betreiben, liegt natürlich die Option offen dies auch als offenes System zu gestalten (siehe Beispiel I). Insbesondere hat sich gezeigt, dass die vorliegende Erfindung auch bei Mikrosystemen, wie Mikromischern etc., bei vielen Anwendungen sehr gut einsetzbar ist, was eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung darstellt.

Beispiel I: Präparation von genomischer DNA aus 5 ml Vollblut

[0068] Aus 5 ml Vollblut wurden mittels des folgenden Protokolls die genomische DNA isoliert:
5 ml Blut wurden in ein 30 ml Becherglas mit einem Zentralelement (Standard Teflon-ummantelter Rührfisch; Länge 2 cm; Durchmesser 7 mm) gegeben.

[0069] Anschließend wurden 5 ml Buffer AL (Markenprodukt der Fa. QIAGEN) sowie 500 µl Proteinase K (QIAGEN) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 60°C auf einem Magnetheizrührer bei langsamer Rührgeschwindigkeit.

[0070] Danach wurden 5 ml Isopropanol und 500 µl MagAttract Suspension G (QIAGEN) zugegeben, welche die Magnetpartikel enthielt; der durchschnittliche Durchmesser der Partikel ist 8 µm.

[0071] Mittels eines externen Magnetrührers wurde 5 min. gerührt, um die genomische DNA an die Magnetpartikel zu binden.

[0072] Anschließend wurde der Rührer gestoppt, worauf sich die Magnetpartikel an das Zentralelement anlagerten. Der Überstand wurde entfernt, anschließend wurden 15 ml Waschpuffer AW1 (QIAGEN) zugeben. Es erfolgte eine Homogenisieren der Magnetpartikel durch Rühren für 60 sec, anschließend erneut eine Magnetseparation durch Rührstopp.

[0073] Es erfolgte ein erneutes Entfernen des Überstandes sowie die Zugabe von 15 ml Waschpuffer AW2 (QIAGEN). Danach wurden die Magnetpartikel durch Rühren für 60 sec. Homogenisiert. Nach Rührstopp erfolgte eine Anlagerung der Magnetpartikel an das Zentralelement.

[0074] Der Überstand wurde entfernt, danach erfolgte ein Lufttrocknen der Magnetpartikel für 20 min.

[0075] Um die DNA zu eluieren wurden 5 ml Buffer TE (DNA Elution, QIAGEN) zugegeben. Danach wurden die Magnetpartikel durch Rühren für 5 min homogenisiert, nach Rührstopp erfolgte die Anlagerung der Magnetpartikel an das Zentralelement.

[0076] Der Überstand, der nun die DNA enthielt, wurde in ein geeignetes Lagerungsröhrchen überführt und die DNA-Konzentration durch UV-Quantifizierung und OD Scan gemessen.

[0077] Die UV-Kurve des Überstandes ist in Fig.3 zu sehen. Anhand des UV-Spektrums kann die Ausbeute abgeschätzt werden, die in Beispiel 1 annähernd quantitativ erfolgte (ca. 170 μg genomische DNA aus 5 ml Vollblut).

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Behandeln einer Flüssigkeit mit magnetischen Partikeln umfassend ein Gefäß (100), enthaltend die Flüssigkeit (150) und eine Vielzahl von in der Flüssigkeit (150) angeordneten magnetischen Partikeln (10) sowie mindestens ein stab-, hantel- oder ellipsoidförmig ausgebildetes magnetisches und/oder magnetisierbares Zentralelement (20), wobei das Verhältnis des längsten Durchmessers d2 des mindestens einen Zentralelements (20) zum Verhältnis des durchschnittlichen Durchmessers d1 der magnetischen Partikel (10) mindestens

$$d2\ (mm) \geq 15 * d1\ (mm)$$

beträgt, wobei sich das Zentralelement (20) vollständig im Inneren des Gefäßes (100) befindet,
wobei die Vorrichtung zusätzlich mindestens einen externen Magneten umfasst, der zur Interaktion mit dem mindestens einen Zentralelement (20) ausgebildet ist, so dass das Zentralelement (20) durch den externen Magneten bewegbar ist.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei das Verhältnis des Volumens V2 des mindestens einen Zentralelements (20) zum Verhältnis des durchschnittlichen Volumens V1 eines magnetischen Partikels (10)

$$V2\ (mm^3) \geq 10 * V1\ (mm^3)$$

beträgt.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die Anzahl der magnetischen Partikel (10) pro Zentralelement (20) $\geq 10^4$ beträgt.

4. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die magnetischen Partikel (10) ein Material, ausgewählt aus der Gruppe paramagnetische Materialien, superparamagnetische Materialien, ferromagnetische Materialien, ferrimagnetische Materialien sowie Mischungen daraus beinhalten.

5. Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das addierte Volumen V_m der magnetischen Partikel (10) sowie des mindestens einen Zentralelements (20) ≥0,25% bis ≤50% des Gesamtvolumens V_G des Gefäßes (100) betragen.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das Zentralelement (20) mindestens einen Permanentmagneten umfasst und das Verhältnis der Magnetstärke H_3 des mindestens einen externen Magneten zur Magnetstärke H_2 des mindestens einen Zentralelements (20)
$H_3 \geq 1.1^* H_2$ bis $H_3 \leq 10^* H_2$
beträgt.

7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der mindestens eine externe Magnet ein Elektromagnet ist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei der mindestens eine externe Magnet ein Permanentmagnet ist.

9. Verfahren zum Behandeln von Flüssigkeiten mit magnetischen Partikeln (10) mit einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, umfassend die Schritte

   a) Verteilen der magnetischen Partikel (10) in der Flüssigkeit (150) sowie nachfolgend
   b) Anlagern der magnetischen Partikel (10) an das mindestens eine Zentralelement (20).

10. Verfahren nach Anspruch 9, **dadurch gekenn-**

zeichnet, dass Schritt a) eine Resuspendierung der magnetischen Partikel (10) in der Flüssigkeit (150) umfasst.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, **dadurch gekennzeichnet, dass** vor dem Schritt a) die magnetischen Partikel (10) zumindest teilweise an das mindestens eine Zentralelement (20) angelagert waren und Schritt a) durch Einwirkung einer Kraft auf das mindestens eine Zentralelement (20) erfolgt.

12. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 und/oder eines Verfahrens gemäß einem der Ansprüche 9 bis 11 zur zumindest teilweisen Abtrennung von Biomolekülen aus/in einer vorzugsweise wässrigen Lösung.

Claims

1. Apparatus for the treatment of a liquid with magnetic particles, comprising a vessel (100) containing the liquid (150) and a plurality of magnetic particles (10) arranged in the liquid (150) and at least one magnetic and/or magnetizable central element (20) formed in bar shape, dumbbell shape or ellipsoidal shape, wherein the ratio of the longest diameter d2 of the at least one central element (20) to the ratio of the average diameter d1 of the magnetic particles (10) is at least

$$d2\ (mm) \geq 15*d1\ (mm)$$

wherein the central element (20) is located completely within the interior of the vessel (100), wherein the apparatus additionally comprises at least one external magnet, which is designed for interaction with the at least one central element (20) such that the central element (20) is movable via the external magnet.

2. Apparatus according to claim 1, wherein the ratio of the volume V2 of the at least one central element (20) to the ratio of the average Volume V1 of one magnetic particle (10) is V2 (mm^3) ≥ 10*V1 (mm^3).

3. Apparatus according to claim 1, wherein the number of magnetic particles (10) per central element (20) is ≥ 10^4.

4. Apparatus according to one of claims 1 to 3, wherein the magnetic particles (10) include a material selected from the group of paramagnetic materials, superparamagnetic materials, ferromagnetic materials, ferrimagnetic particles and mixtures thereof.

5. Apparatus according to one of claims 1 to 4, wherein the added volume V_m of the magnetic particles (10) and the at least one central element (20) is ≥0.25% to ≤50% of the total volume V_G of the vessel (100).

6. Apparatus according to one of claims 1 to 5, wherein the central element (20) comprises at least one permanent magnet and the ratio of the magnetic strength H_3 of the at least one external magnet to the magnetic strength H_2 of the at least one central element (20) is $H_3 \geq 1.1*H_2$ to $H_3 \leq 10*H_2$.

7. Apparatus according to one of claims 1 to 6, wherein the at least one external magnet is an electromagnet.

8. Apparatus according to one of claims 1 to 6, wherein the at least one external magnet is a permanent magnet.

9. Method for treating liquids with magnetic particles (10) with an apparatus according to one of claims 1 to 8, comprising the steps

a) distributing the magnetic particles (10) in the liquid (150) and subsequently
b) attaching the magnetic particles (10) to the at least one central element (20).

10. Method according to claim 9, **characterized in that** step a) comprises resuspending the magnetic particles (10) in the liquid (150).

11. Method according to claim 9 or 10, **characterized in that** prior to step a) the magnetic particles (10) were at least partially attached to the at least one central element (20) and that step a) occurs due to a force acting on the at least one central element (20).

12. Use of an apparatus according to one of claims 1 to 8 and/or of a method according to one of claims 9 to 11 for at least partially separating biomolecules from/in a preferably aqueous solution.

Revendications

1. Dispositif de traitement d'un liquide comportant des particules magnétiques, ledit dispositif comprenant un récipient (100), qui contient le liquide (150), et une multitude de particules magnétiques (10) disposées dans le liquide (150) ainsi qu'au moins un élément central magnétique et/ou magnétisable (20) en forme de tige, d'haltère ou d'ellipsoïde, le rapport du plus long diamètre d2 de l'au moins un élément central (20) au diamètre moyen d1 des particules magnétiques (10) étant d'au moins

$$d2\ (mm) \geq 15*d1\ (mm),$$

l'élément central (20) étant situé entièrement à l'intérieur du récipient (100),
le dispositif comprenant en outre au moins un aimant externe qui est conçu pour interagir avec l'au moins un élément central (20) de sorte que l'élément central (20) peut être déplacé par l'aimant externe.

2. Dispositif selon la revendication 1, le rapport du volume V2 de l'au moins un élément central (20) au volume moyen V1 d'une particule magnétique (10) étant

$$V2\ (mm^3) \geq 10*V1\ (mm^3).$$

3. Dispositif selon la revendication 1, le nombre de particules magnétiques (10) par élément central (20) étant $\geq 10^4$.

4. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 3, les particules magnétiques (10) contenant un matériau choisi dans le groupe comprenant les matériaux paramagnétiques, les matériaux superparamagnétiques, les matériaux ferromagnétiques, les matériaux ferrimagnétiques et leurs mélanges.

5. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 4, le volume ajouté V_m des particules magnétiques (10) ainsi que l'au moins un élément central (20) étant $\geq$ 0,25 % à $\leq$ 50 % du volume total V_G du récipient (100).

6. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 5, l'élément central (20) comprenant au moins un aimant permanent et le rapport de la force magnétique H_3 de l'au moins un aimant externe à la force magnétique H_2 de l'au moins un élément central (20) étant $H_3 \geq 1$, $1*H_2$ à $H_3 \leq 10*H_2$.

7. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 6, l'au moins un aimant externe étant un électroaimant.

8. Dispositif selon l'une des revendications 1 à 6, l'au moins un aimant externe étant un aimant permanent.

9. Procédé de traitement de liquides comportant des particules magnétiques (10) à l'aide d'un dispositif selon l'une des revendications 1 à 8, le procédé comprenant les étapes suivantes :

a) répartir les particules magnétiques (10) dans le liquide (150) puis
b) fixer les particules magnétiques (10) à l'au moins un élément central (20).

10. Procédé selon la revendication 9, **caractérisé en ce que** l'étape a) comprend une remise en suspension des particules magnétiques (10) dans le liquide (150).

11. Procédé selon la revendication 9 ou 10, **caractérisé en ce que**, avant l'étape a), les particules magnétiques (10) étaient fixées au moins partiellement à l'au moins un élément central (20) et l'étape a) est effectuée par action d'une force sur l'au moins un élément central (20).

12. Utilisation d'un dispositif selon l'une des revendications 1 à 8 et/ou d'un procédé selon l'une des revendications 9 à 11 pour séparer au moins partiellement des biomolécules d'une/dans une solution de préférence aqueuse.

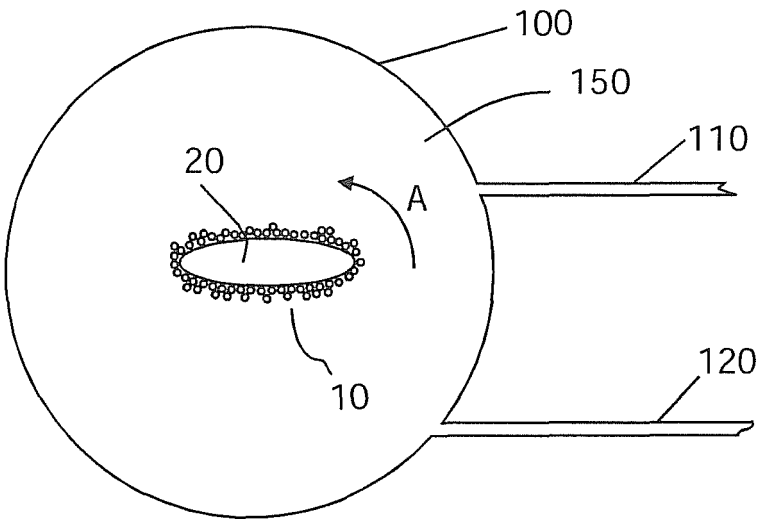


Fig. 1

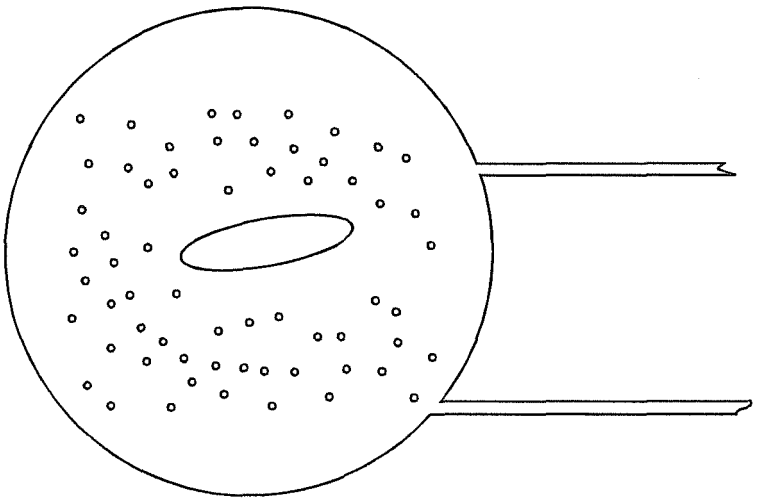


Fig. 2

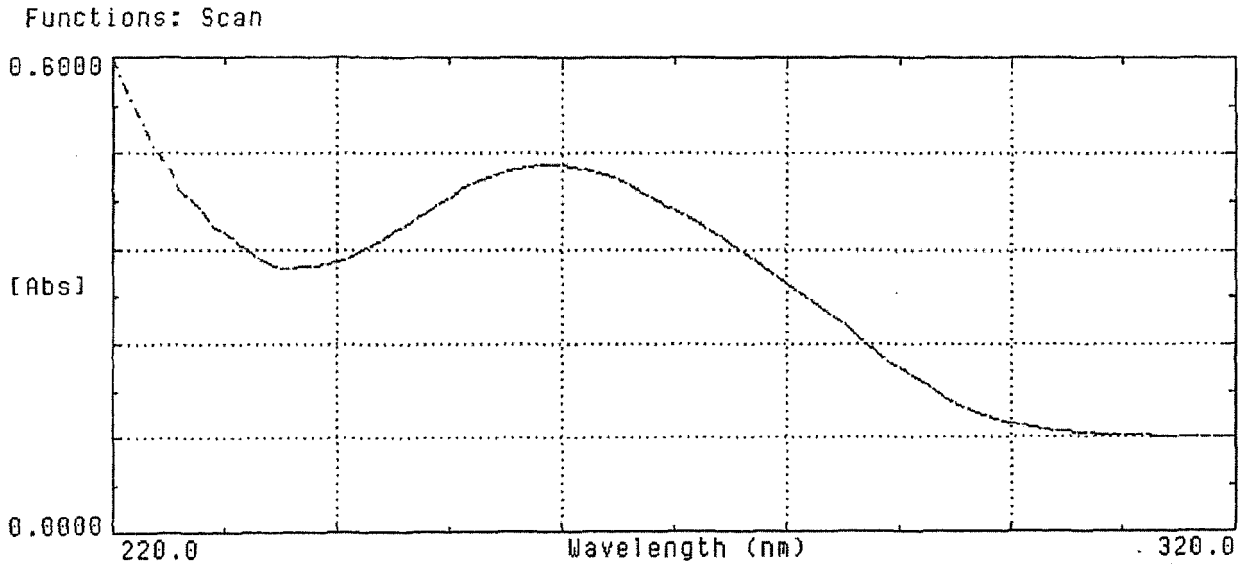


Fig. 3

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- US 20010022948 A **[0008]**
- US 6065605 A **[0009]**
- WO 2005005049 A **[0009]**
- EP 0965842 A **[0010]**
- US 6187270 B **[0011]**
- EP 015905520 A **[0012]**
- WO 2007063174 A **[0013]**
- WO 9942832 A **[0014]**
- WO 2004035217 A **[0015]**
- WO 03072531 A1 **[0015]**