



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
26.06.2019 Patentblatt 2019/26

(51) Int Cl.:
B04B 5/04 (2006.01) **B04B 9/10** (2006.01)
B04B 13/00 (2006.01) **B01L 3/00** (2006.01)

(21) Anmeldenummer: **17208556.5**

(22) Anmeldetag: **19.12.2017**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
Benannte Erstreckungsstaaten:
BA ME
Benannte Validierungsstaaten:
MA MD TN

• **Fränzel, Benjamin**
44789 Bochum (DE)

(72) Erfinder:

• **Pinto, Antonio**
53177 Bonn (DE)
• **Fränzel, Benjamin**
44789 Bochum (DE)

(71) Anmelder:

• **Pinto, Antonio**
53177 Bonn (DE)

(74) Vertreter: **Stürken, Joachim**

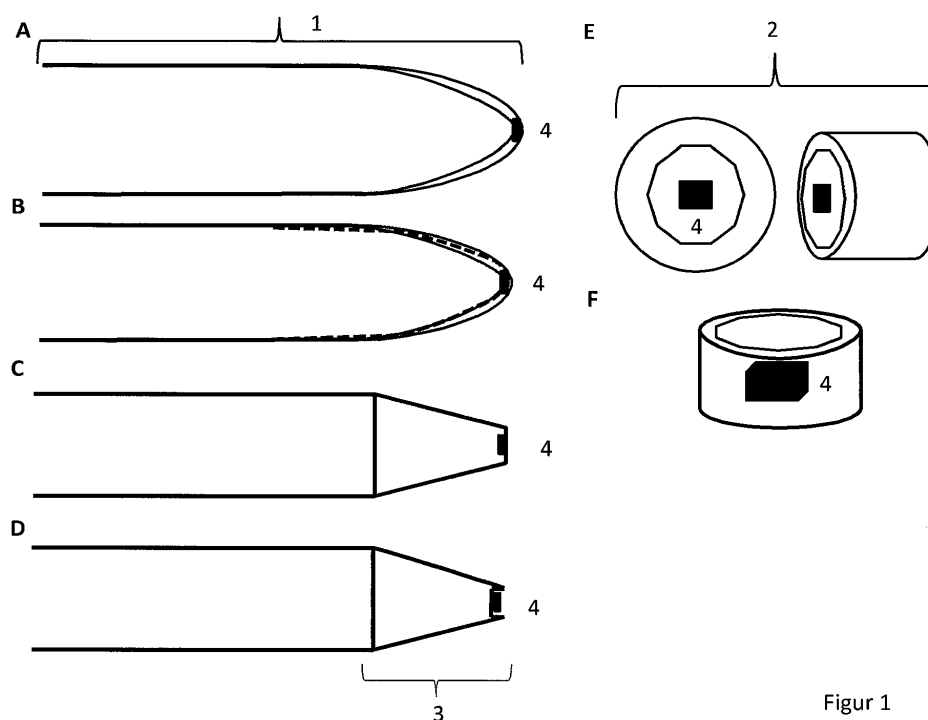
Joachim Stürken
Patentanwalts-gesellschaft mbH
Kirchhölzle 18
79104 Freiburg (DE)

(54) **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR STOFFTRENNUNG DURCH ZENTRIFUGATION**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stofftrennung wie insbesondere zur Trennung der Bestandteile von Suspensionen, Emulsionen und Gasgemischen, sowie geeignete Vorrichtungen zur Durchführung desselben.

Erfindungsgemäß erfolgt das Trennverfahren durch

übliche Zentrifugation unter Verwendung geeigneter Trennvorrichtungen und/oder Zentrifugationsbehältnissen in Anwesenheit von mindestens einem Beschleunigungssensor in unmittelbarer Nähe zum Zentrifugationsgut.



Figur 1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stofftrennung wie insbesondere zur Trennung der Bestandteile von Suspensionen, Emulsionen und Gasgemischen, sowie geeignete Vorrichtungen zur Durchführung desselben.

[0002] Zur Stofftrennung werden häufig Zentrifugen eingesetzt, die unter Ausnutzung der Massenträgheit arbeiten. Die Funktionsweise beruht auf der Zentrifugalkraft, die aufgrund einer gleichförmigen Kreisbewegung des zu zentrifugierenden Gutes (Zentrifugiergut) zustande kommt und die gewünschte Stofftrennung herbeiführt. Ein ähnliches Verfahren verwendet der Fliehkraftabscheider, für dessen Anwendung das erfindungsgemäße Verfahren gleichermaßen geeignet ist.

[0003] Zentrifugen nutzen die Massenträgheit im Zentrifugiergutraum zur Stofftrennung. Dabei werden Partikel oder Medien mit höherer Dichte aufgrund ihrer höheren Trägheit von den Bestandteilen mit niedrigerer Dichte getrennt. Dieser Prozess ist gegenüber der Sedimentation durch die Schwerkraft wesentlich schneller oder wird überhaupt erst möglich, da Gegenkräfte wie die Adhäsion, die thermische Molekularbewegung oder die Viskosität überwunden werden.

[0004] Werden zur gewünschten Stofftrennung eines gegebenen Stoffgemisches unter Verwendung derselben Zentrifuge und eines Zentrifugationsbehältnisses derselben Spezifikation voneinander abweichende Zentrifugationsbedingungen angewendet, kann es insbesondere im medizinisch-diagnostischen Bereich zu erheblichen Auftrennungsfehlern kommen, da die Trennung der Bestandteile unterschiedlicher Dichte nur teilweise stattgefunden hat. Praktische Anwendungen hierfür sind zum Beispiel die Trennung von Vollblut in Serum oder Plasma und Zellbestandteile. Die getrennten Bestandteile wie Plasma und Serum werden zum Beispiel in der Diagnostik zur Bestimmung von Krankheitsmarkern weiterverwendet. Hierbei ist die Einhaltung der Zentrifugationsbedingungen für die Vergleichbarkeit der Messergebnisse unabdingbar, da schon kleine Unterschiede die Messergebnisse moderner Methoden beeinflussen können. Die aktuelle Entwicklung in der zellbasierten Immuntherapie gegen Krebs hat aufgezeigt, dass Zentrifugationsprozesse auch im pharmazeutischen Bereich relevant sind. Beispielsweise ist bei dem neu zugelassenen T-Zell basierten Medikament CTL019 (Novartis, CAR-T Technologie) für die Vorbereitung der T-Zellen eine Zentrifugation zur Aufbereitung der T-Zellen zwingend notwendig. Die Überprüfbarkeit, ob diese für die Konditionierung erforderlichen Zentrifugationsprozesse im Rahmen der zuvor erfolgten Spezifikation (Validierung) stattgefunden haben, ist exakt nur am Zentrifugationsgerät oder Zentrifugationsbehältnis und nur direkt nach dem Zentrifugationsvorgang gegeben. Dieser Umstand erfordert Vertrauen in regelmäßige Wartung, sachgemäße Nutzung und wahrheitsgemäße Herstellerangaben. Insbesondere bei dezentral stattfindenden

Prozessen mit multiplen Anwendern kann es dabei zu einer Vielzahl von Fehlern oder Unregelmäßigkeiten kommen, die im Zuge vieler Zertifizierungs- und Auditierungsmaßnahmen nicht vorkommen dürfen, wie dies unter anderem unter GMP (Good Manufacturing Practice) bzw. GLP (Good Laboratory Practice) festgelegt ist.

[0005] Es besteht daher ein Bedarf an der Bereitstellung eines Verfahrens sowie dafür geeigneter Vorrichtungen, mit denen die Ergebnisse einer Stofftrennung der vorbezeichneten Art direkt vor Ort in Echtzeit erfasst und vergleichsweise einfach sowie kostengünstig überprüft werden können.

[0006] Die Aufgabe wird durch das Verfahren und durch die Trennvorrichtung der unabhängigen Patentansprüche gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen sind in den Unteransprüchen sowie in der nachfolgenden detaillierten Beschreibung dargelegt.

[0007] Wie bereits erwähnt, ist die Güte der Trennung von Partikeln in Suspension durch Beschleunigungskräfte hauptsächlich von der Partikelgröße und den Dichteunterschieden zwischen den Stoffen abhängig. Durch die Anwendung von Beschleunigungskräften werden Partikel mit größerem Volumen und höherer Dichte von Partikeln mit geringerem Volumen und/oder geringerer Dichte im Verlauf der Zentrifugation getrennt, wobei die Zeit bis zur gewünschten Trennung oder Sedimentation durch die Anwendung höherer Beschleunigungskräfte verkürzt werden kann. Durch die Stokes-Gleichung kann die Sedimentationsgeschwindigkeit von Partikeln anhand von 5 Parametern sehr gut berechnet werden

$$v = \frac{d^2(p - L)g}{18\eta}$$

, wobei v die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikelsphäre, d den Durchmesser der Sphäre, p die Partikeldichte, L die Dichte des umgebenden Mediums, n die Viskosität des umgebenden Mediums, und g die Beschleunigungskraft bezeichnen.

[0008] Die Brown'sche Molekularbewegung wirkt der Sedimentationsgeschwindigkeit entgegen. Bei sehr kleinen Partikeln und geringen Dichteunterschieden müssen deshalb sehr hohe Beschleunigungskräfte wirken, um eine erfolgreiche Trennung der Partikel zu gewährleisten. Durch die Anwendung von Zentripetalkräften um eine fixierte Achse können diese hohen Beschleunigungskräfte erreicht werden, so dass selbst Trennungen von Molekülen, die sich nur in der Isotopenverteilung unterscheiden, möglich sind. Diese allgemein als Zentrifugation bezeichnete Technik ermöglicht im biologischen oder biotechnologischen Bereich die Trennung von Zellen, Organellen, Membranen und Molekülen. Eine grobe Klassifizierung von Zentrifugationsanwendungen erfolgt durch die erreichbaren Beschleunigungskräfte (ausgedrückt in Vielfachen von g, der Erdbeschleunigung). Während bei der sogenannten Low Speed Zentrifugation

bis zu 8.000 g zur Anwendung kommen, werden bei der High Speed Zentrifugation bis zu 22.000 g und im Rahmen einer Ultrazentrifugation bis zu 700.000 g angewendet.

[0009] Neben einer direkten Sedimentation wird vor allem die Low Speed Zentrifugation auch zur beschleunigten Filtration oder anderen Größenausschlussverfahren genutzt. Darüber hinaus werden bei der Festphasenextraktion von beispielsweise Nukleinsäuren mittels sogenannter 'Spin Columns' Zentrifugationsvorgänge zur Beschleunigung des Vorgangs eingesetzt (s. z.B. BioRad (<http://www.bio-rad.com/de-de/product/empty-spin-columns>)).

[0010] Eine Erweiterung der Methoden betrifft die differenzielle Zentrifugation, welche die sequenzielle Anwendung unterschiedlicher Zentrifugationsbedingungen nutzt, um mehrere Stoffe aus demselben Gemisch zu trennen. Weiterhin werden 'Rate-Zonal'-Zentrifugationen und isopyknische Zentrifugationen verwendet. Beide Techniken verwenden Hilfsstoffe, die Gradienten bilden. Bei 'Rate Zonal' ist die Dichte des Gradienten geringer als die zu trennenden Stoffe, weshalb es erforderlich ist, die Zentrifugation zu einem definierten Zeitpunkt zu stoppen, um die Trennung verschiedener Partikelgrößen zu erreichen. Bei der isopyknischen Zentrifugation ist die Dichte des Gradienten durchaus höher als diejenige der zu trennenden Stoffe, so dass sich die Partikel in einer Bande des Gradienten gleicher Dichte bzw. gleicher Sedimentationsrate sammeln.

[0011] In Zentrifugen werden gewöhnlich Festwinkelrotoren, Ausschwingrotoren oder spezialisierte Rotorensysteme eingesetzt, die vorliegend auch als Trennvorrichtungen bezeichnet werden. Die Rotoren können direkt zur Aufnahme eines aufzutrennenden Gemisches ausgestaltet sein, oder sie sind ausgelegt zur Aufnahme von Behältnissen wie insbesondere Röhrchen unterschiedlicher Größe und Beschaffenheit (Polypropylen, meist bis 20.000 g (Festwinkelrotor), bei höheren g-Kräften eher Duroplasten (z.B. Polycarbonat)).

[0012] Zu den bekanntesten Zentrifugenherstellern gehören Beckmann-Coulter (Sorvall und andere Marken, größter Hersteller von Ultrazentrifugen), Hettich, Thermo, Eppendorf, und NuAire.

[0013] Typische Zentrifugationsbehältnisse wie z.B. Zentrifugenröhrchen weisen ein Volumen zwischen 5 µl und 5000 ml auf, wobei sie zumeist konisch, kugelförmig oder elliptisch geformt sind. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf diese exemplarische Auswahl an Größen und Formgebungen gebunden, sondern ist gleichermaßen für die Verwendung von Behältnissen anderer Größen und Formen geeignet.

[0014] Herkömmliche Zentrifugenröhrchen werden zumeist aus thermoplastischen oder duroplastischen Kunststoffen im Spritzgussverfahren (im speziellen Streckblas- oder Spritzblasverfahren) hergestellt, wobei die Temperaturen im normalen Spritzgussverfahren bis zu 220°C erreichen können. Im Spritzblasverfahren werden niedrigere Verarbeitungstemperaturen im Bereich

von ca. 100-120°C angewendet.

[0015] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird vorgeschlagen, die gewünschte Stofftrennung mit Zentrifugen durchzuführen, deren Rotoren und/oder Behältnisse wie insbesondere Röhrchen mit mindestens einem RFID-Transponder ausgerüstet sind, wobei dieser Transponder vorzugsweise eine Komponente eines auch einen Empfänger umfassenden RFID-Systems darstellt und einen Beschleunigungssensor (Accelerometer) umfasst, wobei der Beschleunigungssensor alternativ auch als Komponente einer sogenannten inertialen Messeinheit (engl. 'Inertial Measurement Unit', IMU) bereitgestellt sein kann.

[0016] RFID (engl. 'radio-frequency identification') bezeichnet eine Technologie für Sender-Empfänger-Systeme zum automatischen und berührungslosen Identifizieren und Lokalisieren von Objekten mit Radiowellen. Ein bekanntes RFID-System besteht somit aus einem Transponder, der sich am oder im Gegenstand befindet und einen kennzeichnenden Code enthält, sowie einem Lesegerät zum Auslesen dieser Kennung. Erfindungsgemäß ist der Transponder in der Trennvorrichtung einer Zentrifuge wie insbesondere am Rotor und/oder am Zentrifugenröhrchen und somit in unmittelbarer Nähe zum aufzutrennenden Gut angeordnet, wobei die Anordnung des Transponders alternativ auch im Rotor und/oder im Zentrifugationsröhrchen bzw. ggfs. im aufzutrennenden Gut erfolgen kann. Obwohl erfindungsgemäß bevorzugt RFID-Systeme der vorbezeichneten Art, d.h. mit kennzeichnendem Code des Transponders und Lesegerät zum Auslesen der Kennung, eingesetzt werden, können insbesondere die mit einem RFID-Transponder versehenen Zentrifugationsröhrchen als Ein- oder Mehrwegartikel ausgestaltet sein. Da die Möglichkeit besteht, RFID-Transponder über ein spezielles Druckverfahren schaltungsstabil und hitzeresistent in Polymere einzubetten, ist es erfindungsgemäß bevorzugt, Zentrifugationsröhrchen aus Kunststoff zu verwenden, die durch vorbezeichnete Spritzgussverfahren unter Einlagerung solcher hitzeresistenter RFID-Transponder aus Polymeren hergestellt worden sind.

[0017] Die aktuell verfügbaren RFID-Transponder (RFID-Chips) ermöglichen bereits eine Temperaturbeständigkeit bei 220°C für die Zeitdauer einer Stunde, was dem Temperaturbereich für Spritzgussverfahren im Rahmen der Herstellung von Zentrifugationsröhrchen aus Kunststoff weitgehend entspricht. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird daher bevorzugt die Bereitstellung sowie Verwendung von Trennvorrichtungen wie insbesondere Zentrifugationsröhrchen mit eingelagerten RFID-Transpondern vorgeschlagen, welche in die Spritzgussform oder für das Spritzblasverfahren des Röhrchens bereits in den Vorförmling eingebracht worden sind. Besonders bevorzugt ist die Verwendung sowie Bereitstellung von Trennvorrichtungen wie insbesondere von Zentrifugationsröhrchen mit RFID-Transpondern, die in das Endstück (in die Wandung des Bodens) des Vorförmlings eingebracht worden sind, so dass der

Transponder unter Anwendung des Spritzblasverfahrens bei der nachfolgenden Verfestigung des Förmings im Boden des Zentrifugenröhrchens dauerhaft fixiert angeordnet ist. Vorzugsweise weist der RFID-Transponder zusätzliche Aussparungen auf, die eine Orientierung und Positionierung sowie ein Abstandhalten während des Spritzgussverfahrens erleichtern. Alternativ und in Abhängigkeit von der konkreten Anwendung und des aufzutrennenden Gutes wird bevorzugt, einen handelsüblichen RFID-Transponder unabhängig von seiner Beschaffenheit und Herstellungsweise vor dem Trennvorgang oder der Zentrifugation lose in das Zentrifugenröhrchen einzulegen, oder ein Röhrchen mit einer Möglichkeit zur Aufnahme des Transponders wie z.B. einem Schlitz am Boden oder der Verschlusskappe zu verwenden, wodurch die Zentrifugation in beiden Fällen in Anwesenheit des RFID-Transponders im Zentrifugationsröhrchen erfolgt.

[0018] Alternativ oder zusätzlich wird vorgeschlagen, den mit der Funktion eines Beschleunigungssensors ausgestatteten RFID-Transponder in oder an einem Rotor als Trennvorrichtung anzuordnen. Bei gewissen technischen Zentrifugationsprozessen werden keine Röhrchen benötigt, sondern es kommt direkt zur Trennung des Gutes im Rotor. Meist geht es dabei um die kontinuierliche Trennung von Suspensionen. Gerade im biologischen Bereich werden oft Zellen einer kontinuierlichen Flusszentrifugation (engl. Continuous Flow Centrifugation) unterworfen. Das erfolgt im niedertourigen Bereich bis 1000 g, wobei es jedoch aufgrund der Größe der Rotoren in Abhängigkeit von der konkreten Positionierung des aufzutrennenden Gutes innerhalb des Rotors zu erheblichen Unterschieden hinsichtlich der am Trennungsgut herrschenden g-Kraft kommen kann. Im Falle der Verwendung derartig mit RFID-Transpondern bestückter Rotoren ist es daher bevorzugt, eine mehrfache punktuelle Überwachung (erhöhte örtliche Auflösung durch gleichzeitige Verwendung mehrerer RFID-Transponder) der tatsächlich vorherrschenden Beschleunigungskräfte durchzuführen, um eine verbesserte Ausbeute und Viabilität von Zellen und Zellprodukten zu ermöglichen.

[0019] Im Rahmen der vorstehenden Abhandlung wird darauf hingewiesen, dass vor allem während der Beschleunigungs- und Abbremsphasen eines Trennvorganges Unterschiede hinsichtlich der wirkenden Beschleunigungskraft g auftreten (s. Figur 3), sofern sich der Abstand des aufzutrennenden Gutes zur Zentrifugationsachse (Drehachse) des Rotors nicht ändert.

[0020] Insbesondere bei Ausschwingrotoren und der Verwendung von Gradientensystemen kann es während der Zentrifugation zu erheblichen Positionsunterschieden der Partikel kommen, weshalb insbesondere bei der Aufreinigung von Zellen Unterschiede hinsichtlich Viabilität und Ausbeute beobachtet werden können. Je weiter eine Zelle von der Zentrifugationsachse entfernt ist, desto größer ist die Kraft, die auf sie wirkt und bei ihr Schaden anrichten kann. Die g-Kraft in einer Zentrifuge (auch Radial Centrifugal Force (RCF)) lässt sich über die einge-

stellte Drehzahl sowie über den Abstand von der Zentrifugationsachse (Drehachse) nach folgender Formel berechnen

$$RCF = 11.18 \cdot r \cdot (Q/1000)^2$$

, wobei R den Abstand zum Zentrifugationsmittelpunkt in cm, und Q die Drehzahl in rpm ('rounds per minute') bezeichnen.

[0021] Ein Unterschied hinsichtlich der g-Kraft bei einem angenommenen Abstand von 10 cm des aufzutrennenden Gutes zur Zentrifugations- oder Drehachse kann sowohl in einem Zentrifugenröhrchen als auch in einem Rotor leicht zustande kommen. Bei einem Abstand von 1 cm und einer Drehzahl von 5000 rpm ergibt sich eine RCF von 279,5 g. Bei 10 cm Abstand und 5000 rpm ergibt sich 2795 g für die RCF. Während 280 g für Zellen gut verträglich sind, können g-Kräfte von über 1000 g Zellen zerstören und zum Platzen bringen. Daraus wird deutlich, dass ein (örtlich) mehrfaches Einbringen von mit Beschleunigungssensoren ausgestatteten RFID-Transpondern in ein Röhrchen, einen Rotor, oder eine andere Trennvorrichtung vorteilhaft sein kann und damit bevorzugt ist. Dies gilt insbesondere im Falle einer gewünschten differenzierten Trennung von Zellen und Biomolekülen.

[0022] Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

[0023] Für die Ausführung der erfindungsgemäßen Lehre wurden RFID-Transponder 4 mit integrierter Funktionalität eines Beschleunigungssensors von ST Electronics (Genf, Schweiz) bezogen. Sie sind bis ca. 200°C temperaturbeständig, umfassen eine Antenne und weisen eine Größe von ca. 3 mm x 3 mm sowie eine Dicke von ca. 1 mm auf (s. Figuren 1 und 3). Aufgrund ihrer geringeren Größe wurden vorliegend passive RFID-Transponder 4 eingesetzt, wobei alternativ auch semi-passive Transponder verwendet wurden.

[0024] Der passive RFID-Transponder 4 lässt sich aufgrund der geringen Größe am einfachsten in den Kunststoff des herzustellenden Zentrifugenröhrchens 1 einarbeiten. Passive RFID-Transponder haben allerdings keine unabhängige Stromquelle, weshalb sie vor ihrem Einsatz über eine RFID-Reader/Senderstation entsprechende Signale erhalten, damit sie Daten senden oder schreiben können. Anschließend wird über die integrierte Antenne eine Induktion ausgelöst, wodurch der RFID Transponder 4 mit ausreichend Strom (ca. 0,35 Watt) versorgt wird. Diese Strömmenge reicht aus, um auch das in den RFID Transponder 4 integrierte 3-Wege Accelerometer für den nachfolgenden Zentrifugationsvorgang ausreichend zu versorgen.

[0025] In mehreren Parallelversuchen wurde ein Aktivierungssender/Empfänger sowohl an, in als auch in der

Nähe der zu benutzenden Zentrifuge angebracht. Die Zentrifugenröhrchen 1 mit passivem RFID-Transponder 4 (Empfangsreichweite 1-6 m) wurden vor der jeweiligen Zentrifugation für einige Sekunden in Reichweite des Senders gebracht. Eine erfolgte Aktivierung konnte über das Display des Senders/Empfängers überprüft werden. Der Zentrifugationsvorgang wurde gestartet. Die passiven RFID-Transponder 4 sendeten die Daten in Echtzeit an den Sender/Reader. Dieser übermittelte die Daten der Beschleunigungsmessung an eine Datenbank. Durch die ständige Aktivierung der Transponder 4 war eine durchgehende Übermittlung der Zentrifugationsdaten auch bei längeren Zentrifugationsprozessen stets gewährleistet.

[0026] Im Rahmen der alternativen Verwendung von semipassiven RFID-Transpondern 4, die eine begrenzte Stromzufuhr haben, konnte auf eine Aktivierung durch eine Sender/Reader-Einheit vor der Zentrifugation verzichtet werden. Die Aktivierung erfolgte über das integrierte Accelerometer, d.h. dass Datenschiebervorgänge nur ab einer vorher festgelegten Zentrifugalkraft von 50 g ausgelöst wurden. Das Auslesen des RFID-Transponders 4 erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt und an einem anderen Ort. Diese Anwendung hat den Vorteil, dass der Einsatzort nicht die Voraussetzung haben muss, die RFID-Transponderdaten online auszulesen. So ist ein sehr flexibler Einsatz der erfindungsgemäß mit RFID-Transpondern 4 ausgestatteten Zentrifugenröhrchen 1 möglich, selbst in weniger technologisierten Umgebungen.

Beispiel 2

[0027] Als praktische Anwendung der erfindungsgemäß vorgeschlagenen RFID-Accelerometer Technologie bei Zentrifugationsprozessen wird hier die Aufreinigung von PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) herangezogen, welche eine Vorstufe der für die T-Zell basierte Immuntherapie darstellt. Ein häufiger Anwendungsfehler ist die Einstellung der Drehzahl in Umdrehungen (rpm) anstatt der beabsichtigten radialen Zentrifugalkraft bzw. Beschleunigung (RCF oder g). Das kann dazu führen, dass die gewünschte Auftrennung der verschiedenen Zellpopulationen nicht wie gewünscht stattfindet. Hierzu wurde folgende Versuchsreihe durchgeführt.

[0028] 50 ml Zellkulturröhrchen 1 (Art.Nr. 210261 Greiner BioOne, Frickenhausen, Deutschland) wurden mit Hilfe von 2-Komponenten Kleber 11 (Henkel, Düsseldorf, Deutschland) mit je einem RFID-Transponder mit Accelerometer 4 (Accelerometer: H3LIS331DL, ST-Electronics, Genf, passiver RFID-Transponder Andy 100 IC, Farsens, San Sebastian, Spanien) in Deckel 2 und Boden 3 versehen und diese entsprechend versiegelt. Nach abgeschlossener Trocknung wurden die Röhrchen 1 für ca. 10 Sekunden über einen Impinj R220 UHF RFID Reader gehalten (ebenfalls Farsens), um die passiven RFID-Transponder 4 zu aktivieren. Anschließend wurden die

Röhrchen 1 mit 20 ml Ficoll Paque Gradientenmedium 5 beladen (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Anschließend wurden vorsichtig 20 ml EDTA-Vollblut 6 aus einer Eigenblutspende in das Röhrchen 1 gegeben (s. Figur 3A). Ein Teil der Proben wurde entsprechend der Vorschrift bei 350 g (Fig. 3B) 45 Minuten lang zentrifugiert, während ein anderer Teil bei 350 rpm (Fig. 3C) 45 Minuten lang zentrifugiert wurde (Eppendorf 5810R mit Rotor A-4-81, ohne Bremskräfteeinstellung). Nach erfolgter Zentrifugation zeigte sich bei Zentrifugation B bei 350 g das erwartete Bandenmuster aus Plasma 7, mononukleären Zellen 8 und Granulozyten 9, sowie das Sediment aus Erythrozyten 10. In Zentrifugation C zeigten sich demgegenüber nicht die erwarteten Banden für mononukleäre Zellen 8 und polymorphnukleäre Zellen 9, und rote Schlieren aus dem Erythrozytensediment 10 durchzogen einen Großteil der Probe. Die Übertragung der Daten erfolgte bei der passiven RFID-Einheit online. Die Auswertung der Daten für Zentrifugation B ergab eine maximale Zentrifugationskraft g im Plateau von 311 g (+/- 2g) für den im Boden 3 eingebrachten RFID-Transponder 4 (b2), während der RFID-Transponder 4 im Deckel 2 (b1) im Plateau eine maximale Beschleunigungskraft von 136 g (+/- 2g) zeigte (siehe Figur 4). Eine Interpolation auf die Mitte des Gefäßes, was der Position der mononukleären Zellen 8 entspricht, ergab eine maximale Zentrifugationskraft von 233 g (+/- 2g). In Zentrifugation C betrug die im Plateau durch das Boden-Accelerometer (c2) maximal registrierte Zentrifugationskraft 22 g, während die Messung durch das Accelerometer 4 im Deckel 2 (c1) nur 10 g ergab (siehe Figur 4). Der ermittelte Verlauf der Zentrifugalkräfte ist für die Zentrifugationen B und C in Figur 4 dargestellt. Die niedrigen nicht ausreichenden Zentrifugationskräfte in Zentrifugation C lassen sich klar durch den Anwendungsfehler und die dadurch zu niedrige Beschleunigung begründen. Die Abweichungen in Zentrifugation B von den eingestellten 350 g sind durch den Abstand des Accelerometers 4 vom maximalen Zentrifugationsradius des Gerätes gegeben und macht selbst im Bodenbereich des Gefäßes mehr als 10 % der Zentrifugalkraft aus. Ein weiterer Anwendungsfehler, der eindeutig über ein integriertes Accelerometer 4 festgehalten werden könnte, wäre die Einstellung einer Bremskraft an der Zentrifuge. Eine zugeführte Bremskraft ist bei einer Gradientenzentrifugation nicht erwünscht, da durch die Fliehkräfte die beim Abbremsen frei werden Dichtebanden des Gradienten verschwimmen und es zu keiner Zellseparation kommt. Die Aufzeichnung durch ein Accelerometer 4 würde hier in der Auslaufphase nach der eigentlichen Zentrifugation ein wesentlich abrupteres Abnehmen der Zentrifugationskraft im Vergleich zu einem ungebremsten Auslaufen anzeigen (siehe zusätzliche Kurven in Figur 4).

Figurenbeschreibung

[0029] Die Figur 1 (A-F) veranschaulicht die jeweilige Positionierung eines miniaturisierten RFID-Accelerome-

ters 4 im Bereich des Bodens 3 von Zentrifugationsbehältnissen 1 unterschiedlicher Formgebung. A) Direkte Inkorporation des RFID-Accelerometers 4 ohne Antennen in das Zentrifugationsgefäß 1 während des Herstellungsprozesses. B) Direkte Inkorporation des RFID-Accelerometers 4 mit Antennen während des Herstellungsprozesses. C) Einbringen und ggfs. Fixieren eines RFID-Accelerometers 4 in das Innere eines Zentrifugationsröhrchens 1. D) Anbringen und Fixieren eines RFID-Accelerometers 4 in eine äußere Einbuchtung eines Zentrifugationsgefäßes 1. E) Anbringen eines RFID-Accelerometers 4 an das Deckeläußere eines Zentrifugationsgefäßes 1. F) Anbringen eines RFID-Accelerometers 4 an das Deckelinnere eines Zentrifugationsgefäßes 1.

[0030] Die Figur 2 (A, B) zeigt den aufgezeichneten Verlauf der Beschleunigung in g über die Zeit der Zentrifugation, beispielsweise innerhalb festgelegter Parameter (A), sowie den aufgezeichneten Verlauf der Beschleunigung in g über die Zeit der Zentrifugation und anschließendem Abbruch bei Erreichen einer festgelegten Beschleunigung g (B).

[0031] In den Figuren 3 und 4 sind die Ergebnisse der in Beispiel 2 dargelegten Versuchsanordnung vergleichend dargestellt.

Bezugszeichenliste

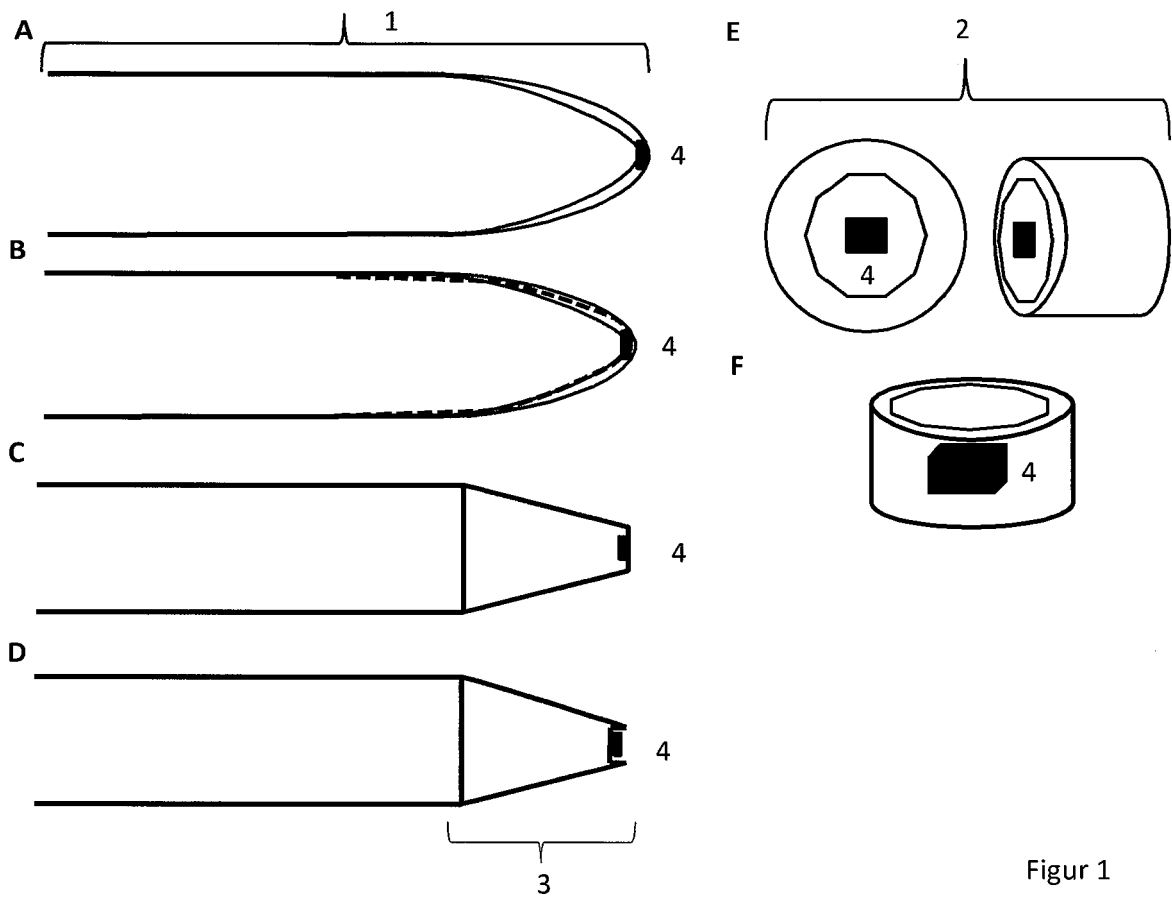
[0032]

- | | | |
|----|---|----|
| 1 | Zentrifugationsröhrchen, Zellkulturröhrchen, Röhrchen, Zentrifugationsbehältnis | 30 |
| 2 | Deckel | |
| 3 | Boden | |
| 4 | Beschleunigungssensor, RFID-Transponder mit Accelerometer, RFID-Accelerometer, Accelerometer, Transponder | 35 |
| 5 | Gradientenmedium | |
| 6 | EDTA-Vollblut | |
| 7 | Plasma | |
| 8 | Mononukleäre Zellen | 40 |
| 9 | Granulozyten, polymorphnukleäre Zellen | |
| 10 | Sediment aus Erythrozyten, Erythrozytensediment | |
| 11 | 2-Komponenten Kleber | 45 |

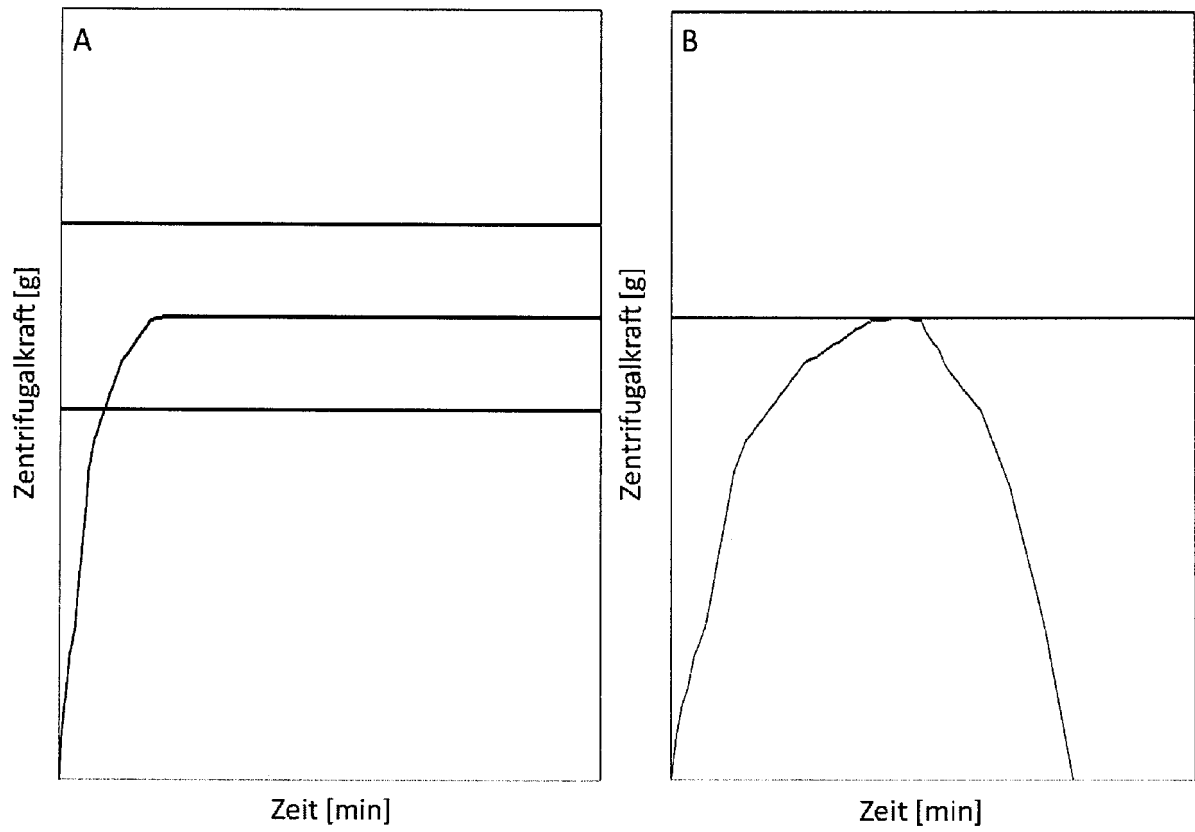
Patentansprüche

1. Verfahren zur Trennung der Bestandteile von Zentrifugationsgütern wie Suspensionen, Emulsionen und Gasgemischen durch übliche Zentrifugation unter Verwendung geeigneter Trennvorrichtungen und/oder Zentrifugationsbehältnissen, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Trennung in Anwesenheit von mindestens einem Beschleunigungssensor (4) in unmittelbarer Nähe zum Zentrifugationsgut erfolgt.

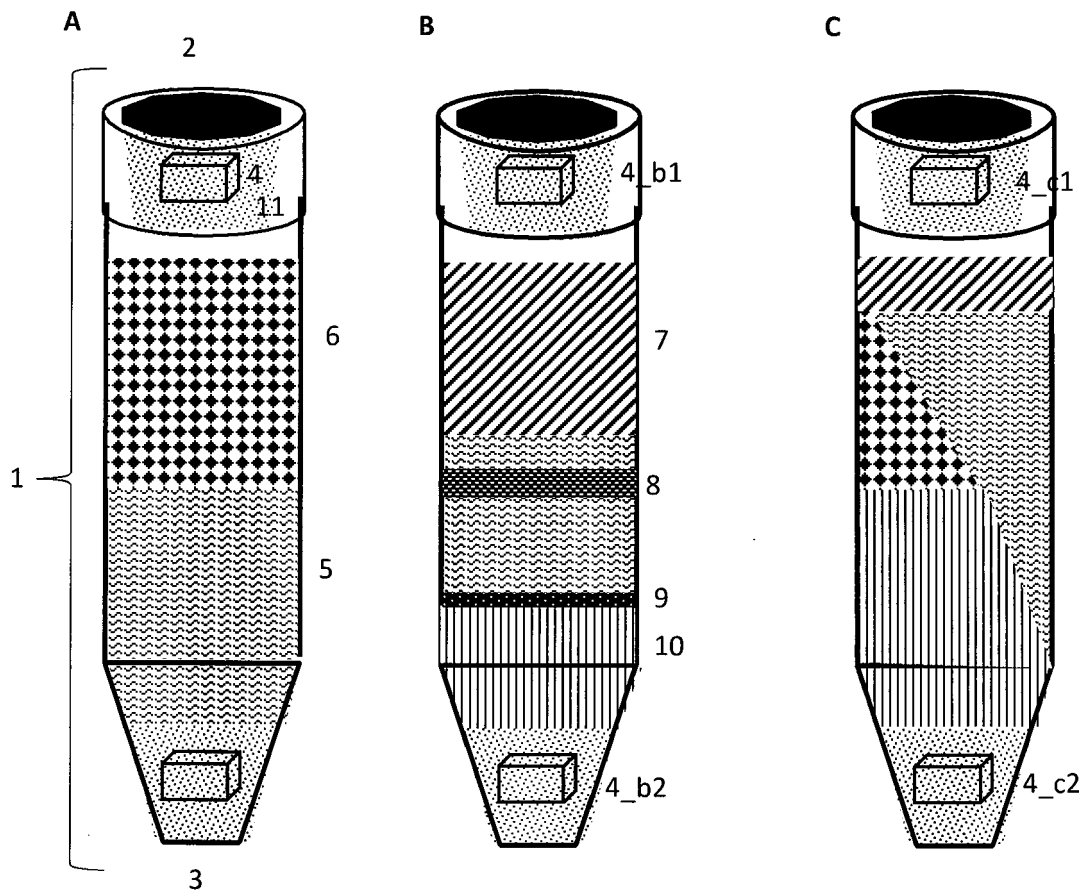
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Beschleunigungssensor (4) in der Lage ist, die am Zentrifugationsgut wirkende Beschleunigungskraft zu messen und aufzuzeichnen und/oder an einen Empfänger zu senden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Beschleunigungssensor (4) ein funktionell zur Beschleunigungsmessung ausgestatteter RFID-Transponder (4) eingesetzt wird.
4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Beschleunigungssensor (4) während der Zentrifugation in und/oder an der Trennvorrichtung bzw. dem Zentrifugationsbehältnis (1) angeordnet ist.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Trennvorrichtung ein Rotor eingesetzt wird.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet, dass** als Zentrifugationsbehältnis (1) ein Zentrifugationsröhrchen (1) eingesetzt wird.
7. Trennvorrichtung oder Zentrifugationsbehältnis, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie bzw. es mit mindestens einem Beschleunigungssensor (4) ausgestattet ist.
8. Trennvorrichtung oder Zentrifugationsbehältnis nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie bzw. es den mindestens einen Beschleunigungssensor (4) als integralen Bestandteil umfasst.
9. Trennvorrichtung nach Anspruch 7 oder 8, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie ein Rotor ist.
10. Trennvorrichtung oder Zentrifugationsbehältnis nach einem der Ansprüche 7 bis 9, **dadurch gekennzeichnet, dass** der Beschleunigungssensor (4) in der Lage ist, die am Zentrifugationsgut wirkende Beschleunigungskraft zu messen und aufzuzeichnen und/oder an einen Empfänger zu senden.



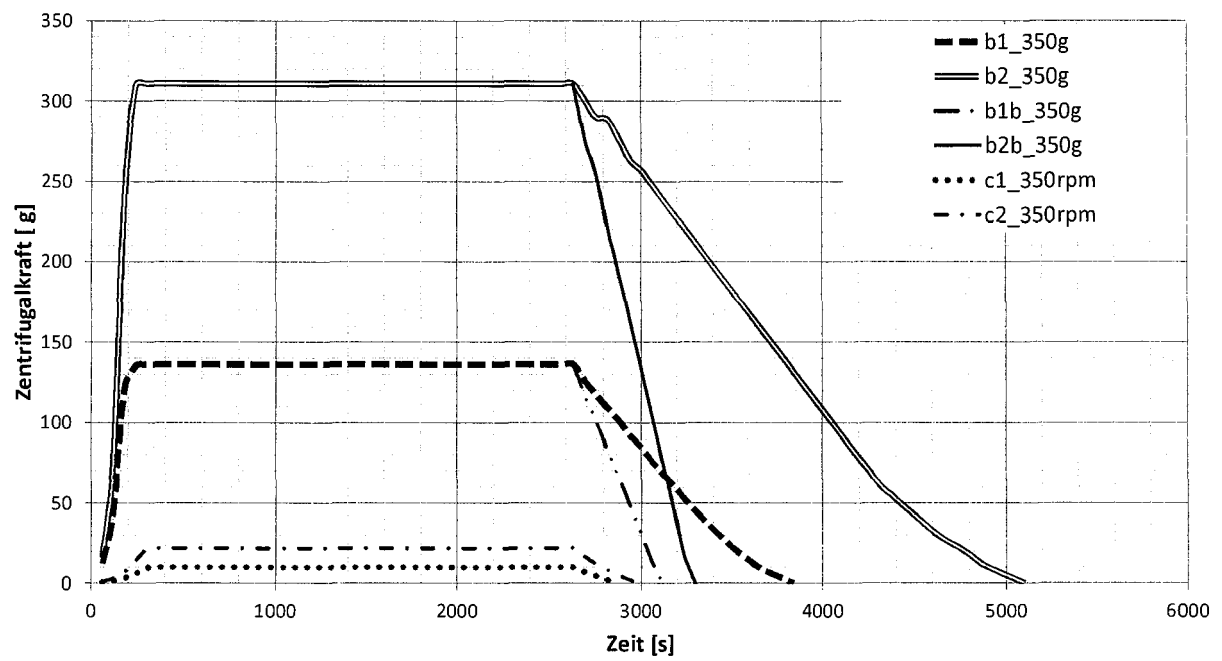
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

 Nummer der Anmeldung
EP 17 20 8556

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	JP 2011 173043 A (OLYMPUS CORP) 8. September 2011 (2011-09-08)	1,2,4-10	INV. B04B5/04 B04B9/10 B04B13/00 B01L3/00
Y	* Absatz [0014] - Absatz [0015] * * Absatz [0027]; Abbildungen 1,3,4 *	1-10	
X	DE 10 2004 061633 A1 (LOSSAU HARALD [DE]) 29. Juni 2006 (2006-06-29) * Absatz [0031] * * Absatz [0056] * * Absatz [0076]; Abbildung 1 *	1-4,6-8,10	
X	US 2014/212914 A1 (COELHO PHILIP H [US]) 31. Juli 2014 (2014-07-31) * Absatz [0107] * * Absatz [0118]; Abbildungen 28-37 *	1,2,4,5,7-10	
Y	EP 2 623 206 A1 (BAUMER ELECTRIC AG [CH]) 7. August 2013 (2013-08-07) * Ansprüche; Abbildungen *	1-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			B04B B01L
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort München		Abschlußdatum der Recherche 6. Juni 2018	Prüfer Leitner, Josef
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.92 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 17 20 8556

5 In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

06-06-2018

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 2011173043 A	08-09-2011	KEINE	
DE 102004061633 A1	29-06-2006	AT 506271 T	15-05-2011
		DE 102004061633 A1	29-06-2006
		DE 202005021951 U1	19-01-2012
		EP 1838589 A1	03-10-2007
		US 2010032437 A1	11-02-2010
		WO 2006066787 A1	29-06-2006
US 2014212914 A1	31-07-2014	AU 2011227203 A1	11-10-2012
		CA 2793648 A1	22-09-2011
		CN 102946890 A	27-02-2013
		EP 2547346 A1	23-01-2013
		JP 5635177 B2	03-12-2014
		JP 6016867 B2	26-10-2016
		JP 2013526901 A	27-06-2013
		JP 2015037590 A	26-02-2015
		KR 20130056224 A	29-05-2013
		MX 341634 B	08-08-2016
		MY 160835 A	31-03-2017
		RU 2012144390 A	27-04-2014
		SG 183963 A1	30-10-2012
		US 2013029370 A1	31-01-2013
		US 2014212912 A1	31-07-2014
		US 2014212914 A1	31-07-2014
		US 2017199106 A1	13-07-2017
		WO 2011116221 A1	22-09-2011
EP 2623206 A1	07-08-2013	KEINE	

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82