

DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/EP2018/067397
International filing date:	28 June 2018 (28.06.2018)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: DE
	Number: 20 2018 002 198.9
	Filing date: 02 May 2018 (02.05.2018)
Date of receipt at the International Bureau:	30 August 2018 (30.08.2018)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung DE 20 2018 002 198.9 über die Einreichung einer Gebrauchsmusteranmeldung

Aktenzeichen: 20 2018 002 198.9

Anmeldetag: 02. Mai 2018

Anmelder/Inhaber: Esser, Knud, Dr., 51061 Köln, DE;
Kulik, Andrea, 81475 München, DE

Bezeichnung: Zwei Teilvorrichtungen bestehende Vorrichtung, welche die (a) schonende, (b) zeitgleiche, (c) gleichmäßige, (d) blasenfreie, (e) vollständige, (f) sterile und (g) effiziente, Entnahme bzw. Zugabe von Flüssigkeit(en) (z.B. Zellsuspensionen, Medien, Puffer oder Reagenzien) aus bzw. in Mikrotiterplatten von beliebiger Well-Zahl ohne die Verwendung von Multikanalpipetten oder Roboter-Systemen sondern mit Verwendung einfacher Handpipetten ermöglicht.

IPC: B01L 3/00; B01L 99/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der Teile der am 02. Mai 2018 eingereichten Unterlagen dieser Gebrauchsmusteranmeldung unabhängig von gegebenenfalls durch das Kopierverfahren bedingten Farbabweichungen.

München, den 20. Juni 2018
Deutsches Patent- und Markenamt
Die Präsidentin
Im Auftrag

Sebele

Beschreibung der Erfindung

Das vorliegende Gebrauchsmuster beschreibt eine aus zwei Teilvorrichtungen bestehende Vorrichtung, welche die (a) schonende, (b) zeitgleiche, (c) gleichmäßige, (d) blasenfreie, (e) vollständige, (f) sterile und (g) effiziente, Entnahme bzw. Zugabe von Flüssigkeit(en) (z.B. Zellsuspensionen, Medien, Puffer oder Reagenzien) aus bzw. in Mikrotiterplatten von beliebiger Well-Zahl ohne die Verwendung von Multikanalpipetten oder Roboter-Systemen sondern mit Verwendung einfacher Handpipetten ermöglicht. Alle Arbeitsschritte mit Ausnahme der Zentrifugation können steril unter einer handelsüblichen Zellkultur-Sterilwerkbank durchgeführt werden.

1.) Teilvorrichtung zur Flüssigkeitsentfernung aus Mikrotiterplatten

Das Entfernen der Well-Flüssigkeit aus den einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte wird hierbei nicht wie üblich durch Absaugen über (Multikanal)-Pipettensysteme sondern mittels kurzzeitiger Zentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde ein für Zentrifugeneinsätze passendes Gefäß entwickelt, in das die Mikrotiterplatte mit der Öffnung der Mikrotiterplatten-Wells nach unten steril über die Gefäßwände und/oder -ränder durch einfachen Aufsatz passend fixiert werden kann und die Flüssigkeit bei der Zentrifugation aus den einzelnen Wells so gleichzeitig in das freie Lumen des Gefäßes abzentrifugiert werden kann. Die Entfernung der Flüssigkeit aus den einzelnen Wells in das entwickelte Gefäß ist dabei sehr effizient und vollständig, was bei Entnahme der Well-Flüssigkeit mittels Pipettensystemen oder Absaugvorrichtungen (z.B. Gefahr des Verlustes adhärent wachsender Zellen in den Wells; Verbleib von Restflüssigkeit) so nicht erreicht werden kann. Für Zellkultivierungsversuche mit adhärent wachsenden Zellen kann so nach nur wenigen Sekunden Zentrifugation mit z.B. 100-300xg steril das Medium vollständig abgenommen und aufgefangen werden, wobei keine Mediumreste in den Wells zurückbleiben. Hierdurch können effizient Waschschrte vermieden, somit die Versuchsdauer signifikant verkürzt und der Einsatz von Waschlösungen deutlich reduziert werden. Bei nachfolgender Kultivierung konnten keine Vitalitätsverluste der Zellen/Zelllinien beobachtet werden. Die effiziente Mediumabnahme und Vermeidung von Waschschrten erhöhen wesentlich die Robustheit von zellbasierten Testverfahren. Die effiziente Abnahme von Überständen in Testverfahren über Zentrifugation anstatt

Absaugvorrichtungen führt auch in Verfahren wie zum Beispiel ELISA-basierten Systemen, Multiplexing-Systemen etc. zu einer Vermeidung von z.B. Waschschritten, Ermöglichung effizienter Reagenzienabnahme und Vermeidung hiermit verbundenen Artefakten.

Es hat sich zudem gezeigt, dass aufgrund der mangelnden Adhärenz toter adhärenter Zellen (z.B. Epithelzellen) im Bereich der Zellkultur bei Verwendung der erwähnten Teilvorrichtung ein neuartiger kostenneutraler Toxizitätstest für adhärenente Zellen integriert wird, da die toten Zellen bei der Zentrifugation mitentfernt werden und die Verringerung der Adhärenz somit als neuartiges Vitalitätskriterium in einem Testverfahren für adhärenente Zellen verwendet werden kann. So kann z.B. über die Reduktion eines vorher von Zellen aufgenommenen bzw. gebundenen Fluorophors oder Chromophors oder auch ohne deren Verwendung allein aufgrund der Absorption durch zelluläre Nukleotide und aromatische Aminosäuren mit Absorptionsmaximum bei 280 nm nach Zentrifugation in Relation zum Hintergrundsignal die Anzahl vitaler Zellen quantifiziert werden. Dies wird möglich, da nach Kultivierung unter toxischen Bedingungen und anschließender mittels der beschriebenen Teilvorrichtung Zentrifugation-basierter Mediumabnahme tote Zellen entfernt werden und nur die verbliebenen vitalen adhärenente Zellen als Quelle eines Fluoreszenz- oder Absorptionssignals dienen. Zudem liegen die Messung störende Mediumreste aufgrund der mittels der Vorrichtung vorgenommenen Mediumabnahme nicht mehr vor. Nach der Vitalitätsmessung stehen die vitalen Zellen im Gegensatz zu herkömmlichen Vitalitätstests unbehandelt für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

2.) Teilvorrichtung zur Flüssigkeitszugabe in Mikrotiterplatten

Herkömmlich kann die zeitgleiche Medium- bzw. Flüssigkeitszugabe in alle Wells einer Mikrotiterplatte über einen Multikanal-Roboterkopf realisiert werden.

Alternativ wurde nun erstmals festgestellt, dass dies auch unter Verwendung herkömmlicher (Multikanal-/) Handpipetten mit einer speziell hergestellten Mikrotiterplatte erreicht werden kann:

- Hierbei wird in einem ersten Schritt in eine hergestellte Mikrotiterplatte mit konischen sich nach unten verjüngenden und am unteren Ende (z.B. kreisförmig) offenen Wells, die zuzugebende Flüssigkeit zugegeben. Für

jedes einzelne Well kann hierbei gezielt eine gesonderte Flüssigkeitszusammensetzung verwendet werden. Aufgrund der Oberflächenspannung fließt die Flüssigkeit nicht durch die Öffnung im Boden der einzelnen konischen/sich nach unten verjüngenden Wells. Der Durchmesser der Loch-Bohrung ist hierbei an die Oberflächenspannung der Flüssigkeit anzupassen: Geringere Oberflächenspannung z.B. bei Gegenwart von Detergenzien, erfordern einen geringeren Durchmesser, erhöhte Oberflächenspannung einer Flüssigkeit ermöglichen einen größeren Durchmesser. Alternativ kann das Beladen der Mikrotiterplatte mit konischen/sich nach unten verjüngenden Wells mit Flüssigkeit statt mittels Pipettieren auch in einem Schritt einfach über das vollständige Eintauchen der Mikrotiterplatte in die Flüssigkeit erreicht werden.

- In einem zweiten Schritt wird dann die Mikrotiterplatte mit den konischen/sich nach unten verjüngenden Wells passend auf die Mikrotiterplatte, in die das Medium bzw. die Flüssigkeit überführt werden soll (handelsübliche Mikrotiterplatte mit nicht-konischen Wells, z.B. quadratischen Wells), gesetzt, wobei die konischen/ sich nach unten verjüngenden Wells nicht den Boden der nicht-konischen Wells berühren. Zur Erhaltung der Sterilität wird die Mikrotiterplatte mit einem passenden Deckel verschlossen. Nun kann unter Zentrifugation gleichzeitig die Flüssigkeit aus den konischen/sich nach unten verjüngenden Wells in die Mikrotiterplatte mit nicht-konischen Wells zentrifugiert werden. Hierbei wird unabhängig von der verwendeten Drehzahl durch die Radialkraft automatisch unter dem geringst-möglichen Druck die Flüssigkeit durch die Well-Öffnung der konischen/sich nach unten verjüngenden Wells in die nicht-konischen Wells gedrückt. Dies ist dabei unabhängig von Höhe der bei der Zentrifuge eingestellten Zentrifugationsgeschwindigkeit, da bereits bei der geringst möglichen Umdrehung im Beschleunigungsprozess, bei der die zugehörige Radialkraft die Kraft der Oberflächenspannung, die die Flüssigkeit zurückhält, übersteigt, die Flüssigkeit in das zugehörige nicht-konische Well überführt wird. Eine weitere Steigerung der Zentrifugationsgeschwindigkeit kann ggf. noch erreichen, dass durch Adhäsion verbliebene Rest-Flüssigkeit vollständig überführt wird. Hierdurch wird aufgrund der vollständigen Flüssigkeitsentfernung eine

weitere Verwendung der gelochten Mikrotiterplatte für andere Substanzen ohne vorherige Reinigung ermöglicht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mittels der beschriebenen Teilvorrichtung mit einer von null aufsteigende Zentrifugationsgeschwindigkeit bis z.B. 300 g in einer herkömmlichen Zellkulturzentrifuge einzelne Flüssigkeiten gezielt, schonend, zeitgleich, gleichmäßig und vollständig in die einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte überführt werden können.

Schutzansprüche

1. Vorrichtung umfassend eine erste Teilvorrichtung (1) und eine davon verschiedene zweite Teilvorrichtung (2), wobei die Vorrichtung die (a) schonende, (b) zeitgleiche, (c) gleichmäßige, (d) blasenfreie, (e) vollständige, (f) sterile und (g) effiziente, Entnahme bzw. Zugabe von Flüssigkeit(en) (z.B. Zellsuspensionen, Medien, Puffer oder Reagenzien) aus bzw. in Mikrotiterplatten von beliebiger Well-Zahl ohne die Verwendung von Multikanalpipetten oder Roboter-Systemen sondern mit Verwendung einfacher Handpipetten ermöglicht, so dass alle Arbeitsschritte mit Ausnahme der Zentrifugation steril unter einer handelsüblichen Zellkultur-Sterilwerkbank durchgeführt werden können.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Teilvorrichtung (1) dadurch gekennzeichnet ist, dass die Entfernung der Flüssigkeit aus den Mikrotiterplattenwells in ein für Mikrotiterplatten konstruiertes Gefäß erfolgt, welches über die Gefäßwände bzw. -ränder die Mikrotiterplatte mit den Wellöffnungen nach unten steril fixiert und die Zentrifugation in das freie Lumen des Gefäßes mit Einsätzen einer herkömmlichen Zellkulturzentrifuge ermöglicht.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Teilvorrichtung (2) dadurch gekennzeichnet ist, dass die Zugabe der Flüssigkeit(en) in die Wells einer Mikrotiterplatte über eine Mikrotiterplattenaufsatz mit gelochten konischen/sich nach unten verjüngenden Wells gezielt erfolgt, deren Wells zunächst mit der/den entsprechenden Flüssigkeit(en) befüllt werden. Anschließend Positionierung der Mikrotiterplatte auf die flüssigkeitserhaltende Mikrotiterplatte und Überführung der Flüssigkeit(en) mittels Zentrifugation. Positionierung des Aufsatzes dabei so, dass jedes konische Well in ein Well der flüssigkeitserhaltenden Mikrotiterplatte passend gesetzt wird, ohne dass die konischen Wells den Mikrotiterplattenboden berühren. Zur sterilen Bearbeitung wird die Mikrotiterplatte vor Zentrifugation mit einem passenden Deckel abgedeckt.

An das

Deutsche Patent und Markenamt
80297 München

Anhang zum Formular G6003 1.14

Sendungen des Deutsche Patent und Markenamts sind zu richten an:

Dr. Knud Esser
Stammheimer Ring 33
51601 Köln

Betreff: graphische Darstellung der in den Schutzansprüchen genannten und der Beschreibung der Erfindung erklärten Teilvorrichtungen 1 und 2.

Nachfolgende, exemplarische Zeichnungen wurden mit den Programm SketchUp 2017 erstellt und dienen zur Veranschaulichung der in der Beschreibung der Erfindung genannten Teilvorrichtungen 1 und 2.

Abbildungen eins bis fünf zeigen Teilvorrichtung 1 zur Flüssigkeitsentfernung aus Mikrotiterplatten in Draufsicht von Oben (Abbildung 1), in seitlicher Ansicht über die Längsseite (Abbildung 2), in perspektivischer Ansicht von Oben (Abbildung 3) und Seitlich (Abbildung 4) sowie von der Unterseite aus betrachtet (Abbildung 5). Die Innenmaße von Teilvorrichtung 1 entsprechen den handelsüblichen Maßen einer 1536-/384-/96-/48-/24-/12-/ oder 6-Well-Mikrotiterplatte. Die Außenmaße von Teilvorrichtung 1 können an handelsübliche Maße der Zentrifugen-Gehänge verschiedenster Hersteller (z.B. Thermo; Eppendorf; Hettich ; ...) angepasst werden. Um der Übersichtlichkeit gerecht zu werden sind in den nachfolgenden Zeichnungen keine Größenangaben vorhanden.

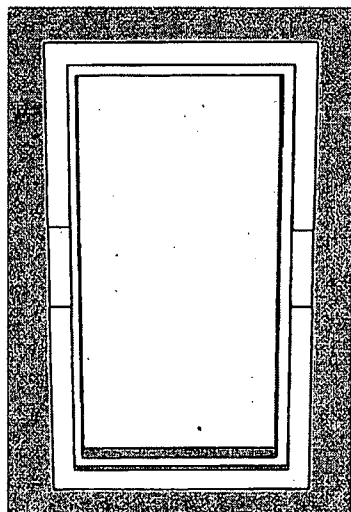


Abbildung 1 Draufsicht auf Teilvorrichtung 1

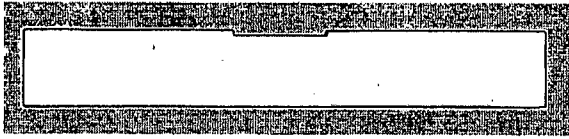


Abbildung 2 seitliche Ansicht Teilvorrichtung 1 (über die Längsseite)

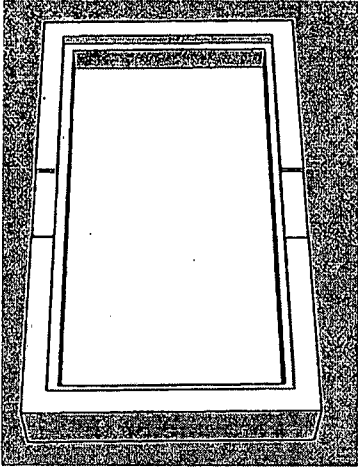


Abbildung 3 perspektivische Ansicht von Teilvorrichtung 1 verdeutlicht die Auflageflächen für die einzulegende Mikrotiterplatte (seitlich von Oben aus betrachtet)

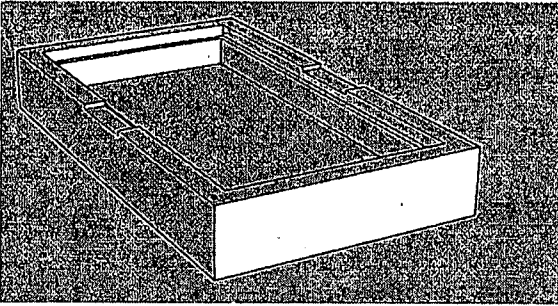


Abbildung 4 perspektivische Ansicht von Teilvorrichtung 1 (von der Seite aus betrachtet)

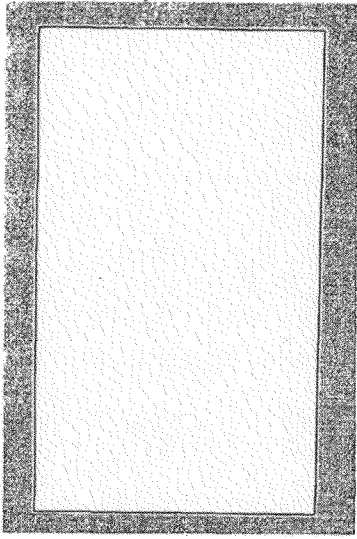


Abbildung 5 Boden von Teilvorrichtung 1

Abbildungen sechs bis acht zeigen Teilvorrichtung 2 zur Flüssigkeitszugabe in Mikrotiterplatten in Draufsicht von Oben (Abbildung 6), in seitlicher Ansicht über die Längsseite (Abbildung 7) und in perspektivischer Ansicht von unten (Abbildung 8). Exemplarisch wurden alle Abbildungen für das Befüllen einer 384- Mikrotiterplatte gewählt. Für Mikrotiterplatten in Abweichenden formaten (1536-well, 96-well; 48-well; etc..) werden die Abstände zwischen den sich nach unten verjüngenden und am unteren Ende (z.B. kreisförmig) offenen Wells, über welche die zuzugebende Flüssigkeit zugegeben wird, entsprechend verändert. Die Außenmaße der Platte entsprechen den handelsüblichen Maßen der Mikrotiterplatte des entsprechenden Well-Formates.

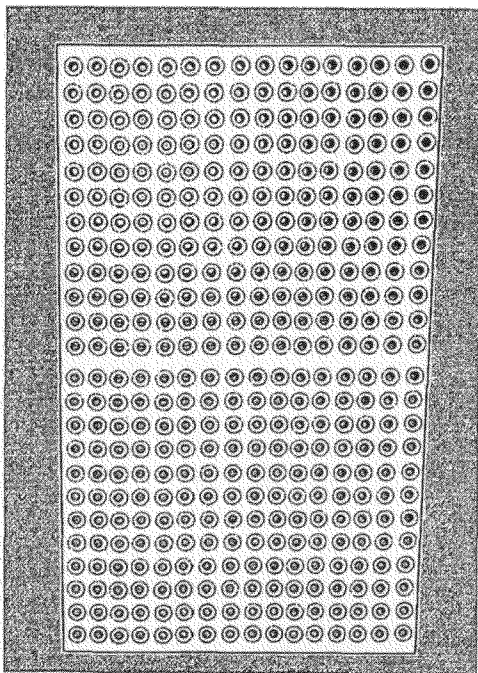


Abbildung 6 Draufsicht auf Teilvorrichtung 2

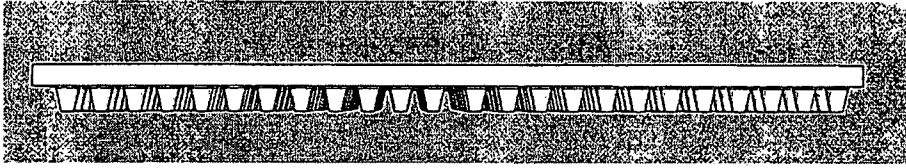


Abbildung 7 seitliche Ansicht Teilvorrichtung 2 (über die Längsseite)

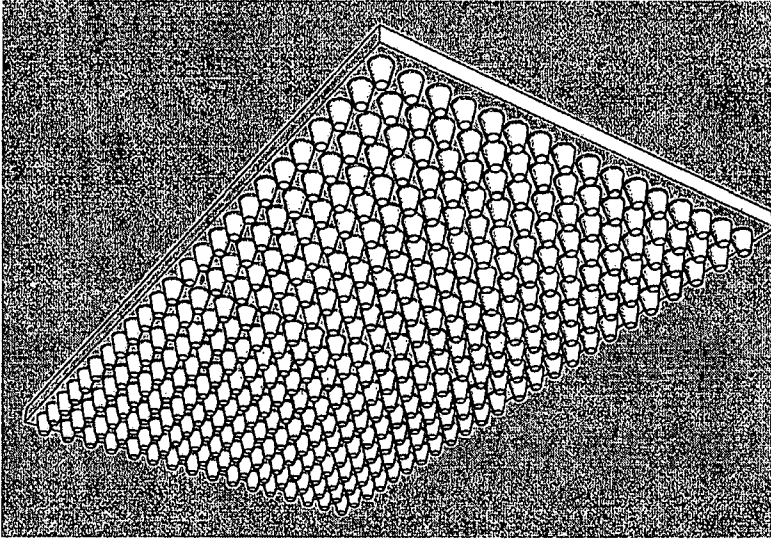


Abbildung 8 perspektivische Ansicht von Teilvorrichtung 2 (von der Unterseite aus betrachtet)