

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. August 2002 (29.08.2002)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/066598 A1

PCT

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12M 3/00 (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE02/00590 (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PFRIEGER, Frank, W. [DE/DE]; Schlossstrasse 18, 78224 Singen (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 20. Februar 2002 (20.02.2002) (74) Anwalt: BAUMBACH, Fritz; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
- (30) Angaben zur Priorität: 101 07 942.7 20. Februar 2001 (20.02.2001) DE 101 16 155.7 31. März 2001 (31.03.2001) DE

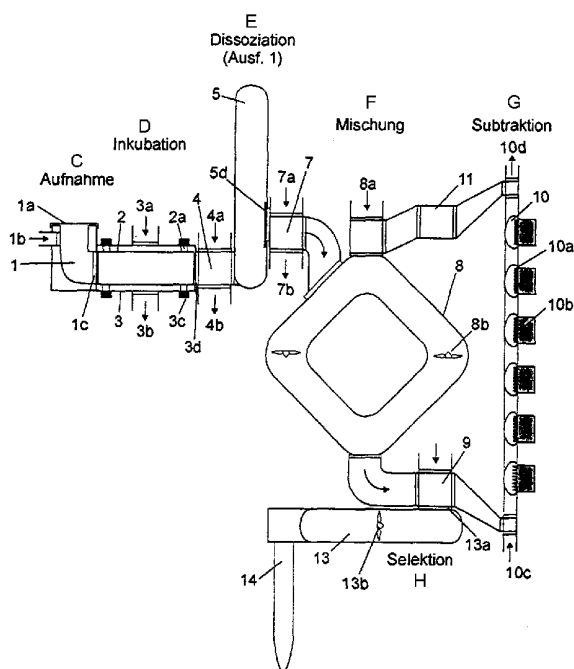
[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: SYSTEM FOR AUTOMATICALLY ISOLATING LIVING CELLS FROM ANIMAL TISSUE

(54) Bezeichnung: SYSTEM ZUR AUTOMATISCHEN ISOLIERUNG VON LEBENDEN ZELLEN AUS TIERISCHEN GEWEBEN

A Seitenansicht

B Maßstab 3:1



A FIG.1 LATERAL VIEW
B SCALE 3:1
C RECEPTION
D INCUBATION

E DISSOCIATION (VERSION 1)
F MIXTURE
G SUBTRACTION
H SELECTION

(57) Abstract: The invention relates to a system which enables animal tissue to be dissociated in a fully automatic and standardised manner, and enables living cells to be subsequently isolated. The inventive system can be used in the fields of biomedical research and development.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein System, welches die vollautomatische und standardisierte Dissoziation von tierischen Geweben und die anschließende Isolierung von lebenden Zellen ermöglicht. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die biomedizinische Forschung und Entwicklung.



WO 02/066598 A1



GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

System zur automatischen Isolierung von lebenden Zellen aus tierischen Geweben

Beschreibung

5 Die Erfindung betrifft ein System, welches die vollautomatische und standardisierte Dissoziierung von tierischen Geweben und die anschliessende Isolierung von lebenden Zellen ermöglicht. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die biomedizinische Forschung und Entwicklung.

10 Aus tierischen Geweben isolierte Zellen spielen eine wichtige Rolle in der biomedizinischen Forschung und bei der Entwicklung von Arzneimitteln und therapeutischen Methoden. Sie dienen zur Anlage primärer Zellkulturen, die für Funktionsuntersuchungen, Wirksamkeitstests oder andere präklinische Experimente eingesetzt werden (Animal Cell Culture Techniques, M. Clynes (Hrsg.), 1998, Springer; In
15 Vitro Models, D. Anderson, 1990, Drug Safety 5: 27-39), zur Entwicklung von Ersatzgewebe aus Stammzellen und zur Gewinnung von biologischem Material wie DNS, RNS oder Proteinen. Der Aufreinigung von spezifischen Zellen aus Geweben kommt mit der rasanten Entwicklung der funktionellen Genomforschung zunehmende Bedeutung zu. Beispielsweise können bestimmte Genmanipulationen in transgenen Tieren embryonal
20 lethal wirken, so daß mögliche Funktionen des untersuchten Proteins, die erst im postnatalen Tier eintreten, nicht *in vivo* untersucht werden können. Die Isolierung und anschliessende Kultivierung von Zellen aus embryonalem Gewebe erlaubt Untersuchungen dieser Funktionen *in vitro*. Eine weitere Aufgabe der funktionellen Genomforschung besteht in der Analyse von Expressionsmustern von Proteinen in bestimmten Zellen,
25 beispielsweise ein Vergleich der Proteinmuster in verschiedenen Entwicklungsabschnitten oder zwischen krankem und gesundem Gewebe (z. B. Tumorcharakterisierung). Hier besteht das Problem, daß jedes Gewebe eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen enthält und daß Veränderungen im Expressionsmuster in bestimmten Zellen, die nur in kleiner Anzahl vorhanden sind, nicht detektiert werden können aufgrund der niedrigen Menge an
30 Protein oder Boten-RNS. Dieses Problem kann dadurch gelöst werden, daß das biologische Material nicht aus dem gesamten Gewebe isoliert wird, sondern aus einer durch vorherige Dissoziation und Aufreinigung gewonnenen, homogenen Population des für die spezifische Fragestellung relevanten Zelltyps.

35 Gegenwärtig gibt es eine Reihe von Methoden für die Isolierung von Zellen aus tierischen Geweben (Culture of Animal Cells, 3. Aufl., R.I. Freshney, 1994, Wiley;

Animal Cell Culture Techniques, M. Clynes (Hrsg.), 1998, Springer; Cell and Tissue Culture. Laboratory Procedures in Biotechnology, A. Doyle & J.B. Griffiths (Hrsg.), 1998, Wiley/VCH; Cells. A Laboratory Manual: Vol 1: Culture and Biochemical Analysis of Cells, Spector et al. (Hrsg.), 1998, Cold Spring Harbor Press). Prinzipiell wird das Gewebe
5 zunächst dem Tier entnommen, dann der Zellverband mechanisch und/oder enzymatisch aufgelöst und der gewünschte Zelltyp anschliessend durch geeignete Selektionsverfahren isoliert.

Die bisherigen Präparations- und Isolationsverfahren sind aber mit einer Reihe von
10 Nachteilen behaftet: Sie sind allgemein kostenintensiv, da sie von entsprechend ausgebildeten und erfahrenen Fachkräften unter grossem Zeit- und Materialaufwand manuell durchgeführt werden, die Ausbeute an verwendbaren Zellen erheblich schwanken kann und die Verfahren von Labor zu Labor unterschiedlich durchgeführt werden. Bisher gibt es keine Möglichkeit, die Isolierung von Zellen aus tierischem Gewebe zu
15 automatisieren und zu standardisieren und damit die Kosten zu senken und die Zuverlässigkeit und Vergleichbarkeit der Zell-Präparationen zu erhöhen.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine vollautomatisierte und standardisierte Präparation von lebenden Zellen mit maximaler Ausbeute zu ermöglichen. Es soll ein modular aufgebautes System entwickelt werden, welches an verschiedene
20 Anwendungen angepasst werden kann, von der reinen Gewebedissoziation bis hin zur Aufreinigung von bestimmten Zelltypen, welche selektierbare Merkmale enthalten. Weiterhin soll es die verlustfreie Verarbeitung von Gewebeproben, die nur in kleinen Mengen zur Verfügung stehen (z.B. Biopsiematerial), die sichere Handhabung von Risikomaterial (z. B. von infiziertem Gewebe), die Gewinnung beliebig grosser Mengen an
25 Zellen durch Dauerbetrieb und die mögliche Kombination mit weiteren Anwendungen, wie beispielsweise der anschliessenden Transfektion der isolierten Zellen mittels geeigneter Geräte, erlauben.

Diese Aufgabe wird gemäß den in den Patentansprüchen dargelegten Maßnahmen
30 realisiert, sie wird nachfolgend näher beschrieben:

Aufbau und Funktionsprinzip

Das System besteht aus dem in Abbildung 1 und 2 dargestellten Hohlraum-Verbund.
35 Dieser setzt sich aus verschiedenen Abschnitten zusammen, welche je nach Anwendung kombiniert werden können. Zunächst wird im Dissoziierungsabschnitt der Gewebeverband

enzymatisch und mechanisch aufgelöst und eine Zellsuspension gewonnen. In einem nachfolgenden Reinigungsschritt werden unerwünschte Zellbruchstücke und beschädigte Zellen im Subtraktionsabschnitt aus der Suspension entfernt. Schliesslich können gewünschte Zellen durch eine entsprechende Kombination von Subtraktions- und/oder Selektionsschritten isoliert werden. Die Subtraktion und Selektion von Zellen und Zellbruchstücken erfolgt durch Erkennungsmoleküle (Antikörper, Lektine, Peptide o.ä.), welche spezifisch an Moleküle auf Zellen oder Zellbruchstücken binden. Diese Erkennungsmoleküle können beispielsweise an magnetische Partikel gekoppelt werden. Die mit magnetischen Partikeln beladenen Zellen werden dann durch entsprechend starke Magnetfelder im Subtraktions- oder Selektionsabschnitt immobilisiert. Alternativ können die Erkennungsmoleküle durch Bindung an vorbereitete Oberflächen reversibel immobilisiert werden. Das System wird in einem Versorgungsbehälter untergebracht, der die Steuerungselektronik, Vorratsbehälter sowie Pumpen, Ventile und Schläuche für die Versorgung mit den notwendigen Lösungen enthält. Jene Teile, welche mit biologischem Material oder Präparationslösungen in Berührung stehen, bestehen aus inertem, nicht-toxischem und hitzebeständigem Material. Das System sollte mit Sensoren für die Temperatur, pH-Wert, Sauerstoff-Partialdruck und Turbidität ausgestattet sein. Das System kann auch so ausgeführt werden, dass die mit Zellen in Kontakt tretenden Teile in einem Bauteil zusammengefasst werden und somit nach einer gewissen Nutzungsdauer ausgetauscht werden können.

Ablauf

Ausgangsmaterial für die Präparation sind Gewebestücke oder -schnitte. Diese werden in die Aufnahmekammer (1) eingebracht. Die Kammer wird über einen Verschluss (1a) geschlossen, und das Gewebe durch einen Flüssigkeitsstrom aus Zulauf (1b) über den Ablauf (1c) in eine drehbar gelagerte Trommel (2) in der Inkubationskammer gespült (3). Abbildung 3 zeigt eine mögliche Ausführung der Inkubationskammer in Frontansicht. Die Drehbewegung des Zylinders während der Inkubation wird durch wechselnde Magnetfelder angetrieben, welche durch ausserhalb der Inkubationskammer (3) angebrachte Elektromagneten (3c) erzeugt werden und auf an der Aussenseite des Zylinders (2) befindliche Dauermagneten (2a) einwirken. Der Zylinder enthält nach innen gerichtete Einkerbungen (2b), welche das darauf liegende Gewebe in Bewegung halten. Der Zylinder ist ausserdem mit wasserdurchlässige Poren (2c) versehen, welche einen Austausch der Präparationslösungen erlauben, das Gewebe aber zurückhalten. Schliesslich trägt der Zylinder aussen Erhebungen (2d), welche die Durchmischung der Enzymlösung verbessern. Für die Enzymbehandlung wird die Präparationslösung in der

Inkubationskammer über den Zulauf (3a) und den Ablauf (3b) durch Enzymlösung ausgetauscht. Das Gewebe wird dann in der Enzymlösung inkubiert. Dabei wird der Zylinder (2) langsam gedreht, damit ständig die Enzymlösung durchmischt und das Gewebe bewegt werden. Alternativ kann die Inkubationskammer aus einem Schlauch
5 bestehen, dessen Enden miteinander verbunden sind. Die im Schlauch befindliche Flüssigkeit mit dem Gewebe wird dann während der Inkubation durch aussen angebrachte Schlauchpumpen in Bewegung gehalten.

Während der Inkubation sollten der Sauerstoffpartialdruck und die Temperatur über entsprechende Sensoren und Regelkreise konstant gehalten werden. Die Temperierung und
10 Begasung der Inkubationslösung kann bereits im Vorratsbehälter erfolgen oder direkt in der Inkubationskammer. Nach einer vom Gewebe abhängigen Inkubationszeit wird die Enzymbehandlung gestoppt, indem die Enzymlösung über den Zulauf (3a) und den Ablauf (3b) durch Enzyminhibitor-Lösung ausgetauscht wird.

Nach der Enzymbehandlung werden die Gewebestücke durch einen
15 Flüssigkeitsstrom aus Zulauf (1b) über die Übergangskammer (4) in die Dissoziationskammer (5) gebracht (Abb. 1). Die Dissoziationskammer wird anschliessend über den Zulauf (4a) vollständig mit Lösung gefüllt. In der Dissoziationskammer wird der Gewebeverband mechanisch aufgelöst, indem die Gewebestücke wiederholt Dissoziationselemente (6) passieren, welche an mindestens einer Stelle in der
20 Dissoziationskammer angebracht sind (Abb. 4 - 6). Diese Dissoziationselemente üben Scherkräfte auf das Gewebe aus, welche bei wiederholten Passagen sukzessive verstärkt werden können und so die allmähliche Auslösung von Einzelzellen aus dem Gewebeverband ermöglichen. Der Durchmesser der Dissoziationskammer ist um die Dissoziationselemente herum verringert, so daß die Gewebestücke die
25 Dissoziationselemente mit erhöhtem Druck passieren. Die Dissoziationskammer kann in zwei Ausführungen konstruiert werden, welche die wiederholte Passage der Gewebestücke durch die Dissoziationselemente ermöglichen. Beide Ausführungen sind in Abbildung 4 dargestellt. In Ausführung 1 besteht die Dissoziationskammer aus einer ringförmigen, geschlossenen Röhre, welche zumindest teilweise aus Schlauchmaterial bestehen kann.
30 Die Lösung mit den Gewebestücken kommt über den Zulauf (5a) in die Kammer und wird durch Propeller (5b) oder aussen angebrachte Schlauchpumpen in zirkulierende Bewegung gebracht, so daß die Gewebestücke wiederholt die Dissoziationselemente (6) passieren. Die Propellerbewegung wird durch ein Magnetfeld angetrieben, welches durch einen aussen angebrachten Elektromagneten (5c) erzeugt wird. In Ausführung 2 besteht die
35 Dissoziationskammer aus einem Zylinder, welcher an den Enden durch bewegliche Kolben oder Membranen (5e) wasserdicht abgeschlossen ist. Die Lösung mit den Gewebestücken

kommt über Zulauf (5f) in die Kammer und wird durch die synchrone Bewegung der beiden Kolben oder Membranen im Zylinder hin- und her bewegt, so daß die Gewebestücke wiederholt die in der Mitte angebrachten Dissoziationselemente (6) passieren. Hierbei ist wichtig, daß der durch einen Kolben oder eine Membran realisierte Abschluss der unteren Kammer auf seiner Innenfläche mit einem Propeller (5g) oder einer ähnlichen Vorrichtung versehen ist, welche von einem ausserhalb der Kammer angebrachten Elektromagneten (5h) in Bewegung gebracht wird. Der Propeller sorgt vor jeder Aufwärtsbewegung des Kolbens für die Aufwirbelung der Gewebestücke. Damit wird sichergestellt, daß alle Gewebestücke die Dissoziationselemente passieren und nicht auf der Kolbenfläche liegen bleiben.

Die Dissoziationselemente, welche veränderbare Scherkräfte auf das Gewebe ausüben sollen, können in verschiedenen Ausführungen konstruiert werden. In Ausführung 1 (Abb. 5) bestehen die Dissoziationselemente aus einer Reihe von drehbar gelagerten Messern oder Drähten (6a). Im ersten Durchgang stehen die Messer alle in einer Reihe und zerschneiden das Gewebe grob (Stellung 1; Abb. 5). Für die nächsten Durchgänge werden die Messerzwischenräume, welche die Gewebeteile passieren müssen, immer kleiner (Stellung 2-3; Abb. 5), so daß die auf das Gewebe einwirkende Scherkraft sukzessive erhöht wird. Die Arretierung der Messer in den verschiedenen Positionen erfolgt magnetisch über aussen entsprechend positionierte Elektromagneten (6b). In Ausführung 2 (Abb. 6) bestehen die Dissoziationselemente aus Gittern oder Lochblenden (6c) und in Ausführung 3 (Abb. 6) aus einer einfachen Verengung der Dissoziationskammer (6d). Diese Dissoziationselemente werden in verschiedenen Varianten realisiert (Abb. 6), welche sich im Gitterabstand, Loch- oder Verengungsdurchmesser unterscheiden. Um die für die Gewebedissoziation erforderliche sukzessive Erhöhung der Scherkraft zu erreichen, werden nacheinander Element-Varianten mit immer kleineren Verengungen in die Dissoziationskammer eingebracht. Dazu wird ein geeigneter Satz an Element-Varianten in einem Magazin untergebracht, welches in Ausführung 1 Kassetten-förmig (6e, Abb. 7) oder in Ausführung 2 zylinderförmig realisiert wird (6f; Abb. 8). Die linear oder kreisförmige Bewegung der Magazine führt zum Austausch der Elementvarianten in der Dissoziationskammer. Alternativ können die verschiedenen Elementvarianten in verschiedenen Dissoziationskammern untergebracht sein, welche das Gewebe dann nacheinander passieren muss. Die Verengungs-Durchmesser der bei jeder Präparation verwendeten Elementvarianten müssen der Art des Gewebes angepasst werden. Dabei gilt, daß der Verengungsdurchmesser der Elemente desto kleiner sein muss, je zäher das Gewebe ist.

Für die Gewinnung von lebensfähigen Zellen ist es essentiell, daß die Dissoziation regelmässig unterbrochen wird und jene Zellen, welche bereits aus dem Gewebe losgelöst wurden, aus der Dissoziationskammer abgeführt werden, damit sie durch weitere Dissoziationsschritte nicht beschädigt werden. Dazu enthalten die Dissoziationskammern
5 mindestens einen verschliessbaren Ablauf (5d, 5i; Abb. 4), welcher mit einem Sieb versehen ist. Dieses Sieb lässt nur einzelne Zellen durch (Porendurchmesser abhängig von Zellgrösse, ca. 10 bis 50 Mikrometer). Der Ablauf ist so angebracht, daß nur aus dem Gewebeverband ausgelöste Zellen, welche in der Lösung schweben, abfliessen. Zur Abführung losgelöster Zellen wird der Ablauf (5d, 5i) mit einer gewissen Verzögerung
10 nach Unterbrechung der Dissoziation geöffnet. In dieser Zeit können undissoziierte Gewebestücke auf den Boden der Dissoziationskammer sedimentieren. Dazu muss die Dissoziationskammer längs des Gravitationsfeldes ausgerichtet sein. Die losgelösten Zellen gelangen dann über eine Übergangskammer (7; Abb. 1) in die mittlere Mischungskammer (8; Abb. 9), welche aus einer ringförmigen, geschlossenen Röhre
15 besteht. Das aus der Dissoziationskammer ausgetretene Lösungsvolumen wird durch frische Lösung ersetzt.

Nachdem die gewünschte Zahl an Zellen durch eine entsprechende Anzahl an Dissoziations-Durchgängen erreicht worden ist, wird die in der mittleren Mischungskammer (8) befindliche Zellsuspension über den Zulauf (8a; Abb. 1) mit
20 magnetischen Partikeln versetzt. Diese Partikel tragen auf ihrer Oberfläche Moleküle, welche spezifische Erkennungsmoleküle auf Zellbruchstücken und toten Zellen binden. Die Mischungskammer wird vollständig mit Lösung aufgefüllt und die Zellsuspension während der Inkubationsphase durch Propeller (8b) oder durch aussen angebrachte Schlauchpumpen in Bewegung gehalten. Die Suspension wird dann durch einen an Zulauf
25 (8a) angelegten Überdruck über die Sammelkammer (9) in die röhrenförmige Subtraktionskammer (10) gebracht. Diese Kammer weist auf einer Seite eine magnetisierbare Oberfläche auf, welche zur effizienten Abreicherung von unerwünschtem Zellmaterial vergrössert ist. Zur Immobilisierung des mit magnetischen Partikeln beladenen Zellmaterials in der Kammer wird ein entsprechend grosses Magnetfeld durch
30 aussen angebrachte Elektromagneten (10b) erzeugt. Alternativ kann das Magnetfeld auch durch Dauermagneten erzeugt werden, deren Abstand zur Subtraktionskammer verändert werden kann. Der Durchmesser der Subtraktionskammer ist in der senkrecht zur aufgefalteten Seite stehenden Richtung verringert, so daß die Zellen möglichst nahe an die magnetisierte Seite herangeführt und so Partikel-behaftete Zellen effizient abgefangen
35 werden. Nach einer gewissen Inkubationszeit werden intakte, nichthaftende Zellen durch Anlegen eines Überdruckes im Zulauf (10c) über die Verteilungskammer (11) in eine der

seitlichen Mischungskammern (12a, 12b; Abb. 9) gepresst. Das in der Subtraktionskammer immobilisierte Zellmaterial wird dann nach Abschalten des Magnetfeldes durch einen Flüssigkeitsstrom aus dem Zulauf (10c) über den Ablauf (10d) ausgewaschen. Die Subtraktionskammer steht damit für nachfolgende
5 Abreicherungs-schritte wieder zur Verfügung.

In den seitlichen Mischungskammern (12a, 12b) werden die Zellen wieder mit magnetischen Partikeln versetzt. Diese können entweder ungewünschte Zellen binden, welche dann über die Subtraktionskammer der Suspension entzogen werden, oder gewünschte Zellen erkennen, welche in der Selektionskammer (13; Abb. 11, 12)
10 zurückgehalten werden. Für die Selektion wird die Zellsuspension über die Sammelkammer (9) und den Zulauf (13a) in die Selektionskammer (13) gebracht. Diese Kammer ist ähnlich gebaut wie die Mischungskammern. In ihr wird die mit magnetischen Partikeln versetzte Zellsuspension durch Propeller (13b) in zirkulierende Bewegung versetzt. Sie enthält an mindestens einer Stelle eine magnetisierbare Immobilisierungszone
15 (14; Abb. 11, 12), welche die zirkulierenden Zellen wiederholt passieren. Hier können die gewünschten, Partikel-tragenden Zellen nach und nach festgehalten und der Suspension entzogen werden. Die Immobilisierungszone ist zur Abführung der selektierten Zellen vom Rest der Kammer durch steuerbare Klappen (14a) abtrennbar und enthält einen Zu- (14b) und Ablauf (14c). Zur effizienten Entfernung der gewünschten Zellen enthält die Zone
20 eine stark vergrößerte Oberfläche, welche durch einen aussen angebrachten Elektromagneten (14d) magnetisiert werden kann. Diese Oberfläche kann in zwei Ausführungen realisiert werden. In Ausführung 1 (Abb. 11) besteht sie aus einem stark verzweigten, magnetisierbaren Fangarm (14e), der in die Selektionskammer eingelagert ist. In Ausführung 2 (Abb. 12) besteht sie aus einer starken Auffaltung des entsprechenden
25 Abschnitts der Selektionskammerwand (14f) und einem aussen angebrachten Elektromagneten (14g). Ähnlich wie bei der Subtraktionskammer ist der Durchmesser der Immobilisierungszone in dieser Ausführung in der senkrecht zur aufgefalteten Seite stehenden Richtung stark verkleinert, so daß Zellen möglichst nahe an die magnetisierte Seite herangeführt werden.

Sobald eine ausreichende Anzahl an Zellen immobilisiert worden ist, wird der Flüssigkeitsstrom gestoppt und die Immobilisierungszone vom Rest der Selektionskammer abgetrennt. Hier ist wichtig, daß das Volumen der Zone die Endkonzentration der Zellen bestimmt und daher entsprechend klein gehalten werden muss. Zur Gewinnung der Zellen wird das Magnetfeld abgeschaltet und die Zellen werden durch einen Flüssigkeitsstrom aus
35 dem Zulauf (14b) über den Ablauf (14c) in einen Ausgang (15) gespült, welcher standardisierte Gefässe, wie beispielsweise Zentrifugenröhrchen, aufnehmen kann.

Alternativ zu den magnetischen Partikeln kann die Immobilisierung von Zellen und Zellbruchstücken in der Subtraktions- und Selektionskammer über spezielle Oberflächen in den Kammern erfolgen, welche eine reversible Bindung von Erkennungsmolekülen erlauben.

5

Bezugszeichenliste

	1	Aufnahmekammer
	1a	Verschluss
10	1b	Zulauf
	1c	Ablauf
	2	Trommel
	2a	Dauermagneten
	2b	Einkerbungen
15	2c	wasserdurchlässige Poren
	2d	Erhebungen
	3	Inkubationskammer
	3a	Zulauf
	3b	Ablauf
20	3c	Elektromagneten
	4	Übergangskammer
	4a	Zulauf
	5	Dissoziationskammer
	5a	Zulauf
25	5b	Propeller
	5c	Elektromagnete
	5d	Ablauf
	5e	Kolben oder Membran
	5f	Zulauf
30	5g	Propeller
	5h	Elektromagnet
	5i	Ablauf
	6	Dissoziationselemente
	6a	drehbar gelagerte Messer oder Drähte
35	6b	Elektromagnete
	6c	Gitter oder Lochblenden

- 6d Verengung der Dissoziationskammer
- 6e Kassettenförmiges Magazin
- 6f Zylinderförmiges Magazin
- 7 Übergangskammer
- 5 8 Mittlere Mischungskammer
 - 8a Zulauf
 - 8b Propeller
- 9 Sammelkammer
- 10 Subtraktionskammer
 - 10a Auffaltungen
 - 10b Elektromagnete
 - 10c Zulauf
 - 10d Ablauf
- 11 Verteilungskammer
- 15 12a, b Seitliche Mischungskammern
 - 13 Selektionskammer
 - 13a Zulauf
 - 13b Propeller
 - 14 Immobilisierungszone
- 20 14a Steuerbare Klappen
 - 14b Zulauf
 - 14c Ablauf
 - 14d Elektromagneten
 - 14e Magnetisierbarer Fangarm
- 25 14f Selektionskammerwand
 - 14g Elektromagneten
- 15 Ausgang

Patentansprüche

1. System zur automatischen Isolierung von lebenden Zellen aus tierischen Geweben, welches aus einem Verbund aus Hohlräumen besteht, welcher zur Gewebe-Dissoziierung dient.
5
2. System nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich zum Dissoziierungsabschnitt weitere Verbünde aus Hohlräumen angeschlossen sind, welche zur Mischung, zur Zell-Subtraktion und zur Zell-Selektion dienen.
3. System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß jene Teile, welche mit biologischem Material oder Präparationslösungen in Berührung kommen, aus chemisch inertem und nicht-toxischem Material bestehen.
10
4. System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sämtliche Öffnungen nach aussen sowie alle Übergänge zwischen Kammern durch magnetisch, pneumatisch, hydraulisch oder elektrisch betriebene Klappen oder Schleusen wasserdicht verschlossen werden können.
15
5. System nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Abschnitt zur Gewebedissoziierung aus den nacheinander angeordneten Elementen einer Aufnahmekammer (1), einer Inkubationskammer (3), einer Übergangskammer (4) und einer Dissoziationskammer (5) besteht, wobei die Aufnahmekammer oder die Übergangskammer jeweils mit den nachfolgenden Kammern zusammengefasst werden können.
20
6. System nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufnahmekammer mindestens einen Zugang (1a) zur Aufnahme von Gewebematerial, einen Zulauf (1b) zur Ausspülung des Gewebes und einen Ablauf (1c) enthält, welcher die Verbindung zur nachfolgenden Inkubationskammer herstellt.
25
7. System nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Inkubationskammer in Ausführung 1 als Hohlraum realisiert wird, in dem sich eine drehbar gelagerte Trommel (2) befindet.
8. System nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubationskammer in Ausführung 2 durch einen Hohlzylinder realisiert wird, der selbst dreh- oder kippbar gelagert ist und durch aussen angebrachte Vorrichtungen bewegt werden kann.
30
9. System nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubationskammer in Ausführung 3 mindestens teilweise durch einen Schlauch realisiert wird, welcher durch eine aussen angebrachte Vorrichtung, wie beispielsweise eine Schlauchpumpe, bewegt werden kann.
35

10. System nach Anspruch 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Trommel (2) in Ausführung 1 der Inkubationskammer Magneten trägt, und daß an den entsprechenden Stellen an der Aussenseite der Inkubationskammer Elektromagneten angebracht sind, welche die Bewegung der Trommel antreiben.
- 5 11. System nach Anspruch 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Innere der Trommel (2) in Ausführung 1 der Inkubationskammer direkt mit dem Inneren der vor- und nachgeschalteten Kammern, aber nicht mit dem Raum zwischen Inkubationskammer und Trommel verbunden ist.
12. System nach Anspruch 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Trommel (2) in
10 Ausführung 1 der Inkubationskammer nach innen und aussen gerichtete Einkerbungen (2b) beziehungsweise Erhebungen (2d) trägt, welche eine Durchmischung einer Flüssigkeit ermöglichen.
13. System nach Anspruch 1 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Trommel (2) in Ausführung 1 der Inkubationskammer Poren enthält (2c), welche Gewebematerial von
15 Flüssigkeiten abtrennen.
14. System nach Anspruch 1, 5, 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausführungen 2 und 3 der Inkubationskammer jeweils mindestens einen Ablauf enthalten, welcher mit einem Sieb versehen ist, welches Gewebematerial von Flüssigkeiten abtrennt.
15. System nach Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Dissoziationskammer
20 nach Ausführung 1 durch eine ringförmige, geschlossene Röhre oder nach Ausführung 2 durch einen Hohlzylinder realisiert wird.
16. System nach Anspruch 1 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausführung 1 der Dissoziationskammer zur Bewegung einer darin befindlichen Flüssigkeit im Inneren
25 mindestens einen durch aussen angebrachte Elektromagneten angetriebenen Propeller (5b) enthält oder zumindest teilweise aus Schlauchmaterial besteht, welches durch eine an der Aussenseite angebrachte Vorrichtung, beispielweise eine Schlauchpumpe, bewegt werden kann.
17. System nach Anspruch 1 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausführung 2 der Dissoziationskammer an beiden Seiten durch bewegbare Kolben oder Membranen (5e)
30 wasserdicht abgeschlossen wird, welche eine darin befindliche Flüssigkeit bewegen.
18. System nach Anspruch 1 und 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausführung 2 der Dissoziationskammer auf einer Seite des durch einen Kolben oder eine Membran realisierten Abschlusses einen durch aussen angebrachte Elektromagneten angetriebenen Propeller (5g) trägt, welcher für die Aufwirbelung der Gewebeteile sorgt.
- 35 19. System nach Anspruch 1 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Dissoziationskammer an mindestens einer Stelle Dissoziationselemente enthält, welche bei

jeder Passage Scherkräfte auf Gewebestücke ausüben und so die mechanische Auslösung von einzelnen Zellen aus dem Gewebeverband ermöglichen.

20. System nach Anspruch 1 und 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Dissoziationselemente in Ausführung 1 durch eine Reihe von drehbar gelagerten, dicht aufeinander folgenden Messern oder Drähten realisiert werden (6a), welche durch aussen angebrachte Magneten gegeneinander verstellt werden können, so daß die Zwischenräume zwischen den Messern oder Drähten und damit die auf das Gewebe einwirkenden Scherkräfte verändert werden können.

21. System nach Anspruch 1 und 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Dissoziationselemente in Ausführung 2 durch Gitter oder Lochblenden (6c) oder in Ausführung 3 durch einfache Verengungen des Hohlraumdurchmessers (6d) realisiert werden.

22. System nach Anspruch 1 und 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Ausführungen 2 und 3 der Dissoziationselemente in Element-Varianten mit unterschiedlichen Gitterabständen, Loch- oder Verengungsdurchmesser realisiert werden, so daß die auf das Gewebe einwirkenden Scherkräfte verändert werden können.

23. System nach Anspruch 1 und 22, dadurch gekennzeichnet, daß in Ausführung a) die Element-Varianten der Dissoziationselemente der Ausführung 2 und 3 in einem Kassetten- (6e) oder Zylinder-förmigen Magazin (6f) untergebracht sind, welches den Austausch der Elementvarianten in der Dissoziationskammer ermöglicht.

24. System nach Anspruch 1 und 22, dadurch gekennzeichnet, dass in Ausführung b) die Element-Varianten der Dissoziationselemente der Ausführung 2 und 3 in jeweils verschiedenen Dissoziationskammern eingebaut werden, welche das Gewebe nacheinander passieren muss.

25. System nach Anspruch 1 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Dissoziationskammer mindestens einen Ablauf (5d, 5i) enthält, welcher mit einem Sieb versehen ist, welches einzelne Zellen von Gewebestücken abtrennt.

26. System nach Anspruch 1 und 25, dadurch gekennzeichnet, daß der Ablauf (5d, 5i) der Dissoziationskammer an einer Stelle der Kammer angebracht sind, welche die Abführung von aus dem Gewebeverband ausgelösten, nicht sedimentierten Zellen erlaubt.

27. System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Mischungsabschnitt aus mindestens einer Mischungskammer (8) besteht, welche in eine Sammelkammer (9) mündet.

28. System nach Anspruch 1, 2 und 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischungskammer (8) über die Übergangskammer (7) mit der Dissoziationskammer verbunden ist.

29. System nach Anspruch 1, 2 und 27, dadurch gekennzeichnet, daß Mischungskammern zusätzlich zu den Verbindungen zu den vor- und nachgeschalteten Kammern jeweils mindestens einen separaten Zulauf besitzen.
30. System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Subtraktionsabschnitt
5 aus einer Subtraktionskammer (10) besteht, welche über die Sammelkammer (9) mit den Mischungskammern verbunden ist.
31. System nach Anspruch 1, 2 und 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Subtraktionskammer innen mindestens eine Immobilisierungszone enthält.
32. System nach Anspruch 1, 2 und 30, dadurch gekennzeichnet, daß ein Ausgang der
10 Subtraktionskammer in eine Verteilungskammer (11) mündet, welche Verbindungen zu den Mischungskammern enthält.
33. System nach Anspruch 1, 2, 5, 27 und 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Inkubationskammer (3), die Übergangskammern (4 und 7), die Sammelkammer (9) und die Subtraktionskammer (10) zusätzlich zu den Verbindungen zu den vor- und
15 nachgeschalteten Kammern jeweils mindestens einen Zulauf und einen Ablauf haben.
34. System nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Selektionsabschnitt aus einer Selektionskammer (13) besteht, welche über die Sammelkammer (9) mit den Mischungskammern verbunden ist.
35. System nach Anspruch 1, 2 und 34, dadurch gekennzeichnet, daß die
20 Selektionskammer innen mindestens eine Immobilisierungszone (14) enthält, welche durch Klappen (14a) oder andere Vorrichtungen vom Rest der Selektionskammer abtrennbar ist und welche mindestens einen separaten Zulauf (14b) und einen Ablauf (14c) aufweist.
36. System nach Anspruch 1, 2 und 35, dadurch gekennzeichnet, daß der Ablauf der Immobilisierungszone (14c) in einen Ausgang (15) mündet, welcher standardisierte
25 Gefässe aufnehmen kann.
37. System nach Anspruch 1, 2, 31 und 35 dadurch gekennzeichnet, daß die Immobilisierungszone eine stark vergrößerte Oberfläche aufweist (10a, 14f), welche entweder durch Auffaltung der inneren Kammerwand oder durch Einbringung eines Materials mit entsprechender Oberflächenstruktur realisiert werden kann.
- 30 38. System nach Anspruch 1, 2 und 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Immobilisierungszone in Ausführung 1 aussen Magneten (10b) trägt, welche im Inneren befindliche magnetische Partikel, welche an Zellen gebunden sind, immobilisieren, oder in Ausführung 2 auf der Kammerwand oder über das eingebrachte Material eine spezielle Oberfläche aufweist, welche die reversible Bindung von Molekülen wie Antikörpern oder
35 Lektinen erlaubt, welche wiederum spezifisch an Moleküle auf Zellen oder Zellbruchstücken binden.

39. System nach Anspruch 1, 2 und 38, dadurch gekennzeichnet, dass die in Ausführung 1 der Immobilisierungszone aussen angebrachten Magneten entweder als Dauermagneten realisiert werden, deren Abstand zur Kammer verändert werden kann, oder als Elektromagneten, deren Magnetfeld an- und abgeschaltet werden kann.
- 5 40. System nach Anspruch 1, 2 und 37 dadurch gekennzeichnet, daß in der Immobilisierungszone der Kammerdurchmesser in der senkrecht zur oberflächenvergrößerten Seite stehenden Richtung stark verkleinert ist, so daß der räumliche Abstand von in der Suspension befindlichen Zellen zu dieser Seite minimiert wird.
- 10 41. System nach Anspruch 1, 2, 27, 30 und 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Mischungs-, Subtraktions- und Selektionskammern als ringförmige, geschlossene Röhren realisiert werden, welche zur Bewegung darin befindlicher Flüssigkeiten in ihrem Inneren jeweils mindestens einen durch aussen angebrachte Elektromagneten angetriebenen Propeller enthalten oder zumindest teilweise aus flexiblem Schlauchmaterial bestehen,
- 15 welches durch eine an der Aussenseite angebrachte Vorrichtung, beispielweise eine Schlauchpumpe, bewegt werden kann.
42. System nach Anspruch 1, 2, 5, 27, 30 und 34, dadurch gekennzeichnet, dass jene Teile, welche mit biologischem Material in Kontakt kommen, in einer Ausführungsvariante zu einem Bauteil zusammengefasst werden, welches nach einer gewissen Nutzungsdauer
- 20 ausgetauscht werden kann.
43. System nach Anspruch 1, 2 und 42, dadurch gekennzeichnet, dass das austauschbare Bauteil der Ausführungsvariante in verschiedenen Varianten realisiert werden kann, welche sich in Eigenschaften wie Innenraum-Volumen oder Beschichtungsmaterial unterscheiden und somit die Verarbeitung unterschiedlicher Gewebemengen und -typen
- 25 erlauben.
44. System nach Anspruch 1, 2, 5, 37 und 38, dass die Inkubationskammer und die Dissoziationskammer in einer Ausführungsvariante jeweils ebenfalls mindestens eine Immobilisierungszone enthalten, welche direkt oder indirekt die Immobilisierung von Molekülen wie beispielsweise Enzymen ermöglichen, welche für die Verarbeitung des
- 30 Gewebes verwendet werden.

Abb. 1 Seitenansicht

Maßstab 3:1

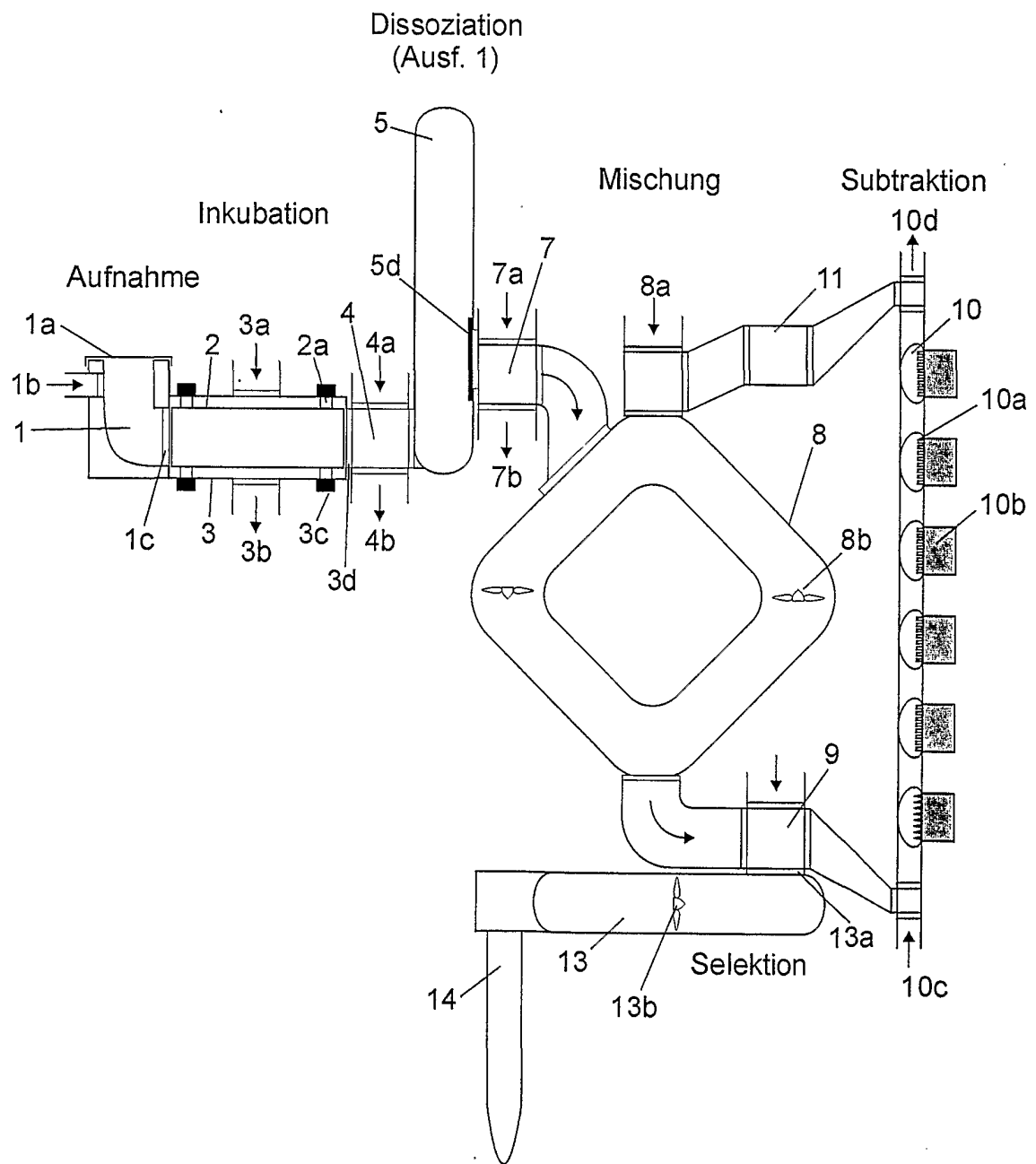


Abb. 2 Aufsicht (ohne Selektionskammer)

Maßstab 3:1

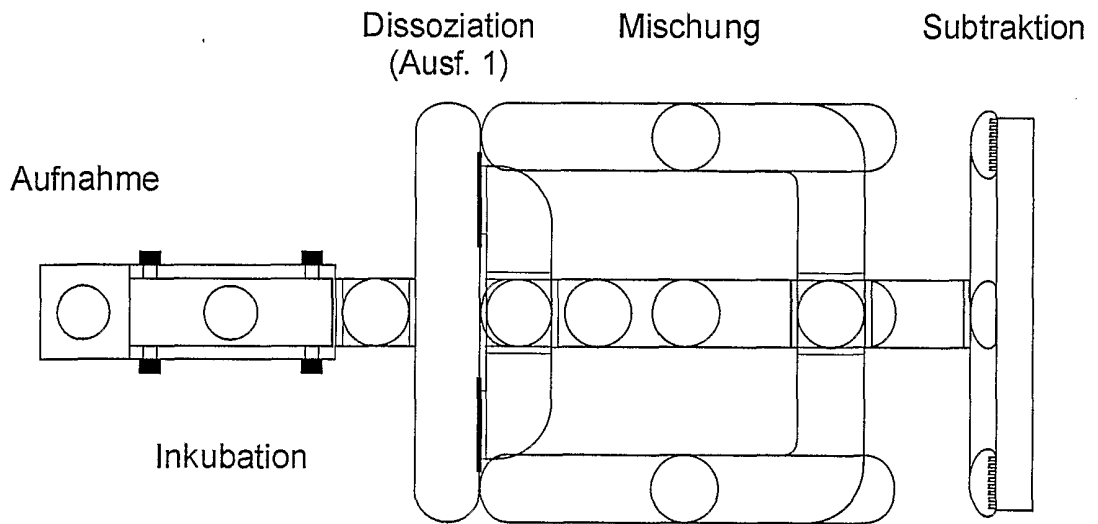


Abb. 3 Inkubationskammer (3)

Maßstab 1:1

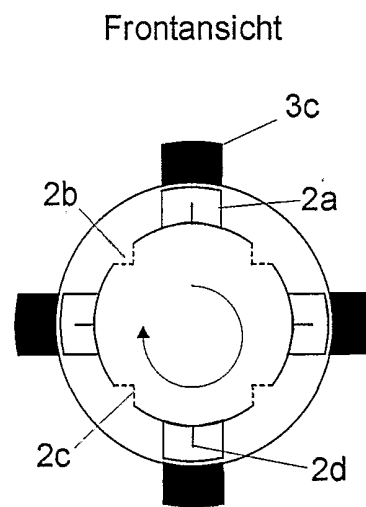
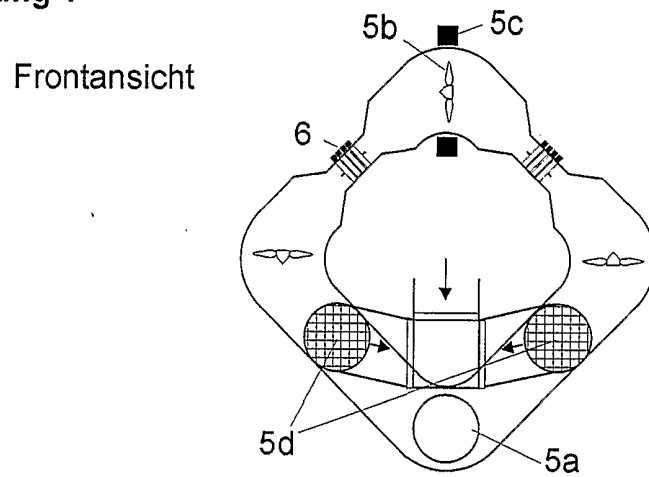


Abb. 4 Dissoziationskammer (5)

Maßstab 3:1

Ausführung 1



Ausführung 2

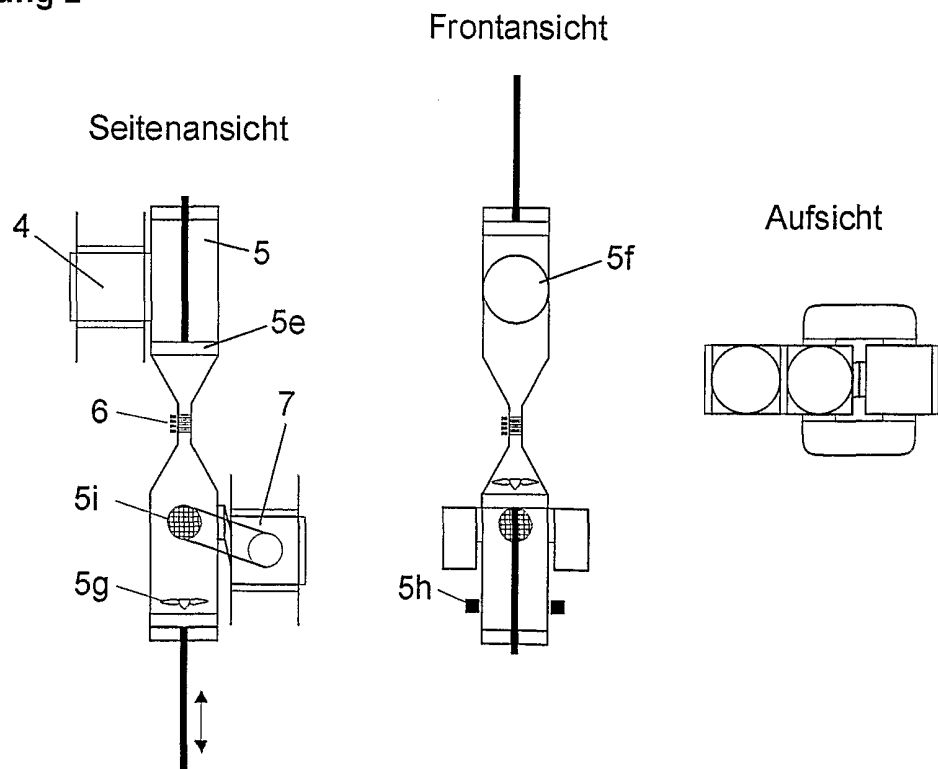
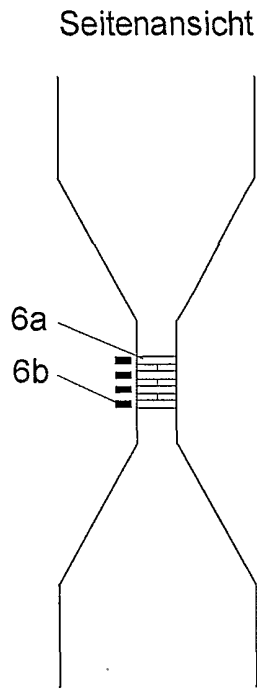


Abb. 5 Dissoziationselemente (6), Ausführung 1

Maßstab 1:1



Anordnung der Messer/Drähte

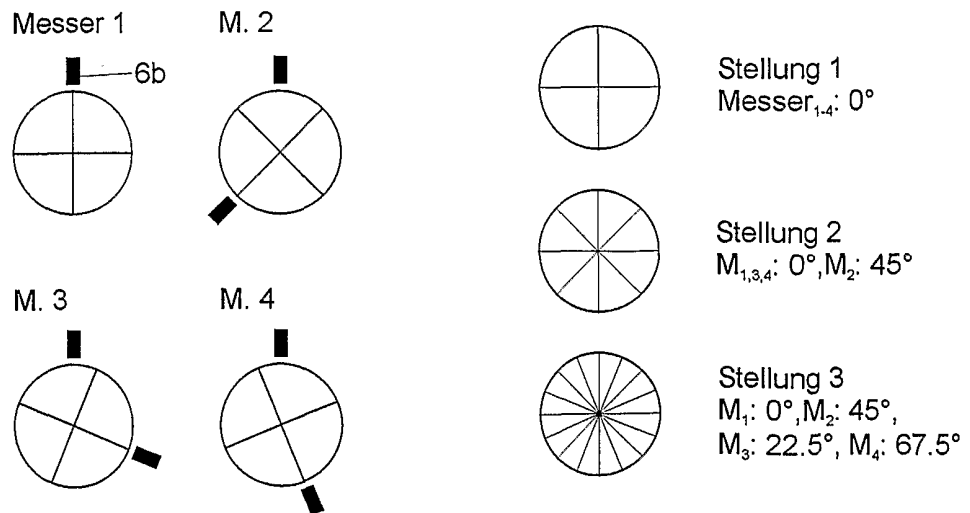
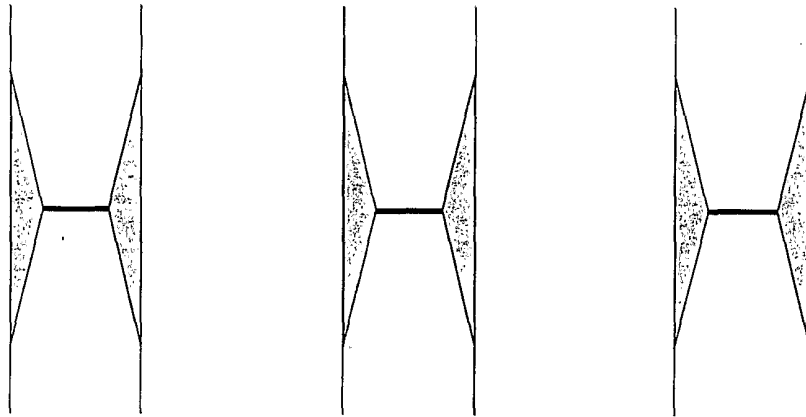


Abb. 6 Dissoziationselemente (6), Ausführung 2, 3

Maßstab 1,5:1

Ausführung 2, Seitenansicht



Gitter, Aufsicht

Variante 1



6c

Variante 2

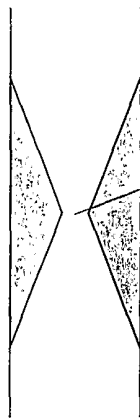


Variante 3

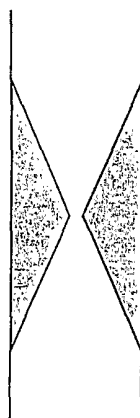


Ausführung 3, Seitenansicht

Variante 1



Variante 2



Variante 3



6d

Abb. 7 Dissoziationselemente (6, Ausf. 2, 3) Austauschmechanismus Ausführung 1

Maßstab 3:1

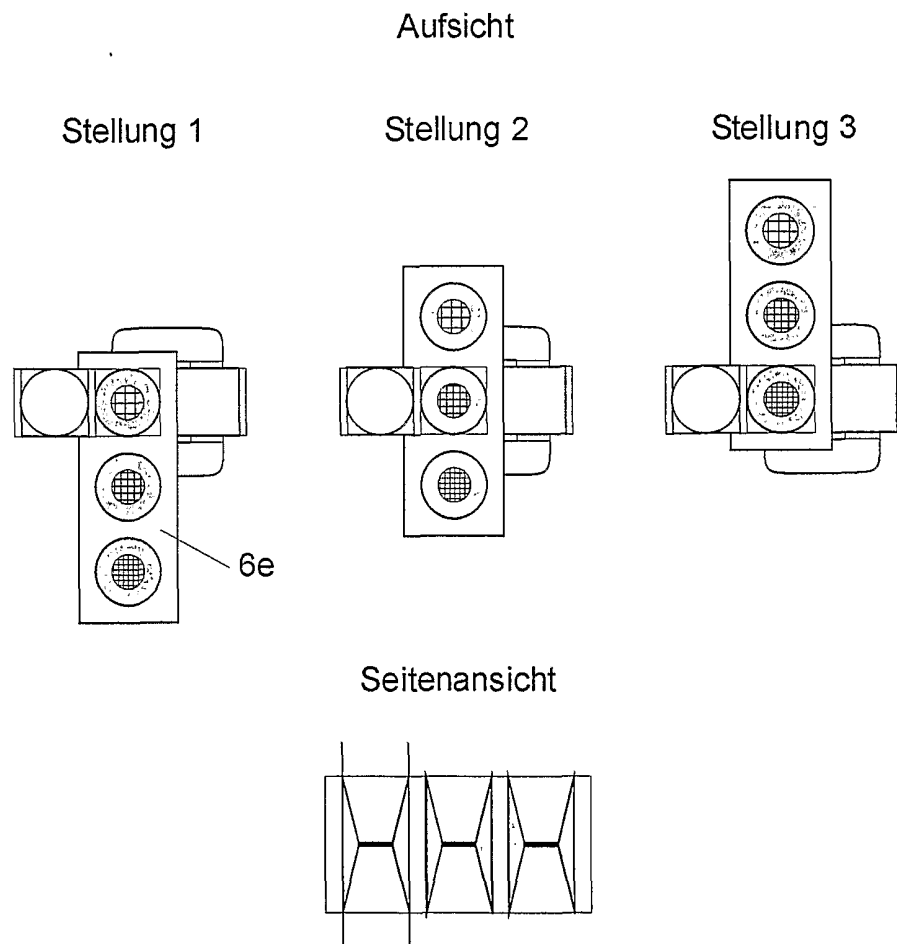


Abb. 8 Dissoziationselemente (6, Ausf. 2, 3) Austauschmechanismus Ausführung 2

Maßstab 3:1

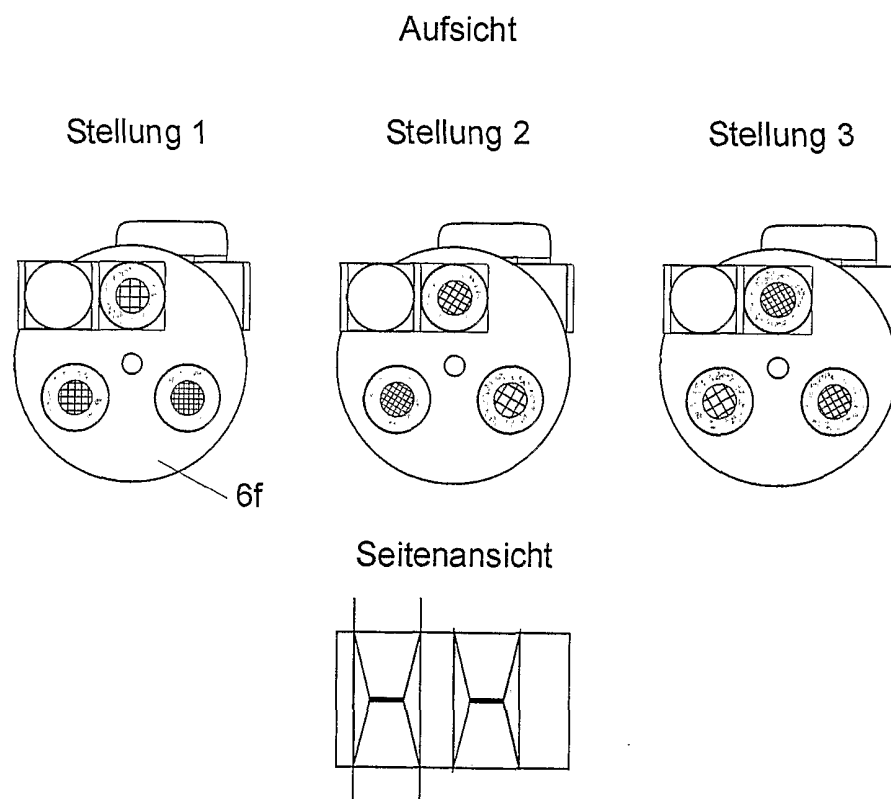


Abb. 9 Mischungskammern

Maßstab 3:1

Frontansicht

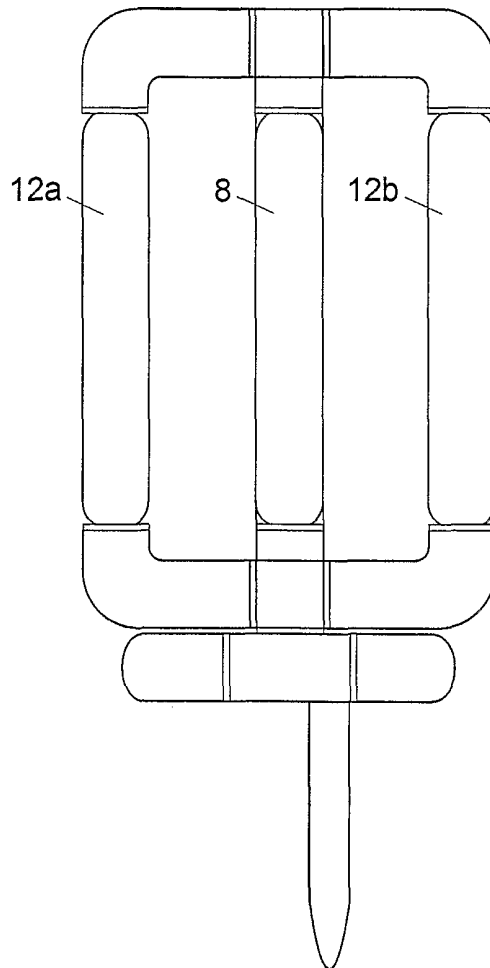


Abb. 10 Subtraktions-Kammer (10)

Maßstab 3:1

Frontansicht

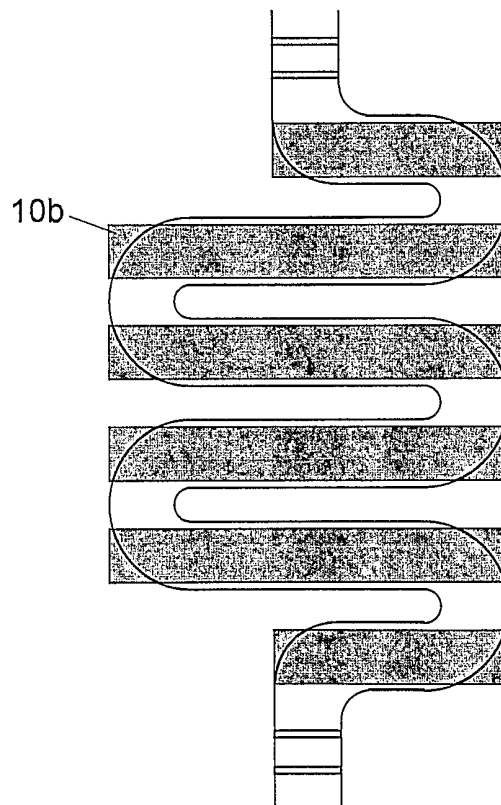
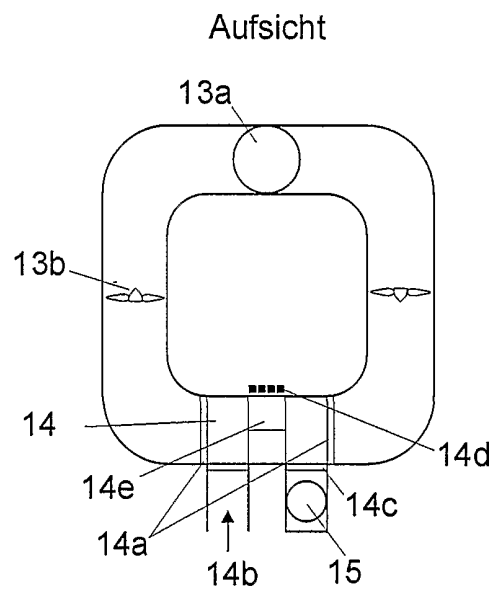


Abb. 11 Selektionskammer (13), Ausführung 1

Maßstab 3:1



Frontansicht des Fangarmes (14e)

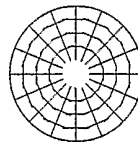
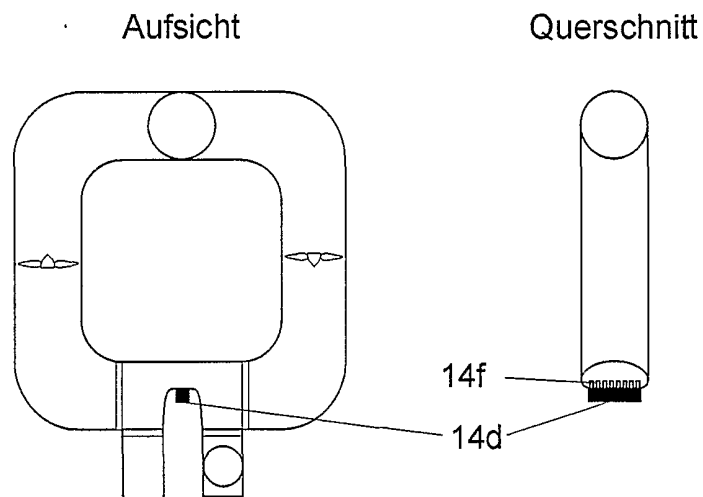


Abb. 12 Selektionskammer (13), Ausführung 2

Maßstab 3:1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 02/00590

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 035 708 A (WILLIAMS STUART K ET AL) 30 July 1991 (1991-07-30) abstract figures 2,4 column 8	1,2
X	WO 94 03645 A (UNIV JEFFERSON ;BECTON DICKINSON CO (US)) 17 February 1994 (1994-02-17) abstract page 13, paragraph 2	1,2
X	EP 0 446 450 A (UNIV JEFFERSON ;BECTON DICKINSON CO (US)) 18 September 1991 (1991-09-18) abstract	1
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

* & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 16 July 2002	Date of mailing of the international search report 23/07/2002
---	--

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Weijland, A
--	---------------------------------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 02/00590

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 786 207 A (KATZ ADAM J ET AL) 28 July 1998 (1998-07-28) the whole document ---	1-44
A	US 5 409 833 A (HU CAN B ET AL) 25 April 1995 (1995-04-25) the whole document -----	1-44

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/DE 02/00590

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date			
US 5035708	A	30-07-1991	US 4820626 A 11-04-1989			
			AT 87811 T 15-04-1993			
			AU 637100 B2 20-05-1993			
			AU 5578290 A 29-11-1990			
			BR 9002433 A 06-08-1991			
			CA 2017346 A1 24-11-1990			
			DE 69001275 D1 13-05-1993			
			DE 69001275 T2 21-10-1993			
			DK 399340 T3 24-05-1993			
			EP 0399340 A1 28-11-1990			
			ES 2039990 T3 01-10-1993			
			IL 94431 A 28-11-1994			
			JP 3136640 A 11-06-1991			
			MX 163811 B 22-06-1992			
			US 5441539 A 15-08-1995			
			US 5372945 A 13-12-1994			
			US 5312380 A 17-05-1994			
			ZA 9003826 A 27-03-1991			
			US 5230693 A 27-07-1993			
			US 5628781 A 13-05-1997			
			AT 113850 T 15-11-1994			
			AU 590573 B2 09-11-1989			
			AU 5830586 A 11-12-1986			
			BR 8602659 A 03-02-1987			
			CA 1293700 A1 31-12-1991			
			DE 3650134 D1 15-12-1994			
			DE 3650134 T2 22-06-1995			
			DE 206025 T1 15-10-1987			
			EP 0206025 A2 30-12-1986			
			EP 0518389 A2 16-12-1992			
			ES 555739 D0 01-03-1989			
			ES 8900149 A1 01-05-1989			
			IL 78950 A 15-12-1991			
			JP 2686930 B2 08-12-1997			
			JP 62049857 A 04-03-1987			
			MX 165125 B 28-10-1992			
			US 5194373 A 16-03-1993			
			ZA 8603958 A 28-01-1987			
			WO 9403645	A	17-02-1994	US 5372945 A 13-12-1994
						AU 4796293 A 03-03-1994
CA 2141573 A1 17-02-1994						
EP 0652976 A1 17-05-1995						
JP 7509369 T 19-10-1995						
WO 9403645 A1 17-02-1994						
EP 0446450	A	18-09-1991	AT 120355 T 15-04-1995			
			AU 648768 B2 05-05-1994			
			AU 6868091 A 15-08-1991			
			BR 9100022 A 22-10-1991			
			CA 2033927 A1 10-08-1991			
			DE 69018246 D1 04-05-1995			
			DE 69018246 T2 02-11-1995			
			EP 0446450 A1 18-09-1991			
			ES 2071733 T3 01-07-1995			
			IL 96675 A 31-08-1995			
			JP 4218146 A 07-08-1992			
			US 5372945 A 13-12-1994			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/DE 02/00590

Patent document cited in search report	A	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
EP 0446450	A			ZA 9100020 A	30-09-1992
US 5786207	A	28-07-1998		AU 7700598 A WO 9854295 A1	30-12-1998 03-12-1998
US 5409833	A	25-04-1995		DE 69423760 D1 DE 69423760 T2 EP 0706561 A1 EP 0984060 A2 JP 8511955 T WO 9501419 A1	04-05-2000 23-11-2000 17-04-1996 08-03-2000 17-12-1996 12-01-1995

INTERNATIONALFR RECHERCHENBERICHT

In ionales Aktenzeichen

PCT/DE 02/00590

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 786 207 A (KATZ ADAM J ET AL) 28. Juli 1998 (1998-07-28) das ganze Dokument ----	1-44
A	US 5 409 833 A (HU CAN B ET AL) 25. April 1995 (1995-04-25) das ganze Dokument -----	1-44

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 02/00590

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung			
US 5035708	A	30-07-1991	US 4820626 A 11-04-1989			
			AT 87811 T 15-04-1993			
			AU 637100 B2 20-05-1993			
			AU 5578290 A 29-11-1990			
			BR 9002433 A 06-08-1991			
			CA 2017346 A1 24-11-1990			
			DE 69001275 D1 13-05-1993			
			DE 69001275 T2 21-10-1993			
			DK 399340 T3 24-05-1993			
			EP 0399340 A1 28-11-1990			
			ES 2039990 T3 01-10-1993			
			IL 94431 A 28-11-1994			
			JP 3136640 A 11-06-1991			
			MX 163811 B 22-06-1992			
			US 5441539 A 15-08-1995			
			US 5372945 A 13-12-1994			
			US 5312380 A 17-05-1994			
			ZA 9003826 A 27-03-1991			
			US 5230693 A 27-07-1993			
			US 5628781 A 13-05-1997			
			AT 113850 T 15-11-1994			
			AU 590573 B2 09-11-1989			
			AU 5830586 A 11-12-1986			
			BR 8602659 A 03-02-1987			
			CA 1293700 A1 31-12-1991			
			DE 3650134 D1 15-12-1994			
			DE 3650134 T2 22-06-1995			
			DE 206025 T1 15-10-1987			
			EP 0206025 A2 30-12-1986			
			EP 0518389 A2 16-12-1992			
			ES 555739 D0 01-03-1989			
			ES 8900149 A1 01-05-1989			
			IL 78950 A 15-12-1991			
			JP 2686930 B2 08-12-1997			
			JP 62049857 A 04-03-1987			
			MX 165125 B 28-10-1992			
			US 5194373 A 16-03-1993			
			ZA 8603958 A 28-01-1987			
			WO 9403645	A	17-02-1994	US 5372945 A 13-12-1994
						AU 4796293 A 03-03-1994
CA 2141573 A1 17-02-1994						
EP 0652976 A1 17-05-1995						
JP 7509369 T 19-10-1995						
WO 9403645 A1 17-02-1994						
EP 0446450	A	18-09-1991	AT 120355 T 15-04-1995			
			AU 648768 B2 05-05-1994			
			AU 6868091 A 15-08-1991			
			BR 9100022 A 22-10-1991			
			CA 2033927 A1 10-08-1991			
			DE 69018246 D1 04-05-1995			
			DE 69018246 T2 02-11-1995			
			EP 0446450 A1 18-09-1991			
			ES 2071733 T3 01-07-1995			
			IL 96675 A 31-08-1995			
			JP 4218146 A 07-08-1992			
			US 5372945 A 13-12-1994			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung

die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 02/00590

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0446450 A		ZA 9100020 A	30-09-1992
US 5786207 A	28-07-1998	AU 7700598 A WO 9854295 A1	30-12-1998 03-12-1998
US 5409833 A	25-04-1995	DE 69423760 D1 DE 69423760 T2 EP 0706561 A1 EP 0984060 A2 JP 8511955 T WO 9501419 A1	04-05-2000 23-11-2000 17-04-1996 08-03-2000 17-12-1996 12-01-1995