

(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
17. Oktober 2002 (17.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/082061 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 21/55**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT02/00105

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. April 2002 (05.04.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
A 554/2001 5. April 2001 (05.04.2001) AT

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **INNOVATIONSAGENTUR GESELLSCHAFT
M.B.H.** [AT/AT]; Taborstrasse 10, A-1020 Wien (AT).

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **LENDL, Bernhard** [AT/AT]; Institut für
Analytische Chemie, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9/151, A-1060 Wien (AT). **SCHUSTER, Kurt,
Christian** [AT/AT]; Institut für Analytische Chemie, Technische Universität Wien, Getreidemarkt 9/151, A-1060
Wien (AT).

(74) Anwälte: **SONN, Helmut** usw.; Riemergasse 14, A-1010
Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, 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).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *mit internationalem Recherchenbericht*

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.

(54) Title: METHOD FOR MONITORING BIOTECHNOLOGICAL PROCESSES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR PROZESSÜBERWACHUNG VON BIOTECHNOLOGISCHEN PROZESSEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for monitoring biotechnological processes while using microorganisms, which is characterized in that both the process medium as well as the microorganisms in the process medium are directly spectroscopied in the infrared region on an ATR crystal while using attenuated total reflection (ATR). The process medium containing the microorganisms is brought into contact with the ATR crystal so that the microorganisms arrive at least at a distance from the ATR crystal that corresponds to the penetration depth of the evanescent field, and the process medium is spectroscopied in the infrared region during this contacting. The process medium containing the microorganisms is then removed from the ATR crystal, the ATR crystal is washed and is optionally brought into contact once again with the process medium containing microorganisms. The invention also relates to a device for carrying out said method.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Prozessüberwachung von biotechnologischen Prozessen unter Verwendung von Mikroorganismen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass sowohl das Prozessmedium als auch die Mikroorganismen im Prozessmedium direkt mittels attenuierter Totalreflexion (ATR) an einem ATR-Kristall im Infrarot-Bereich spektroskopiert werden, wobei das Prozessmedium, enthaltend die Mikroorganismen, mit dem ATR Kristall kontaktiert wird, so dass Mikroorganismen zumindest auf einen Abstand zum ATR-Kristall, der der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes entspricht, gelangen, und während dieser Kontaktierung im Infrarot-Bereich spektroskopiert wird, worauf das Prozessmedium, enthaltend die Mikroorganismen, vom ATR-Kristall entfernt wird, der ATR-Kristall gewaschen wird, und gegebenenfalls eine erneute Kontaktierung mit dem Prozessmedium, enthaltend Mikroorganismen, erfolgt, sowie eine Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens.

WO 02/082061 A1

Verfahren zur Prozessüberwachung von biotechnologischen Prozessen

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Prozessüberwachung von biotechnologischen Prozessen unter Verwendung von Mikroorganismen.

Die Überwachung von biotechnologischen (Fermentations-)prozessen ist äußerst komplex. Neben den im Fermentationsmedium produzierten Substanzen und deren Gehalt im Fermentationsmedium sind auch die Mikroorganismen und deren physiologischer Status zu überwachen. Bei einer derartigen Prozessüberwachung sollten Daten über den Fermentationsprozess, wie Ausbeute, Lebensfähigkeit und Stoffwechselzustand der Mikroorganismen, möglichst annähernd "real time" erfasst werden, um umgehend auf Änderungen in der Zusammensetzung des Fermentationsmediums bzw. im Status der Mikroorganismen reagieren zu können. Eine Prozesskontrolle der löslichen Bestandteile von Reaktionsprozessen, insbesondere von Fermentationsprozessen mittels Infrarot-Spektroskopie, wurde beispielsweise zur Messung von Substanzen, wie Glukose, Essigsäure, Milchsäure, Lactose und Galactose sowie Ethanol, beschrieben. Es ist mit dieser Methodologie auch möglich, mehrere Substanzen gleichzeitig zu erfassen.

Obgleich die Infrarot-Spektroskopie von biologischen ganzen Zellen prinzipiell möglich ist (siehe Hopkinson et al., Analyst 112 (1987), 501-505; Fayolle et al., Vibr. Spectroscopy 14 (1997), 247-252), wurde diese für eine genaue Analyse der Zellen bislang nur in getrocknetem Zustand bzw. in Deuteriumoxid in Betracht gezogen (McGovern et al., J. Biotechnol. 72 (1999), 157-167; Schuster et al., Vibr. Spectroscopy 19 (1999), 467-477 und Majara et al., J. Inst. Brew. 104 (1998), 143-146). Die ständige Überwachung von Zellen in biotechnologischen Prozessen mittels Infrarot-Spektroskopie wurde daher nicht für geeignet erachtet, und zwar methodologisch und apparativ. Weiters wurde die Infrarot-Spektroskopie von ganzen Zellen bislang auch auf Grund des "bio-fouling"-Effekts für nicht praktikabel gehalten: im Zuge der Messung von nicht-getrockneten Fermentationslösungen, die Zellen enthalten, kommt es zu Ablagerungen an den IR-Messkristallen (ATR-Kristallen), die manuell entfernt werden müssen (siehe Hop-

kinson et al., oben, die auch besonders die Problematik des Zerkratzens der Kristalle und der dadurch bedingten Kontamination und Artefakt-Erzeugung in nachfolgenden Spektren hervorgehoben haben). Diese manuelle Reinigung wird daher als zu aufwendig und für eine Routine-Analytik in der Prozessüberwachung als ungeeignet angesehen. Auf der anderen Seite erfordert die IR-Spektroskopie von getrockneten Zellen einen enormen Zeit- und Präparationsaufwand, um die Zellen in geeigneter Form zur IR-Messung zu bringen. So kann davon ausgegangen werden, dass alleine die Probenpräparation nicht unter 25 Minuten erfordert (siehe Majara et al., oben). Weiters ist auch kein geeignetes on-line-Equipment zur Durchführung von Prozessüberwachungen von biotechnologischen Prozessen unter Verwendung von Mikroorganismen, bei welchen auch die Zusammensetzung und der Zustand von Mikroorganismen überwacht werden können, erhältlich (Majara et al., oben).

Die von Fayolle et al. erhaltenen Spektren wurden in einer optischen Küvette mit 38 µm Schichtdicke gemessen. Eine solche Anordnung ist für eine Prozesskontrolle nicht geeignet, da diese leicht bei der wiederholten Messung verstopft. Vor allem ist beim von Fayolle et al. beschriebenen System die Messung der Amid-I-Bande nicht möglich.

Auch die Verunreinigungen der Messzellen mit polymerem oder organischem Material (u.a. "bio-fouling") wird als ein wesentlicher Nachteil der Infrarot-Technologie angesehen, insbesondere, wenn die optischen Kristalle von Durchflussszellen von den Verunreinigungen irreversibel überzogen sind und nur durch aufwendige physikalische Reinigungsverfahren wieder von diesen Überzügen befreit werden können (US 5,604,132).

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Prozessüberwachung von biotechnologischen Prozessen unter Verwendung von Mikroorganismen zur Verfügung zu stellen, bei welchem sowohl die löslichen Stoffe im Prozessmedium als auch die Mikroorganismen schnell, verlässlich, automatisch, gut reproduzierbar und mit hohem Informationsgehalt gemessen und überwacht werden können.

Die vorliegende Erfindung sieht daher ein Verfahren der eingangs

beschriebenen Art vor, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass sowohl das Prozessmedium als auch die Mikroorganismen im Prozessmedium direkt mittels abgeschwächter (attenuierter) Totalreflexion (ATR) an einem ATR-Kristall im Infrarot-Bereich spektroskopiert werden, wobei das Prozessmedium, enthaltend die Mikroorganismen, mit dem ATR-Kristall kontaktiert wird, so dass Mikroorganismen zumindest auf einen Abstand zum ATR-Kristall, der der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes entspricht, gelangen und während dieser Kontaktierung im Infrarot-Bereich spektroskopiert wird, worauf das Prozessmedium, enthaltend die Mikroorganismen, vom ATR-Kristall entfernt wird, der ATR-Kristall gewaschen wird, und gegebenenfalls eine erneute Kontaktierung mit dem Prozessmedium, enthaltend Mikroorganismen, erfolgt.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass es möglich ist, mittels Infrarot-Spektroskopie eine komplette und umfassende Prozessüberwachung von biotechnologischen Prozessen durchzuführen, wobei nicht nur eine Vielzahl von löslichen Verbindungen gemessen und überwacht werden können, sondern auch die Zusammensetzung und der Zustand der Mikroorganismen on-line und nahezu in "real time" gemessen wird. Dies kann erfindungsgemäß ohne Trocknung der Mikroorganismen durchgeführt werden, wodurch der gesamte Prozess so schnell durchgeführt werden kann, dass er sich für eine on-line-Prozesskontrolle eignet. Die löslichen Inhaltsstoffe im Kulturmedium können dabei in an sich bekannter Weise im Infrarot-Bereich, beispielsweise in einer Durchflusszelle, spektroskopiert werden. Die im Prozessmedium enthaltenden Mikroorganismen werden in einem speziellen Kontaktierungsschritt zumindest auf einen Abstand zum ATR-Kristall, der der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes entspricht, herangebracht und genau während dieser Kontaktierung im Infrarot-Bereich spektroskopiert.

Die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ist eine insbesondere Material-, Wellenlängen-, Einfallswinkel- und Medien-abhängige Größe, die z.B. in Harrick (J. Opt. Soc. Am. 55 (7) (1965, 851-857) definiert ist. (Eindringtiefe = Abstand von der Oberfläche des ATR-Kristalls, bei dem die Amplitude der evaneszenten Welle auf die Hälfte des Wertes gefallen ist, welche sie an der Oberfläche hat.) Bei Diamant, wässrigen Lösungen und einer Wellen-

zahl von 1000 beträgt diese etwa 2 μm .

Das Prozessmedium enthaltend die Mikroorganismen wird dann vom ATR-Kristall entfernt, der ATR-Kristall mit Waschlösungen gewaschen, worauf gegebenenfalls erneute Kontaktierungen mit dem Prozessmedium enthaltenden Mikroorganismen erfolgen können.

Bevorzugterweise wird die Spektroskopie im Infrarot mit Fourier-transformierter Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) durchgeführt, welche, wie erwähnt, bereits in der Vergangenheit zur Überwachung von biotechnologischen Prozessen, allerdings ausschließlich im Hinblick auf gelöste Substanzen, verwendet worden ist. Die Messung mittels Infrarot-Lasern (z.B. Quantum-Kaskaden-Laser) als IR-Quelle ist ebenfalls vorteilhaft.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird ein Diamant als ATR-Kristall im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt. Dieser erweist sich vor allem im Waschprozess wesentlich stabiler als herkömmliche ATR-Kristalle und ist bei der ATR-Messung von besonderem Vorteil. Bevorzugterweise wird die ATR-Messung mittels planarem Wellenleiter als ATR-Kristall, insbesondere mit der von Braiman et al., Appl. Spectrosc. 51 (4) (1997), S. 592-597, beschriebenen Methodologie durchgeführt (vgl. auch WO 00/36442-A, US 5 980 831-A).

Bevorzugterweise wird das Prozessmedium mit einem automatischen Fließsystem aus dem Bioreaktor, in dem der biologische Prozess durchgeführt wird, an den ATR-Kristall geführt, wobei während der Zeit, während der die Biosuspension über den ATR-Kristall strömt ("flow on"), die "großen" Mikroorganismen-Zellen nicht in die Nähe der ATR-Oberfläche kommen und daher nicht bzw. nur unwesentlich vom Infrarotlicht erfasst werden. Diese Zellen liefern daher keinen nennenswerten Beitrag zu den gemessenen Spektren, so dass während der "flow on"-Phase nur die gelösten Bestandteile, wie z.B. Zucker, Alkohole, Aminosäuren, etc., quantitativ bestimmt werden, wie in Kansiz et al., Analytica Chimica Acta 21149 (2001), 1-12, beschrieben. Hierbei wurden beispielsweise bei der Überwachung einer Aceton-Butanol-Fermentation simultan Aceton, Acetat, n-Butanol, Butyrat und Glukose in mittleren IR gemessen.

Wenn der Durchfluss nun beispielsweise abgestoppt wird, kommt es zum Absetzen der Mikroorganismen auf dem ATR-Kristall, wodurch diese nun gemessen werden können. Gegebenenfalls können dabei auch mechanische Druckkräfte ausgeübt werden, die den Annäherungsschritt der Mikroorganismen an den ATR-Kristall effizienter gestalten.

Die Annäherung der Mikroorganismen an den ATR-Kristall (und damit die temporäre Vermessung dieser Mikroorganismen) kann aber auch auf andere Weise erfolgen, etwa durch temporäres Aufhalten der Mikroorganismen in der Prozesslösung durch geeignete Filter und gegebenenfalls Heranbringen an den ATR-Kristall, durch Anwendung von Zentrifugalkraft, durch bioelektrisch-magnetische Anlagerungen an den ATR-Kristall, etc..

Bei der Messung der Zellen kann auch eine Variation des Einfallswinkels an der Grenzfläche ATR-Kristall/Medium, wie von Shick et al. (Appl. Spectrosc. 47 (8) (1993), s. 1237-1244) beschrieben, verwendet werden. Die Messung kann auch mit zwei oder mehr ATR-Kristallen, gegebenenfalls mit unterschiedlichen Einfallswinkeln, durchgeführt werden.

Das Waschen erfolgt erfindungsgemäß bevorzugt durch Behandlung des ATR-Kristalls mit einer Base, beispielsweise mit 1M NaOH, und darauffolgendem Spülen mit destilliertem Wasser. Die Zugabe von Basen ermöglicht die vollständige Deprotonierung der analysierten Säuren und das Abstoppen der Stoffwechselaktivitäten. Alternativ oder in Kombination dazu können auch alternative Waschlösungen zum Einsatz kommen, beispielsweise Na_2CO_3 (z.B. 5%), wobei ebenfalls bevorzugt Waschschrte mit destilliertem Wasser abgeschlossen werden können.

Es hat sich gezeigt, dass erfindungsgemäß die Dauer eines Messzyklus von ganzen Zellen mittels Infrarot von zumindest knapp unter 30 Minuten gemäß der üblichen Methoden (Majara et al., oben), vorzugsweise auf unter 20 Minuten, besonders bevorzugt auf unter 10 Minuten, insbesondere auf unter 5 Minuten, verringert werden kann, so dass Überwachungspunkte des biologischen Prozesses in den genannten Abständen möglich sind, was für eine ausreichend genaue Prozessüberwachung ausreicht.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders gut zur Überwachung von biotechnologischen Prozessen unter Verwendung von einzelligen Eukaryonten, insbesondere Hefe, oder Bakterien, insbesondere E. coli, wobei das Verfahren aber auf jegliche Suspensions-(Submers-)kultivierung, i.e. bei welcher Mikroorganismen oder Aggregate derselben in suspendierter Form vorliegen, prinzipiell anwendbar ist.

Besonders bevorzugte Mikroorganismen sind demgemäß rekombinante Mikroorganismen und/oder Antibiotika-produzierende Mikroorganismen, die auf Grund ihrer Empfindlichkeit und komplizierten Stoffwechselvorgänge einer äußerst genauen und komplexen Prozessanalytik bedürfen. Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorzugsweise auch bei der Herstellung von Einzelzellenprotein oder zur Herstellung von Futterstoff oder Nahrungsmitteln auf Basis von Mikroorganismen verwendet werden, sowie zur Messung von mikrobiellen Kohlehydraten.

Eine genaue Prozesskontrolle ist auch bei biotechnologischen Prozessen erforderlich, bei welchen in den Mikroorganismen Einschlusskörper gebildet werden. Auch diese Mikroorganismen bzw. Einschlusskörper können mittels Infrarot-Spektroskopie gut überwacht und mit den erfindungsgemäßen Verfahren demgemäß auch in industriellem Maßstab kontrolliert werden. Es ist bekannt, dass die Sekundärstruktur von Proteinen mittels IR-Spektroskopie analysiert werden kann (Milot et al., Anal. Chim. Acta 295 (1994), S. 233-241; Naumann et al. "Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials" (2000), S. 323-378; Eds. Gremlich et al., Marcel Dekker, New York). Gerade Einschlusskörper haben eine charakteristische Sekundärstruktur, die besonders reich an β -Faltblatt ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist im gesamten Infrarot-Bereich anwendbar, besonders bevorzugt erfolgt die Spektroskopie jedoch im mittleren Infrarot-Bereich bei einer Wellenzahl zwischen 4000 und 400/cm, insbesondere zwischen 1800 und 900/cm, dem sogenannten "Fingerprint"-Bereich. Aber die Messungen können selbstverständlich auch bevorzugt im nahen Infrarot durchgeführt werden, also bei Wellenlängen zwischen 2,5 μ m bis 750 nm.

Vorzugsweise wird die Spektroskopie von löslichen Bestandteilen im Prozessmedium vor der Spektroskopie der Mikroorganismen vorgenommen. Nach der Spektroskopie der Mikroorganismen kann bevorzugterweise der Waschschrift angeschlossen werden.

Wie erwähnt, wird das Verfahren besonders bevorzugt so durchgeführt, dass nach der Kontaktierung des ATR-Kristalls mit dem Prozessmedium die Bewegung des Mediums gestoppt wird, so dass die Mikroorganismen auf dem ATR-Kristall abgesetzt werden (wodurch sie ebenfalls auf einen geeigneten Abstand zum ATR-Kristall gelangen können), worauf die Spektroskopie der Mikroorganismen durchgeführt wird.

Beim erfindungsgemäßen Verfahren kann im Prozessmedium, insbesondere aber auch bei den Mikroorganismen, die Sekundärstruktur von Proteinen überwacht werden. Weiters kann im Prozessmedium und/oder bei den Mikroorganismen auch der Gehalt von Lipiden überwacht werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, umfassend ein mit einem automatischen Fließsystem verbundenes ATR-Element mit einem ATR-Kristall, eine mit dem ATR-Kristall verbundene Infrarot-Spektroskopie-Einrichtung und ein über ein automatisches Fließsystem mit dem ATR-Element verbundenes Waschsystem.

Diese Vorrichtung ist auf Grund des automatischen Fließsystems zur IR-Kontrolle und Überwachung von biotechnologischen Prozessen besonders geeignet. Ein automatisches Fließsystem ist generell eine Vorrichtung, die z.B. flüssige bzw. suspendierte Proben mittels z.B. Pumpen, Schläuchen und Ventilen transportiert und manipuliert. Vorzugsweise ist die Infrarot-Spektroskopie-Einrichtung mit einer elektronischen Datenverarbeitungs-Anlage (IR-EDV) verbunden, womit die aufgenommenen Spektren analysiert werden können und mit der vorzugsweise Prozesseinrichtungen (Stellglieder), wie z.B. Zuflusseinrichtungen, Temperaturregler, pH-Regler, usw., für den Bioreaktor, wenn sie mit der IR-EDV verbunden sind, von der IR-EDV steuerbar sind, womit eine Veränderung von Pro-

zessparametern gesteuert werden kann. Damit kann eine automatische Prozesskontrolle durchgeführt werden, mit der beispielsweise vorgegebene Soll-Werte durch gezielte Zuststeuerung von Nährmittel und Prozesskontrollmittel in den Bioreaktor effizient und voll-automatisch überwacht, kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert werden können. Beispielsweise können auf Grund der IR-Spektroskopie-Informationen gezielt Nährstoffe aber auch beispielsweise Expressions-Repressoren, Attenuatoren oder Induktoren (z.B. in rekombinanten Kulturen) zugesetzt werden.

Vorzugsweise umfasst die erfindungsgemäße Vorrichtung weiters einen Bioreaktor, der gegebenenfalls mit Prozessmedium und Mikroorganismen gefüllt ist.

Über das automatische Fließsystem kann auch eine Konditionierung des Prozessmediums vorgenommen werden oder z.B. Messung, pH-Werteinstellungen, temporäre Filtrierungs- oder Trennschritte, Abtrennung von Substanzen, die die Messung beeinträchtigen könnten, etc., vorgenommen werden.

Bevorzugterweise weist das erfindungsgemäße Fließsystem Schläuche mit einem Innendurchmesser von größer als 0,7 mm, also größer als die standardisierten Durchmesser (0,3, 0,5 und 0,7 mm) auf, da es bei den Schläuchen mit Standard-Durchmessern aufgrund der Mikroorganismen leicht zu Verstopfungen kommen kann. Vorzugsweise werden erfindungsgemäß Schläuche mit Innendurchmessern von 1 mm und darüber, insbesondere 1,2 mm und (weit) darüber, verwendet.

Obgleich normalerweise bei der IR-Spektroskopie mittels ATR-Kristallen ein geringes Detektionsvolumen (= Totvolumen des ATR-Elements; Messvolumen, das sich auf dem ATR-Kristall befindet) erwünscht ist (geringere Probenmenge, genauere Messung, Hintanhaltung von Verdünnungen, etc.), hat es sich bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung als günstig erwiesen, das Totvolumen des ATR-Elements größer als die üblichen 5 µl vorzusehen. Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist daher vorzugsweise ein Totvolumen von mehr als 5 µl, noch bevorzugter 10 µl oder mehr, insbesondere 20 µl oder mehr, vorgesehen.

Die Infrarot-Spektroskopie-Einrichtung ist bevorzugterweise ein

FTIR-Spektrometer, das sich besonders gut zur optimalen Gewinnung von Infrarotspektren mit ATR-Kristallen eignet. IR-Messung mittels Lasern (z.B. Quantum-Kaskaden-Laser) ist ebenfalls vorteilhaft.

Vorzugsweise ist der ATR-Kristall horizontal gegenüber dem zu messenden bzw. vorbeifließenden Prozessmedium positioniert, so dass das Prozessmedium über den ATR-Kristall geleitet werden kann. Beim Abstoppen des Flusses können dann die Mikroorganismen bedingt durch die Schwerkraft einfach auf dem ATR-Kristall sedimentieren und dort gemessen werden. Beispielsweise kann aber auch der ATR-Kristall mit einer Auffangvorrichtung für Mikroorganismen, z.B. einem aufklappbaren Filter, verbunden werden, der - wenn die Mikroorganismen gemessen werden sollen - aufklappt und die "eingefangenen" Mikroorganismen auf den ATR-Kristall positioniert.

Weiters ist es möglich, durch geeignete elektrische Ladungsinduktion die Mikroorganismen an den ATR-Kristall heranzubringen. Dies kann z.B. durch ein äußeres elektrisches Feld realisiert werden, wie bei der "Free-Flow"-Elektrophorese (Raymond et al., Anal. Chem. 68 , (15) (1996), S. 2515-2522), oder aber auch durch Aufbringen einer geladenen Oberfläche auf den ATR-Kristall, z.B. durch eine Schicht von poly-L-Lysin.

Vorzugsweise können auf dem ATR-Kristall auch Substanzen vorgesehen werden, die den Waschvorgang günstig beeinflussen oder die Anhaftung von Mikroorganismen beeinflussen, insbesondere werden dabei Monolayer dieser Substanzen vorgesehen.

Vorzugsweise ist das ATR-Element als Durchflusszelle ausgeführt, so dass die Messung von löslichen Bestandteilen/Zellen durch Kombination von "flow on" mit "Stopp"-Schritten aufgenommen werden kann.

Der ATR-Kristall ist, wie schon oben erwähnt, vorzugsweise ein Diamant, der sich auf Grund seiner Härteeigenschaften und der dadurch bedingten erleichterten Wartung besonders gut für ein derartiges Verfahren eignet. Ebenfalls bevorzugt sind Kristalle aus Germanium, Silizium oder Kristalle vergleichbarer Härte.

Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Vorrichtung mit einer Anhaltevorrichtung zum Stoppen des Flusses des Prozessmediums ausgestattet, die trotz Stoppens eine IR-Messung erlaubt.

Die Erfindung wird an Hand der nachfolgenden Beispiele sowie der Zeichnungsfiguren, auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt ist, näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1: die Prozessführung und Wachstumskurve einer Backhefe-
produktion;

Fig. 2: den Verlauf der Speicherstoff-Bildung in dieser Fermentation;

Fig. 3: ein IR-Spektrum von getrockneter Backhefe, normiert auf
Amid (Protein);

Fig. 4: die 2. Ableitung von Fig. 3, Vektor-normiert;

Fig. 5: Referenzspektren reiner Zellkomponenten;

Fig. 6: Spektren on-line (in vivo), Backhefe-Fermentation mit
ATR-Technik aufgenommen;

Fig. 7 und 8: Spektren der Mikroorganismen "on-line" (in vivo)
erfindungsgemäß; und

Fig. 9 und 10: FTIR-Spektren von Zellen (*Chlostridium*) im ge-
trockneten Zustand. Fig. 9 zeigt die Analyse von unter-
schiedlichen Sekundärstrukturen in den Proteinen ge-
trockneter Zellen.

B e i s p i e l e :

Die Leistungsfähigkeit des entwickelten Verfahrens wurde an Hand einer Hefefermentation gezeigt:

Zunächst wurde eine Hefekultur während etwa 15 Stunden in C-limitiertem Wachstum gehalten und anschließend in einer N-limitierten Reifungsphase. Während der C-limitierten Wachstumsphase kommt es zu keiner Einlagerung von Speicherkohlehydraten in den Hefezellen. Diese tritt erst dann auf, wenn auf N-limitiertes Wachstum umgeschaltet wird. Fig. 2 zeigt die Ergebnisse von Referenzanalysen (HPLC, nass-chemisch).

Dieser biotechnologische Prozess wurde zweimal durchgeführt: beim ersten biotechnologischen Prozess (gemäß dem Stand der Technik) wurden Proben manuell entnommen, getrocknet und spektroskopiert. Die Ergebnisse sind in Fig. 3 und 4 gezeigt. Man sieht deutlich, dass erst in der N-limitierten Phase Kohlehydrate aufgenommen werden. Die Information im mittleren Infrarot ermöglicht auch, zwischen unterschiedlichen Zuckern zu unterscheiden. Die Abfolge der Speicherstoffbildung von zuerst Glycogen, dann Trehalose konnte durch externe Referenzanalyse (Fig. 2) und Referenzspektren reiner Zellkomponenten (Fig. 5) bestätigt werden.

Beim zweiten biotechnologischen Prozess wurde das erfindungsgemäße Verfahren angewendet. Die während der "stopped-flow"-Zeit gemessenen Spektren der Mikroorganismen sind jenen der im getrockneten Zustand aufgenommenen sehr ähnlich (Fig. 6, 7 und 8). Der Vergleich der zweiten Ableitungen zeigt deutlich, dass die on-line aufgenommenen Spektren praktisch die gleiche Information enthalten, wie jene von den getrockneten Mikroorganismen (siehe Fig. 4 und 8).

Diese Experimente belegen somit die Funktionstüchtigkeit des erfindungsgemäßen Verfahrens. Wie die Figuren 9 und 10 zeigen, ist aus den Spektren auch Information über die Sekundärstruktur von Proteinen sowie über den Anstieg/Abnahme von Lipiden, RNA, und dgl., ableitbar. Das erfindungsgemäße Verfahren bzw. die erfindungsgemäße Vorrichtung kann zur Prozessüberwachung/Steuerung von jeglichen Kultivierungsprozessen von Suspensionskulturen eingesetzt werden. Es ist auch in der Lage, die Degeneration von Mikroorganismen on-line zu erkennen. Industriell besonders bevorzugte Einsatzgebiete für das erfindungsgemäße Verfahren sind die Herstellung von rekombinanten Proteinen, insbesondere von Proteinen, die intrazellulär gebildet werden, besonders bei Bildung von

Einschlusskörpern (inclusion bodies), die Herstellung von Antibiotika, die Herstellung von Polyhydroxyalkanoaten, aber auch im Bereich der Grundlagenforschung an Bioprozessen.

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Prozessüberwachung von biotechnologischen Prozessen unter Verwendung von Mikroorganismen, dadurch gekennzeichnet, dass sowohl das Prozessmedium als auch die Mikroorganismen im Prozessmedium direkt mittels attenuierter Totalreflexion (ATR) an einem ATR-Kristall im Infrarot-Bereich spektroskopiert werden, wobei das Prozessmedium, enthaltend die Mikroorganismen, mit dem ATR-Kristall kontaktiert wird, so dass Mikroorganismen zumindest auf einen Abstand zum ATR-Kristall, der der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes entspricht, gelangen, und während dieser Kontaktierung im Infrarot-Bereich spektroskopiert wird, worauf das Prozessmedium, enthaltend die Mikroorganismen, vom ATR-Kristall entfernt wird, der ATR-Kristall gewaschen wird, und gegebenenfalls eine erneute Kontaktierung mit dem Prozessmedium, enthaltend Mikroorganismen, erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Spektroskopie im Infrarot mit Fourier-transformierter Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ein Diamant-ATR-Kristall eingesetzt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Prozessmedium mit einem automatischen Fließsystem aus dem Bioreaktor, in dem der biotechnologische Prozess durchgeführt wird, an den ATR-Kristall geführt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Waschen eine Behandlung des ATR-Kristalls mit einer Base umfasst.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Spektroskopie im Abstand von zumindest 20 Minuten, vorzugsweise von zumindest 10 Minuten, insbesondere von zumindest 5 Minuten, durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, dass als Mikroorganismen einzellige Eukaryonten, insbesondere Hefe, oder Bakterien, insbesondere E. coli, verwendet werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Spektroskopie bei einer Wellenzahl von 400 bis 4000 erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Spektroskopie von löslichen Bestandteilen im Prozessmedium vor der Spektroskopie der Mikroorganismen vorgenommen wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass nach der Kontaktierung des ATR-Kristalls mit dem Prozessmedium die Bewegung des Mediums gestoppt wird, so dass die Mikroorganismen auf dem ATR-Kristall abgesetzt werden, worauf die Spektroskopie der Mikroorganismen durchgeführt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass als Mikroorganismen rekombinante Mikroorganismen und/oder Antibiotika-produzierende Mikroorganismen verwendet werden.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der biotechnologische Prozess unter Bildung von Einschlusskörpern in den Mikroorganismen durchgeführt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass im Prozessmedium die Sekundärstruktur von Proteinen überwacht wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass im Prozessmedium der Gehalt von Lipiden überwacht wird.

15. Vorrichtung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 14, umfassend ein mit einem automatischen Fließsystem verbundenes ATR-Element mit einem ATR-Kristall, eine mit dem ATR-Kristall verbundene Infrarot-Spektroskopie-Einrichtung

und ein über ein automatisches Fließsystem mit dem ATR-Element verbundenes Waschsystem.

16. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Infrarot-Spektroskopie-Einrichtung mit einer elektronischen Datenverarbeitungs-Anlage (IR-EDV) verbunden ist, womit die aufgenommenen Spektren analysiert werden können.

17. Vorrichtung nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung weiters einen Bioreaktor, gegebenenfalls gefüllt mit Prozessmedium, enthaltend Mikroorganismen, umfasst.

18. Vorrichtung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die IR-EDV mit Prozesssteuerungs-Einrichtungen zum Bioreaktor verbunden ist, welche von der IR-EDV steuerbar sind.

19. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Infrarot-Spektroskopie-Einrichtung ein FTIR-Spektrometer ist.

20. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der ATR-Kristall horizontal gegenüber dem Prozessmedium positioniert ist, so dass das Prozessmedium über den ATR-Kristall geleitet werden kann.

21. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass das ATR-Element als Durchfluss-Zelle ausgeführt ist.

22. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass der ATR-Kristall ein Diamant ist.

23. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass das automatische Fließsystem Schläuche mit einem Innendurchmesser von mehr als 0,7 mm, vorzugsweise 1,0 mm oder mehr, insbesondere 1,2 mm oder mehr, umfasst.

24. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, dadurch gekennzeichnet, dass das ATR-Element ein Totvolumen von mehr als 5

µl, vorzugsweise 10 µl oder mehr, insbesondere 20 µl oder mehr, aufweist.

25. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 15 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Infrarot-Spektroskopie-Einrichtung einen Laser als IR-Quelle umfasst.

1/7

Modellprozess: Backhefeproduktion

Prozessführung, Wachstumskurve

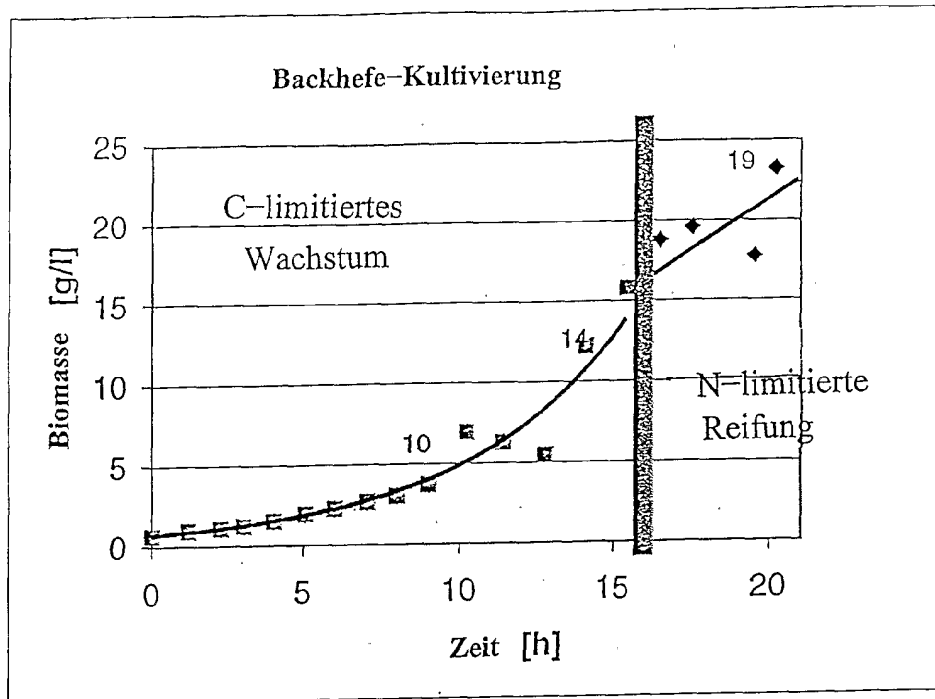


Fig. 1

Bildung der Speicherkohlehydrate gemäß Referenzanalyse (Protein: Biuret-Reaktion; Zucker: HPLC)

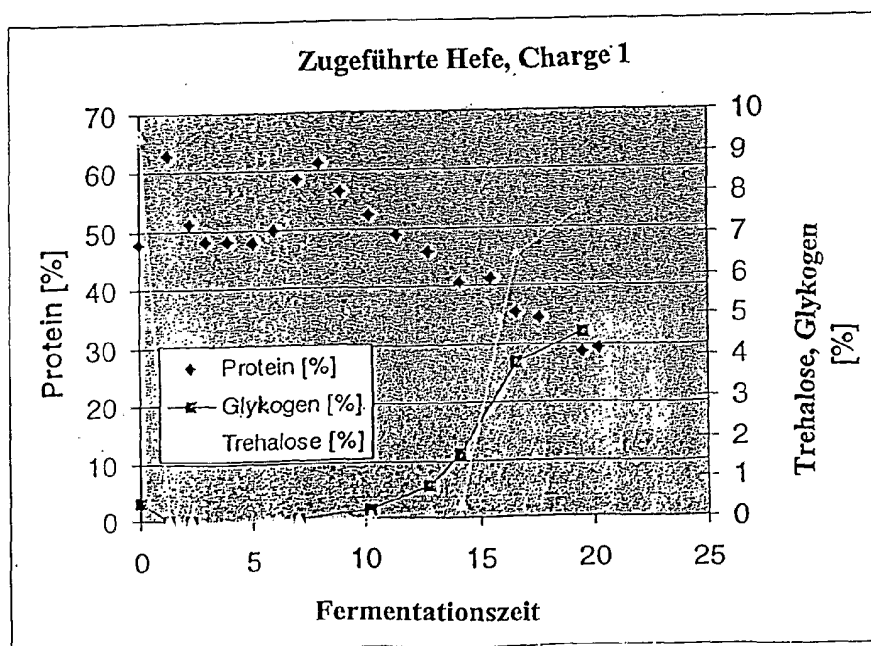


Fig. 2

2/7

IR-Spektren im Verlauf einer Hefe-Batch-Kultivierung

Fig. 3

Ursprüngliche Spektren
auf Amid I(Protein) normiert

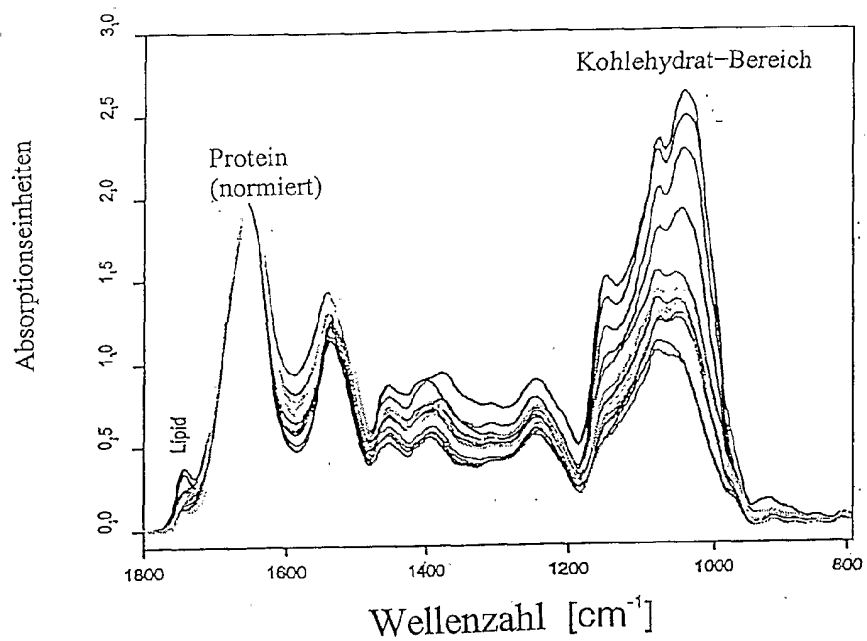
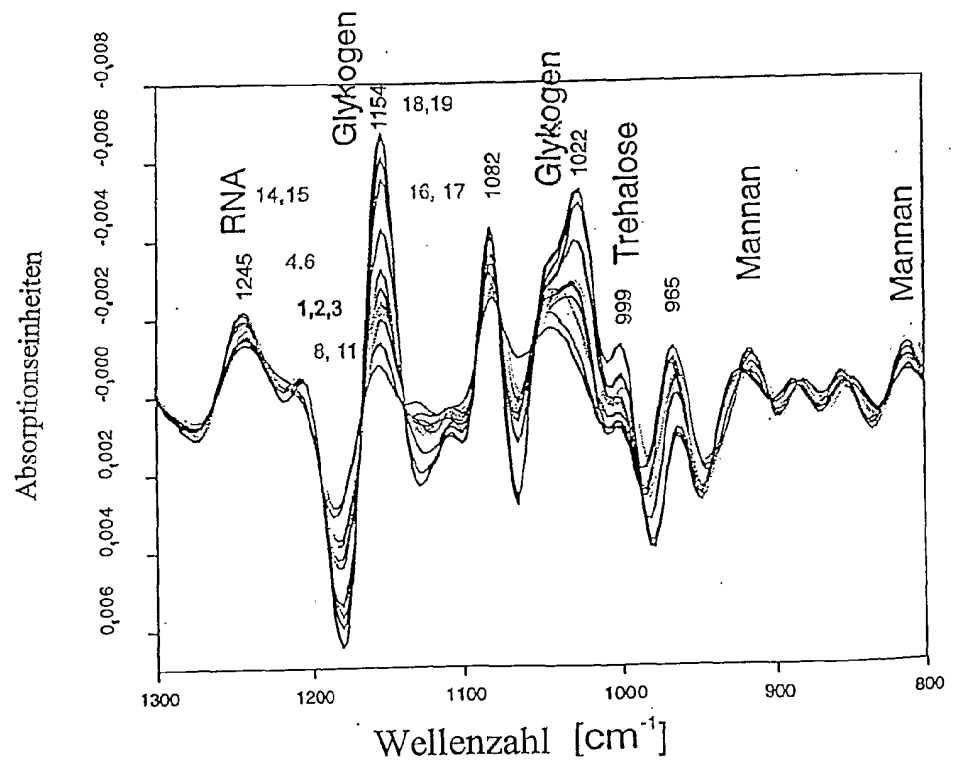


Fig. 4

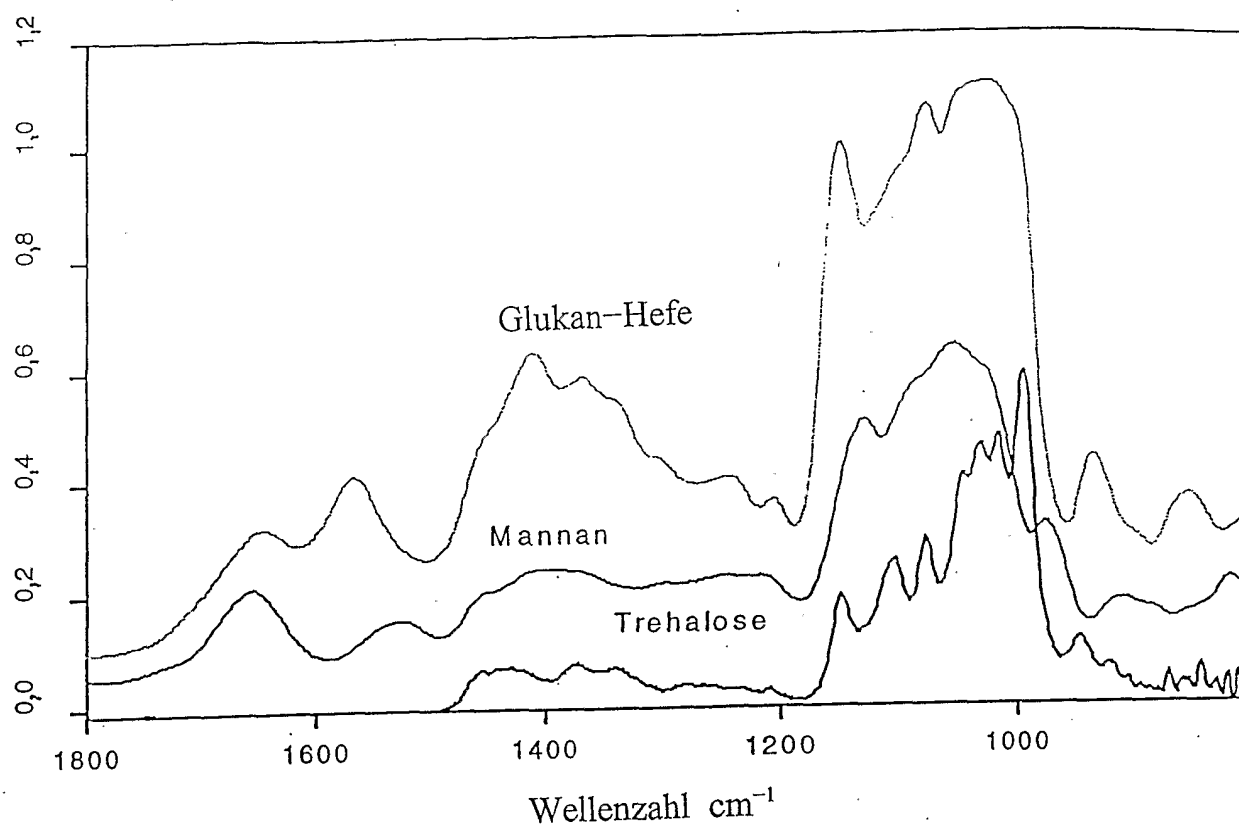
Spektren: 2. Ableitung,
vektornormiert



Farben: Zeitverlauf gelb-rot-grün-blau-schwarz

3/7

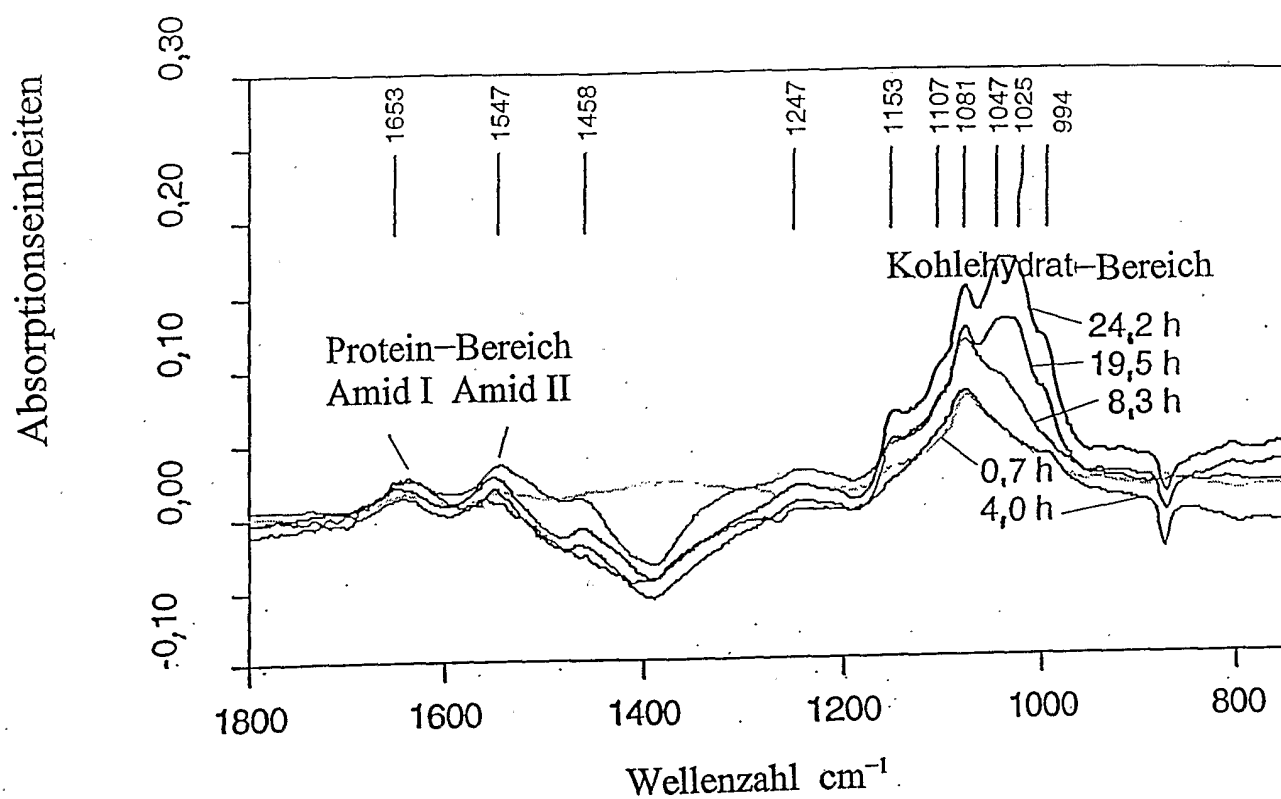
Einige Referenz-Spektren

**Fig. 5**

4/7

Backhefe-Kultivierung mit on-line-Überwachung

Spektren on-line (*in vivo*) auf horizontalem ATR-Kristall nach dem Setzen aufgezeichnet
Original-Spektren



Zeitpunkte:
 0,7 h gelb
 4,0 h rot
 8,3 h grün
 19,5 h blau
 24,2 h schwarz

Fig. 6

5/7

Backhefe-Kultivierung

Spektren on-line (*in vivo*) aufgezeichnet

2. Ableitung der Spektren

vektornormiert aus 1. Ableitung

Zeitpunkte:

0,7 h gelb

4,0 h rot

8,3 h grün

19,5 h blau

24,2 h schwarz

Gesamter "Fingerabdruck"-Bereich

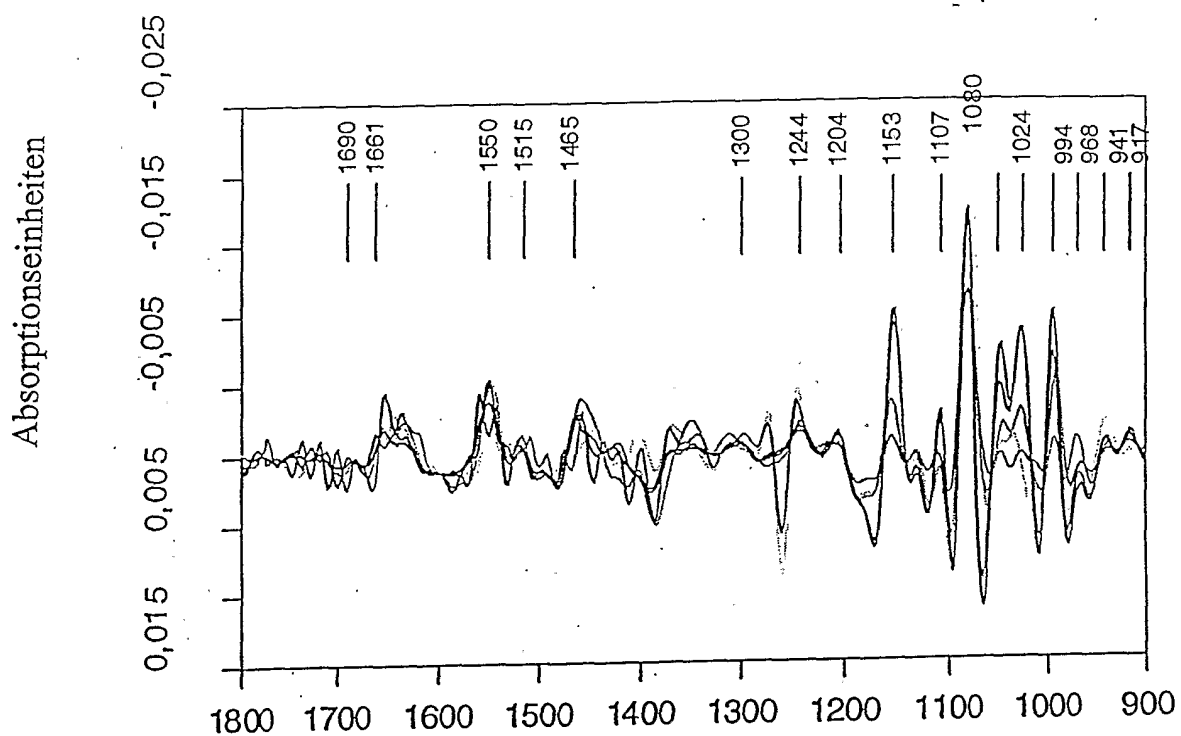


Fig. 7

Kohlehydrat-Bereich

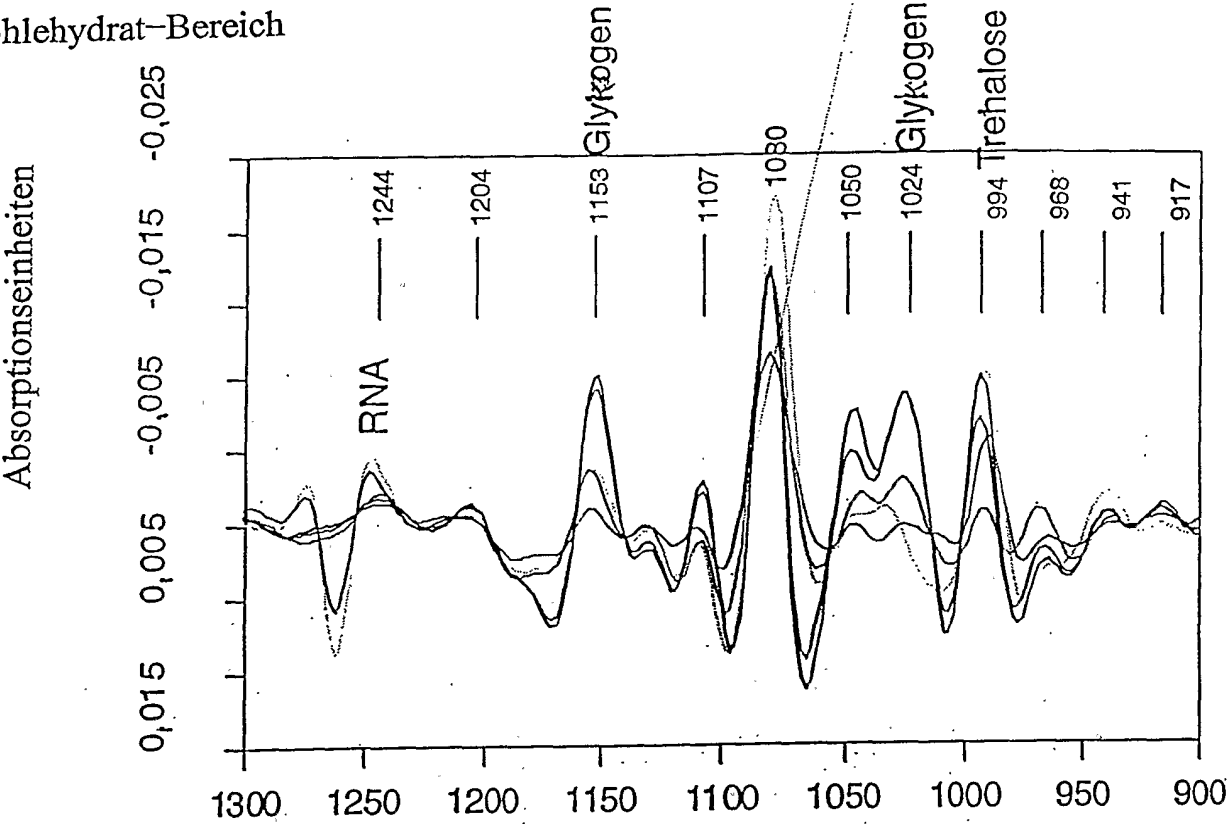


Fig. 8

7/7

Beispiel für die Analyse der Sekundärstruktur von Protein in getrockneten Zellen:
 FTIR-Spektren von *Clostridium*-Zellen im Verlauf eines Batch-Prozesses.
 Spektren von getrockneten Filmen auf ZnSe-Trägern
 Darstellung: negative 2. Ableitung
 Zahlen gemäß den Zeitpunkten der Probenahmen im Verlauf der 100 h-Batch-Fermentation (entsprechend dem Alter der Zellen)
 Zuordnungen gemäß Naumann, 2000, und Jackson & Mantsch, 1995.

Veränderung in der durchschnittlichen Sekundär-Struktur des Gesamt-Zellproteins

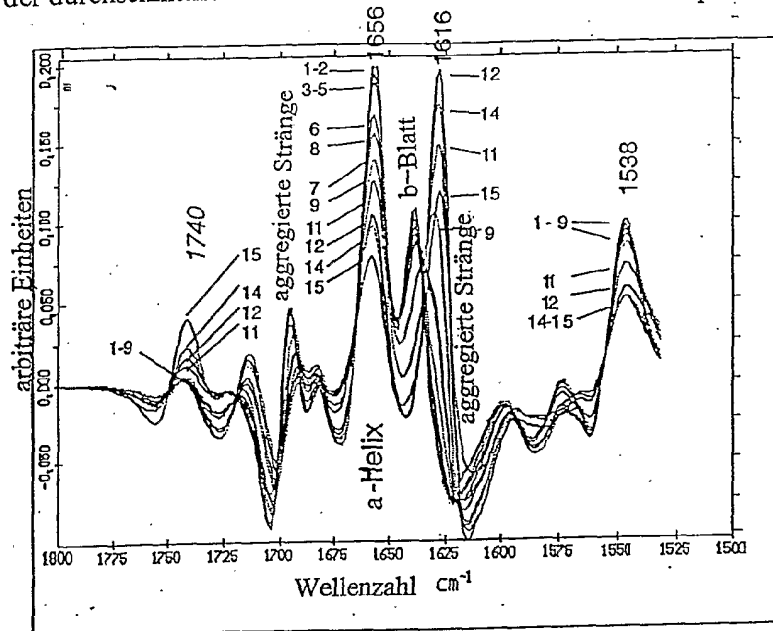


Fig. 9

Andere Veränderungen in Zellen, durch IR-Spektroskopie auf getrockneten Filmen sichtbar:
 Zunahme an Lipid, Abnahme an Phosphorsäureestern (hauptsächlich Nukleinsäuren)

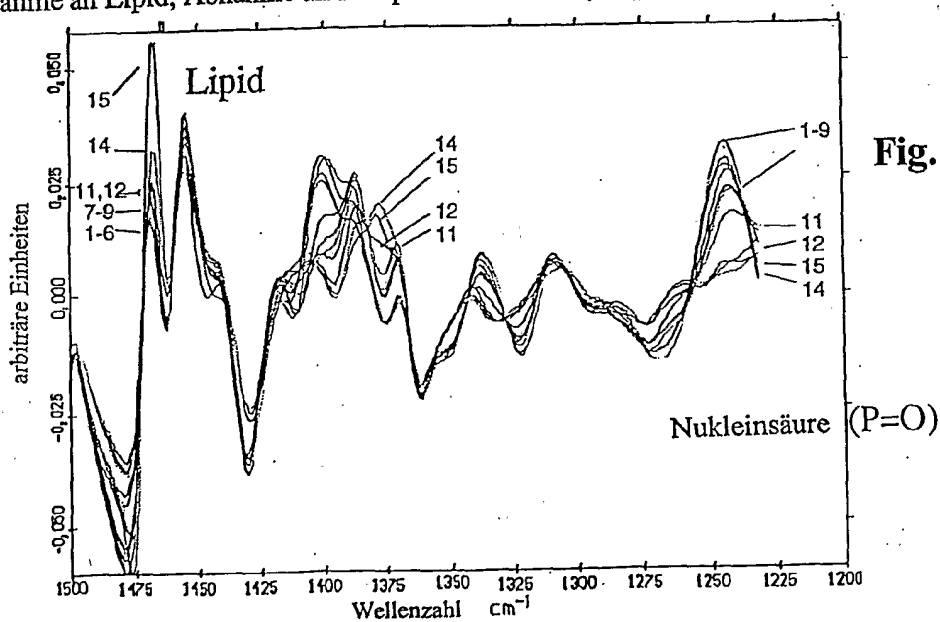


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 02/00105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N21/55

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 G01N

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, WPI Data, PAJ, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 99 05509 A (KELLER THOMAS ;VOGEL HORST (CH); ECOLE POLYTECH (CH); LILEY MARTHA) 4 February 1999 (1999-02-04) page 4, line 28 -page 5, line 33 page 8, line 1 -page 12, line 5 figure 1	1,2
A	US 5 362 445 A (MIYAHARA YUJI ET AL) 8 November 1994 (1994-11-08) column 2, line 10 - line 17 column 3, line 14 -column 4, line 7 column 7, line 27 - line 56 claim 1; figure 12	1,15,18, 20,21

-/--



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.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2002

Date of mailing of the international search report

29/07/2002

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

Krametz, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/AT 02/00105

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 5 777 726 A (KRONE-SCHMIDT WILFRIED) 7 July 1998 (1998-07-07) column 2, line 48 -column 3, line 55 column 4, line 27 -column 6, line 53 figure ---	1,15,20
A	US 3 803 384 A (BRAUNLICH G) 9 April 1974 (1974-04-09) column 4, line 5 - line 51 figure 2 ---	1,15,25
A	EP 0 624 785 A (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES) 17 November 1994 (1994-11-17) page 3, line 3 - line 7 page 3, line 18 - line 20 claim 1 ---	3,22
A	DE 196 50 899 A (BRINK GUNNAR DR) 18 June 1998 (1998-06-18) column 6, line 22 - line 32 figure 1 -----	25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 02/00105

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9905509	A	04-02-1999	WO 9905509 A1	04-02-1999
			AU 3356597 A	16-02-1999
			EP 1002226 A1	24-05-2000
US 5362445	A	08-11-1994	JP 4084738 A	18-03-1992
			JP 4110752 A	13-04-1992
			DE 4124920 A1	06-02-1992
US 5777726	A	07-07-1998	DE 69301521 D1	21-03-1996
			DE 69301521 T2	18-07-1996
			EP 0594838 A1	04-05-1994
			JP 2773980 B2	09-07-1998
			JP 7500422 T	12-01-1995
			WO 9323737 A1	25-11-1993
US 3803384	A	09-04-1974	DE 2164670 A1	28-06-1973
			CH 546954 A	15-03-1974
			FR 2165676 A5	03-08-1973
EP 0624785	A	17-11-1994	DE 69322256 D1	07-01-1999
			DE 69322256 T2	27-05-1999
			EP 0624785 A1	17-11-1994
			US 5569921 A	29-10-1996
			WO 9408224 A1	14-04-1994
			JP 6214102 A	05-08-1994
			ZA 9306715 A	13-04-1994
DE 19650899	A	18-06-1998	DE 19650899 A1	18-06-1998
			AU 5753798 A	29-06-1998
			WO 9825130 A1	11-06-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 02/00105

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N21/55

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 99 05509 A (KELLER THOMAS ;VOGEL HORST (CH); ECOLE POLYTECH (CH); LILEY MARTHA) 4. Februar 1999 (1999-02-04) Seite 4, Zeile 28 -Seite 5, Zeile 33 Seite 8, Zeile 1 -Seite 12, Zeile 5 Abbildung 1	1,2
A	US 5 362 445 A (MIYAHARA YUJI ET AL) 8. November 1994 (1994-11-08) Spalte 2, Zeile 10 - Zeile 17 Spalte 3, Zeile 14 -Spalte 4, Zeile 7 Spalte 7, Zeile 27 - Zeile 56 Anspruch 1; Abbildung 12 --- -/--	1,15,18, 20,21

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

19. Juli 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Krametz, E

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 02/00105

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 777 726 A (KRONE-SCHMIDT WILFRIED) 7. Juli 1998 (1998-07-07) Spalte 2, Zeile 48 - Spalte 3, Zeile 55 Spalte 4, Zeile 27 - Spalte 6, Zeile 53 Abbildung ----	1,15,20
A	US 3 803 384 A (BRAUNLICH G) 9. April 1974 (1974-04-09) Spalte 4, Zeile 5 - Zeile 51 Abbildung 2 ----	1,15,25
A	EP 0 624 785 A (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES) 17. November 1994 (1994-11-17) Seite 3, Zeile 3 - Zeile 7 Seite 3, Zeile 18 - Zeile 20 Anspruch 1 ----	3,22
A	DE 196 50 899 A (BRINK GUNNAR DR) 18. Juni 1998 (1998-06-18) Spalte 6, Zeile 22 - Zeile 32 Abbildung 1 -----	25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 02/00105

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9905509	A	04-02-1999	WO	9905509 A1	04-02-1999
			AU	3356597 A	16-02-1999
			EP	1002226 A1	24-05-2000
US 5362445	A	08-11-1994	JP	4084738 A	18-03-1992
			JP	4110752 A	13-04-1992
			DE	4124920 A1	06-02-1992
US 5777726	A	07-07-1998	DE	69301521 D1	21-03-1996
			DE	69301521 T2	18-07-1996
			EP	0594838 A1	04-05-1994
			JP	2773980 B2	09-07-1998
			JP	7500422 T	12-01-1995
			WO	9323737 A1	25-11-1993
US 3803384	A	09-04-1974	DE	2164670 A1	28-06-1973
			CH	546954 A	15-03-1974
			FR	2165676 A5	03-08-1973
EP 0624785	A	17-11-1994	DE	69322256 D1	07-01-1999
			DE	69322256 T2	27-05-1999
			EP	0624785 A1	17-11-1994
			US	5569921 A	29-10-1996
			WO	9408224 A1	14-04-1994
			JP	6214102 A	05-08-1994
DE 19650899	A	18-06-1998	ZA	9306715 A	13-04-1994
			DE	19650899 A1	18-06-1998
			AU	5753798 A	29-06-1998
			WO	9825130 A1	11-06-1998