

PCT

 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

 Internationales Büro

 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE

 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

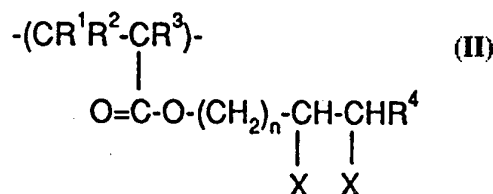
(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : B01J 20/32, G01N 30/48, B01J 39/12	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/09694 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. April 1995 (13.04.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/03157 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1994 (21.09.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 33 674.4 2. Oktober 1993 (02.10.93) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MÜLLER, Egbert [DE/DE]; Elbestrasse 70, D-64390 Erzhausen (DE). HEMBERGER, Jürgen [DE/DE]; Konradstrasse 7A, D-63741 Aschaffenburg (DE). MORR, Michael [DE/DE]; Elmblick 53, D-38302 Wolfenbüttel (DE). (74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH; Frankfurter Strasse 250, D-64293 Darmstadt (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: NUCLEOTIDE-CONTAINING SORBENT FOR AFFINITY CHROMATOGRAPHY

(54) Bezeichnung: NUKLEOTIDHALTIGES SORBENS FÜR DIE AFFINITÄTSCHROMATOGRAPHIE

(57) Abstract

The invention relates to sorbents based on hydroxyl group containing base carriers for affinity chromatography on the surface of which polymers are covalently bonded, in which a) the substrate contains aliphatic hydroxyl groups, b) the covalently bonded polymers are bonded to the base carrier via a final-position monomer unit, c) the polymers contain monomer units of formula (II), d) the monomer units are linearly linked. In formula (II), R¹, R² and R³ are independently H or CH₃, R⁴ is H, C₁-C₅ alkyl or C₆-C₁₂ aryl, n is an integer from 1 to 5, and one of the radicals X is OH and the other is a nucleoside-containing radical. Their production and use, especially for affinity chromatography, are also disclosed.



(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Sorbentien für die für die Affinitätschromatographie auf der Grundlage von Hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält, b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind, c) die Polymeren Monomereinheiten der Formel (II) enthalten, d) die Monomereinheiten linear verknüpft sind. In Formel (II) bedeuten R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃, R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl, n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5 und einer der Reste X OH und der andere Rest X einen nukleosidhaltigen Rest sowie deren Herstellung und Verwendung, insbesondere für die Affinitätschromatographie.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Nukleotidhaltiges Sorbens für die Affinitätschromatographie

Die Erfindung betrifft Sorbenzien für die Affinitätschromatographie, die Nukleoside oder Nukleotide als Affinitätsliganden enthalten, sowie
5 phosphorsäurehaltige Zwischenverbindungen für ihre Herstellung und deren Verwendung.

Für biologische Wechselwirkungen, z.B. die Mechanismen der Zellerkennung, spielen Glycoproteine, die häufig Sialinsäure enthalten, eine wichtige Rolle. Deren Oligosaccharidbestandteile besitzen häufig komplexe
10 Strukturen. Deswegen sind organisch-chemische in-vitro Synthesen solcher Oligosaccharide, beispielsweise wegen der Einführung und Abspaltung von Schutzgruppen, äußerst aufwendig. Ähnlich aufwendig ist normalerweise die Isolierung aus Naturstoffen. Deswegen werden bei
15 in-vitro Synthesen organisch-chemische Syntheseschritte mit biochemischen Syntheseschritten kombiniert. Bei den biochemischen Syntheseschritten wird die Fähigkeit von Enzymen ausgenutzt, in spezifischer Weise bestimmte chemische Strukturen zu erzeugen, ohne daß Schutzgruppen eingeführt werden müssen. Für derartige Reaktionen werden
20 verschiedene Enzyme aus der Gruppe der Glykosyltransferasen benötigt. Sialinsäurereste lassen sich beispielsweise durch Verwendung von Sialintransferasen an Mono- oder Oligosaccharide binden.

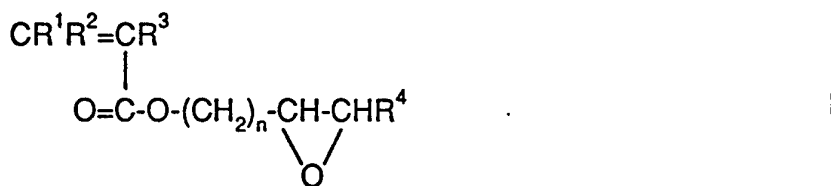
Die Isolierung der Glykosyltransferasen, z.B. Sialin-, Glucosyl-, Acetylglucosamin-, Galactosyl-, Galactosamin-, Mannosyl- oder Fucosyltransferase, erfolgt am besten mit Hilfe der Affinitätschromatographie, wobei bevorzugt immobilisierte Nukleosiddiphosphate, Nukleoside, Mono- oder Oligonukleotide als Affinitätsligand dienen. Für die Sialintransferase wird Cytidindiphosphat (CDP) als Affinitätsligand bevorzugt.
30

Nukleosidhaltige Affinitätsliganden sind auch zur Anreicherung anderer Enzyme, beispielsweise von Dehydrogenasen, Oxidasen, Kinasen oder Transaminasen geeignet.

- 2 -

Im Stand der Technik bekannte Sorbenzien für die Affinitätschromatographie enthalten als Basisträger Polysaccharide, beispielsweise Agarose, an die CDP über einen Aminohexylrest als Spacer gebunden ist. Dieser Spacer ist für die Wechselwirkung zwischen Affinitätsligand und Enzym notwendig. Wegen der Hydrophobizität des Spacers kommt es jedoch zu unerwünschten Wechselwirkungen, wodurch die Ausbeute an Enzym und seine Aktivität verringert werden. Es besteht also die Aufgabe, verbesserte nukleosidhaltige Affinitätsträger für die Reinigung von Enzymen, beispielsweise von Glykosyltransferasen bereitzustellen.

Aus der Anmeldung DE 43 10 964 sind oxiranhaltige aktivierte Trägermaterialien bekannt, bei denen Monomere der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger aufgepfropft sind,



worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,

R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl

und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

bedeuten. Es wurde gefunden, daß sich aus diesen aktivierten Trägermaterialien durch Kombination von an sich bekannten Einzelschritten Trennmaterialien für die Affinitätschromatographie herstellen lassen. Die resultierenden Trennmaterialien weisen verbesserte Eigenschaften auf.

- 3 -

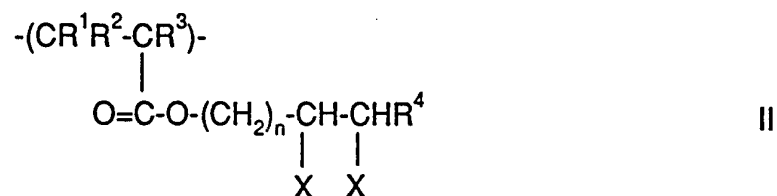
Gegenstand der Erfindung sind Trennmaterialien für die Affinitätschromatographie auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

5

- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
- b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
- c) die linearen Polymeren Monomereinheiten der Formel II enthalten,

10

15



worin

20

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,

R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl,

25

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

und

30

einer der Reste X OH und der andere Rest X einen nukleosidhaltigen Rest, beispielsweise einen Nukleosiddiphosphatrest, einen Mono- oder Oligonukleotidrest oder einen Nukleosidrest,

bedeuten. In besonders bevorzugten Ausführungsformen leitet sich der nukleosidhaltige Rest X von einer der folgenden Verbindungen her: CDP, UDP, GDP, AMP, ADP, ATP, cyclo-AMP.

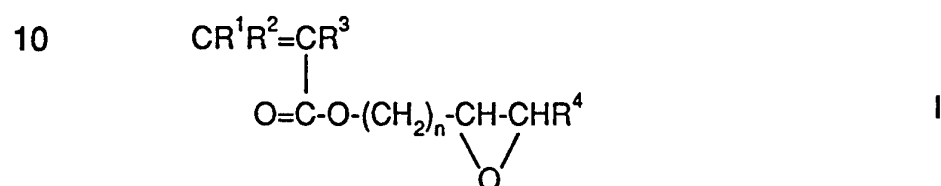
35

- 4 -

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung dieser erfindungsgemäßen Trennmaterialien für die Affinitätschromatographie.

5 Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Herstellung eines nukleosidhaltigen Sorbens, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:

- a) Pfropfpolymerisation von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger unter Beteiligung von Cer-(IV),



15 worin

R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander H oder CH_3 ,

20 R^4 H, C_1 - C_5 -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl

und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

25 bedeuten.

- b) Umsetzung des epoxidgruppenhaltigen Trägers aus Verfahrensschritt a) mit Phosphorsäure oder einem Alkalisalz der Phosphorsäure oder mit Ammoniak;

30

- c) Einführung von nukleosidhaltigen Resten in das in Schritt b) erhaltene Produkt.

35

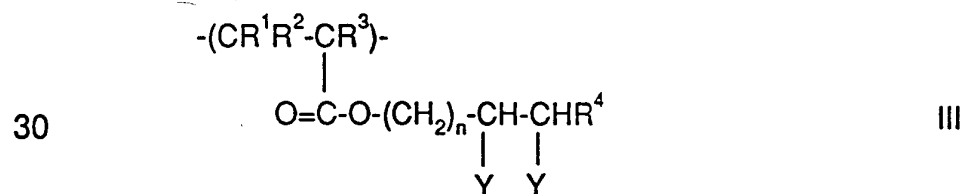
- 5 -

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Umsetzung nach Schritt b) mit Phosphorsäure; anschließend wird der phosphorylierte Träger durch Zugabe eines Überschusses eines tertiären Alkylamins oder von Pyridin in ein alkyliertes Ammoniumsalz überführt. Dieses wird unter wasserabspaltenden Bedingungen mit einem Nukleotid oder Oligonukleotid umgesetzt.

In einer weiteren Ausführungsform erfolgt die Umsetzung nach Schritt b) mit Ammoniak. Anschließend wird der Nukleosidrest beispielsweise als 6-Chlorpurinribosid eingeführt. Das so erhaltene Purinderivat kann nach an sich bekannten Methoden beispielsweise zu einem trägergebundenen AMP-, ATP- oder cyclischen AMP-Derivat umgesetzt werden. Auch sind analoge Umsetzungen zu anderen nukleosidhaltigen Verbindungen bekannt.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Phosphorsäureesterderivate eines gepfropften Polymeren auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
- b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
- c) die linearen Polymeren Monomereinheiten der Formel III enthalten,



worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,

- 6 -

R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

5 und

einer der Reste Y OH und der andere Rest Y PO₄H₂

bedeuten.

10

Gegenstand der Erfindung ist schließlich die Verwendung eines erfindungsgemäßen Phosphorsäureesterderivates eines gepfropften Polymeren für die Herstellung eines erfindungsgemäßen Sorbens für die Affinitätschromatographie und als Kationenaustauscher für die Flüssigkeitschromatographie.

15

In dem ersten Verfahrensschritt entsteht entweder durch Reaktion von Phosphorsäure oder deren Salzen mit Epoxidgruppen der in DE 43 10 964 beschriebenen aktivierten Trägermaterialien Phosphorsäuremonoesterderivate dieser Trägermaterialien. oder es werden die Epoxidgruppen mit Ammoniak zum Hydroxyaminderivat umgesetzt. Entsprechend dem Gehalt an Oxiranresten der aktivierten Trägermaterialien und durch Wahl der Reaktionsbedingungen (Menge an Phosphorsäure/Phosphat; Reaktionsdauer und -temperatur) läßt sich der Substitutionsgrad des Phosphorsäuremonoesterderivates des Trägermaterials einstellen. In ähnlicher Weise kann der Substitutionsgrad bei der Umsetzung mit Ammoniak variiert werden. Eventuell vorhandene Überschüsse an Oxirangruppen werden nach üblichen Methoden, z.B. durch Reaktion mit Mercaptoglycerin oder durch Behandlung mit verdünnter Schwefelsäure entfernt.

20
25
30

Die nach diesem Verfahren hergestellten Phosphorsäuremonoesterderivate des Trägermaterials können auch als Kationenaustauscher verwendet werden.

35

In der Biochemie werden unter dem Begriff Nukleoside N-Glycoside der Pyrimidinbasen Thymin, Uracil und Cytosin und der Purinbasen Guanin und Adenin mit Ribose oder 2-Desoxyribose verstanden. Nukleotide sind die Phosphorsäureester dieser Nukleoside. Nukleosiddiphosphate enthalten ein weiteren Phosphorsäurerest, der durch eine Pyrophosphatbindung an den ersten Phosphorsäurerest gebunden ist. Oligonukleotide enthalten mehrere Nukleotide, die gleich oder verschieden sein können, und die durch Phosphorsäurediesterbindungen verknüpft sind. Erfindungsgemäß werden unter den Begriffen Nukleosid, Nukleotid und Oligonukleotid außerdem Verbindungen verstanden, bei denen statt der genannten Basen andere Purin- oder Pyrimidinbasen, wie z.B. Hypoxanthin, 5-Methylcytosin oder N-2-Methylguanosin enthalten sind, oder die statt der Ribose oder 2-Desoxyribose einen anderen Zuckerrest oder einen Zuckeralkohol wie Ribit enthalten. Derartige analoge Verbindungen sind dem Fachmann bekannt. In ihrer Gesamtheit werden diese Verbindungen erfindungsgemäß unter dem Begriff nukleosidhaltige Verbindungen beziehungsweise Reste zusammengefaßt. Beispiele solcher nukleosidhaltigen Verbindungen sind Adenosin, AMP, ADP, ATP, cyclo-AMP, CDP, UDP, GDP, NAD(H), NADP(H), FMN oder FAD.

Esterbindungen entstehen aus einer Säure und einem Alkohol durch Wasserabspaltung; entsprechend entstehen Pyrophosphatbindungen aus zwei Phosphorsäureverbindungen. Zu den gebräuchlichen wasserabspaltenden Mitteln gehören beispielsweise die Carbodiimide, beispielsweise Dicyclohexylcarbodiimid. Bevorzugterweise wird 1,1'-Carbonyldiimidazol für diesen Zweck benutzt. Bei anderen Verfahren der Wasserabspaltung werden aktivierte Zwischenstufen, wie z.B. Säurehalogenide oder -anhydride, eingesetzt. Die Einzelheiten derartiger Verfahren und geeignete Verfahrensvarianten sind dem Fachmann beispielsweise aus gängigen Handbüchern bekannt. Für die Bildung von Pyrophosphatverbindungen zwischen dem Phosphorsäureesterderivat, das Monomereinheiten nach Formel III enthält, und den Nukleotiden wird die Methode nach Michelson (1964) Biochim. Biophys. Acta 91, 1 ff, bevorzugt. Bei diesem

Verfahren werden die Phosphorsäureester mit tertiären Aminen oder mit quaternären Ammoniumhydroxid in die entsprechenden primären Salze umgesetzt. Bevorzugt ist dabei die Verwendung von Tri-n-butylamin oder Methyltri-n-octylammoniumhydroxid.

5

Weitere Synthesen zur Herstellung von Nukleosidderivaten sind dem Fachmann bekannt; diese können in geeigneter Weise auf die Umsetzung mit den aus DE 43 10 964 bekannten aktivierten Trägermaterialien angewandt werden, wobei die Phosphorsäure- oder Aminoderivate dieser
10 Träger als bevorzugte Zwischenprodukte dienen. Zu derartigen Umsetzungen gehört die Alkylierung des Aminoderivates mit 6-Chlorpurinribosid, 2',3'-Isopropyliden-6-chlorpurinribosid oder 6-Chlor-AMP. Im letzteren Fall wird direkt das trägergebundene AMP-Derivat erhalten. Die ungeschützte Ribosidverbindung kann anschließend nach Yoshikawa,
15 M. Yoshikawa et al. Tetrahedron Lett. (1967) 1967, 5065; M. Yoshikawa und T. Kato (1967) Bull. Chem. Soc. Jpn. 40, 2849; K. Kusashio und M. Yoshikawa (1968) Bull. Chem. Soc. Jpn. 41, 142; M. Yoshikawa et al. (1969) Bull. Chem. Soc. Jpn. 42, 3505, phosphoryliert werden. Die Schutzgruppe des 2',3'-Isopropylidenderivates kann nach der 5'-Tosylierung
20 abgespalten werden. In allen Fällen können anschließend nach gängigen Methoden der Nukleosidchemie die weiteren Derivatisierungen ausgeführt werden. Dazu gehören die ATP-Synthese nach J. Ludwig (1981) Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 16, 131-133) oder auch die Bildung von Pyrophosphaten oder Triphosphat aus dem AMP-Derivat mittels
25 wasserabspaltender Mittel wie z.B. Dicyclohexylcarbodiimid oder Carbonyldiimidazol. Ebenso lassen sich cyclische Phosphatderivate wie cyclo-AMP-Derivate herstellen. Als Beispiel für weitere Literaturhinweise sei H. Guilford et al. (1972) Chemica Scripta 2, 165-170 genannt.

30 Auch ohne weitere Ausführungen wird davon ausgegangen, daß ein Fachmann die obige Beschreibung in weitesten Umfang nutzen kann. Die bevorzugten Ausführungsformen sind deswegen lediglich als beschreibende, keineswegs als in irgendeine Weise limitierende Offenbarung aufzufassen.

35

Die vollständige Offenbarung aller vor- und nachstehend aufgeführten Anmeldungen, Patente und Veröffentlichungen, sowie der korrespondierenden Anmeldung DE 43 33 674, eingereicht am 02.10.1993, sind durch Bezugnahme in diese Anmeldung eingeführt.

5

Die folgenden Beispiele sollen den Gegenstand näher erläutern; diese Beispiele stellen keine Einschränkung des Erfindungsgegenstandes dar.

10

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung eines oxiran-aktivierten Trägers ausgehend von Fractogel®-TSK HW 65 (S)

15

Zu einer Suspension aus 50 ml sedimentiertem Fractogel®-TSK HW 65 (S) und 25 ml Wasser werden mit 2 g Ammoniumcer(IV)nitrat (gelöst in 25 ml 2 M HNO₃) bei RT unter starkem Rühren vermischt. Nach 1 Minute erfolgt die Zugabe einer Lösung von 3 g (2,3-Epoxypropyl)-methacrylat in 30 ml Dioxan. Es wird 3 Stunden weitergerührt. Anschließend wird die Reaktionssuspension erst mit destilliertem Wasser und dann mit 0.05 M EDTA-Lösung gewaschen.

20

Beispiel 2: Synthese eines phosphatgruppenhaltigen Trägermaterials

25

5 g getrocknete Gel hergestellt nach Beispiel 1 werden in 20 ml Wasser suspendiert und mit 8 ml Phosphorsäure (85 %) versetzt. Die Suspension wird unter Schütteln 3 bis 4 Stunden bei Raumtemperatur weiter geschüttelt. Das Reaktionsprodukt wird mit einer Glasfritte (G3) abfiltriert und mit Wasser neutral gewaschen.

30

Anschließend wird das Reaktionsprodukt mit 1 ml Mercaptoglycerin in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 unter Schütteln behandelt (3 Tage, Raumtemperatur), damit nicht umgesetzte Oxirangruppen entfernt werden.

35

Das phosphatgruppenhaltige Trägermaterial wird nochmals gründlich mit Wasser gewaschen. Es enthält 30 µmol Phosphat/g Trägermaterial.

5 **Beispiel 3:** Synthese eines phosphatgruppenhaltigen Trägermaterials mit höherer Phosphatbelegung

10 5 g getrocknete Gel hergestellt nach Beispiel 1 werden wie in Beispiel 2 beschrieben umgesetzt, jedoch erfolgt die Reaktion mit der Phosphorsäure 15 Stunden. Das resultierende phosphatgruppenhaltige Trägermaterial enthält 40 µmol Phosphat/g Trägermaterial.

15 **Beispiel 4:** Synthese eines mit Cytidin-5'-diphosphat (CDP) derivatisierten Trägermaterials

Stufe 1: Tri-n-butylammoniumsalz des derivatisierten Trägermaterials

20 Das feuchte Reaktionsprodukt aus Beispiel 2 wird in 30 ml Wasser suspendiert, mit 0,5 ml Tri-n-butylamin versetzt und 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wird über eine Glasfritte (G2) filtriert und dreimal mit 50 ml Aceton gewaschen. Der feste Rückstand wird in einem 250-ml-Rundkolben bei 50 °C über Nacht unter Vakuum (5-7 Torr) getrocknet.

25 **Stufe 2:** Methyl-tri-octylammoniumsalz des CMP

30 4,2 g Methyl-tri-octylammoniumchlorid werden in 100 ml Methanol gelöst und über eine Säule (DOWEX® 1X2, 200-400 mesh; OH-Form) in die quaternäre Base überführt. Mit dieser Lösung wird eine Suspension aus 3,23 g CMP in 250 ml Methanol versetzt. Das entstandene Methyl-tri-octylammoniumsalz des CMP wird eingeeengt.

35

Stufe 3: Diphenylpyrophosphat-aktiviertes CMP

1 mMol des Methyl-tri-octylammoniumsalzes des CMP aus Stufe 2 werden in einer Mischung aus 7 ml Dioxan und 3 ml N,N-Dimethylformamid gelöst.
5 Unter Feuchtigkeitsausschluß werden zu der Lösung 0,3 ml Diphenylphosphorsäurechlorid und 0,45 ml Tri-n-butylamin zugegeben und 3 Stunden geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt und der Rückstand mit 30 ml Diethylether behandelt. Die Suspension wird 1 Stunde auf 0 °C gekühlt und die
10 Etherphase abdekantiert und verworfen. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und nochmals in 2 ml Dioxan gelöst und erneut im Vakuum getrocknet.

Stufe 4: Pyrophosphatderivat von CMP und derivatisiertem Trägermaterial
15

Das derivatisierte Trägermaterial aus Stufe 1 wird in 30 ml Pyridin suspendiert und mit einer Lösung von 0,5 mMol des Diphenylpyrophosphat-aktivierten CMP aus Stufe 3 in 10 ml Pyridin unter Feuchtigkeitsausschluß
20 versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Das Reaktionsprodukt wird mit einer Glasfritte (G2) abfiltriert und mit 250 ml Methanol, mit 100 ml gesättigter wäßriger Natriumhydrogencarbonatlösung und mit 1000 ml Wasser gewaschen.

25 Das resultierende Material enthält 25 µMol Cytidin / g Feuchtgewicht (gemessen durch UV-Absorption bei 267 nm nach Hydrolyse (1 N HCl; 2 Stunden bei 110 °C) und anschließender Neutralisation mit 1 N NaOH).

30 Beispiel 5: Synthese eines mit Guanosin-5'-diphosphat (GDP) derivatisierten Trägermaterials

Stufe 1: Tri-n-butylammoniumsalz des derivatisierten Trägermaterials

35 Die Durchführung dieser Stufe ist identisch mit der Stufe 1 aus Beispiel 4.

- 12 -

Stufe 2: Tri-n-butylammoniumsalz des GMP

5 3 g GMP (freie Säure) und 1,1 g Tri-n-butylamin werden in 250 ml Methanol erwärmt, bis die Lösung klar ist; anschließend wird die Lösung zur Trockene eingedunstet.

Stufe 3: Diphenylpyrophosphat-aktiviertes GMP

10 1 mMol des Tri-n-butylammoniumsalz des GMP aus Stufe 2 werden in einer Mischung aus 7 ml Dioxan und 3 ml N,N-Dimethylformamid gelöst. Unter Feuchtigkeitsausschluß werden zu der Lösung 0,3 ml Diphenylphosphorsäurechlorid und 0,45 ml Tri-n-butylamin zugegeben und 3 Stunden geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel in einem Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt und der Rückstand mit 30 ml Diethylether behandelt. Die Suspension wird 1 Stunde auf 0 °C gekühlt und die Etherphase abdekantiert und verworfen. Der Rückstand wird im Vakuum getrocknet und nochmals in 2 ml Dioxan gelöst und erneut im Vakuum getrocknet.

20 Stufe 4: Pyrophosphatderivat von GMP und derivatisiertem Trägermaterial

25 Das derivatisierte Trägermaterial aus Stufe 1 wird in 30 ml Pyridin suspendiert und mit einer Lösung von 0,5 mMol des Diphenylpyrophosphat-aktivierten GMP aus Stufe 3 in 10 ml Pyridin unter Feuchtigkeitsausschluß versetzt und bei Raumtemperatur über Nacht geschüttelt. Das Reaktionsprodukt wird mit einer Glasfritte (G2) abfiltriert und mit 250 ml Methanol, mit 100 ml gesättigter wäßriger Natriumhydrogencarbonatlösung und mit 1000 ml Wasser gewaschen.

30 Das resultierende Material enthält 30 µMol Guanosin / g Feuchtgewicht (gemessen durch UV-Absorption bei 270 nm nach Hydrolyse (1 N HCl; 2 Stunden bei 110 °C) und anschließender Neutralisation mit 1 N NaOH).

35

Beispiel 6: Synthese eines aminogruppenhaltigen Trägermaterials

- 5 35 g getrocknete Gel hergestellt nach Beispiel 1 werden in 200 ml konzentrierter wäßriger Ammoniaklösung 5 Tage bei Raumtemperatur geschüttelt. Dabei kann der Fortgang der Reaktion folgendermaßen überprüft werden: Eine trockene Probe des Reaktionsansatzes wird mit Pyridin aufgekocht. Solange noch Epoxidgruppen vorhanden sind, färbt sich der Träger braun bis gelb. Nach vollständiger Umsetzung bleibt der Träger farblos.
- 10 Anschließend wird das Reaktionsprodukt auf einer G3-Fritte abgesaugt und mit Methanol und Aceton gewaschen. Das Reaktionsprodukt wird im Vakuum (10 - 15 mbar) bei 60 - 70 °C getrocknet.
- 15 Das Reaktionsprodukt weist einen Stickstoffgehalt von 1,3 % auf. Beim Erwärmen mit einer ethanolischen Ninhydrinlösung färbt sich der Träger violett.

Beispiel 7: Synthese eines purinribosidhaltigen Trägermaterials

- 20 36 g des Aminoderivates hergestellt nach Beispiel 6 werden in 150 ml absolutem Ethanol suspendiert und mit 3,6 g 6-Chlor-purinribosid und 3,6 ml Triethylamin 15 Stunden unter Rückfluß erhitzt.
- 25 Anschließend wird das Reaktionsprodukt auf einer G3-Fritte abgesaugt und mit Methanol und Aceton gewaschen. Das Reaktionsprodukt wird in einen Rundkolben überführt und im Vakuum (10 - 15 mbar) bei 60 - 70 °C getrocknet.

Die Kopplungsrate beträgt ca. 97 %.

30

35

Beispiel 8: Synthese eines AMP-haltigen Trägermaterials
(Phosphorylierung nach Yoshikawa)

5 Das Produkt aus Beispiel 7 wird mit 125 ml wasserfreiem Triethylphosphat versetzt und unter Rühren bei 0 °C mit 1,8 ml frisch destilliertem Phosphoroxychlorid versetzt. Man rührt 3 Stunden bei 0 °C und anschließend eine Stunde bei 4 °C. Anschließend wird überschüssiges Phosphoroxychlorid im Vakuum (10 - 15 mbar) abdestilliert.

10 Zur Herstellung des AMP-Derivates wird die Reaktionssuspension anschließend langsam unter Rühren bei 10 °C in 500 ml einer wäßrigen Natriumhydrogencarbonatlösung (50 g/l) gegossen. Dabei fällt der pH-Wert von 7.8 auf 7.2. Nach 30 Minuten wird über eine G3-Fritte abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Aus dem Natriumsalz erhält man durch
15 Behandlung mit 0,1 N wäßriger HCl auf der Fritte die freie Säure (AMP-Derivat des Trägers), das auf der Fritte mit Wasser, Methanol und Aceton gewaschen und bei 70 °C im Vakuum (10 - 15 mbar) getrocknet wird.

20 **Beispiel 9:** Synthese eines cyclo-AMP-haltigen Trägermaterials

Das trockene Produkt aus Beispiel 8 wird in einer Apparatur mit Rührer und Rückflußkühler in 150 ml wasserfreiem Pyridin suspendiert und mit
25 5,4 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt. Es wird 4 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Produkt auf einer G3-Fritte abgesaugt und mit Dichlormethan, Methanol, heißem Methanol (zum Herauslösen des Dicyclohexylharnstoffs), Wasser, gesättigter wäßriger Natriumhydrogencarbonatlösung, 1 M wäßriger Kaliumdihydrogenphosphatlösung (pH 4), und Wasser gewaschen. Das feuchte Gel wird in 20%igem (v/v) wäßrigen
30 Ethanol unter Zusatz von 0,1 M NaCl gelagert.

Beispiel 10: Synthese eines ATP-haltigen Trägermaterials
(ATP-Synthese nach J. Ludwig (1981) Acta Biochim.
Biophys. Acad. Sci. Hung. 16, 131-133)

5 Das Produkt aus Beispiel 8 (Chlorderivat, d.h. vor der Hydrolyse) wird mit dem tri-n-Butylammoniumsalz der Pyrophosphorsäure umgesetzt.

10 Eine Mischung von 0,5 M bis-tri-n-Butylammoniumsalz der Pyrophosphorsäure in wasserfreiem DMF und tri-n-Butylamin wird unter Schütteln zugegeben. Nach 5 Min. kräftigem Schütteln wird die Suspension mit 1 M Triethylammoniumhydrogencarbonatpuffer (pH 7,5) hydrolysiert und nach 0,5 Std. über eine G3-Fritte abgesaugt und mit Wasser, ges. Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen.

15 Die Ausbeute an ATP liegt bei ~60 % (P-Analyse).

Anwendungsbeispiel A: Trennung von Sialyltransferase aus Rindercolostrum

20 Eine Superformance® Säule (I.D. 1,6 cm) wird mit 10 g CDP-haltigem Trägermaterial nach Beispiel 4 gefüllt und mit 10 mM MES-Puffer pH 6,8, der 25 % Glycerin enthält, equilibriert. Rindercolostrum vom 1. Tag nach der Geburt wird durch Zentrifugation entfettet und gegen denselben Puffer
25 ausgiebig dialysiert. Ca. 1 l dialysiertes Colostrum wird mit einem Fluß von 1 ml/min aufgetragen. Elution erfolgt mit einem Stufengradienten von 1,0 M NaCl.

30 Die Aktivität der Sialyltransferase wird durch Übertragung von CMP-[¹⁴C]-Sialinsäure auf Lactose bestimmt. Dazu werden 50 µl Enzymprobe mit 30 µl MES-Puffer (Endkonzentration: 50 mM MES, 10 mM MnCl₂, pH 6,8), 10 µl 0,8 M Lactose und 10 µl CMP-[¹⁴C]-Sialinsäure (0,05 µCi) für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz wird mit 1 ml eiskaltem 5 mM
35 Kaliumphosphat-Puffer pH 7,0 abgestoppt und über eine 1-ml-Säule mit

Dowex 1X8-200 chromatographiert. CMP-[¹⁴C]-Sialinsäure wird unter diesen Bedingungen auf der Säule retardiert, während das Produkt [¹⁴C]-Sial-Lactose in der nicht-bindenden Fraktion isoliert werden kann.

- 5 1 Unit Sialyltransferase-Aktivität wird definiert als Übertragung von 1 µmol [¹⁴C]-Sialinsäure / min. Es werden 0,2 U Sialyltransferase pro g Trägermaterial gebunden. Diese Bindungskapazität liegt um 50 % über der eines Vergleichsmaterials (CDP gekoppelt an BrCN-Sephrose). Die gebundene Aktivität konnte mit einer Ausbeute von 75 % mit 1,0 M NaCl eluiert
- 10 werden, während das Vergleichsmaterial nur eine Wiederfindungsrate von maximal 8 % aufwies (Elution mit 2,0 M NaCl).

- 15 **Anwendungsbeispiel B:** Trennung von 1-3/4-Fucosyltransferase aus Humanmilch

- 20 1000 ml Humanmilch werden durch Zentrifugation entfettet und ausgiebig bei 4 °C gegen 10 mM Na-Cacodylat, 10 mM MgCl₂, 20 % Glycerin pH 6,8 dialysiert. Die Vorreinigung der Transferase erfolgt nach einer beschriebenen Methode (Eppenberger-Castori et al., Glycoconjugate J., 6, p 101-114, 1990) durch Chromatographie an Fractogel® SO₃ (Fa. E. Merck).

- 25 Die Bestimmung der Fucosyltransferase-Aktivität wird analog zum Beispiel 6 mit GDP-[¹⁴C]-Fucose als Substrat durchgeführt.

- 30 Aktive Fraktionen aus der SO₃-Chromatographie werden durch Dialyse entsalzt und affinitätschromatographisch an GDP-Trägermaterial nach Beispiel 5 gereinigt. Dazu wird eine Superformance® Säule (I.D. 1,0 cm) mit 2 ml Trägermaterial gefüllt und mit 10 mM Na-Cacodylat, 10 mM MgCl₂, 20 % Glycerin pH 6,8 equilibriert (0,5 ml/min). Nach Probenauftrag wird ausgiebig mit Equilibrierungspuffer gewaschen und mit einem NaCl-Gradienten (0-1,5 M NaCl, 20 Säulenvolumina, 0,2 ml/min) eluiert.

- 17 -

Die Ausbeute beträgt ca. 83 % bei einer ungefähr 450fachen Anreicherung. Die Fucosyltransferase ist als dominante Bande in der SDS-Gel-elektrophorese zu sehen (MW 47 kD).

5

10

15

20

25

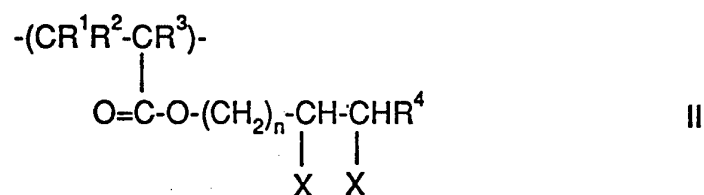
30

35

Patentansprüche

1. Trennmaterialien für die Affinitätschromatographie auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

- a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,
- b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,
- c) die linearen Polymeren Monomereinheiten der Formel II enthalten,



worin

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,

R⁴ H, C₁-C₅-Alkyl oder C₆-C₁₂-Aryl,

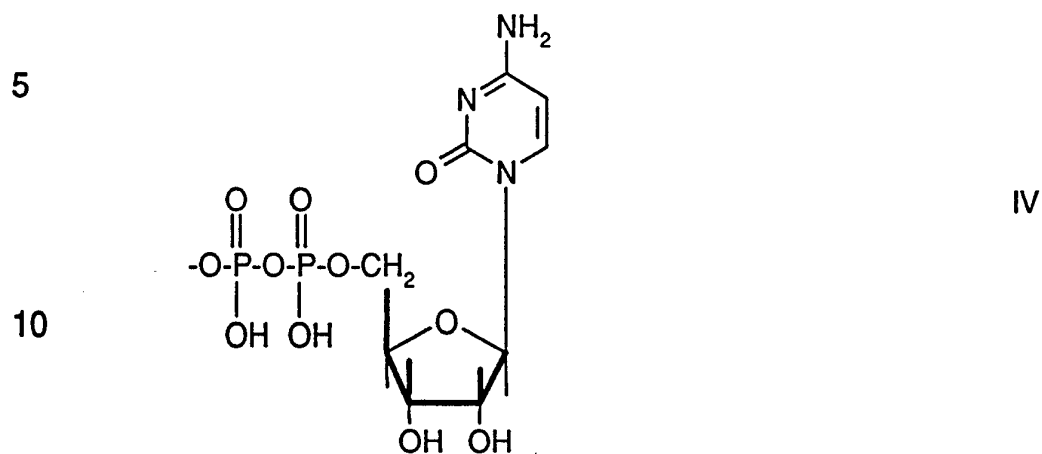
n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

und

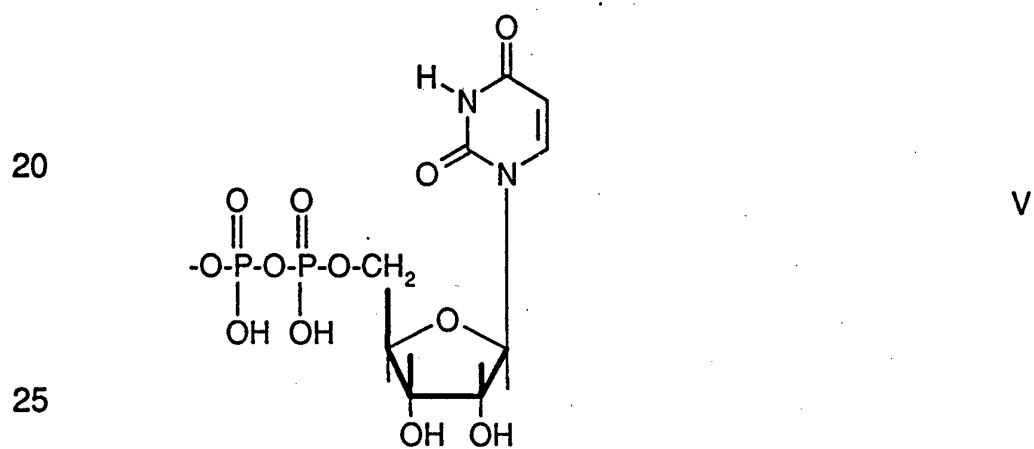
einer der Reste X OH und der andere Rest X einen nukleosidhaltigen Rest

bedeuten.

2. Trennmaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der nukleosidhaltige Rest X einen Rest nach Formel IV bedeutet.



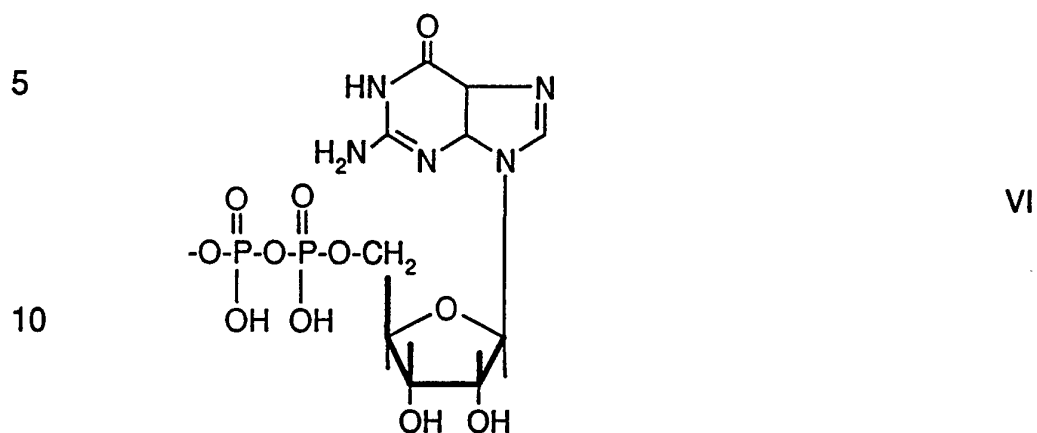
- 15
3. Trennmaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der nukleosidhaltige Rest X einen Rest nach Formel V bedeutet.



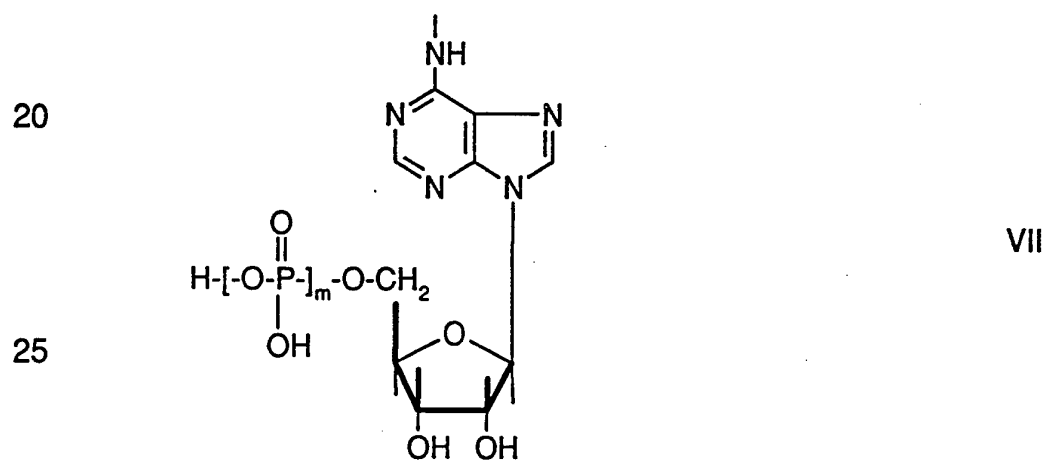
30

35

4. Trennmateriel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der nukleosidhaltige Rest X einen Rest nach Formel VI bedeutet.



- 15
5. Trennmateriel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der nukleosidhaltige Rest X einen Rest nach Formel VII bedeutet, worin m 1, 2 oder 3 bedeutet.

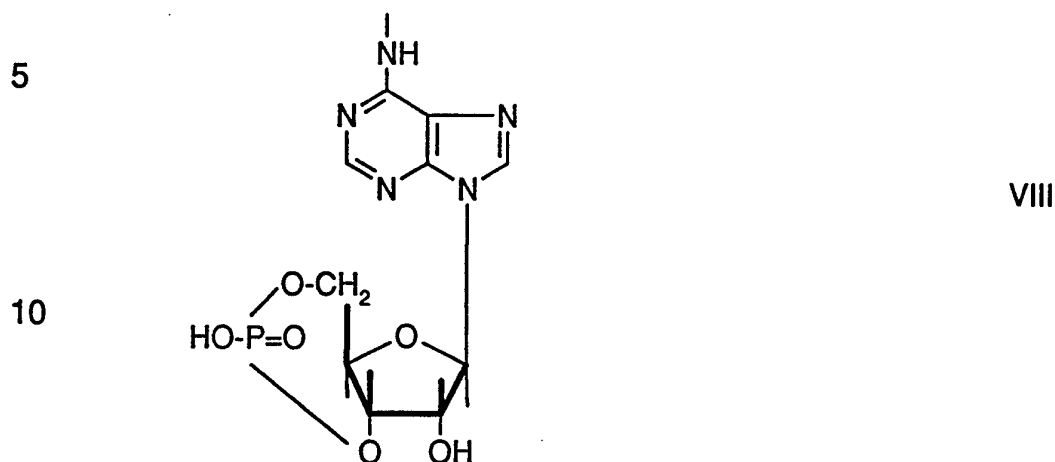


30

35

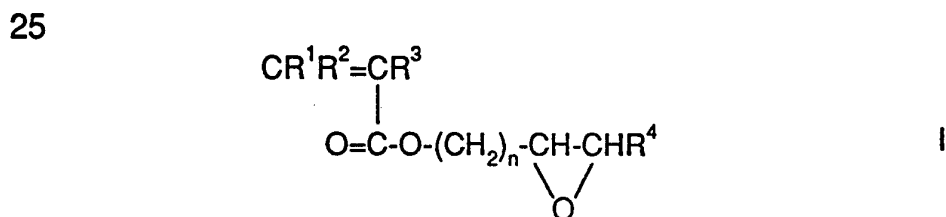
- 21 -

6. Trennmaterial nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der nukleosidhaltige Rest X einen Rest nach Formel VIII bedeutet.



- 15
7. Verwendung von Trennmaterialien mit den Merkmalen eines der Ansprüche 1 - 6 für die Affinitätschromatographie.
8. Verfahren zur Herstellung eines Sorbens mit den Merkmalen eines der Ansprüche 1 - 6, gekennzeichnet durch folgende Verfahrensschritte:
- 20

- a) Pffropfpolymerisation von Monomeren der Formel I auf einen hydroxylgruppenhaltigen Basisträger unter Beteiligung von Cer-(IV)-Ionen,



30

worin

R^1 , R^2 und R^3 unabhängig voneinander H oder CH_3 ,

35

R^4 H, C_1 - C_5 -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl

- 22 -

und

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

5 bedeuten.

b) Umsetzung des epoxidgruppenhaltigen Trägers aus Verfahrensschritt a) mit Phosphorsäure oder einem Alkalisalz der Phosphorsäure oder mit Ammoniak;

10

c) Einführung von nukleosidhaltigen Resten in das in Schritt b) erhaltene Produkt.

15

9. Phosphorsäureesterderivat eines gepfropften Polymeren auf der Grundlage von hydroxylgruppenhaltigen Basisträgern, auf deren Oberflächen Polymere kovalent gebunden sind, dadurch gekennzeichnet, daß

20

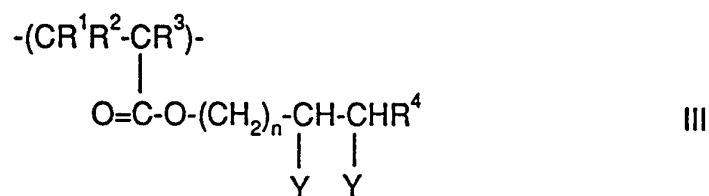
a) der Basisträger aliphatische Hydroxylgruppen enthält,

b) die kovalentgebundenen Polymeren über eine endständige Monomereinheit an den Basisträger gebunden sind,

25

c) die linearen Polymeren Monomereinheiten der Formel III enthalten,

30



worin

35

R¹, R² und R³ unabhängig voneinander H oder CH₃,

- 23 -

R^4 H, C_1 - C_5 -Alkyl oder C_6 - C_{12} -Aryl,

n eine ganze Zahl zwischen 1 und 5

5 und

einer der Reste Y OH und der andere Rest Y PO_4H_2 bedeuten.

10 10. Verwendung eines Phosphorsäureesterderivates nach Anspruch 9 für die Herstellung eines Sorbens nach einem der Ansprüche 2, 3 oder 4.

15 11. Verwendung eines Phosphorsäureesterderivates nach Anspruch 9 als Kationenaustauscher für die Flüssigkeitschromatographie.

20

25

30

35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/03157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 B01J20/32 G01N30/48 B01J39/12

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 6 B01J G01N C08F

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE,A,23 37 312 (BOEHRINGER MANNHEIM) 13 February 1975 see page 4, paragraph 5 - page 7, paragraph 2 see page 18; claims 1-4 ---	1-7
A	FR,A,2 440 956 (UNITAKA) 6 June 1980 see page 2, line 20 - page 4, line 4 ---	1,5
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 6, no. 159 (P-136) 20 August 1982 & JP,A,57 077 958 (MITSUBISHI) 15 May 1982 see abstract --- -/--	1,5



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

4 January 1995

Date of mailing of the international search report

16. 01 95

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

Wendling, J-P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Application No

PCT/EP 94/03157

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Week 9343, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-339774 & JP,A,5 247 123 (HITACHI) 24 September 1993 see abstract ---	9
A	EP,A,0 346 865 (DU PONT DE NEMOURS) 20 December 1989 see page 4, line 25-57 ---	1
A	EP,A,0 356 838 (AT BIOCHEM) 7 March 1990 ---	
A	WO,A,93 13220 (TEPNEL MEDICAL) 8 July 1993 see page 12, paragraph 2 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/03157

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A-2337312	13-02-75	GB-A- 1416419	03-12-75
		JP-C- 1144265	26-04-83
		JP-A- 50042085	16-04-75
		JP-B- 57021980	11-05-82
		NL-A- 7407474	27-01-75
		US-A- 3951744	20-04-76
FR-A-2440956	06-06-80	JP-C- 1508570	26-07-89
		JP-A- 55064599	15-05-80
		JP-B- 63050359	07-10-88
		DE-A, C 2945129	29-05-80
		GB-A, B 2036029	25-06-80
		SE-B- 445224	09-06-86
		SE-A- 7909236	09-05-80
		US-A- 4282352	04-08-81
EP-A-0346865	20-12-89	AU-A- 3653789	21-12-89
		JP-A- 2109979	23-04-90
EP-A-0356838	07-03-90	US-A- 5153166	06-10-92
		AU-A- 3942489	22-02-90
		JP-A- 3002560	08-01-91
WO-A-9313220	08-07-93	AU-B- 3169493	28-07-93
		CA-A- 2126748	25-06-93
		EP-A- 0620863	26-10-94
		FI-A- 943054	22-08-94
		NO-A- 942399	12-08-94

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 94/03157

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 B01J20/32 G01N30/48 B01J39/12

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 B01J G01N C08F

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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE,A,23 37 312 (BOEHRINGER MANNHEIM) 13. Februar 1975 siehe Seite 4, Absatz 5 - Seite 7, Absatz 2 siehe Seite 18; Ansprüche 1-4 ---	1-7
A	FR,A,2 440 956 (UNITAKA) 6. Juni 1980 siehe Seite 2, Zeile 20 - Seite 4, Zeile 4 ---	1,5
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 6, no. 159 (P-136) 20. August 1982 & JP,A,57 077 958 (MITSUBISHI) 15. Mai 1982 siehe Zusammenfassung --- -/--	1,5

☒ 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

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

4. Januar 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16. 01. 95

Name und Postanschrift der Internationale 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

Wendling, J-P

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter.ionales Aktenzeichen

PCT/EP 94/03157

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE WPI Week 9343, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-339774 & JP,A,5 247 123 (HITACHI) 24. September 1993 siehe Zusammenfassung ---	9
A	EP,A,0 346 865 (DU PONT DE NEMOURS) 20. Dezember 1989 siehe Seite 4, Zeile 25-57 ---	1
A	EP,A,0 356 838 (AT BIOCHEM) 7. März 1990 ---	
A	WO,A,93 13220 (TEPNEL MEDICAL) 8. Juli 1993 siehe Seite 12, Absatz 2 -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/03157

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung	
DE-A-2337312	13-02-75	GB-A-	1416419	03-12-75
		JP-C-	1144265	26-04-83
		JP-A-	50042085	16-04-75
		JP-B-	57021980	11-05-82
		NL-A-	7407474	27-01-75
		US-A-	3951744	20-04-76

FR-A-2440956	06-06-80	JP-C-	1508570	26-07-89
		JP-A-	55064599	15-05-80
		JP-B-	63050359	07-10-88
		DE-A, C	2945129	29-05-80
		GB-A, B	2036029	25-06-80
		SE-B-	445224	09-06-86
		SE-A-	7909236	09-05-80
		US-A-	4282352	04-08-81

EP-A-0346865	20-12-89	AU-A-	3653789	21-12-89
		JP-A-	2109979	23-04-90

EP-A-0356838	07-03-90	US-A-	5153166	06-10-92
		AU-A-	3942489	22-02-90
		JP-A-	3002560	08-01-91

WO-A-9313220	08-07-93	AU-B-	3169493	28-07-93
		CA-A-	2126748	25-06-93
		EP-A-	0620863	26-10-94
		FI-A-	943054	22-08-94
		NO-A-	942399	12-08-94
