

(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
9. Dezember 2004 (09.12.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/106931 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 33/546, (74) Anwalt: RUDOLPH, Ulrike; In der Schanz 10, 69198 Schriesheim (DE).
33/58, C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2004/001078 (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, 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, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
21. Mai 2004 (21.05.2004)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
103 23 901.4 26. Mai 2003 (26.05.2003) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSTITUT VIRIONSERION GMBH [DE/DE]; Friedrich-Bergius-Ring 19, 97076 Würzburg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HERMANN, Gerhard [DE/DE]; Judenbühlweg 22, 97082 Würzburg (DE). KÜHLMANN-RABENS, Ilona [DE/DE]; Waldmannshofen 62, 97993 Creglingen (DE). SCHOBEL, Uwe [DE/DE]; Elisabethenstrasse 12b, 35576 Wetzlar (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD AND TESTING SYSTEM FOR ANALYZING AND/OR DETECTING BIOMOLECULES AND/OR ACTIVE SUBSTANCES IN LIQUID SAMPLES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND TESTSYSTEM ZUR UNTERSUCHUNG UND/ODER ZUM NACHWEIS VON BIOMOLEKÜLEN UND/ODER WIRKSTOFFEN IN FLÜSSIGKEITSPROBEN

(57) Abstract: The method for analyzing and/or detecting the type and/or quantity of at least one sample substance is characterized by the following features: pre-dosed quantities of carrier particles are prepared, which are loaded with probe/detector molecules and dried, and which are different with regard to size and/or color (color type and/or color intensity). These carrier particles are either: (i) brought into contact with a liquid that contains the sample substance(s) to be analyzed or detected, whereby the sample substance(s) is/are marked with one and/or more defined marking quantities or they are; (ii) simultaneously or sequentially brought into contact with sample substance(s) and with marker/reporter substance(s) that are located in the same or different liquids. After one or more reaction times, the quantity and/or color of the carrier particle and at least one marking quantity of the sample substance(s) and/or marker/reporter substance(s) are analyzed, and the type and/or amount of sample substance(s) can be concluded based on this analysis. The testing system is characterized in that it comprises carrier particles, which are loaded with probe or detector molecules and which are different with regard to size and/or color.

(57) Zusammenfassung: Das Verfahren zur Untersuchung und/oder zum Nachweis der Art und/oder Menge wenigstens einer Probensubstanz ist durch folgende Merkmale gekennzeichnet: Vordosierte Mengen von hinsichtlich Größe und/oder Farbe (Farbenart und/oder Farbenintensität) verschiedenen, mit Sonden-/Detektormolekülen beladenen und getrockneten Trägerpartikeln werden bereitgestellt. Diese Trägerpartikel werden entweder (i) mit einer Flüssigkeit in Kontakt gebracht, die die zu untersuchende(n) bzw. nachzuweisende(n) Probensubstanz(en) enthält, wobei die Probensubstanz(en) mit einer und/oder mehreren definierten Markierungsgrößen markiert sind, oder sie werden (ii) mit Probensubstanz(en) und mit Marker-/Reportersubstanz(en), die sich in derselben oder in verschiedenen Flüssigkeiten befinden, gleichzeitig oder sequenziell in Kontakt gebracht. Nach einer oder mehreren Reaktionszeiten wird die Größe und/oder Farbe der Trägerpartikel und wenigstens eine Markierungsgröße der Probensubstanz(en) und/oder Marker-/Reportersubstanz(en) analysiert, woraus auf die Art und/oder Menge der Probensubstanz(en) geschlossen werden kann. Das Testsystem ist dadurch gekennzeichnet, daß es hinsichtlich Größe und/oder Farbe verschiedene Gruppen von mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladene Trägerpartikel umfaßt, die in getrockneter Form vordosiert vorliegen.

WO 2004/106931 A1



— 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.

Verfahren und Testsystem zur Untersuchung und/oder zum Nachweis von Biomolekülen und/oder Wirkstoffen in Flüssigkeitsproben

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Untersuchung und/oder zum Nachweis der Art und/oder Menge wenigstens einer zu untersuchenden Probensubstanz, bei dem (a) vordosierte Mengen Trägerpartikel bereit gestellt werden, die mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen sind, (b) diese beladenen Trägerpartikel in getrockneter Form vorliegen, (c) (i) die Trägerpartikel mit einer Flüssigkeit, die die zu untersuchende(n) bzw. nachzuweisende(n) Probensubstanz(en) enthält, in Kontakt gebracht werden, wobei die Probensubstanz(en) mit einer oder mehreren definierten Markierungsgrößen markiert ist/sind, oder (ii) die Trägerpartikel mit der/den Probensubstanz(en) und mit Marker- bzw. Reportersubstanz(en), die sich in derselben oder in verschiedenen Flüssigkeiten befinden, gleichzeitig oder sequentiell in Kontakt gebracht werden, und (d) nach einer oder mehreren Reaktionszeiten, während der die in Kontakt gebrachten Probensubstanz(en) und Sonden- bzw. Detektormoleküle und Marker- bzw. Reportersubstanz binden können, wenigstens eine (vorzugsweise jedoch zwei oder mehr) definierte Markierungsgröße analysiert wird, aus der auf die Menge der zu untersuchenden bzw. nachzuweisenden Probensubstanz(en) geschlossen werden kann.

In DE 33 22 373 C2 und EP 0 126 450 ist ein Verfahren beschrieben, welches die simultane Bestimmung von mehreren Antigenen und/oder Antikörpern aus einer Probe ermöglicht. Eine Mischung aus Partikeln, die mit unterschiedlichen Antikörpern und/oder Antigenen beschichtet sind, wird mit einer Flüssigkeit gemischt, die die zu untersuchenden bzw. nachzuweisenden Antigene bzw. Antikörper enthält. Nach einer definierten Reaktionszeit, in der die nachzuweisenden Antigene bzw. Antikörper von den an die Trägerpartikel beschichteten Antikörpern bzw. Antigenen gebunden werden, erfolgt die Identifizierung der gebundenen Antigene bzw. Antikörper durch Zugabe einer Flüssigkeit mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und/oder Antigenen, die mit den

- 2 -

nachzuweisenden bzw. zu untersuchenden Antigenen bzw. Antikörpern speziesspezifisch reagieren. Die Analyse der Markierungen der einzelnen Trägerpartikel erfolgt mit Hilfe von speziell für Partikelmessungen abgestimmten Durchflußzytometern. Aus dieser Analyse kann auf die Beschaffenheit bzw. auf das Vorhandensein von zu untersuchenden Antigenen bzw. Antikörpern rückgeschlossen werden. Durch geeignete Auswahl der Antikörper bzw. Antigene, mit denen die verwendeten Trägerpartikel beladen sind, können vorbestimmte gewünschte Eigenschaften der zu untersuchenden Flüssigkeit bzw. ihrer Inhaltsstoffe untersucht werden. Je nachdem, welche Antigene bzw. Antikörper in der zu untersuchenden Flüssigkeit nachgewiesen bzw. analysiert werden sollen, können Testpartikel, die mit entsprechend korrespondierenden Antikörpern bzw. Antigenen beladen sind, verwendet werden.

Im vorliegenden Text werden mit "Probensubstanz(en)" die zu untersuchenden bzw. nachzuweisenden Biomoleküle bzw. Wirkstoffe bezeichnet. Hierbei steht der Begriff "Biomoleküle" für alle Moleküle und Molekülfragmente, die natürlicherweise in der belebten und unbelebten Natur vorkommen und entweder durch Isolierungsverfahren oder identische Nachbildung bereit gestellt werden können, insbesondere Moleküle in bzw. aus pflanzlichen und tierischen Zellen, Organen und Organismen, in/aus Prokaryonten, in/aus Pilzen, in/aus Viren und Phagen, aber auch Moleküle wie Virionen, Prione und ähnliche oder Teile davon (z. B. Antigene, Antikörper, DNA, DNA-Fragmente, etc.).

Der Begriff "Wirkstoffe" steht hier für alle Moleküle, die von Menschenhand kreiert und synthetisiert wurden (z. B. synthetische Medikamente).

Mit "Sondenmolekülen bzw. Detektormolekülen" werden diejenigen Biomoleküle und/oder Wirkstoffe bezeichnet, mit denen die Trägerpartikel beladen bzw. beschichtet sind, d.h. die sich auf/an diesen Trägermolekülen befinden.

Mit "Marker- bzw. Reportersubstanz" werden diejenigen Biomoleküle und/oder Wirkstoffe bezeichnet, die eine bekannte, definierte Markierungsgröße aufweisen,

welche zur Analyse herangezogen d.h. ausgewertet wird. Als eine solche Marker- bzw. Reportersubstanz kommen insbesondere Biomoleküle oder Wirkstoffe in Betracht, die selbst Fluoreszenzaktivität, Phosphoreszenzaktivität, Biolumineszenzaktivität, Chemielumineszenz, Chromophorenaktivität, Radioaktivität oder Enzymaktivität aufweisen oder die mit Molekülen gekoppelt sind, die eine oder mehrere dieser Aktivitäten aufweisen.

Das im Stand der Technik bekannte Verfahren umfaßt die folgenden Schritte:

- Dispensierung der Mischung aus Partikeln, die mit zweiten Antikörpern/Antigenen als Sonden- bzw. Detektormoleküle beschichtet sind, in ein Reaktionsgefäß,
- Zugabe einer Flüssigkeit, die die zu untersuchenden bzw. nachzuweisenden ersten Antigene/Antikörper als Probensubstanz(en) enthält,
- Inkubation,
- Waschen der Trägerpartikel nach Ende der Reaktionszeit zum Entfernen der nicht gebundenen Substanzen und Moleküle,
- Zugabe einer Flüssigkeit mit fluoreszenzmarkierten dritten Antikörpern und/oder Antigenen als Marker- bzw. Reportersubstanz(en), die mit den nachzuweisenden oder zu untersuchenden ersten Antigenen/Antikörpern (d.h. der Probensubstanz(en)) spezie-spezifisch reagieren,
- Inkubation,
- Waschen zum Entfernen der nicht gebundenen Substanzen und Moleküle, und
- Analyse der Markierungen der einzelnen Trägerpartikel mit Hilfe von speziell für Trägerpartikel-Messungen abgestimmten Durchflußzytometern.

Zu Beginn des Analyseverfahrens ist eine Dispensierung der mit den gewünschten Biomolekülen/Wirkstoffen als Sonden- bzw. Detektormolekülen beschichteten Trägerpartikel bzw. -partikelmischung in ein Reaktionsgefäß vorzunehmen. Dieser Pipettierschritt beeinflusst die Qualität des Untersuchungsergebnisses ganz entscheidend, da hiermit die Konzentration der auf den Partikeln befindlichen

- 4 -

Sonden- bzw. Detektormolekülen in der Testlösung festgelegt wird. Die Konzentration der auf den Partikeln befindlichen Biomolekülen/Wirkstoffen in der Testlösung hat Einfluß auf die Testeinstellung und das Testniveau und damit auf die Bewertung des untersuchten Probenmaterials. Von der Testeinstellung abweichende Partikelzahlen haben auch Einfluß auf die Zählraten z. B. bei der Analyse in einem Durchflußzytometer.

Werden die zu dispensierenden Trägerpartikel z. B. in wäßrigen Pufferlösungen (z. B. PBS) geliefert, kommt es aufgrund der höheren Dichte der Trägerpartikel (z. B. 1,05 g/ml für Trägerpartikel aus Polystyrol) zu einem Sedimentationsprozeß. Vor der Weiterverwendung muß somit eine Homogenisierung der Suspension durchgeführt werden, wobei das Schäumen der Suspension und die Bildung von Luftblasen sorgfältig vermieden werden muß. Im darauffolgenden Prozeß muß darauf geachtet werden, daß eine erneute Sedimentation der Trägerpartikel vermieden wird.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, das bekannte Verfahren derart weiterzuentwickeln, daß die genannten Nachteile vermieden sind und daß eine vereinfachte Verfahrensführung bei gleichzeitig hoher Sensitivität und Spezifität möglich ist.

Diese Aufgabe wird gelöst mit einem Verfahren der eingangs genannten Art, das sich dadurch auszeichnet, daß die mit den Sonden- bzw. Detektormolekülen beladenen Trägerpartikel hinsichtlich Größe und/oder Farbe verschieden sind, und daß in Schritt (d) auch die Größe und/oder Farbe der Trägerpartikel analysiert wird.

"Hinsichtlich Farbe verschieden" bedeutet im vorliegenden Kontext, daß die Trägerpartikel sowohl mit verschiedenen Farbarten bzw. Farbstoffen (z.B. rot, grün, blau) als auch mit verschiedenen Farbintensitäten derselben Farbart/desselben Farbstoffs (z.B. in zehn Intensitätsstufen von hellrot bis dunkelrot) versehen (codiert) sind bzw. sein können. Bei der Analyse der Farbe wird folglich die Farbart und/oder die Farbintensität analysiert.

- 5 -

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden die mit den Sonden- bzw. Detektormolekülen beladenen bzw. beschichteten Trägerpartikel vordosiert in getrockneter Form bereitgestellt. Ein Labormitarbeiter kann so auf die vordosierte Menge der beschichteten Trägerpartikel zurückgreifen, ohne daß er zunächst in einem aufwendigen Pipettierschritt die Menge der Trägerpartikel genau festlegen müßte. Bei der Untersuchung bzw. dem Nachweis der Probensubstanz(en) ist dieser besonders kritische und fehlerintensive Schritt also nicht mehr notwendig und das Verfahren kann somit auch unter vereinfachten Bedingungen ohne große Expertise durchgeführt werden. Der Schritt der genauen Festlegung der Menge der Trägerpartikel wird im Vorhinein bei der Herstellung entsprechender Testsysteme vorgenommen.

Da die vordosierte Menge an Trägerpartikeln in getrockneter, vorzugsweise in gefriergetrockneter Form bereitgestellt wird, ist zudem eine verlängerte Haltbarkeit der Sonden- bzw. Detektormoleküle gegeben, mit denen die Trägerpartikel beschichtet sind.

Die Bereitstellung der Trägerpartikel in gefriergetrockneter Form ist besonders einfach zu bewerkstelligen und präzise.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann sowohl zur Untersuchung der Menge einer bestimmten vorhandenen Probensubstanz (d.h. Sorte von Biomolekülen bzw. Wirkstoffen) als auch zum Nachweis, ob überhaupt eine bestimmte Probensubstanz (d.h. entsprechende Biomoleküle oder Wirkstoffe) enthalten sind, verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsvariante werden hierfür Trägerpartikel eingesetzt, die nicht nur nach Farbe und/oder Größe verschieden sind, sondern die zudem mit unterschiedlichen Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen sind.

Die vordosierte Menge an Trägerpartikeln mit darauf befindlichen Sonden- bzw. Detektormolekülen kann insbesondere zu diesem Zweck aus mehreren Gruppen von Trägerpartikeln bestehen, wobei sich die einzelnen Gruppen erstens durch die Größe und/oder Färbung (Farbart und/oder Farbintensität) der dazugehörigen

- 6 -

Trägerpartikel und zweitens durch die Art der Sonden- bzw. Detektormolekülen auf den Trägerpartikeln voneinander unterscheiden. Mit anderen Worten: die Trägermoleküle jeder einzelnen Gruppe weisen die gleiche Größe und Farbart/Farbtintensität auf und sind mit den gleichen Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen, die Trägermoleküle zweier Gruppen unterscheiden sich in ihrer Größe und/oder ihrer Farbart und/oder Farbtintensität und sie sind mit unterschiedlichen Sonden- bzw. Detektormoleküle beladen.

Mit dieser Ausführungsvariante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist ein Nachweis bzw. eine Untersuchung unterschiedlicher Probensubstanzen in derselben Testflüssigkeit in einem einzigen Untersuchungsdurchgang auf einfachste Art und Weise durchführbar.

Es können hierbei Sonden- bzw. Detektormoleküle eingesetzt werden, die zu der/den Probensubstanzen und/oder zu der/den Marker- bzw. Reportersubstanz(en) komplementär sind. Als komplementär werden dabei derartige Sonden- bzw. Detektormoleküle (d.h. Biomoleküle oder Wirkstoffe) bezeichnet, die über eine Affinitäts- bzw. Hybridisierungsreaktion und/oder kovalente Reaktion weitere Probensubstanz(en) (Biomoleküle und/oder Wirkstoffe) binden.

Um zu prüfen, ob in einer Flüssigkeitsprobe eine bestimmte Sorte Probenmoleküle (d.h. Biomoleküle bzw. Wirkstoff) überhaupt enthalten ist, werden vorzugsweise Trägerpartikel mit Sonden- bzw. Detektormolekülen eingesetzt, die mit den gegebenenfalls nachzuweisenden Probensubstanzen reagieren (würden).

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch unter Ausnutzung einer kompetitiven Reaktion durchgeführt werden. Hierbei sind die Probensubstanz(en) und die Sonden- bzw. Detektormolekülen sehr ähnlich oder sogar gleich und die Marker- bzw. Reportersubstanzen sind komplementär zu den Probensubstanzen und/oder den Sonden- bzw. Detektormolekülen. Bei der kompetitiven Reaktion konkurrieren die Probensubstanz(en) mit den Sonden- bzw. Detektormoleküle um die Bindung zu der markierten komplementären Marker- bzw. Reportersubstanz. Ist kein

- 7 -

Probensubstanzteilchen in der Flüssigkeit enthalten, binden alle Marker- bzw. Reportersubstanzteilchen an die Sonden-/Detektormoleküle und damit an die Trägerpartikel und werden detektiert. Sind andererseits viele Probensubstanzteilchen vorhanden, binden alle Marker- bzw. Reportersubstanzteilchen an die Probensubstanzteilchen und nicht an die Sonden-/Detektormoleküle und somit nicht an die Trägerpartikel und werden infolgedessen nicht detektiert.

Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die vordosierten und getrockneten bzw. gefriergetrockneten Trägerpartikel als Presslinge bereitgestellt. Mit anderen Worten: es werden Presslinge verwendet, die die getrockneten bzw. gefriergetrockneten Trägerpartikel in vordosierter Form enthalten. Diese Presslinge sind leicht zu handhaben und können in beliebigen Reaktionsgefäßen eingesetzt werden.

Eine Weiterbildung dieser Verfahrensvariante sieht vor, daß verschiedene Gruppen von Presslingen verwendet werden, die sich durch die unterschiedliche Beladung der darin enthaltenen Trägerpartikel mit Sonden- bzw. Detektormolekülen unterscheiden, wobei die Trägerpartikel jedes einzelnen Presslings mit den gleichen Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen sind.

Beispielsweise kann für einen infektionsserologischen Test während der Schwangerschaft (sog. Schwangerschaftspanel") ein einziger Pressling bereitgestellt werden, der verschieden große und/oder verschieden farbige Trägerpartikel enthält, die mit Sonden- bzw. Detektormolekülen für die Antigene und/oder Antikörper von Röteln, Toxoplasmose, CMV, HSV, VZV, Parvovirus u.ä. beladen sind, wobei jede Trägerpartikelspezies mit einer bestimmten Sonden- bzw. Detektormolekülspezies beladen ist.

Gleichermaßen gut kann beispielsweise für einen infektionsserologischen Test zur Impfkontrolle ein Set von mehreren Presslingen bereitgestellt werden wobei jeder Pressling nur eine einzige, bestimmte Gruppe von Trägerpartikeln beladen mit einer bestimmten Art Sonden- bzw. Detektormolekül z.B: für die Antigen und/oder

Antikörper von Tetanus, Diphtherie, Pertussis u.ä enthält. Diese einzelnen Presslinge können dann individuell je nach Fragestellung zusammengemischt werden.

Die vordosierten, getrockneten bzw. gefriergetrockneten Trägerpartikel können ebensogut unverpresst in Reaktionsgefäßen wie z.B. Mikro-Titerplatten oder Röhrchen bereitgestellt werden, und diese Reaktionsgefäße können dann ohne weitere zusätzliche Maßnahmen direkt zur Analyse der zu untersuchenden Flüssigkeit eingesetzt werden. Der Laborant muß nur noch die zu untersuchende Flüssigkeit in dieses Reaktionsgefäß einfüllen, um sie mit der vordosierten und damit bekannten Menge an gefriergetrockneten Trägerpartikeln in Kontakt zu bringen, ein Umfüllprozeß oder eine Mengenbestimmung ist nicht mehr notwendig.

Als definierte Markierungsgröße für die Probensubstanz(en) in der Flüssigkeit wird ein Fluoreszenzfarbstoff vorgeschlagen, so daß in Schritt d) des erfindungsgemäßen Verfahrens infolgedessen die Fluoreszenz ausgewertet wird.

Besonders vorteilhaft läßt sich das erfindungsgemäße Verfahren dadurch vereinfachen, daß die vordosierten, mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladenen Trägerpartikel zusammen mit einer vordosierten Menge an Marker- bzw. Reportersubstanz(en) in getrockneter bzw. gefriergetrockneter Form bereitgestellt werden. Die Marker- bzw. Reportersubstanz(en) weist/weisen hierbei die Eigenschaft auf, mit der zu untersuchenden bzw. nachzuweisenden Probensubstanz(en) spezies-spezifisch zu reagieren. Sie kann/können aus einer oder mehreren Komponenten bestehen, und sie kann/können eine oder mehrere zu den Sonden- bzw. Detektormolekülen und/oder Probensubstanz(en) komplementäre Strukturen aufweisen.

Bei einem solchen Verfahren, in der markierte Marker- bzw. Reportersubstanz(en) bereits mit den vordosierten Trägerpartikeln bereitgestellt werden, ist eine weitere Verringerung der Fehlerquote durch Einsparung eines weiteren Dispensierschrittes gewährleistet. Zusätzlich wird das Prozedere durch Reduktion der Anzahl der Verfahrensschritte weiter vereinfacht, denn im Gegensatz zu den oben

geschilderten Verfahrensschritten des Standes der Technik sind bei dieser Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens nur noch die Zugabe einer Flüssigkeit, die ggf. die zu untersuchenden bzw. nachzuweisenden Probensubstanz(en) enthält, und die Analyse der Markierungen der einzelnen Trägerpartikel z. B. mit Hilfe von speziell für Partikelmessungen abgestimmten Durchflußzytometern notwendig.

Gegenstand vorliegender Erfindung ist auch ein Testsystem (Kit) zur Verwendung in dem erfindungsgemäßen Untersuchungs- und/oder Nachweisverfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es hinsichtlich Größe und/oder Farbe (Farbart und/oder Farbintensität) verschiedene Gruppen von mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladene Trägerpartikel umfaßt, die in getrockneter Form vordosiert vorliegen.

Die Kodierung der Trägerpartikel hinsichtlich der Farbe geschieht vorzugsweise in bekannter Weise durch Einbringen von einem oder mehreren Fluorophoren eventuell in unterschiedlichen Konzentrationen in die Trägerpartikel oder durch Anhängen von einem oder mehreren, gleichartige oder verschiedenartigen fluoreszierenden(n) Nanopartikel an die Oberfläche der Trägerpartikel.

Dieses erfindungsgemäße Testsystem (Kit) kann von einem Laboranten ohne Pipettier- oder Dispensierschritt direkt verwendet werden, so daß in beschriebener Weise eine wesentliche Fehlerquelle reduziert ist. Solche Testsysteme (Kits) können in großen Mengen im Vorhinein hergestellt und als solche z. B. vertrieben werden.

Vorzugsweise liegen die Trägerpartikel in dem Testsystem (Kit) in gefriergetrockneter Form vor.

Das Testsystem kann hinsichtlich Größe und/oder Farbe verschiedene Gruppen von Trägerpartikeln umfassen, wobei die Trägerpartikel einer jeden Gruppe mit gleichartigen Sonden- bzw. Detektormoleküle beladen sind und die Trägerpartikel verschiedener Gruppen unterschiedliche Sonden- bzw. Detektormoleküle tragen.

Die getrockneten bzw. gefriergetrockneten Trägerpartikeln liegen in dem Testsystem vorzugsweise entweder vordosiert in Form von einem oder mehreren Pressling(en) oder unverpresst vordosiert in einem Reaktionsgefäß vor.

Bei einer Ausführungsvariante des erfindungsgemäßen Testsystems ist vorgesehen, daß es zusätzlich wenigstens eine Marker- bzw. Reportersubstanz umfaßt, die mit zu untersuchenden Probensubstanz(en) spezies-spezifisch reagieren kann. Diese Marker- bzw. Reportersubstanz kann insbesondere eine Fluoreszenzaktivität, Phosphoreszenzaktivität, Biolumineszenzaktivität, Chemielumineszenzaktivität, Chromophorenaktivität, Radioaktivität oder Enzymaktivität aufweisen.

Die Marker- bzw. Reportersubstanz(en) ist/sind vorzugsweise entweder in den Presslingen oder in den mit den Trägerpartikel befüllten Reaktionsgefäßen mit enthalten und kann/können aus einer oder mehreren Komponenten bestehen.

Für diese besonderen Ausführungsformen des Testsystems (Kits) bestehen die oben bereits für das erfindungsgemäße Verfahren beschriebenen Vorteile in analoger Weise.

Alle erfindungsgemäßen Testsysteme (Kits) werden vorzugsweise an zentraler Stelle hergestellt und von dort vertrieben, so daß sie nach Erwerb im Labor ohne zusätzlichen Dispensier- oder Pipettierschritt direkt für die gewünschten Untersuchungen eingesetzt werden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren und das erfindungsgemäße Testsystem wird im folgenden anhand von Figuren und Ausführungsbeispielen näher erläutert. Dabei versteht sich von selbst, daß die in den Beispielen beschriebene Vorgehensweise bei der betreffenden Untersuchung dem Prinzip nach auch für jede andere Untersuchung einer Flüssigkeitsprobe hinsichtlich darin befindlicher Probensubstanz(en) gilt.

Figur 1 zeigt beispielhaft (denkbar sind natürlich auch andere Temperatur und Druckprofile) den Temperatur- bzw. Druckverlauf bei der Gefriertrocknung bei der Durchführung eines erfindungsgemäßen Herstellungsverfahrens für die erfindungsgemäßen Testsysteme (Kits).

Beispiel 1: Infektionsserologische Untersuchung bei Schwangeren - Variante 1

Um Informationen über das Vorhandensein und/oder die Beschaffenheit bestimmter Probensubstanz(en), beispielsweise Antigene und/oder Antikörper von Röteln, Toxoplasmose, CMV, HSV, VZV, Parvovirus in der Serumprobe einer schwangeren Frau, zu erhalten, werden unterschiedlich große Trägerpartikel mit unterschiedlichen Sonden- bzw. Detektormoleküle, nämlich Sonden- bzw. Detektormoleküle für diese und eventuell weitere Antigene und/oder Antikörper, beladen, vordosiert, gefriergetrocknet und - entweder unverpresst in einem Reaktionsgefäß oder zu einem Pressling verpresst - bereitgestellt.

Zur Analyse dieser Serumprobe greift ein Labormitarbeiter auf ein solches Reaktionsgefäß oder einen solchen Pressling mit einer vordosierten Menge an Trägerpartikeln zurück. Er weiß, wieviele Trägerpartikel und damit Sonden- bzw. Detektormoleküle er einsetzt, und für welche der zu untersuchenden bzw. möglicherweise nachzuweisenden Probensubstanz(en) die Sonden- bzw. Detektormoleküle spezifisch sind. Der Labormitarbeiter bringt den Pressling oder die unverpresste Menge Trägerpartikel in dem Reaktionsgefäß mit der zu untersuchenden Flüssigkeit, die die Probensubstanz(en) enthält, nämlich mit der Serumprobe, in einem bzw. dem Reaktionsgefäß in Kontakt. Gleichzeitig oder sequentiell fügt er eine bestimmte Menge Marker- bzw. Reportersubstanz(en) hinzu.

Dieser Schritt erübrigt sich, falls die Marker- bzw. Reportersubstanz(en) bereits zusammen mit den mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladenen Trägerpartikeln getrocknet, vordosiert und entweder zu einem Pressling verpresst oder unverpresst in ein Reaktionsgefäß abgefüllt vorliegen.

- 12 -

Nach Ablauf der Reaktionszeit sind an die Trägerpartikel unterschiedliche Probensubstanz(en) und gleichartige Marker- bzw. Reportersubstanz gebunden. Durch Analyse der Größe der Trägerpartikel - z.B. in einem für Partikelmessungen abgestimmten Durchflußzytometer - kann auf die Art und durch Analyse der definierten Markierungsgröße(n) der Probensubstanz(en) und/oder Marker- bzw. Reportersubstanz(en) kann auf die Menge Probensubstanz(en) in der zu untersuchenden Flüssigkeit zurückgeschlossen werden.

Zur Entfernung ungebundener Substanzen können am Ende der jeweiligen Reaktionszeiten an sich bekannte Waschschriffe durchgeführt werden.

Beispiel 2: Infektionsserologische Untersuchung bei Schwangeren - Variante 2

Wie Beispiel 1, jedoch werden anstelle der verschieden großen Trägerpartikel verschieden farbige, nämlich hinsichtlich Farbeart und/oder Farbintensität verschiedene Trägerpartikel eingesetzt und mit den unterschiedlichen Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen.

Durch Analyse der unterschiedlichen Farbe bzw. Farbintensität sind die verschiedenen Trägerpartikel und damit die Art (Sorte) der an sie gebundenen Sonden- bzw. Detektormoleküle und die Art (Sorte) der damit detektierten Probensubstanzen(en) nachweisbar, und durch Analyse der definierten Markierungsgröße(n) der Probensubstanz(en) und/oder der Marker- bzw. Reportersubstanz(en) können Rückschlüsse auf die Menge der Probensubstanz(en) in der zu untersuchenden Flüssigkeit gezogen werden

Beispiel 3: Infektionsserologische Untersuchung bei Schwangeren - Variante 3

Wie Beispiel 2, jedoch werden Trägerpartikel eingesetzt, die verschiedene groß und verschieden farbig sind, wobei die Verschiedenfarbigkeit in einer unterschiedlichen Farbeart oder einer unterschiedlichen Farbintensität (bei gleiche Farbeart) bestehen

kann. Trägerpartikel der gleichen Größe und Farbart oder Farbintensität, d.h. der gleiche Codierung, sind mit Sonden- bzw. Detektormolekülen der gleichen Art (Sorte) beladen, Trägerpartikel mit anderer Größe und/oder Farbart und/oder Farbintensität, d.h. mit anderer Codierung, sind mit einer anderen Art (Sorte) von Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen.

Durch Analyse der unterschiedlichen Größe und/oder Farbart und/oder Farbintensität sind die verschiedenen Trägerpartikel und damit die Art der an sie gebundenen Sonden- bzw. Detektormoleküle und die Art der damit detektierten Probensubstanzen(en) nachweisbar, und durch Analyse der definierten Markierungsgröße(n) der Probensubstanz(en) und/oder der Marker- bzw. Reportersubstanz(en) können Rückschlüsse auf die Menge der Probensubstanz(en) in der zu untersuchenden Flüssigkeit gezogen werden

Beispiel 4: Nachweis von Probensubstanz(en) ohne Verwednung von Marker- bzw. Reportersubstanz(en)

Zum Nachweis von Nukleinsäuresequenzen (z. B. DNA) können bereits die Probensubstanz(en), z.B. eine bestimmte DNA, fluoreszenzmarkiert sein. Für einen solchen Test wird die nachzuweisende DNA zunächst amplifiziert. Dieser Schritt kann mit bereits fluoreszenzmarkierten Primern erfolgen, so daß die Amplifikate der nachzuweisenden DNA (also der Probensubstanz) bereits einen Fluorophor enthalten.

An die hinsichtlich Größe und Farbe (FARBART und/oder Farbintensität) codierten Trägerpartikel sind Sonden- bzw. Detektormoleküle, z.B. in Gestalt einer zweiten (komplementären) DNA gekoppelt. Die fluoreszenzmarkierten Amplifikate der nachzuweisenden DNA (Probensubstanz(en)) binden direkt an die (zweite) Sonden- bzw. Detektor-DNA an/auf den Trägerpartikeln.

Der Einsatz von Marker- bzw. Reportersubstanz(en) ist nicht erforderlich. Zur Durchführung dieses Verfahrens wird deshalb ein Testsystem gemäß Beispiel 5 vorgeschlagen.

Andererseits besteht auch die Möglichkeit, markierte und nicht markierte dritte DNA-Moleküle als Marker- bzw. Reportersubstanzen einzusetzen, die als Brücke

zwischen der Proben-DNA und der Sonden- bzw. Detektor-DNA fungieren. Zur Durchführung dieser Verfahrensvariante eignet sich ein Testsystem gemäß Beispiel 6, nämlich ein Testsystem, das mit Sonden- bzw. Detektor-DNA beladene Trägerpartikel und markierte oder nicht markierte Marker- bzw. Reporter-DNA in getrockneter, vordosierter Form umfaßt.

Beispiel 5: Herstellung und Zusammensetzung eines erfindungsgemäßen Testsystems (Kits) - Variante 1

Eine oder mehrere Sorten Trägerpartikel (.d.h Trägerpartikel mit derselben oder mit verschiedenen Codierungen) werden in definierten Mengen und unter genau überwachten Bedingungen in Reaktionsgefäße dispensiert, wobei vorzugsweise ein spezielles Puffer-Stabilisator-System (z.B. 50 mM Phosphatpuffer, 150 mM Natriumchlorid, 0,02 % Natriumazid, 8 g/L Gelatine Hydrolysat, pH 7,4, zusätzlich Gerüstbildner und Hilfsstoffe wie z.B. Saccharose, Phenylalanin) verwendet wird. Falls erforderlich werden die Trägerpartikel mittels Ultraschall und/oder mechanischem Rühren homogenisiert. Anschließend werden diese vordosierten Trägerpartikel mittels Gefriertrocknung oder anderer Trocknungsverfahren getrocknet und damit haltbar und einfacher handhabbar gemacht. Hierbei wird vorzugsweise ein Temperatur- und Druckprofil eingesetzt, wie es der Figur 1 zu entnehmen ist. Je nachdem, für welche Analysen das Testsystem eingesetzt werden soll, werden entweder (a) Trägerpartikel derselben Codierung und beladen mit nur einer Art (Sorte) Sonden- bzw. Detektormoleküle, oder (b) Trägerpartikel derselben Codierung aber beladen mit verschiedenartigen (verschiednen Sorten) Sonden- bzw. Detektormolekülen oder (c) Trägerpartikel verschiedener Codierung und pro Codierung beladen mit nur einer Art (Sorte) Sonden- bzw. Detektormolekülen verwendet.

Nach der Trocknung/Gefriertrocknung können diese mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladenen Trägerpartikel zu Presslingen geformt werden, wobei diese Presslinge jeweils eine vorbestimmte Menge Trägerpartikel enthalten.

- 15 -

Im Falle von Presslingen, die nur eine Sorte von Trägerpartikeln mit bestimmter Größe und bestimmter Farbart und/oder Farbintensität, d.h. die nur Trägerpartikel derselben Codierung enthalten, und wobei diese Trägerpartikel mit nur einer Art (Sorte) komplementärer Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen sind, kann die Mischung der Trägerpartikel durch Kombination entsprechender Presslinge in einem Reaktionsgefäß individuell hergestellt werden.

Beispiel 6: Herstellung und Zusammensetzung eines erfindungsgemäßen Testsystems (Kits) - Variante 2

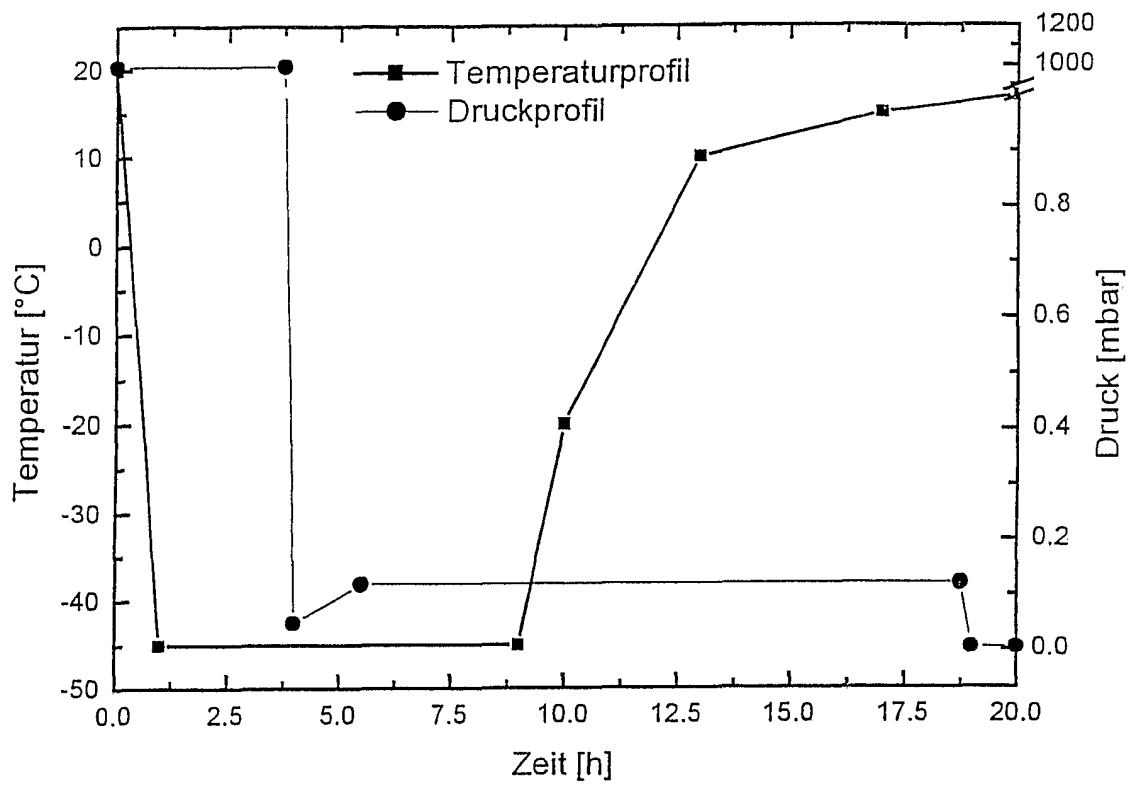
Wie Beispiel 5, jedoch werden die mit den Sonden- bzw. Detektormolekülen beladenen Trägerpartikeln zusammen mit einer definierten Menge Marker- bzw. Reportersubstanz(en) unter Verwendung eines speziellen Puffer-Stabilisator-Systems unter genau überwachten Bedingungen in die Reaktionsgefäße dispensiert, mittels Gefriertrocknung oder anderer Trocknungsverfahren getrocknet und schließlich zu Presslingen verpresst oder unverpresst in Reaktionsgefäße abgefüllt bereitgestellt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung und/oder zum Nachweis der Art und/oder Menge wenigstens einer Probensubstanz, bei dem
 - a) vordosierte Mengen Trägerpartikel bereitgestellt werden, die mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen sind,
 - b) diese beladenen Trägerpartikel in getrockneter Form und vorliegen,
 - c) (i) die Trägerpartikel mit einer Flüssigkeit, die die zu untersuchende(n) bzw. nachzuweisende(n) Probensubstanz(en) enthält, in Kontakt gebracht werden, wobei die Probensubstanz(en) mit einer und/oder mehreren definierten Markierungsgrößen markiert sind, oder
(ii) die Trägerpartikel mit Probensubstanz(en) und mit Marker- bzw. Reportersubstanz(en), die sich in derselben oder in verschiedenen Flüssigkeiten befinden, gleichzeitig oder sequenziell in Kontakt gebracht werden, und
 - d) nach einer oder mehreren Reaktionszeiten, während der die miteinander in Kontakt gebrachten Probensubstanz(en) und Sonden- bzw. Detektormoleküle und Marker- bzw. Reportersubstanz(en) binden können, wenigstens eine Markierungsgröße analysiert wird, aus der auf die Art und/oder Menge der Probensubstanz(en) geschlossen werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß die mit den Sonden- bzw. Detektormolekülen beladenen Trägerpartikel hinsichtlich Größe und/oder Farbe (Farbenart und/oder Farbenintensität) verschieden sind, und daß in Schritt (d) auch die Größe und/oder Farbe der Trägerpartikel analysiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerpartikel gefriergetrocknet sind.
3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die nach Farbe und/oder Größe verschiedenen Trägerpartikel mit unterschiedlichen Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen sind.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die getrockneten bzw. gefriergetrockneten Trägerpartikel als Presslinge bereitgestellt werden.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 3 und 4, bei dem verschiedene Gruppen von Presslingen verwendet werden, die sich durch die unterschiedliche Beladung der darin enthaltenen Trägerpartikel mit Sonden- bzw. Detektormolekülen unterscheiden, wobei die Trägerpartikel jedes einzelnen Presslings mit den gleichen Sonden- bzw. Detektormolekülen beladen sind.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die getrockneten bzw. gefriergetrockneten Trägerpartikel in Reaktionsgefäßen vordosiert bereitgestellt werden.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die definierte Markierungsgröße der Probensubstanz(en) ein Fluoreszenzfarbstoff ist und in Schritt d) die Fluoreszenz ausgewertet wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Marker- bzw. Reportersubstanz Fluoreszenzaktivität, Phosphoreszenzaktivität, Biolumineszenzaktivität, Chemielumineszenz, Chromophorenaktivität, Radioaktivität oder Enzymaktivität aufweist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die vordosierten, mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladenen Trägerpartikel zusammen mit einer vordosierten Menge an Marker- bzw. Reportersubstanz(en), die dazu geeignet ist/sind, mit der zu untersuchenden bzw. nachzuweisenden Probensubstanz(en) spezies-spezifisch zu reagieren, in getrockneter bzw. gefriergetrockneter Form bereitgestellt werden
10. Testsystem zur Verwendung in einem Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es hinsichtlich Größe und/oder Farbe verschiedene Gruppen von mit Sonden- bzw. Detektormolekülen beladene Trägerpartikel umfaßt, die in getrockneter Form vordosiert vorliegen.

11. Testsystem nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerpartikel derselben Gruppe mit gleichartigen Sonden- bzw. Detektormoleküle beladen sind und die Trägerpartikel verschiedener Gruppen unterschiedliche Sonden- bzw. Detektormoleküle tragen.
12. Testsystem nach einem der Ansprüche 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Trägerpartikel gefriergetrocknet vorliegen.
13. Testsystem nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die getrockneten Trägerpartikeln vordosiert in Form von einem oder mehreren Pressling(en) vorliegen.
14. Testsystem nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die getrockneten Trägerpartikeln vordosiert in einem Reaktionsgefäß vorliegen.
15. Testsystem nach einem der Ansprüche 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es zusätzlich wenigstens eine Marker- bzw. Reportersubstanz umfaßt.
16. Testsystem nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Marker- bzw. Reportersubstanz Fluoreszenzaktivität, Phosphoreszenzaktivität, Biolumineszenzaktivität, Chemielumineszenz, Chromophorenaktivität, Radioaktivität oder Enzymaktivität aufweist.



Figur 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2004/001078

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/546 G01N33/58 C12Q1/68		
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 GOIN C12Q		
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, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/061121 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG ; YANG LI (US); HINKEL CHRISTOPHER A (US);) 8 August 2002 (2002-08-08) das ganze Dokument, siehe insbesondere Seite 19 -----	1-16
X	EP 0 126 450 A (TRIPATZIS IOANNIS) 28 November 1984 (1984-11-28) cited in the application das ganze Dokument, insbesondere Ansprüche 8 und 13 -----	1-16
X	GB 1 561 042 A (COULTER ELECTRONICS) 13 February 1980 (1980-02-13) the whole document -----	1-16
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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	*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	
E earlier document but published on or after the international filing date	*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	
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)	*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.	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*&* document member of the same patent family	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">11 November 2004</p>	Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">19/11/2004</p>	
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 <p style="text-align: center;">STEINHEIMER, K</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE2004/001078

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/55363 A (AMERSHAM PHARM BIOTECH UK LTD ; THOMAS NICHOLAS (GB); WAGGONER ALAN (U) 21 September 2000 (2000-09-21) page 4 - page 5	1-16
Y	EP 0 296 136 A (WALLAC OY) 21 December 1988 (1988-12-21) das ganze Dokument, siehe insbesondere Spalte 4	1-16
Y	US 4 801 504 A (DANIELSON SUSAN J ET AL) 31 January 1989 (1989-01-31) das ganze Dokument, siehe insbesondere Spalte 7	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE2004/001078

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02061121	A	08-08-2002	CA 2436428 A1	08-08-2002
			WO 02061121 A2	08-08-2002
			EP 1381695 A2	21-01-2004
			JP 2004529618 T	30-09-2004
			US 2003165865 A1	04-09-2003
EP 0126450	A	28-11-1984	DE 3322373 A1	22-11-1984
			AT 80469 T	15-09-1992
			CA 1248873 A1	17-01-1989
			DE 3485912 D1	15-10-1992
			EP 0126450 A2	28-11-1984
			JP 2040626 C	28-03-1996
			JP 7054324 B	07-06-1995
			JP 60035265 A	23-02-1985
			DK 305084 A	23-12-1984
			NO 842501 A	27-12-1984
GB 1561042	A	13-02-1980	DE 2632478 A1	24-02-1977
			FR 2319131 A1	18-02-1977
			JP 52015815 A	05-02-1977
			NL 7608052 A	25-01-1977
			SE 7608307 A	24-01-1977
WO 0055363	A	21-09-2000	AU 2928400 A	04-10-2000
			EP 1163367 A2	19-12-2001
			WO 0055363 A2	21-09-2000
			JP 2002538836 T	19-11-2002
EP 0296136	A	21-12-1988	SE 458968 B	22-05-1989
			DE 3870324 D1	27-05-1992
			EP 0296136 A1	21-12-1988
			JP 1035268 A	06-02-1989
			JP 2638085 B2	06-08-1997
			SE 8702511 A	17-12-1988
			US 5028545 A	02-07-1991
US 4801504	A	31-01-1989	US 4719182 A	12-01-1988
			CA 1248445 A1	10-01-1989
			DE 3686429 D1	24-09-1992
			DE 3686429 T2	08-04-1993
			EP 0195624 A2	24-09-1986
			JP 61218944 A	29-09-1986

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/001078

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N33/546 G01N33/58 C12Q1/68

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N C12Q

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, BIOSIS, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 02/061121 A (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG ; YANG LI (US); HINKEL CHRISTOPHER A (US);) 8. August 2002 (2002-08-08) das ganze Dokument, siehe insbesondere Seite 19	1-16
X	EP 0 126 450 A (TRIPATZIS IOANNIS) 28. November 1984 (1984-11-28) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument, insbesondere Ansprüche 8 und 13	1-16
X	GB 1 561 042 A (COULTER ELECTRONICS) 13. Februar 1980 (1980-02-13) das ganze Dokument	1-16
	----- -/-	

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

11. November 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

19/11/2004

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

STEINHEIMER, K

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/001078

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00/55363 A (AMERSHAM PHARM BIOTECH UK LTD ; THOMAS NICHOLAS (GB); WAGGONER ALAN (U) 21. September 2000 (2000-09-21) Seite 4 - Seite 5 -----	1-16
Y	EP 0 296 136 A (WALLAC OY) 21. Dezember 1988 (1988-12-21) das ganze Dokument, siehe insbesondere Spalte 4 -----	1-16
Y	US 4 801 504 A (DANIELSON SUSAN J ET AL) 31. Januar 1989 (1989-01-31) das ganze Dokument, siehe insbesondere Spalte 7 -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2004/001078

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 02061121	A	08-08-2002	CA	2436428 A1	08-08-2002
			WO	02061121 A2	08-08-2002
			EP	1381695 A2	21-01-2004
			JP	2004529618 T	30-09-2004
			US	2003165865 A1	04-09-2003
EP 0126450	A	28-11-1984	DE	3322373 A1	22-11-1984
			AT	80469 T	15-09-1992
			CA	1248873 A1	17-01-1989
			DE	3485912 D1	15-10-1992
			EP	0126450 A2	28-11-1984
			JP	2040626 C	28-03-1996
			JP	7054324 B	07-06-1995
			JP	60035265 A	23-02-1985
			DK	305084 A	23-12-1984
			NO	842501 A	27-12-1984
GB 1561042	A	13-02-1980	DE	2632478 A1	24-02-1977
			FR	2319131 A1	18-02-1977
			JP	52015815 A	05-02-1977
			NL	7608052 A	25-01-1977
			SE	7608307 A	24-01-1977
WO 0055363	A	21-09-2000	AU	2928400 A	04-10-2000
			EP	1163367 A2	19-12-2001
			WO	0055363 A2	21-09-2000
			JP	2002538836 T	19-11-2002
EP 0296136	A	21-12-1988	SE	458968 B	22-05-1989
			DE	3870324 D1	27-05-1992
			EP	0296136 A1	21-12-1988
			JP	1035268 A	06-02-1989
			JP	2638085 B2	06-08-1997
			SE	8702511 A	17-12-1988
US 4801504	A	31-01-1989	US	4719182 A	12-01-1988
			CA	1248445 A1	10-01-1989
			DE	3686429 D1	24-09-1992
			DE	3686429 T2	08-04-1993
			EP	0195624 A2	24-09-1986
			JP	61218944 A	29-09-1986