

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

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
17. August 2017 (17.08.2017)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2017/137616 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 1/30 (2006.01) A61K 31/496 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2017/053089

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. Februar 2017 (10.02.2017)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2016 102 346.9
10. Februar 2016 (10.02.2016) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): BIOSEPAR GESELLSCHAFT FÜR
MEDIZIN- UND LABORTECHNIK MBH [DE/DE];
Am Industriepark 2a, 84453 Mühldorf am Inn (DE).

(72) Erfinder; und

(71) Anmelder (nur für US): SZABADOS, Andreas [DE/DE];
Am Industriepark 2A, 84453 Mühldorf am Inn (DE).

(74) Anwalt: VON BÜLOW & TAMADA; Rotbuchenstr. 6,
81547 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,
SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG,
KZ, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO,
RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

(54) Title: FIXATIVE

(54) Bezeichnung : FIXATIVUM

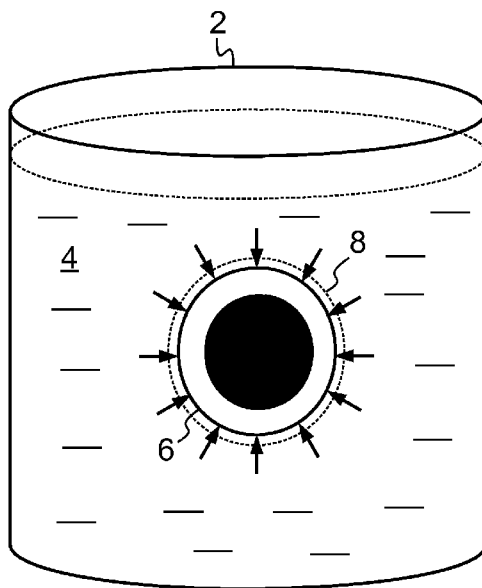


Fig. 1

(57) Abstract: The invention relates to a fixative for the preservation of
organic tissue and cell aggregates, comprising a hydrophilic denaturant for
structural change of the molecules of the organic tissue, a lipophobic solvent,
in which said denaturant is dissolved, and an amphiphilic infiltration agent
which is dissolved in the solvent for dissolving fats on the surface of the
biological tissue in order to accelerate a penetration of the denaturant into the
biological tissue.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Fixativum zur
Konservierung von organischem Gewebe und Zellverbänden, umfassend ein
hydrophiles Denaturierungsmittel zum strukturellen Verändern der Moleküle
des organischen Gewebes, ein lipophobes Lösungsmittel, in dem das
Denaturierungsmittel gelöst ist, und ein in dem Lösungsmittel gelöstes
amphiphiles Infiltrationsmittel zum Lösen von Fetten an der Oberfläche des
biologischen Gewebes, um ein Eindringen des Denaturierungsmittels in das
biologische Gewebe zu beschleunigen.

5

Fixativum**Beschreibung**

10 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Fixativum.

Diverse Fixativa ist beispielsweise aus der DE 10 2012 101 896 A1 bekannt. Eines der offenbarten Fixativa umfasst als Lösungsmittel Alkohol, in dem als Denaturierungsmittel ein Polyamin gelöst ist. Die DE 10 2012 101 896 A1 offenbart
15 allerdings auch, dass bestimmte Alkohole, wie Ethanol als Lösungsmittel nachteilig sind, weil es das zu konservierende Gewebe dehydriert. Ein anderes der offenbarten Fixativa umfasst als Lösungsmittel Wasser, in dem als Denaturierungsmittel ein Polyamin gelöst ist. Insbesondere bei der Fixierung von Gewebe mit in Wasser gelösten Polyaminen als Denaturierungsmittel ist jedoch
20 nachteilig, dass die zur Konservierung notwendige strukturelle Veränderung des zu konservierenden organischen Gewebes zu langsam abläuft und sich damit beispielsweise ungewünschte Artefakte bilden, oder der Fixiervorgang nicht alle Strukturen der Zellen und des Gewebes voll erfasst.

25 Aufgabe der Erfindung ist es daher, die Wirkung des Denaturierungsmittels zu beschleunigen, ohne das zu konservierende Gewebe zu zerstören und so die Fixierung zu verbessern.

Gemäß einem Aspekt der Erfindung, umfasst ein Fixativum zur Konservierung von
30 organischem Gewebe und Zellverbänden ein hydrophiles Denaturierungsmittel zum strukturellen Verändern der Moleküle des organischen Gewebes, ein lipophobes Lösungsmittel, in dem das Denaturierungsmittel gelöst ist und ein in dem Lösungsmittel gelöstes amphiphiles Infiltrationsmittel zum Lösen von Fetten an der

Oberfläche des biologischen Gewebes, um ein Eindringen des Denaturierungsmittels in das biologische Gewebe zu beschleunigen.

- Dem angegebenen Fixativum liegt die Überlegung zugrunde, dass ein
- 5 Denaturierungsmittel zur Anwendung in einem Lösungsmittel gelöst verwendet wird und hydrophil wirkt. Das Denaturierungsmittel muss sich in dem Lösungsmittel lösen können, das Lösungsmittel ist daher nicht beliebig wählbar. Das Lösungsmittel darf das zu konservierende organische Gewebe dabei nicht verändern und sollte daher lipophob gewählt werden. Auf der anderen Seite
- 10 verlangsamt Fett an den Zellwänden des zu konservierenden organischen Gewebes die Wirkung des Denaturierungsmittels, was die Wahrscheinlichkeit für osmotische Schäden am zu konservierenden organischen Gewebe erhöht, welche wiederum zu den zu vermeidenden Artefakten führen (Beispiele: Hämolytische Wirkung, strukturelle, biochemische und morphologische Zerstörung von
- 15 Erythrozyten und anderen Zellen, Zellstrukturen, beispielsweise auch von Protozoen, Verschlechterung der immunologischen Eigenschaften).

- Für ein schnelles Einwirken des Denaturierungsmittels in das zu konservierende Gewebe wäre es daher wünschenswert, wenn das Fett an den Zellwänden
- 20 möglichst schnell gelöst wird. Daher wird mit dem angegebenen Fixativum vorgeschlagen, in dem Lösungsmittel zusätzlich ein amphiphiles, also ein gleichzeitig lipophiles und hydrophiles, Infiltrationsmittel zu lösen, welches sich aufgrund seiner Hydrophilität im Lösungsmittel lösen lässt, und welches aufgrund seiner Lipophilität das Fett den Zellwänden des zu konservierenden biologischen
- 25 Gewebes löst. Die Penetration des Denaturierungsmittels in das zu konservierende biologische Gewebe wird auf diese Weise beschleunigt und die Wirkung des Fixativums verbessert, um alle inter- und extrazellulären Bereiche beziehungsweise Bestandteile des zu konservierenden Gewebes zu erfassen.
- 30 Mit dem angegebenen Fixativum können selbst mit Polyamin, insbesondere auch mit Urotropin als Denaturierungsmittel zufriedenstellende Konservierungsergebnisse erreicht werden.

- Als Lösungsmittel sollte bevorzugt Wasser verwendet werden, weil dies einerseits
- 35 das zu konservierende Gewebe nicht angreift und andererseits sehr kostengünstig ist.

Das amphiphile Infiltrationsmittel sollte bevorzugt hygroskopische Eigenschaften aufweisen. Auf diese Weise wirkt das Infiltrationsmittel selbst fixierend und unterstützt das eigentliche Denaturierungsmittel bei der Konservierung, ohne dass
5 ungünstige denaturierende und hygroskopische Eigenschaften zu Tage treten.

In dem amphiphilen Infiltrationsmittel kann wenigstens ein kurzkettiges Alkanol mit maximal zehn Kohlenstoffeinheiten enthalten sein. Kurzkettige Alkohole haben sowohl eine polare OH-Gruppen als auch unpolare CH-Gruppen und wirken daher
10 amphiphil. Das kurzkettige Alkanol kann aus Methanol, Ethanol, Isopropanol, Glycerin und Butanol ausgewählt sein.

Das angegebene Fixativum kann 80 bis 99,8 Gew. % des Lösungsmittels, 0,1 bis 10 Gew. % des Denaturierungsmittels und 0,1 bis 10 Gew. % des
15 Infiltrationsmittels enthalten. Mit diesen Mischungsverhältnissen wird durch eine Lösung von lipophilen Membranstrukturen der Gewebszellen eine aktive Infiltration erzielt. Im eingangs genannten Fixativum wird durch Verwendung von amphiphilen Ethanol als Lösungsmittel lediglich eine passive Funktionshilfe erreicht, die bei vielen Gewebetypen nicht oder nur unvollkommen funktioniert.

20 Das Infiltrationsmittel kann 0,1 bis 10 Gew % Methanol und/oder 0,1 bis 10 Gew % Ethanol und/oder 0,1 bis 10 Gew % Isopropanol und/oder 0,1 bis 10 Gew % Glycerin und/oder 0,1 bis 10 Gew % Butanol enthalten. Insbesondere kann das Fixativum drei oder vier der genannten Alkohole enthalten und so ein ternäres oder
25 quaternäres Gemisch sein.

Das Denaturierungsmittel kann ein Polyamin, insbesondere Urotropin (auch auch Hexamethylentetramin oder Methenamin genannt) enthalten.

30 Das Fixativum kann ferner ein Säuerungsmittel umfassen, das eingerichtet ist, Protonen abzugeben, die mit dem Denaturierungsmittel reagieren und so ein Aldehyd bilden, das dann wiederum die Konservierung des biologischen Gewebes beschleunigt. Mit dem Säuerungsmittel kann der pH-Wert des Fixativums eingestellt werden. Wird beispielsweise Urotropin allein in Wasser als Lösungsmittel
35 verwendet, dann ist der pH-Wert dieser Wasserlösung alkalisch und instabil. Für ein

wirkungsvolles Fixativum sollte der pH-Wert auf einen stabilen Wert zwischen 2,5 und 10, vorzugsweise unterhalb von unter 8 eingestellt werden.

- 5 Das Säuerungsmittel zum Einstellen des pH-Wertes kann eine organische Säure, eine anorganische Säure, ein sauer reagierendes Salz oder eine Mischung davon sein.

- 10 Die organische Säure kann ausgewählt sein aus aliphatischen gesättigten und ungesättigten Monocarbonsäuren, Di- und Tricarbonsäuren, aromatischen Carbonsäuren, beispielsweise Salizylsäuren, Benzoessäuren, heterozyklischen Carbonsäuren oder Mischungen davon. Beispiele für in Frage kommende organische Säuren sind Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Milchsäure, Oxalsäure, Bernsteinsäure, Malonsäure, Glutarsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Zitronensäure, Sorbinsäure, Ascorbinsäure und deren Mischungen.

- 15 Die anorganische Säure kann ausgewählt sein aus Salzsäure, Schwefelsäure, schweflige Säure, Phosphorsäure, Salpetersäure, salpetrige Säure und Polythionsäuren und deren Salze, sowie deren Mischungen.

- 20 Das sauer reagierende Salz kann ausgewählt sein aus quartären Ammoniumverbindungen, Ammoniumchlorid und Mischungen davon.

- 25 Dem Fixativum können ferner bakterizid wirkende Substanzen (wie z.B. Natriumazid und quartäre Ammoniumverbindungen) beigemischt werden. Der Zusatz von Tensiden (anionischen und kationischen, nichtionischen und amphoteren Tensiden - hier auch quartäre Ammoniumverbindungen mit Tensidwirkung) verbessert die Fähigkeit der Infiltration und Penetration des in der Erfindung genannten Fixativums im physiologischen und nicht physiologischen Milieu. Als Konzentration kann 0,001 - 10,0% gewählt werden.

- 30 Die Lösungen mit den oben erwähnten Inhalten können ferner mit Duftstoffen und Farbstoff versehen.

- 35 Gegenüber den herkömmlichen Gewebe- und Zellfärbungen mit Formalin und anderen, bislang verwendeten konventionellen Fixiermittel mit vielen Nachteilen sind mit dem angegebenen Fixativum wenig, oder keine Artefakte zu verzeichnen.

Viele Strukturen im Gewebe, in den Zellen und im subzellulären Bereich werden durch die verschiedenen nachfolgenden Färbeverfahren besser angefärbt. Durch die Verwendung des neu entwickelten Fixierkonzeptes werden auch die serologisch-immunologischen und molekularbiologischen Untersuchungen
5 begünstigt im Sinne der verbesserten Möglichkeit der fachlichen und diagnostischen Beurteilung und Weiterverarbeitung.

Durch die Anfärbung des Fixiermittels erreicht man eine optische Differenzierung gegenüber anderen wässrigen Diagnostika und chemischen Lösungen. Dadurch
10 kann die Sicherheit im Laboratorium erhöht werden. Die charakteristische Färbung, die mit geschützt werden soll: Pink-Farbe. Die Duftstoffe dienen ebenso der Sicherheit im Labor.

Durch das angegebene Fixativum findet keine nennenswerte Vernetzung von DNS
15 und RNS und der Proteine statt, wie das bei den meisten bekannten Fixativa nach dem Stand der jetzt bekannten Technik gegeben ist. Das hat enorme Vorteile für die DNS/RNS-Untersuchungen, die molekular-biologische Gentechnologie, aber auch für alle anderen biotechnologischen Arbeiten und Untersuchungen, die mit Proteinstrukturen zu tun haben. Fixiermittel, die primäre, sekundäre, tertiäre oder
20 quartäre Proteinstrukturen verändern und dies häufig sogar irreversibel, erfüllen nicht die modernen analytischen und präparativen Arbeitsbedingungen und deren Qualitätsmanagement. Durch die starke, zum Teil irreversible Proteindenaturierung wird nicht nur eine künstliche Barriere, Behinderung und Verzögerung des Fixationsvorganges erreicht. Es werden auch Artefakte produziert, die
25 beispielsweise in der Diagnostik falsch positive oder auch falsch negative Ergebnisse begünstigen. Formalinhaltige Fixiermittel und deren Verwandte geben ein gutes Beispiel für diese Nachteile ab. Es muss aber hier auch auf die Nachteile der rein alkoholhaltigen Fixationsmittel verwiesen werden. Das angegebene Fixativum verbindet die Vorteile aller bisherigen Fixationsmittel nach dem Stand der
30 Technik ohne deren Nachteile aufzuweisen.

Die oben beschriebenen Eigenschaften, Merkmale und Vorteile dieser Erfindung sowie Art und Weise, wie diese erreicht werden, werden klarer und deutlicher verständlich im Zusammenhang mit der folgenden Beschreibung der
35 Ausführungsbeispiele, die im Zusammenhang mit der Zeichnung näher erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines zu konservierenden Gewebekörpers in einem Fixativum.

- 5 In den Figuren werden gleiche technische Elemente mit gleichen Bezugszeichen versehen und nur einmal beschrieben. Die Figuren sind rein schematisch und geben vor allem nicht die tatsächlichen geometrischen Verhältnisse wieder.

Es wird auf Fig. 1 Bezug genommen. Schematisch gezeigt ist ein Becherglas 2, in dem eine Fixierlösung 4 sowie ein mit der Fixierlösung 4 zu fixierendes Gewebe 6 aufgenommen ist. Das zu fixierende Gewebe 6 kann ein sehr fettreiches Organ eines Menschen sein, wie beispielsweise das Zentralnervensystem, die Leber, die Muskulatur, das Herz oder die Blutgefäße. Der reiche Fettgehalt des zu fixierenden Gewebes 6 ist in Fig. 1 durch eine gestrichelte Linie 8 um das zu fixierende Gewebe 6 angedeutet.

Die Fixierlösung 4 enthält im vorliegenden Ausführungsbeispiel 98% eines Lösungsmittels in Form von Wasser, 1% eines Denaturierungsmittels in Form von Urotropin und 1% eines noch zu beschreibenden Infiltrationsmittels.

20 Beispielsweise aus der DE 10 2012 101 896 A1 ist die konservierende Wirkung von Urotropin bekannt. Allerdings läuft der Konservierungsvorgang nur sehr langsam ab und insbesondere ein hoher Fettanteil 8 in dem zu konservierenden organischen Gewebe 6 verlängert den Konservierungsvorgang deutlich.

25 Aus diesem Grund ist in dem Lösungsmittel der Fixierlösung 4 zusätzlich das Infiltrationsmittel gelöst. Seine Aufgabe ist es, den Fettanteil 8 des zu fixierenden Gewebes zu lösen und so die Infiltration des Denaturierungsmittels zu beschleunigen. Damit das Infiltrationsmittel in der Fixierlösung 4 gelöst werden kann, muss es zusätzlich hydrophil gewählt sein, weshalb für das Infiltrationsmittel ausschließlich amphiphile Stoffe in Frage kommen.

35 In der vorliegenden Ausführung wurde für das Infiltrationsmittel ein quaternäres Gemisch aus Methanol, Ethanol, Isopropanol und Glyzerin zu je gleichen Anteilen gewählt. Durch Hinzugeben dieses Infiltrationsmittels zu der Fixierlösung 4 konnte

die Zeitdauer des gesamten Fixier- und Konservierungsvorgang deutlich reduziert werden.

5 Zwar ist die Verwendung eines amphiphilen Mittels in Form von Alkohol in der Fixierlösung bereits aus der DE 10 2012 101 896 A1 bekannt, allerdings wird der Alkohol dort als Lösungsmittel selbst verwendet. Der dort angegebene Alkohol begünstigt, vermischt mit Urotropin als ein Mittel mit stark polarer und hydrophiler Eigenschaft, das passive Eindringen ins biologische Gewebe.

10 Die Eigenschaft der zuvor als Infiltrationsmittel angegebenen Alkohole aufgelöst in Wasser erweitert einerseits das Eindringen des Fixiermittels Urotropin in einer deutlich verbesserten Weise, nämlich durch Erweichung/Auflösung - und Öffnung - der lipophilen Membranstrukturen, andererseits wirken diese Alkohole selbst in den vorgeschlagenen Konzentrationen und Mischungen auch als ideale Fixiermittel -
15 ohne die ungünstigen denaturierenden und hygroskopischen Eigenschaften der reinen Alkoholfixierungen zu besitzen, wenn der Alkohol als Lösungsmittel selbst verwendet wird.

Zudem sind die Fixiereigenschaften der zusammen mit Urotropin in Wasser
20 gelösten Alkohole in den angegebenen Konzentrationen nicht nur einzeln, sondern auch zusammen kumulativ gegeben, wodurch eine deutliche Steigerung der fixativen Qualität und Potenz bei allen Gewebetypen unabhängig vom Fettgehalt gegeben ist.

25 Zusammenfassend lässt sich die angegebene Fixierlösung wie folgt beurteilen:

Amphiphile Stoffe, wie die beispielhaft angegebenen Alkohole werden nicht als das Denaturierungsmittel tragendes Lösungsmittel sondern als Hilfsmittel verwendet. Die für das angegebene Fixativum angegebenen Stoffgruppen wirken in den
30 angegebenen Konzentrationen und im vorgeschlagenen Mischungsverhältnis in idealer Weise fixierend im physiologischen Milieu wie auch bei verfettetem oder fettreichem Gewebe.

Das angegebene Fixativum eliminiert die bisherigen Nachteile der einzelnen fixativ
35 wirkenden amphiphilen Stoffe, weil diese Nachteile durch das Lösen in einem hydrophoben Lösungsmittel nicht mehr zum Tragen kommen.

- Die Infiltration des Denaturierungsmittels wird aktiv durch Lösung von lipophilen Membranstrukturen der Gewebszellen erzielt. Bei der Verwendung amphiphiler Stoffe als Lösungsmittel konnte lediglich eine passive Funktionshilfe erzielt werden,
- 5 die bei vielen Gewebetypen nicht oder nur unvollkommen funktioniert.

Patentansprüche

1. Fixativum zur Konservierung von organischem Gewebe und Zellverbänden, umfassend:
 - 5 - ein hydrophiles Denaturierungsmittel zum strukturellen Verändern der Moleküle des organischen Gewebes,
 - ein lipophobes Lösungsmittel, in dem das Denaturierungsmittel gelöst ist, und
 - 10 - ein in dem Lösungsmittel gelöstes amphiphiles Infiltrationsmittel zum Lösen von Fetten an der Oberfläche des biologischen Gewebes, um ein Eindringen des Denaturierungsmittels in das biologische Gewebe zu beschleunigen.
2. Fixativum nach Anspruch 1, wobei das Lösungsmittel Wasser enthält.
- 15 3. Fixativum nach Anspruch 1 oder 2, wobei das amphiphile Infiltrationsmittel hygroskopische Eigenschaften aufweist.
4. Fixativum nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das amphiphile Infiltrationsmittel wenigstens ein kurzkettiges Alkanol mit maximal zehn Kohlenstoffeinheiten enthält.
20
5. Fixativum nach Anspruch 4, wobei das kurzkettige Alkanol ausgewählt ist aus Methanol, Ethanol, Isopropanol, Glycerin und Butanol.
- 25 6. Fixativum nach einem der vorstehenden Ansprüche, enthaltend:
 - 80 bis 99,8 Gew. % des Lösungsmittels,
 - 0,1 bis 10 Gew. % des Denaturierungsmittels, und
 - 0,1 bis 10 Gew. % des Infiltrationsmittels.
- 30 7. Fixativum nach Anspruch 6, wobei das Infiltrationsmittel enthält:
 - 0,1 bis 10 Gew % Methanol, und/oder
 - 0,1 bis 10 Gew % Ethanol, und/oder
 - 0,1 bis 10 Gew % Isopropanol, und/oder
 - 0,1 bis 10 Gew % Glycerin, und/oder
 - 35 - 0,1 bis 10 Gew % Butanol.

8. Fixativum nach Anspruch 7, mindestens enthaltend drei, vorzugsweise vier der genannten Alkohole.
- 5 9. Fixativum nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Denaturierungsmittel ein Polyamin, insbesondere Urotropin enthält.
- 10 10. Fixativum nach einem der vorstehenden Ansprüche, umfassend ein Säuerungsmittel, das eingerichtet ist, Protonen abzugeben, die mit dem Denaturierungsmittel reagieren.
- 11 11. Fixativum nach Anspruch 10, wobei das Säuerungsmittel eine organische Säure, eine anorganische Säure, ein sauer reagierendes Salz oder eine Mischung davon sein.
- 15 12. Fixativum nach einem der vorstehenden Ansprüche, ferner umfassend eine bakterizid wirkende Substanz.

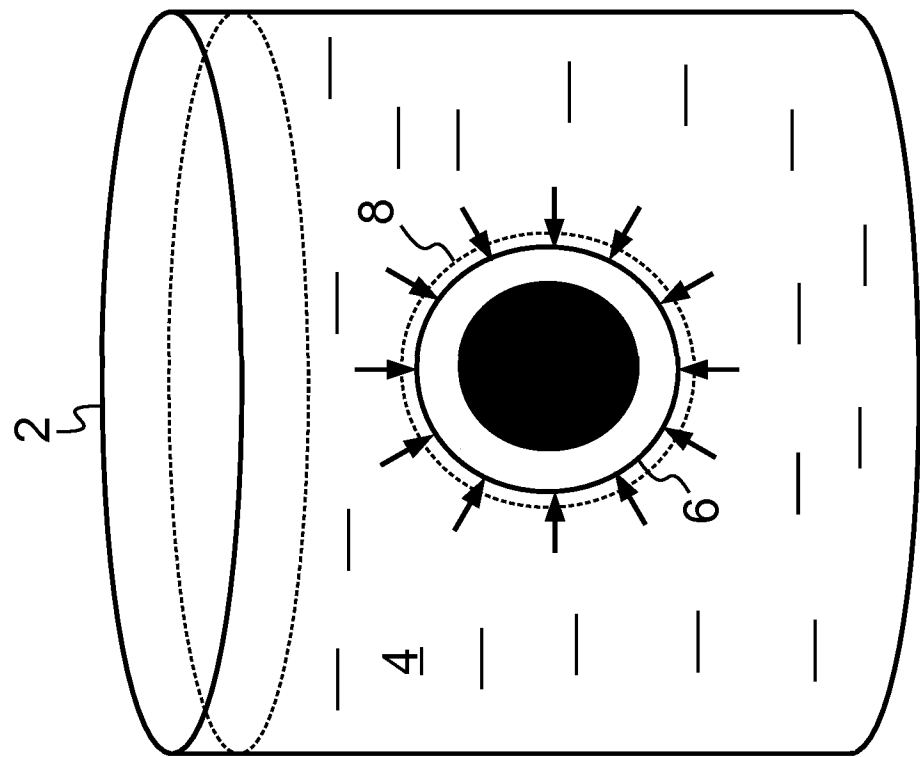


Fig. 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/053089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N1/30 A61K45/06 A61K31/496
ADD.

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)
G01N A61K

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 873 962 A1 (LEICA BIOSYSTEMS NUSSLOCH GMBH [DE]) 20 May 2015 (2015-05-20) paragraphs [0001] - [0005] paragraphs [0036] - [0040] -----	1-12
X	US 2010/209930 A1 (FERNANDO M ROHAN [US]) 19 August 2010 (2010-08-19) paragraphs [0023], [0025], [0027], [0029] -----	1-12
X	EP 1 895 287 A2 (BIOSEPAR GES FUER MEDIZIN UND [DE]) 5 March 2008 (2008-03-05) paragraphs [0017] - [0019] claims 1-12 ----- -/--	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family 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 application or patent 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 May 2017

Date of mailing of the international search report

22/05/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Michalitsch, Richard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/053089

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 10 2012 101896 A1 (GERIGK ROBERTO [DE]) 12 September 2013 (2013-09-12) cited in the application paragraph [0024] paragraphs [0031] - [0033] paragraphs [0037] - [0038] -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/053089

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2873962	A1	20-05-2015	CN 104655471 A 27-05-2015
			DE 102013223384 A1 21-05-2015
			EP 2873962 A1 20-05-2015
			JP 2015096853 A 21-05-2015
			US 2015140601 A1 21-05-2015

US 2010209930	A1	19-08-2010	EP 2398912 A1 28-12-2011
			US 2010209930 A1 19-08-2010
			US 2013034860 A1 07-02-2013
			US 2014054508 A1 27-02-2014
			WO 2010096323 A1 26-08-2010

EP 1895287	A2	05-03-2008	AT 453110 T 15-01-2010
			DE 102006040315 A1 27-03-2008
			DK 1895287 T3 03-05-2010
			EP 1895287 A2 05-03-2008
			ES 2338815 T3 12-05-2010
			US 2008057536 A1 06-03-2008

DE 102012101896	A1	12-09-2013	AU 2013229654 A1 25-09-2014
			CA 2865584 A1 12-09-2013
			DE 102012101896 A1 12-09-2013
			EP 2823282 A1 14-01-2015
			US 2015050689 A1 19-02-2015
			WO 2013131816 A1 12-09-2013

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/053089

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N1/30 A61K45/06 A61K31/496
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherhierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

G01N A61K

Recherhierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherhierten Gebiete fallen

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, FSTA, INSPEC

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 2 873 962 A1 (LEICA BIOSYSTEMS NUSSLOCH GMBH [DE]) 20. Mai 2015 (2015-05-20) Absätze [0001] - [0005] Absätze [0036] - [0040] -----	1-12
X	US 2010/209930 A1 (FERNANDO M ROHAN [US]) 19. August 2010 (2010-08-19) Absätze [0023], [0025], [0027], [0029] -----	1-12
X	EP 1 895 287 A2 (BIOSEPAR GES FUER MEDIZIN UND [DE]) 5. März 2008 (2008-03-05) Absätze [0017] - [0019] Ansprüche 1-12 ----- -/--	1-12



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" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. 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 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. Mai 2017

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/05/2017

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Michalitsch, Richard

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/053089

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 10 2012 101896 A1 (GERIGK ROBERTO [DE]) 12. September 2013 (2013-09-12) in der Anmeldung erwähnt Absatz [0024] Absätze [0031] - [0033] Absätze [0037] - [0038] -----	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2017/053089

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 2873962 A1	20-05-2015	CN 104655471 A	27-05-2015
		DE 102013223384 A1	21-05-2015
		EP 2873962 A1	20-05-2015
		JP 2015096853 A	21-05-2015
		US 2015140601 A1	21-05-2015

US 2010209930 A1	19-08-2010	EP 2398912 A1	28-12-2011
		US 2010209930 A1	19-08-2010
		US 2013034860 A1	07-02-2013
		US 2014054508 A1	27-02-2014
		WO 2010096323 A1	26-08-2010

EP 1895287 A2	05-03-2008	AT 453110 T	15-01-2010
		DE 102006040315 A1	27-03-2008
		DK 1895287 T3	03-05-2010
		EP 1895287 A2	05-03-2008
		ES 2338815 T3	12-05-2010
		US 2008057536 A1	06-03-2008

DE 102012101896 A1	12-09-2013	AU 2013229654 A1	25-09-2014
		CA 2865584 A1	12-09-2013
		DE 102012101896 A1	12-09-2013
		EP 2823282 A1	14-01-2015
		US 2015050689 A1	19-02-2015
		WO 2013131816 A1	12-09-2013
