



— 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.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Transfektionseffizienz unter Verwendung von K16-Peptiden. Desweiteren betrifft die Erfindung neue K16-Peptide. Insbesondere das K16-CYC mit der Peptid-Sequenz: K16-CYC (1) und K16mVprN mit der Peptidsequenz KKKKKKKKKKKKKKKGGGCNEWTLEELLEELKNEAVRHF.

Verfahren zur Verbesserung der Transfektionseffizienz

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Transfektionseffizienz unter Verwendung von K16-Peptiden. Desweiteren betrifft die Erfindung neue K16-Peptide. Anwendungsgebiete sind die Molekularbiologie und die Medizin.

Der Transfektionsmechanismus nicht-viraler Gentransfer-Systeme ist ein komplexer Prozess, der durch eine Vielzahl biologischer Barrieren gehemmt wird. Ein wesentlicher limitierender Schritt ist die Überwindung der Zellkernmembran durch den Vektor. Durch diesen Schritt gelangt die transgene DNA in den Zellkern, wodurch erst eine effiziente Expression des Transgens möglich wird.

Um den Transfer von Plasmid-DNA in den Zellkern zu verbessern, wird u. a. versucht, Kerntransportmechanismen der Zelle zu nutzen. Eine Strategie besteht darin, peptidische NLS-Sequenzen nicht-kovalent an die DNA über eine zusätzlich angefügte kationische DNA-Bindungssequenz zu koppeln, mit dem Ziel, daß die Kerntransport-Maschinerie der Zelle diese an DNA gebundene NLS-Sequenzen erkennt und zusammen mit der DNA in den Zellkern transportiert.

Die in nicht-viralen Gentransfersystemen meist verwendete NLS-Sequenz ist der Aminosäurenabschnitt 126 bis 132 des Simian Virus 40 (SV 40) large T-Antigens (SV40-NLS). Eine Sequenz-spezifische Erhöhung der Transfektionseffizienz durch diese NLS-Sequenz konnte bisher in der oben erwähnten Strategie nicht nachgewiesen werden.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Kerntransport von Plasmid-DNA zu verbessern. Gemäß der Erfindung wird ein synthetisches Peptid bestehend aus einer oligo-Lysin-DNA-Bindungssequenz und einer SV40-NLS konstruiert. Ferner wird die Konstruktion und Optimierung eines Komplexes bestehend aus Plasmid-DNA, synthetischem Peptid und Lipid realisiert.

Als synthetische Peptide wurden die folgenden Peptide ausgewählt:

K16-NLS: CKKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGPKKKRKVG

K16-SLN: CKKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGGVKKKKKP

K16-Vpr: KKKKKKKKKKKKKKKKKKKCGGGIGCRHSRIGVTRQRRARNGASRS

K16-VprN KKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGCNEWTLELLEELKNEAVRHF

K16-mVprN KKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGNEATLELLPELKNPAVRHF

Alle diese Peptide tragen 16 Lysin-Reste zur Bindung der Peptide an die Plasmid-DNA.

Das K16-NLS Peptid trägt außerdem die SV40-NLS-Sequenz (PKKKRKV). Das K16-SLN-Peptid ist ein Kontrollpeptid mit gleicher DNA-Bindungssequenz und identischer Aminosäuren-Zusammensetzung, das eine umgedrehte SV40-NLS-Sequenz trägt. Das K16-Vpr-Peptid trägt zusätzlich zur Oligo-Lysin-DNA-Bindungssequenz eine NLS-Sequenz, die aus der C-terminalen Region des HIV-Vpr-Protein abgeleitet wurde. Das K16-VprN-Peptid trägt analog eine Sequenz, die aus der N-terminalen Region abgeleitet wurde. Das K16-mVprN-Peptid ist ein Kontrollpeptid mit gleicher DNA-Bindungssequenz und einer VprN-Kontrollsequenz, die durch einen Austausch von drei Aminosäuren konstruiert wurde und dadurch als defizient für den erleichterten Kernimport beschrieben wurde.

Außerdem wurde ein synthetisches Peptid bestehend ausschliesslich aus 16 Lysinresten (K16) als zusätzliches Kontrollpeptid verwendet.

Als Lipid wurde bevorzugt die Lipid-Zusammensetzung Lipofektin verwendet.

Es wurden Komplexe aus Plasmid-DNA, Peptid und Lipid hergestellt und zur Transfektion von humanen Kolon-Karzinoma-Zellen (HCT 116) getestet. Zur Messung der Transfektionseffizienz wurde das Luziferase-Reportergen eingesetzt.

Außer der Konstruktion der K16-NLS-Peptide besteht die erfinderische Leistung in der Konstruktion des DNA-Peptid-Lipid-Komplexes. Dabei sind Zusammensetzung der Komplexe durch die Auswahl bestimmter Ladungsverhältnisse zwischen Peptid und DNA sowie die Menge an Lipid entscheidend. Das Verfahren der Konstruktion ist ebenfalls ein entscheidender Faktor (Konzentrationen, Volumina, Puffersystem, Inkubationszeiten und Reihenfolge der Konstruktion, vgl. die Abbildungen 1-3 und 4-6).

Nach Optimierung wurde eine Zusammensetzung und eine Verfahrensweise entwickelt, die als Ergebnis eine Sequenz-spezifische Erhöhung der Genexpression des Reportergens nach Transfektion von HCT 116-Zellen hatte.

Die erfinderische Leistung besteht darin, das Peptid-DNA-Verhältnis so zu wählen, das zunächst ein instabiler Peptid-DNA-Komplex hergestellt wird, dem danach eine relativ kleine Menge an Lipid beigefügt wird.

Die generierte Sequenz-spezifische Erhöhung der Genexpression korreliert mit einem erhöhten Kerntransport der DNA.

Ferner wurde erfindungsgemäß ein zyklisches Peptid zur Stabilisierung der NLS-Sequenz und seine Verwendung zur Optimierung eines nicht-viralen Gentransfersystems konstruiert.

Die SV40-NLS-Sequenz ist durch einen hohen Anteil an basischen Resten stark positiv geladen. Wie in Transfektionsexperimenten und durch biochemische Analyse nachgewiesen wurde, interagiert sehr wahrscheinlich die SV40-NLS mit der Plasmid-DNA. Die Bindung der SV40-NLS-Sequenz an die DNA kann potentiell dazu führen, daß das Peptid einerseits für eine Interaktion mit der Nukleartransport-Machinerie der Zelle maskiert ist und andererseits seine Sekundärstruktur verändert wird, so daß es als Kernimport-Substrat nicht mehr erkannt werden könnte.

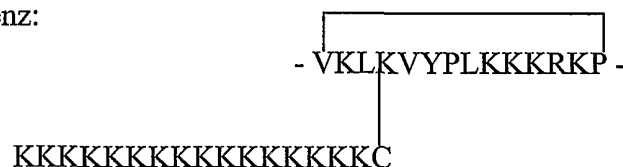
Die erfinderische Idee besteht darin, die Sekundärstruktur der SV40-NLS-Sequenz durch Zyklisierung des Peptids zu stabilisieren. Dabei wurde die Interaktion der SV40-NLS-Sequenz mit seinem Rezeptor Importin α in einer Faltblattstruktur-Konformation ausgenutzt. Als Basis der Zyklisierung diente daher ein zyklisches Peptid, welches aus zwei antiparallel liegenden Faltblattsequenzen besteht.

Die Erfindung besteht darin, in diesem zyklischen Peptid die SV40-NLS-Sequenz zu rekonstruieren. Das Ergebnis ist ein zyklisches Peptid bestehend aus zwei antiparallelen Faltblatt-Strukturen, wobei die eine Seite die SV40-NLS-Sequenz enthält. Zur Bindung an die DNA wurden an der gegenüberliegenden Seite der SV40-NLS-Sequenz kovalent 16 Lysin-Reste gebunden. Das resultierende Konstrukt ist also ein synthetisches Peptid mit einer zyklisierten NLS-Sequenz und einer oligo-Lysin-DNA-Bindungsstelle.

Es hat die folgende

Peptid-Sequenz:

K16-CYC:



Gegenstand der Erfindung sind desweiteren zwei neue K16-Peptide, das insgesamt 39 Aminosäuren aufweisende Peptid mit der Sequenz:

K16-VprN KKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGCNEWTLELLEELKNEAVRHF

und das insgesamt 38 Aminosäuren aufweisende Peptid mit der Sequenz:

K16-mVprN KKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGNEATLELLPELKNPAVRHF.

Diese Peptide sind sowohl in Kombination mit Plasmid-DNA als auch in Kombination mit Plasmid-DNA und Lipid zur Transfektion geeignet.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Verwendung des K16-CYC-Peptids in einem nicht-viralen Gentransfer-System:

Auf der Grundlage der oben beschriebenen Optimierung eines DNA-Peptid-Lipid-Komplexes wurden Komplexe bestehend aus Plasmid-DNA, dem K16-CYC-Peptid und Lipofektin hergestellt und zur Transfektion von HCT116-Zellen getestet.

Das Ergebnis zeigt eine drastische Erhöhung der Genexpression nach Transfektion mit dem K16-CYC-Peptid im Vergleich zum K16-NLS-Peptid, das eine lineare Form der SV40-Sequenz trägt (vgl. Abbildungen 7 und 8).

Verwendung des K16-VprN-Peptids in einem nicht-viralen Gentransfer-System:

Es wurden Komplexe bestehend aus Plasmid-DNA, dem K16-VprN-Peptid und Lipofektin hergestellt und zur Transfektion von HCT116-Zellen getestet.

In einer weiteren Anwendung wurden Komplexe bestehend aus Plasmid-DNA und dem K16-VprN-Peptid hergestellt und ebenso zur Transfektion von HCT116-Zellen getestet.

In beiden Anwendungen wurde als Vergleich zum K16-VprN-Peptid das K16-mVprN-Peptid verwendet. Das Ergebnis zeigt eine deutliche Erhöhung der Genexpression in beiden Anwendungen (vgl. Abbildungen 9 und 10).

Diese Sequenz-spezifische Verbesserung der Transfektionseffizienz wurde in besonderem Maße in der Anwendung des Peptides ohne zusätzliche Verwendung des Lipids erzielt (vgl. Abbildung 10). Das K16-VprN-Peptid bewirkte eine 10-fache Erhöhung der maximalen Genexpression im Vergleich zum K16-mVprN-Peptid. Ausserdem wurde für das K16-VprN-Peptid für eine maximale Genexpression gleichzeitig eine 12-fach geringere Menge an Peptid benötigt im Vergleich zum K16-mVprN-Peptid.

Um auszuschließen, daß die erzielte Verbesserung der Transfektionseffizienz auf eine verbesserte Bildung von DNA-Komplexen beruht, wurden die scheinbare Größe (vgl. Abbildung 11) und die relative Partikel-Anzahl (vgl. Abbildung 12) mittels Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) untersucht. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, unterscheiden sich die Größen der DNA-Komplexe mit dem K16-VprN-Peptid nur geringfügig im Vergleich zum K16-mVprN-Peptid. Abbildung 12 zeigt, daß mit zunehmendem DNA/Peptid-Ladungsverhältnis die Streulicht-Intensität ansteigt. Der Vergleich der Abbildungen 10 und 12 zeigt jedoch, daß die gemessenen Streulicht-

Intensitäten mit der Genexpression nicht korreliert. Insbesondere bewirkt das K16-VprN-Peptid bei einem DNA/Peptid-Ladungsverhältnis von 3 eine 2-fache Erhöhung der Streulicht-Intensität und eine mindestens 100-fache Erhöhung der Genexpression. Bei einem Ladungsverhältnis von 9 verdoppelt sich die Streulicht-Intensität im Vergleich zu einem Ladungsverhältnis von 3. Die Genexpression erhöht sich jedoch dabei um etwa 10-fach.

Die Abbildungen 13 und 14 sollen belegen, daß die gemessene Streulicht-Intensität mit der eingesetzten Menge an DNA-Komplexen korreliert. Dazu wurden DNA-Komplexe bestehend aus Plasmid-DNA und den Peptiden K16-VprN und K16-mVprN hergestellt und anschliessend wie abgebildet bis 16-fach verdünnt. Das Ergebnis zeigt, daß die Streulicht-Intensität in dem Maße des Verdünnungsfaktors abnimmt, während die Größe der Partikel etwa gleich bleibt. Die Streulicht-Intensität ist also ein Maß für die relative Menge an eingesetzten DNA-Komplexen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Sequenz-spezifische Erhöhung der Genexpression durch das K16-VprN-Peptid nicht auf eine Erhöhung der Partikelgröße oder der Partikelmenge zurückzuführen ist. Folglich ist zu erwarten, daß vielmehr ein zellulärer Mechanismus, beruhend auf die Erkennung der VprN-Sequenz durch spezifische Faktoren während des Transfektionsvorgangs eintritt. Es ist also anzunehmen, daß die K16-VprN/Plasmid DNA-Komplexe von der Kernimport-Maschinerie der Zelle als Imports substrat erkannt werden, verstärkt in den Kern transportiert werden und dadurch eine Erhöhung der Transfektionseffizienz bewirken.

Zusammengefasst bedeuten diese Resultate in Bezug auf Neuheit, daß:

1. ein DNA-Peptid-Lipid-Komplex konstruiert wurde, dessen Zusammensetzung zu einer Sequenz-spezifischen Erhöhung der Transfektionseffizienz durch eine NLS-Sequenz führt.
2. die Zyklisierung einer NLS-Sequenz die Transfektionseffizienz in dem genannten Komplex noch weiterhin erhöht.
3. die Verwendung der VprN-Sequenz eine drastische Verbesserung des Transfektionssystems bewirkt.

Patentansprüche

1. Transfektionsverfahren, dadurch gekennzeichnet, daß ein Komplex, bestehend aus
 - Plasmid-DNA
 - einem synthetischen Peptid und
 - einem Lipid
 zur Transfektion eingesetzt wird.
2. Transfektionsverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als synthetisches Peptid ein Peptid aus der Gruppe

K16-NLS: CKKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGPKKKRKVG

K16-SLN: CKKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGGVKKRKKKP

K16-Vpr: KKKKKKKKKKKKKKKKKKKCGGGIGCRHSRIGVTRQRRARNGASRS

K16-VprN KKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGCNEWTLELLEELKNEAVRHF

K16-mVprN KKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGNEATLELLPELKNPAVRHF.

ausgewählt wird.

3. Transfektionsverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als synthetisches Peptid ein zyklisches K16-Peptid, vorzugsweise das K16-CYC, der

Peptid-Sequenz:



verwendet wird:

4. Transfektionsverfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß als Lipid Lipofektin verwendet wird.
5. Transfektionsverfahren nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß das Ladungsverhältnis Peptid : Plasmid-DNA 0,7 bis 1,0 beträgt.
6. Transfektionsverfahren nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß das Mengenverhältnis Plasmid-DNA : Lipid 2 : 1 bis 1 : 1 beträgt.

7. Zyklisches Peptid K16-CYC.
8. K16-VprN KKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGCNEWTLELLEELKNEAVRHF.
9. K16-mVprN KKKKKKKKKKKKKKKKKKKGGGNEATLELLPELKNPAVRHF.
10. Verwendung von Peptiden gemäß Anspruch 7 bis 9 in Kombination mit Plasmid-DNA zur Transfektion.

Abbildung 1 Transfektion mit K16-SNL/DNA/Lipofektin-Komplexen, 15 Min. Inkubation

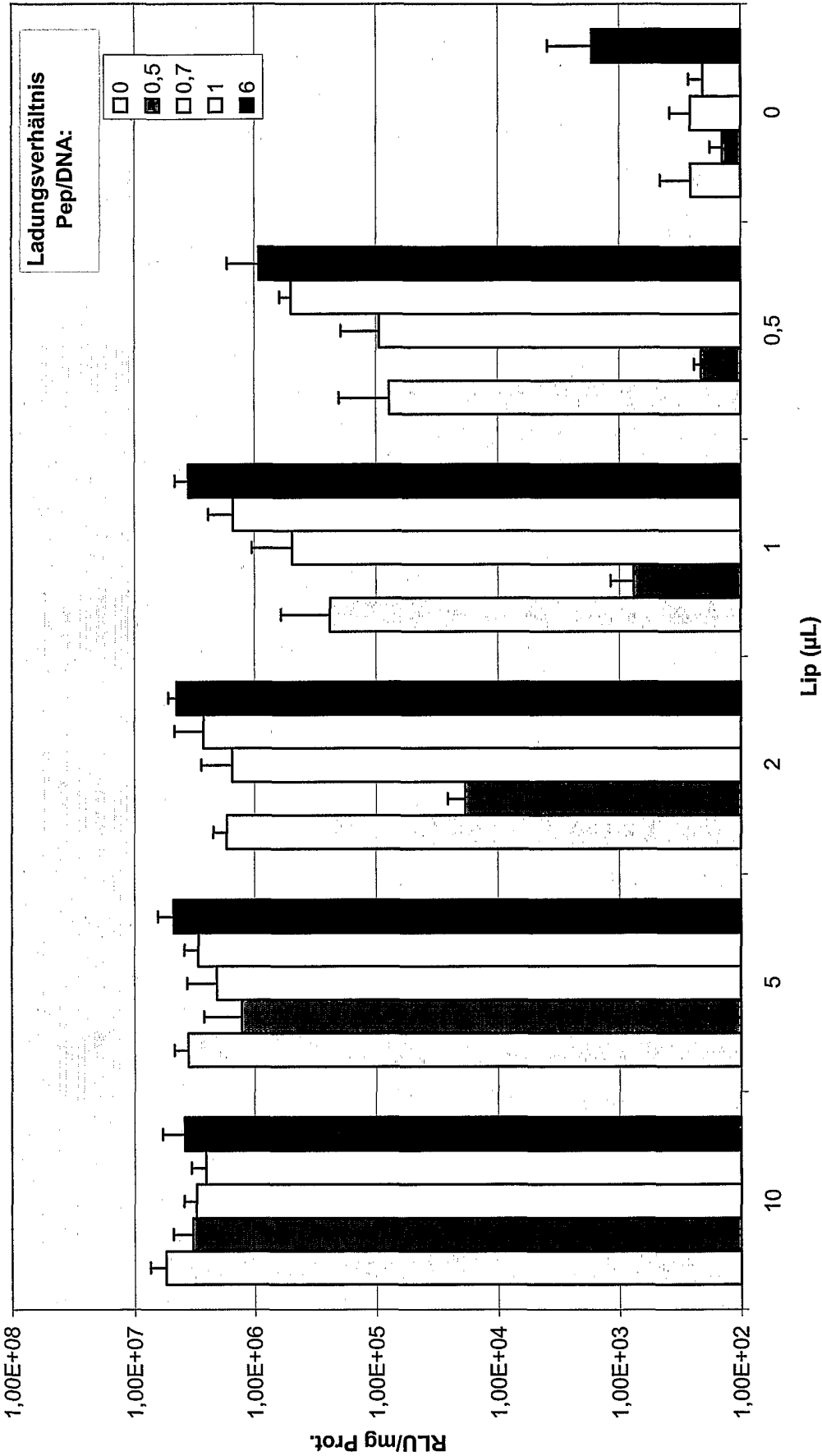


Abbildung 2 Transfektion mit K16-NLS/DNA/Lipofektin-Komplexen, 15 Min. Inkubation

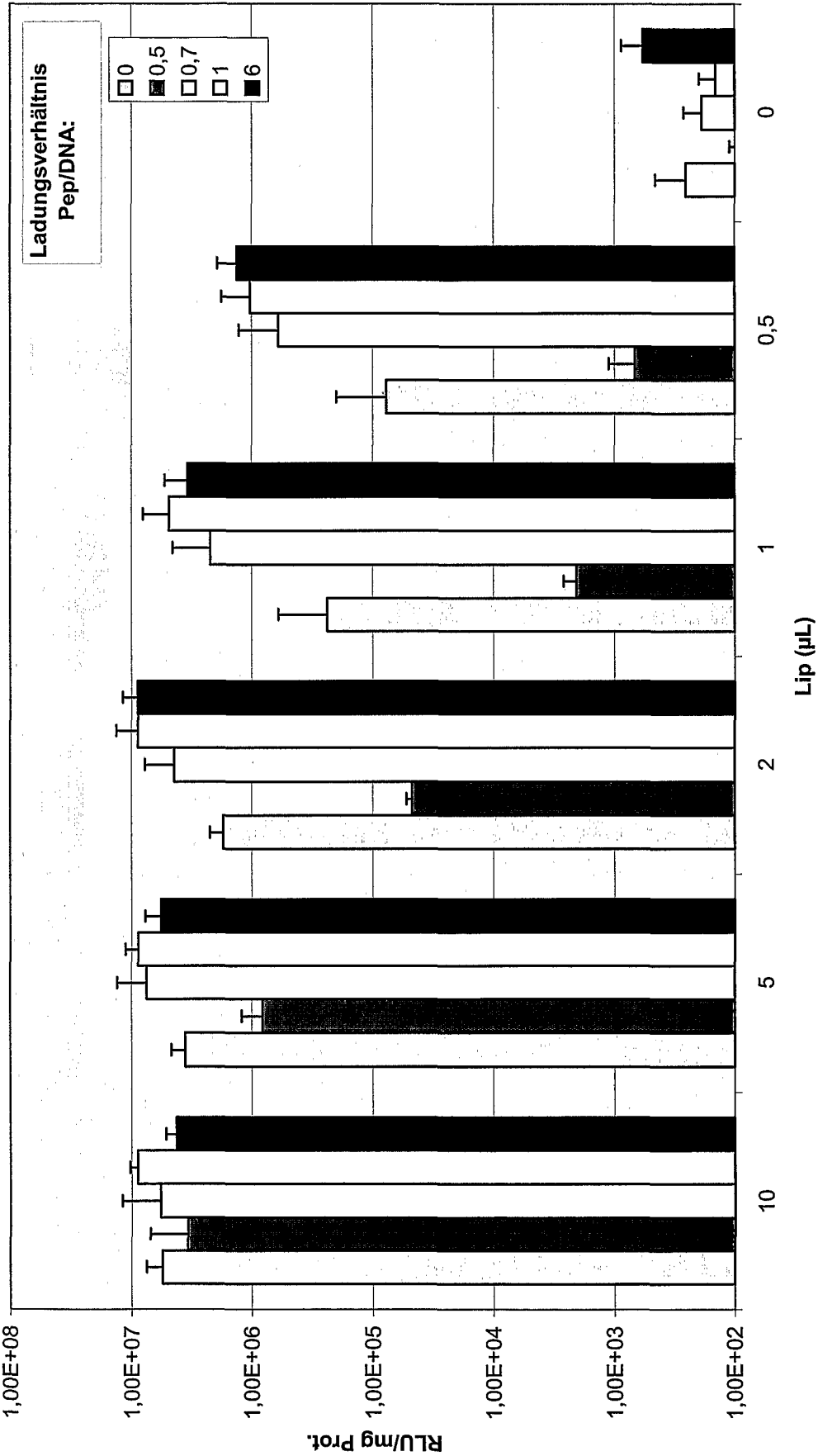
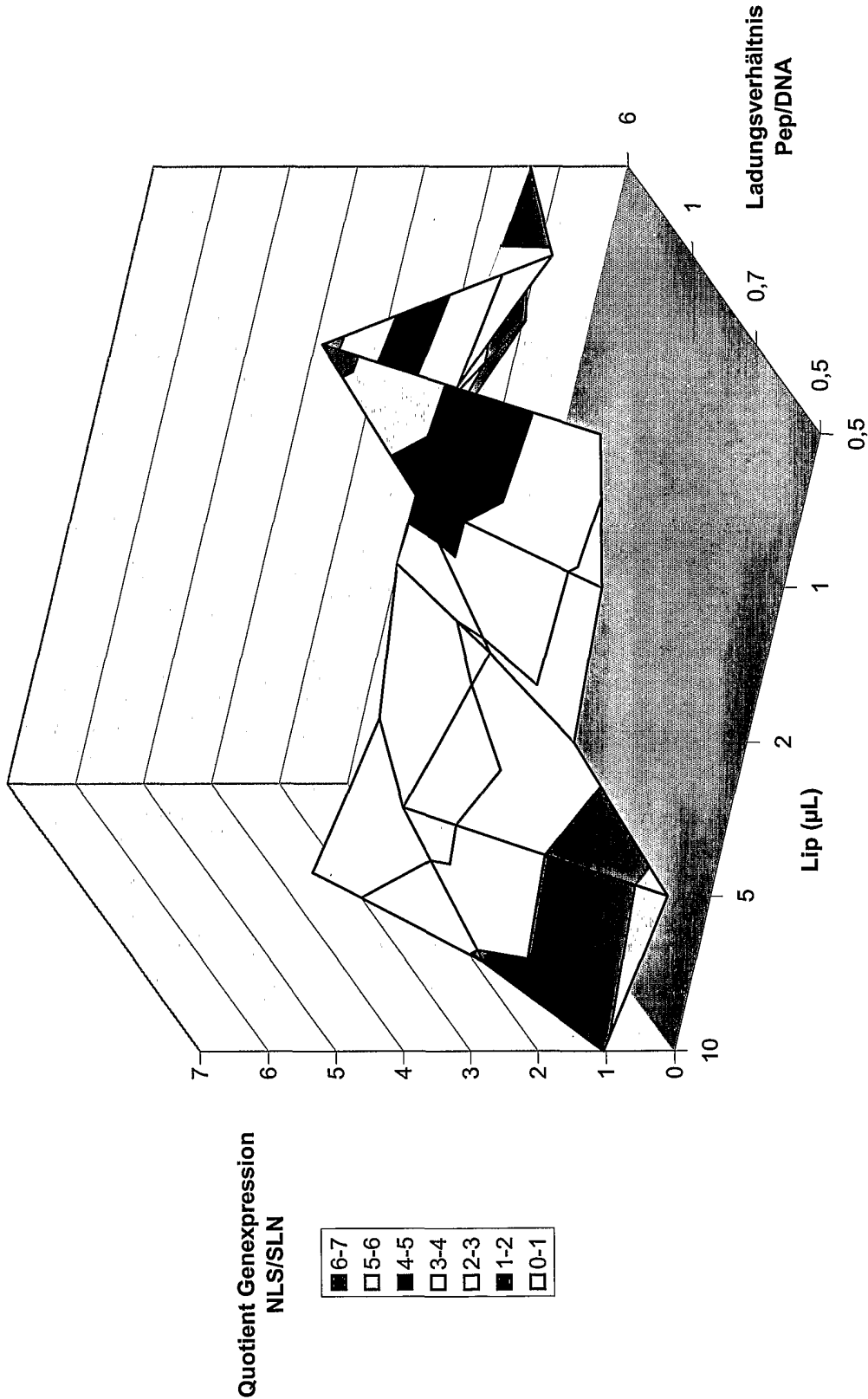


Abbildung 3a

Sequenz-Spezifität der Genexpression
NLS/SLN, 15 Min. Inkubation



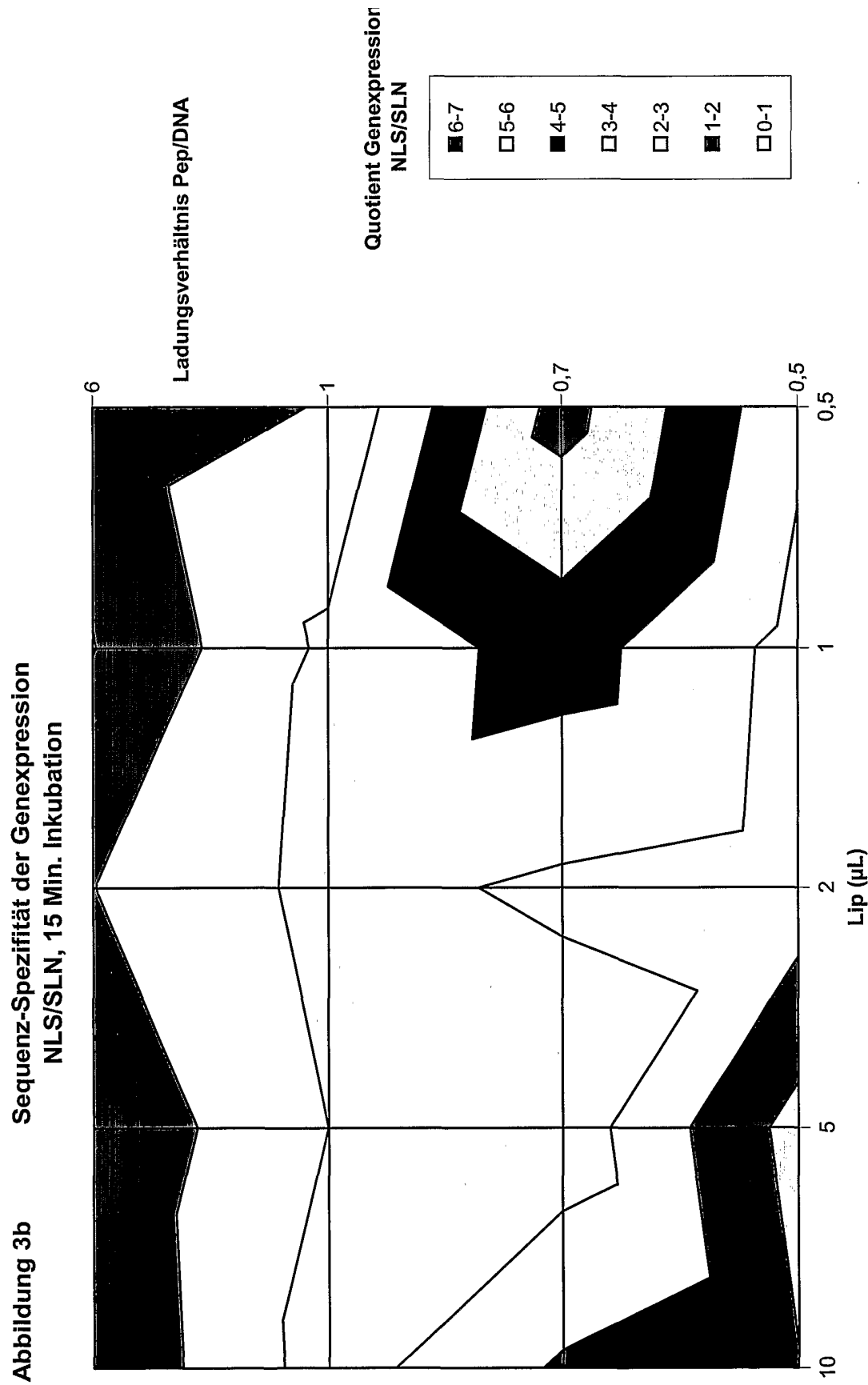


Abbildung 4
Transfektion mit K16-SNL/DNA/Lipofektin-Komplexen

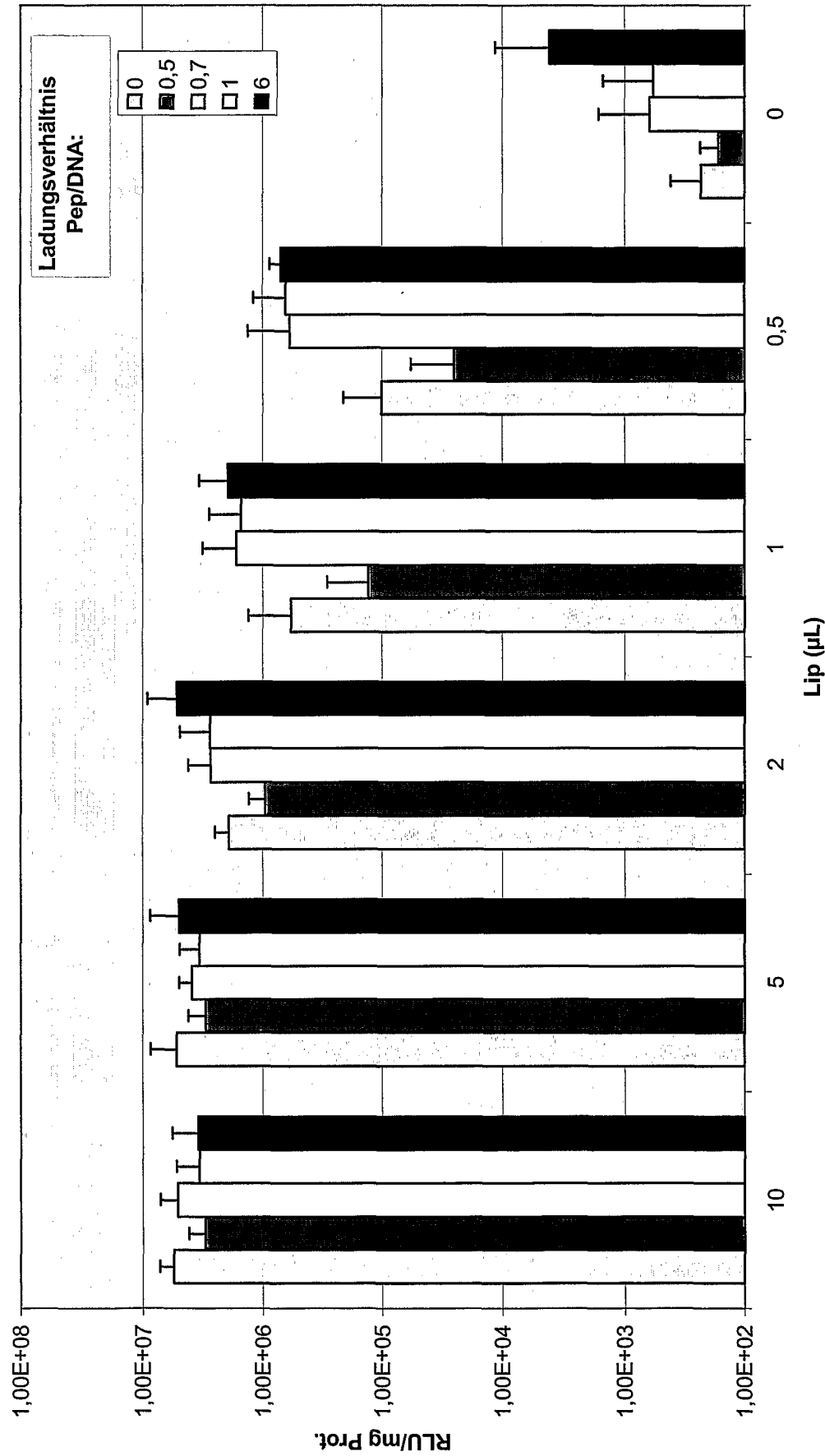


Abbildung 5

Transfektion mit K16-NLS/DNA/Lipofektin-Komplexen

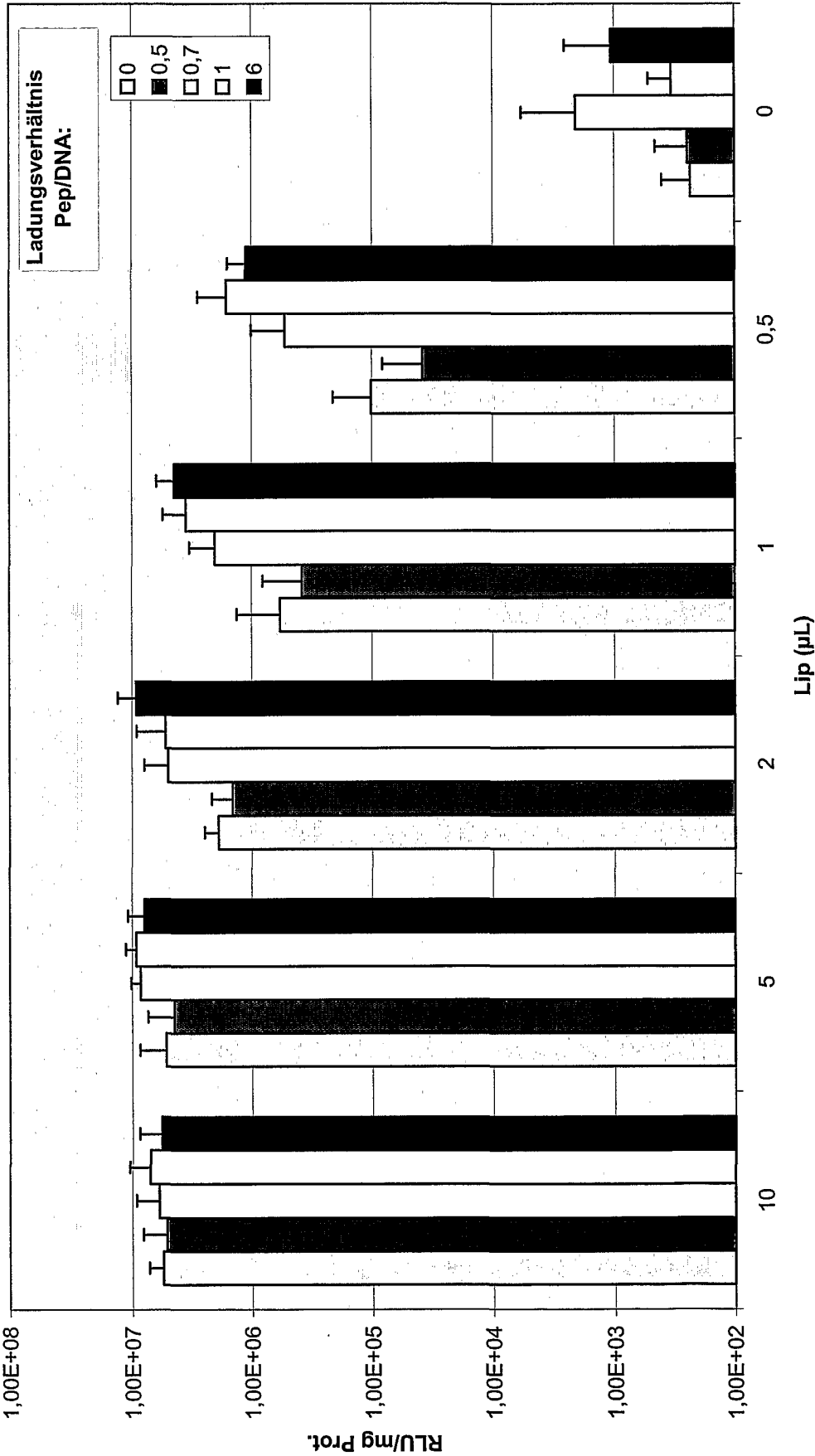


Abbildung 6a

Sequenz-Spezifität der Genexpression
NLS/SLN

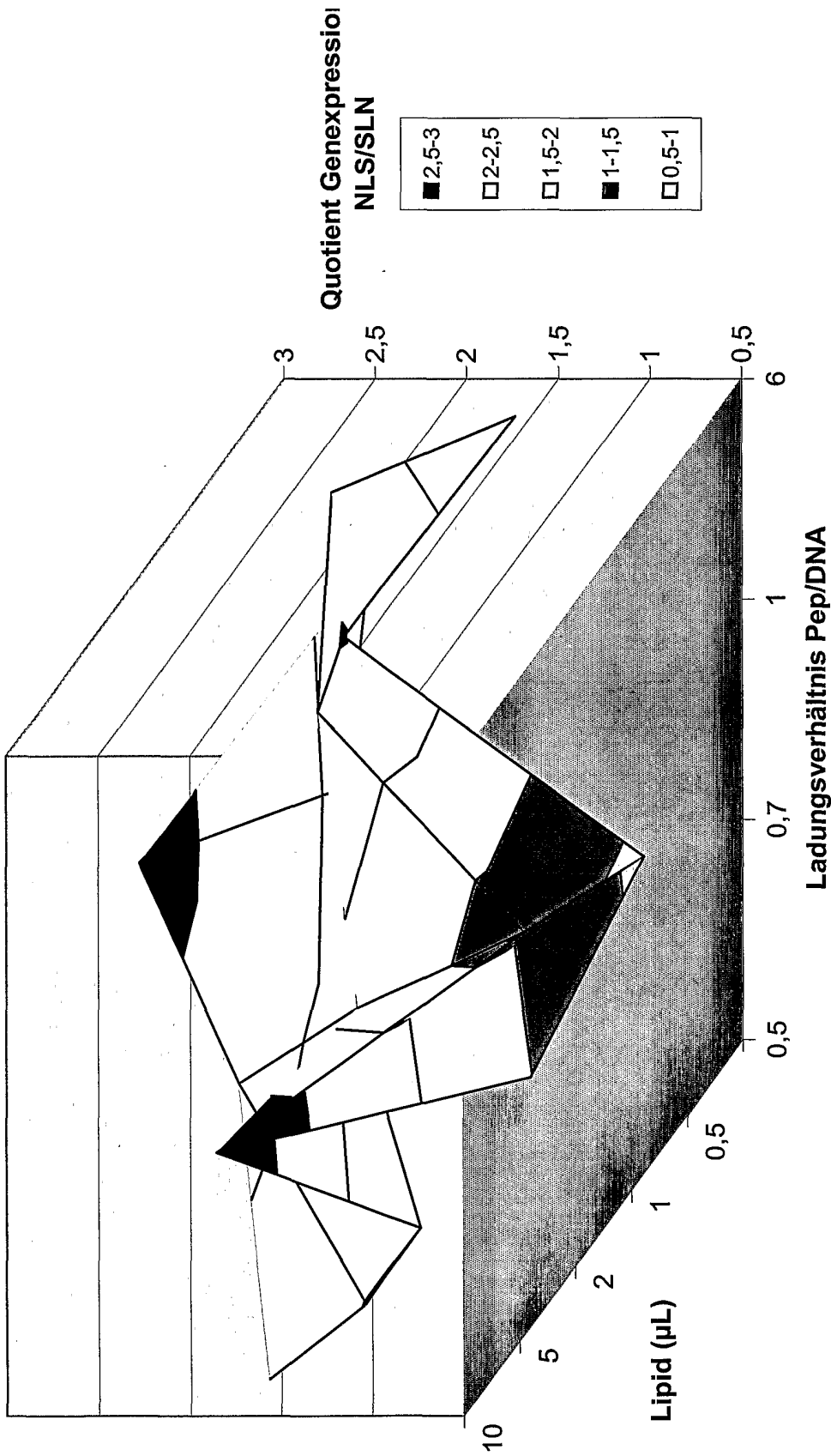


Abbildung 6b

Sequenz-Spezifität der Genexpression
NLS/SLN

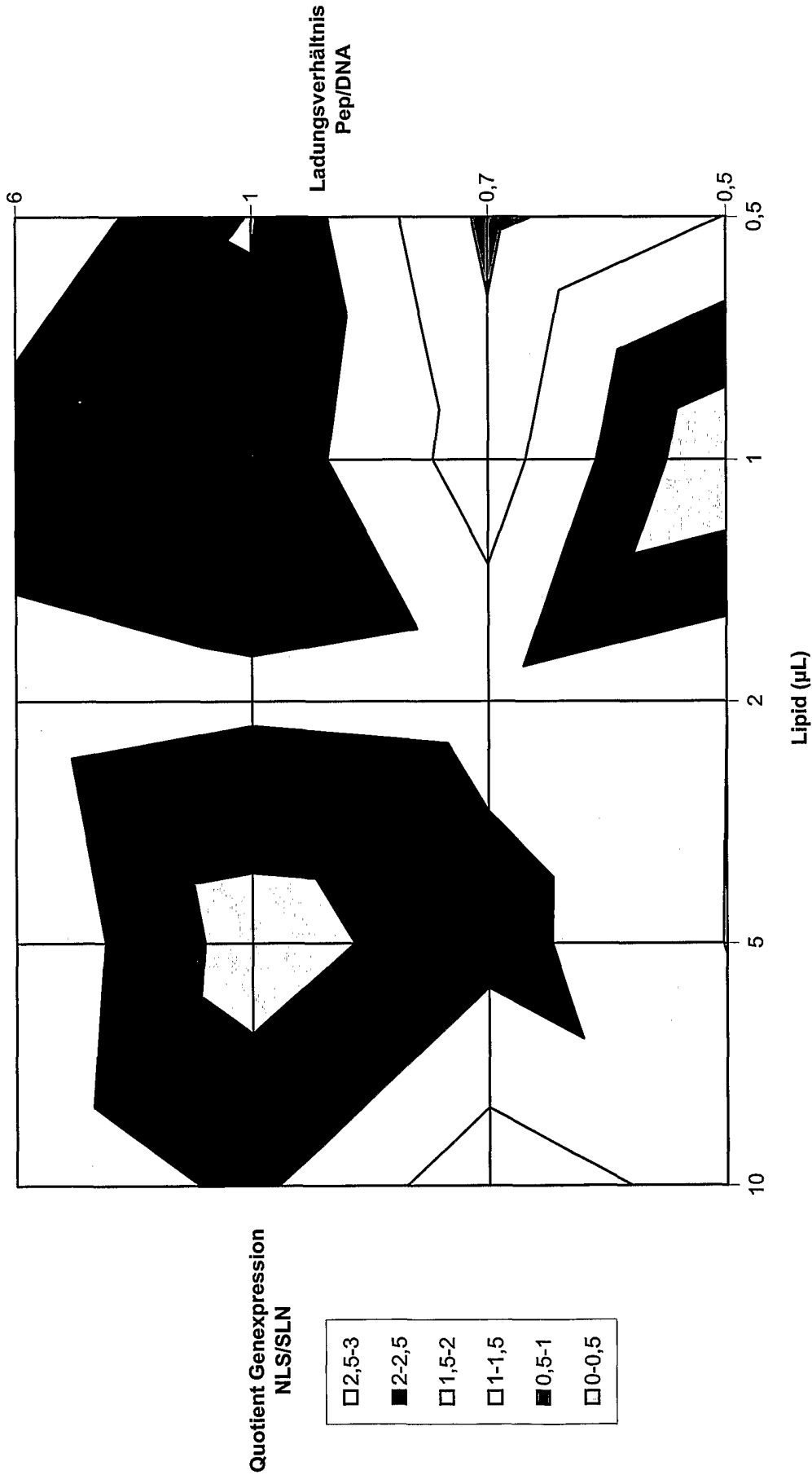


Abbildung 7

Polyplexe mit 0.5 µl Lipofektin

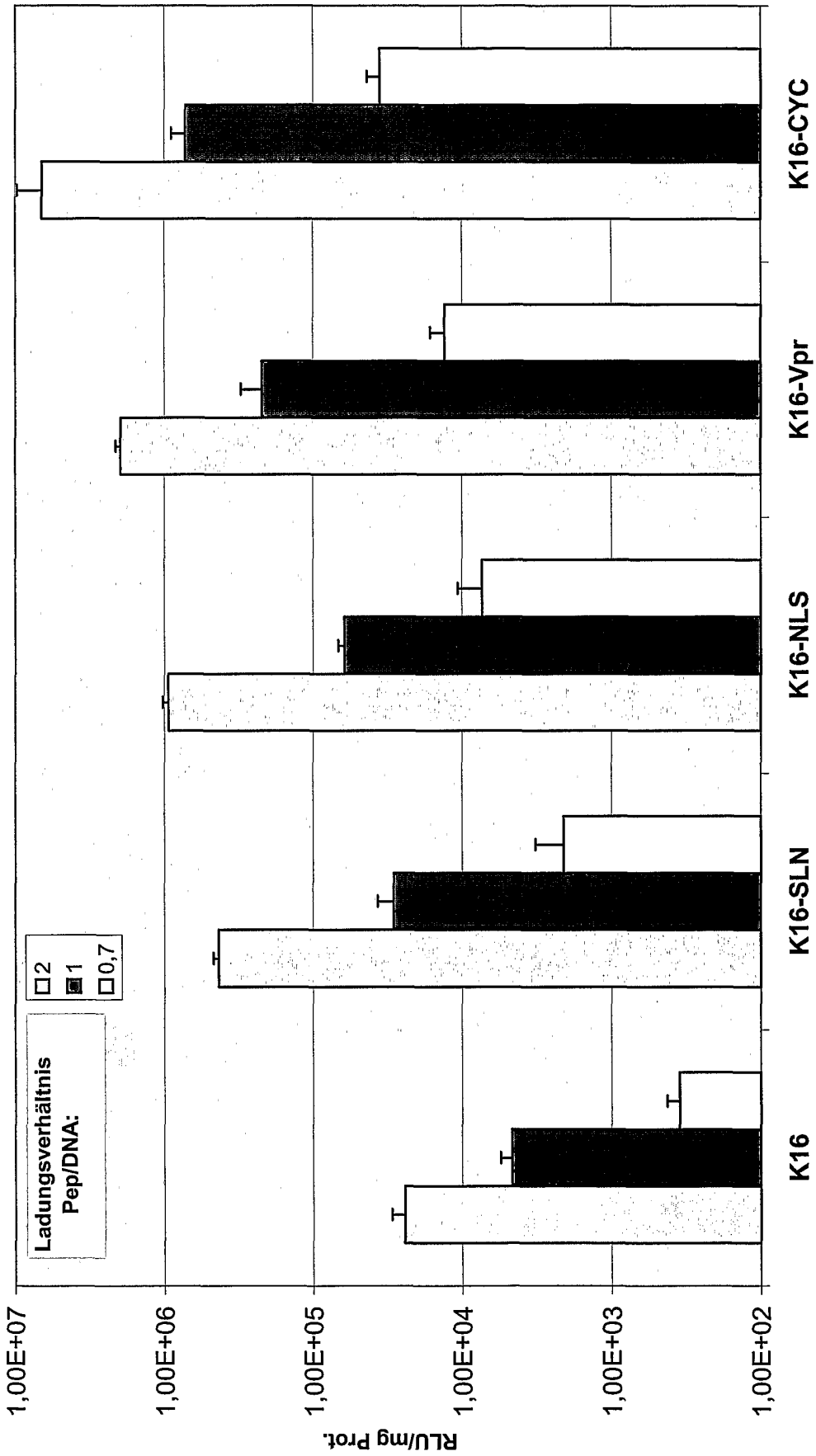


Abbildung 8
Polyplexe mit 1 µl Lipofektin

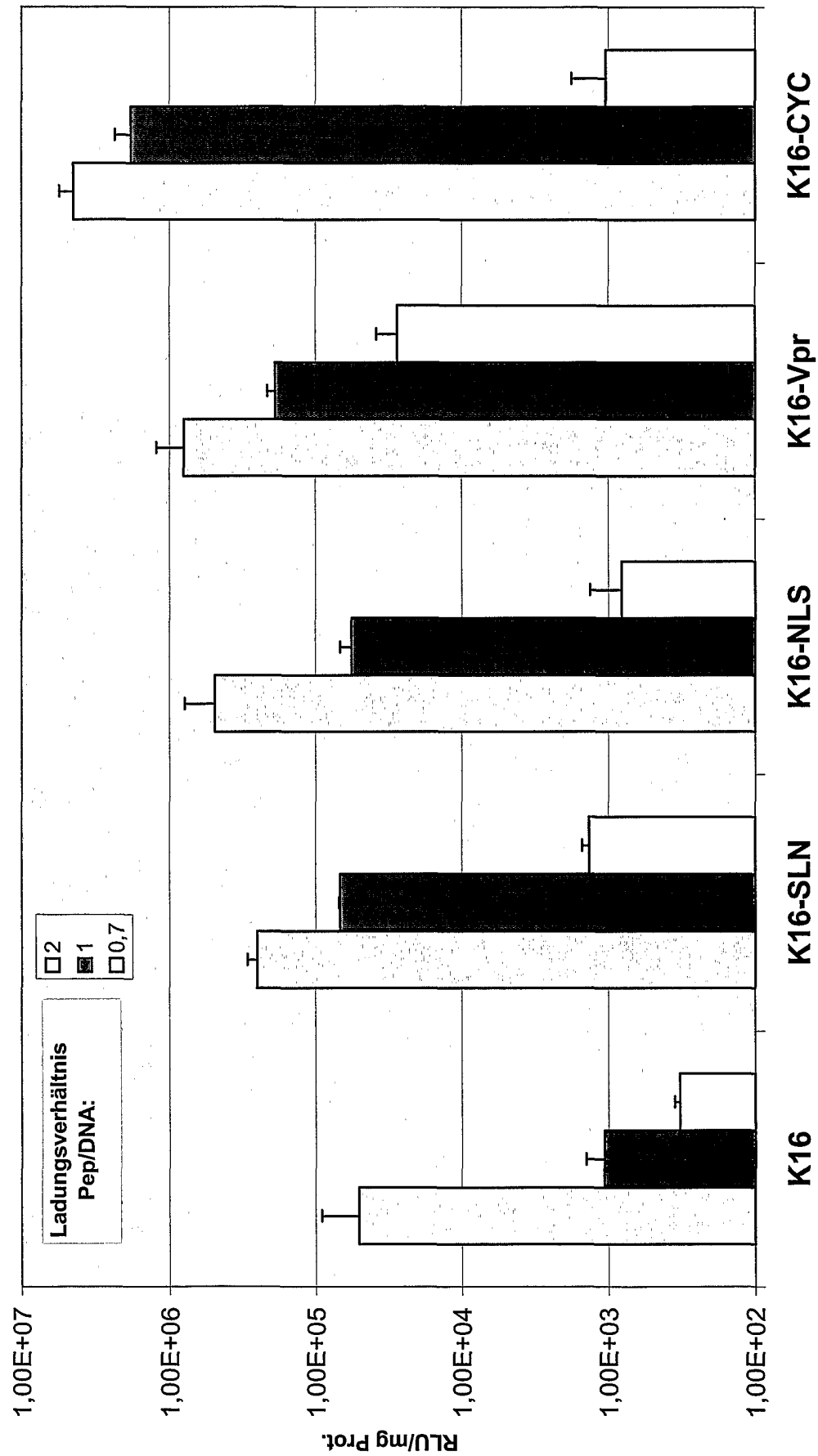
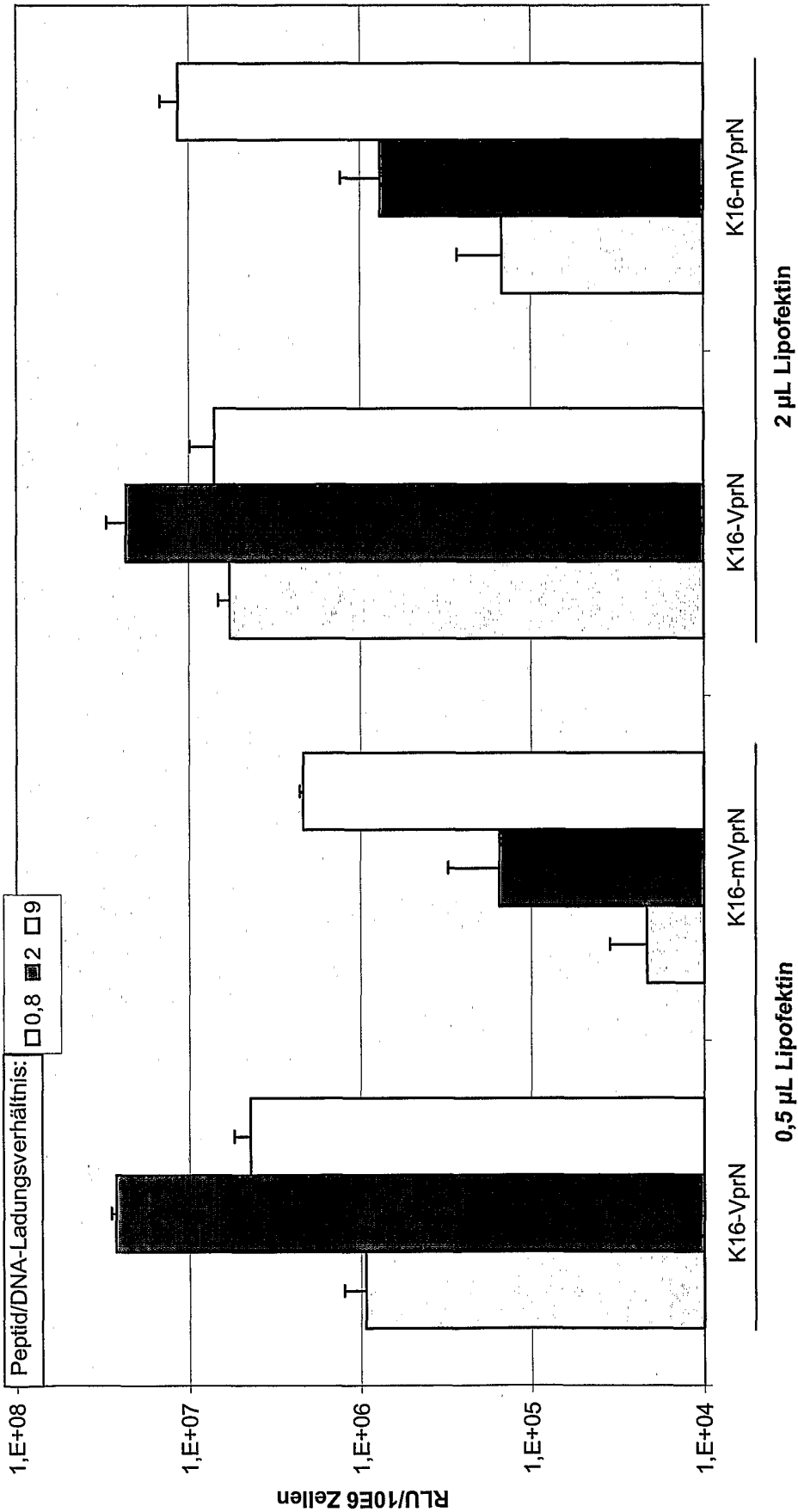


Abbildung 9

Luziferase-Expression



Peptid/DNA-Ladungsverhältnis und Lipid-Menge

Abbildung 10

Luziferase-Expression

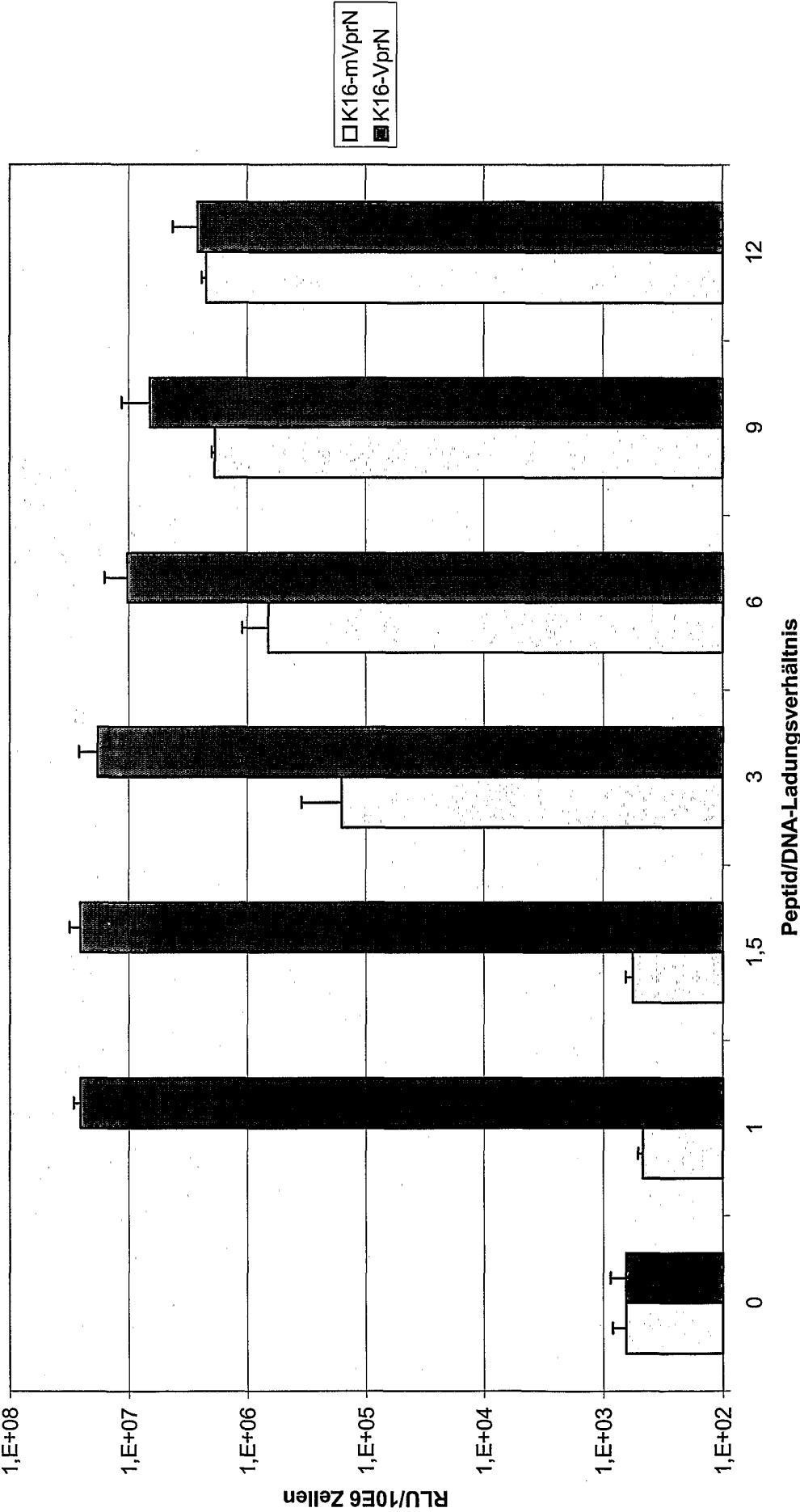


Abbildung 11

Scheinbare Größe

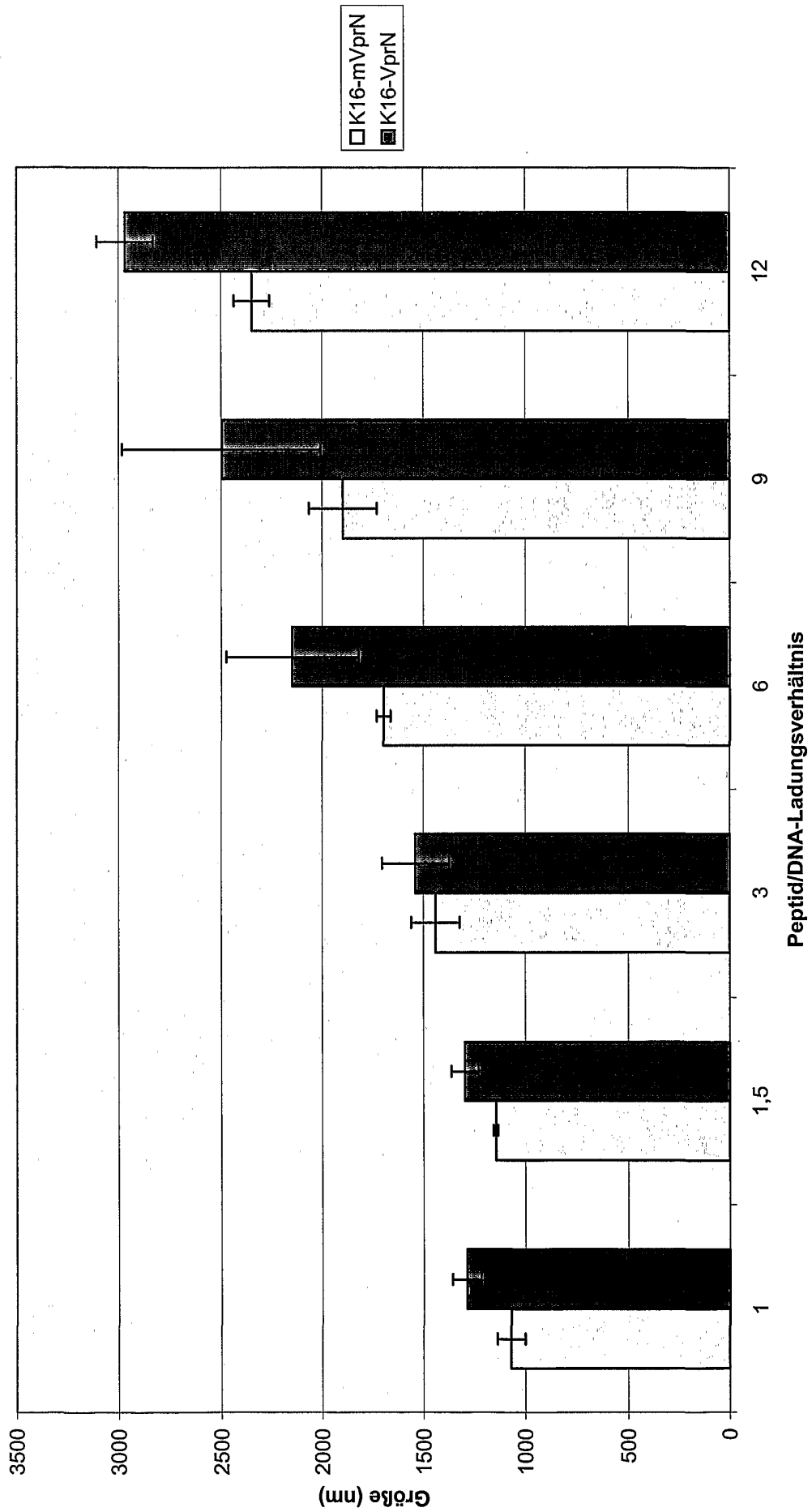


Abbildung 12

Streulicht-Intensität

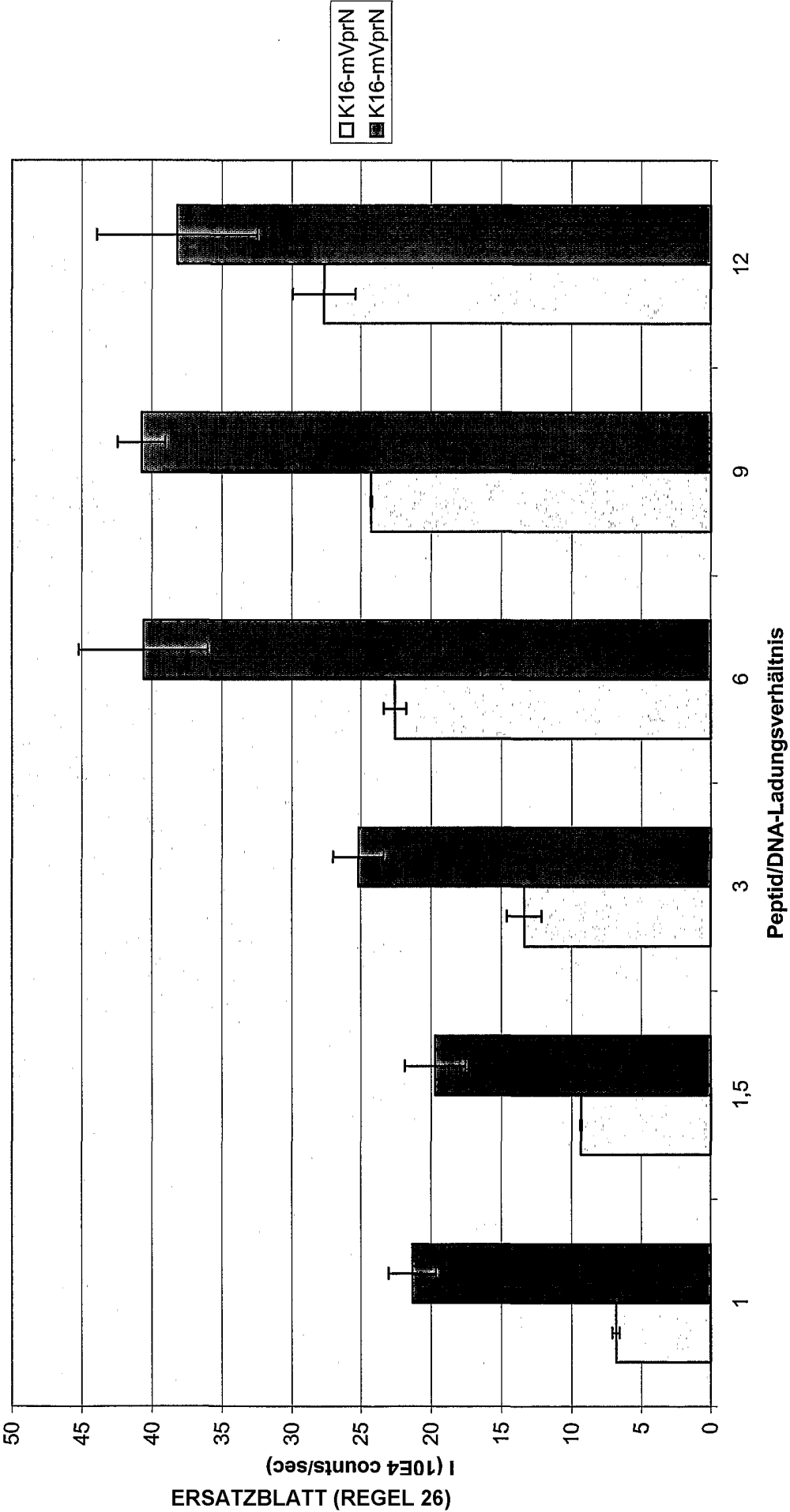


Abbildung 13 K16-mVprN

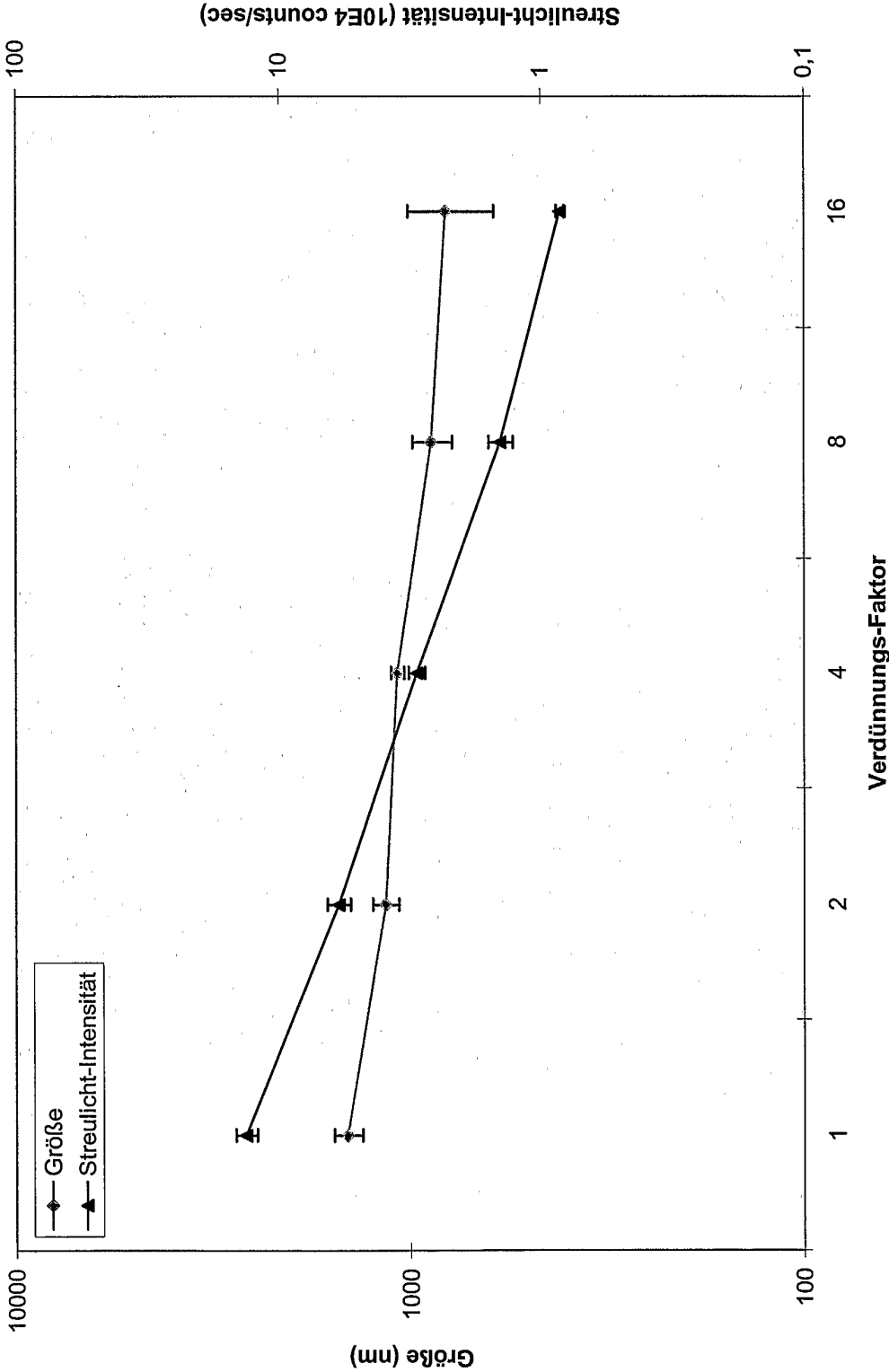
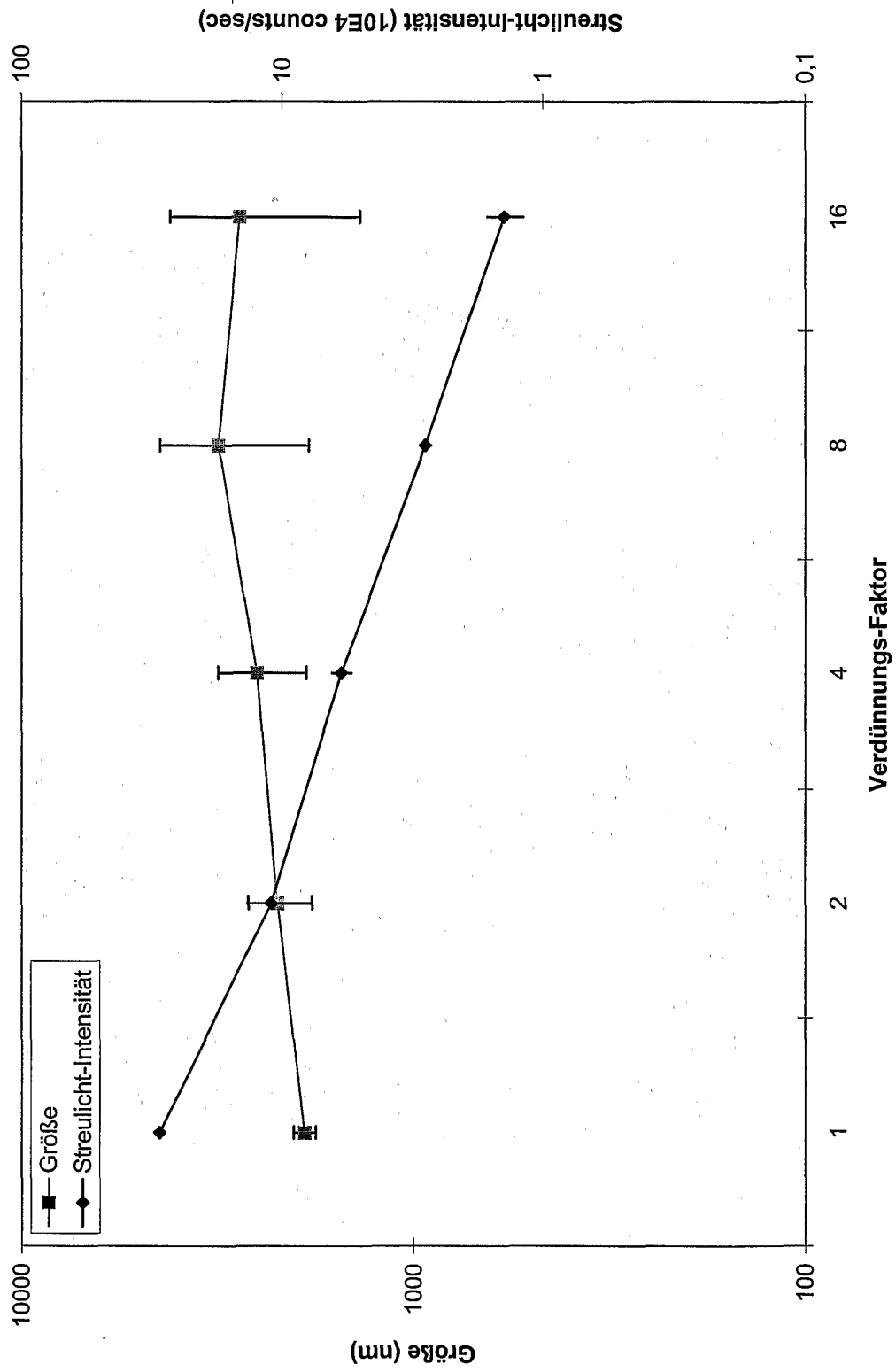


Abbildung 14

K16-VprN



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/02219

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 D06F58/10

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 D06F

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

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

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 094 356 A (INDESIT) 16 November 1983 (1983-11-16) page 9, paragraph 2; figure 1 ---	1-3, 9, 13, 14
A	DE 42 35 560 A (PATENT UND INNOVATIONSAGENTUR) 28 April 1994 (1994-04-28) cited in the application the whole document ---	1, 9, 13
A	US 5 228 211 A (STUBBING THOMAS J) 20 July 1993 (1993-07-20) the whole document ---	1
A	DE 36 32 820 A (BALTES HANS) 7 April 1988 (1988-04-07) cited in the application -----	



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 December 2001

Date of mailing of the international search report

11/12/2001

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

Debard, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In International Application No

FI/DE 01/02219

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0094356	A	16-11-1983	IT 1155193 B DE 3364365 D1 EP 0094356 A1	21-01-1987 07-08-1986 16-11-1983
DE 4235560	A	28-04-1994	DE 4235560 A1 AT 177797 T DE 59309452 D1 DK 594085 T3 EP 0594085 A1 ES 2131548 T3 JP 2527135 B2 JP 6212554 A US 5433919 A	28-04-1994 15-04-1999 22-04-1999 11-10-1999 27-04-1994 01-08-1999 21-08-1996 02-08-1994 18-07-1995
US 5228211	A	20-07-1993	AT 111980 T AU 611983 B2 AU 2716588 A CA 1337152 A1 DE 3851636 D1 DE 3851636 T2 EP 0395685 A1 ES 2015116 A6 FI 91891 B WO 8904392 A1 GB 2209383 A ,B JP 3501813 T NO 177437 B	15-10-1994 27-06-1991 01-06-1989 03-10-1995 27-10-1994 11-05-1995 07-11-1990 01-08-1990 13-05-1994 18-05-1989 10-05-1989 25-04-1991 06-06-1995
DE 3632820	A	07-04-1988	DE 3632820 A1 AT 62817 T CN 87106682 A ,B DE 3769566 D1 EP 0262451 A2 JP 63095056 A SU 1709926 A3 US 4869872 A	07-04-1988 15-05-1991 06-04-1988 29-05-1991 06-04-1988 26-04-1988 30-01-1992 26-09-1989

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In ☐ nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02219

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 D06F58/10

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 D06F

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	EP 0 094 356 A (INDESIT) 16. November 1983 (1983-11-16) Seite 9, Absatz 2; Abbildung 1 ---	1-3,9, 13,14
A	DE 42 35 560 A (PATENT UND INNOVATIONSAGENTUR) 28. April 1994 (1994-04-28) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1,9,13
A	US 5 228 211 A (STUBBING THOMAS J) 20. Juli 1993 (1993-07-20) das ganze Dokument ---	1
A	DE 36 32 620 A (BALTES HANS) 7. April 1988 (1988-04-07) in der Anmeldung erwähnt -----	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

^o 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

4. Dezember 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

11/12/2001

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

Debard, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/02219

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0094356	A	16-11-1983	IT 1155193 B 21-01-1987 DE 3364365 D1 07-08-1986 EP 0094356 A1 16-11-1983
DE 4235560	A	28-04-1994	DE 4235560 A1 28-04-1994 AT 177797 T 15-04-1999 DE 59309452 D1 22-04-1999 DK 594085 T3 11-10-1999 EP 0594085 A1 27-04-1994 ES 2131548 T3 01-08-1999 JP 2527135 B2 21-08-1996 JP 6212554 A 02-08-1994 US 5433919 A 18-07-1995
US 5228211	A	20-07-1993	AT 111980 T 15-10-1994 AU 611983 B2 27-06-1991 AU 2716588 A 01-06-1989 CA 1337152 A1 03-10-1995 DE 3851636 D1 27-10-1994 DE 3851636 T2 11-05-1995 EP 0395685 A1 07-11-1990 ES 2015116 A6 01-08-1990 FI 91891 B 13-05-1994 WO 8904392 A1 18-05-1989 GB 2209383 A ,B 10-05-1989 JP 3501813 T 25-04-1991 NO 177437 B 06-06-1995
DE 3632820	A	07-04-1988	DE 3632820 A1 07-04-1988 AT 62817 T 15-05-1991 CN 87106682 A ,B 06-04-1988 DE 3769566 D1 29-05-1991 EP 0262451 A2 06-04-1988 JP 63095056 A 26-04-1988 SU 1709926 A3 30-01-1992 US 4869872 A 26-09-1989