

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-509354

(P2004-509354A)

(43) 公表日 平成16年3月25日(2004.3.25)

(51) Int.Cl.⁷

GO 1 N 27/447

F I

GO 1 N 27/26 3 1 5 C

GO 1 N 27/26 3 0 1 C

GO 1 N 27/26 3 1 5 F

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2002-528811 (P2002-528811)
 (86) (22) 出願日 平成13年8月30日 (2001.8.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年3月18日 (2003.3.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2001/010036
 (87) 国際公開番号 W02002/025263
 (87) 国際公開日 平成14年3月28日 (2002.3.28)
 (31) 優先権主張番号 100 47 088.2
 (32) 優先日 平成12年9月21日 (2000.9.21)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

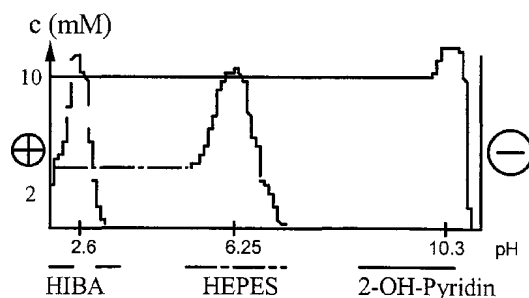
(71) 出願人 592245546
 ゲルハルト ヴェーバー
 ドイツ連邦共和国 8 0 1 1 キルヒハイ
 ム マルガリーテンヴェーク 2 3
 (74) 代理人 100100561
 弁理士 岡田 正広
 (72) 発明者 ゲルハルト ヴェーバー
 ドイツ連邦共和国 8 5 5 5 1 キルヒハ
 イム マルガリーテンヴェーク 2 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析用及び分取用の電気泳動のための媒体

(57) 【要約】

異なる pK_s 値を有する酸及び塩基を含有する分析用及び分取用の電気泳動のための媒体であって、少なくとも2つの酸であって、隣接する酸の pK_s 値 (ΔpK_s) が1より大きくなく、好ましくは0.8~0.5である少なくとも2つの酸と、 pK_s 値が約1.5~1.1の間にある少なくとも2つの塩基であって、隣接する塩基の pK_s 値の差分 (ΔpK_s) が1より大きくなく、好ましくは0.8~0.5である少なくとも2つの塩基とを含有する媒体。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

異なる pK_s 値を有する酸及び塩基を含有する分析用及び分取用の電気泳動のための媒体であって、 pK_s 値が約 3.0 ~ 12 の間にある少なくとも 2 つの酸であって、隣接する酸の pK_s 値の差分 (ΔpK_s) が 1 より大きくなく、好ましくは 0.8 ~ 0.5 である少なくとも 2 つの酸と、 pK_s 値が約 1.5 ~ 11 の間にある少なくとも 2 つの塩基であって、隣接する塩基の pK_s 値の差分 (ΔpK_s) が 1 より大きくなく、好ましくは 0.8 ~ 0.5 である少なくとも 2 つの塩基とを含有することを特徴とする媒体。

【請求項 2】

少なくとも 3 つの酸及び 3 つの塩基を含有することを特徴とする、請求項 1 記載の媒体。 10

【請求項 3】

酸の相対的及び絶対的濃度が増大する pK_s 値と共に連続的に増加し、かつ塩基の相対的及び絶対的濃度が増大する pK_s 値と共に減少し、いつも最も強い酸及び塩基の濃度と比較して、より弱い酸及び / 又はより弱い塩基の濃度が、1 ~ 3 の範囲の pK_s 値間の僅かな差分の場合には係数 1.5 ~ 3 だけ増加され、他方、3 ~ 8 の範囲の pK_s 値間の大きい差分の場合には、より弱い酸及び塩基の相対的濃度が係数 4 ~ 8 まで増加されることを特徴とする、請求項 1 又は 2 記載の媒体。

【請求項 4】

電気泳動移動完了後に隣接した pH 値単位あたり、酸 / 塩基対が形成され、前記対がそれぞれの酸及びそれぞれの塩基の pK_s 値の算術平均値に相当する pH 値を発生することを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の媒体。 20

【請求項 5】

個々の酸及び塩基の濃度が、十分な緩衝液容量の調整及び維持のために電気泳動移動完了後の平衡状態で選択されることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の媒体。

【請求項 6】

より狭い pH 間隔の調整のために、酸及び塩基の絶対濃度が増加され、必要な場合は、酸及び塩基の ΔpK_s 値が酸及び塩基の適切な選択によって縮小されることを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の媒体。

【請求項 7】

それぞれ使用した酸及び / 又は塩基の分子量が 300 ダルトン (Dalton) より小さいことを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項記載の媒体。 30

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、分析用及び分取用の電気泳動のための媒体に関する。

高压電気泳動に際して pH 勾配を形成するような水溶液は、大規模にタンパク質及びペプチドの分析に使用される。前記のような公知の溶液は、両性の性質を有する多価電解質を含有し、常法の合成で不飽和カルボン酸類とポリアミン類の縮合及び / 又は重合によって製造される。この合成の結果、異なる分子量とさまざまな数の酸性基 (カルボキシル基) 及び塩基性基 (アミノ基及び / 又はイミノ基) の多数の化合物が生成する。高压電気泳動の条件下に、これらの多価電解質は、酸性及び塩基性の基の異なる比率に基づいて、特に 40 酸性の性質を有する前記多価電解質が陽極の近傍領域に濃縮され、全ての他の多価電解質が酸性もしくは塩基性の性質の「序列」に従って電極の間に配列され且つその際にも濃縮されるように、配列される。個々の種の酸性及び / 又は塩基性の性質に従って多価電解質の選択的富化によって、pH 勾配が全水溶液の内部で発生される。

【0002】

前記 pH 勾配を利用して、タンパク質及びペプチドのような両性化合物を異なる酸性及び / 又は塩基性の性質に従って分離することができる。この分析分離方法は文献において「等電点電気泳動」(“Isoelektrische Fokussierung”)と呼ばれる。この方法が特異的ゲル (ポリアクリルアミド) で実施される場合、この方法は P A G I E F (ポリアクリルアミドゲル上の等電点電気泳動) と呼ばれ、標準方法と考え 50

られる。

【0003】

商慣習上の両性電解質の合成時に使用された不飽和酸、たとえば置換されたアクリル酸は高毒性であり、その残留含有分が非常に問題があると考えられる。

【0004】

この理由から商業上の両性電解質の使用は、後にヒトに投与されるべきタンパク質類の洗浄に対して禁止されている。

【0005】

両性電解質の合成時に、未知の構造の多数の化学種が形成され、それらの相対的濃度はそれぞれのバッチに応じて強く変化しうる。しかしそれによって、分析結果の再現性が負の影響を受ける。 10

【0006】

特別の応用において、両性電解質と分析電解質との望ましくない錯体形成の結果として「人口バンド」(“artifizielle Banden”)が報告されている。

【0007】

より高い分子量を有する両性電解質によるタンパク質類の分析染色反応の部分的妨害も同様に報告されている。特定の製造者の製品中の、 $MG > 10KD$ を有する両性電解質の異常に高い割合については幾度も報告された。

【0008】

タンパク質類の分取洗浄の場合において、両性電解質の連続分離は困難であり、時々不完全である；疑われる原因として、錯体形成が推測されている。 20

【0009】

商業上の両性電解質は、生物粒子がこれら媒体において凝集するので、生物粒子用の分離媒体として適していないことが証明された。

【0010】

本発明の目的は、上記欠点を有さず、かつその適用範囲がそれによって著しく拡大される、異なる pK_s 値の酸及び塩基を含有する等電点電気泳動(IEF)用の水溶液を提供することである。

【0011】

本発明の目的は、請求項1記載の水溶液によって達成される。その他の有利な形態は、続く請求項2ないし7に記載される。 30

【0012】

本発明による水溶液は、段階付きの「酸性度」及び/又は「塩基性度」を有する酸及び塩基の混合物を含有する。個々の酸の pK_s 値は、 $pK_s 3.5 \sim pK_s 12$ の範囲内で変化し、「隣接する(benachbarten)」酸の pK_s 値の差分(ΔpK_s)は、 $\Delta pK_s = 1$ より大きくてはならない。 $\Delta pK_s < 0.8$ の値が理想的と考えられる。

【0013】

使用される塩基の pK_s 値は、 $pK_s = 1.5 \sim pK_s = 11$ の範囲内で変化する。個々の塩基の値の差分は、 $\Delta pK_s < 0.8$ が満たされたとき、理想的である。

【0014】

使用される酸及び/又は塩基の数とそれらの相対的濃度が、pH勾配の範囲(Spanne)とプロフィル(Profile)を決定する。最小数はそれぞれ2つの酸及び/又は2つの塩基であり、好ましくは3つの酸及び/又は3つの塩基になる。広いpH範囲(pH 2.5 ~ 10)の場合に、段階付きの pK_s 値を有する11の酸及び13の塩基が使用される。 40

【0015】

添付の図1~3にそれぞれ3つの典型的な酸及び塩基のモデル例を用い電気泳動移動後のそこから生じるpH勾配の形成が描かれる。次の酸：ヒドロキシ酪酸(HIBA: $pK_s = 3.8$)、HEPES($pK_s = 7.5$)及び2-ヒドロキシピリジン($pK_s = 11.6$)、及び次の塩基：タウリン($pK_s = 1.5$)、メラミン($pK_s = 5$)及びアメ 50

ジオール (Ammediol) ($pK_s = 9$) は、異なる濃度で出発溶液中に存在する (図 1 参照)。一般的規則として、非常に弱い酸及び非常に弱い塩基の相対的濃度が、相対的に強い酸及び塩基の濃度に比べて明らかに高い (係数約 5)。「適度な強さ」の酸及び塩基の濃度は、係数約 1.5 ないし最大 3 だけ増加されている。

【0016】

図 2 及び 3 に、電気泳動移動後の上記酸及び塩基の相対的濃度を表す。表示した「平衡状態」で酸及び塩基の「対」が形成され、前記対が相互に非常に少ない程度でイオン化することができ (強い酸: HIBA + 非常に弱い塩基: タウリン、弱い酸: HEPES + 弱い塩基: メラミン、及び強い塩基: アメジオール + 非常に弱い酸: 2-OH-ピリジン)、かつそれによって媒体固有の物質の電気泳動移動が停止する。この対の範囲内で、それぞれ酸及び塩基の pK_s 値の算術平均値に相当する pH 値が作られる。それにより、これらの対の pH 値は次のようになる: HIBA / タウリン溶液 $pH = 2.6$ 、HEPES / メラミン $pH = 6.25$ 、2-OH-ピリジン / アメジオール $pH = 10.3$ 。一つの対が安定した pH 値を保証できる pH 範囲は、約 1 pH 単位である。種々の pK_s 値を有する全ての他の酸及び塩基は、個々の酸及び塩基の絶対濃度が平衡状態で十分な緩衝液容量を保証する限りにおいて、同様に 1 pH 単位の内部で安定した pH 値を保証する対を形成する。

10

【0017】

本発明による溶液は、性質が詳細に知られている定義の明確な化学物質からなる。全混合物の再現性は、製造に使用される秤の精密度及び / 又は正確度によって保証されている。使用される物質類は毒性がない。使用した物質類の各々は「単官能性」であり、すなわち錯体形成及び / 又はバイオポリマーの凝集のような作用は全く起こらないか、又は複数の官能基群を有する多価電解質と比較して少なくとも明らかに低減されている。この混合物の全ての個々の種の分子量は < 300 ダルトン (Dalton) になる。

20

【0018】

本発明による水溶液は、すでに成功裡にバイオポリマー及び生物粒子用の分離媒体としてテストされ、生物両立性があることが明らかとなった。大抵の個々の種は類似の pK_s 値を有する化学物質と置換してよいので、生物粒子の分離媒体に対する特異的要求事項は混合物の組成の変化によって考慮することができる。この理由から、後のヒト投与のための生物粒子及びバイオポリマー (ペプチド類及びタンパク質類) の洗浄用の前記溶液の官庁

30

【0019】

以下、種々の pH 間隔を有する本発明による水溶液のいくつかの例を示す。この場合、より狭い pH 間隔用の媒体の製造に際して、酸及び塩基の絶対濃度が増加されることに注意すべきである; 通常、 pK_s 値の差分は新規の成分の使用によって縮小される。

【0020】

【表 1】

例 1

(pH 間隔 3 ~ 10)

酸	pK _s	c (mMol)	塩基	pK _s	c (mMol)	
ヒドロキシイソ酪酸	4.0	1.5	ベタイン	1.8	10	
ピバリン酸	5.0	5.0	2-アミノ酪酸	2.3	10	10
ピコリン酸	5.5	2	クレアチン	2.7	10	
MES	6.1	4	ニコチン酸アミド	3.1	8	
MOPSO	6.9	2	Pip. - 4 -			
			カルボン酸	3.5	3	
HEPES	7.5	2	EACA	4.4	2	
EPBS	8.0	2	メラミン	5.0	2	20
TAPS	8.3	3	ヒドロキシエチル			
			ピリジン	5.3	2	
			ヒスチジン	6.0	3	
AMPSO	9.0	6	BISTRIS	6.5	3	
CAPSO	9.6	8	ヒドロキシエチル			
			モルホリン	7.1	3	30
CAPS	10.3	9	トリエタノールアミン	7.8	2	
CABS	10.8	10	TRIS	8.3	2	
2-ヒドロキシ-			アメジオール	9.0	2	
ピリジン	11.6	10				

【 0 0 2 1 】

【 表 2 】

例 2

(pH 間隔 4 ~ 6)

ピバリン酸	5.0	5	クレアチン	2.7	30	
ピコリン酸	5.5	10	グリシルグリシン	3.1	20	
M E S	6.1	20	P i p. - 4 -			
			カルボン酸	3.5	10	10
M O P S O	6.9	30	G A B A	4.2	10	
			E A C A	4.4	5	

【 0 0 2 2 】

【 表 3 】

例 3

(pH 間隔 5. 5 ~ 7. 5)

M O P S O	6.9	10	E A C A	4.4	15	
M O P S	7.2	10	クレアチン	4.8	15	
H E P E S	7.5	15	ヒドロキシエチル			
			ピリジン	5.4	10	
E P P S	8.0	15	β -ピコリン	5.8	10	
T A P S	8.3	20	B I S T R I S	6.5	5	30

【 0 0 2 3 】

【 表 4 】

例4

(pH間隔8~11.5)

TAPS	8.3	3	イミダゾール	7.0	15	
AMPSO	9.0	5	トリエタノールアミン	7.8	12.5	
CAPSO	9.6	7.5	TRIS	8.3	12.5	
GABA	10.2	10	アメジオール	8.8	10	10
EACA	10.6	10	ヒドロキシエチル			
			エチレンジアミン	9.8	7.5	
4-ヒドロキシー			ジエチルアミノ			
ビリジン	11.2	7.5	エチレンジアミン	10.2	n5	
2-ヒドロキシー			トリエチルアミン	10.8	5	
ビリジン	11.6	7.5	ジメチルピペリジン	11.2	3	20

【0024】

【表5】

例5

(pH間隔2.5~5)

クエン酸	3.2	5	ベタイン	1.8	20	
HIBA	4.0	10	2-アミノ酪酸	2.2	20	30
イソ酪酸	4.5	15	クレアチン	2.7	15	
ピコリン酸	5.5	20	グリシルグリシン	3.1	10	
MES	6.1	20	Pip. - 4 -			
			カルボン酸	3.6	10	
			GABA	4.2	5	

40

【0025】

上記媒体において、広範囲に線形のpH勾配が発生される。pHプロファイルは、酸及び塩基の相対的濃度が変化されることによって、一定のpH範囲内で平坦化することができる。本発明による溶液の製造において、通常の場合、個々の化合物の添加の順序は重要ではない。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1~3は、3つの典型的な酸及び塩基のモデル例を用いた場合の電気泳動移動後に生じるpH勾配の形成を示す図であり、図1は、酸としてのヒドロキシ酪酸(HIBA)、HEPES及び2-ヒドロキシピリジン、及び塩基としてのタウリン、メラミン及

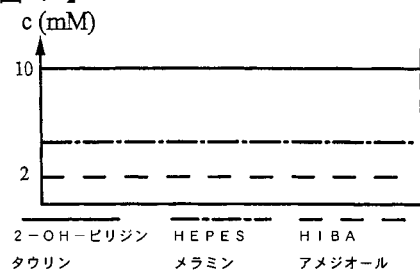
50

びアメジオールが、異なる濃度で出発溶液中に存在することを示す図である。

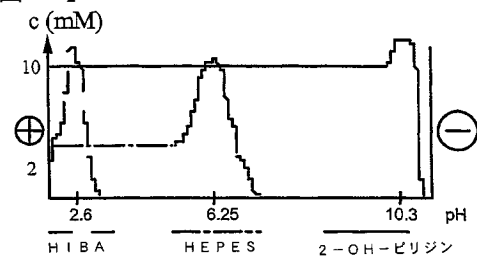
【図 2】電気泳動移動後の上記酸の相対的濃度を示す図である。

【図 3】電気泳動移動後の上記塩基の相対的濃度を示す図である。

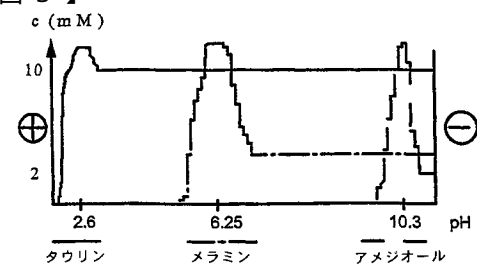
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【国際公開パンフレット】

(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
28. März 2002 (28.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/25263 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 27/447
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10036
- (22) Internationales Anmeldedatum:
30. August 2001 (30.08.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 47 088.2 21. September 2000 (21.09.2000) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: WEBER, Gerhard (DE/DE); Margeritenweg
23, 85551 Kirchheim (DE).
- (74) Anwalt: WILHELM, KILIAN & PARTNER, Eduard-
Schmid-Strasse 2, 81541 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MEDIUM FOR ANALYTIC AND PREPARATIVE ELECTROPHORESIS

(54) Bezeichnung: MEDIUM FÜR ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE ELEKTROPHORESE

(57) Abstract: The invention relates to a medium for analytic and preparative electrophoresis comprising a content of acids and bases of different pK_a values. Said medium contains at least two acids, whose pK_a values (delta pK_a) of adjacent acids are no greater than 1.0 but preferably range from 0.8 to 0.5, and contains at least two bases, whose pK_a values range from approximately 1.5 to 11, whereby the difference of the pK_a values (delta pK_a) of adjacent bases is no greater than 1.0 but preferably ranges from 0.8 to 0.5.

(57) Zusammenfassung: Medium für analytische und präparative Elektrophorese mit Gehalt an Säuren und Basen unterschiedlicher pK_a -Werte, wobei der Gehalt an mindestens 2 Säuren, deren pK_a -Werte (Delta pK_a) benachbarter Säuren nicht größer als 1, bevorzugt 0,8 bis 0,5 ist und mindestens zwei Basen, deren pK_a -Werte zwischen etwa 1,5 bis 11 liegen, wobei die Differenz der pK_a -Werte (Delta pK_a) benachbarter Basen nicht größer als 1, bevorzugt 0,8 bis 0,5 ist.

WO 02/25263 A2

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

Medium für analytische und präparative Elektrophorese

Die Erfindung betrifft ein Medium für analytische und präparative Elektrophorese.

Derartige wässrige Lösungen, die unter Hochspannungselektrophorese einen pH-Gradienten bilden, werden in großem Umfang in der Analytik von Proteinen und Peptiden verwendet. Derartige bekannte Lösungen enthalten Polyelektrolyte mit amphoteren Eigenschaften und werden üblicherweise synthetisch durch Kondensation bzw. Polymerisation von Polyaminen mit ungesättigten Carbonsäuren hergestellt. Bei dieser Synthese entsteht eine Vielzahl von Verbindungen unterschiedlichen Molekulargewichts und unterschiedlicher Anzahl von sauren Gruppen (Carboxyl-Gruppen) und basischen Gruppen (Amino- bzw. Iminogruppen). Unter den Bedingungen der Hochspannungselektrophorese ordnen sich diese Polyelektrolyte aufgrund des unterschiedlichen Verhältnisses der sauren und basischen Gruppen derart an, daß diese Polyelektrolyte mit besonders sauren Eigenschaften im Nahbereich der Anode konzentriert und alle weiteren Polyelektrolyte gemäß der "Rangordnung" der sauren bzw. basischen Eigenschaften zwischen den Elektroden angeordnet und dabei auch konzentriert werden. Durch die selektive Anreicherung der Polyelektrolyte gemäß den sauren bzw. basischen Eigenschaften der einzelnen Spezies wird ein pH-Gradient innerhalb der gesamten wässrigen Lösung erzeugt.

Mittels dieses pH-Gradienten können amphotere Verbindungen wie Proteine und Peptide nach den unterschiedlichen sauren bzw. basischen Eigenschaften getrennt werden. Dieses analytische Trennverfahren wird in der Literatur als "Isoelektrische Fokussierung" bezeichnet. Wird dieses Verfahren in einem speziellen Gel (Polyacrylamid) durchgeführt, so wird dieses Verfahren als PAGIEF (IEF auf Polyacrylamidgel) bezeichnet und gilt als das Standardverfahren.

Die bei der Synthese der handelsüblichen Ampholyte

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

- 2 -

verwendeten ungesättigten Säuren, z.B. substituierte Acrylsäuren, sind hochgiftig und deren Restgehalt wird als sehr bedenklich angesehen.

Aus diesem Grund ist die Verwendung von kommerziellen Ampholyten zur Reinigung von Proteinen verboten, die später human appliziert werden sollen.

Bei der Synthese der Ampholyte entsteht eine Vielzahl chemischer Spezies unbekannter Struktur, deren relative Konzentration je nach Batch stark variieren kann. Dadurch wird aber die Reproduzierbarkeit der analytischen Ergebnisse negativ beeinflusst.

Bei bestimmten Applikationen werden über "artifizielle Banden" als Folge einer unerwünschten Komplexbildung zwischen Ampholyt und Analyt berichtet.

Über die teilweise Störung der analytischen Färbereaktion der Proteine durch Ampholyte mit höherem Molekulargewicht wird ebenfalls berichtet. Über einen ungewöhnlich hohen Anteil von Ampholyten mit MG >10 KD in Produkten bestimmter Hersteller wurde mehrmals berichtet.

Im Falle einer präparativen Reinigung von Proteinen ist die nachfolgende Abtrennung des Ampholyten schwierig und manchmal unvollkommen; als mögliche Ursache wird hier Komplexbildung vermutet.

Kommerzielle Ampholyte haben sich als Trennmedien für Biopartikel als nicht geeignet erwiesen, da die Biopartikel in diesen Medien aggregieren.

Aufgabe der Erfindung ist es, wässrige Lösungen für isoelektrische Fokussierung (IF) mit Gehalt an Säuren und Basen unterschiedlicher pK_s Werte zur Verfügung zu stellen, die die aufgezeigten Nachteile nicht aufweisen, und deren Anwendungsbereich dadurch erheblich verbreitert wird.

Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch die wässrige Lösung nach Anspruch 1 gelöst. Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den nachfolgenden Ansprüchen 2 bis 7.

Die erfindungsgemäße wässrige Lösung enthält ein Gemisch von Säuren und Basen mit abgestufter "Acidität" bzw.

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

- 3 -

"Basizität". Die pK_s -Werte der einzelnen Säuren variieren im Bereich von pK_s 3.5 bis pK_s 12 und die Differenzen der pK_s -Werte (ΔpK_s) der "benachbarten" Säuren sollen nicht größer sein als $\Delta pK_s = 1$. Als ideal gilt ein Wert von $\Delta pK_s < 0.8$.

Die pK_s -Werte der verwendeten Basen variiert im Bereich von $pK_s = 1.5$ bis $pK_s = 11$. Die Differenzen der Werte der einzelnen Basen sind ideal, wenn $\Delta pK_s < 0.8$ erfüllt ist.

Die Anzahl der verwendeten Säuren bzw. der Basen und deren relative Konzentrationen bestimmen die Spanne und das Profil des pH-Gradienten. Die Mindestanzahl beträgt je 2 Säuren bzw. 2 Basen, bevorzugt 3 Säuren bzw. 3 Basen. Im Falle eines weiten pH-Bereichs (pH 2.5 bis 10) werden 11 Säuren und 13 Basen mit abgestuften Werten des pK_s verwendet.

In den beiliegenden Figuren 1 bis 3 wird am Modellbeispiel von je 3 typischen Säuren und Basen die elektrophoretische Wanderung und daraus resultierend die Bildung des pH-Gradienten beschrieben. Folgende Säuren: Hydroxybuttersäure (HIBA ($pK_s = 3.8$), HEPES ($pK_s = 7.5$) und 2-Hydroxypyridin ($pK_s = 11.6$) und folgende Basen: Taurin ($pK_s = 1.5$), Melamin ($pK_s = 5$) und Ammediol ($pK_s = 9$) sind in unterschiedlichen Konzentrationen in der Ausgangslösung vorhanden (siehe Figur 1). Es gilt die Regel, daß die relativen Konzentrationen sowohl der sehr schwachen Säuren und der sehr schwachen Basen deutlich erhöht sind im Vergleich zu den Konzentrationen der relativ starken Säuren und Basen (ca. Faktor 5). Die Konzentrationen von Säuren und Basen "mäßiger Stärke" sind ca. um den Faktor 1.5 bis max. 3 erhöht.

In den Figuren 2 und 3 werden die relativen Konzentrationen der oben beschriebenen Säuren und Basen nach der elektrophoretischen Wanderung dargestellt. In dem dargestellten "Gleichgewichtszustand" werden "Pärchen" von Säuren und Basen gebildet, die sich gegenseitig nur in sehr geringem Maß ionisieren können (starke Säure-HIBA + sehr schwache Base-Taurin, schwache Säure-HEPES + schwache Base-Melamin und starke Base-Ammediol + sehr schwache Säure-2OH-Pyridin) und damit kommt die elektrophoretische Wanderung der me-

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

- 4 -

dieneigenen Substanzen zum Erliegen. Im Bereich dieser Pärchen wird jeweils ein pH-Wert generiert, der dem arithmetischen Mittelwerte der pK_s -Werte der Säure und Base entspricht. Die pH-Werte dieser Pärchen sind demnach: HIBA/Taurinlösung pH = 2.6, HEPES/Melamin pH = 6.25, 2-OH-Pyridin/Ammediol pH = 10.3. Die pH-Spanne, in der ein Pärchen einen stabilen pH-Wert garantieren kann, ist ca. 1 pH-Einheit. Alle weiteren Säuren und Basen mit verschiedenen pK_s -Werten bilden Pärchen, die ebenfalls innerhalb einer pH-Einheit einen stabilen pH-Wert garantieren, sofern die absoluten Konzentrationen der einzelnen Säuren und Basen eine genügende Pufferkapazität im Gleichgewichtszustand garantieren.

Die erfindungsgemäßen Lösungen bestehen aus wohldefinierten Chemikalien, deren Eigenschaften im Detail bekannt sind. Die Reproduzierbarkeit der gesamten Mischung ist garantiert durch die Präzision bzw. Genauigkeit der zur Herstellung verwendeten Waage. Die verwendeten Substanzen sind nicht toxisch. Jede der verwendeten Substanzen ist "monofunktionell", d.h. Effekte wie Komplexbildung bzw. die Aggregation von Biopolymeren nicht vorhanden oder zumindest deutlich reduziert sind im Vergleich zu Polyelektrolyten mit mehreren funktionellen Gruppen. Das Molekulargewicht aller einzelnen Spezies der Mischung beträgt <300 Dalton.

Die erfindungsgemäßen wässrigen Lösungen wurden bereits erfolgreich als Trennmedien für Biopolymere und Biopartikel getestet und als biokompatibel befunden. Da die meisten einzelnen Spezies durch Chemikalien mit ähnliche pK_s -Werten ersetzt werden können, können spezielle Anforderungen von Biopartikeln an das Trennmedium durch die Abänderung der Zusammensetzung der Mischung berücksichtigt werden. Aus diesen Gründen erscheint die behördliche Zulassung dieser Lösungen für die Reinigung von Biopartikeln und Biopolymeren (Peptide und Proteine) für spätere humane Applikation möglich.

Im folgenden werden beispielhafte wässrige Lösungen gemäß Erfindung mit verschiedenen pH-Intervallen vorgestellt.

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

- 5 -

Hierbei ist zu beachten, daß bei Herstellung eines Mediums für einen engeren pH-Intervall die absoluten Konzentrationen der Säuren und Basen erhöht werden; in der Regel werden auch die Differenzen der pK_s -Werte durch Verwendung neuer Bestandteile verkleinert.

Beispiel 1
(pH-Intervall 3-10)

Säure	pK_s	c(mMol)	Base	pK_s	c(mMol)
Hydroxyisobuttersäure	4.0	1.5	Betain	1.8	10
Pivalinsäure	5.0	5.0	2-Aminobuttersäure	2.3	10
Picolinsäure	5.5	2	Creatin	2.7	10
MES	6.1	4	Nicotinsäureamid	3.1	8
MOPSO	6.9	2	Pip.-4-carbonsäure	3.5	3
HEPES	7.5	2	EACA	4.4	2
EPPS	8.0	2	Melamin	5.0	2
TAPS	8.3	3	Hydroxyethylpyridin	5.3	2
			Histidin	6.0	3
AMPSO	9.0	6	BISTRIS	6.5	3
CAPSO	9.6	8	Hydroxyethylmorpholin	7.1	3
CAPS	10.3	9	Triethanolamin	7.8	2
CABS	10.8	10	TRIS	8.3	2
2-Hydroxy-pyridin	11.6	10	Ammediol	9.0	2

Beispiel 2
(pH-Intervall 4-6)

Pivalinsäure	5.0	5	Creatin	2.7	30
Picolinsäure	5.5	10	Glycylglycin	3.1	20
MES	6.1	20	Pip.-4-carbonsäure	3.5	10
MOPSO	6.9	30	GABA	4.2	10
			EACA	4.4	5

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

- 6 -

Beispiel 3

(pH-Intervall 5,5-7,5)

MOPSO	6.9	10	EACA	4.4	15
MOPS	7.2	10	Creatinin	4.8	15
HEPES	7.5	15	Hydroxyethylpyridin	5.4	10
EPDS	8.0	15	β -Picolin	5.8	10
TAPS	8.3	20	BISTRIS	6.5	5

Beispiel 4

(pH - Intervall 8 - 11,5)

TAPS	8.3	3	Imidazol	7.0	15
AMPSO	9.0	5	Triethanolamin	7.8	12.5
CAPSO	9.6	7.5	TRIS	8.3	12.5
GABA	10.2	10	Ammediol	8.8	10
EACA	10.6	10	Hydroxyethylethylen-		
			diamin	9.8	7.5
4-Hydroxy-pyridin	11.2	7.5	Diethylamino-		
			ethylendiamin	10.2	n 5
2-Hydroxy-pyridin	11.6	7.5	Triethylamin	10.8	5
			Dimethylpiperidin	11.2	3

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

- 7 -

Beispiel 5
(pH-Intervall 2,5-5)

Citronensäure	3.2	5	Betain	1.8	20
HIBA	4.0	10	2-Aminobuttersäure	2.2	20
Isobuttersäure	4.5	15	Creatin	2.7	15
Picolinsäure	5.5	20	Glycylglycin	3.1	10
MES	6.1	20	Pip.-4-carbonsäure	3.6	10
			GABA	4.2	5

In den angegebenen Medien werden weitgehend lineare pH-Gradienten erzeugt. Das pH-Profil kann in bestimmten pH-Bereichen abgeflacht werden, indem die relativen Konzentrationen der Säuren und Basen verändert werden. Bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Lösungen ist im Regelfall die Reihenfolge der Zugabe der Einzelverbindungen ohne Bedeutung.

Ansprüche

1. Medium für analytische und präparative Elektrophorese mit Gehalt an Säuren und Basen unterschiedlicher pK_s -Werte, gekennzeichnet durch Gehalt an mindestens 2 Säuren, deren pK_s -Werte zwischen etwa 3,0 bis 12 liegen, wobei die Differenz der pK_s -Werte (ΔpK_s) benachbarter Säuren nicht größer als 1, bevorzugt 0,8 bis 0,5, ist und mindestens zwei Basen, deren pK_s -Werte zwischen etwa 1,5 bis 11 liegen, wobei die Differenz der pK_s -Werte (ΔpK_s) benachbarter Basen nicht größer als 1, bevorzugt 0,8 bis 0,5, ist.

2. Medium nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Gehalt an mindestens 3 Säuren und 3 Basen.

3. Medium nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die relativen und absoluten Konzentrationen der Säuren mit steigendem pK_s -Wert kontinuierlich zunehmen und die relativen und absoluten Konzentrationen der Basen mit steigendem pK_s -Wert abnehmen, wobei jeweils verglichen mit den Konzentrationen der stärksten Säuren und Basen die Konzentration der schwächeren Säuren bzw. schwächeren Basen bei geringen Differenzen der pK_s -Werte von $pK_s = 1$ bis 3 um den Faktor 1,5 bis 3 erhöht sind, während bei großen Werten die Differenz der pK_s -Werte im Bereich von pK_s von 3 bis 8 die relativen Konzentrationen der schwächeren Säuren und Basen bis zu einem Faktor von 4 bis 8 erhöht sind.

4. Medium nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß pro benachbarter pH-Wert Einheit nach elektrophoretischer Wanderung ein Säure/Basen Pärchen ausgebildet ist, daß einen pH-Wert generiert, der dem arithmetischen Mittelwerte der pK_s -Werte der entsprechenden Säure und der entsprechenden Base entspricht.

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

- 9 -

5. Medium nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentrationen der einzelnen Säuren und Basen zur Einstellung und Erhaltung einer ausreichenden Pufferkapazität im Gleichgewichtszustand nach elektrophoretischer Wanderung gewählt werden.

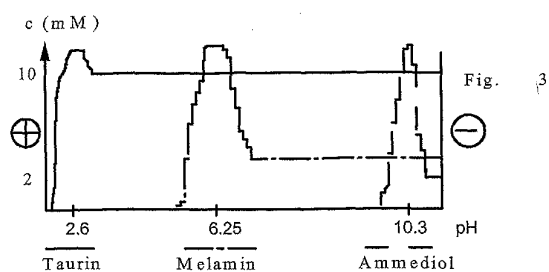
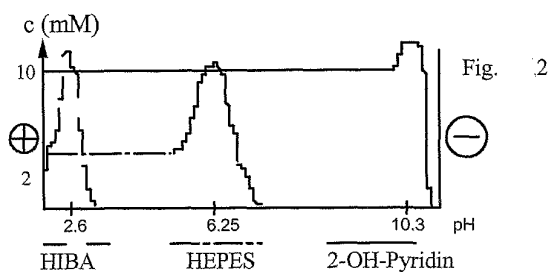
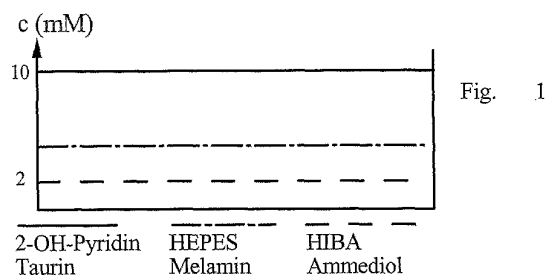
6. Medium nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zur Einstellung engerer pH-Intervalle die absoluten Konzentrationen der Säuren und Basen erhöht und gegebenenfalls die pK_s -Werte der Säuren und Basen durch deren entsprechende Auswahl verkleinert sind.

7. Medium nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Molekulargewichte der jeweils eingesetzten Säuren bzw. Basen kleiner als 300 Dalton sind.

WO 02/25263

PCT/EP01/10036

1/1



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(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
28. März 2002 (28.03.2002)

PCT

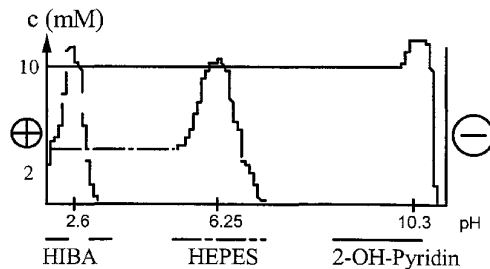
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/025263 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation: G01N 27/447, B01D 57/02, C07K 1/28 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/JP01/10036 (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GI, GM, KI, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) Internationales Anmeldedatum: 30. August 2001 (30.08.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 47 088.2 21. September 2000 (21.09.2000) DE
- (71) Anmelder und (72) Erfinder: WEBER, Gerhard (DU/DE); Margeritenweg 23, 85551 Kirchheim (DE).
- (74) Anwalt: WILHELM, KILIAN & PARTNER; Eddard-Schmid-Strasse 2, 81541 München (DE).
- Veröffentlicht: mit internationalem Recherchenbericht

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MEDIUM FOR ANALYTIC AND PREPARATIVE ELECTROPHORESIS

(54) Bezeichnung: MEDIUM FÜR ANALYTISCHE UND PRÄPARATIVE ELEKTROPHORESE



(57) Abstract: The invention relates to a medium for analytic and preparative electrophoresis comprising a content of acids and bases of different pK_a values. Said medium contains at least two acids, whose pK_a values (ΔpK_a) of adjacent acids are no greater than 1.0 but preferably range from 0.8 to 0.5, and contains at least two bases, whose pK_a values range from approximately 1.5 to 11, whereby the difference of the pK_a values (ΔpK_a) of adjacent bases is no greater than 1.0 but preferably ranges from 0.8 to 0.5.

(57) Zusammenfassung: Medium für analytische und präparative Elektrophorese mit Gehalt an Säuren und Basen unterschiedlicher pK_a -Werte, wobei der Gehalt an mindestens 2 Säuren, deren pK_a -Werte (ΔpK_a) benachbarter Säuren nicht größer als 1, bevorzugt 0.8 bis 0.5 ist und mindestens zwei Basen, deren pK_a -Werte zwischen etwa 1.5 bis 11 liegen, wobei die Differenz der pK_a -Werte (ΔpK_a) benachbarter Basen nicht größer als 1, bevorzugt 0.8 bis 0.5 ist.

WO 02/025263 A3 **(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen****Recherchenberichts:**

3. Januar 2003

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.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/10036
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N27/447 B01D57/02 C07K1/28		
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 601N C07K B01D		
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	US 4 139 440 A (CHRAMBACH ANDREAS ET AL) 13 February 1979 (1979-02-13) column 1, line 62 -column 2, line 15	1,2,4-7
X	US 4 279 724 A (HEARN MILTON T W ET AL) 21 July 1981 (1981-07-21) column 3, line 58 -column 4, line 60; table 1	1,2,4-7
A	US 4 334 972 A (SOEDERBERG JOHN L) 15 June 1982 (1982-06-15) column 10, line 40 - line 53	3
A	US 5 447 612 A (BIER MILAN ET AL) 5 September 1995 (1995-09-05) abstract; figure 1	1-7
	-/--	
☒ 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 doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 July 2002		Date of mailing of the international search report 23/07/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wilhelm, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 01/10036
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 817 225 A (HINTON STEPHEN M) 6 October 1998 (1998-10-06) column 3, line 24 - line 45; figure 1 -----	1-7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT in relation to patent family members				International Application No. PCT/EP 01/10036	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 4139440	A	13-02-1979	NONE		
US 4279724	A	21-07-1981	NONE		
US 4334972	A	15-06-1982	SE	415731 B	27-10-1980
			CA	1139304 A1	11-01-1983
			DE	2814408 A1	02-11-1978
			FR	2395253 A1	19-01-1979
			GB	1596427 A	26-08-1981
			JP	53146976 A	21-12-1978
			SE	7704783 A	27-10-1978
US 5447612	A	05-09-1995	NONE		
US 5817225	A	06-10-1998	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT		Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/10036
A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N27/447 B01D57/02 C07K1/28		
Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoffe (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N C07K B01D 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*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	US 4 139 440 A (CHRAMBACH ANDREAS ET AL) 13. Februar 1979 (1979-02-13) Spalte 1, Zeile 62 - Spalte 2, Zeile 15 ---	1,2,4-7
X	US 4 279 724 A (HEARN MILTON T W ET AL) 21. Juli 1981 (1981-07-21) Spalte 3, Zeile 58 - Spalte 4, Zeile 60; Tabelle 1 ---	1,2,4-7
A	US 4 334 972 A (SOEDERBERG JOHN L) 15. Juni 1982 (1982-06-15) Spalte 10, Zeile 40 - Zeile 53 ---	3
A	US 5 447 612 A (BIER MILAN ET AL) 5. September 1995 (1995-09-05) Zusammenfassung; Abbildung 1 --- -/-	1-7
☒ 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 vor 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 ausgestellt) *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 erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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		Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
16. Juli 2002		23/07/2002
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Palatinen 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Wilhelm, J

Formblatt PCT/ISA210 (Richt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter  hales Aktenzeichen
PCT/EP 01/10036

C./Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Botr. Anspruch Nr.
A	US 5 817 225 A (HINTON STEPHEN M) 6. Oktober 1998 (1998-10-06) Spalte 3, Zeile 24 - Zeile 45; Abbildung 1 -----	1-7

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1998)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT			
Angaben zu Veröffentlichung		Ihre zur selben Patentfamilie gehören	
		Intern: les Aktenzeichen PCT/EP 01/10036	
Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 4139440	A	13-02-1979	KEINE
US 4279724	A	21-07-1981	KEINE
US 4334972	A	15-06-1982	SE 415731 B 27-10-1980 CA 1139304 A1 11-01-1983 DE 2814408 A1 02-11-1978 FR 2395253 A1 19-01-1979 GB 1596427 A 26-08-1981 JP 53146976 A 21-12-1978 SE 7704783 A 27-10-1978
US 5447612	A	05-09-1995	KEINE
US 5817225	A	06-10-1998	KEINE

Formblatt PCT/ISA/E10 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW