

(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

27. Oktober 2016 (27.10.2016)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer

WO 2016/169679 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

C12N 15/10 (2006.01) B01L 3/02 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)

(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, 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, KN, KP, KR, 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.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2016/054180

(22) Internationales Anmeldedatum:

26. Februar 2016 (26.02.2016)

(25) Einreichungssprache:

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache:

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2015 207 481.1 DE
10 2015 211 393.0 19. Juni 2015 (19.06.2015) DE
10 2015 211 394.0 19. Juni 2015 (19.06.2015) DE

(71) Anmelder: AJ INNUSCREEN GMBH [DE/DE]; Robert-Roessle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder: HILLEBRAND, Timo; Bogenstrasse 29, D-15366 Hoppegarten (DE). STROH, Thorsten; Rudolstaedter Strasse 96, 10713 Berlin (DE).

(74) Anwälte: WEHLAN, Helmut et al.; Wehlan & Wehlan, Moellendorffstrasse 49, 10367 Berlin (DE).

(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).

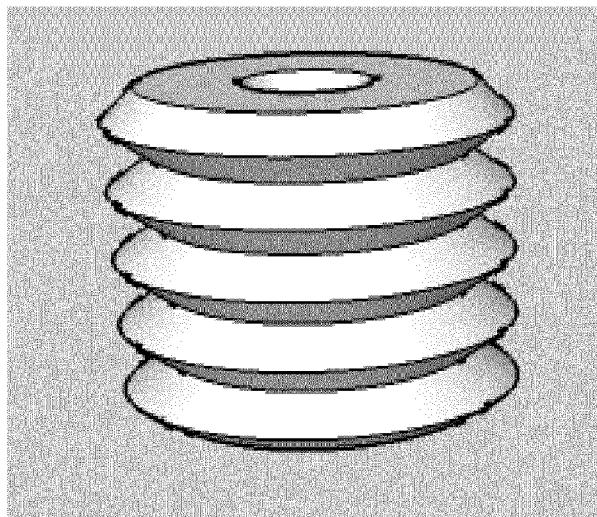
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

(54) Title: DEVICE AND PROCESS FOR AUTOMATED EXTRACTION OF NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung : VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR AUTOMATISIERTEN EXTRAKTION VON NUKLEINSÄUREN

Figur 1



(57) Abstract: Device and process for the automated extraction of nucleic acids, comprising a body which is able to be immersed partly or wholly into a reaction cavity, characterized in that at least the part immersed into the reaction cavity has a non-smooth surface. After lysis, a biological sample is admixed with an organic substance, preferably alcohols or ketones. This batch is then contacted with a material characterized by a non-smooth surface. In these circumstances, nucleic acids are adsorbed onto the surface of the material used. This is followed optionally by washing steps with known alcoholic washing solutions. After drying, the adsorbed nucleic acid is detached from the material by adding water or a low-salt buffer and can be used for downstream applications.

(57) Zusammenfassung: Vorrichtung und Verfahren zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren, umfassend einen Körper, der teilweise oder vollständig in eine Reaktionskavität eintauchen kann, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens der Teil, der in die Reaktionskavität eintaucht eine nicht-glätte Oberfläche aufweist. Nach Lyse wird eine biologische Probe mit einer organischen Substanz, vorzugsweise Alkohole oder Ketone, versetzt. Dieser Ansatz wird nunmehr mit einem Material, welches durch eine nichtglatte Oberfläche charakterisiert

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



ist, in Kontakt gebracht. Unter diesen Voraussetzungen adsorbieren Nukleinsäuren an die Oberfläche des eingesetzten Materials. Nachfolgend erfolgen ggf. Waschschritte mit bekannten alkoholischen Waschlösungen. Nach Trocknung wird die adsorbierte Nukleinsäure durch Zugabe von Wasser oder eines Niedrigsalzpuffers vom Material abgelöst und kann für downstream-Anwendungen eingesetzt werden.

Vorrichtung und Verfahren zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren

[0001] Gegenstand der Erfindung ist eine Vorrichtung und ein Verfahren, mit dem Nukleinsäuren schnell und hocheffizient sowie quantitativ automatisiert, isoliert und 5 aufgereinigt werden können.

[0002] Unter klassischen Bedingungen erfolgt die Isolierung von DNA aus Zellen und Geweben dadurch, dass die Nukleinsäuren enthaltenden Ausgangsmaterialien unter stark denaturierenden und reduzierenden Bedingungen, teilweise auch unter Verwendung von proteinabbauenden Enzymen aufgeschlossen, die austretenden Nukleinsäurefraktionen über 10 Phenol-/ Chloroform- Extraktionsschritte gereinigt und die Nukleinsäuren mittels Dialyse oder Ethanolpräzipitation aus der wässrigen Phase gewonnen werden (Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., 1989, CSH, "Molecular Cloning"). Diese "klassischen Verfahren" zur Isolierung von Nukleinsäuren aus Zellen und besonders aus Geweben sind sehr zeitaufwendig (teilweise länger als 48 h), erfordern einen erheblichen apparativen Aufwand und sind darüber 15 hinaus auch nicht unter Feldbedingungen realisierbar. Außerdem sind solche Methoden auf Grund der verwendeten Chemikalien wie Phenol und Chloroform in einem nicht geringen Maße gesundheitsgefährdend.

[0003] Die nächste Verfahrensgeneration zur Isolierung von Nukleinsäuren basiert auf einer von Vogelstein und Gillespie (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 615 - 619) entwickelten 20 und erstmals beschriebenen Methode zur präparativen und analytischen Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen. Die Methode kombiniert die Auflösung der die zu isolierende DNA- Bande enthaltenden Agarose in einer gesättigten Lösung eines chaotropen Salzes (NaJ) mit einer Bindung der DNA an Glaspartikel. Die an die Glaspartikel fixierte DNA wird anschließend mit einer Waschlösung (20 mM Tris HCl [pH 7,2]; 200mM NaCl; 2 mM 25 EDTA; 50% v/v Ethanol) gewaschen und danach von den Trägerpartikeln abgelöst. Diese Methode erfuhr bis heute eine Reihe von Modifikationen und wird zum gegenwärtigen Zeitpunkt für unterschiedliche Verfahren der Extraktion und Reinigung von Nukleinsäuren aus unterschiedlichen Herkünften angewendet und ist letztlich die Basis für fast alle kommerziell verfügbaren Kits zur manuellen wie auch automatisierten Isolierung von 30 Nukleinsäuren. Darüber hinaus gibt es eine Vielzahl von Patenten und Veröffentlichungen, die sich auf das Basisprinzip der Isolierung von Nukleinsäuren beziehen, welches von Vogelstein und Gillespie erstmals publiziert wurde und ggf. weitere Vorteile innehaben. Diese Varianten betreffen sowohl die Verwendung unterschiedlicher mineralischer Trägermaterialien als auch die Art der für die Bindung der Nukleinsäuren eingesetzten Puffer.

Beispiele sind u.a. die Bindung von Nukleinsäuren an mineralische Träger unter Anwesenheit von Lösungen unterschiedlicher chaotroper Salze, bei welchen als Trägermaterial feingemahlene Glaspulver (BIO 101, La Jolla, CA), Diatomenerden (Fa.Sigma) oder auch Silicagele bzw. Silicasuspensionen oder Glasfaserfilter oder mineralische Erden (DE 41 39 5 664 A1; US 5,234,809; WO-A 95/34569 DE 4321904; DE 20207793) zum Einsatz kommen. All diese Patente basieren auf der Anbindung von Nukleinsäuren an ein mineralisches Trägermaterial auf der Basis von Glas oder Silizium unter Anwesenheit chaotroper Salzlösungen. In neueren Patentschriften wird offenbart, dass für die Adsorption von Nukleinsäuren an die dem Fachmann bekannten und eingesetzten mineralischen Materialien 10 auch sogenannte antichaotrope Salze als Bestandteil von Lyse-/ Bindungspuffer- Systemen sehr effizient und erfolgreich eingesetzt werden können (EP 1135479). Zusammenfassend kann man den Stand der Technik also dahingehend beschreiben, dass Nukleinsäuren an mineralische Materialien in Anwesenheit von Puffern, die chaotrope oder antichaotrope Salze enthalten oder auch in Anwesenheit von Puffern die Mischungen chaotroper und 15 antichaotroper Salze enthalten, binden und auf diesem Wege dann auch isoliert werden können. Dabei gibt es auch Vorzugsvarianten, bei denen zusätzlich aliphatische Alkohole zur Bindungsvermittlung eingesetzt werden. Dem Fachmann ist auch bekannt, dass alle gängigen kommerziellen Produkte zur Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren auf dieser Grundlage basieren. Die eingesetzten mineralischen Träger liegen dabei in Form von losen 20 Schüttungen, in Form von Filtermembranen oder auch in Form von Suspensionen vor. Für die Durchführung von automatisierten Extraktionsabläufen werden häufig paramagnetische oder magnetische Partikel eingesetzt. Dabei handelt es sich z.B. um silicatische Materialien, die einen magnetischen oder paramagnetischen Kern besitzen oder aber auch um Eiseoxydpartikel, deren Oberfläche so modifiziert wird, dass diese für die Anbindung der 25 Nukleinsäuren notwendigen Funktionalitäten tragen. Um insbesondere automatisierte Extraktionen einfacher durchführen zu können, wurden modifizierte Pipettenspitzen eingesetzt. Diese sind dadurch charakterisiert, dass sie die zur Anbindung von Nukleinsäuren notwendigen Trägermaterialien (poröse mineralische Trägermaterialien oder poröse Anionenaustauscher etc.) bereits enthalten. So beschreibt die Patentschrift DE3717211 eine 30 Pipettenspitze mit einem porösen Chromatographiematerial für die Isolierung von Nukleinsäuren. Die Patentschrift EP1951904 offenbart eine Pipettenspitze bestehend aus einem Ober- und Unterteil, zwischen welchem sich ebenfalls ein poröses chromatographisches Trägermaterial befindet und welche für die automatisierte Isolierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden soll. Eine modifizierte Pipettenspitze zur Extraktion von Nukleinsäuren ist

auch in der Patentschrift US2013/0078619 offenbart. Auch in dieser Pipettenspitze befindet sich ein poröses mineralisches Trägermaterial (poröses Glas) zur direkten Anbindung von Nukleinsäuren. All diesen modifizierten Pipettenspitzen ist gemeinsam, dass es sich um ein poröses chromatographisches Material handelt (lose Schüttung oder fester poröser Körper).

5 Diese Trägermaterialien befinden sich immer horizontal innerhalb der Pipettenspitze. Die zu prozessierenden Flüssigkeiten strömen durch das eingesetzte poröse Material. Der Extraktionsablauf basiert darauf, dass nach Lyse der Probe und Einstellung notwendiger Bindungsbedingungen für die Adsorption der Nukleinsäuren an das Trägermaterial, dieser Ansatz mittels eines Pipettierungsvorganges durch das poröse Trägermaterial gezogen wird. Die 10 Nukleinsäuren binden an das Trägermaterial. Nachfolgend werden Waschpuffer durch das Trägermaterial pipettiert. Danach erfolgt ein Trocknungsschritt (häufiges Auf-und Abpipettieren oder Anlegen von Vakuum). Final wird das Elutionsmittel durch das Trägermaterial pipettiert. Dabei wird die gebundene Nukleinsäure vom Trägermaterial abgelöst. Die Verwendung von Trägermaterial enthaltenden Pipettenspitzen soll den 15 (insbesondere) automatisierten Ablauf von Nukleinsäureextraktionen deutlich vereinfachen. Obwohl diese Ideen schon teilweise relativ alt sind (die Patentschrift DE3717211 datiert vom 22.5.1987), hat sich ein solches Verfahren nicht durchgesetzt. Die Ursache liegt dabei in einigen grundsätzlichen Problemen:

- 20 1) Das Pipettieren von Nukleinsäure enthaltenden Lysaten hoher Viskosität funktioniert nur eingeschränkt oder führt zum vollständigen Verschluss des chromatographischen Materials. Damit ist keine Extraktion möglich.
- 25 2) Das Pipettieren von Lysaten über ein poröses Material führt zur Schaumbildung. Dieses wird mit der zunehmenden Anzahl von Pipettierschritten verstärkt und kann den Extraktionsprozess ebenfalls unmöglich machen.
- 3) Die Entfernung von alkoholischen Komponenten aus einem porösen Material ist schwierig und ist oftmals nicht zufriedenstellend gelöst.

30 [0004] Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zu Grunde, die bekannten Probleme zu lösen und damit die automatisierte Extraktion von Nukleinsäuren deutlich einfacher und schneller als bisher durchführen zu können. Ein weites Ziel der Erfindung besteht darin, zu ermöglichen, vorhandene Liquidhandling-Geräteplattformen für die automatisierte Nukleinsäureextraktion zu nutzen. Dies soll mit einfachen Mitteln universell möglich sein.

[0005] Die Aufgabe wurde gemäß den Merkmalen der Patentansprüche gelöst. Gemäß

Anspruch 1 wird eine Vorrichtung zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren beschrieben, umfassend einen Körper, der teilweise oder vollständig in eine Reaktionskavität eintauchen kann, wobei mindestens der Teil, der in die Reaktionskavität eintaucht eine raua oder strukturierte Oberfläche aufweist. Vorzugsweise wird eine entsprechende Pipettenspitze verwendet, die entweder aufgeraut wurde oder der ein rauer oder strukturierter Gegenstand außen angesteckt wird. An diesem Gegenstand findet die Präzipitation der Nukleinsäuren statt, wenn die Polarität der Lösung gesenkt wird. Dies geschieht entweder vorzugsweise entweder durch Zugabe eines organischen Lösungsmittels (Alkohole) oder durch einen im Stand der Technik bekannten Bindungspuffer. Es hat sich herausgestellt, dass die Anbindung der Nukleinsäuren an diesen Gegenstand nicht stattfindet, wenn dieser Gegenstand eine glatte Oberfläche aufweist. Die Ansprüche 2 bis 6 stellen bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung dar.

[0006] Gegenstand der Erfindung ist auch ein Gerät nach dem walk-away-Prinzip, das die erfindungsgemäße Vorrichtung aufweist, z.B. ein Pipettierautomat oder ein Extraktionsautomat.

[0007] Basis der Erfindung ist die Beobachtung, dass Nukleinsäuren an die Oberfläche von strukturierten bzw. rauen Materialien (z.B. an Polymermaterialien) adsorbieren. Dazu ist es nur notwendig, eine Nukleinsäure enthaltende biologische Probe zu lysieren, um die Nukleinsäure freizusetzen. Dies kann mit dem Fachmann bekannten Puffern erfolgen. Nach Lyse wird die Probe mit einer Substanz, welche die Polarität der wässrigen Lösung senkt, vorzugsweise organische Lösungsmittel wie Alkohole oder Ketone, versetzt. Dieser Ansatz wird nunmehr mit einem Material, welches durch eine nichtglatte Oberfläche charakterisiert ist, in Kontakt gebracht. Unter diesen Voraussetzungen adsorbieren Nukleinsäuren an die Oberfläche des eingesetzten Materials. Nachfolgend erfolgen ggf. Waschschritte mit bekannten alkoholischen Waschlösungen. Nach Trocknung wird die adsorbierte Nukleinsäure durch Zugabe von Wasser oder eines Niedrigsalzpuffers (z.B. 10 mM Tris HCl) vom Material abgelöst und kann für downstream-Anwendungen eingesetzt werden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren nutzt diese Möglichkeit für einen einfachen und automatisierbaren Extraktionsprozess. Die Vorrichtung besteht dabei aus einem Körper, der teilweise in eine Reaktionskavität eintauchen kann, wobei der Teil, der in diese Reaktionskavität eintaucht, eine nicht-glatte Oberfläche aufweist. Vorzugsweise verwendet man einen Hohlkörper, welcher Flüssigkeiten aufnehmen und abgeben kann. Besonders bevorzugt wird eine Pipettenspitze eingesetzt. Die Pipettenspitze ist so aufgebaut, dass sich an ihrer Außenfläche im letzten unteren Drittel ein strukturiertes bzw. raues Material befindet.

Dies kann z.B. durch das Aufstecken eines passenden Ringes erfolgen (z.B. kann ein solcher Ring auf gängige Pipettenspitzen gesteckt werden, was die Universalität unterstreicht). Der Hohlkörper selbst kann aber ebenfalls über eine solche konstruktive Besonderheit (Rauheit) verfügen und somit aus einem Teil bestehen und in einem Spritzgusswerkzeug produziert werden. In der Figur 1 ist die erfindungsgemäße Vorrichtung beispielhaft für eine modifizierte Pipettenspitze skizziert.

[0008] Zur Erfindung gehört auch ein Verfahren zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- 10 a) Eine lysierte biologische Probe wird in eine Reaktionskavität gegeben und mit mindestens einer Substanz, die die Polarität der wässrigen Lösung senkt oder mit einem Mittel zur Anbindung von Nukleinsäuren an eine feste Phase, versetzt
- b) Eintauchen einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in diese Kavität, wobei die Nukleinsäuren an den rauen bzw. strukturierten Teil dieser Vorrichtung binden
- 15 c) Ggf. Überführen der Vorrichtung in eine mindestens weitere Kavität zum Waschen der angebundenen Nukleinsäuren
- d) Ggf. Trocknen der angebundenen Nukleinsäuren
- e) Überführen der trockenen angebundenen Nukleinsäuren in eine weitere Kavität zur Elution der Nukleinsäuren

20

[0009] Der Begriff „raue Oberfläche“ ist so zu verstehen, dass durch Berühren oder durch Ansicht der Oberfläche erkennbar ist, dass diese nicht glatt ist. Dabei kann es sich aber auch um eine Oberfläche handeln, die eine Struktur aufweist (z.B. Rillen). Durch diese Struktur ist die Glattheit der Oberfläche aufgehoben, auch wenn die Struktur, also die Rillen, selbst glatt sein kann. Erfindungsgemäß werden solche Oberflächen als „strukturierte Oberflächen“ bezeichnet. Falls durch Ansicht oder Berühren der Oberfläche nicht erkennbar ist, ob eine Oberfläche glatt oder rau ist, kann ein Test durchgeführt werden, bei dem ein Laserstrahl auf diese Oberfläche gerichtet wird. Bei einer glatten Oberfläche wird der Laser nur in Hauprichtung an der Oberfläche reflektiert. Bei rauen Oberflächen erfolgt eine Streuung in alle Raumrichtungen. Ein solcher Test ist auf der Web-Seite der Universität Kiel beschrieben worden (http://www.tf.uni-kiel.de/matwis/amat/semitech_en/kap_3/illustr/oberflaechenstrukture.pdf).

[0010] Die erfindungsgemäße Vorrichtung wird für das erfindungsgemäße Verfahren zur

automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren wie folgt eingesetzt: Vorzugsweise nutzt man ein klassisches walk-away-Prinzip, d.h. die für die Extraktion benötigten Lösungen werden vorgelegt und sukzessive in den Extraktionsprozess einbezogen. Entsprechend der Zielstellung der vorliegenden Erfindung können für den automatisierten Extraktionsablauf 5 sogar kommerziell verfügbare Extraktionsautomaten oder Pipettierautomaten eingesetzt werden, wenn diese über die notwendigen technischen Voraussetzungen verfügen. Die Probe wird in eine Reaktionskavität gegeben und mit Lysepuffer und ggf. proteolytischen Enzymen versetzt. Danach erfolgt die Probenlyse. Nach Lyse der Probe mit bekannten Lysepuffern wird dem Lysat eine organische Komponente zugegeben. In diese Lösung taucht die erfindungsgemäße Vorrichtung ein und wird in der Lösung mehrere Male vertikal auf- und ab bewegt. Nun befinden sich die Nukleinsäuren an dieser Vorrichtung. Danach wird die Vorrichtung aus der Lösung entfernt und in eine neue Reaktionskavität bewegt. In dieser befindet sich ein alkoholischer Waschpuffer (auch hierbei können bekannte Waschpuffer verwendet werden) bzw. nur ein Alkohol. In diese Lösung taucht das erfindungsgemäße 10 Mittel ein und wird in der Lösung mehrere Male vertikal auf- und ab bewegt. Die Waschschrifte können mehrere Male wiederholt werden. Nach dem letzten Waschschritt wird das die Vorrichtung aus der Lösung entfernt und außerhalb der Kavität kurz getrocknet, damit der restliche Alkohol entfernt wird. Im letzten Schritt wird die erfindungsgemäße Vorrichtung 15 in eine weitere Kavität getaucht, in welcher sich Wasser oder ein anderer Niedrigsalzpuffer befindet. Auch in diese Kavität taucht die erfindungsgemäße Vorrichtung ein und wird in der Lösung mehrere Male vertikal auf- und abbewegt. Dies führt zum Ablösen der gebundenen Nukleinsäure. Aus diesem allgemeinem Ablaufprotokoll wird ersichtlich, wie einfach die automatisierte Extraktion nunmehr ist. Es muss keine Separation von magnetischen Partikeln 20 mehr vorgenommen werden, wie dies bei der automatisierten Extraktion mittels Magnetpartikeln der Fall ist. Das Verfahren benötigt keine Vakuumfiltrationschritte, wie bei der Nutzung von Filterplatten notwendig. Es benötigt lediglich die erfindungsgemäße Vorrichtung sowie eine Pipettierplattform. Vorteilhaft ist dabei natürlich die Universalität und Einfachheit der erfindungsgemäßen Vorrichtung, da man kommerziell verfügbare 25 Standardpipettenspitzen nehmen kann. Diese Pipettenspitzen werden durch aufstecken z.B. eines Ringes mit der für die Isolierung von Nukleinsäuren notwendigen spezifischen Oberflächeneigenschaft so modifiziert, dass sie zur erfindungsgemäßen Vorrichtung werden und somit auf beliebigen Pipettierplattformen für die Isolierung von Nukleinsäuren eingesetzt 30 werden können.

[0011] Darüber hinaus können die für die Extraktion benötigten Reagenzien in

entsprechenden Reaktionskavitäten bereits vorgelegt sein, so dass der Extraktionsprozess nach dem walk-away-Prinzip ablaufen kann. Ein weiterer besonderer Vorteil offenbart sich dadurch, dass das erfindungsgemäße Mittel nicht nur die Anbindung der Nukleinsäure ermöglicht, sondern darüber hinaus auch in separater Art noch Flüssigkeiten bewegen kann.

5 In dieser kombinierten Funktion kann der Extraktionsablauf noch weiter optimiert werden. So kann bereits die Lyse der Probe auf einem Automaten erfolgen. Die während der Lyse notwendige kontinuierliche Bewegung der Probe wird durch die Pipettierfunktion der erfindungsgemäßen Vorrichtung erreicht. Weiterhin kann nach dem finalen Elutionsschritt das Eluat auch aus der Elutionskavität mittels der Pipettierfunktion entfernt und in ein
10 Lagergefäß überführt werden. Durch diese einfach umsetzbare Doppelfunktion des erfindungsgemäßen Mittels kann damit der Grad der Automatisierung flexibel erhöht werden.
[0012] Die Erfindung soll nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. Die Ausführungsbeispiele stellen dabei keine Limitierung der Erfindung dar.

15 **Ausführungsbeispiel**

Automatisierte Extraktion von Nukleinsäure aus NIH 3T3 Zellen mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens und unter Verwendung einer modifizierten Pipettenspitze sowie unter Verwendung eines kommerziell verfügbaren Extraktionsautomaten

20

Variante A: halbautoamischer Extraktionsablauf (Probenlyse erfolgt separat)

[0013] Als Beispiel für einen Standard-Extraktionsautomat wurde der InnuPure C16 (Analytik Jena AG) verwendet. Bei diesem System handelt es sich um einen Magnetpartikel-basiertes Extraktionssystem, dass für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zweckentfremdet eingesetzt wurde. An das untere Ende der für den InnuPure C16 Automaten eingesetzten Pipettenspitzen wurde von außen ein Ring aufgesteckt in der Art, dass die
25 Pipettierfunktion nicht beeinträchtigt wird. Der außen aufgesteckte Ring besteht dabei aus einem Polymer und weist eine strukturierte Oberfläche auf. Die Kombination aus Hohlkörper und daran befestigtem Ring bilden das Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens.
30

[0014] Für die Nukleinsäureextraktion wurden unterschiedlichen Mengen an NIH 3T3 Zellen eingesetzt. Die für die Isolierung der Nukleinsäuren eingesetzte Extraktionschemie wurde

dabei teilweise aus dem kommerziellen Extraktionskit innuPREP Blood DNA Kit/IPC16X (Analytik Jena AG) genommen. Mittels eines Lysepuffers (Lysis Solution CBV) sowie von Proteinase K wurden die Zellen bei 60°C für 15 min in einem 2.0 ml Reaktionsgefäß lysiert. Die Lyse erfolgte dabei nicht im Extraktionsautomaten. Nachfolgend wurde das automatisierte Verfahren des Innupure C16 für die Aufreinigung der Nukleinsäuren verwendet. Die für die Extraktion benötigten Lösungen lagen in einer vorbefüllten Deep-Well-Platte vor. Die oben beschriebenen Lysate wurden in Kavitäten gegeben, die mit 400 µl Isopropanol befüllt waren. Die mit dem Ring versehenen Pipettenspitzen (das erfindungsgemäße Mittel) vollzogen 80x eine vertikale Eintauchbewegung in diese Kavitäten, wobei am Boden der Kavität jeweils eine Inkubation von 2 s abgewartet wurde. Danach wurden die mit dem Ring modifizierten Pipettenspitzen sukzessive je 10x in drei weiteren Kavitäten eingetaucht, die alkoholische Waschpuffer (Washing Solution LS, 80%iger Ethanol, 80%iger Ethanol) enthielten.

10 [0015] Im Anschluss an den letzten Waschschritt wurde der Ring an dem Hohlkörper 10 Minuten lang außerhalb der Kavität getrocknet und damit der restliche Ethanol entfernt. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte durch 30 Wiederholungen einer Ein- und Auftauchbewegung in 200 µl Elution Buffer, der durch das Gerät zuvor auf 50° C temperiert worden war. Es schloss sich in derselben Kavität ein Mischschritt mittels 80-maligem Pipettieren von 100 µl bei 40° C an. Dazu wurde die erfindungsgemäße doppelte Funktion des erfindungsgemäßen Mittels genutzt.

15 [0016] Das Verfahren ist extrem einfach in der Durchführung und dadurch extrem schnell. Im Vergleich zum Standardverfahren einer Nukleinsäureextraktion mit dem InnuPure C16 und der Verwendung von Magnetpartikeln für die Anbindung der Nukleinsäuren beträgt die Zeitersparnis über 50 %.

20 [0017] Der Nachweis der isolierten Nukleinsäure erfolgte mittels spektrophotometrischer Messung und gelelektrophoretischer Darstellung in einem Agarosegel.

[0018] Ergebnisse der spektrophotometrischen Vermessung:

	Probe	Konzentration (ng/ µl)	Ausbeute (µg)	Ratio A ₂₆₀ :A ₂₈₀	Ratio A ₂₆₀ :A ₂₃₀
1	5 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	72,52	14,5	1,79	1,53
2	5 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	64,11	12,8	1,96	1,58
3	2,5 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	45,19	9,0	1,74	1,41

4	2,5 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	32,88	6,8	1,91	1,29
5	1,25 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	19,4	3,9	1,8	1,1
6	1,25 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	10,47	2,1	1,76	1,05
7	0,62 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	5,65	1,1	1,34	0,76
8	0,62 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	5,84	1,2	1,9	0,7

[0019] Wie die Ergebnisse zeigen, ist es mit dem erfindungsgemäßen Mittel möglich, allein unter Verwendung einer Standard- Extraktionschemie und kommerziell erhältlicher Extraktionsplattformen Nukleinsäure zu binden und zu isolieren. Es zeigt sich, dass die 5 Ausbeuten extrem hoch sind und dass in Abhängigkeit der eingesetzten Zellmengen auch Abstufungen bei den Ausbeuten zu beobachten sind.

[0020] Figur 2 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der isolierten Nukleinsäure. Dargestellt ist die in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte 10 Nukleinsäure, die mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens isoliert wurde. Die Proben wurden von links nach rechts, beginnend mit Probe 1 aufgetragen. Das aufgetragene Volumen betrug 5 µl.

Variante B: vollautomatischer Extraktionsablauf (Probenlyse erfolgt im Gerät)

15 [0021] In einer weiteren Ausführungsform erfolgt die Lyse der Probe ebenfalls automatisiert. Somit ist vom Anwender lediglich die Probe und die Proteinase K zuzugeben, die weitere Präparation erfolgt komplett automatisiert mit der Technik des InnuPure C16. Für die Lyse der Probe wird diese vom Innupure C16 auf 50° C erhitzt und durch 250x Auf- und Abpipettieren die Lyse noch verstärkt. Im Anschluss erfolgt durch die Pipettierfunktion des 20 Hohlkörpers die Verbringung von 400 µl Isopropanol aus einer vorbefüllten Kavität in die Kavität mit dem Lysat. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

	Probe	Konzentration	Ausbeute	Ratio	Ratio
		(ng/ µl)	(µg)	A ₂₆₀ :A ₂₈₀	A ₂₆₀ :A ₂₃₀
1	2,5 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	33,07	6,6	1,72	1,14
2	2,5 x 10 ⁵ NIH 3T3 Zellen	34,02	6,8	1,62	1,13

[0022] Figur 3 zeigt die geelektrophoretische Auftrennung der isolierten Nukleinsäure. Dargestellt ist die in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte Nukleinsäure, die mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens und interner Lyse isoliert wurde. Die Proben wurden von links nach rechts, beginnend mit Probe 1 aufgetragen. Das 5 aufgetragene Volumen betrug 5 µl.

[0023] Figur 1 ist eine exemplarische Ausführungsform des Ringes, der auf einen Hohlkörper aufgesteckt wird. Die Abbildung ist stark vergrößert.

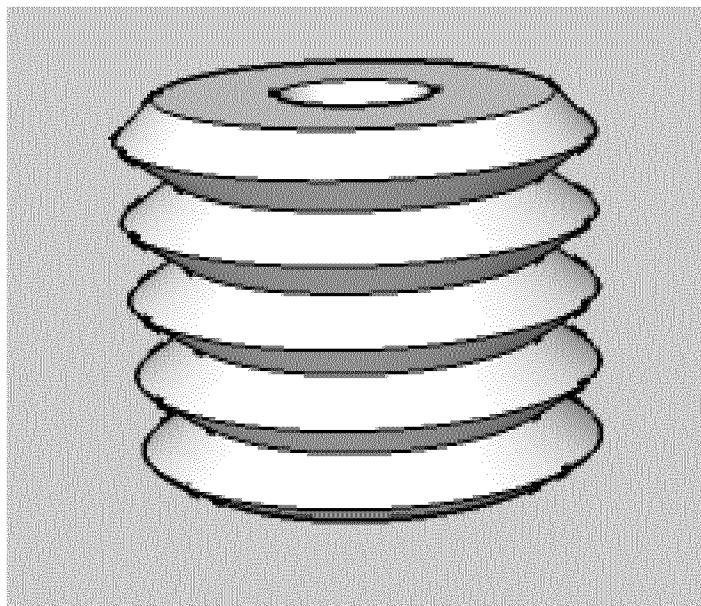
10 [0024] Dargestellt ist eine exemplarische Ausführungsform des Ringes, wie er für eine Nukleinsäureextraktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt werden kann. Dieser Formkörper mit nichtglatter Oberfläche kann auf beliebige kommerziell verfügbare Pipettenspitzen aufgesteckt werden, so dass dieser sich dann im letzten unteren Drittel der Spitze befindet.

Patentansprüche

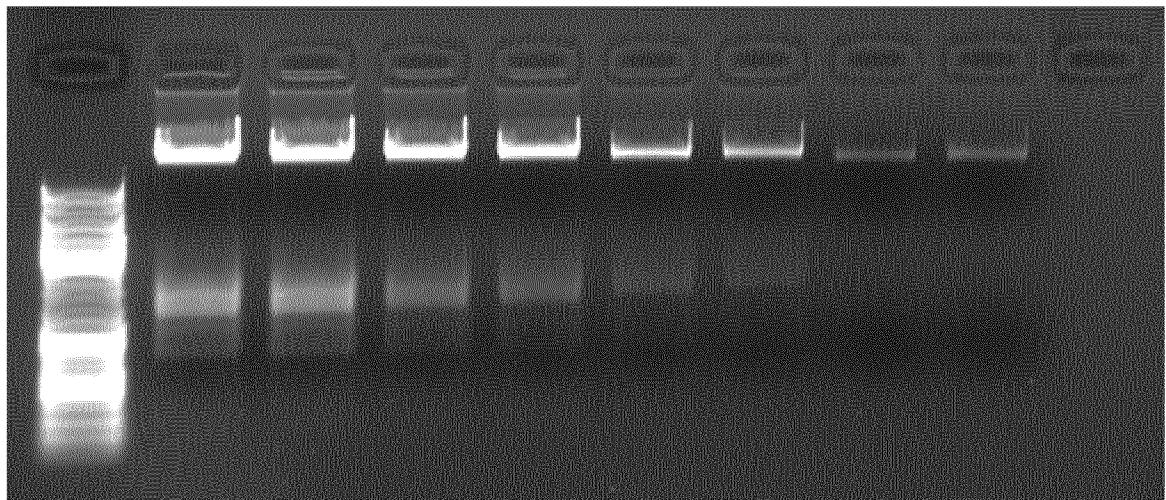
1. Vorrichtung zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren, umfassend mindestens einen Körper, der teilweise oder vollständig in eine Reaktionskavität eintauchen kann, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens der Teil, der in die Reaktionskavität eintaucht eine raue oder strukturierte Oberfläche aufweist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorrichtung einen mindestens teilweise rauen oder strukturierten Hohlkörper umfasst, vorzugsweise um eine Pipettenspitze mit teilweiser rauer oder strukturierter Oberfläche handelt.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um einen glatten Hohlkörper, vorzugsweise um eine Pipettenspitze handelt, an dem (der) ein rauer oder strukturierter Gegenstand außen angebracht ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem aufsteckbaren Gegenstand um einen Ring oder eine Hülse mit rauer oder strukturierter Oberfläche handelt.
5. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem aufsteckbaren Gegenstand um ein raues oder strukturiertes Polymermaterial, ein Kompositmaterial mit rauer oder strukturierter Oberfläche oder um ein Material handelt, dass mittels 3D-Druck erzeugt wurde.
6. Vorrichtung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Hohlkörper, vorzugsweise eine Pipettenspitze, eine Flüssigkeit, die sich in einer Reaktionskavität befindet, aufnehmen kann.
7. Gerät nach dem walk-away-Prinzip zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren, umfassend mindestens eine der Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Gerät nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Pipettierautomaten oder einen Extraktionsautomaten darstellt.

9. Verfahren zur automatisierten Extraktion von Nukleinsäuren, gekennzeichnet durch folgende Schritte:
 - f) Eine lysierte biologische Probe wird in eine Reaktionskavität gegeben und mit mindestens einer Substanz, die die Polarität der wässrigen Lösung senkt oder mit einem Mittel zur Anbindung von Nukleinsäuren an eine feste Phase, versetzt
 - g) Eintauchen einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 in diese Kavität, wobei die Nukleinsäuren an den rauen bzw. strukturierten Teil dieser Vorrichtung binden
 - h) Überführen der Vorrichtung in eine mindestens weitere Kavität zum Waschen der angebundenen Nukleinsäuren
 - i) Trocknen der angebundenen Nukleinsäuren
 - j) Überführen der trockenen angebundenen Nukleinsäuren in eine weitere Kavität zur Elution der Nukleinsäuren
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Substanz zur Senkung der Polarität der wässrigen Lösung organische Lösungsmittel, vorzugsweise Alkohole, eingesetzt werden.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass mittels der Pipettierfunktion gemäß Anspruch 6 die Flüssigkeit der Kavität gemäß Anspruch 9e an die Vorrichtung überführt wird.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass, die Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 5 ausgestaltet ist und wobei nach der Elution der Nukleinsäuren in einer Elutionskavität Eluat aus der Reaktionskavität mittels des Hohlkörpers, insbesondere einer Pipettenspitze, in ein Lagergefäß überführt wird.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass, die Vorrichtung nach einem der Ansprüche 2 bis 5 ausgestaltet ist und wobei die lysierte biologische Probe mittels des Hohlkörpers, insbesondere einer Pipettenspitze, in die Reaktionskavität gegeben wird.
14. Automatisches Verfahren gemäß einem der Ansprüche 9 bis 13 mittels eines Pipettierautomaten oder einen Extraktionsautomaten.

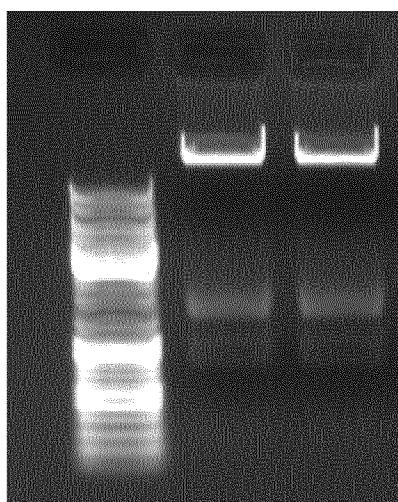
Figur 1



Figur 2



Figur 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/054180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 G01N1/40 B01L3/02 B01L3/00
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)
C12N G01N B01L

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/124551 A1 (GJERDE DOUGLAS T [US] ET AL) 15 June 2006 (2006-06-15) abstract figures 1-5, 10, 12-13 paragraph [0241] examples 6, 9 ----- X AKONNI: "TruTip - Breaking the speed limit on ultra-rapid nucleic acid extraction", INTERNET CITATION, 16 November 2010 (2010-11-16), pages 1-8, XP002753497, Retrieved from the Internet: URL: http://www.akonni.com/docs/TruTip%20Br ochure.pdf [retrieved on 2010-11-16] the whole document ----- -/-	1-8 1,2,5-9, 11-14

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	Date of mailing of the international search report
13 June 2016	27/06/2016

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

Barz, Wolfgang

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/054180

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DARRELL P CHANDLER ET AL: "Rapid, simple influenza RNA extraction from nasopharyngeal samples", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 183, no. 1, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 8-13, XP028483393, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2012.03.002 [retrieved on 2012-03-07] abstract; figure 1 Materials and methods -----	1-3,5-14
X	HOLMBERG R C ET AL: "High-throughput, automated extraction of DNA and RNA from clinical samples using TruTip technology on common liquid handling robots", JOVE, JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, US, no. 76, 1 June 2013 (2013-06-01), pages e50356-1, XP002753498, ISSN: 1940-087X, DOI: 10.3791/50356 [retrieved on 2013-06-11] abstract; figure 1 tables 1-2 Diskussion -----	1,2,5-14
A	VOGELSTEIN B ET AL: "PREPARATIVE AND ANALYTICAL PURIFICATION OF DNA FROM AGAROSE", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 76, no. 2, 1 February 1979 (1979-02-01), pages 615-619, XP002906050, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.76.2.615 abstract -----	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2016/054180

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006124551 A1	15-06-2006	US 2006124551 A1 US 2010179308 A1 US 2011038769 A1	15-06-2006 15-07-2010 17-02-2011
<hr/>			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/054180

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 INV. C12N15/10 G01N1/40 B01L3/02 B01L3/00
 ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 C12N G01N B01L

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	US 2006/124551 A1 (GJERDE DOUGLAS T [US] ET AL) 15. Juni 2006 (2006-06-15) Zusammenfassung Abbildungen 1-5, 10, 12-13 Absatz [0241] Beispiele 6, 9 ----- AKONNI: "TruTip - Breaking the speed limit on ultra-rapid nucleic acid extraction", INTERNET CITATION, 16. November 2010 (2010-11-16), Seiten 1-8, XP002753497, Gefunden im Internet: URL: http://www.akonni.com/docs/TruTip%20Br ochure.pdf [gefunden am 2010-11-16] das ganze Dokument ----- -/-	1-8
X		1,2,5-9, 11-14



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 erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher 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

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

13. Juni 2016

27/06/2016

2

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

Barz, Wolfgang

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/054180

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DARRELL P CHANDLER ET AL: "Rapid, simple influenza RNA extraction from nasopharyngeal samples", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, Bd. 183, Nr. 1, 1. März 2012 (2012-03-01), Seiten 8-13, XP028483393, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2012.03.002 [gefunden am 2012-03-07] Zusammenfassung; Abbildung 1 Materials and methods -----	1-3,5-14
X	HOLMBERG R C ET AL: "High-throughput, automated extraction of DNA and RNA from clinical samples using TruTip technology on common liquid handling robots", JOVE, JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, US, Nr. 76, 1. Juni 2013 (2013-06-01), Seiten e50356-1, XP002753498, ISSN: 1940-087X, DOI: 10.3791/50356 [gefunden am 2013-06-11] Zusammenfassung; Abbildung 1 Tabellen 1-2 Diskussion -----	1,2,5-14
A	VOGELSTEIN B ET AL: "PREPARATIVE AND ANALYTICAL PURIFICATION OF DNA FROM AGAROSE", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, Bd. 76, Nr. 2, 1. Februar 1979 (1979-02-01), Seiten 615-619, XP002906050, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.76.2.615 Zusammenfassung -----	1-14
2		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2016/054180

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2006124551 A1	15-06-2006	US 2006124551 A1 US 2010179308 A1 US 2011038769 A1	15-06-2006 15-07-2010 17-02-2011
<hr/>			