Title: PLASMID FOR PRODUCING SENSE AND ANTI-SENSE RNA PROBES OF THE HUMAN MGMT GENE

Bezeichnung: PLASMID ZUR HERSTELLUNG VON SENSE- UND ANTISENSE-RNA-PROBEN DES MENSCHLICHEN MGMT-GENS

Abstract
A plasmid is disclosed for producing sense and anti-sense RNA probes of the human O\(^6\)-methylguanine-DNA-methyltransferase gene (MGMT gene). Alkyltransferase gene is also used as a synonym.

Zusammenfassung
<table>
<thead>
<tr>
<th>AT</th>
<th>Österreich</th>
<th>GA</th>
<th>Gabon</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>AU</td>
<td>Australien</td>
<td>GB</td>
<td>Vereinigtes Königreich</td>
</tr>
<tr>
<td>BB</td>
<td>Barbados</td>
<td>GE</td>
<td>Georgien</td>
</tr>
<tr>
<td>BE</td>
<td>Belgien</td>
<td>GN</td>
<td>Guine</td>
</tr>
<tr>
<td>BF</td>
<td>Burkina Faso</td>
<td>GR</td>
<td>Griechenland</td>
</tr>
<tr>
<td>BG</td>
<td>Bulgarien</td>
<td>HU</td>
<td>Ungarn</td>
</tr>
<tr>
<td>BJ</td>
<td>Benin</td>
<td>IE</td>
<td>Irland</td>
</tr>
<tr>
<td>BR</td>
<td>Brasilien</td>
<td>IT</td>
<td>Italien</td>
</tr>
<tr>
<td>BY</td>
<td>Belarus</td>
<td>JP</td>
<td>Japan</td>
</tr>
<tr>
<td>CA</td>
<td>Kanada</td>
<td>KE</td>
<td>Kenia</td>
</tr>
<tr>
<td>CF</td>
<td>Zentrale Afrikanische Republik</td>
<td>KG</td>
<td>Kirgisistan</td>
</tr>
<tr>
<td>CG</td>
<td>Kongo</td>
<td>KP</td>
<td>Demokratische Volksrepublik Korea</td>
</tr>
<tr>
<td>CH</td>
<td>Schweiz</td>
<td>KR</td>
<td>Republik Korea</td>
</tr>
<tr>
<td>CI</td>
<td>Côte d'Ivoire</td>
<td>KZ</td>
<td>Kasachstan</td>
</tr>
<tr>
<td>CM</td>
<td>Kamerun</td>
<td>LI</td>
<td>Liechtenstein</td>
</tr>
<tr>
<td>CN</td>
<td>China</td>
<td>LK</td>
<td>Sri Lanka</td>
</tr>
<tr>
<td>CS</td>
<td>Tschechische Republik</td>
<td>LU</td>
<td>Luxemburg</td>
</tr>
<tr>
<td>CZ</td>
<td>Tschechische Republik</td>
<td>LV</td>
<td>Lettland</td>
</tr>
<tr>
<td>DE</td>
<td>Deutschland</td>
<td>MC</td>
<td>Monaco</td>
</tr>
<tr>
<td>DK</td>
<td>Dänemark</td>
<td>MD</td>
<td>Republik Moldau</td>
</tr>
<tr>
<td>ES</td>
<td>Spanien</td>
<td>MG</td>
<td>Madagaskar</td>
</tr>
<tr>
<td>FI</td>
<td>Finnland</td>
<td>ML</td>
<td>Mali</td>
</tr>
<tr>
<td>FR</td>
<td>Frankreich</td>
<td>MN</td>
<td>Mongolei</td>
</tr>
<tr>
<td>MR</td>
<td>Mauritania</td>
<td>MW</td>
<td>Malawi</td>
</tr>
<tr>
<td>NE</td>
<td>Niger</td>
<td>NL</td>
<td>Niederlande</td>
</tr>
<tr>
<td>NO</td>
<td>Norwegen</td>
<td>NZ</td>
<td>Neuseeland</td>
</tr>
<tr>
<td>PL</td>
<td>Polen</td>
<td>PT</td>
<td>Portugal</td>
</tr>
<tr>
<td>RO</td>
<td>Rumänien</td>
<td>RU</td>
<td>Russische Föderation</td>
</tr>
<tr>
<td>SD</td>
<td>Sudan</td>
<td>SE</td>
<td>Schweden</td>
</tr>
<tr>
<td>SI</td>
<td>Slowenien</td>
<td>SK</td>
<td>Slowakei</td>
</tr>
<tr>
<td>SN</td>
<td>Senegal</td>
<td>TD</td>
<td>Tschad</td>
</tr>
<tr>
<td>TG</td>
<td>Togo</td>
<td>TJ</td>
<td>Tadschikistan</td>
</tr>
<tr>
<td>TT</td>
<td>Trinidad und Tobago</td>
<td>UA</td>
<td>Ukraine</td>
</tr>
<tr>
<td>US</td>
<td>Vereinigte Staaten von Amerika</td>
<td>UZ</td>
<td>Usbekistan</td>
</tr>
<tr>
<td>VN</td>
<td>Vietnam</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
Plasmid zur Herstellung von sense- und antisense-RNA-Proben des menschlichen MGMT-Gens

Beschreibung


Das MGMT-Gen codiert für ein DNA-Reparaturprotein, welches in Körperzellen Alkylgruppen aus der DNA entfernt.


Diese Methode hat drei Nachteile:

a) die Hybridisierungsprobe muß jeweils neu synthetisiert werden, was einen breiten Anwenderkreis ausschließt;

b) es steht keine adäquate Kontrollprobe zur Verfügung;

c) die Endmarkierung mit Digoxygenin bewirkt eine relativ niedrige Spezifität der Markierung der Probe.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Plasmid der e. g. Art und die damit hergestellten RNA-Proben zur Verfügung zu stellen, sowie Verwendungen der RNA-Proben anzugeben.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale Patentansprüche 1, 7, 8 und 9.

Die Ansprüche 2 bis 6 beschreiben vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung.
Eine bestimmte Klasse von Tumortherapeutika (Chlorethylnitrosoharstoff-Verbindungen) wirken durch Chlorethylierungen und anschließende Vernetzung der DNA toxisch auf Tumorzellen.


Die Erfindung wird im folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels mit Hilfe der Figuren 1 bis 3 näher erläutert.

Die Figuren 1 bis 3 zeigen jeweils ein Plasmid bei dem unterschiedliche Sequenzen des MGMT-Gens in einen Expressionsvektor hineinkloniiert wurden.

Der Vektor, in den die MGMT-Restriktionsfragmente hineinkloniiert wurden, war für alle drei Beispiele pBluescript KS(-) von Pharmacia Biotech GmbH, Munzingerstr. 9 W 7800 Freiburg.
Andere Vektoren, welche entsprechende Promotoren der Transcription in ähnlicher Anordnung tragen, können ebenso verwendet werden.

Fig. 1 zeigt das Plasmid pBM243, bei dem in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Plasmids pBluescript SK (-) die Sequenz der menschlichen MGMT cDNA von Position -96 bis +734 (Eco RI-Fragment) hineinkloniert wurde.


Fig. 2 zeigt das Plasmid pBM244, bestehend aus dem gleichen Vektor und dem SacI-EcoRI-Fragment (Position 549 bis 734) des MGMT-Gens.

Fig. 3 zeigt das Plasmid pBM246, bei dem das PstI-EcoRI-Fragment (von Position 447 bis 734) in den Vektor hineinkloniert wurde.

Andere Sequenzen des menschlichen MGMT-Gens sind ebenfalls möglich, die Sequenz sollte jedoch mindestens 20 Nucleotide enthalten, damit eine spezifische Hybridisierung der Probe noch erfolgen kann.

Die Plasmide beherbergen 5' und 3' vom hineinklonierten MGMT-Fragment, jeweils einen Promotor für RNA Polymerase.

Im Falle der in den Fig. 1, 2 und 3 aufgeführten Vektoren sind es die Promotoren T3 und T7.

Andere für DNA abhängige RNA-Polymerasen spezifische Promotoren, z. B. der Promotor SP6, können ebenfalls verwendet werden.
Zum Nachweis der Alkyltransferase-Aktivität in Zellen in vitro oder in Schnittpreparaten von normalen- oder von Tumor-Gewebe

wird eines der o. a. Plasmide linearisiert, dann erfolgt die RNA-Transkription mit gleichzeitiger Markierung. Markiert wird die RNA hier beispielhaft mit Digoxingenin. Pro Plasmid erfolgen zwei Transkriptionsansätze jeweils für sense- und anti-
sense-RNA.

Die antisense-RNA erlaubt bei der Hybridisierung spezifisch die Bestimmung der Alkyltransferase m RNA Expression, während die sense-RNA als negative Kontrollprobe den unspezifischen Hintergrund erfaßt.Wir haben in davon unabhängigen Experimen-
ten geyeigt, daß die Menge der Alkyltransferase m RNA mit der Alkyltransferase-Reparaturaktivität der Zelle korreliert ist.

Im folgenden werden die einzelnen Schritte für die in vitro RNA-Transskription und für die in situ-Hybridisierung angege-
ben.

Zur Linearisierung vor der in vitro-Transkription werden die Plasmide mit folgenden Enzymen geschnitten.

pBM243: mit XhoI für die sense-Probe (Kontrolle)
        mit XbaI für die antisense-Probe
pBM244: mit EcoRI für die sense-Probe (Kontrolle)
        mit SacI für die antisense-Probe
pBM246: mit EcoRI für die sense-Probe (Kontrolle)
        mit XbaI für die antisense-Probe.

Das Schneiden wird mittels Agarosegel und Ethylium bromid kon-
trolliert.

Das linearisierte DNA Template wird durch Phenol/Chlorform-Ex-
trakation und nachfolgender Ethanolfällung gereinigt.

Das gereinigte DNA Template wird in Puffer (10 mM TMS, 1mM
EDTA, pH 8.0) aufgenommen und in wäßriger Lösung mit Trans-
kriptionspuffer, DTT, RNA'se-Inhibitor und Digoxingenin Labe-
ing Mixture (Boehringer Nr. 1277073) vermischt.

Für die Transkription von sense-RNA wird T7 Polymerase und für
die Transkription von antisense-RNA wird T3 Polymerase zu der
Lösung pipettiert.

Nach der Inkubation (ca. 37° C, ca. 90 min.) wird die erhal-
tene markierte RNA in üblicher Weise gefällt und gereinigt.

Der Nachweis der Alkyltransferase-Expression wird mit Hilfe
der in situ-Hybridisierung mit der markierten RNA an Paraffin-
oder Gefrierschnitten oder an auf Objekträgern fixierten Zel-
len in situ geführt.

Das Paraffin wird entfernt. Danach wird zur Untergrundreduzie-
rung eine geeignete Vorhybridisierung durchgeführt.

Nun wird je eine Probe mit sense- und antisense-RNA in ge-
eigneter Hybridisierungsflüssigkeit inkubiert. Die Gewebepro-
ben werden dann gewaschen und mit RNase behandelt, um über-
schüssige, nicht gebundene RNA zu entfernen.

Der Nachweis der Alkyltransferase-Expression in den Präparaten
erfolgt nun indirekt durch Bestimmung der Menge an gebundenem
Digoxingenining mit einem handelsüblichen Nachweiskit (z. B. DIG
Nucleic Acid Detection-Kit, Boehringer, Nr. 1175041).

Bei hoher Alkyltransferase-Expression in Zellen ist es nicht
angezeigt, bei der Tumor-Chemotherapie Chlorenthylnitrosohar-
stoff-Verbindungen einzusetzen, da wie schon erwähnt, die Al-
kyltransferase den toxischen Effekt dieser Therapeutika auf-
hebt.

Die mit Hilfe der Plasmide erzeugten RNA-Sonden können daher
diagnostisch zur Abschätzung der Wirksamkeit dieser Chemo-
therapeutika bei der Tumorbehandlung eingesetzt werden.
Patentansprüche


2. Plasmid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Promotoren der Transkription die Promotoren T3 und T7 sind.


5. Plasmid nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz von menschlicher MGMT-c-DNA mindestens 20 Nucleotide enthält.

6. Plasmid nach Ansprüche 1 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der menschlichen MGMT-c-DNA von Position -96 bis +734 (Eco RI-Fragment) reicht.

7. Plasmid nach Anspruch 1 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der menschlichen MGMT-c-DNA von Position 549 bis 734 (SacI-EcoRI-Fragment) reicht.

9. MGMT m-RNA in sense- und antisense-Orientierung, welche mit Hilfe eines Plasmids gemäß eines der Ansprüche 1 bis 8 herstellbar ist.


11. Verwendung der MGMT m-RNA's gemäß Anspruch 9 als Diagnostika.
Fig. 1

- pBM243
- pBluescript KS-
- KpnI XhoI
- PstI XbaI SacI
- 621 nt MGMT ORF
- T3
- EcoRI +734
- Sacl +549
- PstI +447
- PstI +116
- EcoRI -96

antisense probe (T3 polymerase, XbaI dig.)
sense probe (T7 polymerase, XhoI dig.)
Fig. 2

pBM244
pBluescript KS-

MCS

T3  72 nt MGMT ORF  T7

EcoRI +734
Sacl +549

antisense probe (T3 polymerase, Sacl dig.)

sense probe (T7 polymerase, EcoRI dig.)
Fig. 3

pBM246
pBluescript KS-

KpnI XhoI
MCS
XbaI SacI

174 nt
MGMT ORF

T3
EcoRI +734

T7
Sacl +549
PstI +447

antisense probe (T3 polymerase, XbaI dig.)
sense probe (T7 polymerase, EcoRI dig.)
**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

<table>
<thead>
<tr>
<th>IPC 5</th>
<th>C12N15/54</th>
<th>C12N9/10</th>
<th>C12N15/70</th>
<th>C12Q1/68</th>
<th>//C12Q1/48</th>
</tr>
</thead>
</table>

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)

<table>
<thead>
<tr>
<th>IPC 5</th>
<th>C12N</th>
<th>C12Q</th>
</tr>
</thead>
</table>

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)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

<table>
<thead>
<tr>
<th>Category</th>
<th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th>
<th>Relevant to claim No.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>X</td>
<td>J. NATL. CANCER INST. (BETHESDA) 84 (5); 4 March 1992. 337-340</td>
<td>1, 2, 4, 5, 9-11</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>CITRON, M. ET AL 'DETECTION OF MESSENGER RNA FROM 0-6 METHYLGUANINE -DNA METHYLTRANSFERASE GENE MGMT IN HUMAN NORMAL AND TUMOR TISSUES.' see page 338: 'Materials and Methods'</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Y</td>
<td>US,A,5 017 488 (MCALLISTER ET AL.) 21 May 1991 see column 2, line 62 - line 66 see column 3, line 44 - line 46 see figure 2 see claims</td>
<td>1-5, 9-11</td>
</tr>
</tbody>
</table>

**X** Further documents are listed in the continuation of box C. **X** 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

  *A* document member of the same patent family

**Date of the actual completion of the international search**

12 September 1994

**Date of mailing of the international search report**

13-10-1994

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: 31 651 epo nl, (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S
<table>
<thead>
<tr>
<th>Category</th>
<th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th>
<th>Relevant to claim No.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Y</td>
<td>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA vol. 87, January 1990, WASHINGTON US pages 686 - 690 TANO, K. ET AL. 'Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine' cited in the application see the whole document</td>
<td>1-5,9-11</td>
</tr>
<tr>
<td>A</td>
<td>GENE vol. 72, 1988, AMSTERDAM NL pages 75 - 89 KRUPP, G. 'RNA synthesis: strategies for the use of bacteriophage RNA polymerases' see figure 1</td>
<td>1-3</td>
</tr>
</tbody>
</table>
### Box I  Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. **X** Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
   
   **Remark:** Although Claim 11 (insofar as it concerns an in vivo method) is related to a diagnostic method for the human or animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

2. □ Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. □ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

### Box II  Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. □ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. □ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. □ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. □ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
□ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
□ No protest accompanied the payment of additional search fees.
<table>
<thead>
<tr>
<th>Patent document cited in search report</th>
<th>Publication date</th>
<th>Patent family member(s)</th>
<th>Publication date</th>
</tr>
</thead>
</table>
A. KLASSEIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 5 C12N15/34 C12N9/10 C12N15/70 C12Q1/68 //C12Q1/48,
C12N15/11

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

B. RECHERCHERTE GEBIETE

Recherchiert ein Mindestprüfstoff (Klassifikationsystem und Klassifikationssymbole

IPK 5 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörige Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

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

C. ALS WESENTLICH ANGEGENEHNE UNTERLAGEN

<table>
<thead>
<tr>
<th>Kategorie</th>
<th>Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile</th>
<th>Betr. Anspruch Nr.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>X</td>
<td>J. NATL. CANCER INST. (BETHESDA) 84 (5); 4 MÄRZ 1992. 337-340 CITALON, M. ET AL 'DETECTION OF MESSENGER RNA FROM 6-METHYLGUANINE-DNA METHYLTRANSFERASE GENE MGMT IN HUMAN NORMAL AND TUMOR TISSUES.' siehe Seite 338: 'Materials and Methods'</td>
<td>1,2,4,5, 9-11</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. September 1994

Abschlußdatum des internationalen Recherchenberichts

13-10-1994

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Ruywik
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beisiedert

Andres, S

Formblatt PCT/ISA/218 (Blatt 2) (Juli 1993)
<table>
<thead>
<tr>
<th>Kategorie</th>
<th>Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile</th>
<th>Betr. Anspruch Nr.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>A</td>
<td>GENE Bd. 72, 1988, AMSTERDAM NL Seiten 75 - 89 KRUPP, G. 'RNA synthesis: strategies for the use of bacteriophage RNA polymerases' siehe Abbildung 1</td>
<td>1-3</td>
</tr>
</tbody>
</table>
INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 94/01800

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. X Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

   Bemerkung: Obwohl Anspruch 11 (soweit es sich um "in vivo" Verfahren handelt) sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, bezieht, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung

2. □ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. □ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. □ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.

2. □ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. □ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. □ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

□ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

□ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.
<table>
<thead>
<tr>
<th>Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument</th>
<th>Datum der Veröffentlichung</th>
<th>Mitglied(e) der Patentfamilie</th>
<th>Datum der Veröffentlichung</th>
</tr>
</thead>
</table>