

(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2004-501054
(P2004-501054A)

(43) 公表日 平成16年1月15日(2004.1.15)

(51) Int.Cl.⁷

C07H 21/04

C07H 1/08

C12N 15/09

F 1

C07H 21/04

C07H 1/08

C12N 15/00

テーマコード(参考)

4 B024

4 C057

A

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2000-524296 (P2000-524296)	(71) 出願人	500261813 ディーエヌエイ リサーチ イノベイションズ リミテッド イギリス国 エムイー9 8ピーエックス, ケント, シッティングボーン リサーチ センター, コーンウォース ドライブ 940
(86) (22) 出願日	平成10年12月4日 (1998.12.4)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成12年6月5日 (2000.6.5)	(72) 発明者	ベイカー, マシュー ジョン イギリス国 エムイー15 9ユージェイ ケント, メイドストーン, ルース ロード 481
(86) 國際出願番号	PCT/GB1998/003602		F ターム (参考) 4B024 AA20 HA20
(87) 國際公開番号	W01999/029703		
(87) 國際公開日	平成11年6月17日 (1999.6.17)		
(31) 優先権主張番号	9725839.6		
(32) 優先日	平成9年12月6日 (1997.12.6)		
(33) 優先権主張国	イギリス(GB)		
(31) 優先権主張番号	9815541.9		
(32) 優先日	平成10年7月17日 (1998.7.17)		
(33) 優先権主張国	イギリス(GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】核酸の単離

(57) 【要約】

血液より核酸を抽出する方法は、血液細胞(好ましくは、溶解後)をあるpHで活性化固相と接触し核酸を固定化する工程、次に、電荷が反転または中性化した場合により高いpHにおいて核酸を取り除く工程を包含する。この固相は、結合剤としてヒスチジンによって活性化されるガラスビーズであり得る。このビーズは、ビーズを含むカラムを通して空気で血液を吸引することによって流動し得、接触を改善し、かつ詰まりを防ぐ。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生物学的材料由来の生体分子の抽出のための方法であって、ここで該方法は、第1のpHにおいて該生体分子を固相に結合し得る該固相と該生物学的材料を接触する工程、次いで第2のpHにおいて溶出溶媒を使用する溶出によって、該固相に結合する該生体分子を抽出する工程、を包含する方法。

【請求項 2】

前記生体分子が核酸を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記生物学的材料が血液である、請求項1または2に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記生体分子が、前記DNAを前記固相に結合するために6未満のpHにおいて該固相に接触し、そして該DNAが8より大きいpHにおいて該固相から放出される、請求項1、2、または3に記載の方法。

【請求項 5】

前記生体分子が、前記DNAを前記固相に結合するために実質的に中性pHにおいて該固相に接触し、そして該DNAが10より大きいpHにおいて該固相から放出される、請求項1、2、または3に記載の方法。

【請求項 6】

前記血液中の細胞が溶解されて核酸を放出する、請求項3～5のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記細胞が、イオン性界面活性剤もしくは非イオン性界面活性剤、塩の低張溶液、タンパク質分解酵素、カオトロピック剤と接触することによってか、またはpH変化もしくは熱を使用することによって溶解される、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記血液が、処理および注入をより容易にするために、水または他の希釀剤で希釀される、請求項3～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

10倍までの希釀が使用される、請求項8に記載の方法。

30

【請求項 10】

前記生物学的材料が接触される前記固相が、核酸に対する天然の親和性を有する材料から形成される、前述の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

前記生物学的材料が接触される前記固相が、核酸を該固相に結合させる薬剤か、または核酸に対する該固相の親和性を増大する薬剤で処理された表面を有する材料から形成される、前述の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 12】

前記固体材料の前記表面が、前記固相上に正電荷または親水性表面もしくは疎水性表面を導入し得る物質で処理される、請求項11に記載の方法。

40

【請求項 13】

前記使用される結合剤が、正に荷電された固相のpKaを越えるかまたは下まわるようにpHを変化することによって反転または中性化され得る、該正に荷電された固相を使用する荷電が切替え可能なイオン交換樹脂である、請求項11に記載の方法。

【請求項 14】

前記結合剤がヌクレオチド、ポリアミン、またはイミダゾール部分を含む化合物である、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記核酸が前記固相内に取り込まれるインターカレーティング化合物を使用するインターカレーションによって結合される、請求項11に記載の方法。

50

【請求項 1 6】

前記色素がアクチノマイシンDまたはエチジウムプロマイドである、請求項15に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記固体材料の表面がヒスチジンまたはポリヒスチジンで処理される、請求項11に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記固相が、制御された細孔のガラス、ポリサッカライド、セラミック材料または多孔性のプラスチック材料である、前述の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記固相が、ポリスチレンのビーズまたは常磁性材料のビーズを含有する、前述の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記固相が、官能基を含むために修飾されたプラスチック表面を含有する、前述の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記プラスチックがポリプロピレンである、請求項20に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記ポリプロピレン表面が、カルボキシル化された表面を作製するために酸化剤を用いて該表面を酸化することによって修飾される、請求項21に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記カルボキシル基が、イミダゾールもしくはポリヒスチジンまたは任意の強イオン交換体もしくは弱イオン交換体のようなアニオン基と共有結合的にカップリングすることによってさらに修飾され、電荷相互作用による核酸の結合を可能にする、請求項22に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記官能基が、前記核酸を結合するように正または負に荷電される、請求項11～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記官能基が、他のリガンドまたはポリマーに対して共有結合的にカップリング可能な化学基である、請求項11～23のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記固体材料が、単一に成形された部分であるか、または容器中の挿入物である多孔性のプラスチックプラグである、請求項20～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記プラスチックがプラスチック成形物中にある、請求項20～25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記固体材料がポリメラーゼ連鎖反応（PCR）チューブである、請求項27に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記固体材料が深いウェルのプレートである、請求項27に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記チューブまたは前記ウェルを使用して、少量のDNAまたはRNAを単離および固定化し、それに続くPCRまたは他の遺伝子的分析および操作のための純粋な鋳型を生成する、請求項26～29のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記固相が顆粒状の固体材料を含有し、該固体材料が混合／攪拌デバイス中で該固体材料と混合されるか、該固相上を血液サンプルを通過させるか、あるいは該固相が磁性化支持体上で操作され、該血液サンプルと接触される、前述の請求項のいずれか1項に記載の方

10

20

30

40

50

法。

【請求項 3 2】

前記容器が多重ウェルプレート中のウェルであり、そして異なるサンプル由来のDNAの一連の抽出が実質的に同時に行われる、前述の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記固相がカラム中で顆粒状形態であり、そして前記血液サンプルが該カラムを通して適用される圧力差によって該カラムを通して吸い上げられる、前述の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記血液サンプルが、空気を用いて吸い上げられ、そして前記顆粒状固体材料が流動化されるようになる、請求項33に記載の方法。 10

【請求項 3 5】

前記生体分子が、低塩緩衝溶液または水を用いた溶出によって取り除かれる、前述の請求項のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、生物学的材料、特に血液から、核酸および他の生体分子を抽出する方法に関する。

【0002】

一連の目的のためのDNA分析に対する非常に大きな需要があり、そしてこのことは、DNAおよび他の核酸の単離および精製に対する、迅速で、安全で、高い処理能力のある方法に対する要求をもたらしている。 20

【0003】

DNAの同定または分析において使用されるサンプルは、生物学的材料（例えば、動物細胞および植物細胞）、糞便、組織などのような広範囲な供給源から採取され得、またサンプルは、土壤、食品、水などからも、採取され得る。

【0004】

既存のDNAの抽出方法には、フェノール／クロロホルムの使用、塩析、カオトロピック塩およびシリカ樹脂の使用、アフィニティー樹脂の使用、イオン交換クロマトグラフィーならびに磁気ビーズの使用が挙げられる。複数の方法は、米国特許第5,057,426号、同第4,923,978号、欧州特許第0,512,767号、A1号および欧州特許第0,515,484B号ならびにWO 95/13368号、WO 97/10331号およびWO 96/18731号に記載される。これらの特許および特許出願は、核酸を固体支持体上に吸着し、次いで核酸を単離する方法を開示する。この以前に使用された方法は、核酸を単離するためにいくつかの型の溶媒を使用し、そしてこれらの溶媒は、引火性、可燃性または毒性である。 30

【0005】

血液は、血液サンプルが広範囲な理由のために慣習的に得られるので、DNA分析に対する最も豊富なサンプル供給源の1つである。しかし、公知のDNA抽出方法に使用される血液の粘稠性質およびタンパク様性質のために、比較的少量のDNAを含む大容量を取り扱う困難さに起因して、自動操作の使用を達成することは困難であることが判明している。これまで核酸の抽出は、危険な試薬の使用によってのみ部分的に自動化され、そしてゆっくりとしたプロセス時間であった。 40

【0006】

本発明者は、今や、血液および他の生物学的材料由来の核酸および他の生体分子の抽出のための改良された方法を発明した。

【0007】

本発明に従って、生物学的材料由来の生体分子の抽出方法を提供する。この方法は、第1のpHにおいて固相に生体分子が結合し得る固相に、生物学的材料を接触させる工程、次いで第2のpHにおいて溶出溶媒を使用する溶出によって、固相に結合する生体分子を抽 50

出する工程を包含する。

【0008】

この方法は、特に生物学的材料が血液である場合に有用であるが、しかしこの方法は、プラスミドおよびベクターの単離および植物DNAの抽出のような一連の適用材料について使用され得る。

【0009】

好ましくは、血液中の細胞は、核酸を放出するために溶解され、そして公知の溶解剤および方法、例えば、イオン性および非イオン性界面活性剤、低浸透圧性溶液の塩、タンパク質分解酵素、カオトロピック剤、溶媒との接触、pH変化または熱の使用、が用いられ得る。核酸を単離するために細胞を溶解する方法は、WO 96/00228号に記載される。10

【0010】

生物学的材料が血液からなる場合、このサンプルは、操作および処理をより容易にするために、必要に応じて水または他の希釈液で希釈され得る。

【0011】

10倍までの希釈が使用され得、そして一般には、それ以上の希釈がより良好であり得、そして血液の少ない希釈を可能とさせることが、本発明の特徴である。

【0012】

血液が接触する固相は、核酸に対して天然の親和性を有する材料から形成され得るか、あるいは、核酸を固相に結合させるか、または核酸に対する親和性を増加させる薬剤で処理された固相表面を有する材料から形成され得る。適切な材料には、制御された細孔ガラス、ポリサッカライド（アガロースまたはセルロース）、他の型のシリカ／ガラス、セラミック材料、多孔性のプラスチック材料（例えば、単一の成形部分中の多孔性のプラスチックプラグまたは標準的なチューブ中への挿入物）、ポリスチレンビーズ、常磁性ビーズなどが挙げられる。この大きさおよび多孔度は重要ではなく、そして変化し得、そして特定の適用について選択され得る。20

【0013】

固相の表面を処理するため、または誘導化するための適切な手段には、例えば、表面上に正電荷のような電荷を、または固相上に親水性もしくは疎水性表面（例えば、ヒドロキシル基、硝酸基、自己反応性基、色素、および他の芳香族化合物）を導入し得る材料でそれを処理することが挙げられる。30

【0014】

本発明の好ましい実施態様において、固相は、あるpHにおいて血液サンプル中の混入物よりはむしろDNAを固相に結合させ、そして異なるpHにおいて溶出剤と接触される場合に、結合された核酸を放出することを可能にする。この系は、ヒスチジンまたはポリヒスチジン（これは低いpH（例えば、6より小さい）で核酸に結合する傾向にあり、次いでpHが増大する場合（例えば8より大きい）、結合した核酸を放出する）を組み込む固相を用いて使用され得る。あるいは、核酸は、実質的に中性pHにおいてアミノ化された表面で結合し、そして非常に高いpHにて放出される。

【0015】

本発明の別の実施態様において、プラスチック成形は、結合剤（例えば、プレート中のウェルなどにおいて）を組み込み得る。その結果、この結合剤は、その表面に組み込まれ、次いで血液サンプルを、核酸が表面に結合されるように表面に接触する。次いで、この血液サンプルが除去され、そしてこの表面は、結合した核酸を放出するために溶出剤で処理される。表面が多重ウェルプレート中のウェルの一部である場合、この全体の系は、容易に迅速な大量サンプリングおよび抽出技術に適合し得る。40

【0016】

使用され得る結合剤は、可逆的であり得、結合剤のpKaを越えるpHに変化することによって反転され得るか、または中性になり得る正に荷電した固相（例えば、適切なpKa値を有するヌクレオチド、ポリアミン、イミダゾール基および他の同様な試薬）を使用す50

る、電荷が切替え可能なイオン交換樹脂を含む。

【0017】

また、核酸は、固相内に組み込まれる多種のインターラーティング化合物（例えば、アクリノマイシンD、エチジウムプロマイドなど）を使用するインターラーションによつても結合され得る。

【0018】

本発明のさらなる実施態様において、プラスチック表面は、官能基を含むように修飾され得る。このプラスチックは、サンプルを含むために使用される任意のプラスチック（例えば、ポリプロピレン）であり得る。この官能基は、適切な緩衝液中で核酸に結合するよう10に正または負に荷電され得る。

【0019】

あるいは、この官能基は、他のリガンドまたはポリマーに共有結合的にカップリングする能力を有する化学基であり得る。

【0020】

プラスチックが、プラスチック成形（例えば、プレート中のウェルにおいて）において、またはポリメラーゼ連鎖反応（P C R）チューブとして使用される場合、このプラスチックの表面の特徴は、成形化合物（例えば、注入成形化合物中のように）中に適切な化学物質を含めることによって、または添加することによって、本発明において使用するために適切に修飾され得る。

【0021】

これが、P C Rチューブ中で、または深いウェルのプレート中で使用される場合、このチューブまたはウェルを使用して、少量のD N AまたはR N Aを単離および固定化し得、それに続くP C Rまたは他の遺伝子の分析および操作のための純粋な鋳型を生成し得る。

【0022】

プラスチックがポリプロピレン（例えば、それは薄壁のP C Rチューブの形態である）である場合、このポリプロピレン表面は、酸化剤（例えば、過マンガン酸カリウムおよび硫酸）を用いてこの表面を酸化することによって修飾して、カルボキシル化された表面（C O O H基）を生成し得る。次いで、このチューブを使用して、溶液からまたは粗サンプル（例えば、血液）からのD N Aの単離を改良し得る。p H、誘電率、溶解度またはイオン強度を調整することによって、このD N AまたはR N Aは、チューブの壁面に固定化され30、混入物を洗浄して除去し、P C Rまたは他の分析技術について使用可能となり得る。

【0023】

このカルボキシ基は、アニオン基（例えば、イミダゾールまたはポリヒスチジンあるいは任意の強イオン交換体もしくは弱イオン交換体）を共有結合的にカップリングすることによってさらに修飾され得、電荷相互作用によって核酸の結合を可能にする。次いで、このチューブを使用して、溶液からまたは粗サンプル（例えば、血液）からのD N Aの単離を改良し得る。p H、誘電率、またはイオン強度を再び調整することによって、このD N AまたはR N Aは、チューブの壁面に固定化され、混入物を洗浄して除去し、P C Rまたは他の分析技術について使用可能となり得る。

【0024】

この核酸は、低塩緩衝液中で溶出され得、その結果、P C Rまたは他の分析について使用可能である。

【0025】

この固相は、混合／攪拌装置中で固相と混合することによるか、固相上を血液サンプルを通過することによるか、あるいは固相が常磁性であり、磁場によって操作され得、血液サンプルに接触され得る。本発明は、特に血液由来の核酸の分離または単離について適切であるが、これは、特に細胞壁の細片または不溶性粒子の除去が必要である一連の生体分子とともに使用され得る。

【0026】

本発明の好ましい実施態様において、この固相は、カラム中で顆粒状の形態であり、そし50

てこの血液サンプルは、カラムを通して適用される圧力差によって、カラムを通して吸い上げられる。この血液サンプルは、空気で吸い上げられ、そして顆粒状固体材料が流動化されるようになり得、従って混合および接触速度が増大し、そして目詰まりを最小にする。

【0027】

本発明の方法は、一連の異なるサンプルからの抽出が、実質的に同時に行われ得る場合、多重ウェル形式における使用において適切であり、そしてこのことは、迅速な高処理能力の抽出を行うことを可能にする抽出過程の自動化を容易にし、そしてコンビナトリアル化学の実行を可能にする。これは、標準的なウェル配列において高処理能力を有することを可能にし（例えば、8×12配列）、その結果、多数のサンプル型が、同時に自動的に処理され得る。

【0028】

本発明は、実施例において記載される。

【0029】

(実施例1)

(全血由来の核酸の抽出)

電荷が切替え可能なイオン交換体を、1グラムのアミノ化されたガラスビーズを20mgのポリヒスチジンを含む0.1M炭酸水素ナトリウム(pH8)中の0.01%(v/v)グルタルアルデヒドと混合することによる、グルタルアルデヒドを使用する100(m)ガラスビーズとのポリヒスチジンの共有結合的カップリングによって、調製した。一晩インキュベート後、このビーズを徹底的に洗浄して非共有的に結合した材料を除去し、そして0.1%(v/v)Tween 20を含む10mM MES(pH5)中で保存した。

【0030】

約300mgの100(m)誘導体化ガラスビーズを、両端で閉じられた1mlのプラスチックカラムに添加した。

【0031】

血液サンプルを、等量の10mM MES(pH5)(1%Tween 20、タンパク質分解酵素(200(g/ml)および1mM EDTAを含む)とインキュベートした。消化が完了した後、この血液をガラスビーズを含むカラムに吸い上げて、DNAを固定化した。この工程は、混入するタンパク質が廃液に素通りすることを可能にした。

【0032】

固定化されたDNAを含むガラスビーズを、10mM MES、pH5(1%Tween 20、および1mM EDTAを含む)を含む緩衝液で洗浄し、そしてこれを洗浄溶液が無色になるまで繰り返した。

【0033】

洗浄後、このビーズを風乾し、そしてDNAを少量の10mM Tris HCl、pH 8.5で溶出し、そして分析に使用可能に滅菌チューブ中に回収した。従って、このDNAを、血液から分離した。

【0034】

異なる生体分子について、緩衝液などを適切に変更し得る。

【0035】

(実施例2)

1グラムのカルボキシル化された常磁性ビーズを、50mM イミダゾール緩衝液(pH6)中で洗浄し、次いで50mlの50mM イミダゾール緩衝液(pH6)中の100mgのポリヒスチジンと混合した。化学的カップリング剤(EDC)を最終濃度を5mg/mlとして添加し、そして一晩混合した。このビーズを水、0.5M 塩化ナトリウム、1% Tween 20、100mM Tris HCl(pH8)で洗浄し、そして10mM MES、0.1% Tween 20(pH5)中で保存した。

【0036】

10

20

30

40

50

血液由来のDNAの抽出のために、1mgのビーズを25mM MES、1mM EDTAを有する10% Tween 20 (pH 5) 中で希釈された血液と混合した。このビーズを、磁石で分離し、そして1mM MES、0.1% Tween 20 で再懸濁することによって洗浄した。DNAを溶出するために、このビーズを、10mM Tris HCl (pH 8.5) で再懸濁し、そして溶液中のDNAを残すように、磁石を用いて分離した。

【国際公開パンフレット】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION

International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification 6: C07H 1/00	(11) International Publication Number: WO 99/29703
	(43) International Publication Date: 17 June 1999 (17.06.99)
(21) International Application Number: PCT/GB98/03602	(61) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CL, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SL, SK, SL, T, TM, TR, TT, CA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, T, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CR, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) International Filing Date: 4 December 1998 (04.12.98)	
(30) Priority Data: 9725839.6 6 December 1997 (06.12.97) GB 9815541.9 20 July 1998 (20.07.98) GB	
(71) Applicant (for all designated States except US): DNA RE- SEARCH INSTRUMENTS LIMITED [GB/GB]; Sitting- bourne Research Centre, Building 940, Popjek Road, Kent ME9 8PS (GB).	
(72) Inventor; and	
(73) Inventor/Applicant (for US only): BAKER, Matthew, John [GB/GB]; 18 Upper Farn Road, Maidstone, Kent ME16 8DN (GB).	
(74) Agent: COUIN, Alan, Nicoll; 2 Grey Place, Tatsfield, West Sussex, Kent TN16 2BB (GB).	
(54) Title: ISOLATION OF NUCLEIC ACIDS	
(57) Abstract	
	A method of extracting nucleic acids from blood comprises contacting blood cells, preferably after lysing with an activated solid phase at one pH to immobilise the nucleic acids and then removing the nucleic acids at a higher pH when the charge has been reversed or neutralised. The solid phase can be glass beads activated by a histidine as a binding agent. The beads can be fluidised by sucking the blood with air up through a column containing the beads to improve contact and prevent clogging.

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Liechtenstein	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Greece	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Micronesia	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BR	Brazil	GS	Guinea	MK	The former Yugoslav	TM	Turkmenistan
BY	Belarus	GR	Greece	ML	Republic of Macedonia	TR	Turkey
CY	Cyprus	GT	Guatemala	MN	Mali	TT	Trinidad and Tobago
DE	Deutschland	HK	Hong Kong	MR	Mauritania	UA	Ukraine
EG	Egypt	HR	Croatia	MV	Malawi	UG	Uganda
ER	Eritrea	IE	Ireland	MX	Mexico	US	United States of America
BR	Brazil	IL	Israel	NE	Niger	UZ	Uzbekistan
BY	Belarus	IS	Iceland	SL	Nigerian	VN	Viet Nam
CA	Canada	IT	Italy	SO	Norway	YU	Yugoslavia
CF	Central African Republic	JP	Japan	SZ	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Costa Rica	KE	Kenya				
DK	Dominican Republic	KG	Kyrgyzstan				
CI	Chad	KM	Kosovo				
CM	Chad	KR	Democratic People's				
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea				
CN	China	KR	Republic of Korea				
CU	Cuba	KY	Kazakhstan				
CZ	Czech Republic	LK	Saint Lucia				
DE	Germany	LI	Liechtenstein				
DK	Denmark	LK	Sri Lanka				
EE	Estonia	LR	Liberia				
				SG	Singapore		

- 1 -

Isolation of Nucleic Acids

The present invention relates to a method for extracting nucleic acids and other biomolecules from biological material, particularly blood.

5

There is a very large demand for DNA analysis for a range of purposes and this has lead to the requirement for quick, safe, high throughput methods for the isolation and purification of DNA and other nucleic acids.

10 Samples for use for DNA identification or analysis can be taken from a wide range of sources such as biological material such as animal and plant cells, faeces, tissue etc. also samples can be taken from soil, foodstuffs, water etc.

15 Existing methods for the extraction of DNA include the use of phenol/chloroform, salting out, the use of chaotropic salts and silica resins, the use of affinity resins, ion exchange chromatography and the use of magnetic beads. Methods are described in US Patents 5057426, 4923978, EP Patents 0512767 Aland EP0515484B and WO 95/13368, WO 97/10331 and WO 96/18731. These patents and patent applications disclose methods of adsorbing nucleic acids on to a solid support and then isolating 20 the nucleic acids. The previously used methods use some type of solvent to isolate the nucleic acids and these solvents are flammable, combustible or toxic.

25 Blood is one of the most abundant sample sources for DNA analysis as blood samples are routinely taken for a wide range of reasons. However because of the viscous and proteinaceous nature of blood using known DNA extraction methods it has proved difficult to accomplish using automation due to the difficulties of handling large volumes containing relatively small amounts of DNA. Hitherto nucleic acid extraction has been partially automated only by using hazardous reagents and slow processing times.

30

- 2 -

I have now devised an improved method for the extraction of nucleic acids and other biomolecules from blood and other biological materials.

According to the invention there is provided a method for the extraction of biomolecules from biological material which method comprises contacting the biological material with a solid phase which is able to bind the biomolecules to it at a first pH and then extracting the biomolecules bound to the solid phase by elution using an elution solvent at a second pH.

10 The method is particularly useful if the biological material is blood, but the method can be used for a range of applications substances such as Plasmid and vector isolation and plant DNA extraction.

15 Preferably the cells in the blood are lysed to release nucleic acids and known lysing agents and methods can be used, such as contacting with ionic and non ionic detergents, hypotonic solutions of salts, proteases, chaotropic agents, solvents, using pH changes or heat. A method of lysing cells to isolate nucleic acid is described in WO 96/00228.

20 When the biological material consists of blood the samples can optionally be diluted with water or other diluent in order to make it easier to manipulate and to process.

Dilutions up to ten times can be used and in general more dilution can be better and it is a feature of the present invention that it allows low dilution of blood to be possible.

25 The solid phase with which the blood is contacted, can be a formed of a material which has a natural affinity for nucleic acids or it can be formed of a material which has its surface treated with an agent which will cause nucleic acids to bind to it or increase its affinity for nucleic acids. Suitable materials include controlled pore glass, 30 polysaccharide (agarose or cellulose), other types of silica/glass, ceramic materials,

- 3 -

porous plastic materials such as porous plastic plugs which in a single moulded part or as an insert in a standard tube, polystyrene beads para magnetic beads etc. The size and porosity is not critical and can vary and be selected for particular applications.

5 Suitable means for treating the surface of the solid phase or for derivitising it include treating it with a substance which can introduce a charge e.g. a positive charge on the surface or a hydrophilic or hydrophobic surface on the solid phase e.g. hydroxyl groups, nitrate groups, autoreactive groups, dyes and other aromatic compounds.

10 In a preferred embodiment of the invention the solid phase will cause DNA to be bound to it at one pH in preference to contaminants in the blood sample and will allow the bound nucleic acid to be released when it is contacted with an eluant at a different pH. This system can be used with a solid phase which incorporates histidine or a polyhistidine which will tend to bind nucleic acids at low pH e.g. less than 6 and 15 will then release the bound nucleic acids when the pH is increased e.g. to greater than 8. Alternatively the nucleic acids are bound at substantially neutral pH to an aminated surface and released at very high pH.

20 In another embodiment of the invention a plastic moulding can incorporate a binding agent e.g. in a well in a plate etc. so that the binding agent is incorporated in the surface, the blood sample is then contacted with the surface so as to cause nucleic acids to be bound to the surface. The blood sample is then removed and the surface treated with an eluting agent to release the bound nucleic acids. When the surface is 25 part of a well in a multi- well plate, the total system can be readily adapted for rapid large scale sampling and extraction techniques.

30 Binding agents which can be used include charge switchable ion exchange resins using a positively charged solid phase that can be reversed or made neutral by changing the pH above its pKa. e.g. nucleotides, polyamines, imidazole groups and other similar reagents with a suitable pKa value.

- 4 -

Also, nucleic acids can be bound by intercalation using a variety of intercalating compounds incorporated into the solid phase e.g. Actinomycin D, Ethidium Bromide etc.

5

In a further embodiment of the invention a plastic surface can be modified to include functional groups. The plastic can be any plastic used for containing samples e.g. polypropylene. The functional groups can be positively or negatively charged so as to bind the nucleic acids in the correct buffer solution.

10

Alternatively the functional groups can be chemical groups capable of covalent coupling to other ligands or polymers.

15

When the plastic is used in a plastic moulding e.g. in a well in a plate, or as a Polymerase Chain Reaction (PCR) tube, the surface characteristics of the plastic can be suitably modified for use in the present invention by including or adding the appropriate chemicals in the moulding compound e.g. as in an injection moulding compound.

20

When this is used in a PCR tube or in a deep well plate the tubes or wells can be used to isolate and immobilise small quantities of DNA or RNA generating a pure template for subsequent PCR or other genetic analysis and manipulation.

25

When the plastic is polypropylene e.g. it is in the form of a thin walled PCR tube the polypropylene surface can be modified by oxidising the surface with an oxidising agent such as potassium permanganate and sulphuric acid to create a carboxylated surface (COOH groups). This tube can then be used to improve the isolation of DNA from solutions or from crude samples e.g. blood. By adjusting the pH, dielectric constant, solubility or ionic strength the DNA or RNA can be immobilised on the walls of the tube, washed free of contaminants, ready for PCR or other analytical

30

- 5 -

techniques.

The carboxy groups can be further modified by covalently coupling an anionic group such as imidazole or polyhistidine or any strong or weak ion exchanger, to allow 5 binding of nucleic acids by a charge interaction. This tube could then be used to improve the isolation of DNA from solutions or from crude samples e.g. of blood. Again by adjusting the pH, dielectric constant, or ionic strength the DNA or RNA can be immobilised on the walls of the tube, washed free of contaminants, ready for PCR or other analytical techniques.

10

The nucleic acids can be eluted with in a low salt buffer so that it is ready for PCR or other analysis.

15

The solid phase can be contacted with a blood sample by mixing with the solid phase in a mixing/ stirring device, by passing the blood sample over the solid phase or the solid phase can be paramagnetic and manipulated by a magnetic field. Although the invention is particularly suitable for the separation or isolation of nucleic acids from blood it can be used with a range of biomolecules particularly those that require removal of cell wall debris or insoluble particles.

20

In a preferred embodiment of the invention the solid phase is in granular form in a column and the blood sample is drawn up through the column by means of a pressure differential being applied through the column, the blood sample is drawn up with air and the granular solid material can become fluidised thus increasing the mixing and 25 contacting rates and minimising clogging.

30

The method of the invention is suitable for use in a multi-well format when a series of extractions from different samples can take place substantially simultaneously and this will facilitate the automation of the extraction process allowing rapid high throughput extraction to take place and to allow combinational chemistry to be

- 6 -

performed. This will enable there to be a high throughput in a standard well array e.g. an eight by twelve array so that a large number of sample types can be treated automatically at the same time.

5 The invention is described in the Example.

Example 1

Extraction of Nucleic Acids from Whole Blood

10 A charge switchable ion-exchanger was prepared by covalently coupling polyhistidine to 100 (m glass beads using glutaldehyde by mixing 1 gram of the aminated glass beads with 0.01 % (v/v) glutaldehyde in 0.1M sodium bicarbonate at pH8 containing 20mg polyhistidine. After overnight incubation the beads were 15 washed exhaustively to remove non-covalently bound material and stored in 10mM MES, pH5 containing 0.1 % (v/v) Tween 20.

About 300mg of the 100(m derivitised glass beads were added to a 1ml plastic column enclosed at both ends.

20 A blood sample was incubated with an equal volume of 10mM MES pH5, containing 1% Tween 20, proteases (200(g/ml) and 1 mM EDTA. After digestion is complete the blood was sucked up the column containing the glass beads and the DNA became immobilised allowing the contaminating proteins to pass through to waste.

25 The glass beads containing the immobilised DNA were washed with a buffer comprising 10mM MES pH5, containing 1% Tween 20, and 1mM EDTA and this was repeated until the wash solution was colourless.

30 After washing, the beads were dried with air and DNA eluted with a small quantity of

- 7 -

10mM Tris HCl, pH 8.5 and collected in a sterile tube ready for analysis. Thus the DNA were separated from the blood.

For different biomolecules, the buffer etc. can be suitably modified.

5 Example 2

One gram of carboxylated paramagnetic beads were washed in 50mM Imidazole buffer pH 6 and then mixed with 100mg of polyhistidine in 50ml of 50mM Imidazole buffer pH 6. A chemical coupling agent was added (EDC) at a final concentration of 5mg per ml and mixed overnight. The beads were washed in water, 0.5M sodium chloride, 1% Tween 20, 100mM Tris HCl pH 8 and stored in 10mM MES, 0.1% Tween 20 pH 5.

To extract DNA from blood, 1mg of beads were mixed with blood diluted in 10% Tween 20 with 25mM MES, 1mM EDTA pH 5. The beads were separated with a magnet and washed by resuspending in 1mM MES, 0.1% Tween 20. To elute the DNA the beads were resuspended in 10mM Tris HCl pH 8.5 and separated with a magnet leaving the DNA in solution.

- 8 -

Claims

1. A method for the extraction of biomolecules from biological material which
5 method comprises contacting the biological material with a solid phase which is able
to bind the biomolecules to it at a first pH and then extracting the biomolecules
bound to the solid phase by elution using an elution solvent at a second pH.
2. A method as claimed in claim 1 in which the biomolecule comprises nucleic acids.
10
3. A method as claimed in claim 1 or 2 in which the biological material is blood.
4. A method as claimed in claim 1, 2 or 3 in which the biomolecule is contacted with
the solid phase at a pH of less than 6 to bind the DNA to the solid phase and the DNA
15 is released from the solid phase at a pH of greater than 8.
5. A method as claimed in claim 1, 2 or 3 in which the biomolecule is contacted with
the solid phase at a substantially neutral pH to bind the DNA to the solid phase and
the DNA is released from the solid phase at a pH of greater than 10.
20
6. A method as claimed in any one of claims 3 to 5 in which the cells in the blood are
lysed to release nucleic acids
7. A method as claimed in claim 6 in which the cells are lysed by contacting with an
25 ionic or non ionic detergent, hypotonic solutions of a salt, a protease, a chaotropic
agents or by use of pH changes or heat.
8. A method as claimed in any one of claims 3 to 7 in which the blood is diluted
with water or other diluent in order to make it easier to manipulate and to
30 pour.

9. A method as claimed in claim 8 in which a dilution of up to ten times is used.
10. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the solid phase with which the biological material is contacted is formed of a material which has a natural affinity for nucleic acids
11. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the solid phase with which the biological material is contacted is formed of a material which has its surface treated with an agent which will cause nucleic acids to bind to it or increase its affinity for nucleic acids.
12. A method as claimed in claim 11 in which the surface of the solid material is treated with a substance which can introduce a positive charge or a hydrophilic or hydrophobic surface on the solid phase
13. A method as claimed in claim 11 in which the binding agent used is a charge switchable ion exchange resins using a positively charged solid phase that can be reversed or neutralised by changing the pH above or below its pKa.
14. A method as claimed in claim 13 in which the binding agent is a nucleotide, a polyamine or a compound containing an imidazole moiety.
15. A method as claimed in claim 11 in which the nucleic acids are bound by intercalation using an intercalating compound incorporated into the solid phase.
16. A method as claimed in claim 15 in which the dye is Actinomycin D or Ethidium Bromide.
- 30 17. A method as claimed in claim 11 in which surface of the solid material is treated

- 10 -

with histidine or a polyhistidine.

18. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the solid phase is a controlled pore glass, a polysaccharide, a ceramic material or a porous plastic material.
19. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the solid phase comprises beads of polystyrene or of a para magnetic material.
- 10 20. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the solid phase comprises a plastic surface modified to include functional groups.
21. A method as claimed in claim 20 in which the plastic is polypropylene.
- 15 22. A method as claimed in claim 21 in which the polypropylene surface is modified by oxidising the surface with an oxidising agent to create a carboxylated surface.
- 20 23. A method as claimed in claim 22 in which the carboxyl groups are further modified by covalently coupling an anionic group such as imidazole or polyhistidine or any strong or weak ion exchanger, to allow binding of nucleic acids by a charge interaction.
24. A method as claimed in any one of claims 11 to 23 in which the functional groups are positively or negatively charged so as to bind the nucleic acids.
- 25 25. A method as claimed in any one of claims 11 to 23 in which the functional groups are chemical groups capable of covalent coupling to other ligands or polymers.
- 30 26. A method as claimed in any one of claims 20 to 25 in which the solid material is a porous plastic plug which is a single moulded part or is an insert in a container.

- 11 -

27. A method as claimed in claim 20 to 25 in which the plastic is in a plastic moulding.
- 5 28. A method as claimed in claim 27 in which the solid material is a Polymerase Chain Reaction (PCR) tube
29. A method as claimed in claim 27 in which the solid material is a deep well plate.
- 10 30. A method as claimed in any one of claims 26 to 29 in which the tubes or wells are used to isolate and immobilise small quantities of DNA or RNA generating a pure template for subsequent PCR or other genetic analysis and manipulation.
- 15 31. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the solid phase comprises granular solid material which is contacted with a blood sample by mixing with the solid material in a mixing/ stirring device, by passing the blood sample over the solid phase or the solid phase is manipulated on a magnetisable support.
- 20 32. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the containers are wells in a multi-well plate and a series of extractions of DNA from different samples takes place substantially simultaneously.
- 25 33. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the solid phase is in granular form in a column and the blood sample is drawn up through the column by means of a pressure differential being applied through the column.
34. A method as claimed in claim 33 in which the blood sample is drawn up with air and the granular solid material becomes fluidised.
- 30 35. A method as claimed in any one of the preceding claims in which the

WO 99/29703

PCT/GB98/03602

- 12 -

biomolecules are removed by elution with a low salt buffer solution or water.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ :	C07H 1/08, C12N 15/10, C12Q 1/68	(11) International Publication Number:	WO 99/29703		
		(A3)	(43) International Publication Date:	17 June 1999 (17.06.99)	
(21) International Application Number:		PCT/GB98/03602			
(22) International Filing Date:		4 December 1998 (04.12.98)			
(30) Priority Data:		9725139.6 6 December 1997 (06.12.97)	GR	9815541.9 20 July 1998 (20.07.98)	GB
<p>(71) Applicant (for all designated States except US): DNA RESEARCH INSTRUMENTS LIMITED [GB/GB]; Sittingbourne Research Centre, Building 940, Popjaks Road, Kent ME9 8PS (GB).</p> <p>(72) Inventor; and</p> <p>(73) Inventor/Applicant (for US only): BAKER, Matthew, John [GB/GU]; 18 Upper Pant Road, Maidstone, Kent ME16 8DN (GB).</p> <p>(74) Agent: COHEN, Alan, Nicol; 2 Grove Place, Tatsfield, Westerham, Kent TN16 2BB (GB).</p>					
<p>(81) Designated States: AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, H, GH, GB, GI, GM, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NG, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SE, SL, TI, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), European patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, LI, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Published With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</p>					
(88) Date of publication of the international search report: 26 August 1999 (26.08.99).					
<p>(54) Title: ISOLATION OF NUCLEIC ACIDS</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A method of extracting nucleic acids from blood comprises contacting blood cells, preferably after lysing with an activated solid phase at one pH to immobilise the nucleic acids and then removing the nucleic acids at a higher pH when the charge has been reversed or neutralised. The solid phase can be glass beads activated by a histidine as a binding agent. The beads can be fluidised by sucking the blood with air up through a column containing the beads to improve contact and prevent clogging.</p>					

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lithuania	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MU	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BE	Belgium	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GB	Greece	MN	Republic of Macedonia	TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Tunisia and Tabago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CG	Central African Republic	JP	Japan	NO	Norway	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KH	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon	KR	Republic of Korea	PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakhstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 98/03602
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07H/08 C12N15/10 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Main or documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07H C12N C12Q		
Documentation searched other than main or main 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		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 707 077 A (JOHNSON & JOHNSON CLIN DIAG) 17 April 1996	1-14, 18-25,35
Y	see the whole document, but especially, page 5, lines 18 to page 6, line 48; example I; claims	1-35

X	WO 96 09116 A (UNIV MASSEY) 28 March 1996	1-14, 17-20, 24,25,35
Y	see the whole document, but especially page 4, line 24 - page 6, line 28; page 11, lines 1-5 especially histidine	1-35

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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		
B* earlier document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but used to understand the principle or theory underlying the invention		
C* document which may impair patentability, claiming what is new to establish the publication date of another document or other relevant reasons as specified		
D* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
E* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
F later document published after the international filing date or priority date and in conflict with the application but used to understand the principle or theory underlying the invention		
G document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
H document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken in combination with one or more other such docu- ments, such combination being obvious to a person skilled in the art		
I document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
25 June 1999		05/07/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentlan 2 NL-2280 RD The Hague Tel. (+31-70) 340-3040, Fax 31 651 820 16 Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized Officer Scott, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	ional Application No
PCT/GB 98/03602	

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 301 899 A (LIFE TECHNOLOGIES INC) 1 February 1989	1-3, 6-13, 15, 16, 18, 19, 24-31, 35
Y	see the whole document ---	1-35
P, X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9819 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class 604, AN 98-210396 XP002106739 & JP 10 057056 A (ASAHI OPTICAL CO LTD) , 3 March 1998 see abstract ---	1-3, 6, 7
Y	WO 97 29825 A (PHARMACIA BIOTECH AB ;BERGLUND ROLF (SE); BERGSTROEM JAN (SE); BEL) 21 August 1997 see the whole document ---	1-35
A	WO 95 27718 A (HYBRIDON INC (TANG JIN YAN (US); GUO QUE (US); AGRAWAL SUDHIR (US)) 19 October 1995 see page 7, line 20 ~ page 8, line 8 ---	1
P, X	EP 0 832 897 A (BECTON DICKINSON CO) 1 April 1998 see the whole document ---	1-12, 26-31, 35
E	EP 0 897 978 A (BECTON DICKINSON CO) 24 February 1999 see the whole document, but especially page 4, lines 5-15; page 5, example 5 to page 8, line 45 and claim 10 ---	1-12, 26-31, 35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/GB 98/03602	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: 2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: not applicable 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 6.4(a). 	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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.: 	
<p>Remark on Protest</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees. 	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB 98/03602

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210	
Claims Nos.: not applicable	
<p>The search revealed such a large number of particularly relevant documents, in particular with regard to novelty, the drafting of a comprehensive International Search Report is not feasible. The cited documents, are considered to form a representative sample of the revealed documents, duly taking into account their relevance with respect to the subject matter as illustrated by the examples. Accordingly, the search results in respect of claim 1 only detail documents in as far as they pertain to claim 2.</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/GB 98/03602

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0707077	A 17-04-1996	US 5582988 A AU 3030295 A CA 2158485 A FI 954331 A JP 8173194 A NO 953631 A	10-12-1996 28-03-1996 16-03-1996 16-03-1996 09-07-1996 18-03-1996
WO 9609116	A 28-03-1996	US 5652348 A AU 683588 B AU 2621295 A CA 2200735 A EP 0783366 A JP 10506987 T NZ 293707 A	29-07-1997 13-11-1997 09-04-1996 28-03-1996 16-07-1997 07-07-1998 29-03-1999
EP 0301899	A 01-02-1989	CA 1297432 A JP 1125395 A US 4921805 A	17-03-1992 17-05-1989 01-05-1990
WO 9729825	A 21-08-1997	AU 1818097 A CA 2242927 A EP 0888157 A	02-09-1997 21-08-1997 07-01-1999
WO 9527718	A 19-10-1995	AU 2286795 A CA 2187338 A CN 1150431 A EP 0755400 A JP 10502052 T	30-10-1995 19-10-1995 21-05-1997 29-01-1997 24-02-1998
EP 0832897	A 01-04-1998	CA 2214495 A JP 10147592 A	25-03-1998 02-06-1998
EP 0897978	A 24-02-1999	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family report) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,SD,SZ,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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CU,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,GB,GE,GH,GM,HU,ID,IL,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZW

F ターム(参考) 4C057 AA05 BB05 CC03 DD01 MM02 MM04