



PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/48	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/32995 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. September 1997 (12.09.97)
--	-----------	---

<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00391</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 4. März 1997 (04.03.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 196 08 687.6 6. März 1996 (06.03.96) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): RETRO-TECH GMBH GESELLSCHAFT FÜR RETROVIRALE TECHNOLOGIE [DE/DE]; Carl-von-Linde-Strasse 40, D-85716 Unterschleißheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FAFF, Ortwin [DE/DE]; Mistralstrasse 10, D-85716 Unterschleißheim (DE). HISEM, Alois, Gabriel [DE/DE]; Heuweg 13, D-84034 Landshut (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>
--	---

(54) Title: PROCESS AND TEST KIT FOR NON-RADIOACTIVE ENZYMATIC DETECTION OF REVERSE TRANSCRIPTASE

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND TEST-KIT FÜR DEN NICHT-RADIOAKTIVEN UND ENZYMATISCHEN NACHWEIS VON REVERSER TRANSKRIPTASE

(57) Abstract

The process disclosed facilitates routine non-radioactive and enzymatic detection of reverse TRANSCRIPTASE. This is done using magnetic particles and reverse transcription primers and templates immobilised on those particles, specifically in the form of a so-called particle-primer/template complex (PPP complex) combined with biotin labeling of the newly synthesised cDNA in a PPP-cDNA complex, followed by detection using streptavidin conjugate in a PPP-cDNA conjugate complex following addition of the substrate. The process and test kit are characterised by the magnetic handling of the above-mentioned particle-ligand complexes using a microtitre magnet separator which facilitates successive separation and dispersion of the particle ligand complexes out of/in solution and thus also washing operations, exchange of solutions, reaction start/stop as well as photometric/fluorimetric or luminometric quantification. The combination of magnetic handling of the particle-ligand complexes with biotin/streptavidin labeling results in an at least ten-fold improvement in sensitivity (0.05 mU/test for the first time) and widens the linear measurement range of 0.05-10.0 mU, as well as making kinetic investigations possible. The magnetic handling and the strong bonding of the biotin/streptavidin system make the process very rapid (three hours), simple and reproducible. In addition, as a result of using its own magnet separator, the process can be carried out in microtitre format and thus makes it possible to process a large number of samples simultaneously in a short time. The process can be used under appropriately optimised reaction conditions with all species of retroviruses and reverse transcriptases and can be used for the direct detection of retroviruses in cases of viral disease, in transfusion and transplant medicine, in virological research and development and in biological quality control of biopharmaceutical and biotechnology products.

(57) Zusammenfassung

Das beschriebene Verfahren ermöglicht den routinemäßigen, nicht-radioaktiven und enzymatischen Nachweis von Reverse Transkriptase. Dies wird realisiert durch die Verwendung von magnetischen Partikeln und daran immobilisierten Reverse Transkriptions-Primern und -Templates in Form eines sogenannten Partikel-Primer/Template-Komplexes (PPT-Komplex) kombiniert mit einer Biotin-Markierung der neu synthetisierten cDNA in einem PPT-cDNA-Komplex und einer anschließenden Detektion mittels Streptavidin-Konjugat in einem PPT-cDNA-Konjugat-Komplex nach Substratzugabe. Verfahren und Test-Kit sind gekennzeichnet durch die magnetische Handhabung der o.g. Partikel-Ligand-Komplexe mittels eines Mikrotiter-Magnet-Separators, der die sukzessive Separation und Dispersion der Partikel-Ligand-Komplexe aus/in Lösung und somit Waschvorgänge, Austausch von Lösungen, Reaktions-Start/Stop sowie eine photometrische/fluorimetrische oder luminometrische Quantifizierung ermöglicht. Durch die Kombination zwischen magnetischer Handhabung der Partikel-Ligand-Komplexe und deren Markierung mittels Biotin/Streptavidin wird eine mindestens zehnfach verbesserte Sensitivität von erstmalig 0.05 mU/Test und eine Erweiterung des Linear-Meßbereichs von 0.05-10.0 mU erreicht sowie die Durchführung kinetischer Untersuchungen möglich. Durch die magnetische Handhabung sowie die starke Bindung des Biotin/Streptavidin Systems ist das Verfahren sehr schnell (3 Stunden), einfach und reproduzierbar. Weiterhin ist es auf Grund des eigenen Magnet-Separators im Mikrotiterformat durchführbar und ermöglicht somit das gleichzeitige Verarbeiten vieler Proben in kurzer Zeit. Das Verfahren ist unter Anwendung entsprechend optimierter Reaktionsbedingungen universell auf alle Spezies von Retroviren bzw. Reverse Transkriptasen anwendbar und eignet sich zum direkten Nachweis von Retroviren bei Virus-bedingten Krankheiten, in der Transfusion- und Transplantationsmedizin, in der virologischen Forschung und Entwicklung sowie bei der biologischen Qualitätskontrolle biopharmazeutischer und biotechnologischer Produkte.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

2. Beschreibung

Verfahren und Test-Kit für den nicht-radioaktiven, enzymatischen Nachweis von Reverser Transkriptase

Virus-Diagnostik

2.1 Stand der Technik

Der **routinemäßige** Nachweis von Retroviren erfolgt gegenwärtig über den Nachweis von Virus-spezifischen **Antikörpern** und/oder von **Virus-Komponenten** (Antigene, RNA, provirale DNA), z.B. anti-HIV-Antikörper Tests, HIV-p24-Antigen-Tests, HIV-PCR Detektions Test (Holodniy M. et al. **J. Infect. Dis.** 163, 862-866, 1991; Henrard DR et al. **AIDS Res. Hum. Retrovir.** 8, 47-52, 1992). Diese Analytik stützt sich lediglich auf eine **nicht funktionelle** bzw. **Struktur spezifische** molekulare Interaktion zwischen Antikörper und Antigen oder PCR primer und proviraler DNA und erlaubt deshalb nicht den Rückschluß auf ein ganzes und funktionelles intaktes Virus. Außerdem erfaßt diese Analytik nicht alle Stadien einer viralen Infektion. z.B. die Phase, in der die Infektion stattgefunden hat, jedoch noch keine Antikörper gebildet sind. Diese Faktoren bewirken somit gelegentlich falsch positive oder negative Ergebnisse. Deshalb ist der **direkte** und auch **funktionelle** Nachweis für Retroviren in biologischen Proben dringlichst notwendig. Diese Notwendigkeit ist auch gegeben durch die **medizinische** und **sozial-politische Bedeutung** von Retroviren, vor allem durch **AIDS** und durch eine zu beobachtende ansteigende Tendenz und zunehmende Rolle von Retroviren bei tierischen und menschlichen Erkrankungen (Leukämie, Autoimmunerkrankungen, Krebs etc.). Weiterhin birgt die Übertragbarkeit von Retroviren durch Infektion ernste Probleme für die Transfusions- und Transplantationsmedizin bzw. erfordert Qualitätsuntersuchungen auf Virus-Kontamination bei Lymph-, Speichel-, Sperma- oder Blutproben von Spendern und bei zu verpflanzenden Organen, Haut, Knochenmark etc. Die gleiche Problematik der Virus-Kontamination bzw. Infektion gilt auch für die Verwendung von Bio-Pharmazeutika und anderen biotechnologischen oder gen-technologischen Präparaten biologischen Ursprungs zu Therapie Zwecken bei Mensch und Tier sowie in der medizinischen Grundlagen-Forschung. Voraussetzung für die Lösung der oben erwähnten Problemstellungen ist der **direkte** und **funktionelle** Nachweis von Retroviren mittels möglichst **einfacher, verlässlicher** und **empfindlicher** Methoden.

Der direkte und biologisch funktionelle Nachweis von Retroviren ist bislang nur in Einzelfällen und mit sehr hohem Arbeits- und Zeitaufwand über **Infektion von Zellen** und nur in in gereinigten Virus-Präparaten oder in Zellkultur-Überständen möglich. Quantitative, einfache und verlässliche Routine-Methoden gibt es bislang dafür nicht. Ein Grund dafür ist die komplexe Zusammensetzung biologischer Proben (Blut, Organextrakte etc.), die Proteine, Enzyme, Vitamine, Lipide, Zucker und verschiedene Inhibitoren enthalten. Diese erschweren oder machen den direkten und funktionellen Nachweis von Retroviren unmöglich.

Die **Reverse Transkriptase** ist das Schlüsselenzym aller Retroviren, da es die Reverse Transkription (Übersetzung) der Virus-RNA in komplementäre DNA (cDNA) bewirkt und deren nachträgliche Integration in das Genom der Wirtszelle ermöglicht. Das Enzym ist spezifisch Retroviren und seine Enzymaktivität ist ein Hinweis auf die Existenz von Virus-Partikeln und deren funktionelle Integrität, da das Enzym als freies Molekül sehr instabil ist und schnell inaktiv wird.

Obwohl bislang eine Vielzahl von Tests für den Nachweis von Reverser Transkriptase entwickelt wurden konnte sich diese Technologie als Routine-Verfahren in der virologischen und klinischen Diagnostik auf Grund folgender Defizite nicht durchsetzen:

- a) Verwendung **radioaktiver Komponenten** (Tritium-, Phosphor- markierte Substrate) und organischer gesundheits- bzw. umweltschädlicher Lösungsmittel (Trichloressigsäure, Toluol)

- 60 b) **unzureichende Sensitivität** der nicht-radioaktiven Verfahren im Vergleich zur ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay)- und PCR (polymerase chain reaction) - Technologie bedingt durch die Verwendung zur Markierung und Detektion der Reaktions-Produkte (cDNA) von Antigen/Antikörper Systemen (z.B. Digoxigenin/anti-Digoxigenin, Fluoreszein/anti-Fluoreszein) mit relativ niedrigen Bindungskonstanten (Eberle, J. et al., J. Virol. Meth. 20, 347-356, 1992, K. Suzuki et. al. J. Virol Meth.41, 21-28, 1993).
- 65 c) **erschwerter routinemäßige Handhabung** und Durchführung kinetischer Messung durch unzulängliche Separationsverfahren der Reaktions-Edukte von den Produkten bedingt durch die Doppelmartierung der neusynthetisierten cDNA (Membranadsorption, Filtration bzw. capturing an solider Phase), (Eberle, J. et al., J. Virol. Meth. 20, 347-356, 1992, K. Suzuki et. al. J. Virol Meth.41, 21-28, 1993)
- 70 d) **ineffiziente Immobilisierung** von primern an Festphasen (Plastik-), (T. Urabe et al. J. Virol. Meth. 40, 154-154, 1992)

75 Das vorliegende und zur Patentierung angemeldete Verfahren beschreibt den routinemäßigen direkten und enzymatischen Nachweis von Retroviren mittels **Reverser Transkriptase**.

2.2 Lösung des Problems

80 Das zu patentierende Verfahren und der entsprechende Test-Kit stützen sich auf die Verwendung zur Reversen Transkriptions Reaktion eines an magnetischen Partikeln immobilisierten primers und templates in Form eines **Partikel-Primer/Template-Komplexes (PPT-Komplexes)** und die Markierung der am PPT-Komplex neusynthetisierten cDNS mit Biotinyltierten-deoxy-Nukleotid-triphosphaten in Form eines **PPT-cDNA-Komplexes** sowie dessen Detektion mit Streptavidin gekoppelten Marker-Enzymen und entsprechenden Substraten in Form eines **PPT-cDNA-Konjugat-Komplexes** (siehe Abb. 2).

85 Magnetische Partikel und daran immobilisierte Ligand-Komplexe bieten den Vorteil, daß sie in Gegenwart eines Magnetfeldes aus Lösungen in fester Phase separiert und in Abwesenheit von Magnetfeldern bzw. unter Schütteln wieder in Lösung dispergiert werden können (siehe Abb. 1). Dieses einfache, sehr schnelle, effiziente und reproduzierbare physikalische Verfahren kann bei Immobilisierung von Molekülen an magnetische Partikel in biologischen Tests benutzt werden um diese Moleküle zu prozessieren und nach Bedarf sukzessive zu separieren (immobilisieren) oder zu dispersieren (solubilisieren). Diese abwechselnde magnetische Handhabung (Abb. 1) ist besonders vorteilhaft bei enzymatischen oder biochemischen Reaktionen wo Reaktions-Edukte (Substrate) von Produkten zum Teil getrennt werden müssen. Die magnetische Handhabung von Partikel-Ligand-Komplexen in Lösung wird realisiert durch das sukzessive Einbringen und Entfernen von Magneten in die nahe Umgebung des Reaktionsgefäßese bzw. der Lösung wodurch die sukzessive Separation und Dispersion der Komplexe bzw. Wechsel von Lösungen, waschen Reaktionsstop etc. realisiert werden kann (Abb. 1). Bei Mikrotiterplatten wird für die magnetische Handhabung ein sogenannter **Mikrotiter-Magnet-Separator** (Abb.3) bestehend aus einer optisch durchsichtigen Halter-Platte mit 24 Stab-Magneten eingesetzt, die in den externen Zwischenraum der Mikro-titer-wells eingeführt werden und somit die in Lösung befindlichen Partikel-Ligand-Komplexe an den Seitenwänden der wells separieren (Abb.1). Dadurch wird ein problemloser Austausch von Lösungen, Waschen sowie photometrische Messungen in Gegenwart und ohne Verlust der magnetischen Partikel-Ligand-Komplexe möglich und realisiert.

100 In dem zu patentierenden Verfahren bzw. Test-Kit werden **magnetische Partikel** mit immobilisiertem **primer** und **template** verwendet, die für die Reaktion der Reversen Transkriptase notwendig sind. Primer kann ein homo- oder hetero- **oligo-deoxynukleotid-triphosphat** sein (z.B. oligo-dT, oligo-dG) sein, während als **template** (Matrix-RNS-Molekül), eine homo- oder hetero-polymere RNS z.B. poly-rA (poly-adenosin-triphosphat) verwendet werden kann. Zusammen bilden Partikel, primer und template das sogenannte **Partikel-primer/template-Komplex/Reagenz (PPT-Reagenz)**. In Gegenwart von Reverser Transkriptase und Biotin-markierten sowie unmarkierten deoxy-Nukleotid-Triphosphaten dNTP's

wird komplementär zu der template-RNS die entsprechende cDNS synthetisiert, die mittels dem
 115 template primer gleichfalls an den magnetischen Partikeln immobilisiert ist und den sogenannten
PPT-cDNA-Komplex bildet.

Der Überschuß an nichteingebauten Nukleotiden wird gewaschen und anschließend der
 120 biotinyllierte **PPT-cDNA-Komplex** mit Streptavidin konjugierten Marker-Enzymen (z.B.
 Peroxidase, Alkalische Phosphatase) inkubiert, wobei sich der sogenannte **PPT-cDNA-
 Konjugat-Komplex** bildet. Der Überschuß an nichtgebundenem Streptavidin Konjugat wird
 gewaschen und das an die Partikel immobilisierte Markerenzym mit dem entsprechenden
 Substraten (z.B. ortho-Phenylendiamin, AEBTS, TMB) inkubiert und die Reaktion photometrisch
 mittels Extinktion/Absorption oder luminometrisch quantitativ bestimmt.

Die neu synthetisierte cDNS ist mittels der eingebauten Biotin-dNTP's markiert. Die
 125 Markierung mit Biotin bietet den Vorteil, daß dessen Detektion mit Streptavidin/Avidin und einem
 konjugierten Markerenzym sehr empfindlich ist auf Grund der sehr starken Bindung **Biotin/
 Streptavidin** ($10^{-15}M$) im Vergleich zu einer vergleichsweise schwachen Antigen /Antikörper
 Bindung ($10^{-7}-10^{-11} M$).

Durch die sehr effiziente und einfache magnetische Handhabung der Partikel-Ligand-Komplexe in
 130 Kombination mit der extrem starken Bindung des Biotin/Streptavidin Systems wird erstmalig eine
 wesentlich bessere Sensitivität des Verfahrens realisiert (0,1 mU* Reverse Transkriptase/Test) was
 eine mindestens zehnfache Steigerung im Vergleich zu anderen existierenden Verfahren und
 Produkten bedeutet. Bei längerer Inkubation kann die Sensitivität sogar auf 0.05 mU gesteigert
 werden, wodurch bei einer spezifischen Aktivität von ca. 5000 Units/mg eine Nachweisgrenze von
 135 ca. **10pg** Reverse Transkriptase pro Test erreicht wird. Außerdem kann durch die starke Bindung
 des Biotin/Streptavidin Systems wesentlich weniger markiertes Substrat (z.B. Biotin-dUTP)
 eingesetzt werden, wodurch der lineare Meßbereich über zwei Zehnerpotenzen ansteigt (ca. 0.5-
 10.0 mU/Test).

Die verbesserte Sensitivität, der erweiterte Linearitäts-Bereich sowie die einfache, schnelle und
 140 effiziente Handhabung machen das neue Verfahren und den Test-Kit sehr interessant für den
 Bereich der klinischen Routine-Virus-Diagnostik sowohl für Krankheiten als auch für die
 Qualitätskontrolle von Bio-Pharmazeutika.

* **Definition der Reverse Transkriptase-Einheit:** Eine Einheit ist die Enzymaktivität, die in
 145 10 min bei 37°C mit Poly(A)/(dT)₁₅ den Einbau von 1.0 nmol [³H]-TMP in säurefällbare
 Produkte bewirkt.

2.3 Vorteile des Verfahrens/Test-Kits

Das beschriebene Verfahren und der dazugehörige Test-Kit haben gegenüber den bisher
 150 existierenden Nachweismethoden und Produkten folgende Vorteile:

a) **nicht-radioaktives Verfahren/Test-Kit** bzw. Verwendung ausschließlich nicht-
 radioaktiver und wässriger Reagentien, Vermeidung organischer Lösungsmittel (TCA, Toluol
 etc.), folglich durchführbar in jedem Labor, ohne spezielle Genehmigung und umweltfreundlich,
 da radioaktiver und organischer Abfall vermieden wird

b) **10x verbesserte Empfindlichkeit und erhöhter linearer Meßbereich** (0.7-7.0
 155 mU) im Vergleich zu anderen nicht-radioaktiven Verfahren, da das Biotin/Streptavidin, welches
 durch eine sehr hohe Bindungskonstante gekennzeichnet ist, als Markierungssystem verwendet
 wird.

c) **Kinetische- und Inhibitionsstudien** sind erstmals im nichtradioaktiven Bereich
 160 möglich, da die Reverse Transkriptions-Reaktion durch Absaugen des Reaktions-Mix gestoppt
 werden kann,

d) **einfache und zeitsparende Handhabung** (max. 3 Stunden) durch Anwendung der
 magnetischen Separation und Dispersion Partikel gebundener Reaktion-Edukte/Produkte

e) **wiederholte Substrat-Zugabe und Extinktionsmessung** wird erstmals durch
 165 die magnetische Immobilisierung des PPT-cDNA-Konjugat-Komplexes bei einem Reverse Trans-
 kriptase Assay möglich

f) **hohe Test-Kapazität und routinemäßig anwendbar**, da im Mikrotiterformat
 durchführbar

170 g) das Verfahren ist unter Anwendung entsprechend spezifischer Reaktionsbedingungen
universell auf alle Spezies von Retroviren bzw. Reverse Transkriptasen anwendbar und kann
entsprechend adaptiert und optimiert werden.

h) der Nachweis von Retroviren erfolgt nicht nur **strukturell**, wie bei Antigen,
Antikörper oder PCR/DNA Tests sondern auch biochemisch **funktionell** anhand der **Reverse
Transkriptase**

175

2.4. Anwendungsgebiete

Die potentiellen Anwendungen des Verfahrens und Test-Kits beziehen sich auf folgende
Bereiche:

180 a) **Forschung & Entwicklungs-Labors** in der Industrie, an Universitäten und Groß-
forschungseinrichtungen, die an der Entwicklung von antiviralen Wirkstoffen, Therapeutika,
Virus-Diagnostika, Impfstoffen, Experimentier-Modellen etc. arbeiten. Bei sämtlichen Arbeiten ist
der direkte Nachweis von Retroviren absolut notwendig.

185 b) die **medizinische Diagnostik und Verlaufskontrolle** bei Retrovirus bedingten
Krankheiten z.B. AIDS, Leukämie, Autoimmunerkrankungen, Krebs. Dieselbe Anwendung gilt
auch für Retrovirus bedingte Krankheiten bei Tieren. Dementsprechend sind potentielle Anwender:
Kliniken u. Krankenhäuser, Blutbanken sowie klinische Labors und Laborgemeinschaften.

190 c) die **gesamte Transplantations- und Transfusions-Medizin** bzw. die Spender-
Banken von Blut, Organen, Knochenmark, Samen etc. Der Nachweis von Kontamination mit
Retroviren in den oben genannten Spender-Materialien ist äußerst wichtig um einer
Weiterverbreitung und Infektion durch Transplantation oder Spende vorzubeugen.

195 d) die **biologische Qualitätskontrolle und Zulassung von Bio-Pharmazeutika**
(z.B. Blutderivate, Gerinnungs-Präparate), **bio/gen-technologischer Kosmetika,**
Lebensmittel und Labor-Reagentien (z.B. Zellkulturen, Immunglobuline, therapeutische
Enzyme, Insulin, fötale Seren etc.), die auf Kontamination mit Retroviren untersucht werden
müssen um gegebenenfalls deren Übertragung zu verhindern.

3. Beispiel

200 Zur Entwicklung und Optimierung des Verfahrens wurde als Modell-Enzym HIV Reverse
Transkriptase verwendet. Folgende experimentellen Schritte wurden pro Testansatz (well)
durchgeführt:

205 1) 50 µl des Partikel-Primer/Template Reagenz (oligodT/poly rA-magnetische Partikel) wurden
vorgegeben und mit 150 µl Partikel-Waschpuffer verdünnt.

210 2) die Partikel wurden in Gegenwart des Mikrotiter-Magnet-Separators 5 Minuten an der
Seitenwand des wells gesammelt, die Lösung mit einem 8 Kanal-Wascher abgesaugt und
anschließend mit 3 x 200µl Partikel Waschpuffer gewaschen.

215 3) Nach Absaugen des Partikel Waschpuffers wurde 20µl HIV-Reverse Transkriptase in
Lysispuffer bestehend aus 10mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM DTT, 0.5% NP40, 0.5% Triton X-100,
2.5 mM EDTA in verschiedenen Konzentrationen vorgegeben und mit den Partikel-
template/primer-Reagenz gemischt. Alternativ können bei Inhibitionsstudien 10µl Enzym und 10µl
Inhibitor in o.g. Lysispuffer vorgegeben werden.

220 4) Die Reaktion wurde mit 30 µl Reaktionsmix gestartet und 60 min. bei 37°C inkubiert und
geschüttelt in einem Reaktionsgemisch von 10µM dTTP+Biotin-dUTP, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0,
80 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2% NP40, 0.2% Triton X-100.

5) Die Reaktion wurde durch Separation der mag. Partikel und Absaugen des Reaktionsmix
gestoppt und die Partikel mit dem immobilisierten Reaktionsprodukt (cDNA) in 5 x 200 µl
Waschpuffer gewaschen bestehend aus salinem Phosphatpuffer (PBS) mit 0.1% Tween.

225

6) Anschließend wurden die Partikel mit 150µl Streptavidin-Peroxidase in Konjugat-Puffer 30 min bei 37°C inkubiert und geschüttelt.

230

7) der Überschuß von nicht gebundener Streptavidin-Peroxidase wurde anschließend wie beschrieben abgesaugt und die Partikel mit 5 x 200 µl Waschpuffer gewaschen.

235

8) anschließend wurden 200µl AEBTS Substrat in Substratpuffer zugegeben und die Extinktion der grünen Farbentwicklung bei 405nm und einer Referenzwellenlänge von 492nm kinetisch gemessen.

240

Die Werte aus Abb. 4 und Tab 1. zeigen einen linearen Anstieg der Extinktion bzw. enzymatischen Aktivität in einem Bereich von 0.1-7.0 mU Reverse Transkriptase innerhalb von 15 min nach Substratzugabe. Bei längerer Substrat-Inkubtion von 60 min. kann die Sensitivität sogar weiter bis auf ca. 0,05 mU gesenkt werden.

Patentansprüche

1. Verfahren und Test-Kit zum **nicht-radioaktiven, enzymatischen Nachweis** von **Reverser Transkriptase** dadurch gekennzeichnet, daß hierfür ein magnetisch sukzessiv separierbarer und dispergierbarer **Partikel-Primer/Template-Komplex (PPT-Komplex)** verwendet wird in Kombination mit einer **Biotin-Markierung** der neu synthetisierten cDNA in einem magnetisierbaren **PPT-cDNA-Komplex** und anschließender Detektion mittels **Streptavidin/Avidin konjugierten Markerenzymen** (Peroxidase, Alkalische Phosphatase) und in einem magnetisierbaren **PPT-cDNA-Konjugat-Komplex** nach Zugabe entsprechender Substrate.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der daraus resultierende Test-Kit für Reverse Transkriptase folgende Zusammensetzung hat:
- a. **PPT-Reagenz** - magnetischer Partikel-Primer/Template-Reagenz, der oligo-dT mit poly (rA) bzw. RNA oder oligo-dG mit poly(rC) bzw. RNA, oder oligo(dC) mit poly(rG) bzw. RNA in Lager-Puffer, bestehend aus PBS, Triton X-100, EDTA, RNase-Inhibitoren und RT-Cryoprotect-Reagenz
 - b. **PPT-Waschpuffer**, der Tris/HCl, pH 8.0; NaCl; EDTA enthält.
 - c. **Virus-Lysis-Puffer**, der Tris/HCl, pH 7.5; EDTA; Triton X-100; NP-40; DTT enthält.
 - d. **Nukleotid-Mix**, der dTTP mit Biotin-dUTP oder dCTP mit Biotin-dCTP oder dATP+dCTP+dGTP+dTTP mit Biotin-dUTP oder mit Biotin-dCTP enthält.
 - e. **RT-Reaktionspuffer**, der Tris/HCl pH 8.0; KCl; MgCl₂ enthält.
 - f. **RT-Waschpuffer**, der PBS mit Tween enthält.
 - g. **Konjugat-Puffer**, der Waschpuffer mit RT-Blocking-Reagenz enthält.
 - h. **Streptavidin-Reagenz**, das unkonjugiertes Streptavidin oder Avidin enthält.
 - i. **Konjugat-Reagenz**, das Streptavidin- oder Avidin - konjugiert mit Markerenzymen z.B. Peroxidase, Alkalische Phosphatase oder aber Biotin- konjugiert mit Markerenzymen enthält.
 - j. **Substrat**, das den Konjugat-Markerenzymen entsprechende Substrate z.B. 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-Sulfon-Säure)Diammonium Salz enthält.
 - k. **Substrat-Puffer**, das den o.g. Konjugat-Markerenzym-Substraten entsprechende Puffer z.B. Na₂HPO₄, NaBo₂ und Citronensäure pH 4.5, enthält.
 - l. **Referenz-Enzym**, das HIV-Reverse-Transkriptase als Marker enthält.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß der sogenannte **Partikel-Primer/Template-Komplex (PPT-Komplex)** aus magnetischen Partikeln (z.B. Dynal, IGI, BioMag, Advanced Biotechnologies, Novagen) und daran immobilisierten Reaktions-**primer** und Reaktions-**templates** zusammengesetzt ist.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Reaktions-**primer** (Initiator) ein homo- oder heteromer von oligo-deoxy-nukleotidtriphosphaten sein kann z.B. olido(dT), oligo-(dG), daß direkt an die magnetischen Partikel gebunden ist.

5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Reaktions-**template** (Matrix) ein homo- oder heteromer von poly-nukleotidtriphosphaten z.B. poly-(rA), poly-(rC) oder eine natürliche RNA sein kann, die direkt oder indirekt an den magnetischen Partikeln bzw. in dem **PPT-Komplex** immobilisiert ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das PPT-Reagenz in einem **PPT-Lagerungs Puffer (PPT-storage buffer)** tiefgekühlt gelagert wird der PBS, EDTA, Triton X-100 und RT-Cryoprotect-Reagenz enthält.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das **PPT-Reagenz** in Mikrotiterplatten oder andere Reagenzgefäße vorgegeben wird (z.B. 50 µl) und mit Partikel-Waschpuffer **PPT-Waschpuffer** (z.B. 150 µl) verdünnt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das **PPT-Reagenz** abwechselnd mittels eines externen Magnetfeldes an der Wand der Mikrotiter-wells gesammelt (separiert) und anschließend solubilisiert (dispergiert) werden um den Partikel-Waschpuffer oder andere Lösungen abzusaugen, zu wechseln und physikalische Messungne durchzuführen (z.B. Photometrie, Fluorimetrie, Luminometrie), (siehe Abb. 1).
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Separation und Dispersion des **PPT-Reagenz** ein Permanent-Magnet bzw. ein sogenannter **Mikroplatten-Magnet-Separator** verwendet wird, der aus einer optisch transparenten Halter-Platte mit 24 Magnet-Stiften entsprechend der Konstruktion aus (Abb.3) besteht, wobei ein Magnet-Stift in die externen Zwischenräume der Mikrotiterwells eindringt und das Magnetfeld für die vier umgebenden wells liefert.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das PPT-Reagenz mit PPT-Waschpuffer gewaschen wird (z.B. mit 3 x 250 µl)
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das PPT-Reagenz nach dem letzten Waschvorgang mit den zu testenden Proben (Reverse Transkriptase± Inhibitoren) in Virus-Lysis-Puffer (z.B. 20µl) unter Schütteln resuspendiert/dispargiert und vorinkubiert wird
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Reverse Transkriptions Reaktion durch Zugabe des **Reaktions-Mix** (z.B. 30µl), bestehend aus Tris-Puffer pH7.8-8.3, KCl, MgCl₂ sowie unmarkierte und markierte deoxy-Nukleotidtriphosphate, dNTP's (z.B. dATP, dTTP, dCTP, dGTP+Biotin-dUTP gestartet und bei 37°C - 43°C für verschiedene Zeiten (z.B. 60-180 min) inkubiert wird. Dabei wird markierte cDNA neusynthetisiert, die mit dem PPT-Reagenz den sogenannten **PPT-cDNA-Komplex** bildet, der mittels Magnetfeldern sukzessive separiert und dispargiert werden kann.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß alternativ zur Biotin-Markierung, dNTP's mit Markierungen von **Br-, Digoxigenin- oder Fluoreszenz-Markern** (z.B. FITC-) eingesetzt werden können.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Reverse Transkriptions Reaktion durch magnetische Separation des PPT-cDNA Komplexes und Absaugen des Reaktions-Mix gestoppt wird.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Überschuß an nicht eingebauten Nukleotiden und der PPT-cDNA-Komplex mit sogenanntem **RT-Waschpuffer** gewaschen wird, bestehend aus salinem Phosphatpuffer und Tween (z.B. 3 x 250 µl).

- 115 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß der PPT-cDNA Komplex anschließend mit **Konjugat** bzw. Streptavidin- oder Avidin-konjugierten Markerenzymen (z.B. Alkalische Phosphatase, Peroxidase) in sogenanntem **Konjugat-Puffer** inkubiert wird, der salinen Phosphatpuffer, Tween und RT-Blocking-Reagenz enthält, wobei der sogenannte **PPT-cDNA-Konjugat-Komplex** entsteht, der gleichfalls magnetisch separiert und dispergiert werden kann.
- 120 17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß der PPT-cDNA Komplex alternativ mit unkonjugiertem Streptavidin- oder Avidin in Konjugat-Puffer inkubiert, dann in RT-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit Biotin-konjugierten Markerenzymen (z.B. Alkalische Phosphatase, Peroxidase) inkubiert werden kann.
- 125 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Überschuß an nicht gebundenem Konjugat und der PPT-cDNA-Konjugat Komplex mit RT-Waschpuffer gewaschen wird.
- 130 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der PPT-cDNA-Konjugat Komplex mit entsprechenden Substraten der Konjugat-Enzyme (z.B. Alkalische Phosphatase, Peroxidase) in entsprechendem Substratpuffer (z.B. perborat/citrat-Puffer) inkubiert werden (z.B. 200µl) und quantitativ photometrisch, fluorimetrisch oder luminometrisch gemessen werden.

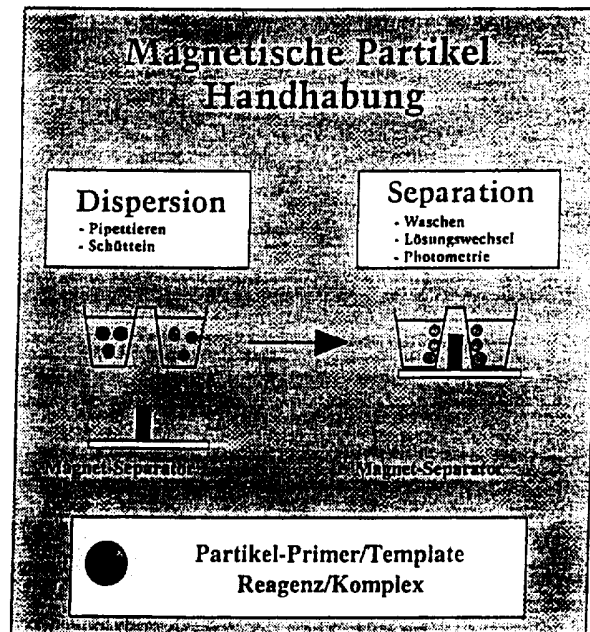
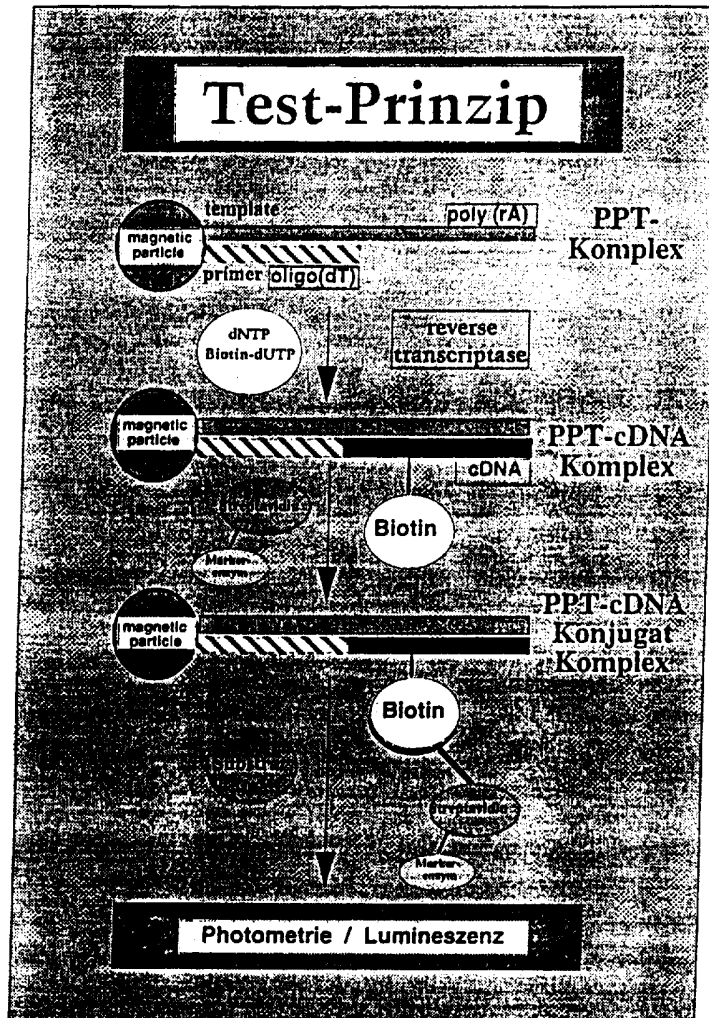


Abb. 1: Magnetische Handhabung der Partikel-Ligand-Komplexe



5

Abb.2: Test-Prinzip und Protokoll-Schema des Reverse Transkriptase Assays

5

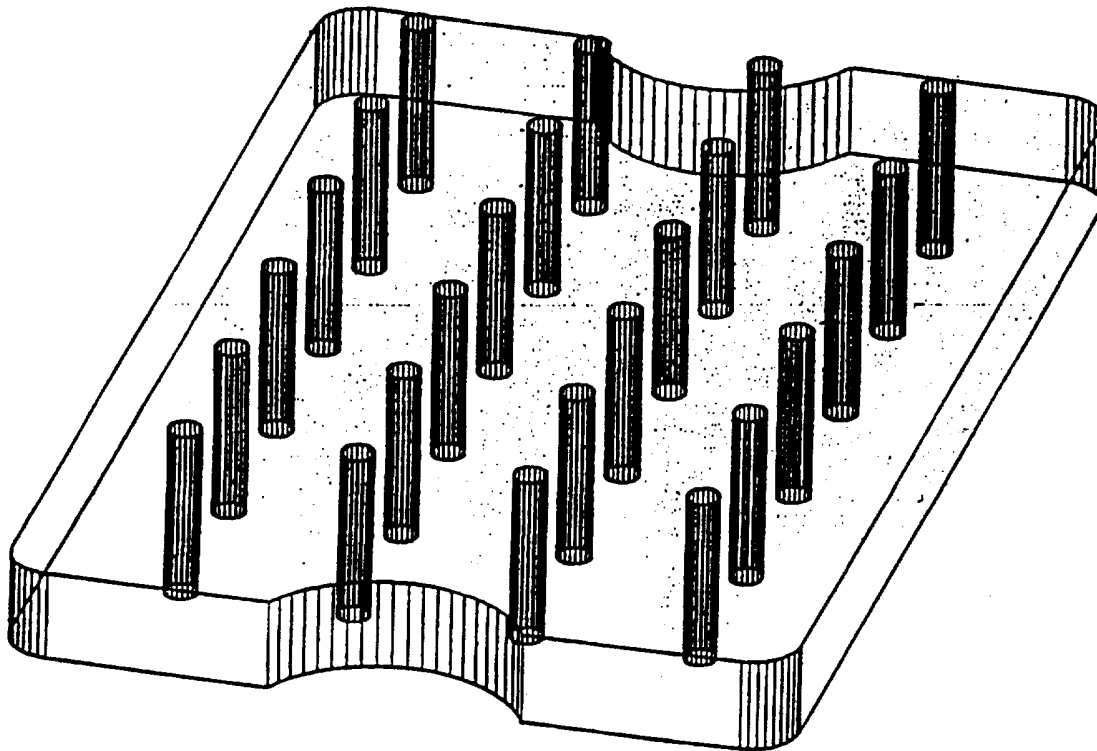
Abb. 3: Mikrotiter-Magnet-Separator zur magnetischen Handhabung der Partikel-Ligand-Komplexe

10

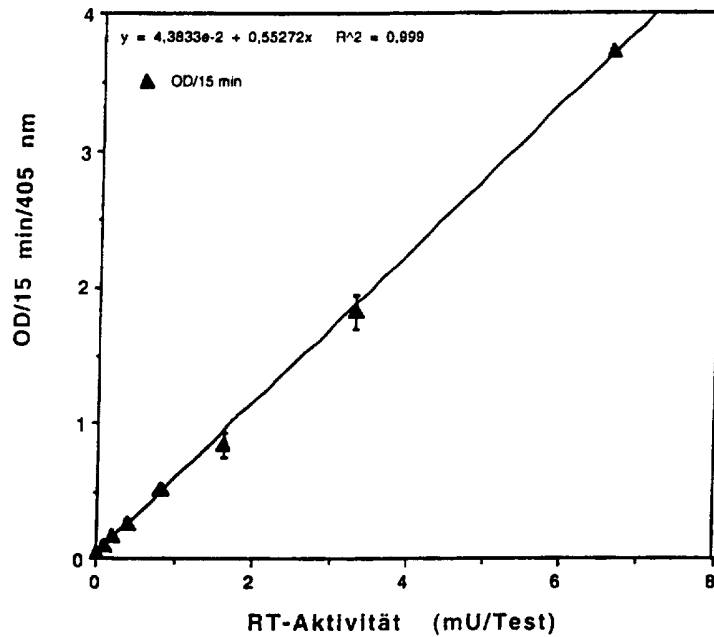
A - Halter-Platte

15

B - Magnetstäbe



**RETRO-KIT
Reverse Transcriptase Assay
Eichkurve**



5

Abb.4: Eichkurve von HIV-Reverse Transkriptions-Aktivität

10

Reverse Transcriptase Konzentration mU/test	Extinktions-Mittelwerte 405nm	Standard-abweichung
Blank	0,070	±0,007
0,10	0,293	±0,013
0,20	0,536	±0,030
0,40	0,839	±0,042
0,80	1,725	±0,009
1,66	2,745	±0,094
3,33	3,566	±0,012
6,66	3,160	±0,004

**Tab. 1: Reverse Transkriptase Aktivität
Exinktionsmittelwerte nach 60 min.
Substrat-Inkubation**

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/00391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

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

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, vol. 41, no. 1, January 1993, pages 21-28, XP002034202 K. SUZUKI ET AL.: "Colorimetric reverse transcriptase assay for HIV-1." see the whole document ---	1-19
Y	WO 90 06042 A (HOLMES MICHAEL JOHN ;DYNAL AS (NO)) 14 June 1990 see the whole document ---	1-19
Y	DE 44 16 300 A (FAFF ORTWIN DR) 8 December 1994 see the whole document ---	1-19
Y	EP 0 480 408 A (TOYO JOZO KK) 15 April 1992 see the whole document ---	1-19
	-/--	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 July 1997

Date of mailing of the international search report

16. 07. 97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Cartagena y Abella,P

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 97/00391

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 392 459 A (TOYO JOZO KK) 17 October 1990 see the whole document ---	1-19
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9245 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 92-368411 XP002034169 & JP 04 267 898 A (MITSUBISHI KASEI CORP) , 24 September 1992 see abstract ---	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9227 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 92-223246 XP002034170 & JP 04 148 698 A (TOYO JOZO KK) , 21 May 1992 see abstract ---	
P,A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 011, 29 November 1996 & JP 08 187099 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD) see abstract -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/00391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9006042 A	14-06-90	AU 640626 B	02-09-93
		AU 4758690 A	26-06-90
		AU 634993 B	11-03-93
		AU 4759690 A	26-06-90
		CA 2003508 A	21-05-90
		DE 68908900 D	07-10-93
		DE 68908900 T	20-01-94
		DE 68913555 D	07-04-94
		DE 68913555 T	07-07-94
		WO 9006045 A	14-06-90
		EP 0446260 A	18-09-91
		EP 0444120 A	04-09-91
		JP 4501956 T	09-04-92
		JP 4501959 T	09-04-92
US 5512439 A	30-04-96		

DE 4416300 A	08-12-94	AU 6793394 A	20-12-94
		WO 9428115 A	08-12-94
		EP 0707635 A	24-04-96
		JP 8510136 T	29-10-96

EP 0480408 A	15-04-92	JP 4148697 A	21-05-92
		DE 69112977 D	19-10-95
		DE 69112977 T	15-05-96
		US 5508166 A	16-04-96

EP 0392459 A	17-10-90	DE 69021425 D	14-09-95
		DE 69021425 T	25-04-96
		JP 3047098 A	28-02-91

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/48

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q

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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, Bd. 41, Nr. 1, Januar 1993, Seiten 21-28, XP002034202 K. SUZUKI ET AL.: "Colorimetric reverse transcriptase assay for HIV-1." siehe das ganze Dokument ---	1-19
Y	WO 90 06042 A (HOLMES MICHAEL JOHN ;DYNAL AS (NO)) 14.Juni 1990 siehe das ganze Dokument ---	1-19
Y	DE 44 16 300 A (FAFF ORTWIN DR) 8.Dezember 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-19
Y	EP 0 480 408 A (TOYO JOZO KK) 15.April 1992 siehe das ganze Dokument ---	1-19
	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst 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 erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2.Juli 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16.07.97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cartagena y Abella,P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	EP 0 392 459 A (TOYO JOZO KK) 17.Oktober 1990 siehe das ganze Dokument ---	1-19
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9245 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 92-368411 XP002034169 & JP 04 267 898 A (MITSUBISHI KASEI CORP) , 24.September 1992 siehe Zusammenfassung ---	
A	DATABASE WPI Section Ch, Week 9227 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 92-223246 XP002034170 & JP 04 148 698 A (TOYO JOZO KK) , 21.Mai 1992 siehe Zusammenfassung ---	
P,A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 096, no. 011, 29.November 1996 & JP 08 187099 A (OLYMPUS OPTICAL CO LTD) siehe Zusammenfassung -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/00391

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9006042 A	14-06-90	AU 640626 B	02-09-93
		AU 4758690 A	26-06-90
		AU 634993 B	11-03-93
		AU 4759690 A	26-06-90
		CA 2003508 A	21-05-90
		DE 68908900 D	07-10-93
		DE 68908900 T	20-01-94
		DE 68913555 D	07-04-94
		DE 68913555 T	07-07-94
		WO 9006045 A	14-06-90
		EP 0446260 A	18-09-91
		EP 0444120 A	04-09-91
		JP 4501956 T	09-04-92
		JP 4501959 T	09-04-92
		US 5512439 A	30-04-96
DE 4416300 A	08-12-94	AU 6793394 A	20-12-94
		WO 9428115 A	08-12-94
		EP 0707635 A	24-04-96
		JP 8510136 T	29-10-96
EP 0480408 A	15-04-92	JP 4148697 A	21-05-92
		DE 69112977 D	19-10-95
		DE 69112977 T	15-05-96
		US 5508166 A	16-04-96
EP 0392459 A	17-10-90	DE 69021425 D	14-09-95
		DE 69021425 T	25-04-96
		JP 3047098 A	28-02-91