

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. September 2001 (07.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/65246 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 27/327,
33/543, C12Q 1/68

GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN
[DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, 91056 Erlangen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/00736

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
28. Februar 2001 (28.02.2001)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHÜLEIN, Jürgen [DE/DE]; Neue Strasse 26, 91054 Erlangen (DE). GRASSL, Björn [DE/DE]; Karl-Jatho-Weg 15, 90411 Nürnberg (DE). HASSMANN, Jörg [DE/DE]; Hofmannstrasse 118 a, 91052 Erlangen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 09 715.4 1. März 2000 (01.03.2000) DE

(74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Nägelsbachstrasse 49 A, 91052 Erlangen (DE).

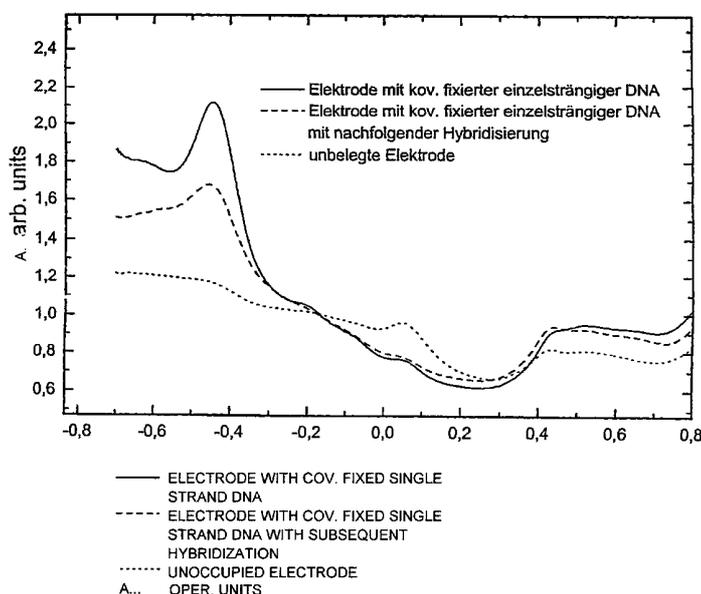
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: QUANTIFYING TARGET MOLECULES CONTAINED IN A LIQUID

(54) Bezeichnung: QUANTIFIZIERUNG VON IN EINER FLÜSSIGKEIT ENTHALTENEN ZIELMOLEKÜLEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting and/or quantifying first biopolymers contained in a liquid involving the following steps: a) providing an electrode with a surface which is made of plastic and which is coated with second biopolymers that have a specific affinity to the first biopolymers to be detected; b) bringing the electrode into contact with the liquid; c) applying a predetermined voltage protocol to the electrode in order to effect a concentration of the first biopolymers on the second biopolymers; d) adding osmium tetroxide and bipyridine to the liquid, and; e) measuring the redox signal coming off the electrode.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit enthaltenen ersten Biopolymeren, mit folgenden Schritten: a) Bereitstellen einer Elektrode mit einer aus Kunststoff hergestellten Oberfläche, die

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 01/65246 A1



GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

- (84) **Bestimmungsstaaten** (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

mit zweiten zu den nachzuweisenden ersten Biopolymeren eine spezifische Affinität besitzenden Biopolymeren beschichtet ist, b) Inkontaktbringen der Elektrode mit der Flüssigkeit, c) Anlegen eines vorgegebenen Spannungsprotokolls an die Elektrode, so dass eine Anreicherung der ersten Biopolymere an den zweiten Biopolymeren bewirkt wird, d) Zugabe von Osmiumtetroxid und Bipyridin zur Flüssigkeit, e) Messung des an der Elektrode abfallenden Redoxsignals.

Beschreibung

QUANTIFIZIERUNG VON IN EINER FLÜSSIGKEIT ENTHALTENEN ZIELMOLEKULEN

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit enthaltenen Zielmolekülen.

10 Nach dem Stand der Technik ist aus der WO 96/01836 ein Chip zum Nachweis von Polynukleotidsequenzen bekannt. Auf dem aus einem Siliziumsubstrat hergestellten Chip ist eine Vielzahl miniaturisierter Reaktionsfelder vorgesehen. An jedes der Reaktionsfelder ist eine Sonde gebunden. Beim Eintauchen des
15 Chips in eine die nachzuweisende Polynukleotidsequenz enthaltende Lösung kommt es zur Hybridisierung mit einer der vorgegebenen Sonden. Die Hybridisierung kann z.B. durch eine an der Sonde vorgesehene fluorophore Markierung nachgewiesen werden.

20

Die DE 198 08 884.1 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von chemischen Substanzen unter Verwendung zweier in Wechselwirkung stehender fluorophorer Gruppen, welche an ein Molekül gebunden sind. Bei der spezifischen Anlagerung des Moleküls
25 an die nachzuweisende chemische Substanz wird die Wechselwirkung zwischen den fluorophoren Gruppen geändert.

Die WO 99/47700 betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines Zielmoleküls mittels Fluoreszenz. Dabei ist eine mit einer
30 fluorophoren Gruppe versehene Sonde an einer festen Phase gebunden. Bei Vorliegen der Zielsequenz in der Lösung wird eine zweite fluorophore Gruppe in der Nähe der ersten fluorophoren Gruppen derart gebunden, daß ein strahlungsloser Energieüber-

gang zwischen den beiden fluorophoren Gruppen stattfinden kann.

Die US 5,312,572 und die US 5,871,918 beschreiben Verfahren
5 zum elektrochemischen Nachweis von Polynukleotidsequenzen.
Dabei sind der Lösung redoxaktive Moleküle zugesetzt, welche
im Falle der Hybridisierung der Polynukleotidsequenz an das
dabei gebildete doppelsträngige Molekül binden. Das Vorliegen
eines solchen doppelsträngigen Moleküls ruft ein meßbares Re-
10 doxsignal hervor.

Die US 5,591,578 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von
Polynukleotidsequenzen unter Verwendung von Redox-Indikato-
ren. Dabei wird eine zur Ziel-Polynukleotidsequenz komplemen-
15 täre Sonde kovalent an eine Elektrode gebunden. An die Sonde
sind kovalent redoxaktive Übergangsmetallkomplexe gebunden.
Im Falle der Hybridisierung der Ziel-Polynukleotidsequenz mit
der Sonde ist ein Redoxsignal an der Elektrode meßbar.

20 Aus der DE 196 28 171 ist ein Verfahren zur Aufreinigung und
Anreicherung von ladungstragenden ersten Molekülen bekannt,
welche zu zweiten an einer Elektrode gebundenen Molekülen ei-
ne spezifische Affinität aufweisen. Beim Inkontaktbringen ei-
ner die ersten Moleküle enthaltenden Lösung mit der Elektrode
25 wird ein Spannungsprotokoll derart gefahren, daß die ersten
Moleküle an der Elektrode angereichert werden.

Aus E. Palecek, Bioelectrochemistry and Bioenergetics 1985,
15, 275 - 295 ist es bekannt, als redoxaktive Substanz zum
30 Nachweis doppelsträngiger Biopolymere Osmiumtetroxide-Verbin-
dungen zu benutzen.

Die nach dem Stand der Technik bekannten Verfahren sind zeit-
aufwendig, umständlich oder erfordern einen hohen apparativen
Aufwand.

5 Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand
der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein sensiti-
ves, einfaches und kostengünstiges elektrochemisches Verfah-
ren zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung geringer Mengen
von in einer Flüssigkeit befindlichen ersten Biopolymeren an-
10 gegeben werden.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale des Anspruchs 1 gelöst.
Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen
der Ansprüche 2 - 12.

15

Nach Maßgabe der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis
und/oder zur Quantifizierung von in einer Flüssigkeit enthal-
tenen ersten Biopolymeren vorgesehen, mit folgenden Schrit-
ten:

20

a) Bereitstellen einer Elektrode mit einer aus Kunststoff
hergestellten Oberfläche, die mit zweiten zu den nach-
zuweisenden ersten Biopolymeren eine spezifische Affinität
besitzenden Biopolymeren beschichtet ist,

25

b) Inkontaktbringen der Elektrode mit der Flüssigkeit,

c) Anlegen eines vorgegebenen Spannungsprotokolls an die El-
ektrode, so daß eine Anreicherung der ersten Biopolymere
30 an den zweiten Biopolymeren bewirkt wird,

d) Zugabe von Osmiumtetroxid und Bipyridin zur Flüssigkeit,

e) Messung des an der Elektrode abfallenden Redoxsignals.

Das vorgeschlagene Verfahren ermöglicht einen sensitiven Nachweis von in einer Flüssigkeit befindlichen ersten Biopolymeren. Die Verwendung von mit einer Kunststoffoberfläche versehenen Elektroden erlaubt eine kostengünstige Durchführung an des Verfahrens. Das Verfahren ermöglicht insbesondere auch eine Quantifizierung der in der Flüssigkeit enthaltenen ersten Biopolymere.

10

Unter den ersten und den zweiten Biopolymeren werden hier insbesondere Proteine, Peptide, DNA, RNA und dgl. verstanden. Das erste Biopolymer kann insbesondere eine zum zweiten Biopolymer komplementäre einzelsträngige DNA oder RNA sein.

15

Die zweiten Biopolymere sind an die Kunststoffoberfläche vorzugsweise kovalent gebunden. In Kombination mit der vorgeschlagenen Verwendung von Osmiumtetroxid und Bipyridin wird eine besonders hohe Sensitivität erreicht.

20

Nach einer vorteilhaften Ausgestaltung ist der Kunststoff ein elektrisch leitfähiges Kompositmaterial, z.B. ein Verbundstoff aus Kohlefasern und Polycarbonat. Vorteilhafterweise ist die Elektrode insgesamt aus dem Kunststoff hergestellt. Solche Elektroden können in einem kostengünstigen Pressverfahren hergestellt werden.

Weiterhin ist es möglich, daß die zweiten Biopolymere an eine auf der Oberfläche der Elektrode aufgebrachte, vorzugsweise aus Dextran oder Polyethylenglycol hergestellte, Matrix gebunden sind. Durch die Verwendung einer solchen Matrix kann die Dichte der Belegung der Oberfläche der Elektrode mit zweiten Biopolymeren erhöht werden.

30

Nach einer weiteren Ausgestaltung wird beim Schritt lit. e eine der folgenden Messungen durchgeführt: Gleichspannungsmessung, zykelvoltammetrische Messung, chronoamperometrische Messung, chronovoltammetrische Messung. Ferner können beim Schritt lit. e ein Differential-Puls-Voltammogramm oder ein Impedanzspektrum aufgenommen werden. Es ist auch möglich beim Schritt lit. e ein Wechselstromsignal phasensensitiv zu messen. Dem Wechselstromsignal kann ein Gleichspannungssignal aufgeprägt sein. Zur Quantifizierung der ersten Biopolymere kann über einen Peak des Meßsignals integriert werden. Als Quantifizierungsgröße kann der Abstand zwischen Peakhöhe und Untergrund herangezogen werden.

Zur Durchführung von Mehrfachmessungen kann die Elektrode nach dem Schritt lit. e gespült oder geheizt werden. Durch das Heizen der Elektrode kann eine thermische Denaturierung der ersten Biopolymere erreicht werden. Bestimmte erste Biopolymere binden vorzugsweise bei einer vorgegebenen Temperatur. Durch Heizen bzw. Einstellen der Temperatur kann die Spezifität des Verfahrens weiter erhöht werden. Die Spezifität bzw. die Stringenz kann auch durch eine geeignete Einstellung des pH-Werts in der Flüssigkeit erhöht werden.

Zweckmäßigerweise werden die ersten Biopolymere vor dem Schritt lit. a einer Polymerase-Kettenreaktion unterworfen. Das ermöglicht den Nachweis besonders geringer Mengen an ersten Biopolymeren.

Das Verfahren wird anhand der Zeichnung und eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

Die einzige Figur zeigt ein Differential-Puls-Voltammogramm einer unbelegten, einer mit einzelsträngigen Oligonukleotiden

belegten und einer mit hybridisierten Oligonukleotiden belegten Arbeitselektrode nach einer Behandlung mit Osmiumtetroxid und Bipyridin. Die Arbeitselektroden bestehen jeweils aus Kohlenstoff-Verbundmaterial, welches vorzugsweise zu 30% aus Kohlefasern und zu 70% aus Polycarbonat zusammengesetzt ist. An Oberfläche der Arbeitselektroden wurden unter Verwendung von Carbodiimid nach einem Standardverfahren kovalent Oligonukleotide mit der Sequenz 5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3' gebunden. Die Belegungsdichte betrug 15fmol/mm². Die Hybridisierung der Oligonukleotide erfolgte in einer gepufferten Lösung aus 0,5-fachem TBE (TRIS Borat EDTA), 0.5M NaCl und 100fmol/ μ l an komplimentären Oligonukleotiden. Nach der Hybridisierung wurden die Arbeitselektrode stringent gewaschen.

Anschließend wurde eine unbehandelte, eine mit einzelsträngigen Oligonukleotiden belegte und eine mit hybridisierten Oligonukleotiden belegte Arbeitselektrode jeweils 30 Sekunden in einer Lösung aus 2 mM OsO₄ und 13 mM Bipyridin getaucht. Die Messung erfolgte unter Zuhilfenahme einer Platingegenoelektrode und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode mit einem Autolab PGSTAT 10 der Firma Ecochemie.

Die Hybridisierung der Targetoligonukleotide an der Arbeitselektrode kann durch das Anlegen einer Spannung beschleunigt werden. Die Belegungsdichte an Oligonukleotiden auf der Oberfläche der Arbeitselektrode kann durch Zugabe von Salz während der Belegung oder durch eine basische Vorbehandlung der Oberfläche erhöht werden. Z.B. kann in einer 10mM MgCl₂ Lösung eine Belegungsdichte von 85fmol/mm² erreicht werden. Bei einer dreistündigen Vorbehandlung der Oberfläche in 5M NaOH kann eine Belegungsdichte von 750fmol/mm² erreicht werden.

Sofern mehrere Messungen hintereinander durchgeführt werden sollen, kann an die Elektrode nach dem Schritt lit. d eine

entgegengesetzte Spannung angelegt werden. Außerdem kann die Elektrode nach dem Schritt lit. e gespült und/oder geheizt werden. Durch das Heizen der Elektrode kann eine thermische Denaturierung der ersten Biopolymere erreicht werden. Durch
5 Heizen bzw. Einstellen der Temperatur der Elektrode kann aber auch die Spezifität des Verfahrens erhöht werden, weil vorgegebene erste Biopolymere bei einer spezifischen Temperatur binden.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> november AG

5 <120> Verfahren zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung von
in einer Flüssigkeit enthaltenen Zielmolekülen

<130> 411639GA-mu

10 <140>
<141>

<160> 1

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 21
<212> DNA

20 <213> Homo sapiens

<400> 1
gccttcccaa ccattccctt a

25

21

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis und/oder zur Quantifizierung von
in einer Flüssigkeit enthaltenen ersten Biopolymeren, mit
5 folgenden Schritten:
 - a) Bereitstellen einer Elektrode mit einer aus Kunststoff
hergestellten Oberfläche, die mit zweiten zu den nachzuwei-
senden ersten Biopolymeren eine spezifische Affinität besit-
10 zenden Biopolymeren beschichtet ist,
 - b) Inkontaktbringen der Elektrode mit der Flüssigkeit,
 - c) Anlegen eines vorgegebenen Spannungsprotokolls an die
15 Elektrode, so daß eine Anreicherung der ersten Biopolymere an
den zweiten Biopolymeren bewirkt wird,
 - d) Zugabe von Osmiumtetroxid und Bipyridin zur Flüssigkeit,
 - 20 e) Messung des an der Elektrode abfallenden Redoxsignals.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei der Kunststoff ein el-
ektrisch leitfähiges Kompositmaterial ist.
- 25 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die Elektrode insgesamt aus Kunststoff hergestellt ist.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
die zweiten Biopolymere an eine auf der Oberfläche der Elek-
30 trode aufgebrachte, vorzugsweise aus Dextran oder Polyethy-
lenglycol hergestellte, Matrix gebunden sind.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei
beim Schritt lit. e eine der folgenden Messungen durchgeführt

wird: Gleichspannungsmessung, zykelvoltammetrische Messung, chronoamperometrische Messung, chronovoltammetrische Messung.

5 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei beim Schritt lit. e ein Differential-Puls-Voltammogramm aufgenommen wird.

10 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei beim Schritt lit. e ein Impedanzspektrum aufgenommen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei beim Schritt lit. e eine Wechselstromsignal phasensensitiv gemessen wird.

15 9. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Wechselstromsignal einem Gleichspannungssignal aufgeprägt ist.

20 10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Quantifizierung der ersten Biopolymere über einen Peak eines Meßsignals integriert wird.

25 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Mehrfachmessung die Elektrode nach dem Schritt lit. e gespült oder geheizt wird.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die ersten Biopolymere vor dem Schritt lit. a einer Polymerase-Ketten-Reaktion unterworfen wird.

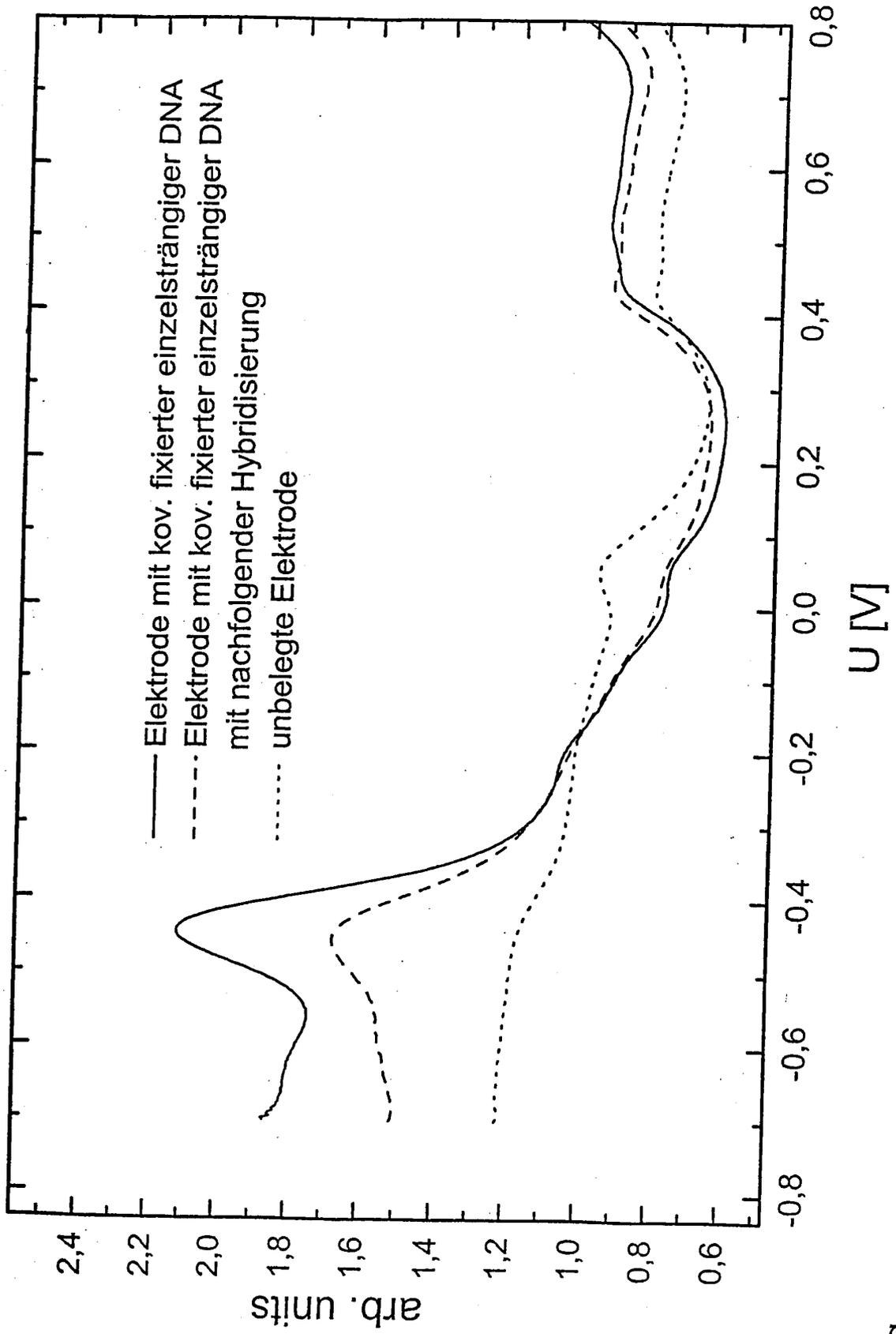


Fig.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/00736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/68				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N 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) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	WO 97 01646 A (UNIV NORTH CAROLINA ; JOHNSTON DEAN H (US); THORP H HOLDEN (US)) 16 January 1997 (1997-01-16) abstract; examples ---	1		
A	WO 99 67628 A (LUMLEY WOODYEAR THIERRY DE ; HELLER ADAM (US); HELLER E & CO (US);) 29 December 1999 (1999-12-29) the whole document ---	1		
A	WO 98 52042 A (KEENSENSE INC ; KEEN RANDY E (US)) 19 November 1998 (1998-11-19) abstract -----	1		
<input 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 :				
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> *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 </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> *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 </td> </tr> </table>			*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
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 <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">16 July 2001</p>		Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">27/07/2001</p>		
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 <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Moreno, C</p>		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/00736

Patent document cited in search report	A	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9701646	A	16-01-1997	US 5871918 A	16-02-1999
			AU 724600 B	28-09-2000
			AU 6337696 A	30-01-1997
			CA 2225935 A	16-01-1997
			CN 1192249 A	02-09-1998
			EP 0871773 A	21-10-1998
			JP 2000501601 T	15-02-2000
			NO 976057 A	24-02-1998
			NZ 311955 A	29-04-1999
			US 6180346 B	30-01-2001
			US 6127127 A	03-10-2000
			US 5968745 A	19-10-1999
US 6132971 A	17-10-2000			
WO 9967628	A	29-12-1999	AU 4833899 A	10-01-2000
			EP 1090286 A	11-04-2001
WO 9852042	A	19-11-1998	US 6060327 A	09-05-2000
			AU 7685598 A	08-12-1998
			EP 0986756 A	22-03-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/00736

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 G01N27/327 G01N33/543 C12Q1/68

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 G01N 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)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 01646 A (UNIV NORTH CAROLINA ;JOHNSTON DEAN H (US); THORP H HOLDEN (US)) 16. Januar 1997 (1997-01-16) Zusammenfassung; Beispiele ---	1
A	WO 99 67628 A (LUMLEY WOODYEAR THIERRY DE ;HELLER ADAM (US); HELLER E & CO (US);) 29. Dezember 1999 (1999-12-29) das ganze Dokument ---	1
A	WO 98 52042 A (KEENSENSE INC ;KEEN RANDY E (US)) 19. November 1998 (1998-11-19) Zusammenfassung -----	1

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 erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

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

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

16. Juli 2001

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/07/2001

Name und Postanschrift der Internationalen 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

Moreno, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

In tionalales Aktenzeichen

PCT/DE 01/00736

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9701646 A	16-01-1997	US 5871918 A	16-02-1999
		AU 724600 B	28-09-2000
		AU 6337696 A	30-01-1997
		CA 2225935 A	16-01-1997
		CN 1192249 A	02-09-1998
		EP 0871773 A	21-10-1998
		JP 2000501601 T	15-02-2000
		NO 976057 A	24-02-1998
		NZ 311955 A	29-04-1999
		US 6180346 B	30-01-2001
		US 6127127 A	03-10-2000
		US 5968745 A	19-10-1999
US 6132971 A	17-10-2000		
WO 9967628 A	29-12-1999	AU 4833899 A	10-01-2000
		EP 1090286 A	11-04-2001
WO 9852042 A	19-11-1998	US 6060327 A	09-05-2000
		AU 7685598 A	08-12-1998
		EP 0986756 A	22-03-2000