

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



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

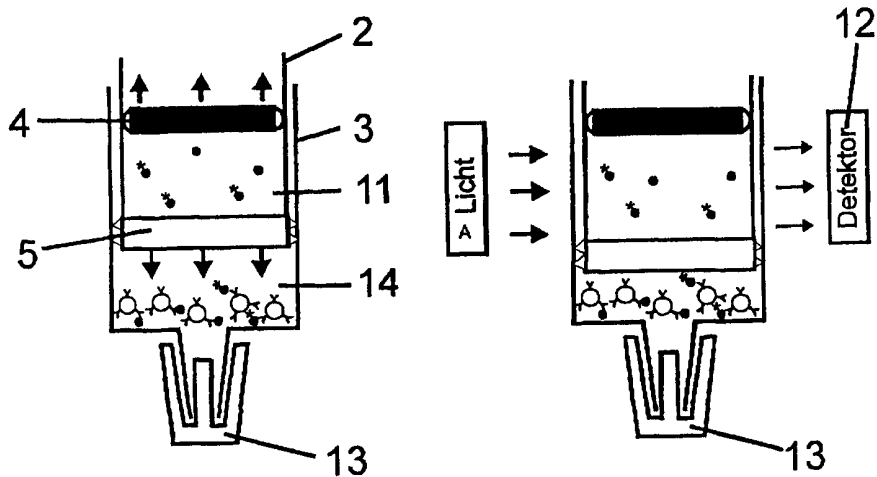
(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/53, B01L 3/00, G01N 21/03		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/62061 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 19. Oktober 2000 (19.10.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01046 (22) Internationales Anmeldedatum: 3. April 2000 (03.04.00) (30) Prioritätsdaten: 199 16 430.4 12. April 1999 (12.04.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR CHEMO- UND BIOSENSORIK MÜNSTER E.V. [DE/DE]; Mendelstrasse 7, D-48149 Münster (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KEY, Göran [DE/DE]; Jeggener Weg 160, D-49084 Osnabrück (DE). KATERKAMP, Andreas [DE/DE]; Wilhelmstrasse 65, D-48149 Münster (DE). (74) Anwalt: PFENNING, MEINIG & PARTNER GBR; Gostritzer Strasse 61-63, D-01217 Dresden (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR USE IN RECEPTOR-LIGAND AND AFFINITY TESTS

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR VERWENDUNG BEI DER DURCHFÜHRUNG VON REZEP-TOR-LIGAND- UND AFFINITÄTSTESTS

(57) Abstract

The invention relates to a device for use in receptor-ligand and affinity tests. To this end a hollow plunger and a hollow cylinder made of a material which is at least partly transparent to light are used. On its end face the hollow plunger has a porous separation layer which on the inside of the hollow plunger is covered by a gas- and liquid-tight disk. This sealing disk (4) is configured such that it is able to effect a translational movement inside the hollow plunger so that when the hollow plunger and sealing disk are moved in relation to each other a prepared sample can move from the hollow cylinder into a space between the porous separation layer and the sealing disk. The sample can then be subjected to a fluorescence or enzyme immunoassay.



A ... LIGHT
12 ... DETECTOR

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Verwendung bei der Durchführung von Rezeptor-Ligand- und Affinitätstests. Hierzu wird ein Hohlkolben und ein Hohlzylinder aus zumindest teilweise für Licht transparentem Material verwendet. Der Hohlkolben weist an seiner Stirnfläche eine poröse Trennschicht auf, die im Inneren des Hohlkolbens mit einer Gas- und Flüssigkeitsdichtplatte abgedeckt ist. Diese Dichtplatte (4) ist so ausgebildet, dass sie im Inneren des Hohlkolbens translatorisch bewegbar ist und bei entsprechender Relativbewegung von Hohlkolben und Dichtplatte eine vorbereitete Probe aus dem Hohlzylinder in einen Raum zwischen poröser Trennschicht und Dichtplatte gelangt. Im Nachgang hierzu kann dann beispielsweise ein Fluoreszenzimmun- oder Enzymimmuntest der Probe durchgeführt werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Vorrichtung und Verfahren zur Verwendung bei der
Durchführung von Rezeptor-Ligand- und Affinitätstests**

5

10

Die Erfindung betrifft Verfahren und eine Vorrichtung, die bei der Durchführung von Rezeptor-Ligand- und Affinitätstests, z.B. Fluoreszenz- oder Enzymimmuntests verwendet werden kann, wobei sich mögliche Applikationen in der medizinischen Diagnostik, der Umwelt- und Lebensmittelanalytik ergeben können.

15

20

Insbesondere in der Umwelt- und Lebensmittelanalytik können solche Tests bisher lediglich für sogenannte Screeningmethoden eingesetzt werden, bei denen jedoch keine konkrete Aussage bezüglich einer einzigen Probe getroffen werden kann und lediglich der Analyseaufwand vorab entsprechend eingeschränkt werden kann. Die mit solchen Tests erhaltenen Aussagen sind bisher offiziell noch nicht anerkannt und können demzufolge auch nicht als klare Beweisaussage verwendet werden.

25

30

35

Bei den bekannten Methoden für solche quantitativen bzw. semiquantitativen Tests werden sogenannte Festphasenimmunoassays durchgeführt. Bei einem solchen Test, nämlich dem sogenannten Dioxin-Assay der Firma CAPE werden analytspezifische Antikörper an der Wand eines Teströhrchens immobilisiert. Bei dem sogenannten BTEX rapid assay der Firma Coring Systems erfolgt die Immobilisierung der Antikörper an magnetische Partikel. In beiden Fällen sind jedoch aufwendige Wasch- und Pipettierschritte erforderlich, die zum einen stark fehlerbehaftet sind und in der Regel auch nicht unmittelbar am eigentlichen Untersuchungsort, sondern in Labors mit relativ hohem Aufwand durchgeführt werden müssen.

Dieser Aspekt ist aber gerade in der Umweltanalytik

von Bedeutung, da die in gesammelten Proben zu analysierenden Stoffe sehr einfach, in kurzer Zeit, mit geringem Arbeits- und instrumentellen Aufwand und geringem Fehler untersucht werden sollen.

5

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, eine Möglichkeit vorzuschlagen, mit der verschiedene Proben in sehr einfacher Form und mit geringem Zeitaufwand vorbereitet und analysiert werden können.

10

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe mit den Merkmalen des Anspruchs 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungsformen und Weiterbildungen der Erfindung, ergeben sich mit den in den untergeordneten Ansprüchen enthaltenen Merkmalen.

15

20

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, die zur Verwendung bei der Durchführung von Fluoreszenz- oder Enzymimmuntests eingesetzt werden kann, besteht dabei im wesentlichen aus drei Einzelteilen. Dabei ist in einem Hohlzylinder ein Hohlkolben aufgenommen und geführt, wobei im Hohlzylinder eine Öffnung für den Eintritt einer Probe vorhanden ist, so daß die erfindungsgemäße Vorrichtung im wesentlichen, wie eine herkömmliche Spritze ausgebildet ist. Im Inneren des Hohlkolbens ist eine für die verschiedensten Fluide dichte Dichtplatte auf der Stirnfläche, die in das Innere des Hohlzylinders zeigt, angeordnet, wobei die Dichtplatte innerhalb des Hohlkolbens translatorisch bewegbar angeordnet und geführt ist. Die bereits erwähnte Stirnfläche des Hohlkolbens ist porös als Trennschicht ausgebildet, wobei hierfür eine herkömmliche Fritte, wie sie aus der Säulenchromatographie bekannt ist, aber auch eine Membran, verwendet werden kann.

35

In einem Raum, der innerhalb des Hohlzylinders, zwischen Hohlzylinderinnenwandung und Hohlkolben ausgebildet ist, können Partikel vorhanden sein. Die Partikel sind hierfür so ausgewählt, daß ihre Korngröße verhindert, daß sie die poröse Trennschicht durchdringen können.

Die poröse Trennschicht, die als Stirnfläche für einen Hohlkolben verwendet wird bzw. eine andere poröse Trennschicht, die an der Eintrittsöffnung für die Probe in den Hohlzylinder angeordnet sein kann, kann vorteilhaft so ausgewählt werden, daß sie z.B. zelluläre Bestandteile einer Vollblutprobe zurückhalten kann und ein so erhaltenes Blutplasma, ohne zusätzliche Vorbereitungsschritte als Probe verwendet werden kann.

Bei der Probennahme und Probenvorbereitung ist es auch wichtig, daß die im Hohlzylinder ausgebildete Öffnung temporär verschlossen werden kann, wobei hierfür ein entsprechend ausgebildeter Stopfen, der bei Bedarf auf die Öffnung geschoben werden kann und diese dann verschließt, einsetzbar ist. Eine andere Alternative hierzu besteht in der Verwendung eines Rückschlagventiles, das in bzw. an der Öffnung angeordnet ist.

Die Probennahme in Vorbereitung des eigentlich durchzuführenden Tests kann in der Weise erfolgen, daß eine Relativbewegung zwischen Hohlzylinder und Hohlkolben, bei geöffneter Öffnung des Hohlzylinders durchgeführt wird und die Probe durch die Öffnung in den Raum, in dem die Partikel enthalten sein können, aufgenommen wird. Die entsprechende Relativbewegung von Hohlkolben und Hohlzylinder kann durch Fixierung

eines der beiden Teile und entsprechende Bewegung des jeweils anderen oder durch Bewegung beider Teile erreicht werden. Dabei ist es besonders günstig, wenn entsprechende Endanschlüsse am Hohlkolben und/oder Hohlzylinder oder an einer die Relativbewegung erzeugenden Manipulationseinheit, wie einem entsprechenden Automaten vorhanden sind, so daß in jedem Falle ein definiertes Probenvolumen in die erfindungsgemäße Vorrichtung aufgenommen wird.

Für die Durchführung von Fluoreszenzimmuntests sind in dem Raum, in dem die Partikel angeordnet sind, z.B. Antigene oder Antikörper vorhanden, wobei entweder die jeweiligen Antigene bzw. Antikörper mit einem geeigneten Fluorophor oder Enzym markiert sind.

Vor dem Einsaugen der Probe in die erfindungsgemäße Vorrichtung können entweder Antigen oder Antikörper an der Innenwandung des Hohlzylinders reversibel und der jeweils andere Partner an der Oberfläche der Partikel immobilisiert sein. Wird nun die Probe in die erfindungsgemäße Vorrichtung eingesaugt, werden Antigene bzw. Antikörper durch die Probe von der Innenwandung gelöst und binden aneinander an.

Die Bindung der unmarkierten oder markierten Biokomponenten kann aber auch an der porösen Trennschicht, die an der Stirnfläche des Hohlkolbens angeordnet ist, erfolgen, wobei auch eine Kombination Bindung an der Innenwandung des Hohlzylinders, der porösen Trennschicht und auf den Partikeln möglich sein kann. Es können auch jeweils unterschiedliche Partner an der Innenwandung, den Partikeln bzw. der Trennschicht gebunden sein, um mindestens an zwei verschiedenen Analyten einer Probe einen Test durchzuführen.

Im Anschluß hieran wird bei geschlossener Öffnung des Hohlzylinders eine entgegengesetzte Relativbewegung von Hohlkolben und Hohlzylinder durchgeführt, wobei gleichzeitig ein bestimmter Teil des Probenvolumens durch die poröse Trennschicht in das Innere des Hohlkolbens gelangt. Dabei wird das nunmehr sich im Inneren des Hohlkolbens befindliche Probenvolumen von der Dichtplatte abgedeckt und zwischen poröser Trennschicht und Dichtplatte ein ein bestimmtes Probenvolumen enthaltender Raum gebildet.

Im Nachgang hierzu kann die erfindungsgemäße Vorrichtung mit der entsprechend vorbereiteten Probe analytisch spezifisch quantitativ ausgewertet werden. Hierfür wird Licht mit mindestens einer fluoreszenzanregenden Wellenlänge, entsprechend dem/den verwendeten Fluorophor(en) auf die im Raum zwischen poröser Trennschicht und Dichtplatte innerhalb des Hohlkolbens vorbereitete Probe gerichtet und mit einem entsprechenden optischen Detektor die Intensität des Fluoreszenzlichtes gemessen, wobei auf hierfür bekannte Meßverfahren zurückgegriffen werden kann. Als Lichtquellen kommen z.B. monochromatisches Licht sendende Laser zum Einsatz. Es kann aber auch Mischlicht unter Verwendung entsprechender Filter eingesetzt werden. Solche Filter können auch vor dem optischen Detektor angeordnet werden, um den Streulichteinfluß zumindest zu verringern.

Günstig kann es außerdem sein, die optische Auswertung innerhalb eines, ansonsten geschlossenen Gehäuses durchzuführen, um Fremdlichteinflüsse auszuschließen.

Der Hohlzylinder und der Hohlkolben können dabei in

Gänze aus einem für das verwendete Licht transparenten Material bestehen. Alternativ können hierfür aber auch lediglich entsprechende Fenster für die Bestrahlung der vorbereiteten Probe und die Detektion des Fluoreszenzlichtes ausgebildet sein.

Mit der Erfindung können die verschiedensten bekannten Assayformate, wie kompetitive, - Titrations-, Verdrängungs- und Sandwich-Assays für die verschiedensten Rezeptor-Ligand-Systeme, wie z.B. Antikörper-Antigen, Lectin-Kohlenhydrat, DNA oder RNA komplementäre Nukleinsäure, DNA- oder RNA-Protein, Hormon-Rezeptor, Enzym-Enzymcofaktoren, Protein G oder Protein A-Immunoglobulin oder Avidin-Biotin durchgeführt werden. Dabei kann die jeweilige Analytkonzentration direkt proportional und bei Sandwich-Immunoassays umgekehrt proportional bestimmt werden. Mit der Erfindung besteht auch die Möglichkeit der Durchführung kompetitiver Assays für hochmolekulare Analyte.

Werden für die Markierung Fluorophore, die im nahen Infrarotbereich angeregt werden können, verwendet, können Körperflüssigkeiten unmittelbar, d.h. ohne zusätzliche Vorbereitungsschritte und Vorbehandlungsmaßnahmen untersucht werden.

Wird die erfindungsgemäße Vorrichtung für die Durchführung von Enzymimmunoassays verwendet, treten an die Stelle der Fluorophore Enzyme als Markierungsstoffe. In diesem Falle kann es günstig sein, wenn das entsprechende enzymespezifische Substrat und gegebenenfalls geeignete Puffersubstanzen für eine Konditionierung der Probe vorab an der Unterseite der im Hohlkolben aufgenommenen Dichtplatte deponiert sind.

Wird nun die entsprechende Probe, wie bereits bei der Durchführung von Fluoreszenzimmuntests beschrieben, in die erfindungsgemäße Probe aufgesaugt und dann nachfolgend teilweise durch die poröse Trennschicht in den Raum zwischen poröser Trennschicht und Dichtplatte innerhalb des Hohlkolbens eingeführt, kann eine colorimetrische Auswertung zeitaufgelöst durchgeführt werden. Hierfür besteht zum einen die Möglichkeit, die Intensität einer für den entsprechend hervorgerufenen Farbumschlag typischen Wellenlänge zeitaufgelöst zu messen.

Mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung können auch verschiedene Rezeptor-Ligand- oder Affinitätstests, als Fluoreszenzimmuntests bzw. Enzymimmuntests so durchgeführt werden, daß wieder durch eine Relativbewegung von Hohlzylinder und Hohlkolben ein definiertes Probenvolumen durch die Öffnung in den sich entsprechend der Relativbewegung vergrößernden Raum innerhalb des Hohlzylinders gesaugt wird. Dabei kann mindestens ein in der Probe enthaltener Analyt abhängig von seiner Konzentration den mit einem fluorophor- bzw. enzymmarkierten Partner eines Rezeptor-Ligand-Systems verdrängen. Der bzw. die fluorophor- bzw. enzymmarkierte Partner kann/können an den Partikeln und/oder der porösen Trennschicht gebunden sein, wobei hierfür neben kovalenten Bindungen, z.B. auch adsorptive oder Affinitätsbindungen in Frage kommen können.

Die so vorbereitete Probe wird dann wieder nach Verschließen der Öffnung des Hohlzylinders und durch entgegengesetzte Relativbewegung von Hohlzylinder und Hohlkolben durch die poröse Trennschicht in den sich entsprechend vergrößernden Raum zwischen poröser

Trennschicht und der Dichtplatte innerhalb des Hohlkolbens geführt und die entsprechende Auswertung mittels Fluoreszenz bzw. colorimetrischer Messung kann dann durchgeführt werden.

5

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann weiterhin so ausgeführt werden, daß ein Hohlzylinder verwendet wird, der zwei Kammern aufweist, in denen jeweils ein entsprechend ausgebildeter Hohlkolben, die bevorzugt unabhängig voneinander relativ zu den Kammern des Hohlzylinders bewegt werden können, eingeführt sind. Dadurch kann in jeder Kammer eines solchen Hohlzylinders mindestens ein gesonderter Analyt bestimmt werden.

10

15

Bei einer solchen Ausführungsform, wie auch bei der mit einfach ausgebildetem Hohlzylinder und Hohlkolben können auch Markierungen mit mehreren Fluorophoren bzw. Enzymen vorgenommen werden, daß eine Multianalytbestimmung möglich ist. Bei Verwendung mehrerer verschiedener Fluorophore sollten solche verwendet werden, deren Immisions- bzw. Anregungswellenlängen sich gegeneinander nicht beeinflussen.

20

25

Nachfolgend soll die Erfindung beispielhaft beschrieben werden.

Dabei zeigen:

30

Figur 1 den schematischen Aufbau eines Beispiels einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, vor der eigentlichen Probennahme und Probenaufbereitung;

35

Figur 2 einen Teil der in Figur 1 gezeigten Vor-

richtung in vergrößerter Darstellung;

Figur 3a

und 3b eine schematische Darstellung der Aufnahme
einer Probe in die Vorrichtung gemäß Figu-
ren 1 und 2;

Figur 3c die Überführung eines Teiles des Probenvo-
lumens in einen im Inneren des Hohlkolbens
ausgebildeten Raum;

Figur 3d eine schematische Darstellung der eigentli-
chen Messung bei einem Fluoreszenzimmun-
tests und

Figur 4a

und 4b ein mit einem stabförmigen Element ergänz-
tes Beispiel einer erfindungsgemäßen Vor-
richtung.

In der Figur 1 ist ein mögliches Beispiel einer er-
findungsgemäßen Vorrichtung schematisch dargestellt.
Dabei ist deutlich erkennbar, wie ein Hohlkolben 2 in
das Innere eines Hohlzylinders 3 geführt ist, wobei
das Spiel zwischen Hohlkolbenaußenwandung und Hohl-
zylinderinnenwandung relativ klein gehalten ist, um
zum einen Kippfehler weitestgehend auszuschließen und
zum anderen ein gewisses Maß an Abdichtung zu errei-
chen.

Im Hohlzylinder 3 ist an seiner äußeren Stirnfläche
eine Öffnung 8 ausgebildet, durch die, wie nachfol-
gend noch zu beschreiben sein wird, die Probe in das
Innere der Vorrichtung gelangen kann.

Der Hohlkolben 2 ist dabei hier so ausgeführt, daß seine in das Innere des Hohlzylinders 3 weisende Stirnfläche, als poröse Trennschicht 5 ausgebildet ist. Die poröse Trennschicht 5 kann aus Kunststoff, Kunststoffmischungen, Glas, Keramik oder Metall bestehen.

Oberhalb der porösen Trennschicht 5 ist im Inneren des Hohlkolbens 2 eine Dichtplatte 4, vor der Probenaufnahme und der Durchführung der Messung unmittelbar auf der porösen Trennschicht 5 aufliegend, angeordnet. Die Dichtplatte 4 besteht aus einem für Flüssigkeiten und Gase dichtem Material. Sie ist dabei so dimensioniert und ausgebildet, daß sie im Inneren des Hohlkolbens 2 entlang seiner Längsachse translatorisch bewegt werden kann.

Am Hohlkolben 2 ist mindestens eine Druckausgleichsöffnung 1 vorhanden, die einen Gasein- oder Austritt in bzw. aus dem Hohlkolben 2 ermöglicht.

Im Hohlzylinder 3 sind bei diesem Beispiel in dem Raum zwischen der Stirnfläche des Hohlkolbens 2 Partikel 6 vorhanden, deren Korngröße so gewählt ist, daß sie die poröse Trennschicht 5 nicht durchdringen können. Es können z.B. Polymere, bevorzugt quervernetzte als Partikelmaterialien verwendet werden.

In nicht dargestellter Form, kann die Öffnung 8 für einen sicheren Einschluß der Partikel 6 im Hohlzylinder 3 mittels einer weiteren porösen Trennschicht als Fritte, ein Filter oder einer Membran verschlossen sein, durch die die jeweilige Probe jedoch ohne weiteres in den Hohlzylinder 3 gelangen kann.

In Figur 2 ist deutlich erkennbar, daß an der äußeren Mantelfläche des Hohlkolbens 2, im Bereich der porösen Trennschicht 5 umlaufende Dichtelemente 10 vorhanden sind, die verhindern, daß Probenflüssigkeit in den Spalt zwischen Hohlkolben 2 und Hohlzylinder 3 gelangen und mit denen der nötige Unterdruck zum Aufsaugen der Probe erzeugt werden kann.

Außerdem ist deutlicher dargestellt, daß auch die Dichtplatte 4 mit einer umlaufenden Dichtung 9 versehen ist, die verhindert, daß Probenflüssigkeit in den Raum, oberhalb des Dichtelementes 4 des Hohlkolbens 2 gelangen kann.

Um ein Verkanten der Dichtplatte 4, bei einer translatorischen Bewegung entlang der Längsachse des Hohlkolbens 2 zu verhindern, kann die Dicke der Dichtplatte 4 unter Berücksichtigung des freien Querschnittes im Inneren des Hohlkolbens 2 entsprechend gewählt werden.

Um den gleichen Effekt zu erreichen, können aber auch, hier nicht dargestellte Führungselemente an der Oberseite der Dichtplatte 4 ausgebildet sein, die sich bevorzugt in radialsymmetrischer Anordnung an der Innenwandung des Hohlkolbens 2 zur Führung der Dichtplatte 4 bei einer entsprechenden translatorischen Bewegung anliegen.

In der Figur 2 ist außerdem deutlicher dargestellt, daß an den verschiedenen Partikeln 6 analytspezifische Antikörper gebunden sind. In nicht dargestellter Form sind die entsprechenden Antigene 7, reversibel an der Innenwandung des Hohlzylinders 3 gebunden, wie dies in Figur 3a angedeutet ist. In dieser Form steht

die erfindungsgemäße Vorrichtung für die Aufnahme und Vorbereitung einer entsprechenden Probe zur Verfügung. Dabei ist entweder der Antikörper oder das Antigen 7 mit einem entsprechend geeigneten Fluorophor, für die Durchführung von Fluoreszenzimmuntests oder mit einem entsprechenden Enzym für die Durchführung von Enzymimmuntests markiert.

Wie dies in Figur 3a erkennbar ist, wird Öffnung 8 der erfindungsgemäßen Vorrichtung in ein eine entsprechende Probe enthaltendes Behältnis eingetaucht und es kann durch Bewegung des Hohlkolbens 2, wie mit dem Pfeil bezeichnet, in vertikaler Richtung das Volumen des Raumes 14 im Inneren des Hohlzylinders 3 vergrößert und die Probe in diesen Raum aufgenommen werden, da die Dichtplatte 4 ein flüssigkeits- und gasdichten Abschluß bildet.

Im Nachgang hierzu, werden, wie dies in Figur 3b angedeutet ist, die Bindungen der Antigene 7 an der Innenwandung des Hohlzylinders 3 gelöst und die hier fluorophormarkierten Antigene 7 können sich frei innerhalb der flüssigen Probe bewegen.

Wie bereits im allgemeinen Teil der Beschreibung erwähnt, kann durch Einhaltung eines bestimmten vorgegebenen Weges, den, bei dem hier gezeigten Beispiel, der Hohlkolben 2 zurücklegt, ein exakt definiertes Probenvolumen aus dem Behältnis in die erfindungsgemäße Vorrichtung, also in den Raum 14 gesaugt werden.

Im Anschluß hieran kann die Öffnung 8 des Hohlzylinders 3 mit einem Stopfen 13 verschlossen werden und nach Ablauf einer analytspezifisch vorgebbaren Zeit kann durch alleinige Bewegung des Hohlkolbens 2 oder

durch entsprechende Relativbewegung von Hohlkolben 2 und Hohlzylinder 3 die Ausgangsposition wieder hergestellt werden, wobei ein Teil des Probenvolumens durch die poröse Trennschicht 5 in das Innere des Hohlkolbens 2, also in einen Raum 11 zwischen poröser Trennschicht 5 und Dichtplatte 4 gelangt und dort eingeschlossen gehalten wird.

In dieser Form kann die eigentliche Auswertung des Fluoreszenzimmuntests, wie dies in Figur 3d schematisch dargestellt ist, durchgeführt werden.

Hierzu wird die Probe innerhalb des Raumes 11 mit einer geeigneten Lichtquelle von einer Seite bestrahlt und Fluoreszenz angeregt. Die Intensität des Fluoreszenzlichtes kann mit einem diametral zur Lichtquelle angeordneten optischen Detektor 12 gemessen und aus den entsprechenden Meßsignalen auf die jeweilige Analytquantität geschlossen werden.

Da die Probe innerhalb der erfindungsgemäßen Vorrichtung durch den Stopfen 13 und mittels der Dichtplatte 4 sowie Hohlkolben 2 und Hohlzylinder 3 allseitig eingeschlossen ist, kann die gesamte Vorrichtung einschließlich der Probe im Nachgang zur durchgeführten Messung ohne weiteres, gefahrlos entsorgt werden.

Bei der Durchführung von Fluoreszenzimmuntests kann zusätzlich eine interne Standardisierung durchgeführt werden. Hierzu wird eine erste Messung einer Fluoreszenzintensität durchgeführt, wenn die Probe über die Öffnung 8 in den Raum 14, innerhalb des Hohlzylinders 3 aufgesaugt worden ist, wie dies in Figur 3b dargestellt ist. Hierzu wird Licht, mit mindestens einer Wellenlänge, mit der Fluoreszenz des bzw. der verwen-

deten Fluorophore angeregt werden kann, gerichtet und die Fluoreszenzintensität mit einem geeigneten optischen Detektor erfaßt.

5 Die so gemessene Fluoreszenzintensität kann dann im Nachgang mit der bzw. den Fluoreszenzintensitäten verglichen und/oder ins Verhältnis zueinander gesetzt werden, die, wie dies in Figur 3d dargestellt und beschrieben worden ist, erfaßt worden sind. Dadurch
10 kann auf einfache Weise die Meßgenauigkeit erhöht und der erforderliche Meßaufwand nur unwesentlich vergrößert werden.

In den Figuren 4a und 4b ist ein mit einem stabförmigen Element 15 modifiziertes Beispiel einer erfindungsgemäßen Vorrichtung gezeigt. Dabei ist das
15 parallel zur Längsachse des Hohlzylinders 2 ausgerichtete stabförmige Element 15 mit der Dichtplatte 4 verbunden, so daß die Dichtplatte 4 mit Hilfe des
20 stabförmigen Elementes 15 zwangsweise translatorisch bewegt werden kann. Hierfür sollte das stabförmige Element 15 aus den Hohlkolben 2 herausgeführt sein, um die Handhabbarkeit zu gewährleisten.

25 In der Figur 4a ist die Ausgangsposition sämtlicher Elemente vor der eigentlichen Probenaufnahme dargestellt. Die Probe gelangt dann, wie bereits mehrfach beschrieben, bei geöffneter Öffnung 8 durch entsprechende Relativbewegung von Hohlzylinder 3 und Hohlkolben 2 in den Raum 14, in dem sich Partikel mit
30 daran gebundenem Partner eines Rezeptor-Ligand-Systems und reversibel an die Wandung des Hohlzylinders 3 gebundene enzymmarkierte andere Partner des Rezeptor-Ligand-Systems befinden. Der in der Probe
35 befindliche Analyt bindet nun an die beiden erwähnten

Partner und bildet einen sogenannten "Sandwich". Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird die Probe mitsamt den überschüssigen ungebundenen Komponenten durch entgegengesetzte Relativbewegung von Hohlzylinder 3 und Hohlkolben 2 mittels Druck auf das stabförmige Element 15 durch die Öffnung 8 aus dem Raum 14 gedrückt, wobei die Dichtplatte 4 stets in Kontakt mit der porösen Trennschicht 5 bleibt und somit keine Flüssigkeit durch letztere hindurchtreten kann. Durch entsprechende Relativbewegung von Hohlzylinder 3 und Hohlkolben 2 wird nun Substratlösung durch Öffnung 8 in Raum 14 aufgenommen. Das an einen der Partner des Rezeptor-Ligand-Systems gebundene Enzym setzt das farblose Substrat (z.B. Tetramethylbenzidin/ H_2O_2 im Falle von Peroxidase oder p-Aminophenylphosphat im Falle von Alkalischer Phosphatase) zum gefärbten Produkt um. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird durch entgegengesetzte Relativbewegung von Hohlzylinder 3 und Hohlkolben 2 bei geschlossener Öffnung 8 die Substratlösung durch die poröse Trennschicht 5 in den Raum 11, der sich durch Zurückweichen von Dichtplatte 4 bildet, gedrückt (stabförmiges Element 15 ist in diesem Fall frei beweglich). Hierdurch wird die Enzymreaktion gestoppt, da Enzym und Substrat nun räumlich voneinander getrennt vorliegen, und die Absorption der im Raum 11 befindlichen Substratlösung kann in einem Photometer gemessen werden (Endpunktbestimmung). Ein solches Vorgehen ist insbesondere für Chemilumineszenz-Assays oder Enzymimmunoassays geeignet.

Zwischen den oben beschriebenen Schritten kann jeweils ein Spülschritt eingeschaltet werden.

Es kann aber auch so verfahren werden, dass der enzymmarkierte Antikörper (Partner eines Rezeptor-Li-

gand-Systems) nicht bereits reversibel an der Wand
des Hohlzylinders gebunden vorliegt, sondern geson-
dert nach der Inkubation der Probe mit dem an die
Partikel gebundenen Partner und Herausdrücken der
5 Probe, in die Vorrichtung aufgenommen wird. Das Re-
zeptor-Ligand-System hat nach erfolgter Inkubation
einen Sandwich-Aufbau Antikörper-Analyt-Antikörper
mit zusätzlichem Enzym und kann an Partikel gebunden
sein.

10

Es können aber auch an sich bekannte kompetitive
Assay-Formate mit zusätzlichem Enzym in dieser Form
bzw. auch Titrationsassays durchgeführt werden.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Verwendung bei der Durchführung
5 von Rezeptor-Ligand- und Affinitätstests,
bei der ein Hohlkolben (2) aus zumindest teilweise für Licht transparenten Material in einem mit einer temporär verschließbaren Öffnung (8)
10 versehenen Hohlzylinder (3), der ebenfalls zumindest teilweise aus einem für Licht transparenten Material besteht, aufgenommen und geführt ist;
die in das Innere des Hohlzylinders (3) weisende
15 Stirnfläche des Hohlkolbens (2) aus einer porösen Trennschicht (5) besteht; und
im Hohlkolben (2) parallel zur porösen Trennschicht (5) eine gas- und flüssigkeitsdichte,
20 innerhalb des Hohlkolbens (2) translatorisch bewegbare Dichtplatte (4) angeordnet ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, daß innerhalb des
25 Hohlzylinders (3) in einem Raum (14) zwischen Hohlzylinder (3) und Hohlkolben (2) Partikel (6) vorhanden sind, deren Korngröße so gewählt ist, daß sie die poröse Trennschicht (5) nicht durchdringen können.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
30 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
daß die Öffnung (8) des Hohlzylinders (3) mittels eines Verschlusses (13) oder eines Rückschlagventiles verschließbar ist.
35

4. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß die Dichtplatte (4)
eine außen umlaufende Dichtung (9) aufweist.
- 5 5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß die Dichtplatte (4)
in Bezug zur lichten Weite innerhalb des Hohl-
kolbens (2) eine Dicke aufweist, die ein Verkan-
ten bei einer translatorischen Bewegung inner-
10 halb des Hohlkolbens (2) verhindert.
6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet, daß an der Dichtplatte
(4), ein Verkannten der Dichtplatte (4) bei einer
15 translatorischen Bewegung innerhalb des Hohlkol-
bens (2) verhindernde, Führungselemente angeord-
net sind.
7. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß der Hohlkolben (2)
20 an seiner äußeren Mantelfläche im Bereich seiner
in das Innere des Hohlzylinders (3) weisenden
Stirnseite umlaufende Dichtungselemente (10)
aufweist.
- 25 8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß am Hohlkolben (2)
mindestens eine Druckausgleichsöffnung (1) vor-
handen ist.
- 30 9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, daß die Partikel (6) aus
Polymeren bestehen.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, daß an den Partikeln (6)
ein Partner eines Rezeptor-Ligand-Systems gebun-
den ist.

5

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, daß die poröse Fritte
(5) aus Kunststoff, Kunststofflegierungen, Glas,
Keramik oder Metall besteht.

10

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, daß am Hohlzylinder (3)
und/oder am Hohlkolben (2) Wegbegrenzungsan-
schläge vorhanden sind.

15

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, daß die Öffnung (8) mit-
tels einer weiteren Fritte, einer Membran oder
eines Filters verschlossen ist.

20

14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, daß die Dichtplatte (4)
mit einem parallel zur Längsachse des Hohlkol-
bens (2) ausgerichteten stabförmigem Element
(15) verbunden ist.

25

15. Verfahren zur Durchführung von Rezeptor-Ligand-
oder Affinitätstests,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
30 daß durch Bewegung eines Hohlzylinders (3) und
eines Hohlkolbens (2) relativ zueinander ein de-
finiertes Probenvolumen durch eine Öffnung (8)
im Hohlzylinder (3) in einen sich entsprechend
der Relativbewegung vergrößernden Raum (14) ge-
35 saugt,

mindestens ein fluorophor-markierter Partner
eines Rezeptor-Ligand-Systems, der an der Innen-
wandung des Hohlzylinders (3) und/oder der porö-
sen Trennschicht (5) reversibel immobilisiert
ist, in der Probe gelöst wird;

der jeweilige Partner abhängig von der Konzen-
tration des Analyten in der Probe und gemäß dem
gewählten Testformat teilweise mit dem anderen
Partner des Rezeptor-Ligand-Systems, der an Par-
tikel (6) und/oder eine poröse Trennschicht (5)
gebunden ist, reagiert,

bei verschlossener Öffnung (8) des Hohlzylinders
(3) durch entgegengesetzte Relativbewegung von
Hohlzylinder (3) und Hohlkolben (2) ein Teil der
so vorbereiteten Probe aus dem Raum (14) durch
die poröse Trennschicht (5) in einen sich ent-
sprechend dem jeweiligen Probenvolumen vergröß-
ernden Raum (11) innerhalb des Hohlkolbens (2)
zwischen poröser Trennschicht (5) und eine
Dichtplatte (4) gelangt;

und die Probe im Raum (11) von außen mit Licht
einer fluoreszenzanregenden Wellenlänge des ver-
wendeten Fluorophors bestrahlt und die Fluores-
zenzintensität mit einem Detektor (12) gemessen
wird.

16. Verfahren zur Durchführung von Rezeptor-Ligand-
oder Affinitätstests,
dadurch gekennzeichnet, daß durch Relativbewe-
gung eines Hohlzylinders (3) und eines Hohlkol-
bens (2) ein definiertes Probenvolumen durch
eine Öffnung (8) im Hohlzylinder (3) in einen

sich entsprechend der Relativbewegung vergrößernden Raum (14) gesaugt,

5 mindestens ein in der Probe enthaltener Analyt abhängig von seiner Konzentration den fluorophormarkierten Partner eines Rezeptor-Ligand-Systems, der aufgrund seiner Affinität an den anderen Partner dieses Systems, der an Partikel (6) und/oder eine poröse Trennschicht (5) gebunden ist, verdrängt;

10 und bei verschlossener Öffnung (8) des Hohlzylinders (3) durch entgegengesetzte Relativbewegung von Hohlzylinder (3) und Hohlkolben (2) ein Teil der so vorbereiteten Probe aus dem Raum (14) durch die poröse Trennschicht (5) in einen sich entsprechend dem jeweiligen Probenvolumen vergrößernden Raum (11) innerhalb des Hohlkolbens (2) zwischen poröser Trennschicht (5) und eine Dichtplatte (4) gelangt;

20 und die Probe im Raum (11) von außen mit Licht einer fluoreszenzanregenden Wellenlänge des verwendeten Fluorophors bestrahlt und die Fluoreszenzintensität mit einem Detektor (12) gemessen wird.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß die im Raum (14) aufgenommene Probe von außen mit Licht einer fluoreszenzanregenden Wellenlänge des verwendeten Fluorophors bestrahlt, die Fluoreszenzintensität gemessen und die so gemessene Fluoreszenzintensität mit der im Nachgang gemessenen Fluoreszenzintensität der beeinflussten Probe, die im

Raum (11) gemessen worden ist, verglichen und/oder ins Verhältnis gesetzt wird.

18. Verfahren zur Durchführung von Rezeptor-Ligand-
oder Affinitätsimmuntests,
dadurch gekennzeichnet, daß durch Relativbewegung eines Hohlzylinders (3) und eines Hohlkolbens (2) ein definiertes Probenvolumen durch eine Öffnung (8) im Hohlzylinder (3) in einen sich entsprechend der Relativbewegung vergrößernden Raum (14) gesaugt,
mindestens ein enzymmarkierter Partner eines Rezeptor-Ligand-Systems, der an der Innenwandung des Hohlzylinders (3) und/oder einer porösen Trennschicht (5) reversibel immobilisiert ist, in der Probe gelöst wird;
dieser Partner abhängig von der Konzentration des Analyten in der Probe und gemäß dem gewählten Testformat teilweise mit dem jeweils anderen Partner des Rezeptor-Ligand-Systems, der an Partikel (6) und/oder eine poröse Trennschicht (5) gebunden ist, reagiert,
bei verschlossener Öffnung (8) des Hohlzylinders (3) durch entgegengesetzte Relativbewegung von Hohlzylinder (3) und Hohlkolben (2) ein Teil der so vorbereiteten Probe aus dem Raum (14) durch die poröse Trennschicht (5) in einen sich entsprechend dem jeweiligen Probenvolumen vergrößernden Raum (11) innerhalb des Hohlkolbens (2) zwischen poröser Trennschicht (5) und eine Dichtplatte (4) gelangt

und danach die Probe innerhalb des Raumes (11) einer zeitaufgelösten colorimetrischen Messung unterzogen wird.

- 5 19. Verfahren zur Durchführung von Rezeptor-Ligand-
oder Affinitätstests,
dadurch gekennzeichnet, daß durch Relativbewe-
gung eines Hohlzylinders (3) und eines Hohlkol-
bens (2) ein definiertes Probenvolumen durch
10 eine Öffnung (8) im Hohlzylinder (3) in einen
sich entsprechend der Relativbewegung vergröß-
ernden Raum (14) gesaugt,
- mindestens ein in der Probe enthaltener Analyt
15 abhängig von seiner Konzentration den enzymmar-
kierten Partner eines Rezeptor-Ligand-Systems,
der aufgrund seiner Affinität an den anderen, an
Partikel (6) und/oder eine poröse Trennschicht
(5) gebundenen Partner dieses Systems gebunden
20 ist, verdrängt,
- bei verschlossener Öffnung (8) des Hohlzylinders
(3) durch entgegengesetzte Relativbewegung von
Hohlzylinder (3) und Hohlkolben (2) ein Teil der
25 so vorbereiteten Probe aus dem Raum (14) durch
die poröse Trennschicht (5) in einen sich ent-
sprechend dem jeweiligen Probenvolumen vergröß-
ernden Raum (11) innerhalb des Hohlkolbens (2)
zwischen poröser Trennschicht (5) und eine
30 Dichtplatte (4) gelangt
- und danach die Probe innerhalb des Raumes (11)
einer zeitaufgelösten colorimetrischen Messung
unterzogen wird.

20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet, dass durch Bewegung ei-
nes stabförmigen Elementes (15), bei mittels
Dichtplatte (4) einseitig verschlossener poröser
5 Trennschicht (5) die Probe durch die Öffnung (8)
aus dem Raum (14) verdrängt;

anschließend durch Relativebewegung von Hohlzy-
linder (3) und Hohlkolben (2) eine Substratlö-
10 sung durch die Öffnung (8) in den Raum (14) auf-
genommen und nach einer Umsetzung eines an ein
Rezeptor-Ligand-Systems gebundenen Enzyms durch
entgegengesetzte Relativbewegung von Hohlzylin-
der (3) und Hohlkolben (2) bei geschlossener
15 Öffnung (8) Substratlösung durch die poröse
Trennschicht (5) in den Raum (11) gedrückt und
eine Verfärbung der Substratlösung colorime-
trisch gemessen wird.

20

25

Fig. 1

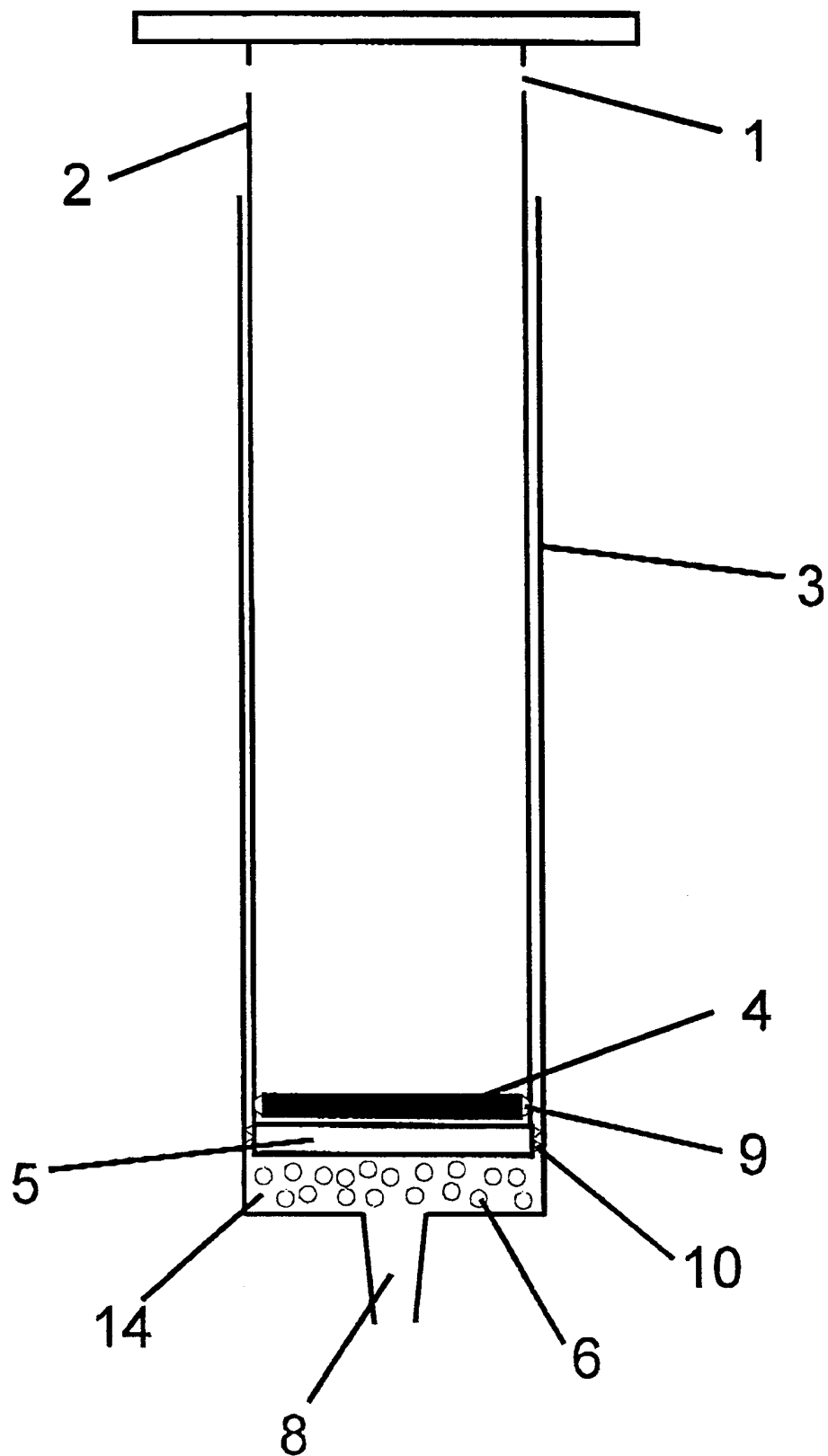
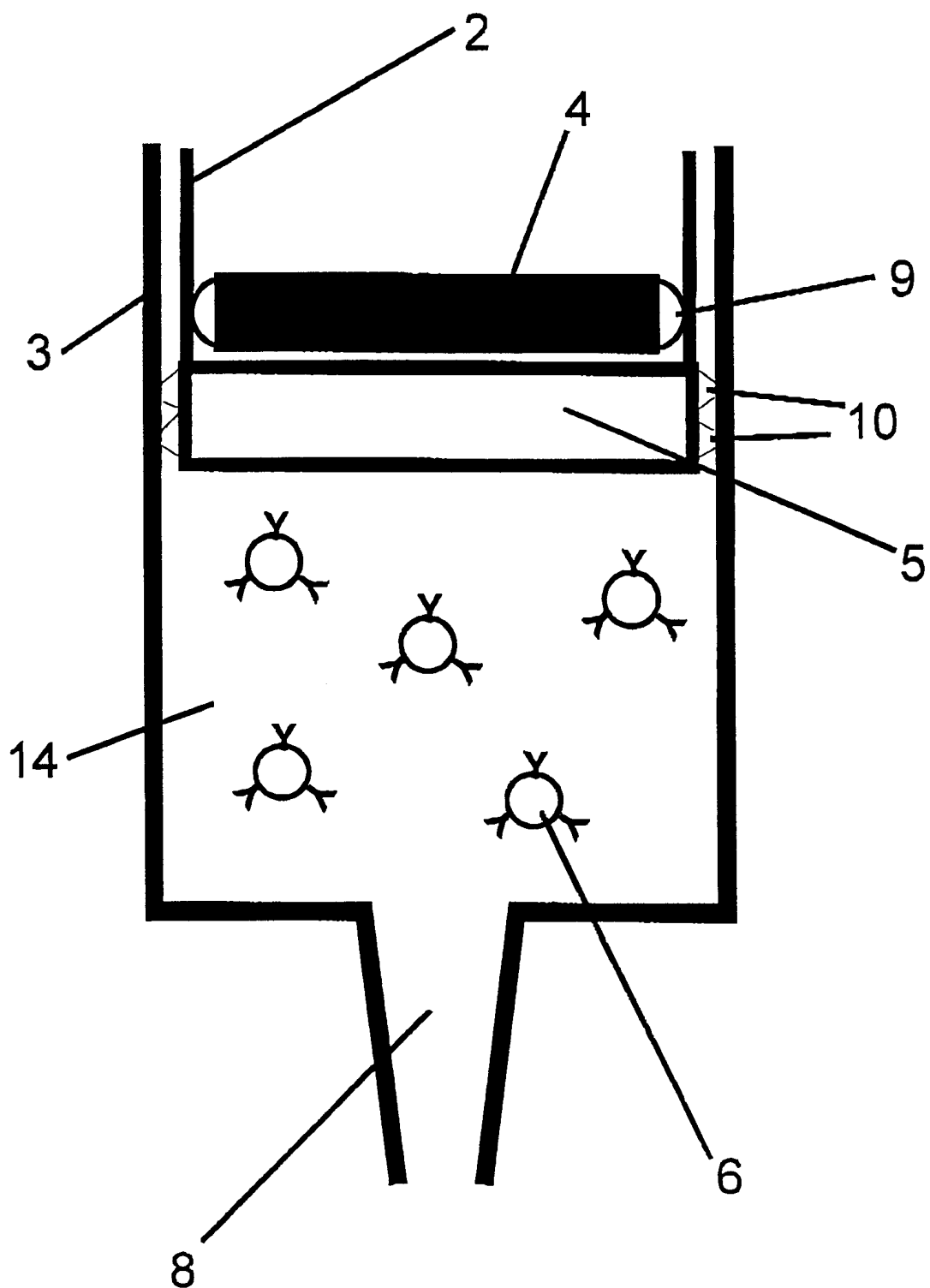


Fig. 2



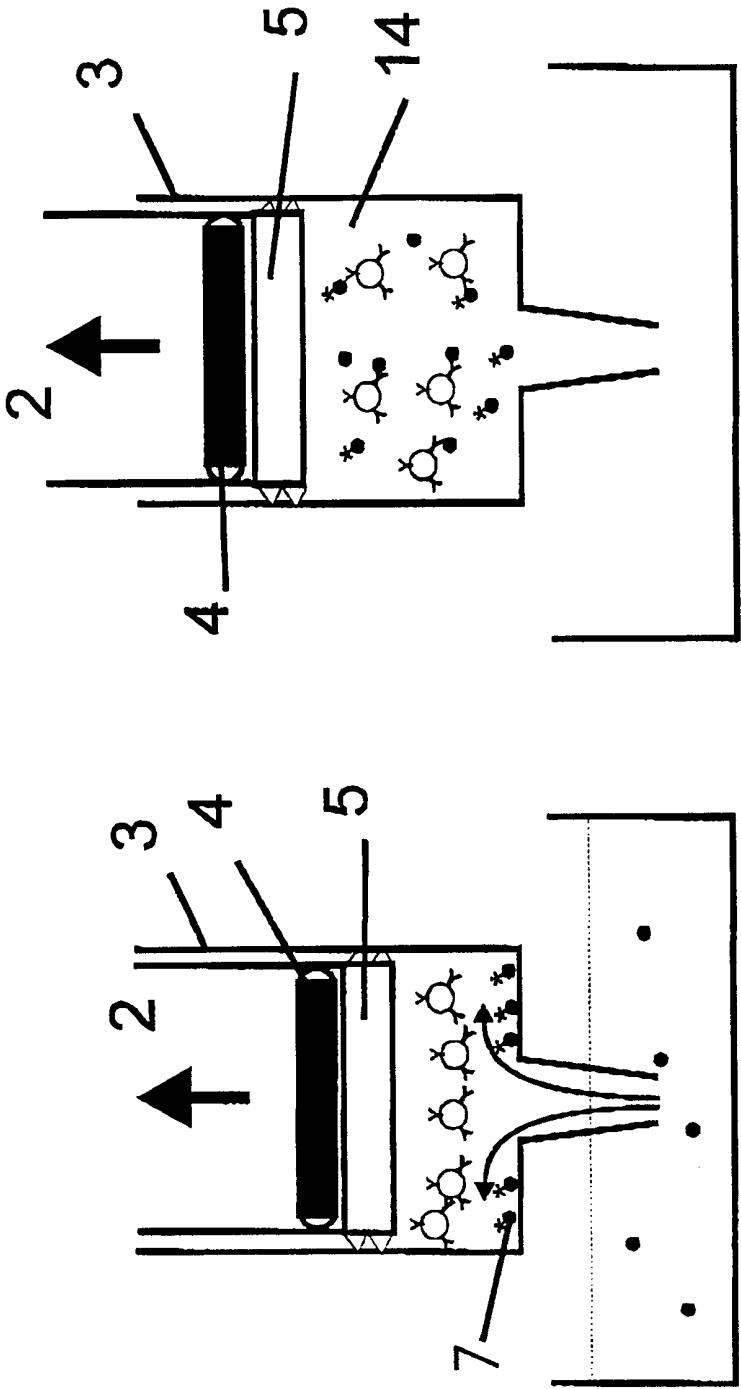


Fig. 3 b

Fig. 3 a

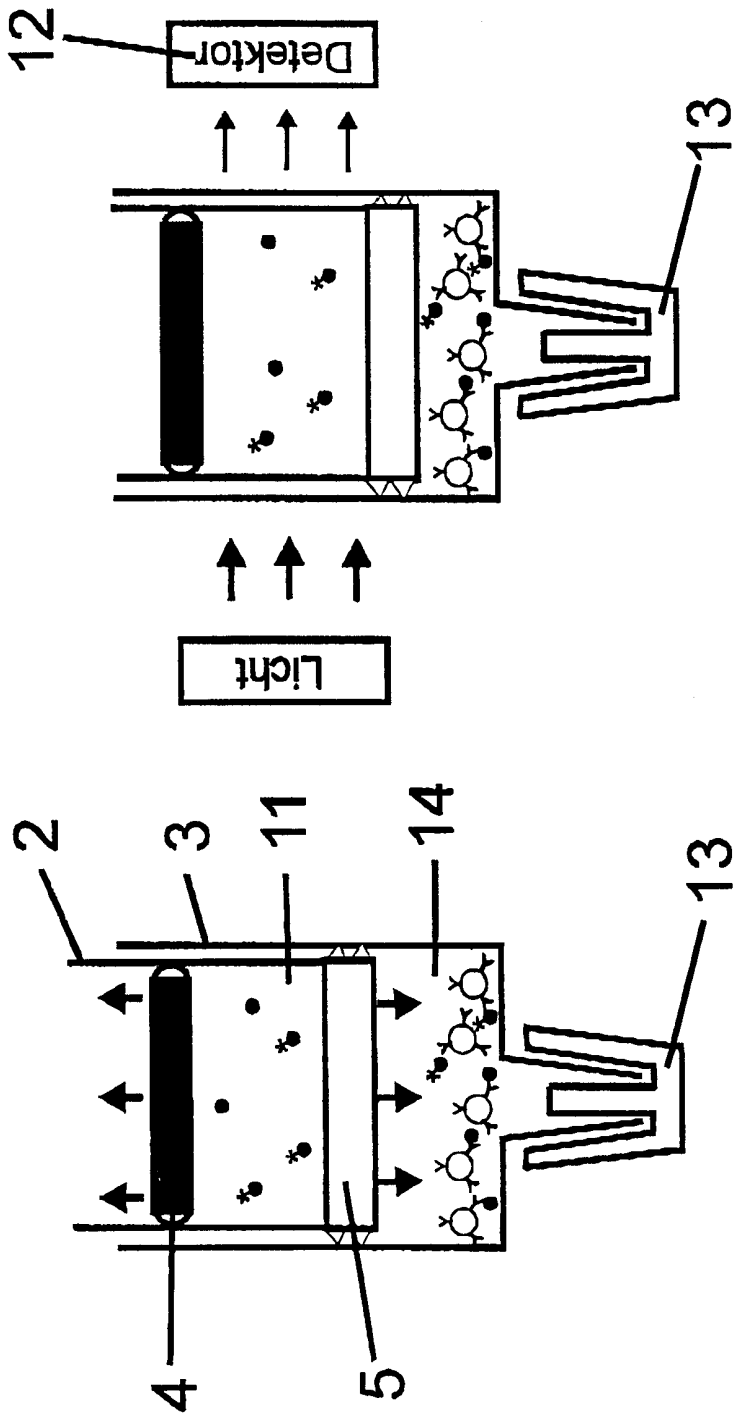
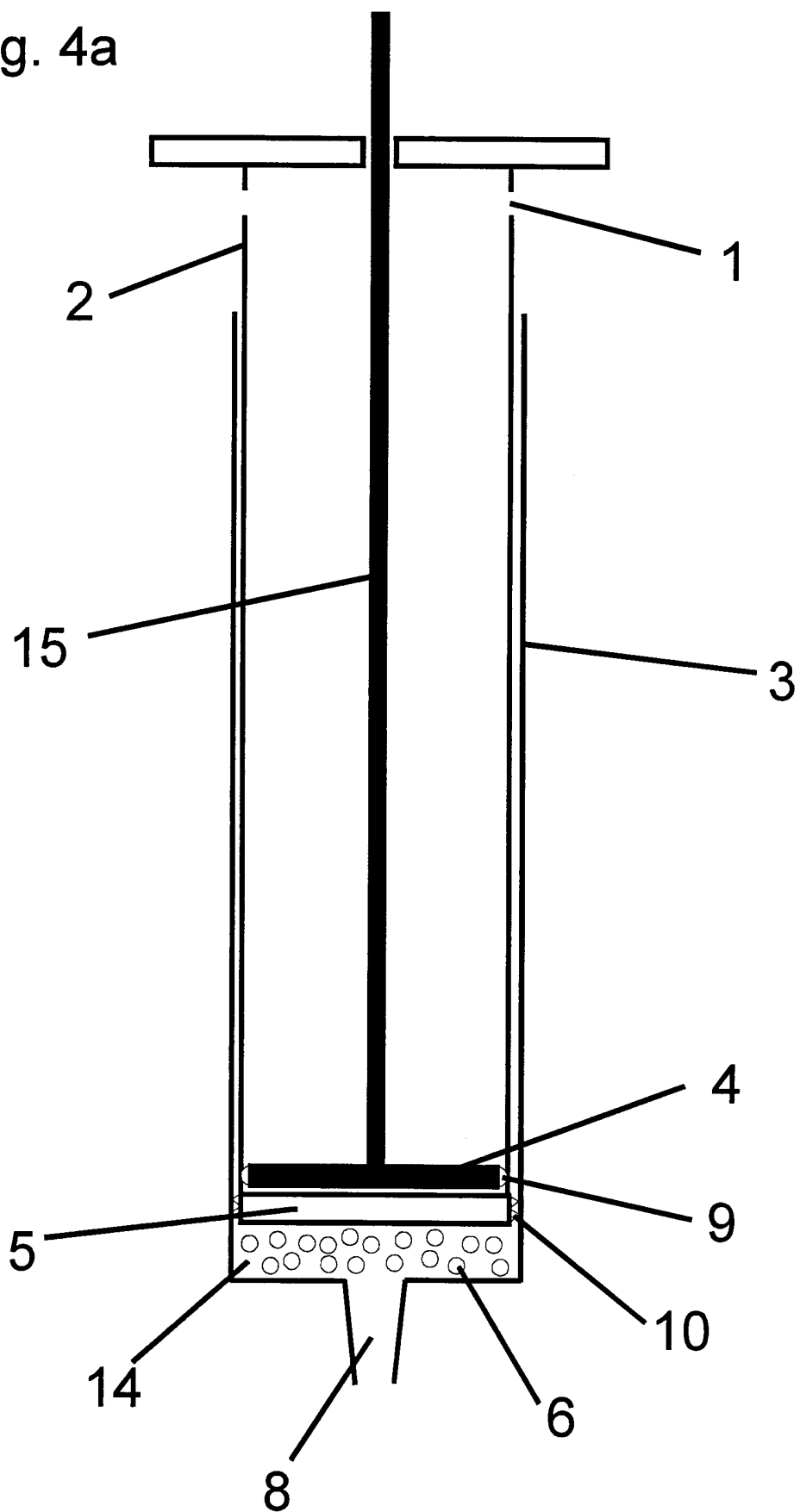
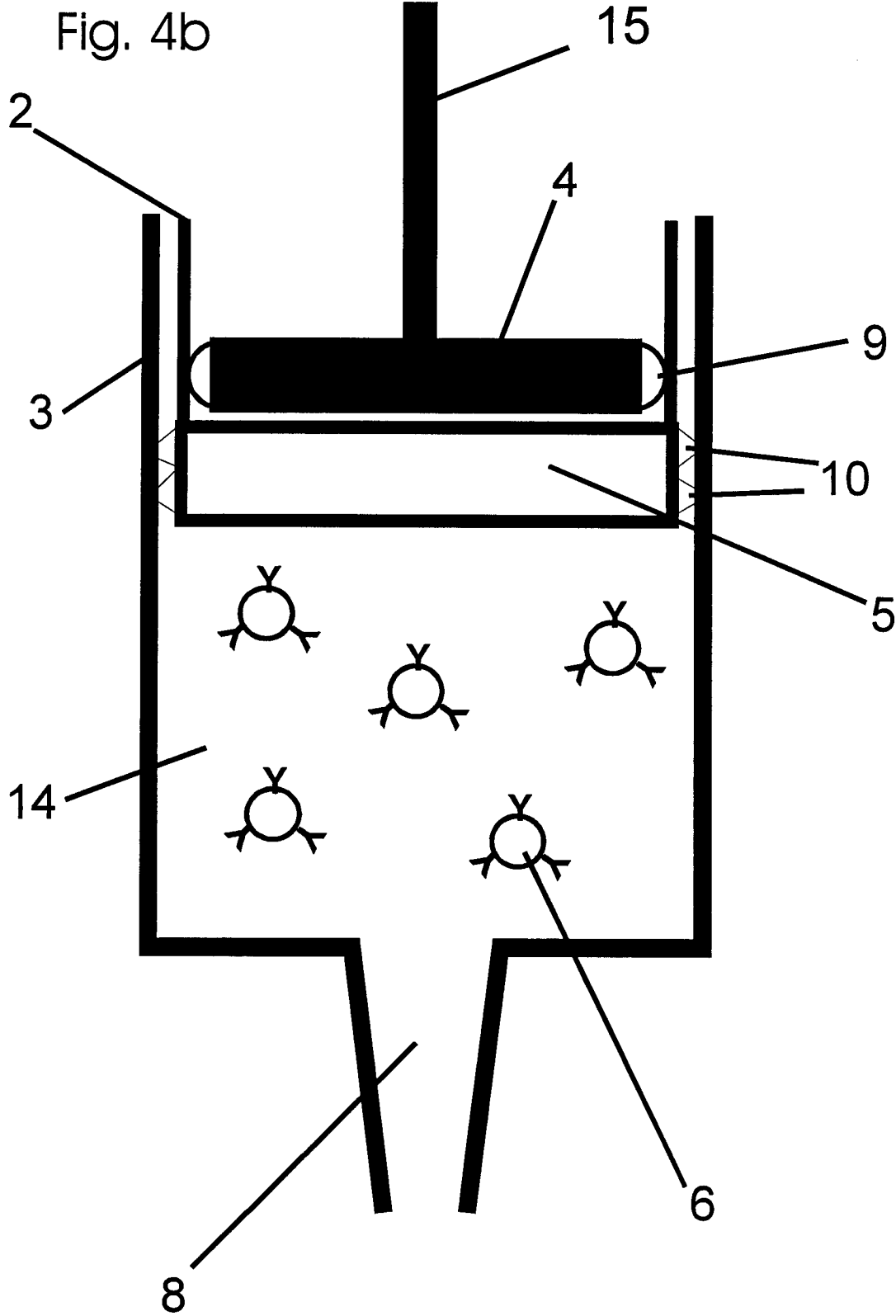


Fig. 3 d

Fig. 3 c

Fig. 4a





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/DE 00/01046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N33/53 B01L3/00 G01N21/03

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 B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DE 41 32 480 A (KABE LABORTECHNIK GMBH) 8 April 1993 (1993-04-08) column 3, line 16 - line 45 ---	1
Y	US 5 846 745 A (NASH PETER ET AL) 8 December 1998 (1998-12-08) column 3, line 33 - line 55 ---	1
A	EP 0 378 353 A (CANCER DIAGNOSTICS INC) 18 July 1990 (1990-07-18) column 4, line 56 -column 5, line 5; figure 4 column 7, line 27 -column 8, line 11; figures 11-14 column 8, line 14 - line 35; figures 15,16 --- -/--	1



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

29 August 2000

Date of mailing of the international search report

08.09.00

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

Hocquet, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01046

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 197 47 572 C (INST CHEMO UND BIOSENSORIK MUE) 8 April 1999 (1999-04-08) column 9, line 14 - line 19; figure 4 column 7, line 63 -column 8, line 64; figures 1,5 ---	1
A	EP 0 561 003 A (MINA LTD) 22 September 1993 (1993-09-22) the whole document ---	1
A	WO 98 18518 A (COHESION CORP) 7 May 1998 (1998-05-07) page 5, line 26 -page 6, line 28; figures 1-3 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 00/0146

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Pages 20,21 & 23 of the application are missing. The text of Claims Nos. 15 and 18 is incomplete and the full text of Claims Nos. 16,17 & 19 is also missing. Claim No. 20 could not be searched because it is dependent on Claim No. 19 which is missing.
2. ☒ Claims Nos.: 15-20
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01046

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 4132480	A	08-04-1993	NONE		

US 5846745	A	08-12-1998	US	5552288 A	03-09-1996
			US	5156948 A	20-10-1992

EP 0378353	A	18-07-1990	US	4961432 A	09-10-1990
			AT	158706 T	15-10-1997
			AU	630653 B	05-11-1992
			AU	4789590 A	19-07-1990
			CA	1335787 A	06-06-1995
			DE	69031507 D	06-11-1997
			DE	69031507 T	19-03-1998
			EP	0737443 A	16-10-1996
			JP	3012262 B	21-02-2000
			JP	3197864 A	29-08-1991
			US	5471994 A	05-12-1995
			US	5024237 A	18-06-1991
			US	5024238 A	18-06-1991
			US	5016644 A	21-05-1991
			US	4960130 A	02-10-1990
			US	5038793 A	13-08-1991
			US	5077012 A	31-12-1991
			US	5358690 A	25-10-1994
			US	5998214 A	07-12-1999
			US	5301685 A	12-04-1994

DE 19747572	C	08-04-1999	WO	9922222 A	06-05-1999
			EP	1027593 A	16-08-2000

EP 0561003	A	22-09-1993	NONE		

WO 9818518	A	07-05-1998	US	5968018 A	19-10-1999
			AU	5156398 A	22-05-1998
			EP	0956086 A	17-11-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/DE 00/01046

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/53 B01L3/00 G01N21/03

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N B01L

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

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

EP0-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	DE 41 32 480 A (KABE LABORTECHNIK GMBH) 8. April 1993 (08.04.93) spalte 3, reihe 16 - reihe 45 ---	1
Y	US 5 846 754 A (NASH PETER ET AL) 8. Dezember 1998 (08.12.98) spalte 3, reihe 33 - reihe 55 --- - / ---	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, 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 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
 29 August 2000 (29.08.00)

 Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
 08 September 2000 (08.09.00)

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt

Telefaxnr.

Bevollmächtigter Bediensteter

Telefonnr.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Internationales Aktenzeichen
 PCT/DE 00/01046

C (Fortsetzung). ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 378 353 A (CANCER DIAGNOSTICS INC) 18.Juli 1990 (18.07.90) spalte 4, reihe 56 - spalte 5, reihe 5; figur 4 spalte 7, reihe 27 - spalte 8, reihe 11; figuren 11-14 spalte 8, reihe 14 - reihe 35; figuren 15, 16 ---	1
A	DE 197 47 572 C (INST CHEMO UND BIOSENSORIK MUE) 08.April 1999 (08.04.99) spalte 9, reihe 14 - reihe 19; figur 4 spalte 7, reihe 63 - spalte 8, reihe 64; figuren 1, 5 ---	1
A	EP 0 561 003 A (MINA LTD) 22.September 1993 (22.09.93) die ganzes dokument ---	1
A	WO 98 18518 A (COHESION CORP) 07.Mai 1998 (07.05.98) seite 5, reihe 26 - seite 6, reihe 28; figuren 1-3 -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/01046

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

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

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 15-20
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
Es fehlen die Seiten 20,21 und 23 der Anmeldung. Der Text von Ansprüchen 15 und 18 ist unvollständig, und es fehlt der ganze Text von Ansprüchen 16,17 und 19. Anspruch 20 konnte nicht recherchiert werden, weil er vom fehlenden Anspruch 19 abhängt.
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

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

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01046

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 4132480	A	08-04-1993	KEINE		
US 5846745	A	08-12-1998	US	5552288 A	03-09-1996
			US	5156948 A	20-10-1992
EP 0378353	A	18-07-1990	US	4961432 A	09-10-1990
			AT	158706 T	15-10-1997
			AU	630653 B	05-11-1992
			AU	4789590 A	19-07-1990
			CA	1335787 A	06-06-1995
			DE	69031507 D	06-11-1997
			DE	69031507 T	19-03-1998
			EP	0737443 A	16-10-1996
			JP	3012262 B	21-02-2000
			JP	3197864 A	29-08-1991
			US	5471994 A	05-12-1995
			US	5024237 A	18-06-1991
			US	5024238 A	18-06-1991
			US	5016644 A	21-05-1991
			US	4960130 A	02-10-1990
			US	5038793 A	13-08-1991
			US	5077012 A	31-12-1991
			US	5358690 A	25-10-1994
			US	5998214 A	07-12-1999
			US	5301685 A	12-04-1994
DE 19747572	C	08-04-1999	WO	9922222 A	06-05-1999
			EP	1027593 A	16-08-2000
EP 0561003	A	22-09-1993	NONE		
WO 9818518	A	07-05-1998	US	5968018 A	19-10-1999
			AU	5156398 A	22-05-1998
			EP	0956086 A	17-11-1999