

(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
9. Juli 2009 (09.07.2009)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/083252 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation:
C07K 1/22 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2008/011129
- (22) Internationales Anmeldedatum:
29. Dezember 2008 (29.12.2008)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2007 063 356.6
28. Dezember 2007 (28.12.2007) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **PETZEL, Jan** [DE/DE]; Laibacher Strasse 13, 42697 Solingen (DE). **STEINERT, Kerstin** [DE/DE]; Martin-Buber-Strasse 44, 40764 Langenfeld (DE). **ROTH, Udo** [DE/DE]; Neefee-strasse 9, 53115 Bonn (DE).
- (74) Anwälte: **KÖNIG, Reimar** et al.; König, König, Szyuka, Von Renesse, Tilmann & Schön, bohm, Lohengrinstrasse 11, 40549 Düsseldorf (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,

BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:

22. Oktober 2009

(54) Title: METHOD FOR ENRICHING PHOSPHOPEPTIDES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ANREICHERUNG VON PHOSPHOPEPTIDEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for enriching phosphopeptides. Said method is characterized in that a carrier is used which carries phosphate groups and/or phosphonate groups on the surface thereof. The phosphate groups and/or phosphonate groups are functionalized with zirconium ions and are bonded to the carrier by means of linker structures which have at least one alkyl chain containing at least 5 C atoms. Also disclosed are corresponding carriers and suitable kits for enriching phosphopeptides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung von Phosphopeptiden, das dadurch gekennzeichnet ist, dass ein Träger eingesetzt wird, der auf seiner Oberfläche Phosphat- und/oder Phosphonatgruppen trägt, die mit Zirkoniumionen funktionalisiert sind, wobei die mit Zirkoniumionen funktionalisierten Phosphat- und/oder Phosphonatgruppen über Linkerstrukturen an den Träger gebunden sind und die Linkerstrukturen wenigstens eine Alkylkette aufweisen, die wenigstens 5 C-Atome aufweist. Ferner werden entsprechende Träger zur Verfügung gestellt sowie geeignete Kits zur Anreicherung von Phosphopeptiden.



WO 2009/083252 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/011129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. C07K1/22 G01N33/68

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)
 C07K G01N

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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NONGLATON GUILLAUME ET AL: "New approach to oligonucleotide microarrays using zirconium phosphonate-modified surfaces." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 126, no. 5, 11 February 2004 (2004-02-11), pages 1497-1502, XP002522258 ISSN: 0002-7863	8-15
Y	page 1499, left-hand column, paragraph 2; figure 1 ----- -/--	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family 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.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 April 2009

Date of mailing of the international search report

21/08/2009

Name and mailing address of the ISA/
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Petri, Bernhard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2008/011129

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FENG SHUN ET AL: "Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis" MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, vol. 6, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 1656-1665, XP002522259 ISSN: 1535-9476 the whole document page 1657, left-hand column, lines 12-16 -----	1-7
A	ZHOU HOUJIANG ET AL: "Zirconium phosphonate-modified porous silicon for highly specific capture of phosphopeptides and MALDI-TOF MS analysis" JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 5, no. 9, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 2431-2437, XP002473329 ISSN: 1535-3893 cited in the application the whole document -----	1-8
A	BODENMILLER BERND ET AL: "Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome" NATURE METHODS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 4, no. 3, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 231-237, XP009090883 ISSN: 1548-7091 cited in the application the whole document -----	1-8
P,A	US 2008/006581 A1 (ZOU HANFA [CN] ET AL) 10 January 2008 (2008-01-10) the whole document -----	1-8

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:

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

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

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

See supplemental box

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:

1-8

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has found that the international application contains multiple (groups of) inventions, as follows:

1. Claims 1-8

Method which is characterized in that carriers are used which carry phosphate groups on the surface thereof, said phosphate groups being functionalized with zirconium ions, said method being further characterized in that the carrier comprises a linker which is characterized by an alkyl chain containing at least 5 C atoms (claims 1-7 and claim 8).

2. Claims 9-15 (in part)

Carrier according to claim 8, which is further characterized in that the linker comprises an inert polymer structure, such as, for example, PEG (claim 9 (a)-(b), claims 10-15 in part).

3. Claims 9-15 (in part)

Carrier according to claim 8, which is further characterized in that the linker comprises an alkanthiol (claim 9 (c) in part, claims 10-15 in part).

4. Claims 9-15 (in part)

Carrier according to claim 8, which is further characterized in that the linker comprises a dialkyl sulphide (claim 9 (c) in part, and (d) and (e), claims 10-15 in part).

5. Claims 9-15 (in part)

Carrier according to claim 8, which is further characterized in that the linker comprises an ethylene glycol alkanthiol derivative (claim 9 (c) in part, and (f), claims 10-15 in part)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/011129

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2008006581 A1	10-01-2008	CN 101101283 A	09-01-2008

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2008/011129

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C07K1/22 G01N33/68

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C07K G01N

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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	NONGLATON GUILLAUME ET AL: "New approach to oligonucleotide microarrays using zirconium phosphonate-modified surfaces." JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 126, Nr. 5, 11. Februar 2004 (2004-02-11), Seiten 1497-1502, XP002522258 ISSN: 0002-7863	8-15
Y	Seite 1499, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 1 ----- -/--	1-7

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- | | |
|--|---|
| <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>*A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>*E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>*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)</p> <p>*O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>*P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> | <p>*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</p> <p>*X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>*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</p> <p>*&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> |
|--|---|

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. April 2009

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

21/08/2009

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Petri, Bernhard

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	FENG SHUN ET AL: "Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis" MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS, Bd. 6, Nr. 9, September 2007 (2007-09), Seiten 1656-1665, XP002522259 ISSN: 1535-9476 das ganze Dokument Seite 1657, linke Spalte, Zeilen 12-16 -----	1-7
A	ZHOU HOUJIANG ET AL: "Zirconium phosphonate-modified porous silicon for highly specific capture of phosphopeptides and MALDI-TOF MS analysis" JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, ACS, WASHINGTON, DC, US, Bd. 5, Nr. 9, 1. September 2006 (2006-09-01), Seiten 2431-2437, XP002473329 ISSN: 1535-3893 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-8
A	BODENMILLER BERND ET AL: "Reproducible isolation of distinct, overlapping segments of the phosphoproteome" NATURE METHODS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, Bd. 4, Nr. 3, 1. März 2007 (2007-03-01), Seiten 231-237, XP009090883 ISSN: 1548-7091 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	1-8
P,A	US 2008/006581 A1 (ZOU HANFA [CN] ET AL) 10. Januar 2008 (2008-01-10) das ganze Dokument -----	1-8

Feld Nr. II 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 internationaler Recherchenbericht erstellt:

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

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

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

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

Diese Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

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 zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung solcher Gebühren 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. Dieser internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfasst:
1-8

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Der Anmelder hat die zusätzlichen Recherchegebühren unter Widerspruch entrichtet und die gegebenenfalls erforderliche Widerspruchsgebühr gezahlt.
- ☐ Die zusätzlichen Recherchegebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt, jedoch wurde die entsprechende Widerspruchsgebühr nicht innerhalb der in der Aufforderung angegebenen Frist entrichtet.
- ☐ Die Zahlung der zusätzlichen Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-8

Verfahren dadurch gekennzeichnet dass Träger eingesetzt werden die dadurch gekennzeichnet sind dass er auf seiner Oberfläche Phosphatgruppen trägt die mit Zirkoniumionen funktionalisierbar sind, weiters dadurch gekennzeichnet dass der Träger einen Linker aufweist welcher durch eine mindestens 5 C-Einheiten lange Alkylkette gekennzeichnet (Ansprüche 1-7, und Anspruch 8).

2. Ansprüche: 9-15 (teilweise)

Träger nach Anspruch 8 weiterhin gekennzeichnet dass der Linker eine inerte Polymerstruktur aufweist, wie z.B. PEG (Anspruch 9 (a)-(b), Ansprüche 10-15 teilweise).

3. Ansprüche: 9-15 (teilweise)

Träger nach Anspruch 8 weiterhin gekennzeichnet dass der Linker ein Alkanthiol aufweist (Anspruch 9 (c) teilweise, Ansprüche 10-15 teilweise).

4. Ansprüche: 9-15 (teilweise)

Träger nach Anspruch 8 weiterhin gekennzeichnet dass der Linker ein Dialkylsulfid aufweist (Anspruch 9 (c) teilweise, und (d) und (e), Ansprüche 10-15 teilweise).

5. Ansprüche: 9-15 (teilweise)

Träger nach Anspruch 8 weiterhin gekennzeichnet dass der Linker ein Ethylenglykolalkanthiolderivat aufweist (Anspruch 9 (c) teilweise, und (f), Ansprüche 10-15 teilweise).

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP2008/011129

Im Recherchenbericht
angeführtes Patentdokument

Datum der
Veröffentlichung

Mitglied(er) der
Patentfamilie

Datum der
Veröffentlichung

US 2008006581	A1	10-01-2008	CN	101101283 A	09-01-2008
---------------	----	------------	----	-------------	------------