

(19)



(11)

**EP 3 181 229 A1**

(12)

**EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:  
**21.06.2017 Patentblatt 2017/25**

(51) Int Cl.:  
**B01L 7/00 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)**

(21) Anmeldenummer: **15003599.6**

(22) Anmeldetag: **17.12.2015**

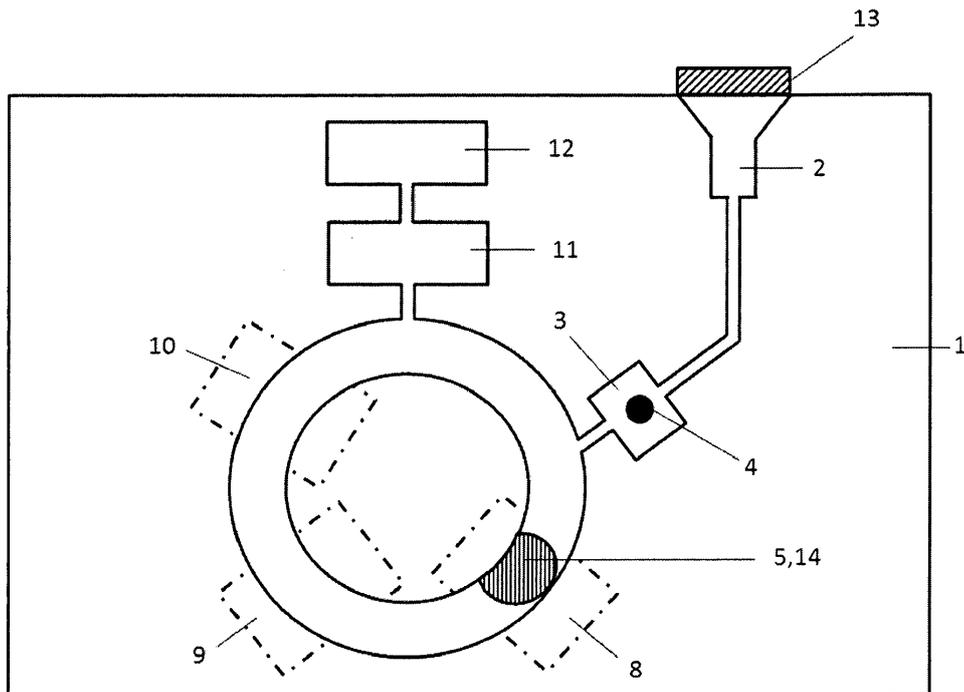
(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR**  
 Benannte Erstreckungsstaaten:  
**BA ME**  
 Benannte Validierungsstaaten:  
**MA MD**

(71) Anmelder: **Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG**  
**23560 Lübeck (DE)**  
 (72) Erfinder: **RICHTER, Carsten**  
**23560 Lübeck (DE)**

(54) **ANALYTISCHE VORRICHTUNG ZUR DURCHFÜHRUNG EINER PCR-REAKTION**

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft eine analytische Vorrichtung umfassend eine Denaturierungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer, wobei die Temperatur der Denaturierungskammer auf eine Temperatur zwischen 90 °C und 105 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist, wobei die Temperatur der Amplifikationskammer auf eine Temperatur zwischen 60 °C und 80 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist,

wobei die Temperatur der Annealingkammer auf eine Temperatur zwischen 40°C und 67 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist, und wobei die Vorrichtung so ausgestaltet ist, dass eine flüssige Probe in die Denaturierungskammer eingebracht werden kann und zwischen der Denaturierungskammer, der Amplifikationskammer, der Annealingkammer und optional weiteren Kammern hin und her übertragen werden kann.



**Fig. 2**

**EP 3 181 229 A1**

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine analytische Vorrichtung umfassend eine Denaturierungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer,

wobei die Temperatur der Denaturierungskammer auf eine Temperatur zwischen 90°C und 105 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist,

wobei die Temperatur der Amplifikationskammer auf eine Temperatur zwischen 60°C und 80 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist,

wobei die Temperatur der Annealingkammer auf eine Temperatur zwischen 40°C und 67 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist,

und wobei die Vorrichtung so ausgestaltet ist, dass eine flüssige Probe in die Denaturierungskammer eingebracht werden kann und zwischen der Denaturierungskammer, der Amplifikationskammer, der Annealingkammer und optional weiteren Kammern hin und her übertragen werden kann.

**[0002]** Bei vielen diagnostischen, labormedizinischen oder sonstigen analytischen Untersuchungen bedient man sich chemischer Reaktionen und/oder physikalischer Nachweisverfahren in einer flüssigen Phase. Besondere analytische und diagnostische Bedeutung kommt der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu, mit der Nukleinsäuresequenzen spezifisch vervielfältigt und nachgewiesen werden können, sofern sie in einer bestimmten Probe vorhanden sind. Damit können beispielsweise Krankheitserreger (Viren, Bakterien, Pilze, Parasiten) wie gegen Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder bestimmte menschliche Nukleinsäuresequenzen, die diagnostisch von Bedeutung sind, beispielsweise, weil sie mit bestimmten Krankheiten zusammenhängende Mutationen aufweisen, in Patientenproben nachgewiesen werden.

**[0003]** Auch außerhalb medizinischer Anwendungen ist die PCR von Bedeutung, beispielsweise bei der Untersuchung von Boden- oder Lebensmittelproben auf bestimmte Mikroorganismen, in der Forensik oder bei der synthetischen Herstellung von komplexen Nukleinsäuren.

**[0004]** Die PCR erfordert in der herkömmlichen Form einen erheblichen Aufwand mit Hinblick auf Reagenzien, Geräte und Arbeitsanfall, insbesondere bei diagnostischen Anwendungen. Für jede einzelne Probe muss ein Reaktionsansatz zusammengestellt werden, der eine ganze Reihe spezifischer, teilweise thermoinstabiler Reagenzien enthält. Der fertige Reaktionsansatz muss über längere Zeit zyklisch bei verschiedenen Temperaturen inkubiert werden. Schon ein einzelner Fehler oder eine Inaktivierung eines Reagenz verhindern den Ablauf der Reaktion.

**[0005]** Kann die Zuverlässigkeit der Reaktion nicht garantiert werden, so bleibt das Ergebnis ohne Aussagekraft. Die Reaktion muss vor Kontaminationen geschützt werden, über die das Ergebnis verfälschende Nuklein-

säuren eingebracht werden können, ebenso vor Stoffen, die den Zerfall von essentiellen Reagenzien beschleunigen können.

**[0006]** Die Analyse des Reaktionsproduktes erfordert eine erhebliche apparative Ausstattung, beispielsweise ein Gerät, das empfindliche Fluoreszenzmessungen gestattet.

**[0007]** Für viele Anwender mit begrenzter Expertise und Infrastruktur ist die Verwendung der PCR nicht mit der erforderlichen Zuverlässigkeit durchführbar. Insbesondere bei geringem Probenaufkommen lohnt der Aufwand der Etablierung eines dafür geeigneten Labors nicht.

**[0008]** Zu analysierende Proben müssen dann verpackt und zu einem Speziallabor versandt werden, bei dem eine große Zahl von Proben abgearbeitet wird. Dies verzögert die Analyse und erhöht die Kosten. Beim Transport besteht die Gefahr, dass eine Probe verloren geht, verdirbt oder durch Beschädigung unbrauchbar wird.

**[0009]** Vor diesem Hintergrund besteht eine der vorliegenden Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe darin, ein möglichst anwenderfreundliches System für die Durchführung von PCR-Reaktionen zu schaffen, das einfach zu bedienen ist, insbesondere nicht die Zubereitung komplexer Reaktionsansätze verlangt.

**[0010]** Das System soll möglichst schnell und Ressourcen (Zeit, Energie, Reagenzien- und Probenverbrauch) sparend funktionieren, keine besonderen Bedingungen verlangen und gegenüber Störungen, Beschädigungen und Bedienungsfehlern möglichst wenig anfällig sein.

**[0011]** Gleichzeitig soll das System die parallele Abarbeitung möglichst vieler Proben gestatten. Je nach Bedarf soll das System die Untersuchung möglichst jeder Art von Probe bzw. jede interessierende Untersuchung, mit einem möglichst großen Spektrum von Parametern, flexibel und kurzfristig ermöglichen. Es soll möglich sein, eine Probe, beispielsweise von einem Patienten, mit möglichst geringem Aufwand und Zeitbedarf auf mehrere diagnostische Parameter zu untersuchen.

**[0012]** Nicht zuletzt soll das System die genannten Vorteile mit einer Sicherung gegen Kontaminationen von außen vereinen, die beispielsweise durch das mit der Bedienung betraute Personal eingetragen werden könnten.

**[0013]** Diese und weitere Aufgaben werden durch den Gegenstand der vorliegenden Anmeldung und insbesondere auch durch den Gegenstand der beigefügten unabhängigen Ansprüche gelöst, wobei sich Ausführungsformen aus den Unteransprüchen ergeben.

**[0014]** Die der Erfindung zu Grunde liegende Aufgabe wird in einem ersten Aspekt gelöst durch eine analytische Vorrichtung umfassend eine Denaturierungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer, wobei die Temperatur der Denaturierungskammer auf eine Temperatur zwischen 90 °C und 105 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist,

wobei die Temperatur der Amplifikationskammer auf eine Temperatur zwischen 60 °C und 80 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist,

wobei die Temperatur der Annealingkammer auf eine Temperatur zwischen 40 °C und 67 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist,

und wobei die Vorrichtung so ausgestaltet ist, dass eine Probe in die Denaturierungskammer eingebracht werden kann und zwischen der Denaturierungskammer, der Amplifikationskammer, der Annealingkammer und optional weiteren Kammern hin und her übertragen werden kann.

**[0015]** In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Vorrichtung eine Aufnahmekammer mit einem Zugang zur Oberfläche der analytischen Vorrichtung, über den eine Probe in die Aufnahmekammer eingebracht und anschließend zu weiteren Kammern übertragen werden kann.

**[0016]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Amplifikationskammer der Denaturierungskammer nachgeschaltet und die Annealingkammer der Amplifikationskammer.

**[0017]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Vorrichtung weiter ein analytisches Reagenz, das in der flüssigen Probe löslich ist, bevorzugt ein lyophilisiertes Reagenz.

**[0018]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der optional vorhandenen Aufnahmekammer nachgeschaltet und der Denaturierungskammer vorgeschaltet, bevorzugt direkt vorgeschaltet, eine Mischkammer vorgesehen, die bevorzugterweise das analytische Reagenz aufweist.

**[0019]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die analytische Vorrichtung wenigstens zwei Sets von Kammern, jeweils umfassend eine Denaturierungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer,

wobei bevorzugt der Aufnahmekammer nachgeschaltet und der Denaturierungskammer vorgeschaltet, besonders bevorzugt direkt vorgeschaltet, eine Mischkammer vorgesehen ist, die bevorzugterweise das analytische Reagenz aufweist, und aus der Mischkammer jeweils ein Teil einer flüssigen Probe in eine Kammer des jeweiligen Sets übertragen werden kann.

**[0020]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist die diagnostische Vorrichtung wenigstens eine Heizzone auf, wobei die Denaturierungskammer, bevorzugt zusätzlich die Amplifikationskammern, noch bevorzugter zusätzlich die Annealingkammern der wenigstens zwei Sets jeweils auf einer Heizzone angeordnet sind.

**[0021]** In einer bevorzugten Ausführungsform weist die Vorrichtung eine Auslesekommer auf, in die die flüssige Probe aus der Denaturierungskammer, aus der Amplifikationskammer oder der Annealingkammer übertragen werden kann.

**[0022]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die Auslesekommer wenigstens eine immobilisierte Nukleinsäure.

**[0023]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei der diagnostischen Vorrichtung um einen Laborchip.

In einem zweiten Aspekt wird das der Erfindung zu Grunde liegende Problem gelöst durch eine Analyseeinheit geeignet zur Aufnahme der analytischen Vorrichtung, bevorzugt umfassend die erfindungsgemäße analytische Vorrichtung,

**[0024]** umfassend eine Heizvorrichtung, die so beschaffen ist, dass in der Denaturierungskammer, Amplifikationskammer und Annealingkammer und/oder in der Heizzone für die Denaturierungskammern, Amplifikationskammer bzw. Annealingkammern die erforderliche Temperatur eingestellt werden kann bzw. eingestellt ist und/oder umfassend ein Mittel zum Auslesen einer flüssigen Probe in der Auslesekommer der analytischen Vorrichtung.

**[0025]** In einem dritten Aspekt wird das der Erfindung zu Grunde liegende Problem gelöst durch eine Verwendung der erfindungsgemäßen analytischen Vorrichtung zur Untersuchung einer flüssigen Probe mittels Polymerase-Kettenreaktion.

**[0026]** In einem vierten Aspekt wird das der Erfindung zu Grunde liegende Problem gelöst durch ein Verfahren umfassend die Schritte:

- a) Einbringen einer flüssigen Probe in die Denaturierungskammer der erfindungsgemäßen analytischen Vorrichtung, anschließend Denaturieren der Probe,
- b) Übertragen der flüssigen Probe aus Schritt a) in die Annealingkammer, anschließend Annealing,
- c) Übertragen der flüssigen Probe aus Schritt b) in die Amplifikationskammer, anschließend Amplifizieren,
- d) optional Wiederholen der Schritte a), b) und c),
- e) optional: Übertragen der flüssigen Probe aus Schritt c) oder d) in die Auslesekommer, anschließend Auslesen der flüssigen Probe.

**[0027]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst die erfindungsgemäße Vorrichtung eine flüssige Probe, bevorzugt eine nukleinsäurehaltige flüssige Probe oder eine Probe, die darauf zu untersuchen ist, ob sie eine Nukleinsäure enthält.

**[0028]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine analytische Vorrichtung mit wenigstens einem Set an Kammern, jeweils umfassend eine Denaturierungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer. Die analytische Vorrichtung gestattet es, eine extern gewonnene Probe in die Denaturierungskammer einzubringen, optional über eine andere Kammer.

**[0029]** Bei der Probe handelt es sich um eine flüssige Probe oder aber um eine feste Probe, sofern letztere im Inneren der analytischen Vorrichtung in eine Flüssigkeit aufgenommen wird, so dass die Probe für die weitere Prozessierung ebenfalls in flüssiger Form zur Verfügung steht. Eine geeignete Vorrichtung zum Überführen einer

festen Probe in eine Flüssigkeit und ein Verfahren ist beispielsweise in der EP15002317.4 beschrieben.

**[0030]** Bei der Probe handelt es sich bevorzugt um eine nukleinsäurehaltige Probe oder eine Probe, die darauf zu untersuchen ist, ob sie eine Nukleinsäure enthält, wobei die Probe in einer weitgehend unprozessierten Form vorliegen kann, beispielsweise einer direkt von einem Patienten gewonnenen Probe oder eine Bodenprobe. Alternativ kann die Probe aufbereitet sein, beispielsweise durch Isolieren und/oder Anreichern der darin enthaltenen Nukleinsäure. Bei der Nukleinsäure kann es sich um jegliche Nukleinsäure oder um ein Derivat davon handeln, die bzw. das mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden kann, bevorzugt um DNA oder RNA.

**[0031]** Die erfindungsgemäße Vorrichtung umfasst ein gegenüber der Umgebung abschließbares, bevorzugt abgeschlossenes System mit Kammern und Verbindungskanälen. In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet "abschließbar", dass das innere System zeitweilig zum Einbringen einer Probe geöffnet werden kann, im abgeschlossenen Zustand ein Einbringen von Probe oder kontaminierendem Material nicht möglich ist. Beispielsweise kann das System eine Öffnung aufweisen, die mit einem Deckel verschlossen werden kann.

**[0032]** In diesem System kann eine flüssige Probe, vom Anwender bzw. einer Steuerungseinheit gesteuert, in kompakter, zusammenhängender Form bewegt werden, insbesondere durch Übertragung von einer ersten Kammer zu einer zweiten Kammer. Dem Fachmann sind zahlreiche Wege bekannt, wie dies bewerkstelligt werden kann, beispielsweise mit Hilfe von Druckunterschieden, die über eine Pumpe oder Spritze erzeugt werden. Die Verbindungskanäle können Ventile umfassen, die die Lenkung eines Flüssigkeitsstromes gestatten. Der Abschluss gegenüber der Umgebung verhindert Kontaminationen von außen und den Verlust von Flüssigkeit durch Verdampfen.

**[0033]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird unter dem Begriff "Kammer", wie hierin verwendet, ein Bereich innerhalb der Vorrichtung verstanden, in dem die gesamte flüssige Probe in kompakter, zusammenhängender Form unter im Wesentlichen definierten, gleichförmigen Bedingungen inkubiert werden kann. Eine Kammer kann ein Hohlraum sein, der geometrisch durch seine Form abgegrenzt ist, beispielsweise gegenüber einem Verbindungskanal einen verbreiterten Durchmesser und ein entsprechend größeres Volumen aufweist. Alternativ kann eine Kammer dadurch geschaffen werden, dass die flüssige Probe zusammenhängend einen abgegrenzten Bereich eines Verbindungskanals einnimmt, wobei die Oberfläche der Flüssigkeit gegenüber der sie umgebenden Gasphase die Grenze der Kammer bildet. Die Kammern können abschließbar ausgeführt sein, um ein Entweichen von flüssiger Probe zu verhindern, beispielsweise aus einer Kammer mit hoher Temperatur.

**[0034]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird un-

ter dem Begriff "Laborchip", wie hierin verwendet, ein abgeschlossenes System verstanden, das Kammern und Verbindungskanäle enthält, in denen alle Schritte von der Einbringung einer unprozessierten Probe über deren Vorbereitung und Prozessierung bis hin zur einer Analyse ausgeführt werden können.

**[0035]** Die erfindungsgemäße Vorrichtung weist wenigstens ein Set umfassend eine Denaturierungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer auf, beispielsweise 2, 3, 4, 5, 6, 8 oder 12 Sets.

**[0036]** Die Denaturierungskammer ist so ausgestaltet und weist geeignete Bedingungen auf, dass eine in der flüssigen Probe enthaltene doppelsträngige Nukleinsäure denaturiert werden kann, d. h. die Doppelstränge lösen sich unter Freisetzung entsprechender Einzelstränge. Insbesondere kann die Temperatur auf einen geeigneten Wert eingestellt werden bzw. ist darauf eingestellt, bevorzugt zwischen 90 °C und 105 °C, noch bevorzugter zwischen 90 °C und 99 °C. Dem Fachmann ist es im Rahmen routinemäßiger Berechnungen und Vorversuche möglich, geeignete Bedingungen, insbesondere eine geeignete Temperatur, zur Denaturierung einer gegebenen doppelsträngigen Nukleinsäure zu ermitteln.

**[0037]** Die Annealingkammer ist so ausgestaltet und weist geeignete Bedingungen auf, dass in der flüssigen Probe enthaltene Primer spezifisch an die Einzelstränge der Nukleinsäure in der flüssigen Probe annealen, d. h. spezifisch mit ihnen hybridisieren. Insbesondere kann die Temperatur auf einen geeigneten Wert eingestellt werden bzw. ist darauf eingestellt, bevorzugt zwischen 40 °C und 67 °C. Dem Fachmann ist es im Rahmen routinemäßiger Berechnungen und Vorversuche möglich, geeignete Bedingungen, insbesondere eine geeignete Temperatur, für das Annealen gegebener Primer an die Einzelstränge einer gegebenen Nukleinsäure mit ausreichender Spezifität zu ermitteln.

**[0038]** Die Amplifikationskammer ist so ausgestaltet und weist geeignete Bedingungen auf, dass durch eine anwesende Polymerase die Einzelstränge der Nukleinsäure ausgehend von den annealten Primer zu einem Doppelstrang aufsynthetisiert werden. Im Ergebnis wird der durch die Primer eingegrenzte Teil einer doppelsträngigen Nukleinsäure aus der in die Vorrichtung eingebrachten flüssigen Probe amplifiziert. Dem Fachmann ist es im Rahmen routinemäßiger Berechnungen und Vorversuche möglich, geeignete Bedingungen zu ermitteln. Insbesondere kann die Temperatur auf einen geeigneten Wert eingestellt werden bzw. ist darauf eingestellt, bevorzugt zwischen 60 °C und 80 °C, noch bevorzugter zwischen 65 °C und 74 °C.

**[0039]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Amplifikationskammer der Denaturierungskammer nachgeschaltet. In einer bevorzugten Ausführungsform bedeutet der Begriff, dass eine zweite Kammer einer ersten "nachgeschaltet" ist, wie hierin verwendet, dass eine in die Vorrichtung eingebrachte flüssige Probe, die die Vorrichtung auf kürzest möglichem Wege durchläuft, zuerst die erste Kammer passiert und an-

schließlich die zweite Kammer. Dass eine zweite Kammer einer ersten "direkt nachgeschaltet" ist, bedeutet bevorzugt, dass die Probe dabei aus der ersten Kammer direkt in die zweite Kammer übertragen wird, ohne dazwischen weitere Kammern zu passieren.

**[0040]** Optional weist die erfindungsgemäße Vorrichtung, dem wenigstens ein Set umfassend eine Denaturierungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer vorgeschaltet, bevorzugt direkt vorgeschaltet, eine Mischkammer auf. Die Mischkammer ist so ausgestaltet, dass ein für die Nachweisreaktion geeignetes Volumen der flüssigen Probe daraus in das wenigstens eine Set übertragen werden kann. Sofern die Vorrichtung mehr als ein Set aufweist, gestattet die Mischkammer, dass die flüssige Probe in geeigneter Weise portioniert wird, dass in jedes Set ein Teil der flüssigen Probe mit einem jeweils für die Nachweisreaktion ausreichenden Volumen übertragen wird.

**[0041]** Bevorzugt umfasst die Vorrichtung weiterhin ein analytisches Reagenz. Das analytische Reagenz umfasst alle Stoffe, die für die Durchführung der Nachweisreaktion, bevorzugt der PCR-Reaktion, erforderlich sind, sofern diese nicht ohnehin in der flüssigen Probe vorhanden sind oder ihre Anwesenheit in der flüssigen Probe nachgewiesen werden soll. Beispielsweise umfasst die flüssige Probe die zu amplifizierende Nukleinsäure oder soll darauf untersucht werden, ob sie die zu amplifizierende Nukleinsäure enthält, und das analytische Reagenz umfasst außer einer als Template geeigneten Nukleinsäure alle anderen Stoffe, die für die Durchführung der PCR-Reaktion erforderlich sind.

**[0042]** Das analytische Reagenz liegt bevorzugt in trockener, bevorzugt lyophilisierter Form vor. Es ist derart beschaffen, dass es sich bei Kontakt mit der flüssigen Probe darin auflöst, so dass die für die Nachweisreaktion, bevorzugt die PCR-Reaktion, notwendigen Stoffe in ausreichender Konzentration vorhanden sind. Optional weist die Vorrichtung ein Mittel auf oder es wird ein geeigneter Verfahrensschritt vorgesehen, um das Lösen des analytischen Reagenzes in der Probe zu fördern. Beispielsweise kann die flüssige Probe mehrfach mit dem Reagenz kontaktiert werden, oder das analytische Reagenz wird durch einen Mikrorührer mit der flüssigen Probe vermischt. Das analytische Reagenz umfasst bevorzugt eine Polymerase und/oder reverse Transkriptase, dNTPs, einen Puffer, Magnesiumchlorid, wenigstens einen Primer, bevorzugt wenigstens ein Primerpaar, optional markiert, ein Detergens, bevorzugt aus der Gruppe umfassend Betain, Tween oder Dimethylsulfoxid, sowie ein Polypeptid wie Rinderserumalbumin.

**[0043]** Umfasst das analytische Reagenz mehrere Stoffe, so können diese getrennt voneinander in der Vorrichtung lokalisiert sein. Bevorzugt liegt das analytische Reagenz in einer kompakten Form vor, die alle Stoffe umfasst.

**[0044]** Das analytische Reagenz kann in jedem Teil der Vorrichtung lokalisiert sein, sofern sichergestellt ist, dass es vor Durchführung der Nachweisreaktion mit der

flüssigen Probe in Kontakt kommt und durchmischt wird. Bevorzugt ist es in der Mischkammer lokalisiert.

**[0045]** Weist die erfindungsgemäße Vorrichtung mehrere Sets an Kammern auf und sollen in diesen verschiedene PCR-Reaktionen ablaufen, so müssen für die jeweilige Reaktion spezifische Reagenzien, insbesondere Primer, dem jeweiligen Teil der Probe in dem jeweiligen Set spezifisch zugeführt werden, statt dass das analytische Reagenz in einer kompakten Form alle Stoffe umfasst. Die spezifischen Reagenzien, insbesondere ein oder mehr als ein Primer, können dem für die jeweilige Reaktion bestimmten Teil der Probe zugeführt werden, ohne dass sie mit den Teilen der Probe für die anderen Reaktionen in Kontakt geraten. Zu diesem Zweck kann jedes Set an Kammern wenigstens ein spezifisches Reagenz, insbesondere einen oder mehr als einen Primer, enthalten, das sich in dem Teil der flüssigen Probe löst, der in dieses Set übertragen wird.

**[0046]** Weist die erfindungsgemäße Vorrichtung mehr als ein Set an Kammern auf, so umfasst sie bevorzugt wenigstens eine Heizzone. Dabei handelt es sich um eine Vorrichtung zum durchgehenden Beheizen eines Bereichs auf der Vorrichtung, in dem wenigstens zwei Kammern lokalisiert sind, die auf die gleiche Temperatur eingestellt werden können, bevorzugt eingestellt sind. Umfasst die Vorrichtung beispielsweise zwei Sets, so können beide Denaturierungskammern mit der gleichen Heizzone auf eine Temperatur von 95 °C eingestellt werden.

**[0047]** Umfasst die Vorrichtung wenigstens zwei Sets und wenigstens eine Heizzone, so kann in einer bevorzugten Ausführungsform die Temperatur aller Denaturierungskammern durch eine Heizzone für die Denaturierungskammern eingestellt werden bzw. wird für sie eingestellt, so dass in den Denaturierungskammern die gleiche Temperatur herrscht.

**[0048]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Temperatur aller Amplifikationskammern durch eine Heizzone für die Amplifikationskammern eingestellt werden bzw. wird für sie eingestellt, so dass in den Amplifikationskammern die gleiche Temperatur herrscht. Alternativ können die die Temperaturen der jeweiligen Annealingkammern einzeln eingestellt werden.

**[0049]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Temperatur aller Annealingkammern durch eine Heizzone für die Annealingkammern eingestellt werden bzw. wird für sie eingestellt, so dass in den Annealingkammern die gleiche Temperatur herrscht.

**[0050]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Temperatur aller Denaturierungskammern und aller Amplifikationskammern durch eine Heizzone für alle Denaturierungskammern bzw. durch eine Heizzone für alle Amplifikationskammern eingestellt werden bzw. wird für sie eingestellt, so dass in allen Denaturierungskammern die gleiche Temperatur herrscht und so dass in allen Amplifikationskammern die gleiche Temperatur herrscht.

**[0051]** Alternativ können die die Temperaturen der je-

weiligen Annealingkammern und/oder Denaturierungskammern einzeln eingestellt werden.

**[0052]** In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann die Temperatur aller Denaturierungskammern, aller Amplifikationskammern und aller Annealingkammern durch eine Heizzone für alle Denaturierungskammern bzw. durch eine Heizzone für alle Amplifikationskammern bzw. durch eine Heizzone für alle Annealingkammern eingestellt werden bzw. wird für sie eingestellt, so dass in allen Denaturierungskammern die gleiche Temperatur herrscht, in allen Amplifikationskammern die gleiche Temperatur herrscht und in allen Annealingkammern die gleiche Temperatur herrscht.

**[0053]** In einer bevorzugten Ausführungsform ist die analytische Vorrichtung ein Einwegartikel, der nach dem Gebrauch in seiner Gesamtheit verworfen wird. Der Einwegartikel ist an eine mehrfach, mit jeweils einem neuen Einwegartikel zu benutzende Analyseeinheit derart angepasst, dass letztere wenigstens eine Heizvorrichtung aufweist, mit der in der Denaturierungskammer, Amplifikationskammer und Annealingkammer und/oder in der Heizzone für die Denaturierungskammern, Amplifikationskammer bzw. Annealingkammern die erforderliche Temperatur eingestellt werden kann bzw. eingestellt ist.

**[0054]** Bevorzugt enthält die Analyseeinheit ein Mittel zum Auslesen einer flüssigen Probe, die sich in der Auslesekommer der analytischen Vorrichtung befindet, welche wiederum in die Analyseeinheit eingebracht wurde. Dabei kann es sich um ein Fluoreszenzspektroskop handeln, wenn die amplifizierte Nukleinsäure Fluoreszenzlabel enthält oder um ein UV/vis-Spektrophotometer, wenn sie ein Chromophor enthält. Die Analyseeinheit kann darüber hinaus weitere Einheiten umfassen, beispielsweise zum internen Transport von in die Analyseeinheit eingebrachten Einwegartikeln sowie zur Verarbeitung von Daten, die bei der Analyse einer flüssigen Probe in einem Einwegartikel erhalten werden.

**[0055]** Das erfindungsgemäße Verfahren ist bevorzugt ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäuresequenz, noch bevorzugter ein diagnostisches Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäuresequenz. Bei der Nukleinsäuresequenz kann es sich um eine humane Sequenz oder die Sequenz eines Pathogens handeln.

**[0056]** Das Verfahren erfordert das Einbringen einer flüssigen Probe in die Vorrichtung. Optional wird die Probe zunächst in die offene Aufnahmekammer eingebracht. Sofern es sich um eine nicht flüssige Probe handelt, kann diese zunächst in eine flüssige Phase überführt werden. Es besteht auch die Möglichkeit, die Probe bereits in der Aufnahmekammer oder zuvor mit analytischem Reagenz zu vermischen. Anschließend kann der Zugang der Aufnahmekammer zur Oberfläche der Vorrichtung verschlossen werden.

**[0057]** Danach wird die flüssige Probe in die Denaturierungskammer übertragen, optional kann sie zuvor in einer Mischkammer mit analytischem Reagenz kontaktiert und/oder für die Übertragung in mehrere Sets an Kammern portioniert werden. In der Denaturierungskam-

mer wird die Denaturierung durchgeführt (Schritt a). Anschließend wird die flüssige Probe aus Schritt a) in die Annealingkammer übertragen, und es wird darin das Annealing durchgeführt (Schritt b). Anschließend wird die flüssige Probe aus Schritt b) in die Amplifikationskammer übertragen, und es wird die Amplifikation durchgeführt (Schritt c).

**[0058]** In einer bevorzugten Ausführungsform wird der Reaktionszyklus umfassend die Schritte a), b) und c) wiederholt. Insgesamt werden bevorzugt wenigstens 5, 10, 15, 20, 30, 40 oder 45 Reaktionszyklen durchgeführt.

**[0059]** Schließlich wird die flüssige Probe, bevorzugt aus dem zuletzt durchgeführten Schritt c), in die Auslesekommer übertragen und dort ausgelesen. Nach dem Auslesen kann sie durch Übertragen in die Abfallkammer verworfen werden. Sofern wenigstens zwei Nachweisreaktionen in wenigstens zwei Sets Kammern durchgeführt werden, werden diese bevorzugt zeitgleich oder wenigstens zeitüberlappend durchgeführt, um die Gesamtdauer des Verfahrens zu minimieren. Die Teile der flüssigen Probe aus diesen wenigstens zwei Nachweisreaktionen werden anschließend nacheinander in die Auslesekommer übertragen und dort ausgelesen und anschließend durch Übertragen in die Abfallkammer verworfen, wenigstens alle Teile der flüssigen Probe bis auf den letzten Teil, der in der Auslesekommer verbleiben kann.

**[0060]** Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann zwei oder mehr Auslesekammern enthalten. Dabei können Teile der flüssigen Probe aus unterschiedlichen Sets jeweils umfassend eine Denaturierungskammer (5), eine Amplifikationskammer (6) und eine Annealingkammer (7) in unterschiedlichen Auslesekammern analysiert werden, beispielsweise mit Mikroarrays, die sich durch die darin enthaltenen Sonden und/oder Primer unterscheiden. Alternativ kann eine Probe oder ein Teil einer Probe in verschiedenen Auslesekammern analysiert werden.

**[0061]** Im Folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Figuren anhand von Ausführungsbeispielen erläutert. Die beschriebenen Ausführungsformen sind in jeder Hinsicht lediglich beispielhaft und nicht als einschränkend zu verstehen, und verschiedene Kombinationen der angeführten Merkmale sind vom Umfang der Erfindung umfasst.

**[0062]** Fig. 1 zeigt eine bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen analytischen Vorrichtung (1). Diese weist eine mit einem Deckel (13) verschließbare Aufnahmekammer (2) auf, in die eine Probe eingebracht werden kann. Aus der Aufnahmekammer kann die Probe in flüssiger Form in eine Mischkammer (3) überführt werden.

**[0063]** Bei ihrer Ankunft kommt sie in der Mischkammer mit einem analytischem Reagenz (4) in Kontakt, das sich dabei in der flüssigen Probe auflöst. Das analytische Reagenz weist bevorzugt alle für eine PCR-Reaktion erforderlichen Reagenzien bis auf die zu amplifizierende Nukleinsäure auf, so dass - vorausgesetzt, dass die Probe die Nukleinsäure enthält - nach dem Auflösen alle für die Reaktion erforderlichen Reagenzien anwesend sind.

**[0064]** Anschließend kann die flüssige Probe aufgeteilt werden, und jeweils ein Teil gelangt in eine Denaturierungskammer (5), die jeweils ein Teil eines Sets umfassend eine Denaturierungskammer (5), eine Amplifikationskammer (6) und eine Annealingkammer (7) ist. Sämtliche Denaturierungskammern sind in einer Heizzone für die Denaturierungskammern (8) angeordnet, analog sämtliche Amplifikationskammern und sämtliche Annealingkammern in der Heizzone für die Amplifikationskammern (9) bzw. Heizzone für die Annealingkammern (10). Die unterschiedlichen Sets können für unterschiedliche Nachweisreaktionen spezifische Reagenzien enthalten. Beispielsweise kann ein erstes Set ein erstes Primerpaar enthalten und ein zweites Set ein anderes zweites Primerpaar. Für alle Reaktionen benötigte unspezifische Reagenzien können der Probe zuvor zugeführt werden, beispielsweise in der Mischkammer (3).

**[0065]** In der Folge kann eine PCR-Reaktion in der Weise ausgeführt werden, dass die flüssige Probe zunächst bei geeigneten Bedingungen in die Denaturierungskammer eingebracht wird, dort anwesend ist und sich Nukleinsäure-Doppelstränge lösen und Einzelstränge freigesetzt werden. Anschließend wird die Probe umfassend die Einzelstränge in die Annealingkammer übertragen und ist dort unter Bedingungen anwesend, die das Annealen der Primer an die Einzelstränge gestatten. Anschließend wird die flüssige Probe mit Einzelsträngen und daran annealten Primern in die Amplifikationskammer übertragen und ist dort unter Bedingungen anwesend, die ausgehend von den Primern das Amplifizieren, d.h. die Synthese neuer Einzelstränge gestatten, die zu den vorhandenen Einzelsträngen komplementär sind. Anschließend kann die Probe für den Beginn eines neuen Amplifizierungszyklus umfassend die Schritte a), b) und c) erneut in die Denaturierungskammer übertragen werden.

**[0066]** Ist eine ausreichende Zahl von Amplifizierungszyklen abgelaufen, so kann der Teil der Probe, der in einem der Sets umfassend eine Denaturierungskammer (5), eine Amplifikationskammer (6) und eine Annealingkammer (7) enthalten war, in die Auslese- kammer (11) übertragen werden. Dort erfolgt eine geeignete Nachweisreaktion, beispielsweise eine Fluoreszenzmessung, mit der Nukleinsäurestränge nachgewiesen werden können, die wenigstens einen fluoreszenzmarkierten Primer enthalten und sich auf diese Weise von Nukleinsäuren unterscheiden, die bereits in der ursprünglich in die Vorrichtung eingebrachten Probe enthalten waren.

**[0067]** Nach Ablauf der Nachweisreaktion kann der in der Auslese- kammer enthaltene Teil der Probe durch Übertragen in die Abfallkammer (12) verworfen werden. Die Auslese- kammer ist damit leer und steht bereit dafür, dass ein Teil der Probe aus einem anderen Set in sie übertragen und mit einer Nachweisreaktion untersucht werden kann. Auf diese Weise können in der gleichen Auslese- kammer mehrere Teile der flüssigen Probe untersucht werden.

**[0068]** Fig. 2 zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen analytischen Vorrichtung (1). Sie unterscheidet sich von der in Fig. 1

bezeigten Vorrichtung insbesondere dadurch, dass sie einen ringförmigen Kanal enthält, in dem die Denaturierungskammer, Amplifikationskammer und Annealingkammer nicht in Form von geometrische abgegrenzten Kammern bereitgestellt werden, sondern dadurch, dass die flüssige Probe (14) in Form eines kompakten, zusammenhängenden Tropfens entlang des Ringes in die Heizzone der Denaturierungskammer, Amplifikationskammer bzw. Annealingkammer (8, 9 bzw. 10) übertragen wird. Zusammen mit den Wänden des ringförmigen Kanals bilden die Grenzflächen dieses Tropfens die Grenzen der Kammer aus, beispielsweise, wie hier abgebildet, die Denaturierungskammer (5).

**[0069]** In einer bevorzugten Ausführungsform können mehrere ringförmige Kanäle senkrecht zur Papierebene übereinander angeordnet sein; die Heizzonen verlaufen dann bevorzugt ebenfalls senkrecht zur Papierebene, so dass jeweils eine der Heizzonen mehrere ringförmige Kanäle jeweils an der entsprechenden Stelle auf die für die Denaturierungskammer, Amplifikationskammer bzw. Annealingkammer gewünschte Temperatur heizen kann bzw. heizt.

**[0070]** Bei dieser bevorzugten Ausführungsform verlässt die flüssige Probe während der PCR-Reaktion niemals den ringförmigen Kanal. Sie wird an die jeweils gerade benötigte Stelle des ringförmigen Kanals übertragen, an der die für den auszuführenden Schritt a), b) oder c) geeignete Temperatur herrscht. Auf diese Weise muss kein Flaschenhals, d. h. eine besonders enge Stelle, durchlaufen werden und die Geschwindigkeit der Übertragung der Probe zwischen den unterschiedlichen Kammern kann maximiert werden.

Bezugszeichenliste:

#### **[0071]**

- |    |  |
|----|--|
| 1  | Analytische Vorrichtung                |
| 2  | Aufnahmekammer                         |
| 3  | Mischkammer                            |
| 4  | Analytisches Reagenz                   |
| 5  | Denaturierungskammer                   |
| 6  | Amplifikationskammer                   |
| 7  | Annealingkammer                        |
| 8  | Heizzone für die Denaturierungskammern |
| 9  | Heizzone für die Amplifikationskammern |
| 10 | Heizzone für die Annealingkammern      |
| 11 | Auslese- kammer                        |
| 12 | Abfallkammer                           |
| 13 | Deckel                                 |
| 14 | Flüssige Probe                         |

#### **Patentansprüche**

1. Analytische Vorrichtung umfassend eine Denaturie-

- rungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer,  
wobei die Temperatur der Denaturierungskammer auf eine Temperatur zwischen 90 °C und 105°C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist, wobei die Temperatur der Amplifikationskammer auf eine Temperatur zwischen 60 °C und 80 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist, wobei die Temperatur der Annealingkammer auf eine Temperatur zwischen 40 °C und 67 °C eingestellt werden kann, bevorzugt eingestellt ist, und wobei die Vorrichtung so ausgestaltet ist, dass eine flüssige Probe in die Denaturierungskammer eingebracht werden kann und zwischen der Denaturierungskammer, der Amplifikationskammer, der Annealingkammer und optional weiteren Kammern hin und her übertragen werden kann.
2. Analytische Vorrichtung gemäß Anspruch 1, weiter umfassend eine Aufnahmekammer mit einem Zugang zur Oberfläche der diagnostischen Vorrichtung, über den eine Probe in die Aufnahmekammer eingebracht werden und anschließend zu weiteren Kammern übertragen werden kann.
  3. Analytische Vorrichtung gemäß Anspruch 2, wobei die Amplifikationskammer der Denaturierungskammer nachgeschaltet ist und die Annealingkammer der Amplifikationskammer.
  4. Analytische Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Amplifikationskammer direkt der Denaturierungskammer nachgeschaltet ist und die Annealingkammer direkt der Amplifikationskammer.
  5. Analytische Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, weiter umfassend ein analytisches Reagenz, das in der flüssigen Probe löslich ist, bevorzugt ein lyophilisiertes Reagenz.
  6. Analytische Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Aufnahmekammer nachgeschaltet und der Denaturierungskammer vorgeschaltet, bevorzugt direkt vorgeschaltet, eine Mischkammer vorgesehen ist, die bevorzugterweise das analytische Reagenz aufweist.
  7. Analytische Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die diagnostische Vorrichtung wenigstens zwei Sets von Kammern umfasst, jeweils umfassend eine Denaturierungskammer, eine Amplifikationskammer und eine Annealingkammer, und wobei bevorzugt der Aufnahmekammer nachgeschaltet und der Denaturierungskammer vorgeschaltet, besonders bevorzugt direkt vorgeschaltet, eine Mischkammer vorgesehen ist, die bevorzugterweise das analytische Reagenz aufweist, und aus der Mischkammer jeweils ein Teil einer flüssigen Probe in eine Kammer des jeweiligen Sets übertragen werden kann.
8. Analytische Vorrichtung nach Anspruch 7, wobei die analytische Vorrichtung wenigstens eine Heizzone aufweist, wobei die Denaturierungskammer, bevorzugt zusätzlich die Amplifikationskammern, noch bevorzugter zusätzlich die Annealingkammern der wenigstens zwei Sets jeweils auf einer Heizzone angeordnet sind.
  9. Analytische Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Vorrichtung eine Auslesekammer aufweist, in die die flüssige Probe aus der Denaturierungskammer, aus der Amplifikationskammer oder der Annealingkammer übertragen werden kann.
  10. Analytische Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei die Auslesekammer wenigstens eine immobilisierte Nukleinsäure umfasst.
  11. Analytische Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei es sich bei der diagnostischen Vorrichtung um einen Laborchip handelt.
  12. Analyseeinheit geeignet zur Aufnahme der analytischen Vorrichtung, bevorzugt umfassend die analytische Vorrichtung, nach einem der Ansprüche 1 bis 11, umfassend eine Heizvorrichtung, die so beschaffen ist, dass in der Denaturierungskammer, Amplifikationskammer und Annealingkammer und/oder in der Heizzone für die Denaturierungskammern, Amplifikationskammer bzw. Annealingkammern die erforderliche Temperatur eingestellt werden kann bzw. eingestellt ist und/oder umfassend ein Mittel zum Auslesen einer flüssigen Probe in der Auslesekammer der analytischen Vorrichtung.
  13. Verwendung der analytischen Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Untersuchung einer flüssigen Probe mittels Polymerase-Kettenreaktion.
  14. Verfahren umfassend die Schritte:
    - a) Einbringen einer flüssigen Probe in die Denaturierungskammer der analytischen Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, anschließend Denaturieren der Probe,
    - b) Übertragen der flüssigen Probe aus Schritt a) in die Annealingkammer, anschließend Annealing,
    - c) Übertragen der flüssigen Probe aus Schritt b) in die Amplifikationskammer, anschließend Amplifizieren,

- d) optional Wiederholen der Schritte a), b) und c),
- e) optional: Übertragen der flüssigen Probe aus Schritt c) oder d) in die Auslesekammer, anschließend Auslesen der flüssigen Probe.

5

- 15.** Analytische Vorrichtung, Verwendung oder Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, umfassend eine flüssige Probe, bevorzugt eine nukleinsäurehaltige flüssige Probe oder eine Probe, die darauf zu untersuchen ist, ob sie eine Nukleinsäure enthält.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

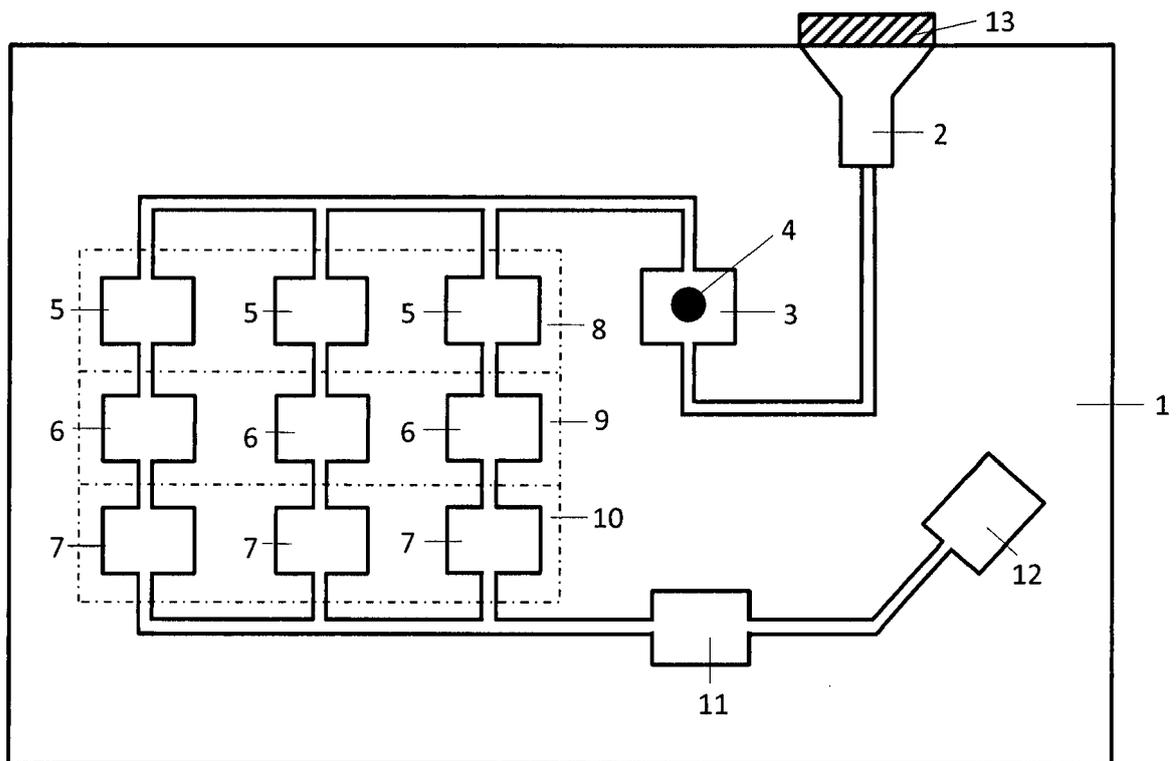


Fig. 1

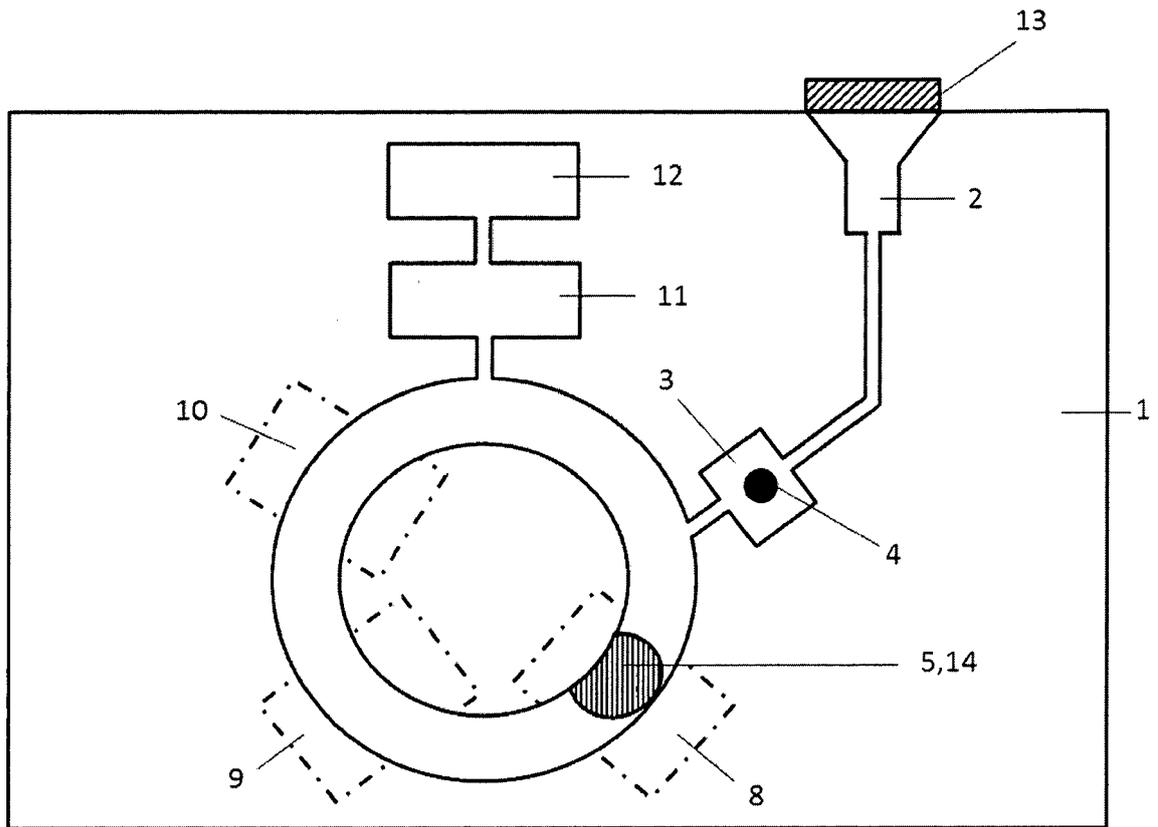


Fig. 2



EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung  
EP 15 00 3599

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X,D	EP 1 769 848 A2 (YOKOGAWA ELECTRIC CORP [JP]) 4. April 2007 (2007-04-04) * Absätze [0078], [0094], [0106] - [0108]; Abbildungen 5A, 5B *	1-15	INV. B01L7/00 B01L3/00
X	DE 10 2014 200509 A1 (BOSCH GMBH ROBERT [DE]) 16. Juli 2015 (2015-07-16) * Absätze [0077] - [0078]; Abbildung 3 *	1,3-5,8,11,12	
A	WO 02/081729 A2 (CALIFORNIA INST OF TECHN [US]; ENZELBERGER MARKUS M [DE]; HANSEN CARL) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) * Absatz [0022] *	10	
A	US 2014/051159 A1 (BERGSTEDT STEVEN W [US] ET AL) 20. Februar 2014 (2014-02-20) * Abbildung 9 *	1-15	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			B01L
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort <b>Den Haag</b>		Abschlußdatum der Recherche <b>26. Mai 2016</b>	Prüfer <b>Campbell, Paul</b>
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument ..... & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT  
 ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 15 00 3599

5 In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am  
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

26-05-2016

10	Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
	EP 1769848	A2	04-04-2007	CN 1940559	A	04-04-2007
				EP 1769848	A2	04-04-2007
				EP 1897616	A1	12-03-2008
15				EP 1900431	A1	19-03-2008
				JP 4830432	B2	07-12-2011
				JP 2007101200	A	19-04-2007
				US 2007077170	A1	05-04-2007
	-----					
20	DE 102014200509	A1	16-07-2015	DE 102014200509	A1	16-07-2015
				WO 2015106858	A1	23-07-2015
	-----					
	WO 02081729	A2	17-10-2002	AU 2002307152	A1	21-10-2002
				EP 1384022	A2	28-01-2004
25				US 2003008308	A1	09-01-2003
				US 2005221373	A1	06-10-2005
				US 2012009663	A1	12-01-2012
				US 2014141498	A1	22-05-2014
				WO 02081729	A2	17-10-2002
	-----					
30	US 2014051159	A1	20-02-2014	US 2014051159	A1	20-02-2014
				US 2014051161	A1	20-02-2014
	-----					
35						
40						
45						
50						
55						

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE**

*Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.*

**In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente**

- EP 15002317 A [0029]