


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

(51) Internationale Patentklassifikation 4 : G01N 33/53, 33/566, 33/567		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 88/ 02861
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. April 1988 (21.04.88)
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/CH87/00122	(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK, FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), US.	
(22) Internationales Anmeldedatum:	24. September 1987 (24.09.87)	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	
(31) Prioritätsaktenzeichen:	4079/86-7		
(32) Prioritätsdatum:	13. Oktober 1986 (13.10.86)		
(33) Prioritätsland:	CH		
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):	ANAWA LABORATORIEN AG [CH/CH]; Unterdorfstrasse 23, CH-8602 Wangen (CH).		
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) :	BUERGISSER, Ernst [CH/CH]; Unterdorfstrasse 23, CH-8602 Wangen (CH).		
(74) Anwalt:	FREI PATENTANWALTSBÜRO; Hedwigs-teig 6, Postfach 95, CH-8029 Zürich (CH).		
(54) Title: PROCESS FOR MANUFACTURING A RECEPTOR PREPARATION FOR A RADIO-RECEPTOR ASSAY AND KIT-ORIENTED RADIO-RECEPTOR ASSAY IN ACCORDANCE WITH THE PROCESS			
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER REZEPTORPRÄPARATION FÜR EINEN RADIO-REZEPTOR-ASSAY UND KITGERECHTER RADIOREZEPTOR-ASSAY GEMÄSS VERFHREN			
(57) Abstract			
<p>Process enabling the production of a receptor preparation from a biologically active receptor material, in which a plasma membrane preparation is lyophilized with the addition of sugars and/or amino acids and/or proteins. On the basis of this, it is possible to produce a radio-receptor assay containing the co-lyophilisate of plasma membrane together with sugar compounds and/or amino acids and/or proteins and of a tracer substance and a control substance. A kit designed for the assay provides the substances in a plurality of test receptacles containing a suitable co-lyophilisate for said assay.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Mit dem Verfahren wird eine Rezeptorpräparation aus biologisch aktivem Rezeptormaterial hergestellt, in dem eine Plasmamembranpräparation unter Zusatz von Zuckern und/oder Aminosäuren und/oder Proteinen lyophilisiert wird. Daraus kann ein Radiorezeptor-Assay hergestellt werden, enthaltend das Co-Lyophilisat von Plasmamembran zusammen mit Zuckerverbindungen und/oder Aminosäuren und/oder Proteinen und von einer Tracersubstanz und von einer Vergleichsstandardsubstanz. Ein Radiorezeptorassay-Kit verwendet den Radiorezeptor-Assay durch Bereitstellung der Substanzen in einer Mehrzahl von Testbehältern enthaltend ein für den Assay geeignetes Co-Lyophilisat.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

- 1 -

VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER REZEPTORPRAEPARATION FUER EINEN RADIOREZEPTOR-ASSAY UND KITGERECHTER RADIOREZEPTOR-ASSAY GEMAESS VERFAHREN.

Die Erfindung liegt auf dem Gebiet der biochemischen Analysemethoden und betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer stabilen Rezeptorpräparation fuer einen stabilen (Mehrkomponenten-) Radiorezeptor-Assay und den mit diesem Verfahren erzielten Radiorezeptor-Assay, dessen Kit und die Verwendung des Kits bzw. des Assays.

Gleich wie bei einem Radioimmunoassay beruht das Prinzip des Radiorezeptorassays auf der biospezifischen Erkennung eines (für den Assay gezielt eingesetzten) Liganden, bspw. ein Hormon, ein Pharmakon, ein Neurotransmitter etc., an das entsprechende Ziel- oder Empfänger-molekül, bspw. ein Antikörper beim Radioimmunoassay oder ein Rezeptor beim Radiorezeptor-Assay. Durch die radioaktive Markierung eines solchen gezielt eingesetzten Liganden, erhält man ein beobachtbares Molekül, den sogenannten Tracer, welcher in kompetitiver Wechselwirkung mit nicht markierten Liganden und damit den gleichartigen aber nicht beobachtbaren Molekülen steht. Durch solche Massnahmen erhält man ein Testsystem, welches die Messung einer unbekanntem Konzentration eines solchen Liganden erlaubt.

ERSATZBLATT

- 2 -

Während der Radioimmunoassay zu einer vielverwendeten Routinemethode geworden ist und heute zu den in grossem Massstab verwendeten Analysemethoden gehört, wurde dagegen der Radiorezeptor-Assay für diesen Zweck nur selten benutzt.

Dies liegt nicht zuletzt daran, dass die Handhabung von biologisch aktiven Rezeptoren um einiges heikler ist, als bei einem Antikörper. Die Voraussetzung für eine Routinemethode ist neben der verhältnismässig einfachen Handhabung (Einfachheit der Methode) und der damit einhergehenden Wirtschaftlichkeit vor allen Dingen die "Stabilität" der chemischen oder biologischen Reaktionspartner. Damit ist die Stabilität der Analysesubstanz an sich und ihre Stabilität innerhalb der Analysenreaktion im besonderen gemeint.

Biologisch aktive Rezeptoren sind jedoch in Lösung instabil und müssen daher eingefroren (fest) sein bis kurz vor den analytischen Einsatz. Dazu kommt, dass sie derart instabil sind, dass auch ein kurzer Ausfall dieser Bedingung den Rezeptor unbrauchbar machen kann. Es liegt wohl auf der Hand, dass solche sensiblen Eigenschaften geeignet sind, einem an und für sich brauchbaren Analysemechanismus den Einzug unter die Routinemethoden zu verwehren.

Es ist daher das Ziel der Erfindung, einen Weg anzugeben, um diese empfindlichen Substanzen einer einfachen Routinemethode zu zuführen, welche Methode einfachst ausführbar ist, wobei die bisher verwendeten Massnahmen wie Einfrieren etc. mit all den Umständlichkeiten, Nachteilen und Risiken vermieden werden sollen.

ERSATZBLATT

- 3 -

Dieses Ziel wird erreicht, durch das in den Patentansprüchen angegebene Herstellungsverfahren für einen Radiorezeptor-Assay und ein mit diesem Verfahren hergestellter Radiorezeptor-Assay zum unmittelbaren Analyseeinsatz.

Erreicht soll werden, dass sich alle oder möglichst viele Reaktionspartner zusammen in einem gemeinsamen Gefäss befinden können und die Ingangsetzung der Bindungsreaktion mit möglichst einem einzigen Pipettierschritt durchgeführt wird, wobei ausser dem zu analysierenden Material alle Reaktionspartner in stabiler Form bspw. in einem Teströhrchen zur Verfügung stehen. Herkömmliche analoge Verfahren benötigen in der Regel 3 bis 4 Pipettierschritte, sodass der durch die Erfindung ermöglichte Einmalvorgang einen ökonomisch (bezgl. Geschwindigkeit der Testdurchführung, Präzision und Arbeitsaufwand) erheblichen Fortschritt in dieser Art Analysetechnik darstellt. Ausserdem kann durch die Erfindung ein Testkit geschaffen werden, der ohne Einbusse an Qualität bei Umgebungs- oder Kühschranktemperatur (kein Einfrieren) gelagert werden kann, was u.a. besonders beim Transport von Wichtigkeit ist, da das bis anhin benötigte Trockeneis für den Transport entfällt.

Das nachfolgend geschilderte Verfahren zur Herstellung eines stabilen Radiorezeptor-Assays, beschreibt das Vorgehen zur Erzielung einer getrockneten, stabilen Form desselben.

Die Präparation von rezeptorhaltigen Plasmamembranen wird gemäss den in der Fachliteratur angegebenen Methoden durchgeführt, zum Beispiel gemäss Angaben E.Bürgisser et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., Bd. 133, p.1201-1209, 1985. Dies beinhaltet die Gewinnung von geeignetem Gewebematerial

- 4 -

oder Zellen, z.B. Blutzellen oder Zellkulturen. Danach erfolgt ein Zellaufschluss mittels Homogenisation, Ultraschall oder einer anderen geeigneten Vorgehensart, mit anschließender Trennung von cytoplasmatischen (löslichen) Bestandteilen, sowie eine Separierung von gröberen Partikeln, bspw. durch zentrifugieren, filtrieren etc.. Die somit gewonnene Plasmamembranpräparation kann nun in einem Radiorezeptor-Assay verwendet werden.

Bis anhin wurde diese Präparation gleich für den Gebrauch in einem Assay hergestellt oder sie wurde tiefgefroren und im tiefgefrorenen Zustand bis zum Gebrauch aufbewahrt. Hier setzt nun das erfinderische Abweichen vom üblichen Vorgehen ein.

An Stelle einer Haltbarmachung durch Tiefrieren wird die Präparation lyophilisiert, also gefriergetrocknet. Dieser Schritt führt jedoch nur dann zum Ziel, nämlich zur Erhaltung der biologischen Aktivität der Rezeptoren (das Erhalten ihrer Bindungsfähigkeit) in einem stabilen und wenig sensiblen Endprodukt, das nach beliebiger Zeitdauer eingesetzt werden kann, wenn der Membranpräparation geeignete Zusatzstoffe beigegeben werden. Eine Gefrier Trocknung an und für sich führt nicht zum Gelingen, d.h., zu einem brauchbaren biologisch aktiven Analyseprodukt.

Diese Zusatzstoffe sollen folgende Eigenschaften aufweisen:

1. Sie sollen chemisch und biochemisch inert sein, damit ist gemeint, dass sie keine Reaktionspartner des Testsystems sind und dieses nicht beeinflussen sollen.

- 5 -

2. Sie sollen eine möglichst geringe bis gar keine Hygro-
skopizität aufweisen.
3. Sie sollen in den für den Assay verwendeten Lösungsmit-
teln, also in den Lösungsmitteln, die zur Auflösung des
lyophilisierten Präparats verwendet werden, ebenfalls
lösbar sein.
4. Fakultativ sollen sie ferner bewirken, dass das Lyo-
philisat eine eher voluminöse und kompakte Masseform
annimmt, welche, so sie direkt im Testgefäss lyophili-
siert wird, auch bei grösserer mechanischer Einwirkung
(Schütteln beim Postversand) fest mit der Gefässwand
verbunden bleibt.

Solche Substanzen sind:

Zuckerverbindungen und deren Derivate, vorzugsweise
Monosaccharide, wie Mannit, Glucose, Fructose, und wei-
tere Aldosen und Ketosen, sowie Disaccharide wie Lac-
tose, Saccharose, sowie schwach reaktive Aminosäuren wie
Glycin etc. und/oder zusätzlich Albumine, vorzugsweise
bovines Serumalbumin. Ferner lösliche Polysaccharide und
Kollagene, bspw. Gelatine.

Beispiel 1: Eine für die Lyophilisation von Plasmamembranen
geeignete wässrige Lösung besteht bspw. aus

-- Tris-Puffer	50 mM, pH 7.6
-- Bovines Serumalbumin	0.5%
-- d-Mannit	2%
-- Stabilisatoren	Anteil gemäss System

- 6 -

Die einzusetzenden Stabilisatoren sind hauptsächlich in Flüssigphase nötig, dies betrifft den Zustand der Präparation vor der Lyophilisierung und während der Inkubation in der Analyse. Bei Substanzen mit leichter Hygroskopizität besteht die Gefahr einer vorzeitigen partiellen Reaktion und/oder Degeneration im Lyophilisat. Die Stabilisatoren sind bspw. Proteaseninhibitoren, bspw. Aprotinin (Trasylol), Leupeptin etc. sowie Antioxydantien, bspw. Dithiothreitol (DTT) etc. Bakteriostatika, bspw. Natriumazid, Thimerosal und auch Komplexe, bspw. EDTA, EGTA. Ihr Einsatz hängt sehr stark vom jeweiligen Assay-System ab, das präpariert wird und sollte für jedes einzelne Testsystem evaluiert und optimiert werden. Die Kriterien dafür, entsprechen der üblichen Stabilisierung von biologisch aktiven Komponenten, wie sie in den herkömmlichen Verfahren bereits benutzt werden.

Beispiel 2:

-- Phosphatpuffer	50 mM, pH 7.4
-- Humanes Serumalbumin	0.2%
-- Lactose	5%
-- Glycerin	0.5
-- Natriumazid (Stabilisator)	0.01%

Beispiel 3:

-- HEPES-Puffer	20 mM, pH 7.4
-- Gelatine	1%
-- Glycin	2%
-- Komplexon III (EDTA)	2 mM

Eine aus dem oben angegebenen Verfahren abgeleitete Variante ist folgende. Die Vereinfachung des Assays liegt in der

- 7 -

Anwendung mittels eines möglichst einzigen (Pipettier-) Schrittes, bspw. das Umsetzen des Lyophilisats in flüssige reaktionsfähige Form. Besteht ein Kit aus mehreren Reaktionspartnern, so können durch Co-Lyophilisieren diese Reaktionsteilnehmer miteinbezogen werden. Die trockene Mischung wird dann mit der zu bestimmenden Probe aufgelöst und damit die Reaktion in Gang gesetzt. Vorteilhafterweise wird die Zusammensetzung in einem Teströhrchen oder Nöpfchen von Mikrottestplatten in richtiger Menge und Zusammensetzung lyophilisiert.

Um eine ungewollte Vorinkubation bei der Herstellung des Lyophilisats zu vermeiden, können die einzelnen Komponenten sequentiell im Reaktionsgefäss eingebracht werden. Dies geschieht bspw. folgendermassen: Jede im Assay reaktive Komponente wird sequentiell im Testbehälter tiefgefroren, um eine Durchmischung in flüssiger Phase zu vermeiden. Vorteilhafterweise wird zwischen zwei reaktive Komponenten eine nichtreaktive Trennschicht gleichermaßen eingeführt. Solche Trennschichten bestehen bspw. aus der in Beispiel 1 beschriebenen Lösung oder Puffersubstanz. Diese Zugaben erfolgen direkt in den Testbehälter, welche den aliquotierten Assay enthalten soll und dem Anwender zum direkten Verbrauch zur Verfügung gestellt wird. Das nachfolgende Lyophilisieren geschieht natürlich auch in diesen Testbehältern, welche anschliessend adäquat verpackt werden.

Eine solche zur Co-Lyophilisierung vorbereitete Mischung besteht aus folgenden Teilen,

Beispiel 4: (Co-Lyophilisat qualitativ)

- Plasmamembranpräparation
- Tracersubstanz

ERSATZBLATT

- 8 -

- evtl. ein Standard
- evtl. Stabilisatoren und/oder Modulatoren
- evtl. Farbstoffe zur visuellen Unterscheidung von verschiedenartig präparierten Tests.
- Lyophilisationsmedium gemäss Beispiel 1 oder Beispiel 2.

Die Modulatoren beeinflussen die Bindungseigenschaften von Liganden an die Rezeptoren. Dafür werden die adäquaten Substanzen für jeden Assay jeweils ausgewählt. So verbessert bspw. die Substanz Amiloride die Bindungsaffinität von ANF an den Plasmamembranrezeptor aus bovinen Nebennierenrinde (Lit. A.DeLean, Lif.sei. 39,1109-1116,1986).

Beispiel 5: (Co-Lyophilisat quantitativ)

- Plasmamembran aus Rindernebennierenrinde 10mg/Test biologische Ausgangsmasse.
- Tracer: Jod-125 markiertes ANF, ANP (Atrial Natriuretic Factor, Peptide) 20'000 cpm
- Standard ANF (Verdünnungsreihe, nur in einem Teil des Testkits, bspw. 16 von 96 Nöpfchen einer Mikrottestplatte.
- Phenanthrolin (Stabilisator) 1 mM
- Farbstoff für die Markierung der Standardreihe: Evans Blue (Konzentration gemäss gewünschter Intensität)

Die einzelnen Komponenten werden vorzugsweise im Lyophilisationsmedium (50 mM Tris-Puffer, pH 7.6, 0.5% BSA, 2% Mannit) gelöst und wie oben beschrieben sequentiell eingefroren.

- 9 -

Die Lyophilisierung wird gemäss bekannten Verfahren ausgeführt, dabei ist darauf zu achten:

-- dass sich die eingefrorenen Komponenten auch nicht kurzfristig verflüssigen können;

-- dass die Lyophilisation komplett ist und keine Restfeuchtigkeit zurückbleibt;

-- der Testbehälter, Röhrchen, Mikrottestplatten werden gleich, nachdem sie aus dem Lyophilisator entnommen werden gegen den Zutritt von Feuchtigkeit abgeschlossen. Vorzugsweise wird der Testbehälterinhalt mit einem trockenen Inertgas z.B. Stickstoff oder Argon gefüllt.

Ein gemäss erfinderischem Verfahren hergestellter Radio-rezeptor-Assay zeichnet sich durch folgende Grundzusammensetzung aus:

Die rezeptorhaltige Plasmamembranpräparation liegt in lyophilisierter Form vor, wobei die vorgängig zugefügten Trägersubstanzen (Zusatzstoffe) dafür sorgen, dass das Trockengemisch nach erfolgter Rekonstitution im Assaypuffer sofort und ohne mechanische Einflussnahme (Rühren etc.) in eine homogene Lösung übergeht. Das Lyophilisat zeichnet sich durch eine relativ voluminöse Masse aus, welche vom Fachmann leicht als typisches Lyophilisat erkannt werden kann.

Die lyophilisierte Membranpräparation kann sowohl als alleiniger Reaktionsteilnehmer oder als Co-Lyophilisat mit anderen Reaktionsteilnehmern vorliegen. Dabei kann in einem Assay-Kit die lyophilisierte Membranpräparation entweder in einem einzigen Gefäss oder aber bereits aliquotiert in den Testbehältern vorliegen.

- 18 -

Das Verfahren eignet sich nicht nur für eine Testdurchführung in Röhrchen, sondern eignet sich in hervorragender Weise für den Einsatz von Mikrotestplatten, welche einen hohen Automationsgrad ermöglichen.

Ein handelsüblicher Assay-Kit besteht beispielsweise aus einer oder mehreren Mikrotestplatten von je 96 Assays, welche gegen das Eindringen von Feuchtigkeit zum Beispiel mittels dafür geeigneten Klebefolien abgeschlossen sind. Dank der Geometrie von Mikrotestplatten (flacher Körper) kann ein solcher Kit problemlos mittels Briefpost versandt werden. Ausserdem entfällt die bis anhin aufwendige und teure Versandart mit Kühlmittel (Trockeneis).

- 11 -

P A T E N T A N S P R U E C H E

1. Verfahren zur Herstellung einer Rezeptorpräparation aus biologisch aktivem Rezeptormaterial, dadurch gekennzeichnet, dass eine Plasmamembranpräparation unter Zusatz von Zuckern und/oder Aminosäuren und/oder Proteinen lyophilisiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die zu lyophilisierende wässrige Mischung von Plasmamembranpräparation mit 0.1-10% w/v Mannit, 0.1-1.0% w/v Bovines oder humanes Serumalbumin.
3. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die zu lyophilisierende wässrige Mischung von Plasmamembranpräparation mit 0.1-10% w/v Glycin, 0.1-1.0% w/v Bovines oder humanes Serumalbumin.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzliche Reaktionsteilnehmer zur Erzielung eines einsatzfertigen Assays co-lyophilisiert werden.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die zusätzlichen Reaktionsteilnehmer eine Tracersubstanz und/oder eine Vergleichsstandardsubstanz eines Assay-systems sind.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass ausserdem Stabilisatoren und/oder Modulatoren co-lyophilisiert werden.

ERSATZBLATT

- 12 -

7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Präparation in einem für den Endverbraucher geeigneten Testgefäss lyophilisiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Testgefäss ein Teströhrchen oder ein Testnöpfchen einer Mikrottestplatte ist.
9. Rezeptorpräparation, hergestellt nach dem Verfahren von Anspruch 1, enthaltend Plasmamembran zusammen mit Zuckerverbindungen und/oder Aminosäuren und/oder Proteinen.
10. Radiorezeptor-Assay hergestellt nach Anspruch 1 und Anspruch 4, enthaltend das Co-Lyophilisat von Plasmamembran zusammen mit Zuckerverbindungen und/oder Aminosäuren und/oder Proteinen und von einer Tracersubstanz und von einer Vergleichsstandardsubstanz.
11. Radiorezeptor-Assay nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass ausserdem Stabilisatoren und/oder Modulatoren enthalten sind.
12. Radiorezeptor-Assay nach den Ansprüchen 10 und 11, gekennzeichnet durch ein Lyophilisat enthaltend:

Plasmamembran aus biologischer Ausgangsmasse 2-50mg pro Test; Tracer: Jod-125 markiertes ANF, ANP (Atrial Na-

triuretic Factor, Peptide) 20'000 cpm; Standard ANF (Verdünnungsreihe, nur in einem Teil des Testkits, bspw. 16 von 96 Nöpfchen einer Mikrotestplatte; Phenanthrolin (Stabilisator) 1 mM; Farbstoff für die Markierung der Standardreihe: Evans Blue (Konzentration gemäss gewünschter Intensität).

13. Radiorezeptorassay-Kit unter Verwendung des Radiorezeptor-Assays nach Anspruch 10, gekennzeichnet durch:

eine Mehrzahl von Testbehältern enthaltend ein Co-Lyophilisat von Plasmamembran zusammen mit Zuckerverbindungen und/oder Aminosäuren und/oder Proteinen und von einer Tracersubstanz und von einer Vergleichsstandardsubstanz und dass ausserdem Stabilisatoren und/oder Modulatoren enthalten sind.
14. Kit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Testbehälter Teströhrchen sind.
15. Kit nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Testbehälter die Nöpfchen einer Mikrotestplatte sind.
16. Verwendung des Kit gemäss Anspruch 13, für den quantitativen oder qualitativen Nachweis von biologisch aktiven Substanzen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/CH 87/00122

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl ⁴ G 01 N 33/53; G 01 N 33/566; G 01 N 33/567		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl ⁴	G 01 N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
X	US, A, 4461829 (A.C. GREENQUIST) 24 July 1984 see column 5, lines 5-36; column 12, line 2 - column 14, line 4; column 17, lines 34-50 --	1-11
X	US, A, 4162003 (D.I. BARTOS & J. RYBCZYNSKI) 24 July 1979 see column 1, lines 12-15; column 7, line 16 - column 8, line 62; column 14, lines 33-52 --	1-11
Y	WO, A, 86/02004 (PRECO INC.) 10 April 1986 see page 1, line 27 - page 2, line 9; page 2, line 36 - page 3, line 28; claims 1-10 --	1-11
Y	US, A, 4259207 (M.J. FRUITSTONE et al.) 31 March 1981 see column 1, line 68 - column 2, line 15; column 8, lines 30-62 -----	1-11
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>¹⁰ Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"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</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"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.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
21 December 1987 (21.12.87)		25 January 1988 (25.01.88)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
EUROPEAN PATENT OFFICE		

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

CH 8700122
SA 18662

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 08/01/88. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 4461829	24-07-84	CA-A- 1190461	16-07-85
US-A- 4162003	24-07-79	NL-A- 7408791	02-01-75
		BE-A- 816971	16-10-74
		FR-A, B 2235366	24-01-75
		DE-A, C 2333434	23-01-75
		AU-A- 7059474	08-01-76
		AT-B- 335073	25-02-77
		GB-A- 1487351	28-09-77
		CH-A- 604171	31-08-78
		CA-A- 1028947	04-04-78
		JP-A- 50040724	14-04-75
		US-A- 4239746	16-12-80
WO-A- 8602004	10-04-86	AU-A- 4966785	17-04-86
		EP-A- 0198882	29-10-86
US-A- 4259207	31-03-81	US-A- 4379847	12-04-83

EPO FORM 10479

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/CH 87/00122

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int. Cl. ⁴ G 01 N 33/53; G 01 N 33/566; G 01 N 33/567		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Cl. ⁴	G 01 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	US, A, 4461829 (A.C. GREENQUIST) 24. Juli 1984 siehe Spalte 5, Zeilen 5-36; Spalte 12, Zeile 2 - Spalte 14, Zeile 4; Spalte 17, Zeilen 34-50 --	1-11
X	US, A, 4162003 (D.I. BARTOS & J. RYBCZYNSKI) 24. Juli 1979 siehe Spalte 1, Zeilen 12-15; Spalte 7, Zeile 16 - Spalte 8, Zeile 62; Spalte 14, Zeilen 33-52 --	1-11
Y	WO, A, 86/02004 (PRECO INC.) 10. April 1986 siehe Seite 1, Zeile 27 - Seite 2, Zeile 9; Seite 2, Zeile 36 - Seite 3, Zeile 28; Ansprüche 1-10 --	1-11
Y	US, A, 4259207 (M.J. FRUITSTONE et al.) 31. März 1981 siehe Spalte 1, Zeile 68 - Spalte 2, Zeile 15; Spalte 8, Zeilen 30-62 --	1-11
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</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 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>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
21. Dezember 1987	25 JAN 1988	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 P.E.G. VAN DER PUTTEN	

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
 ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

CH 8700122
 SA 18662

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
 Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 08/01/88
 Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US-A- 4461829	24-07-84	CA-A- 1190461	16-07-85
US-A- 4162003	24-07-79	NL-A- 7408791	02-01-75
		BE-A- 816971	16-10-74
		FR-A, B 2235366	24-01-75
		DE-A, C 2333434	23-01-75
		AU-A- 7059474	08-01-76
		AT-B- 335073	25-02-77
		GB-A- 1487351	28-09-77
		CH-A- 604171	31-08-78
		CA-A- 1028947	04-04-78
		JP-A- 50040724	14-04-75
		US-A- 4239746	16-12-80
WO-A- 8602004	10-04-86	AU-A- 4966785	17-04-86
		EP-A- 0198882	29-10-86
US-A- 4259207	31-03-81	US-A- 4379847	12-04-83

EPO FORM P0473