

(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
28. November 2013 (28.11.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/174515 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12M 1/00 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2013/001525

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Mai 2013 (23.05.2013)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2012 010 155.4 24. Mai 2012 (24.05.2012) DE

(71) Anmelder: **PAN-BIOTECH GMBH** [DE/DE]; Am
Gewerbepark 13, 94501 Aidenbach (DE).

(72) Erfinder: **ERL, Wolfgang, Ludwig**; Ringstrasse 21,
93095 Hagelstadt (DE). **SEIDL, Joseph**; Kühblei 1, 94424
Arnstorf (DE).

(74) Anwalt: **HOFFMANN, Ulrich**; Müller-Boré & Partner,
Grafinger Str. 2, 81671 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,

BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, 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)

(54) Title: CELL CULTURE CONTAINER FOR ONE-TIME USE

(54) Bezeichnung : ZELLKULTURBEHÄLTER FÜR DEN EINMALGEBRAUCH

(57) Abstract: A method for producing a cell culture container for one-time use that is made at least in part of polymer material, wherein the cell culture container is treated with gamma radiation for sterilization, characterized in that the cell culture container, before the irradiation, is treated with inert gas and/or a defined amount of oxygen in order to prevent the occurrence of an "extended lag phase".

(57) Zusammenfassung: Verfahren zur Herstellung eines mindestens teilweise aus Polymermaterial gefertigten Zellkulturbehälters für den Einmalgebrauch, wobei der Zellkulturbehälter zur Sterilisierung mit gamma-Strahlung behandelt wird, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturbehälter vor der Bestrahlung mit Inertgas und/oder einer definierten Menge an Sauerstoff behandelt wird, um das Auftreten einer "extended lag phase" zu verhindern.



WO 2013/174515 A1

Zellkulturbehälter für den Einmalgebrauch

Beschreibung

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft u. a. ein Verfahren zur Herstellung eines Zellkulturbehälters für den Einmalgebrauch.

Derartige Zellkulturbehälter sind aus dem Stand der Technik seit langer Zeit bekannt und sind mindestens teilweise aus Polymermaterial gefertigt. Die bekannten
10 Zellkulturbehälter können mehrlagig aufgebaut sein, wobei die Innenlage, d.h. diejenige Lage, die mit den Zellkulturen in Berührung kommt, aus Polymermaterial gefertigt ist. In der Regel besteht zumindest diese Lage bzw. Schicht aus Polyethylen (PE) oder Ethylvinylacetat (EVA).

- 15 Ein Zellkulturbehälter für den Einmalgebrauch ist ein Behälter, der für die biopharmazeutische oder sonstige Produktion von Peptiden, Proteinen, Antikörpern oder sonstigen bakteriellen, mikrobiologischen oder zellulären Produkten in großen Mengen verwendet werden kann. Dieser Prozess wird auch als Fermentation bezeichnet, und für diesen Fermentationsprozess werden sogenannte Bioreaktoren
20 verwendet. Im Zusammenhang mit der beschriebenen Erfindung kann man bei einem Zellkulturbehälter für den Einmalgebrauch, der üblicherweise aus Polymermaterial in Form eines Beutels für die Produktion großer Mengen biologischer Materialien konstruiert ist auch von einem Wegwerf-Bioreaktor sprechen. Im folgenden Text bezeichnet der Begriff Zellkulturbehälter jede Form eines Zellkultur-
25 behälters für den Einmalgebrauch oder entsorgbaren Zellkulturbehälters oder Beutels oder Bioreaktors für die Produktion von Biomaterialien.

Vor dem Befüllen der bekannten Zellkulturbehälter, die insbesondere in Form von Zellkulturbeuteln vorliegen, werden diese zur Sterilisierung mit gamma-Strahlung
30 behandelt. Dies ist nötig, damit sämtliche Mikroorganismen, die ein optimales Zellwachstum stören oder beeinflussen könnten, abgetötet werden. Die Sterilisierung läuft i. d. R. so ab, dass eine Vielzahl von Zellkulturbehältern in einen Strah-

lenapparat eingebracht wird. Anschließend werden die Zellkulturbehälter mit gamma-Strahlung behandelt.

Es hat sich gezeigt, dass bei einer Vielzahl der oben beschriebenen Zellkulturbe-
5 hälter für den Einmalgebrauch das Wachstum von Zellkulturen oder bakteriellen
oder mikrobiellen Kulturen beeinträchtigt ist. Es kommt nämlich häufig zu einer
sogenannten "extended lag phase", nämlich einem verzögerten Wachstum der zu
kultivierenden Zellen oder Organismen. Eine derartige "extended lag phase" ist
insbesondere bei Bioprozessen zur Arzneimittelproduktion äußerst unerwünscht.

10 In der Vergangenheit wurde fast die gesamte bio-pharmazeutische Produktion in
fest eingebauten Bioreaktoren in Form von Edelstahltanks durchgeführt. Traditio-
nell wurde dabei Serum, normalerweise fetales Rinderserum, als Nahrungs-
ergänzung verwendet, um Zellwachstum zu fördern.

15 Die Anwesenheit von Serum im Produktionsprozess behindert jedoch das sog.
"downstream processing", d.h. die Gewinnung und Aufreinigung der Endprodukte.
Deshalb geht seit etwa zehn Jahren das Bestreben der Hersteller ganz klar zur
Vermeidung von Serum in Zellkulturen wegen des einfacheren "downstream
20 processings". Zusätzlich führt das Entfernen von Serum aus den Zellkulturen zu
einer wesentlichen Erleichterung der Zulassung und Zertifizierung bio-
pharmazeutischer Produkte. In etwa demselben Zeitraum hat die pharma-
zeutische und biotechnologische Produktion in fixierten Stahltankanlagen deutlich
abgenommen, wodurch Flexibilität gewonnen und Aufbauzeiten sowie Pro-
25 duktionskosten reduziert werden konnten. In fest eingebauten Anlagen wurde das
Problem der "extended lag phase" kaum beobachtet. In Anwesenheit von Serum
zeigen Zellkulturbehälter für den Einmalgebrauch keine "extended lag phase". Die
Kombination von Zellkulturbehältern für den Einmalgebrauch mit serum-freien
Medien, welche bei pharmazeutischen und biotechnologischen Produktions-
30 prozessen immer mehr Anwendung findet ist jedoch regelmäßig betroffen vom
Auftreten einer "extended lag phase". Bislang konnte dieses Problem nicht gelöst
werden.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, die Nachteile der Einmal-Zellkulturbehälter aus dem Stand der Technik zu überwinden. Der Erfindung liegt insbesondere die Aufgabe zugrunde, Zellkulturbehälter für den Einmalgebrauch zur Verfügung zu stellen welche in ausreichendem Maße steril sind und bei denen eine "extended lag phase" nicht auftritt oder zumindest stark reduziert wird.

Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines mindestens teilweise aus Polymermaterial gefertigten Zellkulturbehälters für den Einmalgebrauch, wobei der Zellkulturbehälter zur Sterilisierung mit gamma-Strahlung behandelt wird, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturbehälter vor der Behandlung mit gamma-Strahlen mit Inertgas behandelt wird. Hierdurch kann die Menge an anwesendem Sauerstoff so gewählt werden, dass bei der Behandlung des Zellkulturbehälters mit gamma-Strahlen Aldehyde und Ketone in einer Menge von maximal 3 ppm entstehen.

Die oben genannte Aufgabe wird ferner durch einen Zellkulturbehälter, der durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt wurde, gelöst.

Die Erfinder haben überraschenderweise herausgefunden, dass bei der Behandlung der Zellkulturbehälter Aldehyde und Ketone entstehen und diese Aldehyde und Ketone für die beschriebene "extended lag phase" verantwortlich sind. Diese Aldehyde und Ketone entstehen offensichtlich durch eine Reaktion von bei der gamma-Bestrahlung entstehenden freien Radikalen mit Luftsauerstoff. Wie weiter unten dargelegt werden wird und auch den später beschriebenen Versuchsergebnissen und Tabellen bzw. Kurven zu entnehmen ist, sind diese entstehenden Aldehyde und Ketone in entsprechender Konzentration eindeutig für die extended lag phase verantwortlich.

Durch die Behandlung der Zellkulturbehälter mit Inertgas vor einer gamma-Bestrahlung kann eine Bildung von Ketonen und Aldehyden unterbunden werden.

Als Inertgas bezeichnet man Gase, die sehr reaktionsträge (inert) sind, sich also an nur wenigen chemischen Reaktionen beteiligen. Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird bevorzugt Stickstoff als Inertgas verwendet. Es können jedoch auch Edelgase, insbesondere Argon, oder Gemische aus Edelgasen und Stickstoff als Inertgas verwendet werden.

Bei einer bevorzugten Verfahrensvariante wird der Zellkulturbehälter vor einer gamma-Bestrahlung mit Inertgas gefüllt und/oder in einen verschließbaren, mit Inertgas gefüllten Behälter eingebracht. Beim Befüllen des Zellkulturbehälters mit Inertgas wird i. d. R. so vorgegangen, dass der Zellkulturbehälter mehrmals mit Inertgas befüllt und wieder entleert wird, bis er schließlich ein letztes Mal befüllt und so entleert wird, dass noch eine geringe Menge Inertgas im Behälter verbleibt. Dadurch wird sichergestellt, dass kein Luftsauerstoff mehr im Inneren des Zellkulturbehälters anwesend ist. Entscheidend ist, dass vor einer Behandlung mit gamma-Strahlung der Zellkulturbehälter mit Inertgas behandelt wird. Es ist jedoch bevorzugt, dass die gamma-Bestrahlung zeitnah auf die Behandlung mit Inertgas folgt. Vorzugsweise soll die gamma-Bestrahlung zur Sterilisierung innerhalb von 24 Stunden, beispielsweise innerhalb von 18 oder 12 Stunden, nach der Inertgasbehandlung erfolgen. Dies gewährleistet optimale Ergebnisse, was ein Zellwachstum im erfindungsgemäßen Zellkulturbehälter betrifft.

Wie oben erwähnt, kann der erfindungsgemäße Zellkulturbehälter vor einem Bestrahlen mit gamma-Strahlung in einen zweiten Behälter, insbesondere einen Beutel, welcher Inertgas enthält, eingebracht werden. Sowohl der erfindungsgemäße Zellkulturbehälter als auch dieser zweite Beutel weisen vorzugsweise Gassperrschichten auf. Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Zellkulturbehälter weist eine äußere Schicht aus Polyethylen mit einer Dicke von 0,1 bis 0,5 mm sowie eine innere, mit der zu kultivierenden Zellkultur in Berührung kommende weitere Schicht aus Polyethylen oder EVA, die ebenfalls 0,1 bis 0,5 mm dick ist, auf. Gemäß der vorliegenden Erfindung betrifft der Begriff "innere Schicht" eine Lage, welche mit der zu kultivierenden Zellkultur in Kontakt steht, und der Begriff "äußere Schicht" eine weitere Lage, welche von dieser Schicht verschieden ist.

Die äußere Lage ist beispielsweise eine Lage, welche mit der Umwelt in Kontakt steht, also die äußerste Lage des Zellkulturbehälters bildet.

Ein bevorzugter erfindungsgemäßer Zellkulturbehälter weist eine äußere Schicht aus Polyethylen mit einer Dicke von 0,15 bis 0,35 mm sowie eine innere, mit der zu kultivierenden Zellkultur in Berührung kommende weitere Schicht aus Polyethylen oder EVA auf, die ebenfalls 0,15 bis 0,35 mm dick ist. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist der Zellkulturbehälter eine äußere Schicht aus Polyethylen mit einer Dicke von 0,18 bis 0,3 mm, beispielsweise 0,2 mm, sowie eine innere weitere Schicht aus Polyethylen oder EVA auf, die ebenfalls 0,18 bis 0,3 mm, beispielsweise 0,2 mm, dick ist.

Zwischen den beiden Polyethylenschichten befindet sich vorzugsweise eine Schicht aus Ethylvinylalkohol (EVOH), die als Gassperrschicht dient. Durch diese Gassperrschicht wird verhindert, dass Inertgas, das in den Zellkulturbehälter vor einer gamma-Bestrahlung eingebracht wurde, entweichen kann.

Wie bereits oben dargelegt, wird bei einem kompletten Ausschluss von Sauerstoff beim Bestrahlen mit gamma-Strahlung eine "extended lag phase" verhindert. Nun wurde ferner überraschend festgestellt, dass bei Anwesenheit von geringen Mengen an Sauerstoff und damit bei Anwesenheit geringer Mengen an Aldehyden und/oder Ketonen ein Zellwachstum sogar noch optimiert werden kann. Je nach Intensität der gamma-Strahlung, des verwendeten Polymermaterials des erfindungsgemäßen Zellkulturbehälters und der Art der zu kultivierenden Zellen kann die Bestrahlung mit gamma-Strahlung unter Anwesenheit von 0% bis zu 20% Sauerstoff erfolgen. Wie bereits oben dargelegt, wird bei Anwesenheit von 0% Sauerstoff eine "extended lag phase" sicher verhindert und Zellen können ohne jegliche Beeinträchtigung wachsen.

Allerdings kann das Zellwachstum unter Anwesenheit bestimmter Mengen an Sauerstoff, die jedoch unterhalb des Sauerstoffgehalts der Luft liegen müssen, durch Entstehung geringer Mengen an Aldehyden und Ketonen verbessert wer-

den. Um dies zu erreichen, wird die Menge an anwesendem Sauerstoff so gewählt, dass beim Bestrahlen mit gamma-Strahlung Aldehyde und Ketone mit einer Konzentration von max. ca. 3 ppm entstehen. Bei Werten über 3 ppm kommt es i. d. R. bereits zur ungewünschten "extended lag phase".

5

Zur Steuerung eines solchen Effekts kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren der Zellkulturbehälter vor der Bestrahlung mit gamma-Strahlen mit Inertgas gespült und mit Inertgas und/oder einer definierten Menge an Sauerstoff, die unterhalb des Sauerstoffgehalts der Luft liegt, beschickt werden. Hierdurch kann die Entstehung von Aldehyden und Ketonen, und damit das Auftreten einer "extended lag phase" entweder verhindert werden, oder eine bestimmte Menge an Aldehyden und Ketonen kann entstehen, um dadurch das Zellwachstum in dem Zellkulturbehälter sogar zu verbessern.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft somit in einer spezifischen Ausführungsform ein Verfahren zur Sterilisation eines mindestens teilweise aus Polymermaterial gefertigten Zellkulturbehälters für den Einmalgebrauch, wobei der Zellkulturbehälter vor der Bestrahlung mit gamma-Strahlung wie vorstehend beschrieben mit Inertgas behandelt wird, um die Entstehung von Aldehyden und Ketonen, die für das Auftreten einer "extended lag phase" verantwortlich sind, zu verhindern oder eine bestimmte Menge an Aldehyden und Ketonen entstehen zu lassen, um dadurch das Zellwachstum in dem Zellkulturbehälter zu verbessern.

20

Gemäß der vorliegenden Erfindung erfolgt die Bestrahlung mit gamma-Strahlung vorzugsweise unter Anwesenheit von 18% Sauerstoff oder weniger, und mehr bevorzugt bei 15% Sauerstoff oder weniger. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bestrahlung mit gamma-Strahlung unter Anwesenheit von 10% Sauerstoff oder weniger, beispielsweise 8% oder weniger. Wie bereits vorstehend dargelegt, beeinflusst neben der Sauerstoffkonzentration, bei der mit gamma-Strahlung bestrahlt wird, auch die Intensität der gamma-Strahlung selbst und das verwendete Polymermaterial des erfindungsgemäßen Zellkulturbehälters sowie die Art der zu kultivierenden Zellen die Menge der entstehenden Aldehyde

25

30

und Ketone. Bei Bestrahlungsdosen von 25 bis 50 kGy beträgt der Sauerstoffgehalt während der Bestrahlung mit gamma-Strahlung gemäß einer bevorzugten Ausführungsform 0 bis 15% und gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform 0 bis 10%. Als weitere Beispiele für einen bevorzugten Sauerstoffgehalt sind Bereiche von 0,05 bis 10%, 0,1 bis 9% oder 0,2 bis 8% zu nennen.

Bei den genannten entstehenden Aldehyden und Ketonen handelt es sich insbesondere um wasserlösliche Aldehyde und Ketone. Wasserunlösliche Aldehyde und Ketone haben auf das Zellwachstum im erfindungsgemäßen Zellkulturbehälter geringere Auswirkungen, weil lipophile Komponenten mit höherer Kettenlänge nicht im gleichen Maße in Zellkulturmedien übertreten, da diese üblicherweise Wasser als Hauptbestandteil enthalten. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden als wasserlösliche Aldehyde und Ketone solche verstanden, deren Wasserlöslichkeit bei 20°C mindestens 30 g/l beträgt.

Bei den Aldehyden sind insbesondere Formaldehyd, Acetaldehyd und Propionaldehyd von Bedeutung. Bei den Ketonen sind insbesondere Aceton, Butanon, Methylpropylketon sowie 3-Pentanon zu nennen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Zellkulturbehälter für den Einmalgebrauch, hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

Wie bereits oben dargelegt, enthält der erfindungsgemäße Zellkulturbehälter Aldehyde und Ketone, insbesondere wasserlösliche Aldehyde und Ketone, in einer Konzentration von max. 3 ppm.

Insbesondere bei Anwendungen des erfindungsgemäßen Zellkulturbehälters im Arzneimittelbereich ist dieser vorzugsweise frei von Aldehyden und Ketonen, insbesondere von wasserlöslichen Aldehyden und Ketonen. Erfindungsgemäß wird unter "frei von Aldehyden und Ketonen" verstanden, dass der erfindungsgemäße Zellkulturbehälter Aldehyde und Ketone in einer Menge von 0 bis zu 0,01 ppm enthält. Im Arzneimittelsektor dürfen Aldehyde und Ketone oftmals auch wegen

Vorschriften aus dem Arzneimittelgesetz nicht vorhanden sein. In diesem Falle wird der erfindungsgemäße Zellkulturbehälter unter Ausschluss von Sauerstoff mit gamma-Strahlung sterilisiert.

- 5 Bei einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Zellkulturbehälters enthält dieser Aldehyde und Ketone mit einer Konzentration von ca. 0,01 bis ca. 3 ppm, insbesondere von 0,1 bis 1 ppm. In diesem Bereich ist überraschender Weise ein besonders gutes Zellwachstum zu beobachten.
- 10 Wie bereits oben erwähnt, ist der erfindungsgemäße Zellkulturbehälter vorzugsweise als mehrlagiger Beutel ausgebildet, der bis zu sieben Lagen, beispielsweise drei Lagen, umfassen kann. Die verschiedenen Lagen des erfindungsgemäßen Zellkulturbehälters können aus unterschiedlichen Materialien oder aus denselben Materialien gefertigt sein, wobei die äußere und die innere Lage vorzugsweise aus
- 15 PE und/oder EVA bestehen. In dieser Konfiguration ist es weiterhin bevorzugt, dass eine von der äußeren und inneren Lage verschiedene Lage, die im Folgenden als eine "mittlere Lage" bezeichnet wird, eine Gassperrschicht, insbesondere eine EVOH-Lage ist. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der erfindungsgemäße Zellkulturbehälter als dreilagiger Beutel ausgebildet, wobei die in-
- 20 nere und äußere Schicht vorzugsweise aus PE oder EVA besteht und die mittlere Lage eine Gassperrschicht, insbesondere eine EVOH-Lage ist.

- Vorzugsweise sind mindestens in einer inneren Schicht bzw. Lage des erfindungsgemäßen Zellkulturbehälters UV-Stabilisatoren oder sogenannte "Anti-rads"
- 25 enthalten. "Anti-rads" sind Substanzen, die ähnlich wie UV-Stabilisatoren wirken und negative Effekte der gamma-Strahlung auf Polymermaterial verhindern oder reduzieren. Diese Stabilisatoren unterdrücken ebenfalls die Bildung von Aldehyden und Ketonen, indem sie eine Radikalbildung beim Bestrahlen des erfindungsgemäßen Zellkulturbehälters mit gamma-Strahlen unterdrücken. Beispiele für UV-
- 30 Stabilisatoren sind 2,6-Di-tert-butylphenol sowie Butyl-hydroxytoluol (BHT). Diese Beispiele sollen den Bereich der gegenwärtigen Erfindung in keiner Weise beschränken. Zusätzlich kann eine Kombination von zwei oder mehr UV-

Stabilisatoren und/oder "Anti-rads" für die Produktion derartiger Zellkulturbehälter verwendet werden.

Die in der Polymerchemie üblicherweise verwendeten UV-Stabilisatoren und Anti-rads mit Schwefel- oder Stickstoffmolekülen in der Ringstruktur verbieten sich für eine Anwendung von Polymeren in der Zellkultur trotz ihrer überlegenen Wirkungsweise, weil aus diesen Molekülen unter Einwirkung von gamma-Strahlen Sulfit- und Nitrosoverbindungen entstehen können, welche eine hohe zytotoxische Wirkung besitzen.

Die hierin angegebenen Konzentrationen und Konzentrationsbereiche in "ppm" ergeben für unterschiedliche Aldehyde und Ketone zum Teil gegenläufige Konzentrationen in Mol/Liter, was sich durch das unterschiedliche Molekulargewicht und die unterschiedlichen Dichten von z.B. Aceton und Formaldehyd erklären lässt. Die zu beobachtende gegensätzliche Tendenz bei ppm und μM führt deshalb zur Angabe von Konzentrationsbereichen, die in keiner Weise als ausschließlich oder absolut betrachtet werden sollen. Vielmehr kann durch diese Angaben eine Konzentration gemeint sein, die sich im Bereich von $\pm 10\%$ bis 20% der angegebenen absoluten Grenzwerte bewegt.

Wie vorstehend beschrieben, basiert die vorliegende Erfindung zum einen auf der Erkenntnis, dass Aldehyde und Ketone, die während der Bestrahlung mit gamma-Strahlen im Rahmen eines Sterilisierungsverfahrens eines Zellkulturbehälters entstehen, für die beschriebene "extended lag phase" verantwortlich sind. Darüber hinaus basiert die vorliegende Erfindung auf der Erkenntnis, dass bei Anwesenheit von geringen Mengen an Sauerstoff und damit bei Anwesenheit geringer Mengen an Aldehyden und/oder Ketonen ein Zellwachstum sogar noch optimiert werden kann. Dadurch ist es möglich, eine effektivere Zellkultivierung zu ermöglichen. Die vorliegende Erfindung stellt daher auch ein Verfahren zur Zellkultivierung bereit, bei dem einer Zellsuspension wasserlösliche Aldehyde und/oder Ketone, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Formaldehyd, Acetaldehyd, Propionaldehyd, Aceton, Butanon, 2-Pentanon und 3-Pentanon, in einer Konzen-

tration von ca. 0,01 bis 3 ppm, bevorzugt von 0,1 bis 1 ppm zugesetzt werden.

Beispiele:

5 1. Nachweis des Einflusses von Aldehyden und Ketonen auf das Zellwachstum:

Fünf Proben einer Zellsuspension aus CHO AA8-Luc-Zellen (Zellen aus Ovarien chinesischer Hamster) und einem Medium (FMX-8), dessen Zusammensetzung in Tabelle 1 angegeben ist, wurden mit unterschiedlichen Mengen (weiter Konzentrationsbereich) an Aceton und Formaldehyd inkubiert. In der **Figur 1** ist das unterschiedliche Zellwachstum dargestellt:

AFO ist eine Kontrolle ohne Zugabe von Aceton oder Formaldehyd (= FMX-8 Medium). Hier ist ein normales, ungestörtes Wachstum zu beobachten.

15 AF1 entspricht 250 ppm Aceton und 250 ppm Formaldehyd (entspricht 4,3 mM Aceton und 8,325 mM Formaldehyd). Bei dieser Konzentration sterben alle Zellen ab.

AF2 entspricht 25 ppm Aceton und 25 ppm Formaldehyd (entspricht 430 μ M Aceton und 832,5 μ M Formaldehyd). Auch hier sterben alle Zellen ab.

20 AF3 entspricht 2,5 ppm Aceton und 2,5 ppm Formaldehyd (entspricht 43 μ M Aceton und 83,25 μ M Formaldehyd). Hier ist klar eine "extended lag phase" zu beobachten.

AF4 entspricht 0,25 ppm Aceton und 0,25 ppm Formaldehyd (entspricht 4,3 μ M Aceton und 8,325 μ M Formaldehyd). Hier ist ein verbessertes Wachstum zu beobachten.

Die beiden entscheidenden Kurven sind AF3 und AF4. Diese Ansätze zeigen eindeutig die unterschiedliche Wirkung von Aldehyd und Keton auf das Zellwachstum. Ist die Menge an zugesetztem Aceton/Formaldehyd gering, so zeigt sich gegenüber der Kontrolle AFO (Abwesenheit von Aldehyd und Keton) sogar ein verbessertes Wachstum. Bei AF3 ist eindeutig die sogenannte "extended lag phase" zu sehen, die häufig bei den Zellkulturbehältern aus dem Stand der Technik vor-

kommt. Beim Bestrahlen mit gamma-Strahlung entsteht in der Regel eine Menge an Aldehyden und Ketonen, die im Bereich von AF3 liegen. Innerhalb der ersten drei bis vier Tage Inkubationszeit der Zellkulturen ist hier nur ein äußerst geringes Zellwachstum zu erkennen. Erst nach dem dritten Tag kommt es zu einer Steigerung des Zellwachstums. Diese Erscheinung wird als "extended lag phase" bezeichnet.

Figur 2 zeigt die Ergebnisse aus einem weiteren Durchgang mit fünf verschiedenen Zellkulturansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen (enger Konzentrationsbereich) an Aceton und Formaldehyd.

Zur Überprüfung der Proliferationssteigernden Wirkung von geringen Mengen an Aldehyden und Ketonen wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, die in **Figur 2** zusammengefasst ist. Hier wurde u. a. eine Menge von 31,25 µM an Formaldehyd und Aceton zu einer Zellsuspension aus CHO-Luc Zellen gegeben. Dies entspricht einer Konzentration von ca. 1 ppm an Aldehyden und Ketonen. Gegenüber der Kontrolle, bei der keine Aldehyde oder Ketone zugegeben wurden, zeigt diese Zellprobe eine gesteigerte Proliferation, was zusätzlich zu den Ergebnissen aus dem ersten Versuch über einen weiten Konzentrationsbereich den Wachstumsfördernden Effekt von Aldehyden und Ketonen in einer Konzentration von etwa 1 ppm für Suspensions-Zellkulturen verdeutlicht.

0 ist Kontrolle (= FMX-8 Medium)>> normales Wachstum

31,25 µM 5 Aceton (= 1,82 ppm) und 31,25 µM Formaldehyd (= 0,94 ppm)

>> verbessertes Wachstum

62,5 µM Aceton (= 3,64 ppm) und 62,5 µM Formaldehyd (= 1,88 ppm)

>> kein Effekt

125 µM Aceton (= 7,28 ppm) und 125 µM Formaldehyd (= 3,76 ppm)

>> kein Effekt

250 µM Aceton (= 14,56 ppm) und 250 µM Formaldehyd (= 7,52 ppm)

>> extended lag phase

Durch das unterschiedliche Molekulargewicht und die unterschiedliche Dichte von Aceton und Formaldehyd ist eine gegensätzliche Tendenz bei ppm und μM zu beobachten.

5

2. Bestimmung der Menge an Aldehyden und Ketonen, die bei der Bestrahlung von Zellkulturbehältern mit gamma-Strahlen entstehen:

Ein zu testender Kulturbeutel wurde mit 0,5 ml destilliertem Wasser pro cm^2 Beutelfinnenfläche gefüllt. Das Wasser wurde 24 Stunden im Beutel belassen. Anschließend wurde die Menge an entstandenen wasserlöslichen Aldehyden und Ketonen gemessen. Mit dieser Methode können sämtliche wasserlösliche Aldehyde und Ketone erfasst werden. Die Messung der Aldehyde und Ketone kann beispielsweise mittels GC-MS durchgeführt werden.

15

3. Vergleich des Zellwachstums in unterschiedlich behandelten Zellkulturbeuteln:

PE-Folie (0,2 mm Dicke) wurde zu Beuteln verschweißt (Oberfläche der Innenseite ca. 100 cm^2). Die Beutel wurden jeweils 3x mit Luft, Sauerstoff (O_2), bzw. Stickstoff (N_2) gefüllt und entleert, so dass ein kleiner Rest des Gases im Beutel verblieb. Anschließend wurden die Beutel in 50 ml Zentrifugenröhrchen aus PP gegeben, diese wieder je 3x mit Luft, O_2 oder N_2 begast und dicht verschlossen. Dann wurden die Beutel mit 50 kGy gamma-Strahlung behandelt. Nach der Bestrahlung wurden die Beutel mit je 5 ml FMX-8 Medium steril befüllt und für 24 h bei 37°C inkubiert.

25

Das Medium wurde aus den jeweiligen Beuteln abgesaugt und je 1,5 ml davon in einer 1:10 Verdünnung zu je 1,5 ml Zellsuspension gegeben, so dass eine Zellzahl von 50.000 pro ml bei Beginn der Inkubationen vorlag. Die Zellen wurden für 4 d bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend ausgezählt.

30

In **Figur 3** dargestellt ist das Zellwachstum, wobei das Medium aus mit Luft behandelten Beuteln als Kontrolle verwendet wurde und diese als 100% definiert

wurde.

Eine Behandlung der Beutel mit O₂ führt zu einer Verzögerung des Zellwachstums. Eine Behandlung mit N₂ führt zu einer Verbesserung des Zellwachstums.

- 5 Hier entstehen im Vergleich zu mit Luft oder reinem Sauerstoffbehandelten Beuteln kaum Aldehyde und Ketone (siehe Fig. 3).

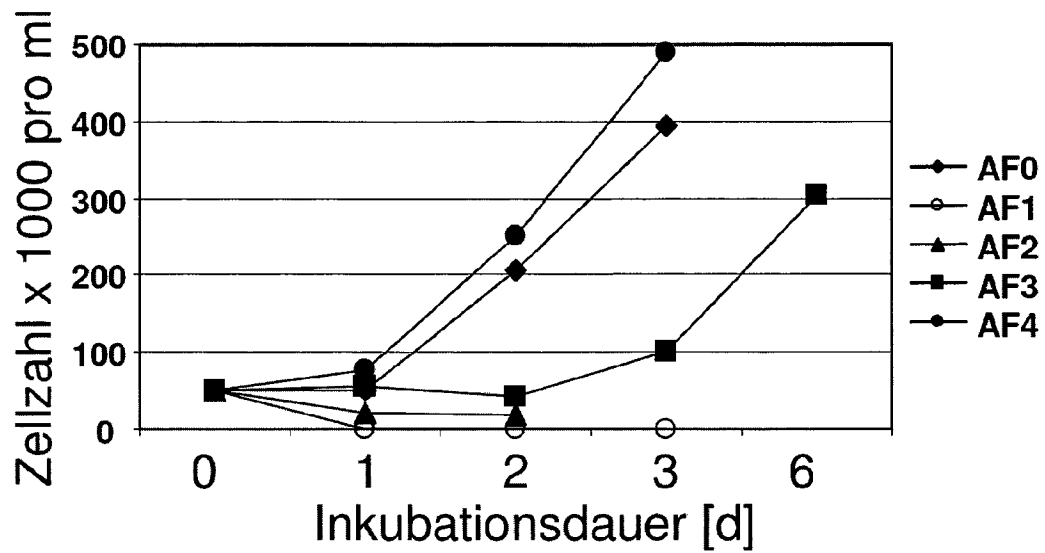
Figur 4 zeigt das Zellwachstum in zwei verschiedenen Zellkulturbehältern aus Poly-ethylen, die beide mit gamma-Strahlung behandelt wurden, bevor sie mit
10 Zellsuspensionen gefüllt wurden. Die beiden hier dargestellten Zellkulturbehälter stammen aus der gleichen Charge an Behältern, die gleichzeitig in einer Bestrahlungsvorrichtung mit gamma-Strahlen beschickt wurden. Der mit run #2 bezeichnete Behälter zeigt eine deutlich ausgeprägte "extended lag phase". Bei dem mit run #1 dargestellten Zellkulturbehälter ist dieser Effekt weniger ausgeprägt. Dies
15 liegt im folgenden Beispiel daran, dass der run #2 Behälter beim Bestrahlen ganz oben aufgelegt ist und dadurch mit dem meisten Luftsauerstoff in Berührung gekommen ist. Dadurch sind in diesem Zellkulturbehälter wesentlich mehr Aldehyde und Ketone entstanden als bei dem run #1 Behälter, der während des Bestrahlungsprozesses weiter unten angeordnet war, und deshalb mit weniger
20 Luftsauerstoff in Kontakt trat. Dieses Phänomen, das bei der Herstellung von Zellkulturbehältern häufig auftritt, konnte bisher weder erklärt noch beseitigt werden.

Patentansprüche

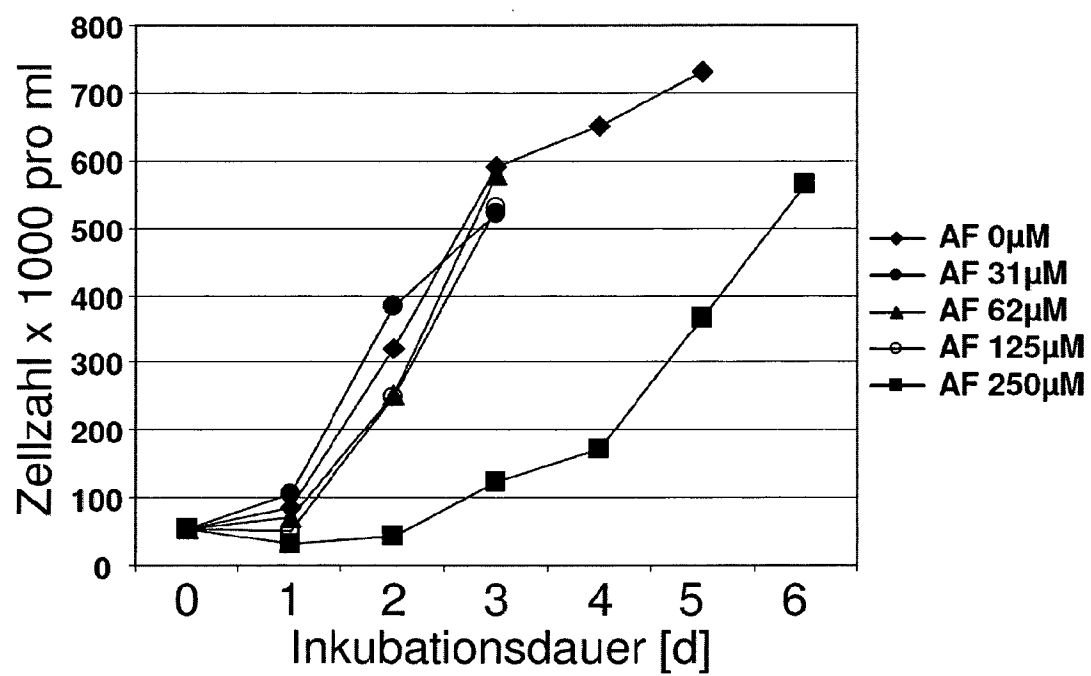
1. Verfahren zur Herstellung eines mindestens teilweise aus Polymermaterial gefertigten Zellkulturbehälters für den Einmalgebrauch, wobei der Zellkulturbehälter zur Sterilisierung mit gamma-Strahlung behandelt wird, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturbehälter vor der Behandlung mit gamma-Strahlung mit Inertgas behandelt wird, wodurch die Menge an anwesendem Sauerstoff so gewählt wird, dass bei der Behandlung des Zellkulturbehälters mit gamma-Strahlung Aldehyde und Ketone in einer Konzentration von maximal 3 ppm entstehen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Zellkulturbehälter vor der Behandlung mit gamma-Strahlung mit Inertgas gefüllt und/oder in einen verschließbaren, mit Inertgas gefüllten Behälter eingebracht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung mit gamma-Strahlung unter Anwesenheit von 0 bis 20% Sauerstoff erfolgt.
4. Zellkulturbehälter, hergestellt nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
5. Zellkulturbehälter nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass er Aldehyde und Ketone in einer Menge von 0 bis zu 0,01 ppm enthält.
6. Zellkulturbehälter nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass er Aldehyde und/oder Ketone in einer Menge von 0,01 bis zu 3 ppm, insbesondere von 0,1 bis 1 ppm enthält.
7. Zellkulturbehälter nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass er als mehrlagiger, insbesondere dreilagiger Beutel ausgebildet ist, wobei die innere Lage und/oder die äußere Lage aus Polyethylen (PE) oder

Ethylvinylacetat (EVA) besteht und die mittlere Lage eine Gassperrschicht, insbesondere eine Ethylvinylalkohol (EVOH)-Lage ist.

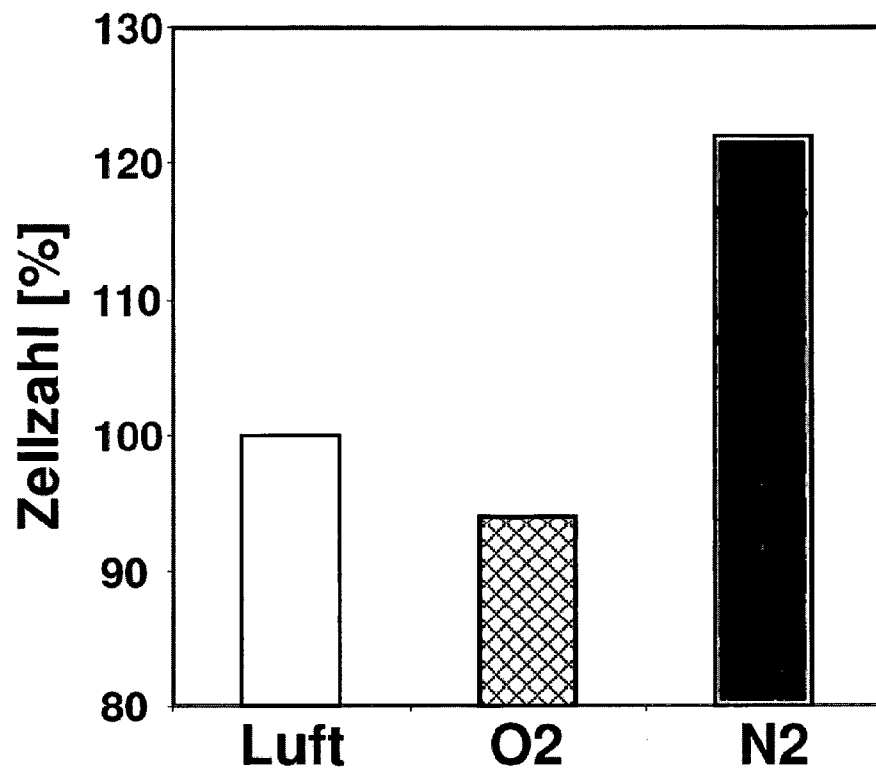
8. Zellkulturbehälter nach einem der Ansprüche 4 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens in der innersten Lage UV-Stabilisatoren und/oder Antirads enthalten sind.



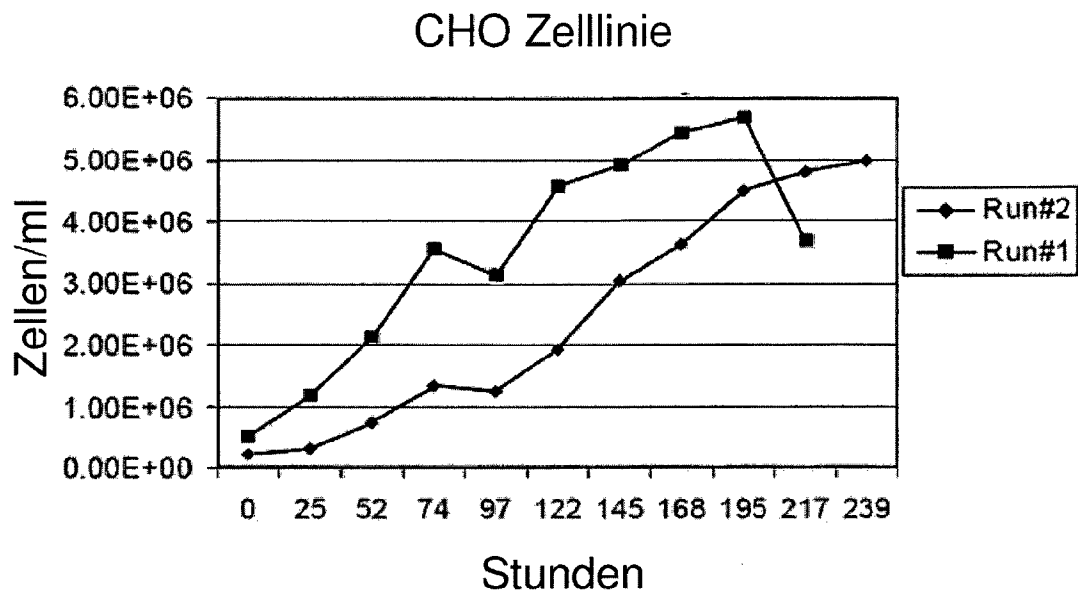
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4

Zusammensetzung mg/L

L-Arg HCl	188,33
L-Asn H ₂ O	127,42
L-Cys HCl H ₂ O	44,00
L-Gln	87,50
Gly	14,58
L-His HCl H ₂ O	46,29
L-Ile	22,35
L-Leu	57,75
L-Lys HCl	70,42
L-Met	18,11
L-Phe	18,71
L-Pro	37,08
L-Ser	13,13
L-Thr	44,84
L-Trp	25,11
L-Tyr	23,72
L-Val	61,74

Anorganische Salze		Vitamine		andere Komponenten	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	56,68	Biotin	0,01	D-Glucose	1700,00
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3,11	Ca-pantothenat	2,83	Hypoxanthin	10,00
		Cholinchlorid	45,00		
KCl	199,10	Myo-Inositol	15,17	Linolsäure	0,07
		Folsäure	2,33		
MgSO ₄ ·7H ₂ O	158,38	Niacinamid	1,98	Thioctsäure	0,18
NaCl	6955,00	Pyridoxin HCl	2,18	Phenolrot	2,67
NaHCO ₃	2100,00	Riboflavin	0,40	Putrescin	0,27
Na ₂ HPO ₄	182,30	Thiamin HCl	1,46	Na-pyruvat	91,67
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,74	Vitamin B ₁₂	0,88	Thymidin	2,00

Figur 5 (Tabelle 1)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/001525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12M1/00
ADD.

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)
C12M A61L B01J

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal, 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	US 2007/071798 A1 (HERWECK STEVE A [US] ET AL) 29 March 2007 (2007-03-29) paragraphs [0012] - [0015], [0025], [0026], [0028], [0087] - [0089] claims; figure 8 -----	1-8
X	EP 1 481 693 A2 (DEPUY PRODUCTS INC [US]) 1 December 2004 (2004-12-01) paragraphs [0008], [0027], [0028] claims 13,18,19 -----	1-6
X	EP 1 598 086 A2 (HOWMEDICA OSTEONICS CORP [US]) 23 November 2005 (2005-11-23) paragraphs [0020], [0023], [0035] claims ----- -/-	1-6



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 application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 August 2013

Date of mailing of the international search report

22/08/2013

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

Böhm, Ingo

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/001525

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 695 30 386 T2 (FRESENIUS KABI AB UPPSALA [SE]) 27 November 2003 (2003-11-27) pages 1-3 pages 8-10 pages 12,18	1-7
A	----- DE 20 2007 005399 U1 (SARTORIUS GMBH [DE]; RESPIRONICS NOVAMETRIX LLC [US]) 19 July 2007 (2007-07-19) the whole document	1,4
A	----- EP 1 072 274 A1 (DEPUY ORTHOPAEDICS INC [US]) 31 January 2001 (2001-01-31) paragraphs [0009], [0026], [0027] claims	1,4
A	----- EP 1 430 831 A1 (LIFESCAN INC [US]) 23 June 2004 (2004-06-23) paragraphs [0002], [0003], [0035] claims	1,4
A	----- WO 2006/034157 A2 (POLY MED INC [US]; SHALABY SHALABY W [US]) 30 March 2006 (2006-03-30) pages 2-5	1,4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/001525

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007071798	A1	29-03-2007	AU 2007300608 A1 03-04-2008
		CA 2663741 A1 03-04-2008	
		EP 2086605 A2 12-08-2009	
		JP 2010504327 A 12-02-2010	
		US 2007071798 A1 29-03-2007	
		US 2013074452 A1 28-03-2013	
		WO 2008039308 A2 03-04-2008	
EP 1481693	A2	01-12-2004	AU 705310 B2 20-05-1999
		AU 5046796 A 17-10-1996	
		CA 2173279 A1 04-10-1996	
		DE 69633312 D1 14-10-2004	
		DE 69633312 T2 29-09-2005	
		EP 0737481 A1 16-10-1996	
		EP 1481693 A2 01-12-2004	
		JP 3628803 B2 16-03-2005	
		JP H08336585 A 24-12-1996	
		US 5577368 A 26-11-1996	
EP 1598086	A2	23-11-2005	AT 171078 T 15-10-1998
		AT 196095 T 15-09-2000	
		AT 302032 T 15-09-2005	
		AU 684500 B2 18-12-1997	
		AU 6436494 A 20-12-1994	
		CA 2162927 C 04-07-2000	
		DE 9490446 U1 20-02-1997	
		DE 69413395 D1 22-10-1998	
		DE 69413395 T2 04-02-1999	
		DE 69425838 D1 12-10-2000	
		DE 69425838 T2 12-04-2001	
		DE 69434462 D1 22-09-2005	
		DE 69434462 T2 08-06-2006	
		EP 0701453 A1 20-03-1996	
		EP 0847765 A1 17-06-1998	
		EP 1005872 A1 07-06-2000	
		EP 1598086 A2 23-11-2005	
		ES 2122260 T3 16-12-1998	
		JP 2836965 B2 14-12-1998	
		JP H08509148 A 01-10-1996	
		US 5414049 A 09-05-1995	
		US 5449745 A 12-09-1995	
		US 5543471 A 06-08-1996	
		US 5650485 A 22-07-1997	
		US 5728748 A 17-03-1998	
		US 6174934 B1 16-01-2001	
		US 6372814 B1 16-04-2002	
		US 2002107299 A1 08-08-2002	
		US 2003207957 A1 06-11-2003	
		US 2005059750 A1 17-03-2005	
		WO 9427651 A1 08-12-1994	
DE 69530386	T2	27-11-2003	AT 237505 T 15-05-2003
		AU 690697 B2 30-04-1998	
		AU 2688495 A 04-01-1996	
		CA 2192365 A1 14-12-1995	
		DE 69530386 D1 22-05-2003	
		DE 69530386 T2 27-11-2003	
		DK 759873 T3 07-07-2003	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2013/001525

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 0759873 A1	05-03-1997
		JP H10501204 A	03-02-1998
		US 5881534 A	16-03-1999
		WO 9533651 A1	14-12-1995
		ZA 9504735 A	26-01-1996

DE 202007005399 U1	19-07-2007	AT 522597 T	15-09-2011
		DE 102006022307 A1	15-11-2007
		DE 202007005399 U1	19-07-2007
		EP 2024487 A1	18-02-2009
		JP 5208919 B2	12-06-2013
		JP 2009536520 A	15-10-2009
		US 2009075362 A1	19-03-2009
		WO 2007131593 A1	22-11-2007

EP 1072274	A1 31-01-2001	AU 4890400 A	01-02-2001
		EP 1072274 A1	31-01-2001
		JP 2001079081 A	27-03-2001

EP 1430831	A1 23-06-2004	AU 2003270938 A1	08-07-2004
		CA 2453741 A1	20-06-2004
		CN 1511590 A	14-07-2004
		EP 1430831 A1	23-06-2004
		IL 159389 A	28-06-2012
		JP 2004219409 A	05-08-2004
		KR 20040055647 A	26-06-2004
		MX PA03011949 A	11-04-2005
		PL 364155 A1	28-06-2004
		RU 2357759 C2	10-06-2009
		SG 121846 A1	26-05-2006
		TW I332394 B	01-11-2010
		US 2004120848 A1	24-06-2004

WO 2006034157	A2 30-03-2006	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. C12M1/00
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
C12M A61L B01J

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2007/071798 A1 (HERWECK STEVE A [US] ET AL) 29. März 2007 (2007-03-29) Absätze [0012] - [0015], [0025], [0026], [0028], [0087] - [0089] Ansprüche; Abbildung 8 -----	1-8
X	EP 1 481 693 A2 (DEPUY PRODUCTS INC [US]) 1. Dezember 2004 (2004-12-01) Absätze [0008], [0027], [0028] Ansprüche 13,18,19 -----	1-6
X	EP 1 598 086 A2 (HOWMEDICA OSTEONICS CORP [US]) 23. November 2005 (2005-11-23) Absätze [0020], [0023], [0035] Ansprüche ----- -/-	1-6



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. August 2013

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/08/2013

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Böhm, Ingo

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 695 30 386 T2 (FRESENIUS KABI AB UPPSALA [SE]) 27. November 2003 (2003-11-27) Seiten 1-3 Seiten 8-10 Seiten 12,18 -----	1-7
A	DE 20 2007 005399 U1 (SARTORIUS GMBH [DE]; RESPIRONICS NOVAMETRIX LLC [US]) 19. Juli 2007 (2007-07-19) das ganze Dokument -----	1,4
A	EP 1 072 274 A1 (DEPUY ORTHOPAEDICS INC [US]) 31. Januar 2001 (2001-01-31) Absätze [0009], [0026], [0027] Ansprüche -----	1,4
A	EP 1 430 831 A1 (LIFESCAN INC [US]) 23. Juni 2004 (2004-06-23) Absätze [0002], [0003], [0035] Ansprüche -----	1,4
A	WO 2006/034157 A2 (POLY MED INC [US]; SHALABY SHALABY W [US]) 30. März 2006 (2006-03-30) Seiten 2-5 -----	1,4

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/001525

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2007071798 A1	29-03-2007	AU 2007300608 A1	03-04-2008
		CA 2663741 A1	03-04-2008
		EP 2086605 A2	12-08-2009
		JP 2010504327 A	12-02-2010
		US 2007071798 A1	29-03-2007
		US 2013074452 A1	28-03-2013
		WO 2008039308 A2	03-04-2008

EP 1481693 A2	01-12-2004	AU 705310 B2	20-05-1999
		AU 5046796 A	17-10-1996
		CA 2173279 A1	04-10-1996
		DE 69633312 D1	14-10-2004
		DE 69633312 T2	29-09-2005
		EP 0737481 A1	16-10-1996
		EP 1481693 A2	01-12-2004
		JP 3628803 B2	16-03-2005
		JP H08336585 A	24-12-1996
		US 5577368 A	26-11-1996

EP 1598086 A2	23-11-2005	AT 171078 T	15-10-1998
		AT 196095 T	15-09-2000
		AT 302032 T	15-09-2005
		AU 684500 B2	18-12-1997
		AU 6436494 A	20-12-1994
		CA 2162927 C	04-07-2000
		DE 9490446 U1	20-02-1997
		DE 69413395 D1	22-10-1998
		DE 69413395 T2	04-02-1999
		DE 69425838 D1	12-10-2000
		DE 69425838 T2	12-04-2001
		DE 69434462 D1	22-09-2005
		DE 69434462 T2	08-06-2006
		EP 0701453 A1	20-03-1996
		EP 0847765 A1	17-06-1998
		EP 1005872 A1	07-06-2000
		EP 1598086 A2	23-11-2005
		ES 2122260 T3	16-12-1998
		JP 2836965 B2	14-12-1998
		JP H08509148 A	01-10-1996
		US 5414049 A	09-05-1995
		US 5449745 A	12-09-1995
		US 5543471 A	06-08-1996
		US 5650485 A	22-07-1997
		US 5728748 A	17-03-1998
		US 6174934 B1	16-01-2001
		US 6372814 B1	16-04-2002
		US 2002107299 A1	08-08-2002
		US 2003207957 A1	06-11-2003
		US 2005059750 A1	17-03-2005
		WO 9427651 A1	08-12-1994

DE 69530386 T2	27-11-2003	AT 237505 T	15-05-2003
		AU 690697 B2	30-04-1998
		AU 2688495 A	04-01-1996
		CA 2192365 A1	14-12-1995
		DE 69530386 D1	22-05-2003
		DE 69530386 T2	27-11-2003
		DK 759873 T3	07-07-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2013/001525

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
		EP 0759873 A1	05-03-1997
		JP H10501204 A	03-02-1998
		US 5881534 A	16-03-1999
		WO 9533651 A1	14-12-1995
		ZA 9504735 A	26-01-1996

DE 202007005399 U1	19-07-2007	AT 522597 T	15-09-2011
		DE 102006022307 A1	15-11-2007
		DE 202007005399 U1	19-07-2007
		EP 2024487 A1	18-02-2009
		JP 5208919 B2	12-06-2013
		JP 2009536520 A	15-10-2009
		US 2009075362 A1	19-03-2009
		WO 2007131593 A1	22-11-2007

EP 1072274	A1 31-01-2001	AU 4890400 A	01-02-2001
		EP 1072274 A1	31-01-2001
		JP 2001079081 A	27-03-2001

EP 1430831	A1 23-06-2004	AU 2003270938 A1	08-07-2004
		CA 2453741 A1	20-06-2004
		CN 1511590 A	14-07-2004
		EP 1430831 A1	23-06-2004
		IL 159389 A	28-06-2012
		JP 2004219409 A	05-08-2004
		KR 20040055647 A	26-06-2004
		MX PA03011949 A	11-04-2005
		PL 364155 A1	28-06-2004
		RU 2357759 C2	10-06-2009
		SG 121846 A1	26-05-2006
		TW I332394 B	01-11-2010
		US 2004120848 A1	24-06-2004

WO 2006034157	A2 30-03-2006	KEINE	
