PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

(51) Internationale Patentklassifikation 5 :
A61L 2/04, A61K 35/14

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 94/13329**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Juni 1994 (23.06.94)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT93/00191

(22) Internationales Anmeldedatum: 10. December 1993 (10.12.93)

(30) Prioritätsdaten:

A 2500/92	16. December 1992 (16.12.92)	AT
A 1547/93	3. August 1993 (03.08.93)	AT

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav Tschermak-Gasse 2, A-1180 Wien (AT). HUMMEL, Gabriela [AT/AT]; Engerthstrasse 165-167/33, A-1020 Wien (AT). REDL, Gerda [AT/AT]; Ortsstrasse 5, A-2301 Rutzendorf (AT). SEELICH, Thomas [AT/AT]; Jacquingasse 2/23, A-1030 Wien (AT). TURECEK, Peter [AT/AT]; Hutweidengasse 41, A-1190 Wien (AT). WÖBER, Günter [AT/AT]; Carolusstrasse 23, A-2522 Oberwaltersdorf (AT).

(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CZ, FI, HU, JP, NO, PL, RU, SK, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PROCESS FOR PREPARING A VIRUS-SAFE BIOLOGICAL COMPOSITION

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES VIRUSSICHEREN BIOLOGISCHEN PRÄPARATES

(57) Abstract

In a process for preparing by heating a virus-safe biological composition, while maintaining at least 50 % of its biological activity, a biocompatible surfactant is added to the compositon before the heating step and the composition is heated in the presence of said surfactant, which is preferably subsequently removed.

(57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen Präparates durch Erhitzen unter Erhaltung von mindestens 50 % der biologischen Aktivität wird dem Präparat vor dem Erhitzungsschritt ein biologisch verträgliches Tensid zugesetzt und das Erhitzen in Gegenwart desselben durchgeführt, worauf vorzugsweise das Tensid entfernt wird.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AT	Österreich	**GA**	Gabon	**MR**	Mauretanien
AU	Australien	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MW**	Malawi
BB	Barbados	**GE**	Georgien	**NE**	Niger
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**NL**	Niederlande
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland	**NO**	Norwegen
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**NZ**	Neuseeland
BJ	Benin	**IE**	Irland	**PL**	Polen
BR	Brasilien	**IT**	Italien	**PT**	Portugal
BY	Belarus	**JP**	Japan	**RO**	Rumänien
CA	Kanada	**KE**	Kenya	**RU**	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	**KG**	Kirgisistan	**SD**	Sudan
CG	Kongo	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**SE**	Schweden
CH	Schweiz	**KR**	Republik Korea	**SI**	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	**KZ**	Kasachstan	**SK**	Slowakei
CM	Kamerun	**LI**	Liechtenstein	**SN**	Senegal
CN	China	**LK**	Sri Lanka	**TD**	Tschad
CS	Tschechoslowakei	**LU**	Luxemburg	**TG**	Togo
CZ	Tschechische Republik	**LV**	Lettland	**TJ**	Tadschikistan
DE	Deutschland	**MC**	Monaco	**TT**	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	**MD**	Republik Moldau	**UA**	Ukraine
ES	Spanien	**MG**	Madagaskar	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	**ML**	Mali	**UZ**	Usbekistan
FR	Frankreich	**MN**	Mongolei	**VN**	Vietnam

Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen Präparates

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen Präparates durch Erhitzen unter Erhaltung von mindestens 50% der biologischen Aktivität, sowie die Anwendung des Verfahrens zur Erhöhung der Virussicherheit eines biologischen Präparates.

Unter biologischen Präparaten versteht man Präparate biologischen Ursprungs, die beispielsweise aus Körperflüssigkeiten, wie Blut, oder aus Zellkulturen gewonnen werden können. Durch den Kontakt mit potentiell infektiösem Material besteht bei derartigen Produkten die Gefahr der Kontamination durch infektiöse Agentien.

Das Risiko der Übertragung von Viren durch Blutprodukte ist bekannt. Unter Blutprodukten werden Produkte aus menschlichem oder tierischem Blut, bzw. Plasma verstanden, die zur therapeutischen, prophylaktischen oder diagnostischen Anwendung bestimmt sind. Solche Produkte können Enzyme, Proenzyme einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobuline, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin oder Plasma enthalten.

Es ist eine umfangreiche Literatur vorhanden, die sich mit der Inaktivierung von infektiösen Agentien durch Erhitzen von Blutprodukten befaßt. Die verschiedenen Verfahren umfassen:

- Erhitzen der Blutprodukte in wässeriger Lösung in Anwesenheit von Stabilisatoren,
- Erhitzen der Blutprodukte in trockenem Zustand,
- Erhitzen der Blutprodukte in festem, nassem Zustand.

Das Bestreben bei allen diesen Inaktivierungsverfahren geht dahin, die potentielle Infektivität der Präparationen zu beseitigen, ihre biologische Aktivität aber weitgehend zu erhalten.

Durch Erhitzen der Blutprodukte werden sowohl membranumhüllte

als auch nicht-membranumhüllte Viren angegriffen. Dies bedeutet einen wesentlichen Vorteil gegenüber solchen Verfahren, die nur auf der membransolubilisierenden Wirkung von Tensiden und gegebenenfalls von organischen Lösungsmitteln beruhen.

Ein Verfahren zur Behandlung von biologischen und pharmazeutischen Produkten durch die Behandlung mit Amphiphilen (Tensiden) ist bei einer Temperatur zwischen 4°C und 37°C in der EP 0 050 061 beschrieben. Diese Behandlung zielt auf die Inaktivierung von Hepatitis B-Viren und non-A, non-B Hepatitis-Viren (membranumhüllt) ab.

Gleichfalls werden wässerige Proteinlösungen gemäß dem Verfahren der EP-0 278 487 mit bis zu 2 g/100 ml eines nichtionischen Detergens versetzt und anschließend bei niedriger Temperatur, beispielsweise 4°C, solange inkubiert, bis ein virusinaktivierender Effekt erzielt wurde.

Diese Behandlung mit Detergentien hat jedoch den Nachteil, daß sie lediglich auf membranumhüllte Viren abzielt: Wenn ein Tensid in einer Konzentration über der mizellbildenden Konzentration (CMC) vorliegt, werden lipidhaltige Membranen solubilisiert und das Virus inaktiviert. Demgegenüber werden Viren, die an sich keine lipidhaltige Membran aufweisen, wie z.B. Hepatitis A-Virus, die aber in Lipidvesikeln eingeschlossen sein können, durch eine Tensidbehandlung freigesetzt und damit aktiviert anstelle von inaktiviert (siehe dazu Manucci PM et al. (1992), The Lancet 339, 819 "Outbreak of hepatitis A among Italian patients with haemophilia").

Oberflächenaktive Mittel werden gemäß der EP-0 124 044 in einer Menge von 0,01 bis 0,5 Gew.% gemeinsam mit einem Polyol und einem chelatbildenden Mittel zu einer fibronectinhaltigen Lösung zugesetzt, die bei einer Temperatur von 50 bis 70°C wärmebehandelt wird. Die geringen Mengen an oberflächenaktivem Mittel schützen Fibronectin vor Denaturierung durch Scherkräfte.

Ebenso werden Detergentien als Lösungsvermittler gemeinsam mit virusinaktivierenden Mitteln (Glycyrrhizin-Triterpenoid-Verbin-

bindung) zu Blutplasma zugesetzt, welches bei einer Temperatur bis zu 60°C gehalten wird (US-PS 5 186 945). Um eine gewünschte oberflächenaktive Wirkung zu erzielen, werden sehr geringe Menge an nichtionischen Detergentien eingesetzt, etwa in einer Konzentration von 0,001 bis 5 Gew.%. Der Vorteil der Verwendung dieser geringen Detergensmengen liegt darin, daß diese nicht entfernt werden müssen.

Es ist weiters in der EP-0 131 740 beschrieben, daß ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren in einer Lösung mit organischen Lösungsmitteln bei einer Temperatur von 0 bis 70°C durchgeführt werden kann. Als Benetzungsmittel kommen dabei 0,001 bis 10 Gew.% Detergentien zum Einsatz. Jedoch ist es erforderlich, die labilen Proteine bei Erhitzen der Lösung zu stabilisieren. Damit werden aber nicht nur das labile Protein stabilisiert, sondern auch die Viruskomponenten.

Als Hitzebehandlung von Blutprodukten in festem Zustand hat sich das Verfahren der EP 0 159 311 bewährt. Dabei werden Blutprodukte lyophilisiert, auf einen Gehalt an Wasser, Methanol, oder Ethanol von mehr als 5 Gew.% und weniger als 70 Gew.% eingestellt und in einem geschlossenen Behälter bei einer Temperatur in einem Bereich von 50 bis 121°C erhitzt. Durch dieses Verfahren werden sogar resistente Viren, wie Vacciniavirus, abgetötet. Die Virusinaktivierung erfolgt in diesem Fall sehr langsam, so daß eine sehr lange Erhitzungsdauer bzw. eine sehr hohe Temperatur verwendet werden muß.

Zur Erhöhung der Effektivität dieses Verfahrens wird das Verfahren gemäß der EP 0 324 729 vorgeschlagen. Dabei werden Blutprodukte in festem, nassem Zustand in Gegenwart von organischen Verbindungen erhitzt. Der Wasseranteil verbleibt zum größten Teil am Blutprodukt physikalisch gebunden, während die organische Verbindung in Gasform in der Atmosphäre vorhanden ist. Als organische Verbindungen eignen sich Ethanol, Essigsäureethylester, Diethylether, Chloroform und dergleichen. Nach erfolgter Inaktivierung müssen die organischen Verbindungen vom Blutprodukt abgetrennt werden. Das verbesserte Verfahren bewirkt, daß das Vacciniavirus bereits nach wenigen Stunden Erhitzungsdauer

bei 60°C inaktiviert ist.

Ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren in einem Produkt, das an eine feste Phase adsorbiert ist, ist in der EP-0 197 554 beschrieben. Das adsorbierte Produkt wird mit einem virusinaktivierenden Mittel in Kontakt gebracht, worauf die feste Phase abgetrennt und gewaschen wird. Zuletzt wird das Produkt wieder desorbiert. Als virusinaktivierendes Mittel ist unter anderem eine amphiphile Substanz beschrieben, die anionisch, kationisch, zwitterionisch und nichtionisch sein kann. Die Behandlung kann jedoch nur bei einer Temperatur von 0 bis 50°C vorgenommen werden.

Die Erfindung stellt sich zur Aufgabe, ein Verfahren zur Herstellung eines virussicheren Präparates enthaltend ein labiles Protein durch Erhitzen zur Verfügung zu stellen, dessen Wirkung im Vergleich zu den bisher bekannten Hitzebehandlungen verbessert ist, wobei die biologische Aktivität der Präparation im wesentlichen erhalten bleibt.

Resistente Viren, wie Vacciniavirus, sollen möglichst rasch und vollständig inaktiviert werden, um die biologische Aktivität des Präparates nicht unnötig zu vermindern.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen Präparates durch Erhitzen unter Erhaltung von mindestens 50 % der biologischen Aktivität gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß dem Präparat vor dem Erhitzungsschritt ein Tensid zugesetzt und das Erhitzen in Gegenwart desselben durchgeführt wird, worauf vorzugsweise das Tensid entfernt wird. Es hat sich gezeigt, daß der Zusatz eines Tensides zu dem Präparat vor der Hitzebehandlung die Wirksamkeit in synergistischer Weise erhöht, ohne die biologische Aktivität des Präparates wesentlich zu vermindern. Nach der Hitzebehandlung wird das Tensid vom Präparat abgetrennt.

Als Tenside eignen sich vor allem biologisch verträgliche anionische, kationische, nicht-ionische oder zwitterionische Amphiphile. Tenside gelten im allgemeinen dann als biologisch ver-

träglich, wenn sie in der angewendeten Konzentration in einem standardisierten in vitro-Test Erythrozyten nicht lysieren (siehe Pape et al., Arzneim.-Forsch./Drug Res. 40, 498-502, 1990).

Beispielsweise können Tenside aus folgenden Gruppen verwendet werden:

Polyoxyethylensorbitanester (Tween®-Verbindungen),
Alkylphenolpolyethylenglykolether bzw. deren Formaldehydpolymere (Triton®-Verbindungen),
Polyoxyethylen-polyoxypropylen-Blockpolymere (Pluronic®-Verbindungen),
Alkylglucoside, wie z.B. Octyl-β-D-glucosid,
Säureamidderivate, wie z.B. Decanoyl-N-methylglucamid (MEGA-10),
anionische Tenside, wie z.B. Na-Desoxycholat,
kationische Tenside, wie z.B. Benzyltrimethylammoniumchlorid oder Benzyldimethyl-2-hydroxyethylammoniumchlorid, und
zwitterionische Tenside, wie z.B. N-Dodecyl-N',N-dimethyl-ammonio-3-propansulfonat (Sulfobetain SB12).

Das Tensid wird in einer hohen Konzentration entsprechend einem Verhältnis von Tensid zu Protein von mindestens 1 : 100, vorzugsweise im Bereich von 2 : 100 bis 300 : 100, zugesetzt, wenn die Behandlung des Präparats in flüssiger oder fester Form vorgenommen wird. Wenn das Präparat an einen festen Träger adsorbiert worden ist und die erfindungsgemäße Hitzebehandlung am festen Träger erfolgt, so kann die Behandlung bei noch höheren Tensidkonzentrationen, beispielsweise bis 98 Gew.%, vorgenommen werden.

Die Erfindung umfaßt gleichermaßen ein Verfahren zum Erhöhen der Virussicherheit eines biologischen Präparates unter Erhaltung von mindestens 50 %, vorzugsweise 80 % der biologischen Aktivität, insbesondere der Virussicherheit gegenüber membranumhüllten und nicht-membranumhüllten Viren, wobei das Präparat in Gegenwart eines Tensids in einer Konzentration von mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise mehr als 10 Gew.%, bis zu 98 Gew.% erhitzt wird.

Obwohl eine Virus-Inaktivierungsmethode mittels Tensiden im Stand der Technik lediglich als wirksam gegen membranumhüllte Viren beschrieben wird, kann der gewünschte Effekt auch gegen nicht-membranumhüllte Viren erzielt werden, wenn das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt wird.

Natürlich eignet sich das vorliegende Verfahren auch zur Inaktivierung von Virusaggregaten oder vesikulären Strukturen, die Viren, beispielsweise Hepatitis A-Viren, beherbergen.

Eine wesentliche Denaturierung von Proteinen im erfindungsgemäß erhitzten Produkt kann nicht festgestellt werden. Es war überraschend, daß hitzelabile Proteine durch die Anwesenheit von Tensiden sogar stabilisiert werden können.

Daher eignet sich das das erfindungsgemäße Verfahren überraschenderweise auch zum Stabilisieren eines biologischen Präparats, welches hitzelabile Proteine enthält, während einer Hitzebehandlung.

Maßnahmen zur Erhaltung der biologischen Aktivität während einer Hitzebehandlung sind vor allem bei hitzelabilen Proteinen von Bedeutung. Eine Behandlung von hitzestabilen Präparationen, beispielsweise einer Albumin-Präparation, ist jedoch weniger kritisch. Die Erfindung betrifft daher vor allem ein Verfahren zur Herstellung eines Präparates, ausgenommen ein Albumin-Präparat, das hitzelabile Proteine enthält.

Erfindungsgemäß können vor allem auch Präparate hergestellt werden, die labile plasmatische Proteine enthalten, wie Faktoren der Gerinnung, Fibrinolyse und Thrombolyse bzw. Proenzyme und Enzyme, oder deren Inhibitoren.

Die erfindungsgemäße Hitzebehandlung des Präparates wird vorzugsweise in festem Zustand vorgenommen, kann jedoch auch in wässeriger Lösung oder in Suspension erfolgen.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens wird so durchgeführt, daß das Tensid dem Präparat in Lösung zugesetzt wird, wo-

rauf dieses lyophilisiert und in lyophilisiertem Zustand hitzebehandelt wird, wobei die Hitzebehandlung dann bei wesentlich höheren Temperaturen möglich ist. Die Hitzebehandlung erfolgt vorteilhafterweise in festem, nassem Zustand, z.B. im lyophilisierten Präparat mit einem Wassergehalt von mehr als 5 Gew.% und weniger als 70 Gew.% in einem geschlossenen Behälter bei einer Temperatur von 50-121°C mindestens 10 min lang, bis die potenzielle Infektiosität des Präparates beseitigt ist, vorzugsweise 1 bis 30 h bei 60 bis 80°C.

Es kann beispielsweise auch eine wässerige Lösung enthaltend Blutgerinnungsfaktor XIII, erfindungsgemäß ohne Verwendung der üblichen Stabilisatoren erhitzt werden.

Die Hitzebehandlung in Lösung oder Suspension wird bei einer Temperatur von 55 bis 65°C, vorzugsweise bei etwa 60°C, und während einer Zeitdauer, die ausreicht, eventuell vorhandene Viren zu inaktivieren, durchgeführt, vorzugsweise während 2 min bis 100 Stunden. Am meisten bevorzugt wird eine Behandlungsdauer von 30 min bis 30 Stunden. Die benötigte Zeitdauer des erfindungsgemäßen Verfahrens kann mit Hilfe von Modellviren, wie HIV, Sindbis-, Polio-, FSME- und Vaccinia-Virus in einem Vorversuch bestimmt werden. Ein vor dem Erhitzen zugesetztes Virus darf nach dem Erhitzen nicht mehr nachweisbar sein.

Das erhaltene Präparat zeichnet sich durch seinen geringen Anteil an Denaturierungsprodukten aus, da trotz Erhitzen mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 80 % der biologischen Aktivität des Präparates erhalten bleibt. Dabei konnte beobachtet werden, daß die nach dem Erhitzen von hochkonzentrierten Präparaten auftretenden Trübungen in einer Lösung des Präparates ausbleiben. Die Extinktion E_{600} des erfindungsgemäß erhitzten Präparates beträgt in einer Lösung mit mindestens 5 Gew.% Proteingehalt weniger als 0,1 (bei einer Schichtdicke von 1 cm, Referenz: Wasser). Als Ergebnis wird also ein in Lösung optisch klares Produkt, weitgehend frei von Denaturierungsprodukten, erhalten.

Es hat sich herausgestellt, daß der Zusatz eines Lösungsvermitt-

lers vor dem erfindungsgemäßen Erhitzen einer Lösung vorteilhaft ist. Einer Faktor XIII-haltigen Lösung kann beispielsweise Arginin zugesetzt werden, um den Effekt der Tensidwirkung auf die Reduktion der Trübungsbildung zu verstärken.

Auf einen Zusatz üblicher Stabilisatoren, wie z.B. Polyole und/oder Aminosäuren oder deren Derivate, kann weitgehend verzichtet werden. Dies hat den Vorteil, daß die Virusinaktivierung rascher erfolgt und die Effektivität der Hitzebehandlung wesentlich besser ist. Die Entfernung der üblichen Stabilisatoren ist überdies aufwendig und kann somit vermieden werden.

Durch die hervorragende viruzide Wirkung der hochkonzentrierten Tenside kann auf die Verwendung organischer Lösungsmittel verzichtet werden. Das erfindungsgemäß behandelte Präparat enthält daher keine toxischen Spuren an organischen Lösungsmitteln.

Eine weitere Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens beinhaltet den Zusatz von Kohlenhydraten zum biologischen Präparat, wodurch die Hydratisierung vorhandener Proteine auch nach Lyophilisierung gewährleistet ist. So kann z.B. Saccharose oder Sorbit zur Hydratisierung von Proteinen im Präparat zugesetzt werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird die virusinaktivierende Hitzebehandlung an einem an einen festen Träger adsorbierten Präparat vorgenommen, wobei das adsorbierte Präparat beim Erhitzen in einer Lösung eines Tensids suspendiert ist. Nach Erhitzen kann das virusinaktivierte Präparat in bekannter Weise vom Träger getrennt werden. Blutfaktoren, wie Faktoren des Prothrombinkomplexes, werden beispielsweise an einem Ionenaustauscher oder an eine Affinitätsmatrix adsorbiert und in einer wässerigen Lösung in Anwesenheit hoher Tensidkonzentrationen suspendiert und erhitzt.

Das Tensid kann vorzugsweise vom Präparat durch geeignete Maßnahmen, wie Dialyse, chromatographische Reinigungsmethoden (z.B. durch Ionenaustauscher-Chromatographie) oder Proteinfällung abgetrennt werden. Beispielsweise kann das behandelte Präparat an

einem festen Träger adsorbiert und tensidfrei gewaschen werden. Die Präzipitation der zu präparierenden Proteine mit Fällungsmitteln, wie Ethanol, Ammoniumsulfat oder Polyethylenglykol, die Flüssigphasenextraktion oder die Phasentrennung durch Zusatz von bestimmten Substanzen, wie Mischungen von Salz und Polyethylenglykol oder löslichem Dextran, sowie die Festphasenextraktion von Tensid an C18-Material ("reversed phase chromatography") sind gleichermaßen geeignete Methoden zur Abtrennung zumindest des Großteils an Tensid vom Präparat. Durch die geeigneten Maßnahmen zur Entfernung des Tensids wird die Tensidkonzentration im Präparat vorzugsweise auf weniger als 0,1 Gew.%, am meisten bevorzugt weniger als 0,01 Gew.% reduziert.

Die Verbesserung der Wirkung einer Hitzebehandlung durch die Anwesenheit von Tensiden ist überraschend. Aus der EP 0 345 246 ist ein Tensidzusatz zu einem Gewebeklebstoff-Lyophilisat lediglich zur Verkürzung der Rekonstitutionszeit bekannt. Dabei werden sehr geringe Konzentrationen von nachweislich toxikologisch unbedenklichen Tensiden verwendet. Das Tensid wird entweder im Lyophilisat inkorporiert oder dem Lyophilisat zugesetzt, welches gelöst werden soll. Das Tensid verbleibt hier also im lyophilisierten Präparat und wird nicht abgetrennt, bzw. sogar dem Präparat zugesetzt. Dadurch ist die Wiederauflösbarkeit des Lyophilisates wesentlich verbessert, gemessen an der Rekonstitutionszeit. Eine verbesserte virusinaktivierende Wirkung wird nicht beobachtet.

Die verbesserte Wirkung einer Hitzebehandlung kann gezeigt werden, wenn sehr geringe Tensidmengen in einer wässerigen Lösung verwendet werden, welche per se nichtinaktivierend auf Viren wirken. Es kann also ein Virustiter in Gegenwart von Tensiden eingestellt werden, der erst durch die Hitzebehandlung eliminiert wird.

Die synergistische Wirkung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dann offensichtlich, wenn die Kinetik der Virusinaktivierung durch die Hitzebehandlung mit und ohne Tensidgehalt im Präparat miteinander verglichen wird. Modellviren, wie Vacciniavirus, Sindbis oder SIV (Simian Immunodeficiency Virus), werden in Ge-

genwart von an sich unwirksamen Mengen an Tensiden während einer Hitzebehandlung von Blutprodukten in festem, nassem Zustand rascher inaktiviert als während der Hitzebehandlung des Präparates ohne Tensidgehalt. Modellviren, die dem Präparat zugesetzt werden, sind unter geeigneten Bedingungen bereits nach 10 min, jedenfalls aber nach einer Stunde erfindungsgemäßer Hitzebehandlung abgetötet.

Der synergistische Effekt von Tensiden während einer Hitzebehandlung konnte nicht erwartet werden. Die solubilisierende Wirkung von Tensiden auf Membranproteine ist nämlich weitgehend von der Temperatur unabhängig. In der Fachwelt bestand die Meinung, daß eine bestimmte Konzentration eines Tensides entweder virusinaktivierend wirkt oder nicht, unabhängig von der Temperatur.

Auch wenn ein synergistischer Effekt methodenbedingt nur dann beobachtet werden kann, wenn eine Tensidkonzentration per se nicht virusinaktivierend wirkt (bei einer Konzentration unterhalb der CMC), so ist dieser Effekt selbstverständlich auch bei höheren Tensidkonzentrationen vorhanden.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele weiter beschrieben:

B e i s p i e l 1 : Hitzebehandlung einer Faktor VIII-Präparation in Gegenwart von Octyl-ß-D-glucosid.

Eine Faktor VIII-hältige Präparation wurde gemäß der AT 391 808 hergestellt.

2,7 ml einer Lösung der Faktor VIII-hältigen Präparation (30 mg Protein/ml) wurden mit 0,3 ml einer Vacciniavirussuspension vermischt und der Lösung 0, 3 bzw. 15 mg Octylglucosid zugesetzt (0, 0,1, 0,5 Gew.%). Das Verhältnis Tensid zu Protein betrug 4:100 bzw. 19:100. Das Gemisch wurde lyophilisiert, auf einen Wassergehalt von 30 Gew.%, 20 Gew.%, 10 Gew.% bzw. ≤ 1 Gew.% (trocken) eingestellt und 10 Stunden lang bei 60°C erhitzt. Der Virustiter wurde jeweils nach 0, 1, 3 und 10 Stunden bestimmt. Ebenso wurde die spezifische Aktivität des Faktor VIII vor und

nach der Hitzebehandlung bestimmt. Die Ergebnisse der Virusinaktivierung, sowie die Restaktivitäten nach den Hitzebehandlungen sind in Tabelle 1 angeführt.

Das Tensid wurde durch chromatographische Reinigung des Faktor VIII unter Verwendung eines Anionenaustauschers entfernt.

B e i s p i e l 2 : Hitzebehandlung einer Faktor VIII-Präparation in Gegenwart von Triton® X-100

2,7 ml der Faktor VIII-hältigen Lösung aus Beispiel 1 wurden mit 0,3 ml einer Vacciniavirussuspension versetzt und der Lösung 15 mg Triton® X-100 (0,5 Gew.%) zugesetzt. Das Verhältnis Tensid zu Protein betrug 19:100. Die Lösung wurde lyophilisiert und ein Wassergehalt von 20 Gew.% eingestellt. Danach wurde eine Hitzebehandlung bei 60°C vorgenommen. Der Virustiter wurde nach 0, 1, 3 und 10 Stunden bestimmt. Ebenso wurde die spezifische Aktivität des Faktors VIII bestimmt. Die Virusinaktivierung bzw. Restaktivitäten sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

Das Tensid wurde durch chromatographische Reinigung des Faktor VIII unter Verwendung eines Anionenaustauschers entfernt.

B e i s p i e l 3 : Hitzebehandlung einer Plasminogenpräparation in Gegenwart von Zwittergent® 3-10

1,8 ml einer Lösung enthaltend Lys-Plasminogen, hergestellt nach dem Verfahren der AT 391 801 wurden mit 0,2 ml einer Vacciniavirussuspension vermischt, und der Lösung 10 mg Zwittergent® 3-10 (0,5 Gew.%) zugesetzt. Das Verhältnis Tensid zu Protein betrug 1:100. Das Gemisch wurde lyophilisiert und auf einen Wassergehalt von 15 Gew.% eingestellt. Danach wurde auf 60°C erhitzt und der Virustiter nach 0, 1, 3 und 10 Stunden Dauer der Hitzebehandlung bestimmt. Ebenso wurde die spezifische Aktivität vor und nach der Hitzebehandlung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 angeführt.

Das Tensid wurde durch Dialyse entfernt.

B e i s p i e l 4 : Hitzebehandlung einer Prothrombinkomplex-Präparation in Gegenwart von Tween 80

Eine Prothrombinkomplexfaktorenpräparation wurde nach der Methode von Brummelhuis ("Methods of Plasma Protein Fractionation", J.M.Curling (ed.), S 117ff, Acad. Press, 1980) hergestellt. 1,35 ml einer Lösung dieser Präparation wurden mit 0,15 ml einer Sindbisvirussuspension vermischt und der Lösung 75 mg Tween 80 zugesetzt (5 Gew.%). Das Verhältnis Tensid zu Protein betrug 5:100. Das Gemisch wurde lyophilisiert und ein Wassergehalt von 9 Gew.% eingestellt. Die Hitzebehandlung wurde bei 60°C bzw. 80°C durchgeführt. Der Virustiter wurde nach 0, 1, 3 und 10 Stunden Dauer der Hitzebehandlung bei 60°C bestimmt, sowie nach einer weiteren Stunde Hitzebehandlung bei 80°C bzw. in einem weiteren Ansatz nach 20, 40 und 60 Minuten bei 80°C. Die spezifische Aktivität wurde vor und nach der Hitzebehandlung bestimmt, die Ergebnisse sind in Tabelle 4 angeführt.

Das Tensid wurde durch chromatographische Reinigung des Prothrombinkomplex unter Verwendung eines Anionenaustauschers entfernt.

B e i s p i e l 5 : Hitzebehandlung einer Fibrinogenpräparation in Gegenwart von MEGA-10

Plasma wurde nach Cohn fraktioniert und die Cohn I-Fraktion enthaltend Fibrinogen hergestellt. 1,8 ml einer Lösung dieser Fraktion wurden mit 0,2 ml einer Vacciniavirussuspension vermischt und der Lösung Decanoyl-N-methylglucamid (MEGA-10) zugestzt, so daß dessen Konzentration in Lösung 0,2 Gew.% betrug. Das Verhältnis Tensid zu Protein betrug 2,5:100. Das Gemisch wurde lyophilisiert und ein Wassergehalt von 10 Gew.% eingestellt. Das Lyophilisat wurde 10 Stunden lang auf 60°C und anschließend 3 Stunden auf 80°C erhitzt bzw. in einem weiteren Ansatz 3 Stunden lang auf 80°C. Der Virustiter wurde nach 0, 1, 3 und 10 Stunden Dauer der Erhitzung (60°C) bestimmt, sowie nach weiteren 3 Stunden (80°C). Ebenso wurde der Virustiter nach 1, 2 und 3 Stunden Dauer der Erhitzung (80°C) bestimmt. Die spezifische Aktivität des Fibrinogens wurde als gerinnbares Material pro Volumseinheit

vor und nach der Hitzebehandlung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 angeführt.

Das Tensid wurde durch Fällung des Fibrinogens mit Glycin entfernt.

B e i s p i e l 6 : Hitzebehandlung einer Thrombinpräparation in Gegenwart von 0,5 % Octyl-ß-D-glucosid

Eine Thrombinpräparation wurde nach dem Verfahren der österreichischen Anmeldung A 2183/91 hergestellt.

1,8 ml einer Lösung dieser Thrombinpräparation wurden mit 0,2 ml einer SIV-Suspension vermischt und der Lösung 10 mg Octylglucosid zugesetzt (0,5 Gew.%). Das Verhältnis Tensid zu Protein betrug 10:100. Das Gemisch wurde lyophilisiert und ein Wassergehalt von 10 Gew.% eingestellt. Die Hitzebehandlung wurde bei einer Temperatur von 60°C durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde vor und nach der Hitzebehandlung bestimmt. Der Virustiter wurde jeweils nach 0, 1, 3, 6 und 10 Stunden Dauer der Hitzebehandlung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 angeführt.

Das Tensid wurde durch chromatographische Reinigung des Thrombins an einem Anionenaustauschers entfernt.

B e i s p i e l 7 : Hitzebehandlung einer C1-Esterase-Inhibitor Präparation in Gegenwart von 0,5% Octyl-ß-D-glycosid

Ein C1-Esterase-Inhibitor Präparat wurde nach dem Verfahren von Vogelaar et al (1973) Vox Sang. 26, 118-127 hergestellt.

1,8 ml einer Lösung dieses Präparates wurden mit 0,2 ml einer Vacciniavirussuspension vermischt und der Lösung 10 mg Octylglucosid zugesetzt (0,5 Gew.%). Das Verhältnis Tensid zu Protein betrug 12,5:100. Das Gemisch wurde lyophilisiert, ein Wassergehalt von 15 Gew.% eingestellt und auf 60°C erhitzt. Der Virustiter wurde jeweils nach 0, 1, 3, 6 und 10 Stunden Dauer der Hitzebehandlung bestimmt. Die spezifische Aktivität wurde vor

und nach der Hitzebehandlung bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 angeführt.

Der C1-Esterase Inhibitor wurde an DEAE-Sephadex adsorbiert und solange mit einem Puffer gewaschen, bis er frei von Tensid war.

Die in den Tabellen 1 bis 7 dargestellten Versuchsergebnisse zeigen deutlich, daß eine wesentlich erhöhte Geschwindigkeit der Inaktivierung von Viren bei Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber der Hitzebehandlung ohne Tensid auftritt.

Die unterschiedliche Nachweisgrenze der Virustiter bei dem Verfahrensvergleich ergibt sich aus der Wahl der Nachweismethode, welche durch die Anwesenheit von Tensiden bedingt ist. Diese unterschiedliche Nachweisgrenze ist in diesem Zusammenhang aber nicht von Belang.

Tabelle 1: Inaktivierung von Vaccianiavirus in einem Faktor VIII-hältigen Präparat durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart von Octylglucosid

WASSERGEHALT IM LYOPHILISAT

	30%				20%				10%				trocken			
Dauer der Hitzebehandlung bei 60 °C (h)	0	1	3	10	0	1	3	10	0	1	3	10	0	1	3	10
0,5% Octylglucosid																
Virustiter (ml^{-1})	n.b.*	n.b.	n.b.	n.b.	$10^{4,4}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$10^{6,4}$	$10^{4,2}$	$10^{3,7}$	$\leq 10^{1,5}$	$10^{6,9}$	$10^{6,7}$	$10^{6,6}$	$10^{6,9}$
spez.Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24,5	n.b.	n.b.	14,9	25,8	n.b.	n.b.	20,6	31,5	n.b.	n.b.	28,5
0,1% Octylglucosid																
Virustiter (ml^{-1})	$10^{6,9}$	$10^{4,6}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$10^{7,1}$	$10^{4,6}$	$10^{3,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$10^{7,2}$	$10^{6,4}$	$10^{6,0}$	$10^{6,2}$	$10^{7,6}$	$10^{7,2}$	$10^{7,4}$	$10^{7,5}$
spez.Aktivität (E/ml)	25,8	n.b.	n.b.	13,4	27,8	n.b.	n.b.	16,5	26,4	n.b.	n.b.	16,1	37,7	n.b.	n.b.	30,2
kein Octylglucosid																
Virustiter (ml^{-1})	$10^{7,2}$	$10^{6,6}$	$10^{4,5}$	$10^{4,5}$	$10^{6,2}$	$10^{7,5}$	$10^{5,9}$	$10^{5,7}$	$10^{6,9}$	$10^{6,7}$	$10^{7,6}$	$10^{7,0}$	$10^{7,2}$	$10^{7,0}$	$10^{7,5}$	$10^{7,1}$
spez.Aktivität (E/ml)	38	n.b.	n.b.	20,2	28,5	n.b.	n.b.	21,7	27,7	n.b.	n.b.	21,0	30,5	n.b.	n.b.	28,7

*) n.b.....nicht bestimmt

Tabelle 2: Inaktivierung von Vaccianiavirus in einem Faktor VIII-hältigen Präparat durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart von Triton^{R} X-100

Dauer der Hitzebehandlung bei 60 °C (h)	0	1	3	10
0,5% Triton^{R} X-100				
Virustiter (ml^{-1})	$10^{5,0}$	$\leq 10^{3,5}$	$\leq 10^{3,5}$	$\leq 10^{3,5}$
spez.Aktivität (E/ml)	25,8	n.b.*	n.b.	22,9
ohne Triton^{R} X-100				
Virustiter (ml^{-1})	$10^{6,1}$	$10^{6,0}$	$10^{5,0}$	$\leq 10^{1,5}$
spez.Aktivität (E/ml)	25,7	n.b.	n.b.	20,6

*) n.b.....nicht bestimmt

Tabelle 3: Inaktivierung von Vacciniavirus in einem Plasminogenpräparat durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart von Zwittergent^{R} 3-10

Dauer der Hitzebehandlung bei 60 °C (h)	0	1	3	10
mit Zwittergent				
Virustiter (ml^{-1})	$10^{3,4}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$
spez.Aktivität ($\mu mol\ ml^{-1} min^{-1}$)	487	n.b.*	n.b.	287
ohne Zwittergent				
Virustiter (ml^{-1})	$10^{6,1}$	$10^{5,9}$	$10^{4,9}$	$\leq 10^{1,5}$
spez.Aktivität ($\mu mol\ ml^{-1} min^{-1}$)	460	n.b.	n.b.	410

*) n.b.. ...nicht bestimmt

Tabelle 4: Inaktivierung von Vacciniavirus in einem Prothrombinkomplex-präparat durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart von Tween 80

	60°C				60+80°C	80°C		
Dauer der Hitze-behandlung	0h	1h	3h	10h	10+1h	20min	40min	60min
mit Tween 80								
Virustiter (ml^{-1})	$10^{3,4}$	$\leq 10^{2,5}$	$\leq 10^{2,5}$	$\leq 10^{2,5}$	$\leq 10^{2,5}$	$\leq 10^{2,5}$	$\leq 10^{2,5}$	$\leq 10^{2,5}$
spez.Aktivität (E F IX/ml)	209	n.b.*	n.b.	n.b.	176	n.b.	n.b	n.b.
ohne Tween 80								
Virustiter (ml^{-1})	$10^{5,1}$	$10^{3,7}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$10^{1,7}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$
spez.Aktivität (E F IX/ml)	204	n.b.	n.b.	n.b.	192,8	n.b.	n.b.	n.b.

*) n.b.....nicht bestimmt

Tabelle 5: Inaktivierung von Vacciniavirus in einem Fibrinogenpräparat durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart von MEGA-10

	60°C				60+80°C	80°C		
Dauer der Hitzebehandlung (h)	0	1	3	10	10+3	1	2	3
mit Tensid								
Virustiter (ml^{-1})	$10^{6,4}$	$10^{6,7}$	$10^{6,4}$	$10^{5,9}$	$\leq 10^{1,5}$	$10^{4,4}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$
spez.Aktivität (%)	100	n.b.*	n.b.	n.b.	90	n.b.	n.b.	n.b.
ohne Tensid								
Virustiter (ml^{-1})	$10^{5,9}$	$10^{4,9}$	$10^{5,0}$	$10^{4,4}$	$\leq 10^{0,5}$	$10^{3,4}$	$10^{2,1}$	$\leq 10^{0,5}$
spez.Aktivität (%)	100	n.b.	n.b.	n.b.	100	n.b.	n.b.	n.b.

*) n.b.....nicht bestimmt

Tabelle 6: Inaktivierung von SIV in einem Thrombinpräparat durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart von Octyl-ß-D-glucosid

Dauer der Hitzebehandlung bei 60 °C (h)	0	1	3	6	10
mit Tensid					
Virustiter (ml^{-1})	$10^{2,2}$	$10^{2,0}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$
spez.Aktivität ($\mu mol\ ml^{-1} min^{-1}$)	1057	n.b.*	n.b.	n.b.	1063
ohne Tensid					
Virustiter (ml^{-1})	$10^{3,5}$	$10^{1,5}$	$10^{0,6}$	$\leq 10^{0,6}$	$\leq 10^{0,6}$
spez.Aktivität ($\mu mol\ ml^{-1} min^{-1}$)	927	n.b.	n.b.	n.b.	1075

*) n.b.....nicht bestimmt

Tabelle 7: Inaktivierung von Vacciniavirus in einem C1-Esterase-Inhibitor-Präparat durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart von Octyl-ß-D-glucosid

Dauer der Hitzebehandlung bei 60 °C (h)	0	1	3	6	10
mit Tensid					
Virustiter (ml^{-1})	$10^{3,0}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$
spez.Aktivität (E/ml)	40	n.b.*	n.b.	n.b.	31
ohne Tensid					
Virustiter (ml^{-1})	$10^{6,4}$	$10^{1,7}$	$10^{0,6}$	$10^{0,6}$	$\leq 10^{0,5}$
spez.Aktivität (E/ml)	39	n.b.	n.b.	n.b.	35

*) n.b.....nicht bestimmt

B e i s p i e l 8: Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem aktiviertem Prothrombinkomplex (FEIBA) in Gegenwart von Tween-80 (Inaktivierung von Vaccinia-Virus)

15 mg DEAE-Sephadex A-50 (Fa. Pharmacia) wurden 15 min bei Raumtemperatur mit 1 ml einer Lösung von 30 g/l NaCl in Wasser zur Quellung inkubiert. Danach wurde das Gel durch Zentrifugation vom Quellüberstand abgetrennt. Anschließend folgten fünf Waschungen des Gels mit je 1 ml Puffer (9 g/l $Na_2HPO_4.2H_2O$, 7 g/l NaCl, pH 7,0) und weitere zwei Waschungen mit einem Puffer (7 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 7 g/l NaCl), wobei ebenfalls resuspendiert und zentrifugiert wurde.

30 ml frisch gefrorenes menschliches Citratplasma wurden bei 0 bis +4°C aufgetaut und das anfallende Kryopräzipitat durch Zentrifugation bei +2°C abgetrennt. Der daraus resultierende "Kryoüberstand" wurde mit dem gewaschen DEAE-Sephadex inkubiert, wobei FEIBA generiert und zusammen mit den Faktoren des Prothrombinkomplexes und inertem Protein an das Gel adsorbiert wurde. Danach wurde koadsorbiertes Inertprotein vom DEAE-Gel durch Waschen mit einem Puffer (9 g/l $Na_2HPO_4.2H_2O$, 7 g/l NaCl) entfernt.

Der pufferfeuchte Gel-Proteinkomplex wurde nun mit 1 ml unverdünntem Tween-80 10 min bei 60°C suspendiert, wobei zuvor 0,1 ml einer Vacciniavirussuspension zugesetzt wurden. Der Virustiter wurde nach 2, 4, 6, 8 und 10 min bestimmt. Die Suspension des Gel-Proteinkomplexes in Tween-80 wurde dann mit einer Lösung von 30 g/l NaCl in Wasser 1:10 verdünnt. Dabei wurde der Wirkstoff vom Gel eluiert. Das Tensid wurde aus dieser Lösung in bekannter Weise durch Adsorption mit Extracti-Gel^{TM}D Detergent Removing Gel (Fa. Pierce) entfernt. Die Lösung wurde nun gegen destilliertes Wasser dialysiert, eingefroren und lyophilisiert. Nach Rekonstitution des Lyophilisats wurde die FEIB-Aktivität gemäß der AT-350726 bestimmt.

Als Kontrolle dienten eine ebenso hergestellte Präparation von FEIBA, versetzt mit Virus, jedoch ohne Behandlung mit heißem Tensid, sowie eine Präparation ohne Tensid- und Hitzebehandlung.

Die Analysenergebnisse sind Tabelle 8 zu entnehmen.

TABELLE 8

Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem aktiviertem Prothrombinkomplex (FEIBA) in Gegenwart von Tween-80 (Vaccinia)

	Eluat nach Lyophilisierung					
	Dauer der Behandlung (min.)					
	2	4	6	8	10	
mit Tween 80						
Virustiter (ml^{-1})	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	20
ohne Tween 80						
Virustiter (ml^{-1})	$10^{4.0}$	$10^{3,1}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1,5}$	$\leq 10^{1.5}$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	5
ohne Tween 80 und Hitzebehandlung						
Virustiter (ml^{-1})	n.b	n.b	n.b.	n.b.	$10^{5,3}$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b	n.b	n.b	n.b.	n.b	24

n.b. ..... nicht bestimmt

B e i s p i e l 9 : Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem aktivierten Prothrombinkomplex (FEIBA) in Gegenwart von Tween-80 (Inaktivierung von FSME-Viren)

FEIBA wurde analog zu Beispiel 8 hergestellt. Zur Behandlung des pufferfeuchten Gel-Proteinkomplexes mit unverdünntem Tween-80 wurden jedoch 0,1 ml einer FSME-Virussuspension zugesetzt. Der Virustiter wurde nach 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 7 und 10 min bestimmt. Die FEIB-Aktivität im Eluat wurde, wie in Beispiel 8 beschrieben, bestimmt.

Als Kontrolle dienten wieder eine ebenso hergestellte Präparation von FEIBA, versetzt mit Virus, jedoch ohne Behandlung mit Tensid, sowie eine ebensolche Präparation ohne Tween-80- und ohne Hitzebehandlung.

Die Analysenergebnisse sind Tabelle 9 zu entnehmen.

TABELLE 9

Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem aktiviertem Prothrombinkomplex (FEIBA) in Gegenwart von Tween-80 (FSME)

	Dauer der Behandlung (min.)								Eluat nach Lyophilisierung
	0,5	1	1,5	2	3	4	7	10	
mit Tween 80									
Virustiter (ml^{-1})	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	20
ohne Tween 80									
Virustiter (ml^{-1})	n.b.	$10^{3.6}$	n.b.	$< 10^0$	n.b.	$< 10^0$	$< 10^0$	$\leq 10^0$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	5
ohne Tween 80 und Hitzebehandlung									
Virustiter (ml^{-1})	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$10^{6.2}$	n.b.
Aktivität (E/ml)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	24

n.b. .... nicht bestimmt

B e i s p i e l 10 : Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem Prothrombinkomplex in Gegenwart von Tween-80 (Inaktivierung von Vaccinia-Viren)

30 ml frisch gefrorenes menschliches Citratplasma wurden bei 0 bis +4°C aufgetaut und das dabei anfallende Kryopräzipitat durch Zentrifugation bei +2°C abgetrennt. Der daraus resultierende "Kryoüberstand" wurde mit 2 IE Heparin/ml versetzt. Danach wurde die Lösung der Proteine des Prothrombinkomplexes mit 0,5 mg DEAE-Sephadex A-50 (Fa. Pharmacia) pro Milliliter adsorbiert. Der Gel-Proteinkomplex wurde von der Lösung abgetrennt und jeweils mit einem Puffer 1 (4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 7 g/l NaCl, 9 g/l $Na_2HPO_4.2H_2O$, 500 IE Heparin/l, pH 7,5) und anschließend mit Puffer 2 (4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$/1,7 g/l NaCl, 500 IE Heparin/l, pH 7,5) gewaschen.

Das gewaschene Gel wurde nun zur Virusinaktivierung mit 1 ml Tween-80 10 min bei 60°C suspendiert. Der Tensidlösung wurden 0,1 ml einer Vacciniavirussuspension zugesetzt. Der Virustiter wurde nach 2, 4, 6, 8 und 10 min bestimmt. Die Suspension des Gel-Proteinkomplexes in Tween-80 wurde anschließend mit einer Lösung von 1 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 30 g/l NaCl, 1000 IE Heparin/l, pH 7,0, 1:10 verdünnt. Dabei wurde der Prothrombinkomplex eluiert. Das Tensid aus dieser Lösung wurde in bekannter Weise durch Adsorption mit Extracti-Gel™ D Detergent Removing Gel (Fa. Pierce) entfernt. Die Prothrombinkomplex enthaltende Lösung wurde gegen einen Puffer, enthaltend 4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$ und 8 g/l NaCl, pH 7,0, umgepuffert und lyophilisiert.

Im rekonstituierten Prothrombinkomplex wurde der Proteingehalt, sowie die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X bestimmt.

Als Kontrolle dienten ein wie oben beschrieben hergestellter Prothrombinkomplex, jedoch ohne Tensidbehandlung, sowie eine Präparation ohne Tensid- und Hitzebehandlung.

Die Resultate sind Tabelle 10 zu entnehmen.

TABELLE 10

Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem Prothrombinkomplex in Gegenwart von Tween-80 (Vaccinia)

	Dauer der Behandlung (min.)					Eluat nach Lyophilisierung Faktor			
	2	4	6	8	10	II	VII	IX	X
mit Tween 80 Virustiter (ml^{-1})	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,8	0,3	1,3	1,4
ohne Tween 80 Virustiter (ml^{-1})	$10^{4.0}$	$10^{3.1}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	$\leq 10^{1.5}$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,3	0,7	0,6
ohne Tween 80 und Hitzebehandlung Virustiter (ml^{-1})	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$10^{5.3}$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,3	2,1	1,5

n.b. .... nicht bestimmt

B e i s p i e l 11: Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem Prothrombinkomplex in Gegenwart von Tween-80 (Inaktivierung von FSME-Viren)

Prothrombinkomplex wurde analog zu Beispiel 10 hergestellt. Zur Behandlung des pufferfeuchten Gelproteinkomplexes mit unverdünntem Tween-80 wurden jedoch 0,1 ml einer FSME-Virussuspension zugesetzt. Der Virustiter wurde nach 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 7 und 10 min bestimmt. Im rekonstituierten Prothrombinkomplex wurde der Proteingehalt, sowie die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X bestimmt.

Als Kontrolle dienten ein, wie oben beschrieben hergestellter Prothrombinkomplex, jedoch ohne Tensidbehandlung, sowie eine Präparation ohne Tensid- und Hitzebehandlung.

Die Resultate sind Tabelle 11 zu entnehmen.

TABELLE 11

Hitzebehandlung von an Ionenaustauscher gebundenem Prothrombinkomplex in Gegenwart von Tween-80 (FSME)

	Dauer der Behandlung (min.)								Eluat nach Lyophilisierung Faktor			
	0,5	1	1,5	2	3	4	7	10	II	VII	IX	X
mit Tween 80 Virustiter (ml^{-1})	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	n.b.	n.b.	n.b.	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,8	0,3	1,3	1,4
ohne Tween 80 Virustiter (ml^{-1})	n.b.	$10^{3.6}$	n.b.	$< 10^0$	n.b.	$< 10^0$	$< 10^0$	$< 10^0$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,3	0,7	0,6
ohne Tween 80 und Hitzebehandlung Virustiter (ml^{-1})	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$10^{6.2}$	...	n.b.	...	...
spez. Aktivität (E/mg Protein)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,9	0,3	2,1	1,5

n.b. .... nicht bestimmt

B e i s p i e l 12 : Stabilität des Faktor XIII beim Erhitzen in Lösung (ohne Stabilisatoren) in Gegenwart eines Tensids

Eine Plasmafraktion (Cohn I Niederschlag) wurde mit der 10-fachen Menge einer citrathaltigen Pufferlösung, pH 7,0 (13,4 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 29 g/l NaCl, 20 000 KIE Aprotinin/l) gelöst. Nach Zusatz von Ammoniumsulfat bis zur 16 %igen Sättigung (bei Raumtemperatur) wurde auf 4°C abgekühlt und das Gemisch noch 2 h gerührt. Der entstande Niederschlag wurde mit der Pufferlösung gelöst und die Fällung mit Ammoniumsulfat einmal wiederholt.

Der Niederschlag wurde in einer citrathaltigen Pufferlösung, pH 7,0 (5,9 g/l $Na_3Citrat.2H_2O$, 7 g/l NaCl, 100 KIE Aprotinin/l) gelöst und 10 min auf 56°C erhitzt. Der entstandene Niederschlag aus denaturiertem Fibrinogen wurde abzentrifugiert. Der Hitzefällungsüberstand wurde durch Fällung mit 3,5 Gew.% PEG 4000 bei 4°C von Begleitproteinen befreit. Anschließend wurde der Faktor XIII durch Zugabe von PEG 4000 bis zu einer Konzentration von 10 Gew.% bei 4°C ausgefällt, durch Zentrifugieren abgetrennt und in 1/25 des ursprünglichen Volumens eines 0,1 gew.%igen Natriumcitratpuffers (pH 7,0) gelöst.

Die spezifische Aktivität betrug 21 E Faktor XIII/mg Protein. Die Lösung wurde geteilt und ein Teil mit 1 Gew.% Tween 80 versetzt. Beide Lösungen wurden 6 h lang auf 60°C erhitzt. Die Faktor XIII-Restaktivitäten nach 6 h Erhitzen betrugen 82 % ohne Tensidzusatz und 84 % mit Tensidzusatz.

B e i s p i e l 13: Beispiel 12 wurde mit verschiedenen Tensiden in unterschiedlichen Konzentrationen wiederholt (Erhitzen: 4 h, 60°C).

TABELLE 12

Erhitzen einer Faktor XIII-haltigen Lösung in Anwesenheit von Tensid

Tensid	Konzentration Gew.%	FXIII-Restaktivität %
Tween 80	15	97
Triton X-100	15	91
Pluronic P 85	10	96

Die Beispiele 12 und 13 zeigen, daß eine Hitzebehandlung von Faktor XIII in Gegenwart von Tensiden durchgeführt werden kann, ohne größere Verluste an Faktor XIII-Aktivität in Kauf nehmen zu müssen.

Das folgende Beispiel 14 illustriert die überraschend verbesserte Inaktivierungskinetik eines Modellvirus durch eine Hitzebehandlung in Gegenwart eines Tensids im Vergleich zur Hitzebehandlung ohne Tensidzusatz:

B e i s p i e l 14 : Inaktivierung eines Modellvirus (Sindbis) in einer Faktor XIII-haltigen Lösung in Anwesenheit bzw. Abwesenheit eines Tensids

Eine Faktor XIII-haltige Lösung entsprechend Beispiel 12 wurde geteilt und ein Teil mit 0,3 Gew.% n-Octylglukosid versetzt.

Beide Lösungen wurden auf 60°C erhitzt, mit 10 Vol.% einer Sindbis-Virus-Suspension versetzt (Start der Virusinaktivierungsreaktion) und bei 60°C weiter inkubiert. In bestimmten Zeitabständen wurden Proben gezogen und der Virustiter bestimmt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 13 zusammenge-

stellt.

TABELLE 13

Virusinaktivierung in einer Faktor XIII-haltigen Lösung mit und ohne Tensid bei 60°C

	Virustiter (log10)	
Dauer des Erhitzens auf 60°C (Minuten)	ohne Tensid	mit Tensid
0	8,1	8,1
0,5	5,75	1,88
1	5,0	≤ 1,5
1,5	4,25	≤ 1,5
2	3,88	≤ 1,5
2,5	3,75	≤ 1,5
3	3,25	≤ 1,5
3,5	2,75	≤ 1,5
4	2,63	≤ 1,5
4,5	2,5	≤ 1,5
5	2,38	≤ 1,5
6	1,88	≤ 1,5
7	2,1	≤ 1,5
8,10,15,20,30	≤ 1,5	≤ 1,5

Durch den Zusatz von Tensid wird eine noch schnellere und weitgehendere Virusinaktivierung erhalten, ohne größere Verluste an Faktor XIII-Aktivität in Kauf nehmen zu müssen (vergleiche Beispiel 13).

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zur Herstellung eines virussicheren biologischen Präparates unter Anwendung eines Tensids und durch Erhitzen unter Erhaltung von mindestens 50 % der biologischen Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß das Erhitzen in Gegenwart des Tensids durchgeführt wird, worauf vorzugsweise das Tensid entfernt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Tensid in einer Menge zugesetzt wird, entsprechend einer Konzentration von mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise im Bereich von 2 bis 98 Gew.%.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Tensid dem in Lösung vorliegenden Präparat zugesetzt wird, worauf dieses lyophilisiert und im lyophilisierten Zustand hitzebehandelt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß das lyophilisierte Präparat auf einen Wassergehalt von mehr als 5 Gew.% und weniger als 70 Gew.% eingestellt wird und in einem geschlossenen Behälter bei einer Temperatur von 50 bis 121°C mindestens 10 min, vorzugsweise 1 bis 30 h bei 60 bis 80°C, hitzebehandelt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat in wässeriger Lösung vorliegt.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Erhitzen bei einer Temperatur im Bereich von 55 bis 65°C während einer Zeitdauer durchgeführt wird, die ausreicht, um infektiöse Agentien zu inaktivieren, vorzugsweise während 2 Minuten bis 100 Stunden.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß dem Präparat ein Kohlenhydrat, vorzugsweise Saccharose oder Sorbit, zugesetzt wurden.

8. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat an einem festen Träger adsorbiert ist, das adsorbierte Präparat in Suspension mit einem Tensid erhitzt wird und das virusinaktivierte Präparat gegebenenfalls vom Träger getrennt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Lösung oder der Suspension ein Lösungsvermittler für Proteine zugesetzt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat plasmatische Proteine enthält, vorzugsweise Faktoren der Gerinnung, Fibrinolyse und Thrombolyse, oder deren Inhibitoren.

11. Virussichere biologische Präparation, erhältlich nach einem der Ansprüche 1 bis 10, die in Lösung optisch klar ist.

12. Verfahren zum Erhöhen der Virussicherheit eines biologischen Präparates unter Erhaltung von mindestens 50 %, vorzugsweise 80 % der biologischen Aktivität, insbesondere der Virussicherheit gegenüber membranumhüllten und nicht-membranumhüllten Viren, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat in Gegenwart eines Tensids in einer Konzentration von mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise mehr als 10 Gew.%, bis zu 98 Gew.% erhitzt wird.

13. Verfahren zum Stabilisieren eines biologischen Präparates während einer Hitzebehandlung, dadurch gekennzeichnet, daß das Präparat in Gegenwart eines Tensids in einer Konzentration von mindestens 1 Gew.%, vorzugsweise mehr als 10 Gew.%, bis zu 98 Gew.% erhitzt wird.

14. Anwendung des Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 10 zur Erhöhung der Virussicherheit eines biologischen Präparates unter Erhaltung von mindestens 50 %, vorzugsweise 80 %, der biologischen Aktivität.

15. Verwendung eines Tensids zur Verbesserung der virusinaktivierenden Wirkung einer Hitzebehandlung eines biologischen Prä-

parates unter Erhaltung von mindestens 50 % der biologischen Aktivität.

16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das biologische Präparat in wässeriger Lösung, in Suspension oder in festem Zustand hitzebehandelt wird.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int ional Application No
PCT/AT 93/00191

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61L2/04 A61K35/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 5 A61L

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 196 761 (THE GREEN CROSS CORP.) 8 October 1986 see page 2, line 8 - line 25 see page 3, line 12 - line 20 see page 5, line 1 - line 18 ---	1-7
X	EP,A,0 341 103 (INSTITUT MERIEUX S.A.) 8 November 1989 see claims; examples ---	1,2
X	EP,A,0 124 044 (ARMOUR PHARMACEUTICAL CO.) 7 November 1984 cited in the application see claims; examples ---	1,2
P,X	EP,A,0 519 901 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT) 23 December 1992 see examples --- -/--	1-16

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 March 1994	25. 03. 94

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	ESPINOSA, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP,A,0 378 208 (THE GREEN CROSS CORPORATION) 18 July 1990 see page 3, line 43 - line 57 see page 4, line 23 - line 26	1-16
A	EP,A,0 197 554 (ARMOUR PHARMACEUTICAL CO.) 15 October 1986 cited in the application see examples	1,2,7
A	EP,A,0 159 311 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT) 23 October 1985 cited in the application see claims	1-16
A	EP,A,0 050 061 (SHANBROM ,EDWARD) 21 April 1982 cited in the application	1-16

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/AT 93/00191

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0196761	08-10-86	JP-A-	61191622	26-08-86
		CA-A-	1306691	25-08-92
EP-A-0341103	08-11-89	FR-A-	2630115	20-10-89
		AU-B-	617451	28-11-91
		AU-A-	3275689	19-10-89
		JP-A-	1311027	15-12-89
		US-A-	5118794	02-06-92
EP-A-0124044	07-11-84	AU-B-	568849	14-01-88
		AU-A-	2740384	01-11-84
		CA-A-	1213827	11-11-86
		JP-A-	59206313	22-11-84
		US-A-	4585654	29-04-86
EP-A-0519901	23-12-92	AU-A-	1830692	24-12-92
		CA-A-	2071567	21-12-92
		JP-A-	5186358	27-07-93
EP-A-0378208	18-07-90	JP-A-	3218322	25-09-91
		US-A-	5151499	29-09-92
EP-A-0197554	15-10-86	US-A-	4673733	16-06-87
		AU-A-	5596086	06-11-86
		CA-A-	1262682	07-11-89
		JP-A-	61275210	05-12-86
EP-A-0159311	23-10-85	AT-A-	385657	10-05-88
		AT-B-	389815	12-02-90
		CA-A-	1239583	26-07-88
		JP-A-	60215628	29-10-85
		US-A-	4640834	03-02-87
EP-A-0050061	21-04-82	US-A-	4315919	16-02-82
		US-A-	4314997	09-02-82
		US-A-	4412985	01-11-83

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/AT 93/00191

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 A61L2/04 A61K35/14

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 5 A61L

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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 196 761 (THE GREEN CROSS CORP.) 8. Oktober 1986 siehe Seite 2, Zeile 8 - Zeile 25 siehe Seite 3, Zeile 12 - Zeile 20 siehe Seite 5, Zeile 1 - Zeile 18 ---	1-7
X	EP,A,0 341 103 (INSTITUT MERIEUX S.A.) 8. November 1989 siehe Ansprüche; Beispiele ---	1,2
X	EP,A,0 124 044 (ARMOUR PHARMACEUTICAL CO.) 7. November 1984 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche; Beispiele ---	1,2
P,X	EP,A,0 519 901 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT) 23. Dezember 1992 siehe Beispiele ---	1-16
	-/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, 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 zumVerständnis 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 anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
'&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
15. März 1994	25. 03. 94

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	ESPINOSA, M

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP,A,0 378 208 (THE GREEN CROSS CORPORATION) 18. Juli 1990 siehe Seite 3, Zeile 43 - Zeile 57 siehe Seite 4, Zeile 23 - Zeile 26 ---	1-16
A	EP,A,0 197 554 (ARMOUR PHARMACEUTICAL CO.) 15. Oktober 1986 in der Anmeldung erwähnt siehe Beispiele ---	1,2,7
A	EP,A,0 159 311 (IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT) 23. Oktober 1985 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche ---	1-16
A	EP,A,0 050 061 (SHANBROM ,EDWARD) 21. April 1982 in der Anmeldung erwähnt -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlic.. .gen, die zur selben Patentfamilie gehören

In. .ionales Aktenzeichen
PCT/AT 93/00191

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP-A-0196761	08-10-86	JP-A-	61191622	26-08-86
		CA-A-	1306691	25-08-92
EP-A-0341103	08-11-89	FR-A-	2630115	20-10-89
		AU-B-	617451	28-11-91
		AU-A-	3275689	19-10-89
		JP-A-	1311027	15-12-89
		US-A-	5118794	02-06-92
EP-A-0124044	07-11-84	AU-B-	568849	14-01-88
		AU-A-	2740384	01-11-84
		CA-A-	1213827	11-11-86
		JP-A-	59206313	22-11-84
		US-A-	4585654	29-04-86
EP-A-0519901	23-12-92	AU-A-	1830692	24-12-92
		CA-A-	2071567	21-12-92
		JP-A-	5186358	27-07-93
EP-A-0378208	18-07-90	JP-A-	3218322	25-09-91
		US-A-	5151499	29-09-92
EP-A-0197554	15-10-86	US-A-	4673733	16-06-87
		AU-A-	5596086	06-11-86
		CA-A-	1262682	07-11-89
		JP-A-	61275210	05-12-86
EP-A-0159311	23-10-85	AT-A-	385657	10-05-88
		AT-B-	389815	12-02-90
		CA-A-	1239583	26-07-88
		JP-A-	60215628	29-10-85
		US-A-	4640834	03-02-87
EP-A-0050061	21-04-82	US-A-	4315919	16-02-82
		US-A-	4314997	09-02-82
		US-A-	4412985	01-11-83