

(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
18. Mai 2012 (18.05.2012)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2012/062841 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 19/10 (2006.01) G01N 31/22 (2006.01)
G01N 25/62 (2006.01) B01D 53/26 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/069813

(22) Internationales Anmeldedatum:
10. November 2011 (10.11.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10191025.5 12. November 2010 (12.11.2010) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Qiagen Strasse 1,
40724 Hilden (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WENDE, Andy** [DE/
DE]; Am Bürenbach 3, 40724 Hilden (DE).

(74) Anwalt: **BRÖCHER, Dirk**; Gille Hrabal, Brucknerstr.
20, 40593 Düsseldorf (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, 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, 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,
MD, 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: HUMIDITY INDICATOR

(54) Bezeichnung : FEUCHTIGKEITSINDIKATOR

(57) Abstract: During incubation in humid air, PAMA absorbs comparatively large quantities of water (% by solid weight). This is accompanied by a significant change in the lyophilisate from dry and cross-linked PAMA. This change manifests itself in a shrinking of the initial lyophilisate. It can be assumed that both observations (water absorption and shrinkage) are causally linked.

(57) Zusammenfassung: PAMA nimmt bei Inkubation in feuchter Luft vergleichsweise große Mengen an Wasser auf (% Feststoffgewicht). Damit einher geht eine starke Veränderung des Lyophilisats aus trockenem und vernetztem PAMA. Diese Veränderung manifestiert sich in einem Zusammenschrumpfen des ursprünglichen Lyophilisats. Es kann vermutet werden, dass beide Beobachtungen (Wasseraufnahme und Schrumpfen) ursächlich in Zusammenhang stehen.



WO 2012/062841 A1

FEUCHTIGKEITSINDIKATOR

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Lyophilisat, welches mindestens eine feuchtigkeits-indizierende Verbindung aufweist. Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist
5 die Verwendung von mindestens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Poly(acrylsäure-co-maleinsäure), Polyacrylsäure und/oder einem Salz davon, zur Feuchtigkeitsindikation sowie ein Verfahren zur Überwachung des Feuchtigkeitsgehalts von einem Lyophilisat.

10 Die Gefriertrocknung, auch als Lyophilisation oder Sublimationstrocknung bezeichnet, ist ein Verfahren zur schonenden Herstellung hochwertiger Produkte. Bei der Gefriertrocknung verdampfen die Eiskristalle direkt ohne den Übergang in den flüssigen Zustand. Das Endprodukt der Gefriertrocknung wird als Lyophilisat bezeichnet.

15 In der Biotechnologie und Pharmaindustrie dient die Gefriertrocknung der Stabilisierung und Haltbarmachung von flüssigen Reagenzienformulierungen, wie Pharmaka und Enzymlösungen. Mit dieser Methode ist es beispielsweise möglich, die Aktivität von empfindlichen Enzymen bei Raumtemperatur für lange Zeit aufrecht zu erhalten. Um den Inhalt der getrockneten Probe einzusetzen (als Pharmakum oder für biologische Reakti-
20 onen, wie beispielsweise der PCR (Polymerase Chain Reaction (PCR, Polymerase Kettenreaktion))) wird das Lyophilisat mit einem adäquaten Lösungsmittel, bei welchem es sich in der Regel um Wasser handelt, versetzt. Dies führt zu einer sofortigen Rücklösung der getrockneten Inhaltsstoffe, welche dann in Lösung wieder ihre ursprüngliche Wirkung entfalten.

25

Die Handhabung von Lyophilisaten wird durch die Gegenwart von Feuchtigkeitsindikatoren erleichtert, welche den Gehalt an Feuchtigkeit in dem Lyophilisat angeben. Die auf dem Markt erhältlichen Feuchtigkeitsindikatoren beruhen im Wesentlichen auf einer Farbreaktion getrockneter Salze beim Rückfeuchten des Lyophilisats. Das Indikatorsystem kann dabei direkt auf ein Trocknungsmittel oder auf ein Trägermaterial, beispiels-
30 weise Papier, aufgetragen sein. Im Allgemeinen schließt sich an dieses Auftragen eine Trocknung des resultierenden Indikatorsystems an, so dass dieses in einem farblichen Ausgangszustand „trocken“ vorliegt. Kommt das Indikatorsystem anschließend mit Feuchtigkeit in Berührung, verändert das System seine Farbe. Durch die Auswahl geeig-

neter Systeme ist dadurch die genaue Luftfeuchte bzw. die Materialfeuchte der Trägermaterialien bestimmbar.

5 Üblicherweise verwendete Trocknungsmittel sind Silikagele, Tonerde oder Molekularsiebe.

Ein Beispiel, nach welchem ein Feuchtigkeitsindikator mit Farbumschlag hergestellt werden kann, offenbart das US-Patent US 6,655,315. In diesem US-Patent wird ein Feuchtigkeitsindikator beschrieben, welcher einen mit Kupferchlorid oder mit einem oder mehreren, zur Freisetzung von Cu^{2+} -Ionen fähigen Salzen gefärbt ist. Zusätzlich umfasst der
10 Feuchtigkeitsindikator ein oder mehrere Metallchloride. Nachteilig an diesem Indikationssystem ist im Wesentlichen, dass es ein Verbundstoff aus mehreren Komponenten ist, die vor der Verwendung des Feuchtigkeitsindikators erst in speziellen Verhältnissen gemischt werden müssen. Darüber hinaus ist es bei einigen biologischen Proben unerwünscht, wenn farbige Feuchtigkeitsindikatoren verwendet werden, da durch die Farbe
15 des Indikators bzw. den auftretenden Farbumschlag eine optische Beeinträchtigung der Probe auftreten kann. Hinzu kommt noch, dass der in US 6,655,315 beschriebene Feuchtigkeitsindikator schon deshalb keiner biologischen Reaktion zugesetzt werden würde, weil er auch im Wesentlichen aus Trägermaterial und meist zweiwertigen Salzen
20 (Co^{2+} , Mg^{2+} , Cr^{2+} etc.) besteht. Letztere sind oftmals stark inhibitorisch auf Enzymreaktionen, wie eine PCR. Darüber hinaus wird in dem US-Patent US 6,665,315 die Verwendung von Feuchtigkeitsindikatoren in Lyophilisaten überhaupt nicht erwähnt.

Die WO 92/02804 A offenbart einen Feuchtigkeitsindikator, der Kobaltthiocyanat als Indikatormaterial und ein hygroskopisches Salz umfasst. Das hygroskopische Salz wird ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Kupferchlorid, Natriumchlorid und Kaliumchlorid. Dieses Indikatorsystem eignet sich aufgrund der verwendeten Komponenten nicht zur Verwendung in empfindlichen biologischen Lyophilisaten. Zusätzlich wird in der WO
25 92/02804 A nicht erwähnt, dass sich der Feuchtigkeitsindikator überhaupt für die Anwendung in Lyophilisaten eignet.
30

Demgemäß stellt sich die vorliegende Erfindung die Aufgabe, ein Indikatorsystem für Feuchtigkeit in Lyophilisaten bereitzustellen, welches insbesondere die zuvor beschriebenen Nachteile nicht aufweist.

Insbesondere stellt sich die vorliegende Erfindung die Aufgabe, einen Feuchtigkeitsindikator bereitzustellen, der in Kombination mit Lyophilisaten von biologischen Proben verwendet werden kann. Unter diesem Gesichtspunkt wird dabei jedoch nicht verstanden, dass die biologische Probe unmittelbar zusammen mit dem Feuchtigkeitsindikator aufbewahrt wird, sondern insbesondere, dass der Feuchtigkeitsindikator räumlich getrennt von der biologischen Probe aufbewahrt wird, jedoch sich in der gleichen Atmosphäre wie die biologische Probe befindet. Sollte es in solch einer Anordnung, umfassend – räumlich voneinander getrennt, jedoch in der gleichen Atmosphäre – mindestens eine biologische Probe und mindestens einen Feuchtigkeitsindikator zu einer Feuchtigkeitsaufnahme kommen, soll dieses von dem getrennt vorliegenden Feuchtigkeitsindikator angezeigt werden. Dabei sollte sich der Feuchtigkeitsindikator vorzugsweise leicht herstellen lassen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden Untersuchungen an unterschiedlichen Indikatorsystemen zur Anwendung bei Lyophilisaten durchgeführt und es wurde festgestellt, dass sich im Allgemeinen Verbindungen als Indikatorsystem in Lyophilisaten eignen, welche eine Volumenreduktion im Vergleich zur im Wesentlichen Abwesenheit von Wasser von mindestens 30 %, weiter bevorzugt 60 %, besonders bevorzugt 90 %, in Gegenwart einer definierten relativen Luftfeuchte der umgebenden Luft von mindestens 70 %, bevorzugter 50 %, noch bevorzugter 30 %, besonders bevorzugt 10 %, aufweisen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer im Wesentlichen Abwesenheit von Wasser eine relative Luftfeuchtigkeit von 0 % verstanden.

Gelöst wird die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe daher zunächst durch die Verwendung von einem Feuchtigkeitsindikator in Kombination mit einem Lyophilisat, welcher eine Volumenreduktion im Vergleich zur im Wesentlichen Abwesenheit von Wasser von mindestens 30 %, weiter bevorzugt 60 %, besonders bevorzugt 90 %, in Gegenwart einer definierten relativen Luftfeuchte der umgebenden Luft von mindestens 70 %, bevorzugter 50 %, noch bevorzugter 30 %, besonders bevorzugt 10 %, aufweist.

Dabei ist es insbesondere bevorzugt, wenn der Feuchtigkeitsindikator selbst ein Lyophilisat ist. Dadurch kann die Herstellung von Anordnungen, umfassend mindestens eine biologische Probe und mindestens einen Feuchtigkeitsindikator, erheblich vereinfacht

werden, da es beispielsweise möglich ist, die mindestens eine biologische Probe und den Feuchtigkeitsindikator zeitgleich zu lyophilisieren.

5 Darüber hinaus benötigt die erfindungsgemäße Lösung des zugrundeliegenden Problems nicht die Verwendung von einem Trägermaterial, auf welchem das die Feuchtigkeit indizierende System (Verbindung, Komplex, Verbundmaterial etc.) aufgebracht ist, da es selbst als eigenständiges Lyophilisat vorliegt.

10 Der erfindungsgemäße Feuchtigkeitsindikator ist also selbst ein Lyophilisat und damit inherent dazu geeignet, den Feuchtigkeitszustand von lyophilisierten Proben, die beispielsweise in benachbarten Kavitäten vorliegen, zu überwachen.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung löst sich der Feuchtigkeitsindikator nach Aufnahme einer definierten Menge von mindestens 60 Gew.-% Wasser, bezogen auf das Ausgangsgewicht des trockenen Feuchtigkeitsindikators, vollständig auf.

20 Gelöst wird die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe ferner durch die Verwendung von einem Feuchtigkeitsindikator, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Poly(acrylsäure-co-maleinsäure), Polyacrylsäure und/oder einem Salz davon, in einem Lyophilisat.

25 Demgemäß betrifft die vorliegende Erfindung zunächst ein Lyophilisat, umfassend mindestens einen Feuchtigkeitsindikator, welcher eine Volumenreduktion im Vergleich zur im Wesentlichen Abwesenheit von Wasser von mindestens 30 %, weiter bevorzugt 60 %, besonders bevorzugt 90 %, in Gegenwart einer definierten relativen Luftfeuchte der umgebenden Luft von mindestens 70 %, bevorzugter 50 %, noch bevorzugter 30 %, besonders bevorzugt 10 %, aufweist.

30 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einem Feuchtigkeitsindikator eine einzelne Verbindung, jedoch auch eine Zusammensetzung mehrerer einzelner Verbindungen verstanden.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Lyophilisat, umfassend mindestens einen Feuchtigkeitsindikator, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Poly(acrylsäure-co-maleinsäure), Polyacrylsäure und/oder einem Salz davon.

5 Bei der erfindungsgemäß vorgesehenen Verbindung Poly(acrylsäure-co-maleinsäure) (CAS-Nummer 52255-49-9) handelt es sich vorzugsweise um ein Copolymer mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von ungefähr 50000; ferner ist das molare Verhältnis von Acrylsäure- und Maleinsäure-Monomeren vorzugsweise ungefähr 1:1.

10 Insbesondere eignet sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Verwendung des Natriumsalzes der Poly(acrylsäure-co-maleinsäure).

Da der erfindungsgemäße Feuchtigkeitsindikator selbst vorzugsweise ein Lyophilisat darstellt, beträgt der Gehalt an feuchtigkeitsindizierender Verbindung, jeweils bezogen
15 auf das Lyophilisat, vorzugsweise 30 bis 100 Gew.-%, bevorzugt 40 bis 100 Gew.-%, besonders bevorzugt 50 bis 100 Gew.-%.

Der erfindungsgemäß vorgesehene Feuchtigkeitsindikator wird vorzugsweise als Lyophilisat in Kombination mit zusätzlich mindestens einem weiteren biologisch aktiven Bestandteil verwendet, wobei der Feuchtigkeitsindikator und der mindestens eine biologisch aktive Bestandteil räumlich voneinander getrennt vorliegen, jedoch gleichzeitig
20 sich in der gleichen Atmosphäre befinden.

Dieser weitere biologisch aktive Bestandteil kann beispielsweise ausgewählt werden aus
25 der Gruppe, bestehend aus Blut, dessen Bestandteile; Proteine, insbesondere Enzyme; Viren; Bakterien; Hormone; Antibiotika; Fettsäuren; Lipide; Kohlenhydrate mit beliebiger Kettenlänge; Impfstoffe; niedermolekulare chemische Verbindungen, deren Salze und Organika.

30 Die feuchtigkeitsindizierende Verbindung und/oder der mindestens eine biologisch aktive Bestandteil kann beispielsweise in einer Kavität auf einem PCR-Streifen eingebracht sein oder in einer Kavität auf einer Mikrotiterplatte, einem (ggf. nicht) standardisierten Reagiergefäß, in Reaktionsräumen, in mikrofluidischen Umgebungen oder Verbrauchsmaterialien vorliegen.

Das Lyophilisat der feuchtigkeitsindizierenden Verbindung kann im Allgemeinen ausgehend von zumindest einer wässrigen Lösung der feuchtigkeitsindizierenden Verbindung erhalten werden. Die wässrige Lösung kann dabei eine Konzentration an feuchtigkeitsindizierender Verbindung, jeweils bezogen auf die wässrige Lösung, von 0,01 bis 20 Gew.-%; bevorzugt 0,1 bis 5 Gew.-%, besonders bevorzugt 0,25 bis 2,5 Gew.-%, aufweisen. Die wässrige Lösung kann ferner zumindest einen weiteren biologisch aktiven Bestandteil gemäß der oben stehenden Definition umfassen.

Das erfindungsgemäße Lyophilisat kann beispielsweise gemäß folgender Verfahrensweise hergestellt werden:

- (i) Herstellen einer wässrigen Lösung, umfassend mindestens eine erfindungsgemäße feuchtigkeitsindizierende Verbindung;
- (ii) Einbringen bzw. Aufbringen der hergestellten Mischung in eine Kavität bzw. sonstige Oberfläche;
- (iii) Einfrieren und Inkubieren der aus Verfahrensschritt (ii) resultierenden Mischung; und
- (iv) Trocknen der aus Verfahrensschritt (iii) resultierenden Mischung in einem geeigneten Vakuum, wobei die Trocknungsphase eine Haupttrocknung und eine Nachtrocknung bei geeigneten Unterdrücken umfassen kann.

Während der Haupttrocknung wird das Wasser sublimiert, in dem das zu trocknende Produkt gelöst ist. Dies geschieht bei einem Vakuum, das dem Dampfdruck des Wassers bei der Temperatur entspricht, bei der die Trocknung durchführen möchte (Bsp.: das Produkt muss mindestens -40 °C kalt sein, damit es seine Struktur während der Trocknung nicht verändert, also lyophilisiert man während der Haupttrocknung mit 0,12 mbar. Dies ist der Dampfdruck des Wassers bei -40 °C. Dadurch wird die Temperatur zu trocknende Produkts solange bei -40 °C liegen, wie noch Wasser vorhanden ist). Die Nachtrocknung dient dazu, die Wassermoleküle zu entfernen, die direkt an das zu trocknende Produkt gebunden sind. Dazu muss ein Hochvakuum von bsp. 0,001 mbar angelegt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird unter einer Inkubation die Zeit verstanden, in der die zu trocknende Mischung eingefroren wird, wobei die Länge der Inkubation bei einer gegebenen Einfriertemperatur einen Einfluss auf die Eigenschaften des Lyophilisats

(speziell auf Aussehen und Struktur des Gefriertrocknungskuchens) aufweist und von dem Fachmann geeignet angepasst werden kann.

- 5 Das im Verfahrensschritt (ii) vorgesehene Einfrieren kann bei einer Temperatur von -10 bis -200 °C, bevorzugt -20 bis -80 °C, besonders bevorzugt -30 bis -50 °C, erfolgen. Die Dauer des Einfrierens kann 0,5 bis 24 Stunden, bevorzugt 0,5 bis 8 Stunden, besonders bevorzugt 1 bis 3 Stunden, betragen.

- 10 Während dieses Trocknungsschritts kann die Temperatur bis auf Raumtemperatur erhöht werden. Ein Nachtrocknen erfolgt vorzugsweise bei mindestens 20°C und einem Vakuum von 0.1 bis 0.00001 mbar, weiter bevorzugt 0.01 bis 0.0001 mbar, besonders bevorzugt 0.01 bis 0.001 mbar, für einen Zeitraum von vorzugsweise 0 bis 72 Stunden, weiter bevorzugt 1 bis 24 Stunden, besonders bevorzugt 3 bis 10 Stunden.

- 15 Das erfindungsgemäße Lyophilisat wird vorzugsweise in einem PCR-Gefäß, insbesondere einem PCR-Röhrchen, bereitgestellt.

- 20 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der zu lyophilisierenden Indikatorlösung hygroskopische Substanzen zugesetzt. Dies führt dazu, dass das Lyophilisat sein Volumen bereits bei geringeren Luftfeuchten verändert, als dies ohne Zusatz der Fall wäre.

- 25 Für die Wasseraufnahme und damit Gewichtszunahme ist im Wesentlichen die absolute Menge an feuchtigkeitsindizierender Verbindung in dem Lyophilisat entscheidend. Für die Volumenreduktion ist jedoch insbesondere die Prozentualität an feuchtigkeitsindizierender Verbindung in der Ursprungslösung (d.h. vor dem Lyophilisieren) von entscheidender Bedeutung: Das heißt, je höher die Ausgangskonzentration in der Lösung vor dem Trocknen, desto höher muss die Luftfeuchte sein, damit das Lyophilisat seine Gestalt verändert.

- 30 Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von einer feuchtigkeitsindizierenden Verbindung, welche eine Volumenreduktion im Vergleich zur im Wesentlichen Abwesenheit von Wasser von mindestens 30 %, weiter bevorzugt 60 %, besonders bevorzugt 90 %, in Gegenwart einer definierten relativen Luftfeuchte der um-

gebenden Luft von mindestens 70 %, bevorzugter 50 %, noch bevorzugter 30 %, besonders bevorzugt 10 % aufweist, zur Feuchtigkeitsindikation.

5 Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von einer feuchtigkeitsindizierenden Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Poly(acrylsäure-co-maleinsäure), Polyacrylsäure und/oder einem Salz davon, in einem Lyophilisat, zur Feuchtigkeitsindikation.

10 Gemäß den vorstehenden Erläuterungen erfolgt die Feuchtigkeitsindikation in einem Lyophilisat.

Weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Überwachung des Feuchtigkeitsgehalts von einem Lyophilisat, dadurch gekennzeichnet, dass

- 15 (i) ein Lyophilisat, umfassend mindestens eine erfindungsgemäße feuchtigkeitsindizierende Verbindung bereitgestellt wird; und
- (ii) das Volumen der feuchtigkeitsindizierenden Verbindung beobachtet wird.

20 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung kann das Volumen der feuchtigkeitsindizierenden Verbindung visuell überwacht werden, wobei es des Weiteren vorgesehen sein kann, dass das Beobachten des Volumens der feuchtigkeitsindizierenden Verbindung durch Vergleichsbeobachtung mit einer äquivalenten Blindprobe erfolgt.

25 Die vorliegende Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Begriffe und Abkürzungen, die im Folgenden benutzt werden:

LoC = Lab-on-a-Chip

PAMA = Poly(acrylsäure-co-maleinsäure), Na Salz

PEG = Polyethylenglykol

30 Lyophilisation = Synonym für Gefriertrocknung

MTP = Mikrotiterplatte

rel. LF = relative Luftfeuchte

Versuch 1: Veränderung der Gestalt von gefriergetrocknetem PAMA durch Feuchteeinwirkung

Eine PAMA-Lösung bildet beim Gefriertrocknen ein dichtes Netzwerk an PAMA als Feststoff. Dies ist zu daran zu erkennen, dass PAMA-Lyophilisate einen weißen Körper besitzen, den der Fachmann als „Kuchen“ bezeichnet. Dies ist an sich nichts Ungewöhnliches. Überraschend hingegen war die Beobachtung, dass dieser Kuchen bei Einwirkung von feuchter Luft verschwindet, wie folgender Versuch zeigt.

- 5 50 µl einer 0,5%- bzw. 5%-PAMA-Lösung wurde in PCR-Streifen gefüllt und gefriergetrocknet (Einfrieren bei -80 °C, 2 h Inkubation bei -50 °C, Trocknung im Vakuum (0.2 mbar) bei steigenden Temperaturen (-40 °C bis 20 °C), Nachtrocknung bei 20 °C und 0.002 mbar). In den Deckel der Lyophilisat-bestückten PCR-Tubes wurden 10 µl Wasser pipettiert und das Tube mit dem passenden Deckel verschlossen. Im Falle des 0,5%-
- 10 PAMA-Lyophilisats begann der Kuchen nach 2 – 4 min „dahinzuschmelzen“. Er verringerte sein Volumen und die Oberfläche sah zunehmend glasig aus (Figur 1). Das 5%-PAMA-Lyophilisat hingegen zeigte auch nach 15 min Inkubation keine Veränderung seiner Morphologie (Figur 2).
- 15 Die Ergebnisse des Versuches 1 sind in den Figuren 1a und 1b dargestellt. Dabei umfassen die rechten vier Tubes die entsprechenden Lyophilisate, zweimal ausgehend von der 0,5 % PAMA-Lösung (1. und 2. Tube von links) und zweimal ausgehend von der 5 % PAMA-Lösung (3 und 4. Tubes von links). In den Figuren 1a und 1b enthält Tube 2 (von links) auf beiden Bildern mit der Aufschrift „0,5“ das Lyophilisat, welches ausgehend von
- 20 der 0,5%-PAMA-Lösung erhalten wurde (Links (Figur 1a): vor Feuchte-Inkubation, Rechts (Figur 1b): Feucht-Inkubation für 15 min). Man erkennt, dass sich das Lyophilisat in Tube 2 (von links) nach der Feucht-Inkubation aufgelöst hat, während das Lyophilisat, welches ausgehend von der 5%-PAMA-Lösung erhalten wurde, sich nach der gleichen Feucht-Inkubation noch nicht aufgelöst hat (auf dem rechten Bild (Figur 1b) befinden sich die
- 25 Lyophilisate im Deckel der Tubes 3 und 4).
- 30

Ein Vergleich der Figuren 2a und 2b (gleiche Anordnung der Tubes wie in Figuren 1a und b) zeigt, wie bereits erwähnt, dass das 5%-PAMA-Lyophilisat auch nach 15 min Inkubation keine Veränderung seiner Morphologie zeigt.

Versuch 2:

Im Folgenden ist ein Experiment gezeigt, bei dem 0,5% / 1% / 5% / 10%-PAMA-Lösungen gefriergetrocknet und anschließend relativen Luftfeuchten von 43 – 59 %
5 ausgesetzt wurden. Die verschiedenen PAMA-Kuchen wurden wie oben beschrieben in PCR-Tubes hergestellt. Dann wurden die PCR-Tubes in einem Exsikkator in Gegenwart einer CaCl_2 -Lösung inkubiert (offen, ohne Deckel) und in Intervallen fotodokumentiert. Die relative Luftfeuchte in dem Exsikkator betrug dadurch 43 % (zu Beginn) bis 59 % (am Ende des Experiments). Abbildung 3 zeigt, dass der 0,5%-PAMA-Kuchen nach weniger
10 als 2 h bereits stark geschrumpft ist. Für den gleichen Effekt brauchte der 1 %-Ansatz ca. 3 h, der 5%-Ansatz mehr als 5 h. Der 10%-Ansatz zeigte erst bei der finalen Fotodokumentation nach 10 Tagen ein vollständig geschrumpftes Lyophilisat. Allgemein war die finale Größe des feuchtgewordenen PAMA-Kuchens proportional zur vorhandenen PAMA-Menge.

15 Die Ergebnisse sind in der Figur 3 dargestellt, welche eine Zeitreihe des Feuchtwerdens von PAMA-Lyophilisaten (0 Stunden bis 10 Tage) zeigt.

Versuch 3:

20 Die folgenden beiden Experimente zeigen mit einfachsten Mitteln, wie man den Effekt des „Zusammenschmelzens“ von PAMA für einen Feuchtigkeitsindikator nutzen kann.

Ein Parafilm wurde von unten mit dem englischen Wort „humid“ beschrieben. Danach
25 wurde auf die Oberseite des Parafilms eine 0,5%-PAMA-Lösung aufgebracht und wie im Versuch 1 beschrieben gefriergetrocknet.

Der so vorbereitete PAMA-Kuchen auf Parafilm wurde in ein halboffenes Plastikästchen gelegt, in dem sich 4 ml Wasser befanden. Die Veränderungen des PAMA-Kuchens
30 wurden über die nächsten 1,5 h fotografisch dokumentiert (Abb. 4). Man sieht deutlich, wie der PAMA-Kuchen quasi unsichtbar wird und den darunterliegenden Schriftzug „humid“ also „feucht“ erkennen lässt.

Figur 4a zeigt links den gefriergetrockneten PAMA-Kuchen vor dem Feuchtwerden, Figur 4b zeigt den PAMA-Kuchen nach 45min an feuchter Luft und Figur 4c zeigt den PAMA-Kuchen nach 1h 45min an feuchter Luft.

5 Versuch 4:

Die MTP-Vertiefungen wurden von außen mit rotem Permanentmarker beschrieben, so dass sich eine rote Fläche ergab. Je 2 MTP-Vertiefungen wurden mit je 200 µl 0,1% / 0,5% / 2% / 5% PAMA inkl. je 2 µl Malachitgrünlösung befüllt. Danach wurde die befüllte MTP wie im Versuch 1 beschrieben gefriergetrocknet.

Die so präparierte MTP wurde nacheinander 14 d auf der Laborbank (20 °C, 35 % rel. LF), 10 d im Exsikkator (22 °C, 45 % rel. LF) sowie 2 d im Exsikkator (22 °C, 75 % rel. LF) gelagert. Nach 2 Tagen auf der Laborbank war keine weitere Veränderung der PAMA-Kuchen bei 35 % rel. LF mehr zu erkennen (Figur 5a). Nach 10 Tagen bei 45 % rel. LF waren die 0,1%- und 0,5%-PAMA-Kuchen geschrumpft (Figur 5b). Nach 2 Tagen bei 75 % rel. LF waren schließlich alle PAMA-Kuchen zusammengeschrumpft (Figur 5c).

Versuch 5:

20

Dieses Experiment zeigt, dass nicht jede Polymersubstanz eine Volumenreduktion bei Feuchtwerden zeigt. Verglichen wurden Polyacrylsäure (PAA, Molekulargewicht 250.000), PEG3000, PEG8000 sowie PEG35000 (PEG = Polyethylenglykol). Je 100 µl dieser Substanzen wurden, wie bereits mehrfach beschrieben, in PCR-Tubes gefüllt und gefriergetrocknet. Danach wurden die Lyophilisate steigenden Luftfeuchten ausgesetzt. Figur 6 zeigt, wie sich die Lyophilisat-Kuchen der einzelnen Chemikalien nach 8 Tagen Inkubation bei 75% rel. LF verändert haben. Man sieht deutlich, dass sich das Volumen des Kuchens aus Polyacrylsäure stark reduziert hat. Die PAA verhält sich folglich vergleichbar wie PAMA. Die drei PEG-Kuchen hingegen zeigen keinerlei Veränderung und sind folglich nicht als Substanzgrundlage für einen Feuchtigkeitsindikator im Sinne der vorliegenden Erfindung geeignet.

In der Figur 6 sind die gefriergetrockneten Kuchen aus je 0,5%-Lösungen von PAA, PEG8000, PEG35000, PEG3000 in der angegebenen Reihenfolge von links nach rechts dargestellt.

Versuch 6: Quantifizierung der Wasseraufnahme durch das PAMA-Lyophilisat

Um das Phänomen der extremen Volumenreduktion des PAMA-Kuchens bei Feuchtwerden besser zu verstehen, wurde bestimmt, bei welchen Luftfeuchtgraden die Änderung der Morphologie stattfindet und wie viel Wasser dabei aufgenommen wird.

Es wurden Lösungen mit verschiedenen PAMA-Konzentrationen (1 – 8 % w/v) sowie verschiedene Volumen einer 10%-PAMA-Lösung in PCR-Streifen pipettiert und wie im ersten Experiment beschrieben gefriergetrocknet. Die PCR-Tube-Streifen wurden zerschnitten und die einzelnen Tubes mit den Lyophilisaten gewogen. Diese wurden dann für 4 Tage einer relativen Luftfeuchte von ca. 60 % bei ca. 20 °C ausgesetzt. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die PCR-Tubes erneut gewogen und die Gewichts-
differenz zwischen trockenem und feuchten Zustand) gegen die Ausgangsmenge an PAMA auf, sieht man eine ganz klare Proportionalität zwischen aufgenommener Wassermenge und ursprünglich eingetrocknetem PAMA-Lösungsvolumen (Figur 7a) bzw. der PAMA-Konzentration der eingetrockneten PAMA-Lösung (Figur 7b). Beide Beobachtungen legen nahe, dass die Menge des aufgenommenen Wassers zwar von der initialen PAMA-Menge abhängig ist, nicht jedoch von der ursprünglichen PAMA-Konzentration.

Versuch 7:

Mit diesem Experiment lässt sich klar belegen, dass tatsächlich lediglich die absolut vorhandene PAMA-Menge und nicht die Konzentration der Ursprungslösung bestimmt, wie viel Wasser von einem PAMA-Gefrier Trocknungskuchen aufgenommen wird.

Dazu wurden

a) 20 – 100 µl 10% PAMA-Lösungen und

b) je 80 µl 1- 8 %-PAMA-Lösungen

in PCR-Tubestrips gefüllt (als Triplikat) und wie eingangs beschrieben gefriergetrocknet. Die Gewichte der trockenen PAMA-Kuchen wurden mit einer Feinwaage bestimmt. Anschließend wurden die offenen Tubes steigenden Luftfeuchten (9%, 33%, 45%, 75%)

ausgesetzt, wobei jeweils ca. 1 Woche bei einer bestimmten Luftfeuchte inkubiert wurde. Vor jedem Wechsel zur nächsthöheren LF wurde das Gewicht der PAMA-Kuchen erneut bestimmt.

- 5 Aus den Figuren 8a und 8b sowie Tabellen 1 und 2 geht hervor, dass beide Ansätze, sowohl a) als auch b), die gleiche Gewichtszunahme pro Milligramm PAMA-Ausgangsgewicht aufweisen.

Tabelle 1: Gewichtszunahme von PAMA-Lyophilisaten (hergestellt nach Ansatz a)) bei Inkubation an verschiedenen Luftfeuchten

10

mg PAMA	Mittlere H ₂ O-Aufnahme [mg]			Standardabweichung H ₂ O-Aufnahme [mg]		Gewichtszunahme [% PAMA-Gewicht]		
	4d@35%	5d@45%	2d@75%	5d@45%	2d@75%	4d@35%	5d@45%	2d@75%
2	0,6	0,6	1,4	0,2	0,1	30	32	70
4	0,8	1,1	2,7	0,0	0,0	20	28	68
6	1,2	1,7	4,0	0,2	0,2	20	28	67
8	1,7	2,2	5,2	0,1	0,1	21	27	65
10	2,0	2,6	6,4	0,1	0,1	20	26	64
Mittlere Gewichtszunahme [Gew.-%]:						22	28	67

Tabelle 2: Gewichtszunahme von PAMA-Lyophilisaten (hergestellt nach Ansatz b)) bei Inkubation an verschiedenen Luftfeuchten

15

mg PAMA	Mittlere H ₂ O-Aufnahme [mg]			Standardabweichung H ₂ O-Aufnahme [mg]		Gewichtszunahme [% PAMA-Gewicht]		
	4d@35%	5d@45%	2d@75%	5d@45%	2d@75%	4d@35%	5d@45%	2d@75%
0,8	0,2	0,3	0,6	0,1	0,1	25	33	75
1,6	0,3	0,4	1,1	0,1	0,1	19	27	67
3,2	0,6	0,9	2,3	0,1	0,1	19	29	71
6,4	1,3	1,8	4,2	0,1	0,1	20	28	66
Mittlere Gewichtszunahme [Gew.-%]:						21	29	70

Versuch 8:

- 20 In diesem Experiment wurde bestimmt, wie viel Wasser PEG-Lyophilisate (PEG = Polyethylenglykol) im Vergleich zu PAMA-Lyophilisaten aufnehmen. Dazu wurden abermals je 4x 100µl 5% PAMA- bzw. PEG8000-Lösungen in PCR-Tubes gefriergetrocknet (Figur 9a: 4 Tubes links mit PAMA und 4 Tubes rechts mit PEG8000). Die Gewichte der trockenen Substanzen wurden bestimmt. Anschließend wurden die Lyophilisate für 4 Tage einer

relativen Luftfeuchte von 75% ausgesetzt und erneut gewogen. Figuren 9a und 9b zeigen Fotos der Ansätze vor und nach dem Feuchtwerden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die PEG8000-Lyophilisate (4 Tubes von rechts) keine Volumenreduktion aufwiesen, während die PAMA-Lyophilisate (4 Tubes von links) sehr stark zusammenschrumpften (Figur 8b). Die Gewichtsbestimmung ergab, dass die PAMA-Ansätze bei gleichem Feststoffgewicht mit 3,35 mg ca. dreimal mehr Wasser aufgenommen hatten als die PEG8000-Ansätze (1,05 mg). PAMA nimmt somit etwa 67% seines Eigenfeststoffgewichts an Wasser auf (Messwert durch mehrere Versuche bestätigt), während es bei PEG8000 nur 21% sind. Vermutlich ist diese hohe Wasseraufnahmekapazität der Grund für die Lyophilisatveränderungen bei PAMA.

Versuch 9:

Es wurden Lösungen mit verschiedenen PAMA-Konzentrationen (0,01 – 1 % w/v) in Duplikaten in PCR-Streifen pipettiert und wie im ersten Experiment beschrieben gefriergetrocknet. Das Ergebnis ist in Abbildung 10 zu sehen. Das Experiment zeigte, dass man mindestens 0,25% PAMA in Lösung haben muss, damit die Gefriertrocknung einen Kuchen von guter Qualität erzeugt.

Figur 10 zeigt Gefriertrocknungskuchen von Lösungen mit steigenden PAMA-Konzentrationen (von links oben nach rechts unten: (je 2x) 0,01% / 0,025% / 0,05% / 0,1% / 0,25% / 0,5% / 1%).

Versuch 10:

Es wurden Lösungen mit verschiedenen PAMA- (0,5 bzw. 1 % w/v) und Cäsiumfluorid-Konzentrationen (0/20/30/40mM bzw. 50/60/70/80 mM CsF) in PCR-Streifen pipettiert und wie im ersten Experiment beschrieben gefriergetrocknet (Figur 11a). Anschließend wurden die offenen Tubes nacheinander steigenden Luftfeuchten ausgesetzt (7 Tage 9%, 14 Tage 24%, 1 Tag 34%). Nach 1 Tag bei 34% rel. LF schrumpften die meisten Ansätze stark zusammen (Figur 11b). Man kann deutlich erkennen, dass das Ausmaß der Schrumpfung mit der Konzentration an CsF im Ansatz korreliert.

Die Figuren 11a und 11b zeigen von links nach rechts Tubes mit folgenden CsF- & PAMA-Konzentrationen: 0mM & 0,5%, 20mM & 0,5%, 30mM & 0,5%, 40mM & 0,5%, 50mM & 1%, 60mM & 1%, 70mM & 1%, 80mM & 1%.

5 Versuch 11:

Es wurden Lösungen mit verschiedenen Volumina (25 - 100 μ l) von verschiedenen PAMA-Konzentrationen (0,25 - 5% w/v) wie im ersten Experiment beschrieben gefriergetrocknet. Figur 12a zeigt die Ansätze unmittelbar nach der Gefriertrocknung: erste Reihe von oben: je 2x je 25 μ l 0,25%, 0,5%, 1%, 2,5% PAMA; zweite Reihe von oben: 2x je 25 μ l 5% PAMA, je 2x je 50 μ l 0,25%, 0,5%, 1% PAMA; dritte Reihe von oben: je 2x je 50 μ l 2,5%, 5% PAMA; je 2x je 100 μ l 0,25%, 0,5% PAMA; unterste Reihe: je 2x je 100 μ l 1%, 2,5%, 5% PAMA.

Anschließend wurden die offenen Tubes einer relativen Luftfeuchte von 45% ausgesetzt. Bereits nach 3h schrumpften alle Lyophilisate mit 0,25% PAMA unabhängig vom eingetrockneten Ausgangsvolumen zusammen. Nach 1 Tag schließlich zeigten alle Ansätze mit kleiner gleich 1% PAMA unabhängig vom Ausgangsvolumen eine starke Schrumpfung. Alle 2,5% PAMA-Ansätze schrumpften – unabhängig vom Ausgangsvolumen – nur sehr wenig. Nur die 5% PAMA-Ansätze zeigten – wiederum unabhängig vom Ausgangsvolumen – keinerlei Schrumpfung. Figur 12b zeigt die selben Ansätze wie Figur 12a, jedoch nach der eintägigen Inkubation bei 45% relativer Luftfeuchte.

Patentansprüche

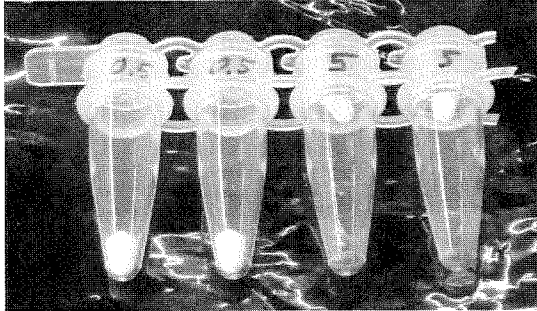
1. Lyophilisat, umfassend mindestens einen Feuchtigkeitsindikator, welcher eine Volumenreduktion im Vergleich zur im Wesentlichen Abwesenheit von Wasser von
5 mindestens 30 % in Gegenwart einer definierten relativen Luftfeuchte der umgebenden Luft von mindestens 10 % aufweist.
2. Lyophilisat, umfassend mindestens einen Feuchtigkeitsindikator, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Poly(acrylsäure-co-maleinsäure), Polyacrylsäure
10 und/oder einem Salz davon.
3. Lyophilisat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass Lyophilisat das Natriumsalz der Poly(acrylsäure-co-maleinsäure) umfasst.
- 15 4. Lyophilisat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Gehalt an Feuchtigkeitsindikator, jeweils bezogen auf das Lyophilisat, 30 bis 100 Gew.-%, bevorzugt 40 bis 100 Gew.-%, besonders bevorzugt 50 bis 100 Gew.-%, beträgt.
- 20 5. Lyophilisat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyophilisat gemäß folgender Verfahrensweise hergestellt wird:
 - (i) Herstellen einer wässrigen Lösung, umfassend mindestens eine feuchtigkeitsindizierende Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2;
 - (ii) Einbringen bzw. Aufbringen der hergestellten Mischung in eine Kavität bzw.
25 sonstige Oberfläche;
 - (iii) Einfrieren und Inkubieren der aus Verfahrensschritt (ii) resultierenden Mischung; und
 - (iv) Trocknen der aus Verfahrensschritt (iii) resultierenden Mischung in einem geeigneten Vakuum, wobei die Trocknungsphase eine Haupttrocknung
30 und eine Nachtrocknung bei geeigneten Unterdrücken umfassen kann.
6. Lyophilisat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyophilisat in einem PCR-Gefäß, Insbesondere einem PCR-Röhrchen, bereitgestellt wird.

- 5 7. Anordnung, umfassend mindestens ein Lyophilisat nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und zusätzlich mindestens einen biologisch aktiven Bestandteil, dadurch gekennzeichnet, dass das Lyophilisat und der mindestens eine biologisch aktive Bestandteil räumlich voneinander getrennt vorliegen, jedoch in Kontakt mit der gleichen Atmosphäre stehen.
- 10 8. Anordnung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der mindestens eine biologisch aktive Bestandteil ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Blut, dessen Bestandteile; Proteine, insbesondere Enzyme; Viren; Bakterien; Hormone; Antibiotika; Fettsäuren; Lipide; Kohlenhydrate mit beliebiger Kettenlänge; Impfstoffe; niedermolekulare chemische Verbindungen, deren Salze und Organika.
- 15 9. Anordnung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Feuchtigkeitsindikator und/oder der mindestens eine biologisch aktive Bestandteil jeweils getrennt voneinander in einer Kavität auf einem PCR-Streifen eingebracht ist oder in einer Kavität auf einer Mikrotiterplatte, einem gegebenenfalls nicht standardisierten Reagiergefäß, in Reaktionsräumen, in mikrofluidischen Umgebungen oder Verbrauchsmaterialien vorliegt.
- 20 10. Verwendung von mindestens einer feuchtigkeitsindizierenden Verbindung, welche eine Volumenreduktion von mindestens 30 % in Gegenwart einer definierten relativen Luftfeuchte der umgebenden Luft von mindestens 10 % aufweist.
- 25 11. Verwendung von mindestens einer Verbindung, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Poly(acrylsäure-co-maleinsäure), Polyacrylsäure und/oder einem Salz davon, zur Feuchtigkeitsindikation.
- 30 12. Verwendung nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Feuchtigkeitsindikation in einem Lyophilisat erfolgt.
- 35 13. Verfahren zur Überwachung des Feuchtigkeitsgehalts von einem Lyophilisat, dadurch gekennzeichnet, dass
- (i) ein Lyophilisat, umfassend mindestens eine feuchtigkeitsindizierende Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, bereitgestellt wird; und
 - (ii) das Volumen der feuchtigkeitsindizierenden Verbindung beobachtet wird.

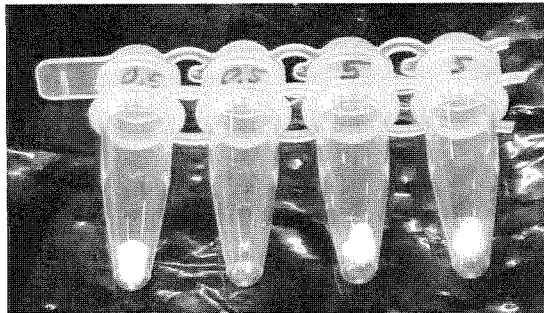
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Volumen der feuchtigkeitsindizierenden Verbindung visuell überwacht wird.
- 5 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Beobachten des Volumens der feuchtigkeitsindizierenden Verbindung durch Vergleichsbeobachtung mit einer äquivalenten Blindprobe erfolgt.

Abbildungen:

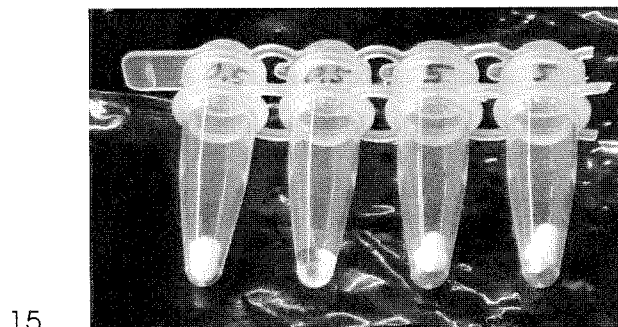
5 Figur 1a)



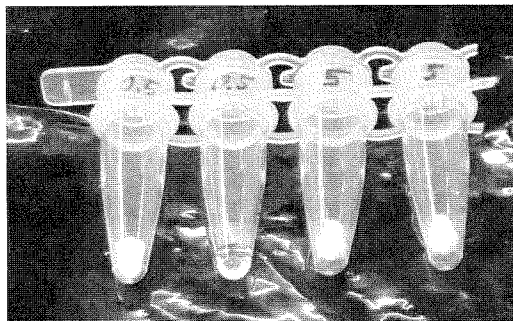
10 Figur 1b)



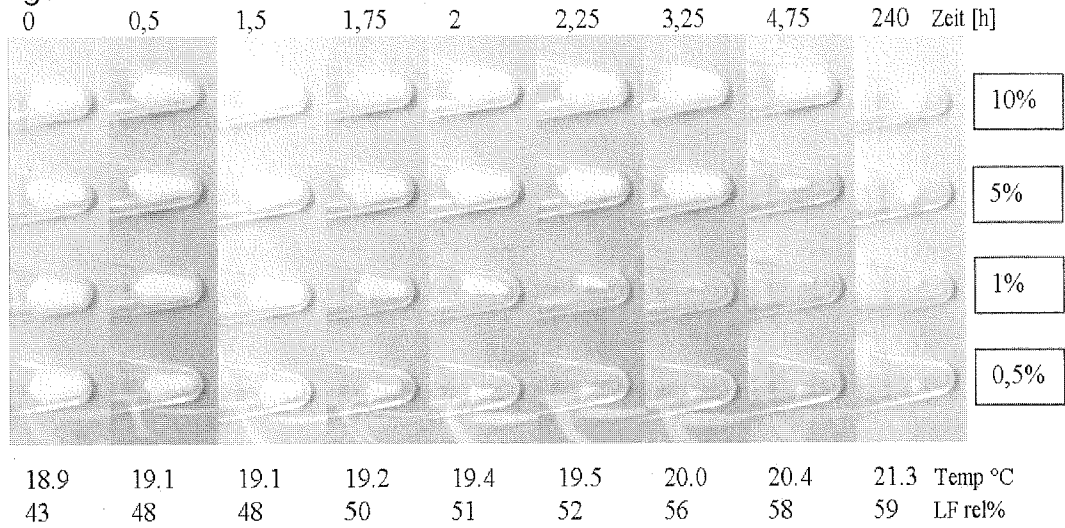
Figur 2a



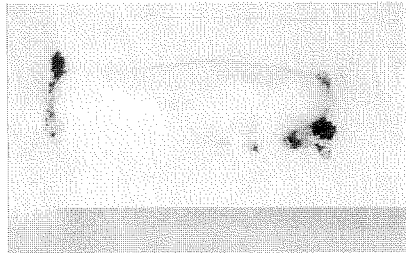
Figur 2b



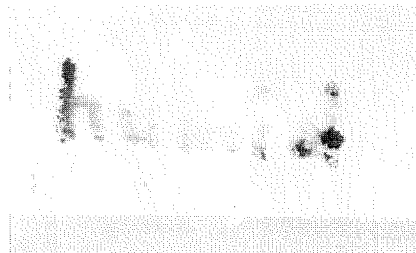
Figur 3



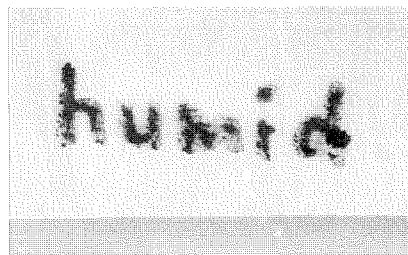
Figur 4a



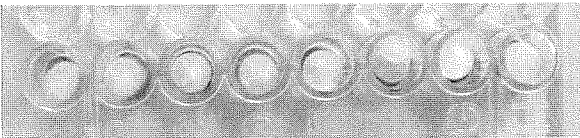
Figur 4b



Figur 4c

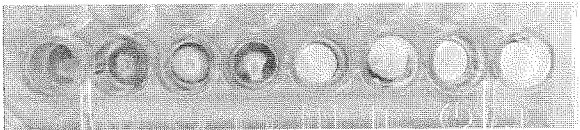


Figur 5a



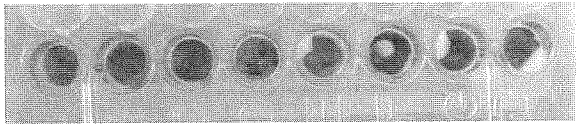
5

Figur 5b



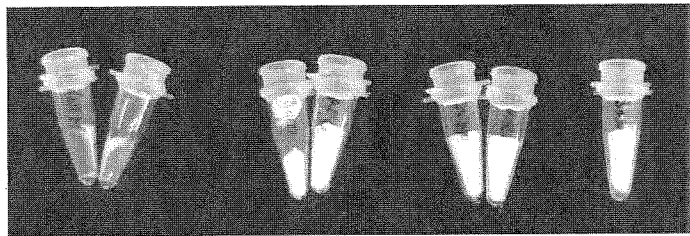
10

Figur 5c

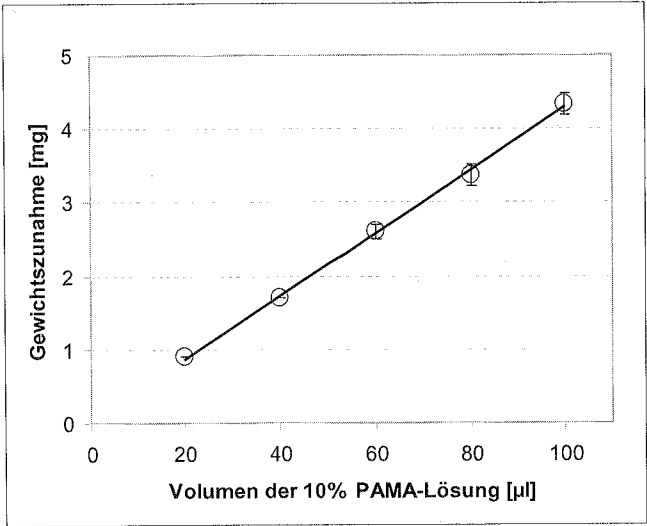


15

Figur 6

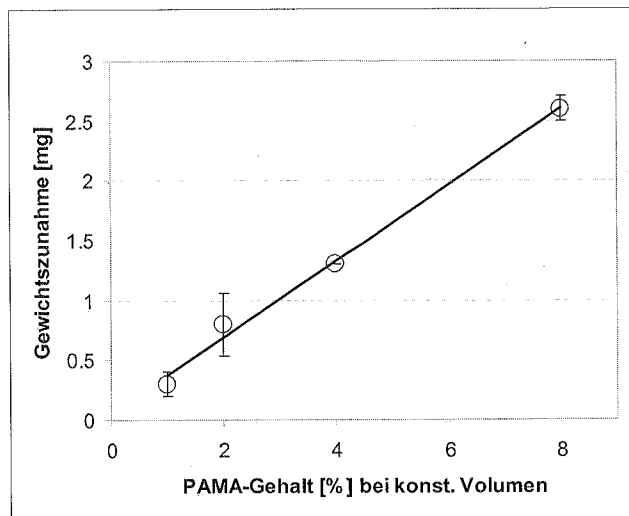


Figur 7a

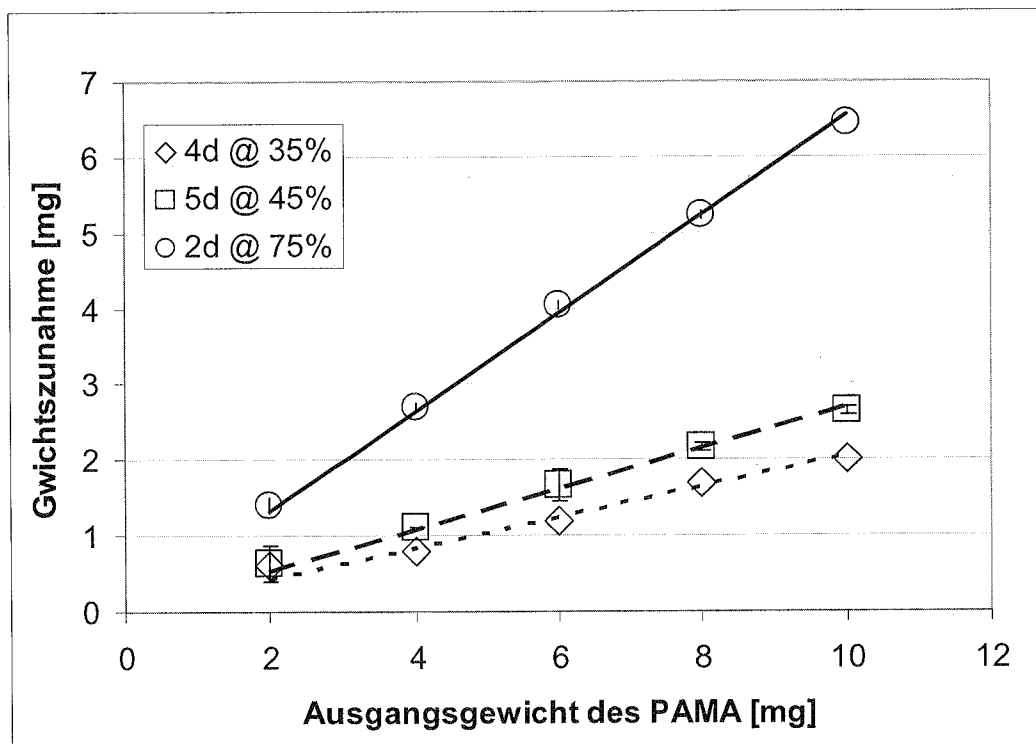


20

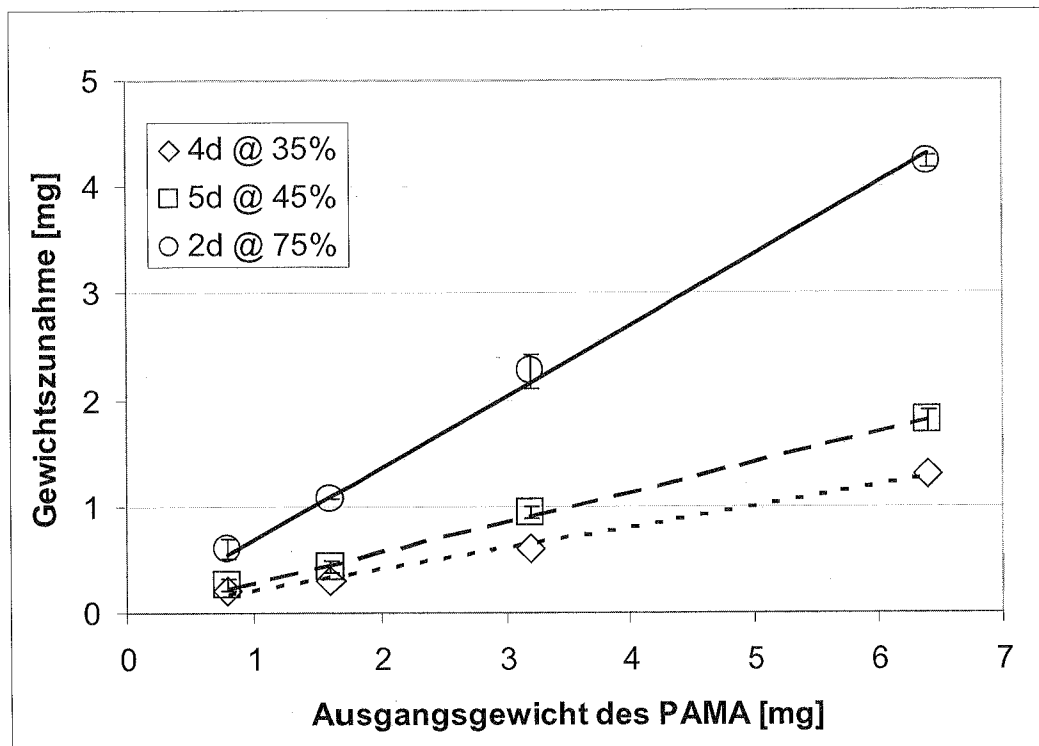
Figur 7b



5 Figur 8a



Figur 8b

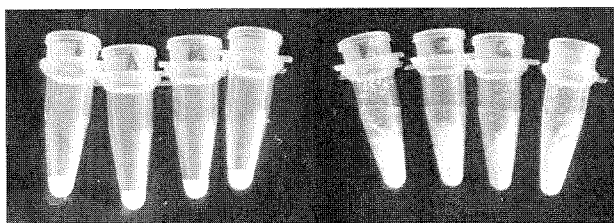


5 Figur 9a

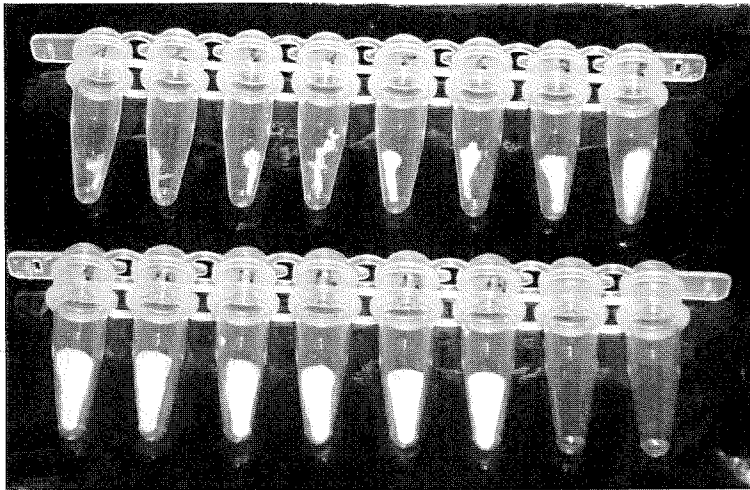


Figur 9b

10

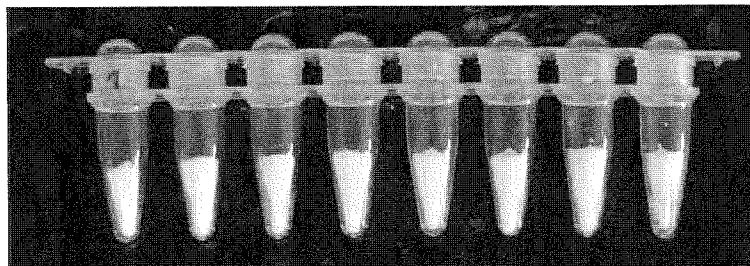


Figur 10



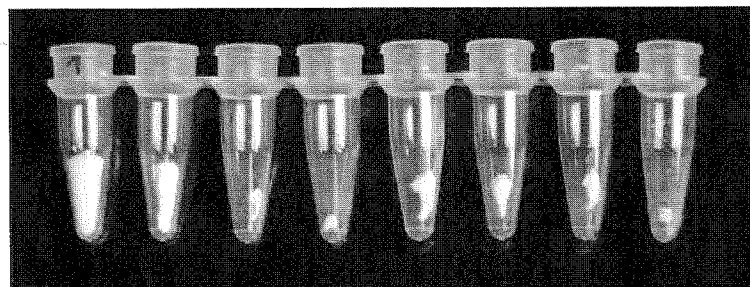
5

Figur 11a

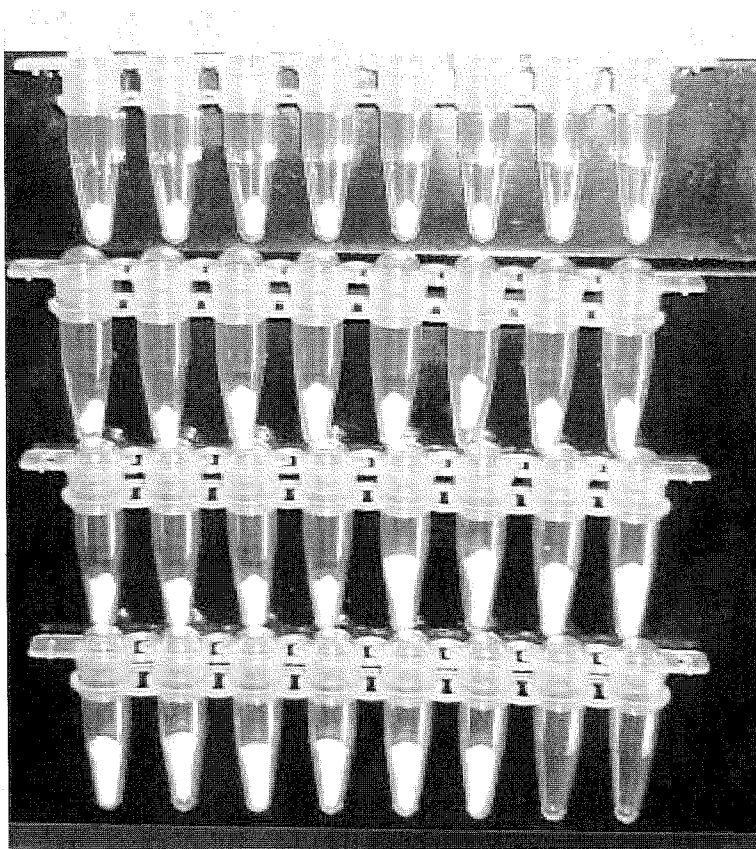


10

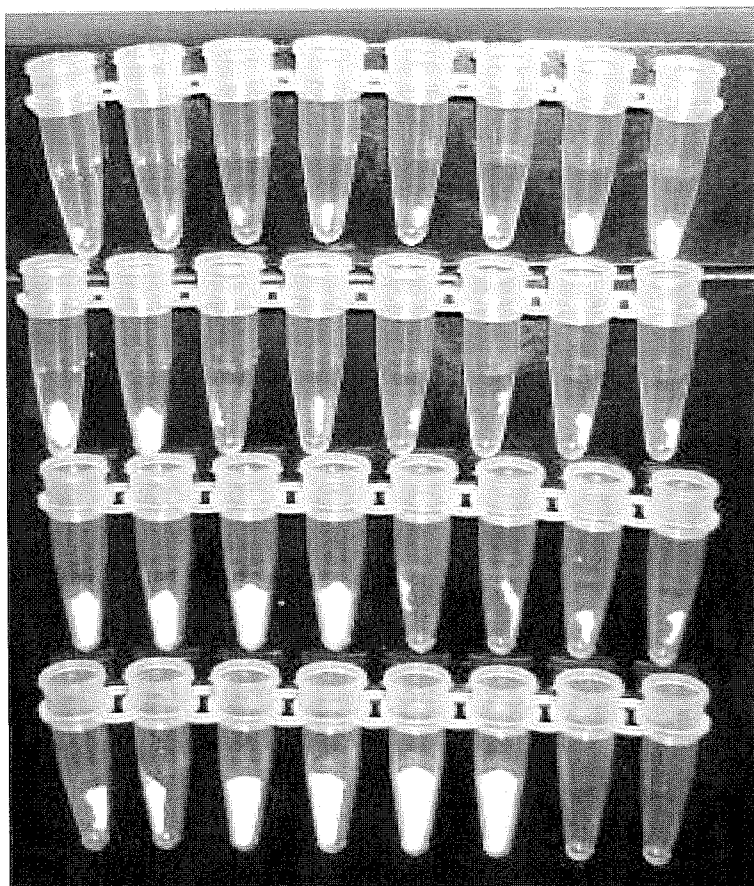
Figur 11b



Figur 12a



Figur 12b



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/069813

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N19/10 G01N25/62 G01N31/22 B01D53/26
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)

B01D G01N

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

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

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, FSTA, INSPEC, MEDLINE, 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,P	EP 2 253 665 A1 (SUWELACK SKIN & HEALTH CARE AG [DE]) 24 November 2010 (2010-11-24) paragraphs [0041] - [0043] paragraph [0048] paragraph [0066] paragraphs [0099] - [0107] claim 9 claims 9-11 ----- -/--	1,2,4,10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

6 February 2012

Date of mailing of the international search report

14/02/2012

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

Michalitsch, Richard

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/069813

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 195 08 029 A1 (SUEVERKRUEP RICHARD PROF DR [DE]; GRUNTHAL SABINE [DE]; DIESTELHORST M) 12 September 1996 (1996-09-12)	1-4,10
A	page 8 page 17 page 19 pages 33,34 page 38 claim 18	6-9, 11-15
X	----- WO 2007/006682 A1 (AGFA GEVAERT [BE]; DEROOVER GEERT [BE]; JAUNKY WOJCIECH [BE]; GROENEND) 18 January 2007 (2007-01-18)	1,2,10
A	paragraph [0144]	3-9, 11-15
X	----- US 4 175 207 A (ELLIOTT STANLEY B [US]) 20 November 1979 (1979-11-20)	10,11
A	page 3, lines 10-15 page 6, lines 20-41 page 23, lines 20-47	1-9, 12-15
A	----- US 4 990 284 A (LAUTERBACH JOHN H [US] ET AL) 5 February 1991 (1991-02-05) the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/069813

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2253665	A1	24-11-2010	BR PI1001930 A2 26-04-2011
		CN 101889958 A 24-11-2010	
		EP 2253665 A1 24-11-2010	
		JP 2010254688 A 11-11-2010	
		US 2010272669 A1 28-10-2010	
DE 19508029	A1	12-09-1996	AU 5103196 A 23-09-1996
		CA 2211888 A1 12-09-1996	
		DE 19508029 A1 12-09-1996	
		DE 19549506 C2 30-07-1998	
		EP 0813399 A1 29-12-1997	
		US 6228381 B1 08-05-2001	
		WO 9627350 A1 12-09-1996	
WO 2007006682	A1	18-01-2007	AT 449822 T 15-12-2009
		ES 2335358 T3 25-03-2010	
		JP 2009501254 A 15-01-2009	
		US 2008177016 A1 24-07-2008	
		WO 2007006682 A1 18-01-2007	
US 4175207	A	20-11-1979	NONE
US 4990284	A	05-02-1991	AU 620265 B2 13-02-1992
		AU 6451790 A 02-05-1991	
		BR 9005212 A 17-09-1991	
		CA 2027271 A1 12-04-1991	
		CH 680221 A5 15-07-1992	
		DE 4032025 A1 25-04-1991	
		EG 19161 A 29-09-1994	
		GB 2236758 A 17-04-1991	
		IL 95891 A 26-08-1994	
		TR 25757 A 01-09-1993	
		US 4990284 A 05-02-1991	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/069813

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01N19/10 G01N25/62 G01N31/22 B01D53/26
ADD.

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

B01D G01N

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

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

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, FSTA, INSPEC, MEDLINE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X,P	EP 2 253 665 A1 (SUWELACK SKIN & HEALTH CARE AG [DE]) 24. November 2010 (2010-11-24) Absätze [0041] - [0043] Absatz [0048] Absatz [0066] Absätze [0099] - [0107] Anspruch 9 Ansprüche 9-11 ----- -/-	1,2,4,10

☒ 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" 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 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 anderen 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

6. Februar 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

14/02/2012

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

Michalitsch, Richard

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 195 08 029 A1 (SUEVERKRUEP RICHARD PROF DR [DE]; GRUNTHAL SABINE [DE]; DIESTELHORST M) 12. September 1996 (1996-09-12)	1-4,10
A	Seite 8 Seite 17 Seite 19 Seiten 33,34 Seite 38 Anspruch 18 -----	6-9, 11-15
X	WO 2007/006682 A1 (AGFA GEVAERT [BE]; DEROOVER GEERT [BE]; JAUNKY WOJCIECH [BE]; GROENEND) 18. Januar 2007 (2007-01-18)	1,2,10
A	Absatz [0144] -----	3-9, 11-15
X	US 4 175 207 A (ELLIOTT STANLEY B [US]) 20. November 1979 (1979-11-20)	10,11
A	Seite 3, Zeilen 10-15 Seite 6, Zeilen 20-41 Seite 23, Zeilen 20-47 -----	1-9, 12-15
A	US 4 990 284 A (LAUTERBACH JOHN H [US] ET AL) 5. Februar 1991 (1991-02-05) das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/069813

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 2253665	A1	24-11-2010	BR PI1001930 A2 26-04-2011
		CN 101889958 A 24-11-2010	
		EP 2253665 A1 24-11-2010	
		JP 2010254688 A 11-11-2010	
		US 2010272669 A1 28-10-2010	
DE 19508029	A1	12-09-1996	AU 5103196 A 23-09-1996
		CA 2211888 A1 12-09-1996	
		DE 19508029 A1 12-09-1996	
		DE 19549506 C2 30-07-1998	
		EP 0813399 A1 29-12-1997	
		US 6228381 B1 08-05-2001	
		WO 9627350 A1 12-09-1996	
WO 2007006682	A1	18-01-2007	AT 449822 T 15-12-2009
		ES 2335358 T3 25-03-2010	
		JP 2009501254 A 15-01-2009	
		US 2008177016 A1 24-07-2008	
		WO 2007006682 A1 18-01-2007	
US 4175207	A	20-11-1979	KEINE
US 4990284	A	05-02-1991	AU 620265 B2 13-02-1992
		AU 6451790 A 02-05-1991	
		BR 9005212 A 17-09-1991	
		CA 2027271 A1 12-04-1991	
		CH 680221 A5 15-07-1992	
		DE 4032025 A1 25-04-1991	
		EG 19161 A 29-09-1994	
		GB 2236758 A 17-04-1991	
		IL 95891 A 26-08-1994	
		TR 25757 A 01-09-1993	
		US 4990284 A 05-02-1991	