(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
29. November 2007 (29.11.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/134761 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:
G01N 33/50 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2007/004340

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Mai 2007 (16.05.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2006 023 906.7 19. Mai 2006 (19.05.2006) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **OVAMED GMBH** [DE/DE]; Kiebitzhörn 33-35, 22885 Barsbüttel (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **ABROMEIT, Norbert** [DE/DE]; Vierbergen 10, 22926 Ahrensburg (DE).

(74) Anwalt: **DINNÉ, Erlend**; Hardenbergstr. 11, 22587 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2007/134761 A1

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING VIABILITY

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUM NACHWEIS DER VIABILITÄT

(57) **Abstract:** Method for detecting the viability of *Trichuris suis* eggs, characterized in that the passage of the eggs through the gastrointestinal passage of a pig is simulated *in vitro* with regard to the temporal sequence and environment, namely first of all the gastric environment and then, with decreasing enzyme and salt concentration, the intestinal environment, and the larvae are thus caused to hatch from the eggs.

(57) **Zusammenfassung:** Verfahren zum Nachweis der Viabilität von *Trichuris suis*- Eiern, dadurch gekennzeichnet, dass man den Durchgang der Eier durch die Magen-Darm-Passage eines Schweins *in vitro* simuliert hinsichtlich zeitlicher Abfolge und Milieu, nämlich zunächst das Magen-Milieu und anschließend in absteigender Enzym- und Salz- Konzentration das Darm-Milieu, und damit die Larven aus den Eiern zum Schlüpfen bringt.

Verfahren zum Nachweis der Viabilität

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis der Viabilität von *Trichuris suis* – Eiern.

Trichuris suis (Peitschenwurm des Schweins) gehört zur Gruppe der Rundwürmer (Nematoden), die als Parasit im Schweinedarm leben, und ist pharmakologisch insbesondere von Interesse für die Behandlung exzessiver Immunreaktionen, wie dies in WO 99/33479 beschrieben ist: die Gewinnung von *Trichuris suis*-Eiern wird beschrieben, ebenso die Besiedlung und Behandlung des Darms von Human-Patienten mit fortgeschrittenem, medikations-resistentem *Morbus Crohn* mit *Trichuris suis*.

Für solchen und anderen Einsatz ist es von Interesse, die Viabilität der eingesetzten *Trichuris suis* – Eier zu kennen. Dafür werden bislang von *Trichuris suis* freie Schweine mit *Trichuris suis*-Eiern, dem pharmazeutisch wirksamen Bestandteil, besiedelt, die so behandelten Schweine werden dann geschlachtet und der Darm wird auf *Trichuris suis* untersucht.

Nachteilig an diesem Vorgehen ist der große Aufwand hinsichtlich *Trichuris suis* freier Schweine, deren Zucht und Unterbringung sowie deren Schlachten. Nachteilig ist auch die lange Dauer einer solchen Untersuchung von *Trichuris suis*- Eiern, die so auf Viabilität überprüft werden können.

Aufgabe der Erfindung war es, hier Abhilfe zu schaffen, insbesondere ein Verfahren zum Nachweis der Viabilität von *Trichuris suis* – Eiern zu schaffen, das die Nachteile des Standes der Technik nicht oder zumindest nicht in dem Maße aufweist, das insbesondere *in vitro* durchgeführt werden kann, wirtschaftlich, standardisiert und von angelerntem Personal.

Gelöst wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zum Nachweis der Viabilität von *Trichuris suis* – Eiern, wie dies in den Patentansprüchen näher gekennzeichnet ist, und das dadurch gekennzeichnet ist, dass man den Durchgang der Eier

durch die Magen-Darm-Passage eines Schweins *in vitro* simuliert hinsichtlich zeitlicher Abfolge und Milieu, nämlich zunächst das Magen-Milieu und anschließend in absteigender Enzym- und Salz-Konzentration das Darm-Milieu, und damit die Larven aus den Eiern zum Schlüpfen bringt.

Die Simulation der Magen-Darm-Passage eines Schweins erfolgt durch Zugabe von entsprechenden Enzymen und Salzen und Inkubation bei erhöhter Temperatur, wobei im einzelnen vorteilhaft folgende Parameter eingestellt werden:

- Enzyme, in der Darmsimulation mit abnehmender Konzentration,
- pH-Wert,
- Wärme,
- evtl. unterschiedliche Gaskonzentration im Klimaschrank,
- Rüttelbewegungen,
- Salzlösungen, in der Darmsimulation mit abnehmender Konzentration.

Damit kann das erste Larvalstadium in einem flüssigen oder halbfesten Milieu, insbesondere in einer Lösung, zum Schlupf gebracht werden.

Grundsätzlich sind mit Enzyme alle Verdauungsstoffe, Enzyme und Enzymmischungen gemeint, die wie Darmenzyme wirken und allgemein abbauende oder verändernde Eigenschaften des Magen-Darminhalts (Magen-Darmreaktionen) hervorrufen. Eine über die Zeit abnehmende Enzymkonzentration ist beim Schlupf ein wichtiger auslösender Faktor.

Bei der Simulation des Magens wird bevorzugt 1-5% (alle % Angaben sind Gewichts%) Pepsin eingesetzt.

Bei der Simulation des Darms wird eine Anfangs-Gesamt-Enzymkonzentration bevorzugt (einschließlich Gallenextrakt/-salze), die 0,5 – 12% beträgt, besonders bevorzugt 1 – 8%. Weiter bevorzugt ist dabei eine Anfangs-Konzentration von Pankreatin, Trypsin und Gallenextrakt/-salze von jeweils 0,3 - 3%, für die erste

Verdünnung 0,1 – 0,8%, für die zweite Verdünnung 0,02 – 0,2%, für die dritte Verdünnung 0,005 – 0,1%, und für die vierte Verdünnung 0,002 – 0,09%. Vorteilhaft sind dabei zwei Verdünnungen, bevorzugt sind drei oder vier Verdünnungen. Die Gesamt-Enzymkonzentration nimmt damit bevorzugt um mehr als 70% ab, besonders bevorzugt um mehr als 90%.

Konkrete Werte für eine vorteilhafte Darm-Simulation zeigt die folgende Tabelle.

Tab. 1: Abnehmende Enzymkonzentration in der Ei-Lösung während der Darm-Simulation

Enzyme / Verdünnungs-schritte	Pankreatin	Trypsin	Gallenextrakt/ -salze
Ausgangskonzentration	Ca. 0,9%	Ca. 0,5%	Ca. 2,0%
Erste Verdünnung	Ca. 0,18%	Ca. 0,1%	Ca. 0,4%
Zweite Verdünnung	Ca. 0,06%	Ca. 0,033%	Ca. 0,13%
Dritte Verdünnung	Ca. 0,01%	Ca. 0,0055%	Ca. 0,022%
Vierte Verdünnung	Ca. 0,005%	Ca. 0,0028%	Ca.0,011%

Auch nur Teile der Darmpassagen-Simulation reichen erfindungsgemäß aus, um einen Schlupf hervorzurufen. Ebenso reicht es erfindungsgemäß aus, nur Teile der Magen-Darm-Passage eines Schweins zu simulieren, insbesondere das Milieu des Mauls und der Speiseröhre nicht zu berücksichtigen; vorteilhaft kann jedoch auch dies noch vor der Magen-Simulation geschehen. Ebenso reicht es erfindungsgemäß aus, nur einzelne Enzyme (in der Magen-Simulation in absteigender Konzentration) einzusetzen.

Bei einer optionalen Simulation des Mauls wird bevorzugt 1-5% Amylase eingesetzt.

Als vorteilhafte Enzym-Beispiele können folgende Verdauungsstoffe, Salze, Enzymgemische oder Enzyme genannt werden, mit deren Hilfe erfindungsgemäß Larven aus den Eiern zum Schlüpfen gebracht werden:

1. Amylase des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,1 – 10%.

2. Pepsin des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,1 – 10%, vorteilhaft in einer stark angesäuerten PBS-Lösung (Salzpuffer) (pH – Wert insbesondere: 0,8 -3).

3. Gallenextrakt/ -salze des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,5 – 12%.

4. Pankreatin des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,1 – 10%.

5. Trypsin des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,01 – 1%.

Dabei sind jeweils die Enzyme und Gallenextrakt/ -salze des Schweins bevorzugt. (Hier und im Folgenden wird unter einem Schwein bevorzugt ein Hausschwein verstanden.) - Gelöst werden die Enzyme und Verdauungsstoffe vorteilhaft in einer PBS-Lsg. (andere isotonische oder nichtisotonische Salzlösungen sind möglich). Vorzugsweise variiert der pH-Wert während der Simulation der Magen-Darm-Passage. Der pH-Wert liegt insbesondere zwischen 0,8 und 3,0 (bei Simulation der Magenpassage) und insbesondere zwischen 5 und 8 (bei Simulation der Darmpassage).

Inkubiert werden die Eier vorteilhaft in einem Klima- oder Wärmeschrank bei Temperaturen insbesondere zwischen 35 und 43°C, besonders bevorzugt 39,4°C, wobei vorteilhaft die Gaskonzentration, insbesondere der CO_2–Gehalt, eingestellt wird, wobei ein CO_2–Gehalt von 4-7%, besonders bevorzugt 5,6%, (Rest Luft) besonders vorteilhaft ist.

Vorteilhaft wird die Ei-Enzym-Mischung im Klima- oder Wärmeschrank auf einem Rüttler geschwenkt, wobei die Larven nach ca. 24 bis 168 Std. schlüpfen.

Im Folgenden wird die Erfindung anhand eines Ausführungsbeispiels erläutert, ohne aber diese dadurch unnötig einschränken zu wollen.

Beispiel einer erfindungsgemäß simulierten *in vitro* Magen-Darm-Passage, die zum Schlupf des ersten Larvalstadiums des Peitschenwurm *Trichuris suis* aus dem Ei führt.

Chemikalien- und Enzym-Lösungen, die bei dem Schlupf von *Trichris suis*-Larven aus den Eiern verwendet wurden (alle Lösungen wurden kurz vor dem Einsatz frisch hergestellt):

1. PBS-Puffer (Dulbecco`s Phosphate-Buffered Saline W/O Ca / Mg): fertig gekaufter Puffer, der nicht verändert wird.
2. HCl-Lösung: 1 ml einer 25%igen HCl-Lösung wird in 49 ml PBS-Puffer (1.) gelöst.
3. Kaliummonohydrogenphosphat-Puffer: 1,9 g Kaliummonohydrogenphosphat werden in 48 ml PBS-Puffer (1.) gelöst.
4. Amylase: 0,5g Amylase wird in 12,5 ml PBS-Puffer (1.) gelöst.
5. Pepsin-Lösung: 1,25g Pepsin wird in 25 ml, der unter 2. hergestellten HCl-Lösung, gelöst.
6. Pankreatin-Trypsin-Lösung: 0,225 g Pankreatin und 0,083g Trypsin werden in 12,5 ml PBS-Puffer (1.) gelöst. Pankreatin und Trypsin werden 1,5 h vor Verwendung in Lösung gebracht und 1 h auf einem Rotator, bei 39,4°C, gemischt. Dann wird die Lösung 0,5 h im Kühlschrank gelagert, damit größere Schwebstoffe sich absetzen können. Aus dem oberen Drittel wird Lösung für die Versuche entnommen.
7. Gallenextrakt/ salz -Lösung: 5 g Galenextrakt wird in 25 ml PBS-Puffer (1.) gelöst. Gallenextrakt wird 1,5 h vor Verwendung in Lösung gebracht und 1 h auf einem Rotator, bei 39,4°C, gemischt. Dann wird die Lösung 0,5 h im Kühlschrank gelagert, damit größere Schwebstoffe sich absetzen können. Aus dem oberen Drittel wird Lösung für die Versuche entnommen.
8. Atemluftgemisch: 94,4% Atemluft plus 5,6% CO_2.

Tab. 2: Hersteller und Artikel-Nummer der verwendeten Lösungen, Chemikalien und Enzyme

	Lösung / Chemikalie	Hersteller	Artikel - Nummer
1	PBS-Puffer	Invitrogen	14190169
2	25 %ige HCl-Lösung	Merck	1.00316.1000
3	Kaliummonohydrogenphosphat	Synopharm	163690-0001
4	Amylase	Sigma-Aldrich	A3176-500KU
5	Pepsin	Sigma-Aldrich	P-7000 25g
6	Pankreatin	Fluka	76190
7	Trypsin	Sigma-Aldrich	T4799-5G
8	Gallenextrakt/ -salze	Sigma-Aldrich	B8631-100G
9	Atemluftgemisch mit 5,6% CO2	Linde	Sonderanfertigung
10	Ei - Urlösung	Parasite Technology	Batch PT-M32
11	Aufgereinigte Ei - Lösung	Ovamed	1602

Tab. 3: Verwendete Laborgeräte

	Gerät	Hersteller	Typ
1	Zentrifuge	Hettich	Rotixa 50 S
2	Laminar Air flow	Holton	HB 2460
3	Brutschrank	Binder	BD 53
4	Rüttler	Kinematica	VXR S13
5	Rotator	Stuart	SB2

Durchführung:

Tag 1

Aus der Ei-Urlösung wird die Ei-Lösung, mit einem pH-Wert um 7 und einer Ei-Zahl von ca. 500 embryonierten Eiern/ml hergestellt. Aus der Ei-Lösung werden 20 ml (ca. 10.000 embryonierte Eier) entnommen und in ein Falcon Röhrchen überführt.

In der Zentrifuge wird die Ei-Lösung 5 Minuten bei 500 U/min zentrifugiert (alle weiteren Zentrifugationsschritte werden bei dieser Einstellung durchgeführt), so dass die Eier durch die Zentrifugalkraft auf den Grund des Falcon Röhrchens absinken.

Das Falcon Röhrchen wird einer Außendesinfektion unterzogen und unter die Laminar-Air-Flow (LF) gebracht. Unter der LF werden 19,5 ml des Überstandes abpipettiert und verworfen (Zugabe und Entfernen von Lösungen findet nur unter der LF statt, ist aber nicht zwingend notwendig).

In das Falcon Röhrchen wird 0,5 ml PBS-Puffer und 1 ml der Amylase-Lösung zugegeben.

Das Falcon Röhrchen wird verschlossen und auf dem Rüttler, unter leichten Rüttelbewegungen (zwischen 50 und 100 U/min, wird während des Versuchs nicht verändert), bei 39,4°C im Brutschrank 0,5 h bebrütet.

Die Lösung wird zentrifugiert. 1,5 ml Überstand werden abpipettiert und verworfen. Es werden 1 ml der hergestellten Pepsin –Lösung und 1 ml der hergestellten HCl-Lösung zugegeben.

Das Falcon Röhrchen wird verschlossen und auf dem Rüttler, unter leichten Rüttelbewegungen, bei 39,4°C im Brutschrank 3 h bebrütet.

6 ml der Kaliummonohydrogenphosphat-Lösung wird hinzu pipettiert. Dadurch findet eine pH-Wert Erhöhung statt.

Die Lösung wird zentrifugiert. 7 ml Überstand wird abpipettiert und verworfen.

In die 1,5 ml neutrale Lösung werden 2,5 ml PBS-Puffer, 5 ml Pankreatin-Trypsin-Lösung und 1 ml Gallenextrakt/ -salz -Lösung zugegeben.

Ab jetzt wird **nach jedem Öffnen,** in den Luftraum des Falcon Röhrchens, über der Lösung das Atemluftgemisch mit 5,6% CO2 geblasen. Das Falcon Röhrchen wird verschlossen und auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 3 h bebrütet.

Die Lösung wird auf 2 Falcon Röhrchen aufgeteilt und identisch weiterbehandelt. Das weitere Vorgehen wird jetzt an einem Falcon Röhrchen dargestellt.

Es werden 20 ml PBS-Puffer in das Falcon Röhrchen pipettiert. Das Falcon Röhrchen wird verschlossen und auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 16 h bebrütet.

Tag 2

Die Lösung wird zentrifugiert. 20 ml Überstand werden abpipettiert und verworfen. Es werden 10 ml PBS-Puffer zugegeben.

Das Falcon Röhrchen wird verschlossen und auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 3 h bebrütet.

Die Lösung wird zentrifugiert. 13 ml Überstand werden abpipettiert und verworfen. Es werden 10 ml PBS-Puffer zugegeben.

Die Lösung wird zentrifugiert. 6 ml Überstand werden abpipettiert und verworfen.

Das Falcon Röhrchen wird verschlossen und auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 3 h bebrütet.

Es werden 6 ml PBS-Puffer zugegeben.

Das Falcon Röhrchen wird verschlossen und auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 16 h bebrütet.

Tag 3

Die Lösung wird zentrifugiert. 6 ml Überstand werden abpipettiert und verworfen.

In dem Falcon Röhrchen befinden sich ca. 6 ml verdünnte Enzym-Lösung und ca. 5000 embryonierte Eier. Das Röhrchen wird auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 24 h bebrütet.

Tag 4

Kontrolle der Lösung auf geschlüpfte Larven. Das Röhrchen wird unter leichten Rüttelbewegungen, bei 39,4°C im Brutschrank 24 h bebrütet.

Tag 5

Kontrolle der Lösung auf geschlüpfte Larven. Das Röhrchen wird auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 24 h bebrütet.

Tag 6

Kontrolle der Lösung auf geschlüpfte Larven. Das Röhrchen wird auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 24 h bebrütet.

Tag 7

Kontrolle der Lösung auf geschlüpfte Larven. Das Röhrchen wird auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 24 h bebrütet.

Tag 8

Kontrolle der Lösung auf geschlüpfte Larven. Das Röhrchen wird auf dem Rüttler, bei 39,4°C im Brutschrank 24 h bebrütet.

Vom vierten zum fünften Tag steigt die Anzahl der lebenden Larven von ca. 2% auf ca. 10%. Ab dem sechsten Tag verringert sich die Anzahl der lebenden Tiere. Die Rate der toten Tiere steigt vom dritten (2-4%) bis zum achten Tag (über 50%) kontinuierlich an. Es ist davon auszugehen, dass alle toten Tiere aktiv geschlüpft sind und somit beim Schlupf am Leben waren.

Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis der Viabilität von *Trichuris suis* – Eiern, dadurch gekennzeichnet, dass man den Durchgang der Eier durch die Magen-Darm-Passage eines Schweins *in vitro* simuliert hinsichtlich zeitlicher Abfolge und Milieu, nämlich zunächst das Magen-Milieu und anschließend in absteigender Enzym- und Salz-Konzentration das Darm-Milieu, und damit die Larven aus den Eiern zum Schlüpfen bringt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Simulation der Magen-Darm-Passage eines Schweins erfolgt durch Zugabe von entsprechenden Enzymen und Inkubation bei erhöhter Temperatur, wobei im einzelnen insbesondere folgende Parameter eingestellt werden:
- Enzyme, in der Darmsimulation mit abnehmender Konzentration,
- pH-Wert,
- Wärme,
- evtl. unterschiedliche Gaskonzentration im Klimaschrank,
- Rüttelbewegungen,
- Salzlösungen, in der Darmsimulation mit abnehmender Konzentration,

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Simulation in einem flüssigen oder halbfesten Milieu, insbesondere in einer Lösung geschieht.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass das Milieu zur Simulation der Darm-Passage eine über die Zeit abnehmende Enzymkonzentration aufweist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, dass nur Teile der Magen-Darm-Passage eines Schweins simuliert werden.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, dass man im Milieu Enzyme einsetzt, insbesondere Verdauungsstoffe, Salze, Enzymgemische oder Enzyme, bevorzugt Amylase des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,1 – 10%, Pepsin des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,1 – 10%, vorteilhaft in einer stark angesäuerten PBS-Lösung (Salzpuffer) (pH – Wert insbesondere: 0,8 -3), Gallenextrakt/ -salze des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,5 – 12%, Pankreatin des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,1 – 10%, Trypsin des Schweins oder anderer Tiere, insbesondere in einer Konzentration zwischen 0,01 – 1%, wobei Enzyme und Salze bevorzugt bei folgenden pH-Werten eingesetzt werden:

Enzym	pH-Wert
Amylase	5 - 8
Pepsin	0,3 - 3
Pankreatin	5 - 8
Trypsin	5 – 8
Gallenextrakt/-salze	5 - 8

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass man im Milieu Enzyme des Schweins einsetzt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert des Milieus zwischen 0,8 und 3,0 (bei Simulation der Magenpassage) und zwischen 5 und 8 (bei Simulation der Darmpassage) eingestellt wird.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, dass die Simulation bei Temperaturen zwischen 35 und 43°C, besonders bevorzugt bei 39,4°C durchgeführt wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, dass der CO_2–Gehalt über dem Milieu auf 4-7%, besonders bevorzugt auf 5,6% eingestellt wird (Rest Luft).

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, dass die Eier zunächst einem simulierten Schweinemagen-Milieu ausgesetzt werden, dass dann die Eier von diesem Milieu getrennt werden, insbesondere durch Zentrifugieren, dass darauf die so behandelten Eier einem simulierten Schweinedarm-Milieu ausgesetzt werden, wobei die Enzymkonzentration dieses Milieus mit der Zeit abnehmend eingestellt wird, insbesondere durch Verdünnen, wobei diese Behandlungen vorteilhaft unter einer CO_2-haltigen Atmosphäre durchgeführt werden, mit einem CO_2–Gehalt von 4-7%, bevorzugt auf 5,6%, und bei einer Temperatur von 35 - 43°C, bevorzugt bei 39,4°C.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/004340

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50

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)
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, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLACK M I ET AL: "SURVIVAL RATES OF PARASITE EGGS IN SLUDGE DURING AEROBIC AND ANAEROBIC DIGESTION" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 44, no. 5, 1982, pages 1138-1143, XP002446722 ISSN: 0099-2240 abstract page 1138, column 2 - page 1140, column 1; figure 2; table 2	1-11
A	WO 99/33479 A (UNIV IOWA RES FOUND [US]) 8 July 1999 (1999-07-08) page 45 - page 48; example 6	1-11

☐ 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	Date of mailing of the international search report
14 August 2007	30/08/2007

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	Klee, Barbara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2007/004340

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9933479 A	08-07-1999	AU 740776 B2	15-11-2001
		AU 1821399 A	19-07-1999
		CA 2315790 A1	08-07-1999
		EP 1041994 A1	11-10-2000
		JP 2001527048 T	25-12-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/004340

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
INV. G01N33/50

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
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, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BLACK M I ET AL: "SURVIVAL RATES OF PARASITE EGGS IN SLUDGE DURING AEROBIC AND ANAEROBIC DIGESTION" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 44, Nr. 5, 1982, Seiten 1138-1143, XP002446722 ISSN: 0099-2240 Zusammenfassung Seite 1138, Spalte 2 - Seite 1140, Spalte 1; Abbildung 2; Tabelle 2	1-11
A	WO 99/33479 A (UNIV IOWA RES FOUND [US]) 8. Juli 1999 (1999-07-08) Seite 45 - Seite 48; Beispiel 6	1-11

☐ 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	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
14. August 2007	30/08/2007

Name und Postanschrift der Internationalen 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	Klee, Barbara

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2007/004340

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9933479 A	08-07-1999	AU 740776 B2	15-11-2001
		AU 1821399 A	19-07-1999
		CA 2315790 A1	08-07-1999
		EP 1041994 A1	11-10-2000
		JP 2001527048 T	25-12-2001