



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>5</sup> : C07K 3/22, A61K 35/16</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 90/05140</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Mai 1990 (17.05.90)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP89/01247 (22) Internationales Anmeldedatum: 19. Oktober 1989 (19.10.89) (30) Prioritätsdaten: 88118478.2 5. November 1988 (05.11.88) EP (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: AT usw. (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): OCTA- PHARMA AG [CH/CH]; Bankstraße 7, CH-8750 Gla- rus (CH). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : SMITH, Andrew [US/ US]; 5366 Ridge Road, Stevensville, MI 49127 (US). (74) Anwälte: WERNER, Hans-Karsten usw. ; Deichmann- haus, D-5000 Köln 1 (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: DK, FI, JP, US.  Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING A HIGH-PURITY, NON-INFECTIOUS ANTIHAEMOPHILIA FACTOR BY CHROMATOGRAPHY (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELUNG EINES HOCHREINEN, NICHT INFEKTIÖSEN ANTIHÄMOPHILIEFAKTORS MITTELS CHROMATOGRAPHIE (57) Abstract A process for producing a high-purity, non-infectious antihaemophilia factor (AHF or factor VIII) from blood plasma by treating a fraction enriched with factor VIII with biocompatible organic solvents/detergents followed by further cleaning steps is characterized in that the fraction enriched with factor VIII is obtained by a chromatographic process. After removal of viruses, said fraction advantageously undergoes further gel permeation chromatography with ion-exchange materials. (57) Zusammenfassung Es wird ein Verfahren beschrieben zur Herstellung eines hochreinen, nicht infektiösen Antihämophiliefaktors (AHF oder Faktor VIII) aus Blutplasma durch Behandlung einer an Faktor VIII angereicherten Fraktion mit biokompatiblen organischen Lösungsmitteln/Detergenzien und anschließende weitere Reinigungsschritte. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die an Faktor VIII angereicherte Fraktion durch ein chromatographisches Verfahren gewonnen wird. Die an Faktor VIII angereicherte Fraktion wird nach der Virusbefreiung in vorteilhafter Weise einer weiteren Gelpermeationschromatographie mit Ionen-austauschermaterialien unterworfen.</p>		

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

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

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

Verfahren zur Herstellung eines hochreinen, nicht infektiösen Antihämophiliefaktors mittels Chromatographie

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines hochreinen, nicht infektiösen Antihämophiliefaktors (AHF oder Faktor VIII) aus Blutplasma durch Behandlung einer an Faktor VIII angereicherten Fraktion mit biokompatiblen organischen Lösungsmitteln/Detergenzien und anschließende weitere Reinigungsschritte.  
10

In der EP-A-0 238 701 wird ein Verfahren zur Herstellung eines hochreinen, nicht infektiösen Antihämophiliefaktors beschrieben, wobei die vorbehandelten Fraktionen ein Kryopräzipitat sind, die mittels Ethanol-  
15 fällung von Fibrinogen, Globulinen, Albuminen und anderen störenden Bestandteilen befreit werden. Die Anreicherung aus dem Kryopräzipitat ist notwendig, da Faktor VIII nur in äußerst geringen Mengen in dem Material  
20 enthalten ist. Dieser Anreicherungsschritt beeinträchtigt jedoch den Gehalt an AHF im Endprodukt. Die bisher bekannten Verfahren zur Herstellung von Faktor VIII ergeben nur geringe Mengen an wirksamer Substanz. Bei der Applikation des auf herkömmlichem Wege hergestellten Faktors VIII belastet man den Patienten daher mit  
25 großen Mengen antigener Substanzen. Diese Verfahrensweise ist nicht unbedenklich. Es hat daher nicht an Versuchen gefehlt, den Faktor VIII durch Trennungsoperationen weiter anzureichern. So wurde versucht, mittels Affinitätschromatographie mit gegen Faktor VIII  
30 gerichteten tierischen Antikörpern Produkte mit höherer spezifischer Aktivität zu erhalten. Diese Technik ist jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv. Zum anderen ist sie auch deshalb nicht unbedenklich, da stets eine gewisse Menge tierischen Eiweißes bei jeder chromatographischen Trennung aus der Säule gewaschen wird.

In der Europäischen Patentanmeldung 88 108 458.6 wird vorgeschlagen, nach der Virusinaktivierung der Kryopräzipitation, eine chromatographische Trennung mit Ionenaustauschern durchzuführen. Dies führt zwar zu einer Ausbeutesteigerung bei der Herstellung von Faktor VIII, beinhaltet jedoch die Kryopräzipitation. Der Verfahrensschritt der Kryopräzipitation ist nachteilig, weil eine quantitative Fällung des im Blutplasma vorhandenen Faktors VIII nicht erreicht wird, so daß hohe Ausbeuteverluste in Kauf genommen werden müssen.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung eines hochreinen, durch Behandlung mit biokompatiblen organischen Lösungsmitteln/Detergenzien nicht infektiösen Antihämophiliefaktors (AHF oder Faktor VIII) aus Blutplasma in höherer Ausbeute und mit höherer biologischer Aktivität pro Gewichtseinheit Protein. Eine weitere Aufgabe besteht darin, die Kryopräzipitation zu vermeiden.

Diese Aufgabe kann in überraschend einfacher Weise dadurch gelöst werden, daß die an Faktor VIII angereicherte Fraktion durch ein chromatographisches Verfahren gewonnen wird.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine höher Ausbeute an Faktor VIII erzielt, indem man anstelle der Kryopräzipitation nach dem Stand der Technik eine Gelpermeationschromatographie mit Ionenaustauschermaterialien durchführt. Dabei wird gefrorenes Plasma in einem Wasserbad aufgetaut. Sobald eine gewisse Temperatur, die vorzugsweise 25°C beträgt, erreicht ist, wird das Plasma, vorzugsweise mit 50 vol.-% Wasser, verdünnt und filtriert.

Danach wird das so behandelte Plasma einer Gelpermeationschromatographie auf Ionenaustauscherbasis, wie Fractogel<sup>R</sup>-DEAE-Harzen unterworfen. Fractogel<sup>R</sup> ist ein hydrophiles Chromatographiematerial auf Basis von Copolymerisaten aus Oligoethylenglycolen, Glycidylmethacrylaten und Pentaerythroidimethacrylaten. Das Trennmaterial in der Säule wird vorher mit einem Glycin Natriumcitrat, Natriumchlorid und Heparin enthaltenden Puffer äquilibriert. Vorzugsweise hat der Puffer die folgende Zusammensetzung: 10 - 50 mM Natriumchlorid, 2 - 18 mM Natriumcitrat, 30 - 210 mM Glycin und 20 - 180 U/L Heparin. Die mit diesem Puffer erzielten Ionenstärkebedingungen führen dazu, daß der Faktor VIII an dem Säulenmaterial adsorbiert wird. Andere Blutplasmabestandteile werden getrennt, indem mit einigen Säulenvolumina des Auftragspuffers bei einem pH-Wert zwischen 6,5 und 6,9 gewaschen wird.

Danach ändert man die Pufferbedingungen durch Erhöhung der Salzkonzentration, vorzugsweise der Kochsalzkonzentration. Dies kann kontinuierlich oder auch diskontinuierlich geschehen. Vorzugsweise erhöht man die Natriumchloridkonzentration in dem oben angegebenen beispielhaften Puffersystem in drei Schritten über 20 - 80 mM, 30 - 180 mM und 40 - 360 mM. Das Säulenmaterial wird mehrfach mit den Puffern höherer Salzkonzentration gewaschen, wobei Verunreinigungen entfernt werden. Der Faktor VIII eluiert dann bei hohen Ionenstärken.

Die Faktor VIII enthaltende Fraktion wird aufgefangen und durch Hinzufügen von humanem Albumin stabilisiert. Vorzugsweise beträgt die Konzentration an humanem Serumalbumin (HSA) 1 mg/ml. Danach kann die Lösung mit Aluminiumhydroxid behandelt werden, um Restmengen von Prothrombinkomplex-Faktoren zu beseitigen. Danach wird filtriert.

Die Virusinaktivierung erfolgt gemäß der Methode, die in der EP-A 131 740 beschrieben wird, durch Behandlung mit biokompatiblen organischen Lösungsmitteln/Detergenzien, vorzugsweise Tween/TNBP (Tri-n-Butylphosphat). Gute Ergebnisse werden auch mit Natriumcholat TNBP erzielt.

In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung wird eine höhere Ausbeute an Faktor VIII mit höherer spezifischer Aktivität erzielt, indem nach der Entfernung der Viren die Probe einer Gelpermeationschromatographie an Ionenaustauschermaterialien unterworfen wird.

Nach der Virusinaktivierung kann die Rohfraktion verdünnt und filtriert werden.

Woods, K. und Orme, Th. beschreiben in der EP-A-0 239 859, daß es von Vorteil ist, nach der Virusentfernung oder -inaktivierung und vor der chromatographischen Trennung die Probe mit Ölen zu extrahieren, vorzugsweise mit Sojaöl, Rizinöl und/oder Baumwollsamensöl.

Für den Fall, daß als Ausgangsmaterial nicht aufgetautes oder frisches Blutplasma verwendet wird, sondern handelsübliches Kryopräzipitat, wird vorzugsweise wie folgt vorgegangen: handelsübliches Kryopräzipitat wird bei Raumtemperatur innerhalb von 3 bis 4 Stunden aufgetaut und in Stücke von ca. 1 bis 2 cm zerteilt. Diese Stücke werden bei Temperaturen zwischen 10 und 25°C durch Rühren suspendiert in etwa dem doppelten Volumen Wasser, welches 1 bis 3 U/ml Heparin-Natrium enthält. Die Suspension wird mit 0,1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von mindestens 7,0 bis 8, vorzugsweise 7,0 bis 7,1 eingestellt. Es wird 15 bis 60 Minuten, vorzugsweise 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Daraufhin werden

etwa 108 g 2% Aluminiumhydroxid-Suspension pro kg Kryopräzipitat hinzugefügt und 1 bis 10 Minuten, vorzugsweise 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Mit Säure, vorzugsweise 0,1 M Essigsäure, wird der Säuregehalt auf pH 6,0 bis 7,0, vorzugsweise 6,5 bis 6,6 eingestellt. Die Probe wird auf 10 bis 18°C, vorzugsweise 14 bis 16°C gekühlt. Man zentrifugiert bei dieser Temperatur, beispielsweise in einer Sharples AS-16 (Cepa 61)-Zentrifuge mit einer Rate von 1,0 L/min. Danach schließt sich eine Filtration des Überstandes, beispielsweise durch ein Pall AB-1 U010ZP-Filter an. Vorzugsweise nach dem Abzentrifugieren und Filtrieren erfolgt eine Virusinaktivierung. Besonders bewährt hat sich die Virusinaktivierung mit Hilfe von Tween/TNBP (Tri-n-Butylphosphat). Gute Ergebnisse werden auch mit Natriumcholat/TNBP erzielt. Das Tween/TNBP bzw. Natriumcholat/TNBP-Gemisch kann beispielsweise durch Ölextraktion wieder entfernt werden.

Nach der Virusinaktivierung gibt man die Probe auf eine Chromatographiesäule, die ein Gelpermeationsmaterial mit Ionenaustauscheraktivität aufweist, wie beispielsweise Fractogel<sup>R</sup>-DEAE. Die Säulenkapazität soll vorzugsweise so beschaffen sein, daß 0,5 kg des Säulenmaterials pro kg Kryopräzipitat sich in der Säule befinden. Die Säule wird mit der Probe beschickt und mit Puffern gewaschen. Nach Elution der Probe mit einem Puffer höherer Ionenstärke wird das erhaltene Produkt mit einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt verdünnt und, falls nötig, auf pH 6,5 bis 7,5, vorzugsweise 6,9 bis 7,1 eingestellt. Danach wird erneut filtriert, vorzugsweise an Nitrocellulosefiltern, worauf sich eine Sterilfiltration anschließt.

Durch die erfindungsgemäßen Maßnahmen ist es erstmals möglich, in hohen Ausbeuten einen hochreinen Antihämo-  
philiefaktor herzustellen, der eine bisher nicht er-  
reichte spezifische Aktivität aufweist. Die bisherigen  
5 Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch die bisher üb-  
liche Ethanol-fällung oder Kryopräzipitation ein be-  
trächtlicher Anteil des Faktors VIII irreversibel zer-  
stört wird.

10

Das Verfahren wird anhand der folgenden Beispiele näher  
erläutert.

B e i s p i e l 1

15

Frisches oder tiefgefrorenes humanes Plasma wird, gege-  
benenfalls in einem Wasserbad, temperiert, bis die Mi-  
schung eine Temperatur von 20°C erreicht. Das Plasma  
wird mit 50 vol.-% Wasser verdünnt und danach fil-  
20 triert. Das Plasmafiltrat wird in eine Ionenaustau-  
schersäule mit Fractogel<sup>R</sup>-DEAE-Harz aufgetragen. Die  
Säule wurde zuvor mit einem Puffer folgender Zusammen-  
setzung äquilibriert:

25

50 mM Natriumchlorid  
10 mM Natriumcitrat  
120 mM Glycin  
100 U/L Heparin pH 6,5 bis 6,9

30

Nach dem Auftragen der Probe wird das Ionenaustauscher-  
harz mit dem Waschpuffer mehrere Male gewaschen. Danach  
wird schrittweise die Konzentration an Kochsalz erhöht,  
indem zunächst mit einem Puffer gewaschen wird, der 100  
mM Natriumchlorid, danach 160 mM Natriumchlorid gefolgt  
von 200 mM Natriumchlorid enthält. Die Faktor VIII ent-  
haltenen Fraktionen werden gesammelt und durch Zugabe

von 1,0 mg/ml humanem Serumalbumin stabilisiert. Die weitere Bearbeitung erfolgt analog den folgenden Beispielen, nur daß anstelle des dort verwendeten handelsüblichen Kryopräzipitats, die Faktor VIII enthaltenden Säulenfraktionen eingesetzt werden.

### Beispiel 2

#### 10 Anreicherung des Faktor VIII

Handelsübliches Kryopräzipitat wird bei Raumtemperatur innerhalb von 3 bis 4 Stunden aufgetaut und in Stücke von ca. 1 bis 2 cm zerteilt. Diese Stücke werden bei 15 bis 25°C durch Rühren suspendiert und in etwa dem doppelten Volumen Wasser, welches 2 U/ml Heparin-Natrium enthält, suspendiert. Die Suspension wird mit 0,1 M Essigsäure auf einen pH-Wert von 7,0 bis 7,1 eingestellt. Man rührt 30 Minuten bei 20 bis 25°C. 108 g 2% 20 Aluminiumhydroxid-Suspension pro kg Kryopräzipitat werden hinzugefügt und weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach stellt man den pH-Wert mit 0,1 M Essigsäure auf pH 6,5 bis 6,6 ein. Danach kühlt man die Probe auf 14 bis 16°C ab, zentrifugiert in einer Sharples AS-16 (Cepa 61)-Zentrifuge mit einer Rate von 25 1,0 L/min. Der Überstand wird durch ein Pall AB-1 U010ZP-Filter filtriert.

### Beispiel 3

30

Vorbereitung der Chromatographiesäule für die Chromatographie nach der Befreiung der Rohfraktion von Viren.

Zur Trennung des extrahierten Kryopräzipitats wird eine Säule mit mindestens 0,5 l Fractogel<sup>R</sup>-DEAE Harz pro kg Kryopräzipitat verwendet. Die Säulenhöhe soll  $\leq$  Durchmesser sein. Nach dem Beschicken der Säule mit Harz

wird die Chromatographiesäule mit 5 Volumina 0,1 M Natriumchloridlösung gewaschen. Danach wäscht man mit einem Puffer A, der wie folgt zusammengesetzt ist:

5

110 mM Natriumchlorid, 10 mM Natriumcitrat-5H<sub>2</sub>O, 120 mM Glycin, 1 mM Calciumchlorid-2H<sub>2</sub>O, pH-Wert 6,9 bis 7,0, mit 1 M HCl einzustellen.

10 Sämtliche Puffer müssen virusfrei sein, da die folgenden Operationen mit virusfreien Extrakten des Kryopräzipitats durchgeführt werden.

#### B e i s p i e l 4

15

Die Probe wird auf die Säule aufgetragen und die Absorption des Durchflusses bei einer Wellenlänge von 280 nm beobachtet. Das Filtrat wird aufgenommen und auf Faktor VIII-Aktivität untersucht, ebenso wie das Produkt vor der Säulentrennung. Danach wird die Säule mit dem Puffer A gewaschen, bis die Absorption wieder ihren Ausgangswert erreicht. Danach wird die Säule mit Puffer B gewaschen. Dies geschieht so lange, bis die Absorption wieder die Grundlinie erreicht hat.

25

Der Puffer B hat folgende Zusammensetzung:

30 160 mM Natriumchlorid, 10 mM Natriumcitrat-5H<sub>2</sub>O, 120 mM Glycin, 1 mM Calciumchlorid-2H<sub>2</sub>O, pH-Wert 6,9 bis 7,0.

Die Elution des Produkts erfolgt mit dem Puffer C. Die nach Zugabe des Puffers C erscheinende Proteinfraction wird gesammelt. Puffer C weist folgende Zusammensetzung auf:

250 mM Natriumchlorid, 20 mM Natriumcitrat-5H<sub>2</sub>O, 80 mM Glycin, 16 mM Lysin, 2,5 mM Calciumchlorid-2H<sub>2</sub>O, pH-Wert 6,9 bis 7,0.

Nach Elution der gewünschten Fraktion wird die Säule anschließend mit 5 Volumina des Puffers D, welcher 1 M Natriumchloridlösung enthält, gewaschen.

5

Die Regenerierung der Säule erfolgt durch Waschen mit 0,1 N NaOH (3 Säulenvolumina), gefolgt durch Waschen der Säule mit 0,1 N Salzsäure (3 Säulenvolumina) und Waschen der Säule mit 5 Säulenvolumina 25% Alkohol in Wasser.

10

#### B e i s p i e l 5

Die gesammelten Fraktionen werden mit Puffer E, bestehend aus

15

20 mM Natriumcitrat, 80 mM Glycin, 16 mM Lysin, 2,5 mM Calciumchlorid-2H<sub>2</sub>O, pH-Wert 6,9 bis 7,1, so lange verdünnt, bis sie eine Aktivität von 26 oder 35 U/ml aufweisen. Danach wird der pH-Wert, falls nötig, auf 6,9 bis 7,1 eingestellt, worauf sich eine Filtration des Produkts durch 0,45 µm Sealklean-Filter anschließt. Abschließend wird eine weitere Sterilfiltration durchgeführt.

20

25

30

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5 1. Verfahren zur Herstellung eines hochreinen, nicht infektiösen Antihämophiliefaktors (AHF oder Faktor VIII) aus Blutplasma durch Behandlung einer an Faktor VIII angereicherten Fraktion mit biokompatiblen organischen Lösungsmitteln/Detergenzien und anschließende weitere Reinigungsschritte, dadurch  
10 gekennzeichnet, daß die an Faktor VIII angereicherte Fraktion durch ein chromatographisches Verfahren gewonnen wird.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das chromatographische Verfahren ein Gelpermeationschromatographisches Verfahren auf Basis von Ionenaustauschern ist.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Ionenaustauschmaterial ein Anionenaustauscherharz ist, wie DEAE-modifiziertes Material.
- 25 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Faktor VIII enthaltende Fraktion mit einer Aluminiumhydroxid-Suspension versetzt und nach Abkühlung von 10 bis 18°C, pH < 7 zentrifugiert oder filtriert wird.
- 30 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Aufarbeitung der Faktor VIII enthaltenden Fraktion durch ein chromatographisches Verfahren erfolgt.

- 5 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,  
daß das chromatographische Verfahren ein gelpermeationschromatographisches Verfahren auf Basis von Ionenaustauschern ist.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Chromatographiematerial ein Anionenaustauschermaterial, wie DEAE-modifiziertes Material, ist.
- 15 8. Faktor VIII enthaltende Rohfraktion, die durch Trennung von Blutplasma mittels chromatographischer Verfahren hergestellt worden ist.
- 20 9. Faktor VIII enthaltende Rohfraktion nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das chromatographische Verfahren ein gelpermeationschromatographisches Verfahren auf Ionenaustauscherbasis ist.
- 25 10. Verwendung von Materialien für die Gelpermeations-Chromatographie auf Ionenaustauscherbasis, wie DEAE-modifizierten Materialien, zur Herstellung Faktor VIII enthaltender Fraktionen aus Blutplasma.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/EP89/01247

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl.5	C07K 3/22; A61K 35/16	
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System <sup>1</sup>	Classification Symbols	
Int.Cl.5	A61K	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b>		
Category <sup>9</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
E	EP, A, 0343275 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 29 November 1989; see the whole document cited in the application ---	1-10
X	EP, A, 0144957 (ARMOUR PHARMACEUTICAL CO.) 19 June 1985; see pages 8-11; example 1; pages 15-16; claims ---	1-3,5-10
X	DE, A, 2635894 (BIOTEST-SERUM-INSTITUT) 16 February 1978; see page 13, example 2 ---	1-3,5-10
X	EP, A, 0173242 (BEHRINGWERKE) 5 March 1986 see pages 9-11; example	1-3,5-10
Y	---	4
Y	US, A, 4478825 (JAMES W. BLOOM) 23 October 1984; see columns 5-6; example 1 ---	4
.../...		
<p><sup>9</sup> Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search 22 January 1990 (22.01.90)	Date of Mailing of this International Search Report 27 February 1990 (27.02.90)	
International Searching Authority European Patent Office	Signature of Authorized Officer	

## II. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)

Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
X	EP, A, 0245875 (GREEN CROSS CORP.) 19 November 1987; see pages 3-6 ----	1-3,5-10
A	EP, A, 0238701 (LECARSA) 30 September 1987 see page 5, claims cited in the application ----	1-10
A	EP, A, 0239859 (NEW YORK BLOOD CENTER) 7 October 1987; see page 12, example 10; cited in the application  -----	1-10

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

EP 8901247  
SA 32365

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 19/02/90. The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0343275	29-11-89	None	
EP-A- 0144957	19-06-85	US-A- 4508709 AU-B- 569129 AU-A- 3598284 CA-A- 1248449 JP-A- 60136518	02-04-85 21-01-88 13-06-85 10-01-89 20-07-85
DE-A- 2635894	16-02-78	None	
EP-A- 0173242	05-03-86	DE-A- 3432083 JP-A- 61060614	06-03-86 28-03-86
US-A- 4478825	23-10-84	None	
EP-A- 0245875	19-11-87	JP-A- 63108000 US-A- 4822872	12-05-88 18-04-89
EP-A- 0238701	30-09-87	None	
EP-A- 0239859	07-10-87	US-A- 4789545 JP-A- 62240623	06-12-88 21-10-87

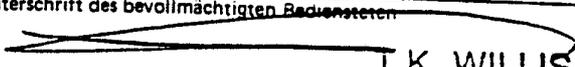
EPO FORM P0479

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

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 89/01247

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup>		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Cl. <sup>5</sup> C 07 K 3/22, A 61 K 35/16		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b>		
Recherchierter Mindestprüfstoff <sup>7</sup>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Cl. <sup>5</sup>	A 61 K	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b>		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. 13
E	EP, A, 0343275 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) 29. November 1989 siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --	1-10
X	EP, A, 0144957 (ARMOUR PHARMACEUTICAL CO.) 19. Juni 1985 siehe Seiten 8-11; Beispiel 1; Seiten 15-16, Ansprüche --	1-3, 5-10
X	DE, A, 2635894 (BIOTEST-SERUM-INSTITUT) 16. Februar 1978 siehe Seite 13, Beispiel 2 --	1-3, 5-10
X	EP, A, 0173242 (BEHRINGWERKE) 5. März 1986 siehe Seiten 9-11, Beispiel --	1-3, 5-10
Y	--	4
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
22. Januar 1990	27. 02. 90	
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten	
Europäisches Patentamt	 <b>T.K. WILLIS</b>	

III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art *	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	US, A, 4478825 (JAMES W. BLOOM) 23. Oktober 1984 siehe Spalten 5-6, Beispiel 1 --	4
X	EP, A, 0245875 (GREEN CROSS CORP.) 19. November 1987 siehe Seiten 3-6 --	1-3,5-10
A	EP, A, 0238701 (LECARSA) 30. September 1987 siehe Seite 5, Ansprüche in der Anmeldung erwähnt --	1-10
A	EP, A, 0239859 (NEW YORK BLOOD CENTER) 7. Oktober 1987 siehe Seite 12, Beispiel 10 in der Anmeldung erwähnt  -----	1-10

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

EP 8901247  
SA 32365

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.  
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 19/02/90  
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0343275	29-11-89	Keine	
EP-A- 0144957	19-06-85	US-A- 4508709 AU-B- 569129 AU-A- 3598284 CA-A- 1248449 JP-A- 60136518	02-04-85 21-01-88 13-06-85 10-01-89 20-07-85
DE-A- 2635894	16-02-78	Keine	
EP-A- 0173242	05-03-86	DE-A- 3432083 JP-A- 61060614	06-03-86 28-03-86
US-A- 4478825	23-10-84	Keine	
EP-A- 0245875	19-11-87	JP-A- 63108000 US-A- 4822872	12-05-88 18-04-89
EP-A- 0238701	30-09-87	Keine	
EP-A- 0239859	07-10-87	US-A- 4789545 JP-A- 62240623	06-12-88 21-10-87

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82