

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

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

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : A61K 37/02		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 94/09806 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 1994 (11.05.94)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE93/01006 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. Oktober 1993 (22.10.93) (30) Prioritätsdaten: P 42 36 469.8 29. Oktober 1992 (29.10.92) DE P 43 04 640.1 16. Februar 1993 (16.02.93) DE P 43 07 352.2 9. März 1993 (09.03.93) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: DENECKE, Rainer [DE/DE]; Mittelweg 98, D-20149 Hamburg (DE). GEBERT, Ir- mingard [DE/DE]; Heiligenstock 29 e, D-53797 Lohmar (DE). (74) Anwälte: KLICKOW, Hans-Henning usw. ; Jessenstrasse 4, D-22767 Hamburg (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: AU, BB, BG, BR, BY, CA, CZ, FI, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LV, MG, MN, MW, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.
(54) Title: PREPARATION FOR THERAPEUTIC AND ESPECIALLY PROPHYLACTIC TREATMENT OF DIGESTIVE TRACT DISORDERS (54) Bezeichnung: PRÄPARAT ZUR THERAPIE UND INSBESONDERE PROPHYLAXE VON ERKRANKUNGEN DES VERDAUUNGSTRAKTES (57) Abstract The preparation is used for therapeutic and prophylatic treatment of disorders of the digestive tract that occur when pa- thogenic and/or secondary-pathogenic bacteria are present, for example, in the presence of <i>Helicobacter pylori</i> . For this purpose a concentration of at least 5 µm of a polypeptide antibiotic per ml of liquid must reach the site of action. This is done by adminis- tering a defined dose. (57) Zusammenfassung Das Präparat dient zur Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen des Verdauungstraktes, die bei Anwesenheit von pat- hogenen und/oder fakultativ-pathogenen Bakterien, z.B. bei Anwesenheit von <i>Helicobacter pylori</i> , auftreten. Zu diesem Zweck muß eine Konzentration von mindestens 5 µg eines Polypeptidantibioticums pro ml Flüssigkeit am Wirkort erreicht werden. Dies geschieht durch Applikation einer definierten Dosis.			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

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

**Präparat zur Therapie und insbesondere Prophylaxe von
Erkrankungen des Verdauungstraktes**

Die Erfindung betrifft ein Präparat zur Therapie und insbesondere Prophylaxe von Erkrankungen des Verdauungstraktes, die bei Anwesenheit von pathogenen und/oder fakultativ-pathogenen Bakterien auftreten.

In diesem Zusammenhang ist die krankmachende Wirkung von *Helicobacter pylori* beim Menschen hinlänglich bekannt.

Es gibt aber auch eine Vielzahl von Bakterien, die ursprünglich vom Tier auf den Menschen übertragen worden sind (Zoonosen), wie z.B. gastrische Spirillen und *Campylobacter-like-organisms* (CLO), die vergleichbare oder ähnliche Krankheiten/Läsionen wie *Helicobacter*

- 2 -

pylori auslösen können. Auch *Proteus vulgaris* wäre zu nennen, der wie *Helicobacter pylori* Urease-positiv ist. Mischinfektionen sind sehr häufig.

Diese von *Helicobacter pylori* verschiedenen Keime werden auch von Mensch zu Mensch weiter übertragen. Die Durchseuchung mit Nicht-*Helicobacter pylori* Bakterien ist nicht zu unterschätzen. Die meisten dieser Bakterien leben auch wie *Helicobacter pylori* in der gleichen ökologischen Nische, d.h. auf und in der Magenschleimhaut unter der schützenden Schleimschicht. Besonders gefährdet sind Hunde- und Katzenhalter, sich mit diesen Keimen zu infizieren, (z.B. mit *Flexispira rappini*).

Krankheitsbilder, an denen oben genannte Bakterien beteiligt sind, werden in den folgenden Publikationen diskutiert: "Chronic Alcoholic Gastritis", Rajiv Uppal, MD; Syed K. Lateef, MD; Mark A. Korsten, MD; Fiorenzo Paronetto, MD; Charles S. Lieber, MD, Archives of Internal Medicine, April 1991, Vol. 151, Seite 760 - 764; "Detection and identification of *Helicobacter pylori* by the polymerase chain reaction", C Clayton, K Kleanthous, S Tabaqchali, J Clin Pathol 1991, 44, Seite 515-516. Ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen *Helicobacter pylori* und Magenkrebs findet sich im Aufsatz "*Helicobacter pylori* and gastric carcinoma", R.J.L.F. Loffeld, I. Willems, J.A. Flendrig & Arends, J.W. Histopathology 1990, 17, Seite 537-541.

Bislang bekannte Präparate zur Therapie der in den oben zitierten Publikationen genannten Erkrankungen weisen ein ungünstiges Verhältnis von Wirksamkeit und Nebenwirkungen auf. Aufgrund der gravierenden Folgen einer Infektion mit diesem Krankheitserregern s.o., ist eine

wirksame und unbedenkliche Prophylaxe und Therapie erforderlich.

Die oben genannten Erkrankungen werden nach bislang angewandten Therapieverfahren mit Präparaten behandelt, deren wirksames Prinzip z.B. Wismutsalze sind. Da eine alleinige Therapie mit diesen Salzen sich als nicht ausreichend erwies, mußte ergänzend eine komplizierte antibiotische Kombinationstherapie durchgeführt werden (z.B. mit Amoxicillin und Metronidazol). Durch den langjährigen Einsatz von Wismutpräparaten ist deren Nebenwirkungsprofil hinreichend bekannt: Im Vordergrund wurden neurotoxische Symptome beobachtet. Seit geraumer Zeit wird das Nutzen-Risiko-Verhältnis von Wismutpräparaten in Frage gestellt. Das Nebenwirkungsspektrum der bisher verwendeten Antibiotika ist hinreichend bekannt.

Derartige Behandlungsverfahren werden beispielsweise im Aufsatz "Diagnostic value of decreasing IgG, IgA, and IgM antibody titres after eradication of *Helicobacter pylori*", Timo U. Kosunen, Kari Seppala, Seppo Sarna, Pentti Sipponen, The Lancet, Vol 339, 11. April 1992, Seite 893 sowie in dem Übersichtsartikel von J. Ormand und N. Talley: "Helicobacter pylori: Controversies and an Approach to Management" aus Mayo Clin. Proc. 65: 414-426, 1990, beschrieben.

Darüber hinaus führt die bisherige symptomatische Therapie mit Antacida, H₂-Blockern und ATPase-Hemmern in der Regel zu einer Überwucherung des Magens mit Bakterien und/oder Pilzen (Fäkalflora), da der Säureschutz des Hohlorgans verlorengegangen ist. Einhergehend mit der Säurehemmung kommt es zu einem massiven Sekretionsrückgang von Lysozym aus den Magendrüssen. Dieses körpereigene, antibakteriell wirkende Enzym ist

essentiell für die Repression von pathogenen Keimen. Insofern begünstigt die Säuresuppression gewisse ätiopathogenetischen Faktoren für diverse gastrointestinalen Läsionen (z.B. Magenkarzinom und Karzinoide). Abgesehen von speziellen Indikationen ist die Säuresuppression obsolet und sollte aus ethischen und volkswirtschaftlichen Gründen durch Lantibioticaprophylaxe und -therapie ersetzt werden.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Präparat der einleitend genannten Art derart anzugeben, das es eine hohe Wirksamkeit ohne Nebenwirkungen gewährleistet.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß als Wirkstoff eine definierte Dosis eines Polypeptidantibioticums enthalten ist, durch dessen Applikation eine Wirkstoffkonzentration von mindestens 5 µg/ml am Wirkort erreicht wird.

Die antibakterielle Wirksamkeit von Lantibiotica, insbesondere von Nisin, ist bereits bekannt. Eine Verwendung als Lebensmittelzusatz wird beispielsweise in der EP-A-0 453 972 beschrieben. Die antibakterielle Wirksamkeit von Nisin ist darüber hinaus auch in der US-PS 5 043 176 angegeben. Die Verwendung von Nisin im kosmetischen Bereich ist in der DE-OS 39 38 140 beschrieben.

Die eingangs genannten Bakterien sind der ätiopathogenetische Faktor für die chronische Gastritis. Diese führt im Laufe der Zeit zur Schleimhautatrophie und intestinalen Metaplasie. Endstadium dieser Prozesse ist in der Regel ein Magentumor.

Durch rechtzeitigen prophylaktischen Einsatz von Nisin ließe sich die Inzidenz dieser Tumoren drastisch

senken. Die Besiedlung des Magens mit pathogenen Bakterien (z.B. *Gastrospirillum hominis* oder *Helicobacter pylori*) kann zu einer Schwächung der Schleimhaut-resistenz führen, so daß Patienten, die auf die regelmäßige Einnahme von Corticosteroiden und nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDS) angewiesen sind, peptische Geschwüre entwickeln.

Auch bei diesem Patientengut kann durch den rechtzeitigen prophylaktischen Einsatz von z.B. Nisin eine erhebliche Reduzierung dieser Krankheit erreicht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch an den Zusatz einer nisinoiden Substanz zu alkoholischen Getränken gedacht werden, um den bei Alkoholikern so gefürchteten Magendurchbruch und die alkoholische Gastritis zu verhindern.

Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *Helicobacter pylori* besiedelt. Durch geeignete Screening-Programme (Serologie, Atemtest und PCR) lassen sich Risikogruppen leicht identifizieren. In diesen Fällen käme dem prophylaktischen Einsatz von nisinoiden Substanzen eine nicht zu unterschätzende volkswirtschaftliche Bedeutung zu.

Der prophylaktische Einsatz von Nisin ist medizinisch unbedenklich, da es nicht resorbiert wird und durch Pankreasenzyme insbesondere Alpha-Chymotrypsin inaktiviert wird.

Die Applikation des Medikamentes erfolgt solange, bis das Ziel der Behandlung, nämlich die Keimeradikation, erfolgt ist. Da viele der diskutierten Bakterien ubiquitär vorkommen, ist eine Reinfektion jedoch nicht auszuschließen.

Aus therapeutischer Sicht ergeben sich folgende Indikationen:

- Ulcus duodeni
- Ulcus duodeni mit gastrischer Metaplasie
- Ulcus ventriculi
- Magenläsionen mit intestinaler Metaplasie
- Erosionen
- chronisch aktive Gastritis
- chronisch inaktive Gastritis (z.B. atrophische)
- chronisch inaktive Gastritis mit Metaplasie und/oder Dyplasie
- sonstige Gastritiden
- akute Gastritis
- Duodenitis
- nicht-ulzeröse Dyspepsie und funktionale Dyspepsie
- andere gastro-intestinale Krankheiten
- Barrett's Ösophagus mit Dysplasie oder Metaplasie
- Erkrankung auf der Basis heterotopischer Magenmukosa im Verdauungstrakt (z.B. im Meckelschen Divertikel)

Weitere Indikationen sind:

- Erkrankungen auf der Basis einer Besiedlung der verdauungstraktassoziierten Ausführungsgänge mit Bakterien (z.B. der Brunnerschen Drüsen)
- endokrine Störungen wie Hypergastrinämie und Hyperpepsinogenämie
- psychische Störungen (z.B. Depression)
- Ménétrier-Krankheit
- Gastropathien, z.B. protein-losing hypertrophic gastropathy oder gastrische Lymphome

Die Verwendung eines Lantibiotiums, insbesondere eines nisinoiden Wirkstoffes, erweist sich als eine äußerst wirksame Maßnahme zur Abtötung von aggressiven Magenbakterien. Nisinoide Substanzen sind gegenüber Magensaft resistent, weil sie Lanthionin und/oder Methyllanthionin enthalten und können sogar bei einem pH-Wert von 1-2, der typischerweise im Magen vorliegt, ihre optimale Wirkung entfalten.

Der Einsatz nisinoider Substanzen ist auch bei Haus- und Nutztieren sowie Labor- und Zootieren angezeigt. Bei diesen Tieren wurden Bakterien nachgewiesen, die in der gleichen ökologischen Nische wie *Helicobacter pylori* beim Menschen vorkommen. *Helicobacter pylori* ist unter normalen Bedingungen humanspezifisch und kommt mit Ausnahme des Affen bei den oben genannten Tieren nicht vor.

Mangels ausreichender Untersuchungsergebnisse und taxonomischer Turbulenzen auf diesem speziellen Sektor werden diese spiraligen Organismen derzeit wie in der Publikation "An Uncultured Gastric Spiral Organism Is a Newly Identified *Helicobacter* in Humans", Jay V. Solnick, Jani O'Rourke, Adrian Lee, Bruce J. Paster, Floyd E. Dewhirst and Lucy S. Tompkins, The Journal of Infections Diseases, 1993, 168, Seite 379 ff, eingeteilt.

Folgende Bakterien werden aufgeführt:

- *Helicobacter felis* DS3
- *Helicobacter felis* CS1
- (*Gastrospirillum hominis*) 2
- (*Gastrospirillum hominis*) 1
- *Helicobacter pylori*
- *Helicobacter acinonyx*

- *Helicobacter* sp. CL03
- *Helicobacter mustelae*
- *Helicobacter fennelliae*
- *Helicobacter muridarum*
- *Helicobacter cinaedi*
- (*Flexispira rappini*)
- *Wolinella succinogenes*
- *Campylobacter fetus* ss *fetus*
- *Campylobacter largi*
- *Campylobacter coli*
- *Campylobacter jejuni*

Die von Tieren isolierten Bakterien des *Campylobacter*-*Helicobacter*-Komplexes induzieren dem Menschen vergleichbare gastro-intestinale Läsionen, so daß auch hier der Nisineinsatz wirtschaftlich sinnvoll erscheint. Außerdem werden sie häufig auf den Menschen übertragen und erzeugen dann das von *Helicobacter pylori* bekannte Bild. Auch dieses Keimspektrum sollte mit nisinoiden Substanzen angegangen werden.

Neueste Erkenntnisse weisen auf eine bakterielle Ätiopathogenese von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa hin (chronisch endzündliche Darmerkrankungen). Auch hier ließe sich an einen Einsatz von Lantibiotica, insbesondere von nisinoiden Substanzen, denken.

Bei der Herstellung und Anwendung des Präparates kann die Wasserlöslichkeit von Nisin genutzt werden. Die Wasserlöslichkeit ist abhängig vom jeweils vorliegenden pH-Wert und beträgt für eine Wassermenge von 100 Milliliter 12 Gramm bei einem pH-Wert von 2,4, 1 Gramm bei einem pH-Wert von 5,6 und 0,075 Gramm bei einem pH-Wert von 7,0. Insbesondere bei niedrigen pH-Werten ist somit eine hohe Wasserlöslichkeit gegeben. In nichtpolaren

Lösungsmitteln ist hingegen eine vergleichsweise ausgeprägte Unlöslichkeit gegeben.

Nisin gehört zur Gruppe der Polypeptidantibiotika, Untergruppe Lantibiotica, und besteht aus 34 Aminosäuren. Dieses Polypeptid wird von gewissen Stämmen von *Lactococcus lactis* ssp. produziert.

Unter Lantibiotica, deren bevorzugte Ausbildung in Subtilin, Nisin und nisinoiden Substanzen zu sehen ist, werden unter anderem auch Bakteriozine verstanden, die Lanthionin und/oder Methyllanthionin enthalten.

Charakteristisch ist, daß innerhalb des Nisinmoleküls fünf Ringstrukturen vorhanden sind, die jeweils eine unterschiedliche Anzahl von Aminosäuren aufweisen. Das Molekulargewicht beträgt etwa 3500. Es sind jedoch auch Molekularstrukturen, insbesondere Di- oder Multimere, bekannt geworden, die Molekulargewichte von bis zu 14000 aufweisen. Dies ist beispielsweise bei B. Jarvis, Jeffsoat, Joan & Cheeseman, *Bioch. Biophys. Acta*, 1968, 168 (1), Seite 153 angegeben.

Eine Wirkstoffherstellung mit bewährten Mitteln kann dadurch erfolgen, daß die nisinoide Substanz als Nisin ausgebildet ist.

Der grundsätzliche Aufbau von Nisin sowie Möglichkeiten zur Produktion von Nisin ergeben sich aus den Patentschriften GB 844 782 und DE 11 95 434. Weitere Produktionsverfahren sind beispielsweise in den Patentschriften DE 16 17 580 sowie DE 20 00 818 angegeben. Nisinoide Substanzen (antimikrobiell wirksame Peptidanalogue) können biotechnologisch hergestellt oder synthetisch erzeugt werden.

- 10 -

Durch "genetic engineering" oder gezielte Mutagenese können der natürlichen Substanz überlegene Mutanten produziert werden. Insbesondere ist es hierdurch möglich, eine Änderung der chemischen Konfiguration, beispielsweise durch Einführung neuer Aminosäuren beziehungsweise Ersatz oder Deletion von Aminosäuren oder bestimmten chemischen Gruppen, durchzuführen.

Eine Kombination der nisinoide Substanz mit Präparaten, die zu einer Reduktion der Mukosabarriere führen, potenziert die Wirksamkeit (z.B. Lysozym, Zyklooxygenasehemmer, kationische Detergenzien, Chelatoren, etc.). Das Lysozym wirkt z.B. nicht nur synergistisch, sondern es bewirkt auch eine Verzögerung der Resistenzentwicklung und ist wie Nisin magensaftresistent. Insbesondere ist an eine Kombination mit Permeabilisierern gedacht.

Die hohe Rückfallquote beziehungsweise Exazerbation gastro-intestinaler Erkrankungen läßt sich aufgrund eigener Untersuchungen darauf zurückführen, daß z.B. *Helicobacter pylori* intrazellulär in Magenepithelzellen persistiert. Diese intrazellulären Keime konnten mit den bisherigen Therapieverfahren nicht erreicht werden. Mit Hilfe von Liposomen oder Proteoliposomen läßt sich Nisin problemlos in die befallenen Zellen einschleusen und führt so zu einer Abtötung der Bakterien. Damit ist die Rezidivgefahr beseitigt.

Zur Erleichterung der Einnahme des Präparates wird vorgeschlagen, daß die zu verabreichende Dosis als Füllung einer Kapsel ausgebildet ist.

Die Dosiermenge kann bei einer Anordnung innerhalb einer Kapsel beispielsweise derart realisiert sein, daß die Füllung als eine pulverförmige Substanz ausgebildet

ERSATZBLATT

ist. Es ist aber auch möglich, daß die Füllung als Lösung der Substanzen ausgebildet ist oder daß eine Dispersion (Suspension oder Emulsion) vorliegt.

Gemäß einer anderen Zubereitung ist es möglich, daß die Dosiermenge im Bereich einer Tablette angeordnet ist. Eine verzögerte Freisetzung des Präparates aus einer speziellen galenischen Formulierung ist denkbar. Hierzu können beispielsweise Liposomen oder Hydrogele entsprechend der Veröffentlichung "Hydrogels: Swelling, Drug Loading, and Release", S.W. Kim et al., Pharmaceutical Research, 9, 1992, Seiten 283-290 verwendet werden ebenso bioadhäsive Materialien natürlichen und synthetischen Ursprungs. Weitere galenische Formulierungen in dieser Hinsicht sind in der Publikation "Formulations releasing the drug proximal to the pylorus in the dog", J. Heinämäki et al., International Journal of Pharmaceutics, 48 (1988), Seite 51-61, beschrieben.

Zur Ermöglichung einer Wirkstoffentfaltung im Bereich des Magens ist auch daran gedacht, daß die Dosiermenge in einer dosierbaren Flüssigkeit enthalten ist und oral zugeführt wird. Es kann beispielsweise eine Lösung oder Dispersion vorliegen. Die orale Applikation ist grundsätzlich bei Magen- und Dünndarmanwendungen zweckmäßig. Bei Anwendungen im Dickdarmbereich sollte die Applikation rektal erfolgen.

Die diversen Möglichkeiten der Zusammensetzung des Präparates können durch folgende Hilfsstoffe ergänzt werden, z.B. Konservierungsstoffe, Puffersubstanzen, Trägerstoffe, Geschmackskorrigenzien, Farbstoffe, Bindemittel, Adhäsiva, Gleitmittel, Adsorbenzien, Eindickmittel und Verdünner. Durch den jahrzehntelangen, unbedenklichen Einsatz in der Lebensmittelkonservierung erscheint es zweckmäßig, die Wirkstoffkomposition mit

sauren Getränken zu verabreichen (z.B. Fruchtsäfte, Cola-Getränke), was die Compliance erhöhen würde. Auch andere Lebensmittel mit breiter Akzeptanz in der Bevölkerung sind als Träger des Präparats denkbar (z.B. Milch).

Eine weitere faszinierende Möglichkeit zur Beseitigung der einleitend genannten Bakterien wäre die probiotische Therapie. Hierbei werden lebende, Bakteriozine-produzierende Bakterien, wie z.B. Lactobazillen, eingesetzt, die selber harmlos sind, aber durch kompetitive und bakterizide Mechanismen zu einer Exklusion der pathogenen/fakultativ-pathogenen Keime führen.

Dieser Ansatz kann selbstverständlich auch prophylaktisch ausgenutzt werden.

Eine elegante Methode wäre z.B. für den gastro-intestinalen Bereich die Anreicherung von Yogurt mit Nisin-produzierenden Laktokokken; bei entsprechender Zubereitung und mit additiven Hilfsstoffen können die Compliance-Probleme mancher Patienten und ihre aggressiven Bakterien beseitigt werden.

Auf diese oder ähnliche Weise werden die von der WHO 1988 und H. Cranz aufgeführten Kriterien eines OTC-Arzneimittels in idealer Weise erfüllt; beschrieben in dem Aufsatz: Cranz, H. Over-the-counter-drugs: the issues. Drug Safety 5 (Suppl. 1): S. 120-125, 1990.

Unter Erkrankungen des Verdauungstraktes werden Erkrankungen des Darms, des Magens und der Speiseröhre verstanden.

NISIN - Empfindlichkeitstestung

Eine experimentelle Prüfung der Nisinwirkung auf *Helicobacter pylori* erfolgte gemäß der nachfolgenden Aufstellung.

1. Teststämme

Helicobacter pylori I, Herkunft MHH, 10.8.92

Helicobacter pylori II, MHH, 17.8.92

Die Stämme wurden als Gefrierkonserven (10% Glycerinzusatz) oder an Transportmediumträgern (Transwab) bei -172° C aufbewahrt.

2. Nährboden

Columbia-Agarbase (Fa. Merck) mit Zusatz von 10% Pferdeblut (Als Kochblutplatte hergestellt)

3. Kulturbedingungen

Anzüchtung im Anaerobentopf nach Brewer unter Verwendung von BBL CampyPac Plus der Fa. Becton Dickinson (standardisierte H₂-, CO₂-Atmosphäre)

4. Herstellung der Prüflösung

Als Testsubstanz wurde reines Nisin der Fa. "Aplin & Barrett LTD" verwendet. Die Testung der Substanz erfolgte bei 2 unterschiedlichen Lösungsmittel-pH, pH 4,43 und pH 2,0

Folgende Konzentrationen wurden im 1. Versuchsansatz geprüft:

- 14 -

250 Mikrogramm/ml
1.000 Mikrogramm/ml
10.000 Mikrogramm/ml.

Da sich aus dem ersten Versuch kein Anhalt für eine unterschiedliche Wirkung bei pH 2,0 und pH 4,42 ergab, wurde die Wiederholungsprüfung mit der auf pH 2,0 eingestellten Verdünnungslösung und mit folgenden Konzentrationen durchgeführt:

500 Mikrogramm/ml
1.000 Mikrogramm/ml
2.500 Mikrogramm/ml
5.000 Mikrogramm/ml
10.000 Mikrogramm/ml.

5. Empfindlichkeitstestung nach DIN 58940, Teil 6
Agarverdünnungsmethode

Ausnahme von dieser Testdurchführung: Prüfung nicht auf Mueller-Hinton-Nährboden (blut- und serumfrei), sondern auf 10% Pferde-Kochblut-Agar, da die Keime bisher nicht auf serumfreien Nährböden zu züchten waren.

Bei der Agarverdünnungsmethode wurden dem noch flüssigen Nährboden die zu prüfenden Konzentrationen als 10-fach konzentrierte Lösung zugesetzt und mit dem Nährboden im Verhältnis 1:10 sorgfältig gemischt. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Teststämme als massives Inokulum und, wie in der DIN gefordert, als Keimsuspension auf die Agarplatten unterschiedlicher Nisinkonzentration aufgeimpft. Das Ergebnis wurde nach 4-tägiger Bebrütung bei 37° abgelesen.

ERSATZBLATT

6. Ergebnis der Prüfung

6.1 Ergebnis der ersten orientierenden Prüfung mit der Nisinreinsubstanz

Tab. 1 Wachstum nach 4d 37° C

Helicobacter pylori I		Helicobacter pylori II	
Massiv-	Verdünnung	Massiv-	Verdünnung
einsaat		einsaat	
<u>pH 4,42</u>			
Kontrolle	+++	+++	+++
250 µg/ml	+++	+++	-
1.000 µg/ml	+	-	-
10.000 µg/ml	-	-	-
 <u>pH 2,0</u>			
Kontrolle	+++	+++	+++
250 µg/ml	++-+++	++-+++	-
1.000 µg/ml	+--+	+/-	-
10.000 µg/ml	-	-	-
Kontrolle	+++	+++	+++
pH neutral			

Hierbei bedeutet

+++ konfluierendes Wachstum,

+/-, +, ++ reduziertes Wachstum,

- kein Wachstum.

6.2 Wiederholungsprüfung

Tab.2	Wachstum nach 4d 37°C			
	Helicobacter pylori I		Helicobacter pylori II	
	Massiv-	Verdünnung	Massiv-	Verdünnung
	einsaat		einsaat	

pH 2,0

Kontrolle	+++	+++	+++	+++
500 µg/ml	++++	+++	-	-
1.000 µg/ml	+	+/-	-	-
2.500 µg/ml	-	-	-	-
5.000 µg/ml	-	-	-	-
10.000 µg/ml	-	-	-	-

Kontrolle	+++	+++	+++	+++
pH neutral				

7. Zusammenfassung:

H.p.I: Die Substanzwirkung beginnt bei 1.000 µg/ml,
die Hemmung ist komplett bei 2.500 µg/ml,

H.p.II: Die Empfindlichkeit dieses Stammes, bzw. seine
minimale Hemmkonzentration liegt bei <250 µg/ml.

Bei einer vorab erfolgten Prüfung dieser Substanz (Präparat SIGMA, keine Reinsubstanz) deutete sich eine Wirkung der Substanz bei allen 5 geprüften Stämmen bei 250 µg/ml an (eine komplette Hemmung wurde nicht erreicht).

Insgesamt ist in Abhängigkeit von der konkret vorliegenden Spezies der Bakterien und der konkreten Realisierung des Lantibioticums, insbesondere der nisinoischen Substanz, in einer pharmazeutischen Komposition bereits ab einer Wirkstoffkonzentration von 5 µg/ml eine Wirkung zu erzielen.

Die bereits beispielhaft erwähnten Permeabilisierer zur Reduktion der Mucosabarriere und als Wirkstoffverstärker lassen sich grundsätzlich in folgende Gruppen einteilen:

1. Lysin-Polymere und Protamine,
2. Polykationische Peptide, beispielsweise
Laktoferrin, Lysozym, Kathepsin G,
3. Aminoglykoside, karboxylische Ionophore,
4. kationische, anionische und amphotere
Detergenzien,
beispielsweise Benzalkoniumchlorid oder SDS,
5. Polymyxine, PMBM und entsprechende Derivate,
6. Chelatoren, beispielsweise div. EDTA's, HMP, NTA,
Citrat
7. Surfactants, beispielsweise Tweens, Tritons,
Glyzeride,

8. allgemeine Permeabilisierer, beispielsweise Tris, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} ,
9. Kohlenhydratfettsäureester, beispielsweise Saccharosemonofettsäureester,
10. Bioadhäsive Substanzen,
11. Liposomen zur intrazellulären Abtötung von internalisierten Bakterien,
12. Zyklooxygenasehemmer wie z.B. 5-ASA,
13. Protektive Antioxidanzien wie z.B. Vitamin C,
14. Andere Stoffe, die die Hydrophobizität des Magenschleims reduzieren.

Grundsätzlich können statt eines isolierten Permeabilisierers beliebige Kombinationen von zwei oder mehreren Permeabilisierern aus den oben angegebenen Gruppen eingesetzt werden, wobei die jeweilige Kombination von den Einsatzrandbedingungen abhängig ist.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Präparat zur Therapie und insbesondere Prophylaxe von Erkrankungen des Verdauungstraktes, die bei Anwesenheit von pathogenen und/oder fakultativ-pathogenen Bakterien auftreten, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirkstoff eine definierte Dosis eines Polypeptidantibioticums enthalten ist, durch dessen Applikation eine Wirkstoffkonzentration von mindestens 5 µg/ml am Wirkort erreicht wird.
2. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Polypeptidantibiotikum als Lantibiotikum ausgebildet ist.

3. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Lantibioticum als eine nisinoide Substanz ausgebildet ist.
4. Präparat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die nisinoide Substanz als Nisin ausgebildet ist.
5. Präparat nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die nisinoide Substanz aus einer Mischung von mindestens zwei Polypeptiden ausgebildet ist.
6. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß von der nisinoiden Substanz aktive Multimere mit Molekulargewichten zwischen 7.000 und 14.000 ausgebildet sind.
7. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6 dadurch gekennzeichnet, daß die Dosis als Füllung einer Kapsel ausgebildet ist.
8. Präparat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Füllung als eine pulverförmige Substanz ausgebildet ist.
9. Präparat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Füllung als eine Substanzdispersion ausgebildet ist.
10. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Dosis im Bereich einer Tablette angeordnet ist.

11. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Dosis in einer dosierbaren Flüssigkeit gelöst ist.
12. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Dosis in einer Flüssigkeit dispergiert ist.
13. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Dosis in einer speziellen galenischen Formulierung mit verzögerter Wirkstofffreisetzung und/oder verlängerter Retention angeordnet ist.
14. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß durch die applizierte Dosis eine Wirkstoffkonzentration von mindestens 50 µg/ml am Wirkort erreicht wird.
15. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß durch die applizierte Dosis eine Wirkstoffkonzentration von mindestens 250 µg/ml am Wirkort erreicht wird.
16. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß durch die applizierte Dosis eine Wirkstoffkonzentration von mindestens 1000 µg/ml am Wirkort erreicht wird.
17. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Dosis mit einem Wirkstoffverstärker kombiniert ist.

18. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoffverstärker als ein Permeabilisierer zur Reduktion der Mukosabarriere ausgebildet ist.
19. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Permeabilisierer als Chelator ausgebildet ist.
20. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Permeabilisierer als EDTA-Tris ausgebildet ist.
21. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Permeabilisierer als Zykl-oxygenasehemmer ausgebildet ist.
22. Präparat nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Zyklooxxygenasehemmer als Azetylsalizylsäure ausgebildet ist.
23. Präparat nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß der Zyklooxxygenasehemmer als 5-ASA ausgebildet ist.
24. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Permeabilisierer als Surfactant ausgebildet ist.
25. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß eine Indikation im Veterinärbereich vorgesehen ist.

26. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß eine Indikation zur Behandlung von Krankheiten des Verdauungstraktes vorgesehen ist, die von Nicht-Helicobacter-pylori-Bakterien verursacht werden.
27. Präparat nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien vom Tier auf den Menschen übertragen sind.
28. Präparat nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien vom Menschen auf das Tier übertragen sind.
29. Präparat nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Bakterien vom Menschen auf den Menschen übertragen sind.
30. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß bei Anwendungen im Darmbereich eine Wirkstoffkombination mit einem pH-Senker zur Bereitstellung eines sauren Mediums am Wirkort vorgesehen ist.
31. Präparat nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Senker als 5-Aminosalicylsäure ausgebildet ist.
32. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß eine Indikation zur Behandlung von Morbus Crohn vorgesehen ist.
33. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß eine Indikation zur Behandlung von Colitis ulcerosa vorgesehen ist.

34. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß eine Indikation zur Behandlung bestimmter Hypergastrinämien vorgesehen ist, an denen Bakterien beteiligt sind.
35. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß eine Indikation zur Behandlung bestimmter psychischer Störungen vorgesehen ist, die endokrinologisch oder toxisch bedingt sind.
36. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Teil des Wirkstoffes zur Ermöglichung einer Zellmembrandurchdringung von Liposomen begrenzt ist.
37. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Teil des Wirkstoffes als Lysozym ausgebildet ist.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 93/01006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 5 A61K37/02

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K C07K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FR,A,2 264 558 (NIVIERE ET AL) 17 October 1975 see the whole document ---	1,7-16, 25-29, 32-35
X	FILE SERVER STN KARLSRUHE, FILE MEDLINE ZUSAMMENFASSUNG 91320473 & VESTN OTORINOLARINGOL (1991 MAI-JUNI) (3) 63-6	1-3, 6-16, 25-29, 32-35
Y	DOROFICHUK ET AL: 'TREATMENT OF CHRONIC RHINITIS IN CHILDREN' see abstract --- -/--	4,5, 17-20, 24,30, 36,37

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 21 January 1994	Date of mailing of the international search report 17 -02- 1994
Name and mailing address of the ISA 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	Authorized officer Sitch, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT T

Inter. Application No

PCT/DE 93/01006

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FILE SERVER STN KARLSRUHE, FILE MEDLINE ZUSAMMENFASSUNG 81016948 & VRACH DELO (1980 JULI) (7) 115-7	1-3, 6-16, 25-29, 32-35
Y	SUZDAL'TSEV: 'USE OF BIFICOL FOR TREATING ADULTS WITH POSTDYSENTERIC COLITIS' see the whole article	4, 5, 17-20, 24, 30, 36, 37
Y	--- WO, A, 90 09739 (THE PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK, INC.) 7 September 1990	4, 5, 17-20, 24
X	see the whole document	1-20, 24-29, 32-35
Y	--- WO, A, 89 12399 (PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK) 28 December 1989	4, 5, 17-20, 24
X	see the whole document	1-20, 24-29, 32-35
Y	--- US, A, 5 043 176 (BYCROFT ET AL) 27 August 1991 cited in the application see column 1, line 55 - column 2, line 13 see column 4, line 3 - line 11	17, 30, 37
Y	--- PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10, no. 78 (C-335) 27 March 1986 & JP, A, 60 215 633 (TERUMO KK) 29 October 1985 see abstract	36
P, X	--- WO, A, 92 18143 (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 29 October 1992	1-20, 24-29, 32-36
P, Y	see the whole document	30, 37
P, X	--- WO, A, 93 13793 (APPLIED MICROBIOLOGY, INC.) 22 July 1993	1-20, 24-29, 32-35
P, Y	see the whole document -----	30, 36, 37

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/DE 93/01006

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR-A-2264558	17-10-75	CA-A- 1070675 DE-A- 2511852 JP-A- 51125715	29-01-80 09-10-75 02-11-76
WO-A-9009739	07-09-90	US-A- 4980163 AU-B- 618714 AU-A- 5285090 CA-A- 2028140 EP-A- 0424484 JP-T- 3504864	25-12-90 02-01-92 26-09-90 02-09-90 02-05-91 24-10-91
WO-A-8912399	28-12-89	AU-B- 631803 AU-A- 3843089 EP-A- 0382814 EP-A- 0545911 JP-T- 3500051 US-A- 5135910 US-A- 5217950 US-A- 5260271	10-12-92 12-01-90 22-08-90 09-06-93 10-01-91 04-08-92 08-06-93 09-11-93
US-A-5043176	27-08-91	CA-A- 2042107 EP-A- 0461530 JP-A- 4230205	14-12-91 18-12-91 19-08-92
WO-A-9218143	29-10-92	AU-A- 1581192	17-11-92
WO-A-9313793	22-07-93	AU-B- 3475093	03-08-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/DE 93/01006

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 5 A61K37/02

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 5 A61K C07K

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

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

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FR,A,2 264 558 (NIVIERE ET AL) 17. Oktober 1975 siehe das ganze Dokument ---	1,7-16, 25-29, 32-35
X	FILE SERVER STN KARLSRUHE, FILE MEDLINE ZUSAMMENFASSUNG 91320473 & VESTN OTORINOLARINGOL (1991 MAI-JUNI) (3) 63-6	1-3, 6-16, 25-29, 32-35
Y	DOROFICHUK ET AL: 'TREATMENT OF CHRONIC RHINITIS IN CHILDREN' siehe Zusammenfassung --- -/--	4,5, 17-20, 24,30, 36,37

☒ 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

21. Januar 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

17 -02- 1994

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
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

Bevollmächtigter Bediensteter

Sitch, W

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inter. sales Aktenzeichen

PCT/DE 93/01006

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	FILE SERVER STN KARLSRUHE, FILE MEDLINE ZUSAMMENFASSUNG 81016948 & VRACH DELO (1980 JULI) (7) 115-7	1-3, 6-16, 25-29, 32-35
Y	SUZDAL'TSEV: 'USE OF BIFICOL FOR TREATING ADULTS WITH POSTDYSENTERIC COLITIS' siehe das ganze Artikel ---	4,5, 17-20, 24,30, 36,37
Y	WO,A,90 09739 (THE PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK, INC.) 7. September 1990	4,5, 17-20,24
X	siehe das ganze Dokument ---	1-20, 24-29, 32-35
Y	WO,A,89 12399 (PUBLIC HEALTH RESEARCH INSTITUTE OF THE CITY OF NEW YORK) 28. Dezember 1989	4,5, 17-20,24
X	siehe das ganze Dokument ---	1-20, 24-29, 32-35
Y	US,A,5 043 176 (BYCROFT ET AL) 27. August 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe Spalte 1, Zeile 55 - Spalte 2, Zeile 13 siehe Spalte 4, Zeile 3 - Zeile 11 ---	17,30,37
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 10, no. 78 (C-335) 27. März 1986 & JP,A,60 215 633 (TERUMO KK) 29. Oktober 1985 siehe Zusammenfassung ---	36
P,X	WO,A,92 18143 (SMITHKLINE BEECHAM PLC) 29. Oktober 1992	1-20, 24-29, 32-36
P,Y	siehe das ganze Dokument ---	30,37
P,X	WO,A,93 13793 (APPLIED MICROBIOLOGY, INC.) 22. Juli 1993	1-20, 24-29, 32-35
P,Y	siehe das ganze Dokument -----	30,36,37

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 93/01006

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR-A-2264558	17-10-75	CA-A- 1070675	29-01-80
		DE-A- 2511852	09-10-75
		JP-A- 51125715	02-11-76

WO-A-9009739	07-09-90	US-A- 4980163	25-12-90
		AU-B- 618714	02-01-92
		AU-A- 5285090	26-09-90
		CA-A- 2028140	02-09-90
		EP-A- 0424484	02-05-91
		JP-T- 3504864	24-10-91

WO-A-8912399	28-12-89	AU-B- 631803	10-12-92
		AU-A- 3843089	12-01-90
		EP-A- 0382814	22-08-90
		EP-A- 0545911	09-06-93
		JP-T- 3500051	10-01-91
		US-A- 5135910	04-08-92
		US-A- 5217950	08-06-93
		US-A- 5260271	09-11-93

US-A-5043176	27-08-91	CA-A- 2042107	14-12-91
		EP-A- 0461530	18-12-91
		JP-A- 4230205	19-08-92

WO-A-9218143	29-10-92	AU-A- 1581192	17-11-92

WO-A-9313793	22-07-93	AU-B- 3475093	03-08-93