

(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
27. Juni 2002 (27.06.2002)

PCT

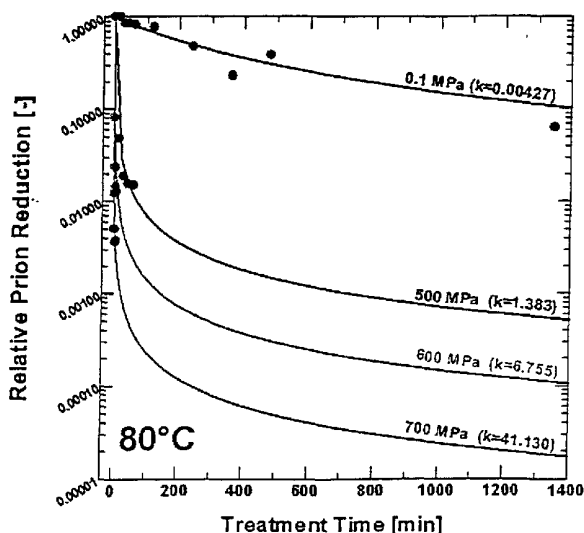
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/49460 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A23L 3/015**,
A23B 4/00, A61L 11/00, 2/02, C07K 1/113
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HEINZ, Volker**
[DE/DE]; Földerichstrasse 63, 13595 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/15027
- (74) Anwälte: **KRUSPIG, Volkmär** usw.; Meissner, Bolte &
Partner, Postfach 86 06 24, 81633 München (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum:
19. Dezember 2001 (19.12.2001)
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
100 63 667.5 20. Dezember 2000 (20.12.2000) DE
101 59 248.5 3. Dezember 2001 (03.12.2001) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: **KORTSCHACK, Fritz** [DE/DE]; Katzwanger
Steig 36 a, 14089 Berlin (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR MODIFYING THE PROTEIN STRUCTURE OF PRIONS PRP^{SC} IN A TARGETED MANNER

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR GEZIELTEN VERÄNDERUNG DER PROTEINSTRUKTUR VON PRIONEN PRP^{SC}



(57) Abstract: The invention relates to a method for modifying the protein structure of prions PrP^{SC} in a targeted manner, in animal raw products for consumption or further processing, especially meat, subcutaneous adipose tissue, connective tissue, brain and bone, and/or for sterilising abattoir equipment, operating instruments or similar objects contaminated with infectious PrP^{SC}, the raw products or equipment being subjected to a high pressure treatment acting on all sides, by means of a transmission medium.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



WO 02/49460 A1



TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

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.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gezielten Veränderung der Proteinstruktur von Prionen PrP^{Sc} in tierischen, zum Verzehr oder zur Weiterverarbeitung vorgesehenen Rohprodukten, insbesondere Fleisch, Unterhäuten, Bindegewebe, Hirn und Knochen und/oder zur Sterilisation von Schlachthausgerätschaften, Operationsbestecken oder dergleichen mit infektiösen PrP^{Sc} kontaminierten Gegenständen, wobei die Rohprodukte bzw. Gerätschaften über ein Übertragungsmedium einer intensiven, von allen Seiten wirkenden Hochdruckbehandlung unterzogen werden.

Verfahren zur gezielten Veränderung der Proteinstruktur von
Prionen PrP^{SC}

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur gezielten Veränderung der Proteinstruktur von Prionen PrP^{SC} oder infektiösen PrP^{SC}-Ketten in tierischen, zum Verzehr oder zur Weiterverarbeitung vorgesehenen Rohprodukten, insbesondere Fleisch, Unterhäute, 5 Bindegewebe, Hirn und Knochen und/oder zur Sterilisation von Schlächthausgerätschaften, Operationsbestecken oder dergleichen mit infektiösen PrP^{SC} kontaminierten Gegenständen, gemäß Oberbegriff des Patentanspruchs 1.

10 Es hat sich durch umfangreiche Untersuchungen gezeigt, daß die Erreger von Scrapie und BSE außerordentlich resistent gegen physikalische und chemische Einflüsse sind. Prionen sind keine Krankheitserreger im klassischen Sinne. Sie unterscheiden sich wesentlich von Bakterien oder Viren. Hitze von 100 Grad 15 Celsius, Chemikalien oder viele Desinfektionsmittel können Ihnen nichts anhaben. Prionen sind auch die Erreger weiterer Krankheiten bei Tieren, wie der Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen, und Menschen, wie dem sehr seltenen Gerstmann-Sträussler-Syndrom. Man nimmt an, dass die Erkrankung vom Tier 20 auf den Menschen übertragen werden kann.

Aus neuen Untersuchungen über die Strukturen des Prionproteins wurden Kenntnisse über die Entstehung von CJD, GSS, BSE, Scrapie und CWD gewonnen. Nach diesen Kenntnissen geht krankheitsdeterminierend das Prion-Protein in eine geänderte dreidimensionale Faltung über, wobei dieses umgefaltete Protein PrP^{SC} der krankheitsauslösende Faktor ist. Kommt nun ein natürliches Prion PrP^C in Kontakt mit einem entarteten, gefalteten Protein, verändert es seine Form und regt weitere Prionen zur Umfaltung 25 an. Auf der Oberfläche der Zelle häufen sich dann die infizierten Prionen an und die Nervenzelle stirbt ab. 30

Zur Bedeutung der BSE-Problematik allein in Deutschland sei auf folgende Fakten verwiesen.

Nach vorliegenden amtlichen Berechnungen wurden im Jahr 2000 in Deutschland über 3,8 Millionen Rinder mit einem durchschnittlichen Schlachtgewicht von 323kg und über 410.000 Kälber mit einem durchschnittlichen Schlachtgewicht von 125kg geschlachtet. Unter den geschlachteten Rindern waren über 630.000 Färsen mit einem durchschnittlichen Schlachtgewicht von 287kg, 1,5 Millionen Kühe mit einem durchschnittlichen Schlachtgewicht von 297 kg und 1,6 Millionen Bullen mit einem durchschnittlichen Schlachtgewicht von etwa 361kg. Weiterhin wurden allein im Jahr 2000 in Deutschland mindestens 42.000 Ochsen im Alter von 2 bis 3 Jahren geschlachtet. Mit Ausnahme von etwa 20.000 Zuchtbullen und etwas mehr als der Hälfte der geschlachteten Kälber werden fast alle männlichen Rinder als Jungbullen im Alter von 18 bis 24 Monaten geschlachtet. Bei den Kälbern muß man im allgemeinen noch nicht mit relevanten Mengen von Infektiosität rechnen. Bei den 18 bis 24 Monaten alten Jungbullen und den selten älteren Färsen ist selbst im Fall einer BSE-Infektion zumindest das Zentralnervengewebe sehr wenig infektiös. Hochinfektiös sind hingegen Hirn und Rückenmark von BSE-infizierten Kühen und Bullen. In der relevanten Altersklasse werden also in Deutschland jährlich etwa 1,566 Millionen Kühe, Ochsen und Bullen geschlachtet.

Bis zum 11.2.2001 wurden rund 209.000 BSE-Tests nach dem Fleischhygienerecht durchgeführt. Zu diesen Tests kommen noch die BSE-Tests bei gefallenen und notgeschlachteten Tieren hinzu. Bei bisher 17 (Stand 28.02. 2001) bestätigten BSE-Fällen bei im normalem Schlachthof oder beim Metzger geschlachteten Rindern muß etwa ungefähr mit 1 hochinfektiösen Rind pro $249.000 / 17 = 14.647$ normal geschlachteten Tieren gerechnet werden. Hochgerechnet auf die jährlichen Schlachtzahlen sind dies ungefähr 100, das Abwasser deutscher Schlachthöfe belastende Rinder. Weil bis ins Jahr 2000 Schlachtabfallprodukte einer zunehmenden Anzahl BSE-infizierter Rinder an Rinder und insbesondere Kälber verfüttert wurden, wird der Anteil der infizierten Tiere in den kommenden Jahren wahrscheinlich noch deutlich zunehmen.

Allein in den Schlachthöfen werden durch den Bolzenschuß, das Absetzen und Reinigen der Köpfe und das Aufsägen der Wirbelsäulen pro Rind etwa 10g Hirn und Rückenmark aus dem Schlachtkörper gepreßt oder gerissen. Dieser feine Gewebepreis wird mit Wasser von den Schlachtkörpern und Köpfen gespült und gelangt ins Abwasser. Bei 100 geschlachteten BSE-Rindern wären das 1000g hochinfektiöses Zentralnervengewebe, welches bei Aufnahme über die Nahrung jährlich etwa 5000 Rinder tödlich infizieren könnte. Diese recht große Ausgangsmenge infektiösen Gewebepreises gelangt unsterilisiert in die Kanalisation und aufgrund der hohen Fließgeschwindigkeiten größtenteils in die Kläranlagen. Würde man davon ausgehen, daß der Klärschlamm auf Rinderweiden zu verteilen ist, dann müßte mit einer noch erheblicheren Gefährdung der Rinder gerechnet werden, weil diese mit dem Gras auch täglich etwa 5kg Erde aufnehmen. Experimente haben gezeigt, daß der vollständige Abbau der Infektiosität im Boden einige bis viele Jahre dauern kann. Daher muß man damit rechnen, daß die Infektiosität teilweise in humusbildende Strukturen fest eingebunden und darin sehr stabil gelagert werden kann. Auf jeden Fall kann es während der Zeit des langsamen Abbaus, beispielsweise durch Bodenbakterien, dazu kommen, daß die Prionen über die Nahrungsketten des Bodens von der Aufnahme durch Kleinstlebewesen bis in kleine Säugetiere gelangen, die dann infiziert werden könnten.

Aus den vorgenannten Darlegungen ergibt sich die klare Relevanz dafür, daß medizinische Geräte und tierische Rohstoffe für Nahrungsmittel, Medikamente und Kosmetika so zu sterilisieren sind, daß auch infektiöse Prionproteine inaktiviert werden. Eine Inaktivierung ist nur dann dauerhaft wirksam, wenn sie wirklich vollständig war, wie experimentelle Untersuchungen zeigten.

Aus der Lebensmitteltechnologie ist seit Anfang der 80er Jahre die Hochdruckbehandlung für Nahrungsmittel bekannt, einerseits um diese zu entkeimen und andererseits um Effekte zu erzielen, die wie bei der Nahrungszubereitung durch Kochen mit hoher Temperatur erreicht werden. Hierbei kommt es zu einer Denaturierung von Eiweiß, zur Inaktivierung von Enzymen und zur Gelati-

nierung der Stärke neben der Abtötung von Mikroorganismen. Durch die Hochdruckbehandlung werden große Moleküle beeinflusst, während kleinere, wie Aminosäuren, Vitamine oder Geschmacksstoffe erhalten bleiben.

5 Die Hochdruckbehandlung selbst stellt einen nichtthermischen Prozeß dar, der mit hydrostatischen Drücken im Bereich von mehreren 1000 bar arbeitet. Nach der Behandlung finden elastische Produkte beim Entspannen wieder in ihre ursprüngliche Form und Größe zurück. Bekannt ist es, in flexible Folien verpackte
10 Lebensmittel in Chargiergestelle oder -körper einzulegen, die dann in eine mit Wasser als Druckträger gefüllten Behälter eingeführt werden. Der Druckbehälter wird nach dem Beladen geschlossen und der Druck aufgebaut, indem ein Kolben in den Druckbehälter eingefahren wird, bis der voreingestellte Druck
15 erreicht ist. Grundsätzlich gilt, daß der Druck der wichtigste Parameter ist, wobei Zeit und Temperatur nur eine untergeordnete Rolle spielen, da die notwendige Behandlungsenergie über den Druck in das System eingebracht wird.

Durch den Druck entsteht Kompressionswärme deren Verlauf von
20 der Zusammensetzung des Behandlungsgutes abhängig ist. Produkte mit einem hohen Fettanteil erreichen durch die Kompressionswärme ein höheres Temperaturniveau als reines Wasser. Der druckabhängige Temperaturanstieg kann zur gezielten Behandlung des Gutes eingesetzt werden. Nach Beendigung der Druckbe-
25 handlung sinkt die Temperatur, auch des Behandlungsgutes, zeitgleich wieder auf das Ausgangstemperaturniveau zurück.

Aus dem Vorgenannten ist es daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur gezielten Veränderung der Proteinstruktur von
30 Prionen PrP^{SC} in tierischen, zum Verzehr oder zur Weiterverarbeitung vorgesehenen Rohprodukten, aber auch zur Sterilisation von medizinischen Geräten, Schlachthausgerätschaften oder dergleichen anzugeben, wobei die Behandlung selbst die übrigen, gewünschten Eigenschaften der Rohprodukte nicht oder nur in ge-
35 ringem Maße beeinflussen soll bzw. der insgesamt anfallende Behandlungsaufwand reduziert ist.

Die Lösung der Aufgabe der Erfindung erfolgt mit einem Verfahren gemäß den Merkmalen des Patentanspruchs 1, wobei die

Unteransprüche mindestens zweckmäßige Ausgestaltungen und Weiterbildungen umfassen.

5 Erfindungsgemäß wird die überraschende Erkenntnis genutzt, daß durch eine Hochdruckbehandlung, welche an sich bekannt ist, die Proteinstruktur von Prionen so verändert werden kann, daß eine Deaktivierung dieser zur Vermeidung von BSE, CJD, GSS, CWD oder Scrapie eintritt.

10 Bezüglich der tatsächlichen überraschenden Wirkungen sei auf den nachveröffentlichten Artikel in „Biochemical and Biophysical Research Communications“ 287, 147 bis 152 (2001): Pressure Denaturation of the Yeast Prion Protein Ure2, dort insbesondere Seite 149, linke Spalte Mitte, verwiesen.

15 Es wird also erfindungsgemäß über ein Übertragungsmedium das jeweilige flüssigkeitsumspülte oder in einer feuchten Umgebung befindliche Rohprodukt einer intensiven, von allen Seiten wirkenden Hochdruckbehandlung unterzogen, wobei auch eine spezifizierte Temperaturbehandlung erfolgt.

20 Bei der Behandlung wird das Rohprodukt verdichtet, gasgefüllte Hohlräume werden entfernt und entartete gefaltete Proteine werden deaktiviert, so daß die Gefahr ausgeschlossen ist, daß beim Inkontaktkommen des entarteten gefalteten Proteins mit einem Prion PrP^C weitere Prionen zur Umfaltung angeregt werden.

30 Bei einem Ausführungsbeispiel der Erfindung wurden verschiedene Rohprodukte mit thermoplastischem Material umhüllt, in einen Druckbehälter überführt und dort auf ca. 80° C erhitzt. Es erfolgte dann ein Druckaufbau bis hin zu einem Maximaldruck von etwa 8000 bar. Durch die Kompressionswärme erfolgte eine Temperaturerhöhung auf ca. 110°C. Die Behandlung dauerte insgesamt 15 Minuten. Mit dem Abbau des Drucks reduzierte sich die Temperatur wieder auf den Ausgangswert von 80° C.

35 Es konnte dann festgestellt werden, daß aufgrund der Behandlung eine BSE-Infektivität nicht mehr gegeben war.

Der Nachweis der Prioneninaktivierung wurde mittels eines biochemischen Testkits zur Feststellung der Prionenresistenz ge-

genüber Proteinase K durchgeführt. Bei dieser Methode wird davon ausgegangen, daß nur die infektiöse Form des Prion Proteins die Verdauerung durch das Enzympräparat übersteht. Die Detektion der verbleibenden Prionen erfolgt durch speziell
5 entwickelte Antikörper und Nachweisverfahren wie z.B. Western Blot oder LIA.

Zur Quantifizierung der Inaktivierungsergebnisse mittels LIA-Test müssen Vergleichstests vorgenommen werden. Hierzu wurde
10 eine positiv beurteilte Probe (Gehirnhomogenisat einer BSE-Kuh) mit Material von negativen Proben in definierten Stufen verdünnt, wodurch sich die Konzentration der Prionen im gleichen Verhältnis reduziert. Diese Reduktion wird üblicherweise
15 logarithmisch aufgetragen. Die Normierung der bei den Verdünnungen erhaltenen LIA-Werte erfolgte mittels Division durch den jeweiligen LIA-Anfangswert LIA/LIA_0 . Die Fig. 1 und die angegebene Gleichung dient für die Inaktivierungsversuche als Kalibrierung. Im logarithmischen Maßstab ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Mit dieser Gleichung wurden nun die LIA-Werte vor
20 der kinetischen Analyse in Verdünnungsfaktoren umgerechnet ($-1=1:10$; $-2=1:100$; $-3=1:1000$ etc).

Die Ermittlung des Druckeffekts auf die Prioneninaktivierung erfolgte durch die Analyse der Reduktion des LIA-Parameters im
25 zeitlichen Verlauf der Einwirkung konstanten hydrostatischen Drucks bei konstanter Temperatur auf in Kunststoffampullen verpacktes Homogenisat von BSE-positiv getesteten Rinderhirn. Derartige Untersuchungen wurden auf verschiedenen Druck- und Temperaturniveaus und bei ausgewählten zeitlichen Stützstellen
30 durchgeführt.

Die Auftragung der in Verdünnungsfaktoren umgerechneten LIA-Werte im halblogarithmischen Maßstab ergab die für die weitergehende kinetische Analyse benötigten Inaktivierungskurven. Am
35 Beispiel des Temperaturniveaus 80°C ist der zeitliche Inaktivierungsverlauf bei Umgebungsdruck (0,1 MPa), 500 MPa, 600 MPa und 700 MPa in der Fig. 2 dargestellt. Typischerweise werden auf allen Druckniveaus stark gekrümmte Kurven mit stetig abnehmender Steilheit erhalten.

Die zur Konkavität führende Abnahme der Inaktivierungsgeschwindigkeit kann auf druck- bzw. thermoresistente Subpopulationen der Prionengesamtheit zurückgeführt werden.

5

Die in der Fig. 2 gezeigte Extrapolation der experimentellen Ergebnisse wurde mittels einer kinetischen Analyse durchgeführt, die auf der Annahme einer Proportionalität zwischen der Inaktivierungsgeschwindigkeit dC/dt und der exponentiell korrigierten Prionenkonzentration C^n beruht. n wird bei diesem Konzept als Reaktionsordnung bezeichnet. Nach Einführung des Proportionalitätsfaktors k (=Geschwindigkeitskonstante) ergibt sich folgende Differentialgleichung:

10

15

$$\frac{dC}{dt} = -k \cdot C^n \quad \text{Gleichung 1}$$

In integrierter Form ergibt sich folgendes Zeitgesetz:

20

$$\left(\frac{C}{C_0} \right) = (1 + k \cdot t \cdot (n-1))^{-\frac{1}{n-1}} \quad \text{Gleichung 2}$$

25

Die linke Seite dieser Gleichung entspricht der relativen Abnahme der Prionenkonzentration ausgedrückt in Verdünnungsfaktoren gemäß der oben beschriebenen Kalibrierung. Die Geschwindigkeitskonstante k kann regressiv ermittelt werden.

30

Die Bestimmung der Reaktionsordnung erfolgte durch die Minimierung des aufsummierten Standardfehlers aller verfügbaren Inaktivierungsdaten auf verschiedenen Temperatur- und Druckniveaus.

35

Wie aus Fig. 3 ersichtlich ist, durchläuft die Standardfehlerfunktion bei einer Reaktionsordnung von $n=2$ ein Minimum.

Somit können unter einheitlicher Verwendung der Reaktionsordnung von $n=2,0$ die Parameter des Zeitgesetzes der Inaktivie-

rungsreaktion zur Beschreibung des Druck- und Temperatureinflusses auf die Geschwindigkeitskonstante k reduziert werden.

Für die vollständige Beschreibung muß für k eine Funktion der Temperatur und des Drucks gefunden werden. In Fig. 4 sind die aus den Regressionsanalysen der Inaktivierungskinetiken ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k dargestellt (Punkte). Aus der logarithmischen Auftragung von k gegen den Behandlungsdruck kann ein linearer Zusammenhang abgeleitet werden. Üblicherweise wird dies folgendermaßen formuliert (siehe z.B. Morild, E. (1981) The Theory of Pressure Effects on Enzymes. Advances in Protein Chemistry 34: 93-167):

$$\ln(k) = k_0 + \left(\frac{-\Delta V^\ddagger}{R \cdot T} \right) \cdot p \quad \text{Gleichung 3}$$

Als charakteristischer Parameter tritt in dieser Gleichung das sogenannte Aktivierungsvolumen ΔV^\ddagger , das meist in [mL/mol] angegeben ist. R ist die molare Gaskonstante: 8,314 J/(mol K). k_0 kann näherungsweise als die Geschwindigkeitskonstante bei Umgebungsdruck (0,1 MPa) auf dem jeweiligen Temperaturniveau betrachtet werden. Die Approximierung der experimentellen Ergebnisse erfolgte mittels eines Polynoms 2. Ordnung. Die resultierende Gesamtgleichung lautet daher:

$$\ln(k) = A_0 + A_1 \cdot T + A_2 \cdot T^2 + \left(\frac{-\Delta V^\ddagger}{R \cdot T} \right) \cdot p \quad \text{Gleichung 4}$$

Nach regressiver Ermittlung der Parameter ergibt sich:

$$\ln(k) = 86,05 - 0,728 \cdot T + 0,00133 \cdot T^2 + \left(\frac{36,79}{R \cdot T} \right) \cdot p \quad \text{Gleichung 5}$$

Für die Temperaturniveaus: 30, 40, 60, 80 und 100°C ist die Funktion in der Fig. 4 grafisch dargestellt.

Auf der Grundlage der bisher verfügbaren experimentellen Ergebnisse kann somit als charakteristische Größe der Druckabhängigkeit der Inaktivierungskinetik ein Aktivierungsvolumen von $\Delta V^\ddagger = -36,79 \pm 2,88$ mL/mol bei einem Signifikanzniveau von 0,95 angegeben werden.

Zur Berechnung der zu erwartenden Prioneninaktivierung (angegeben in Zehnerpotenzen) für die ermittelte Reaktionsordnung von $n=2$ können zusammenfassend folgende Funktionen angegeben werden:

a)

Für den Fall einer Behandlung der Dauer t (in Minuten) bei gleichbleibendem Temperatur- und Druckniveau, wobei die Kompressions- und Dekompressionszeiten gegenüber der Einwirkungszeit vernachlässigt werden:

$$\log\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = \log\left(\frac{1}{1+k \cdot t}\right) \quad \text{Gleichung 6}$$

Die für das jeweilige Temperatur und Druckniveau gültige Geschwindigkeitskonstante kann aus Gleichung 8 errechnet werden.

b)

Die bis zum Zeitpunkt t (in Minuten) erreichte Inaktivierung für den Fall, daß Änderungen von Druck und Temperatur während der Behandlungszeit berücksichtigt werden müssen:

$$\log\left(\frac{C_t}{C_0}\right) = \log\left(\frac{1}{1+\int_0^t k dt}\right) \quad \text{Gleichung 7}$$

Da die Geschwindigkeitskonstante k eine Funktion der zeitlich variablen Größen Druck und Temperatur ist, müssen in Gleichung 8 Temperatur und Druck als die bei der Behandlung verwendeten Zeitfunktionen eingesetzt und wie in Gleichung 7 dargestellt integriert werden.

$$\ln(k) = 86,05 - 0,728 \cdot T + 0,00133 \cdot T^2 + \left(\frac{36,79}{R \cdot T} \right) \cdot p \quad \text{Gleichung 8}$$

5

mit: C_t/C_0 : Reduktion der Prionenkonzentration

k: Geschwindigkeitskonstante [1/min]

R: molare Gaskonstante: 8,314 J/(mol K)

p: Druck [MPa]

10

T: Temperatur [K]

In der Literatur sind Richtwerte für die erforderliche Behandlungsintensität zur sicheren Hitzeinaktivierung CJD infizierter Materialien angegeben (siehe z.B. Casolari, A. (1998) Heat Resistance of Prions and Food Processing, Food Microbiology 15: 59-63):

15

- 18 Minuten bei 134°C laut Department of Health and Social Security (DHSS)
- 60 Minuten bei 132°C laut American Neurobiological Association (ANA)

20

Bei diesen Temperaturen liegt bei feuchter Hitze ein Dampfdruck von ca. 0,4 MPa vor. Setzt man diese Bedingungen in die obige Gleichung für die auf LIA-Basis ermittelte Prioneninaktivierung ein, so ergeben sich 5,42 bzw. 5,67, im Mittel also 5,56 Zehnerpotenzen Reduktion. Für diese als ausreichend angesehene Reduktion können nun aus der oben entwickelten Gleichung für jeweils konstante Behandlungszeiten bestimmte Druck-Temperatur-Bedingungen ermittelt werden, die zu identischen Prioneninaktivierungen führen (siehe auch Fig. 5).

25

30

Ausgehend von den in der Literatur angegebenen Behandlungsbedingungen für die Hitzeinaktivierung bei Umgebungsdruck (p=0,1 MPa) zeigt sich auf Basis des vorhandenen Datenmaterials, daß durch Druckerhöhung ein identischer Effekt auf niedrigerem Eingangstemperaturniveau erreichbar ist.

35

Die erforderliche Behandlungstemperatur wird unter Berücksichtigung der entstehenden Kompressionswärme erreicht. Zeitgleich

mit der Druckreduzierung sinkt das Temperaturniveau nach Abschluss der Druckbehandlung wieder auf den Ausgangswert zurück.

5 Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird also zunächst die Art bzw. die Eigenschaften des zu behandelnden Produkts oder Gegenstands bestimmt. Wenn hier ein Produkt vorliegt, das z.B. ein Rohprodukt ist, dessen Eigenschaften durch die Behandlung nicht nachteilig beeinflusst werden sollen, dann wird unter Berücksichtigung der vorstehenden Beziehungen überprüft, bei welchem
10 Druckwert auf niedrigerem Temperaturniveau der gewünschte Inaktivierungserfolg eintritt. Die Druck- bzw. Druck-Temperatur-Behandlung erfolgt dann in einer feuchten Umgebung, d.h. unter Nutzung einer reaktiven Flüssigkeit.

15 Eine weitere Größe im Entscheidungssystem neben der anzustrebenden minimalen Temperatur in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Produkte ist eine möglichst kurze bzw. nicht zu lange Behandlungsdauer, um ein Einordnen des Verfahrens in übliche Produktionszyklen ohne nennenswerte Verringerung der Effektivität zu ermöglichen.
20

Bei Materialien bzw. Gegenständen besonderer Art, wie beispielsweise Schlachthausmessern, Operationsbestecken oder dergleichen kann selbstverständlich eine gleichzeitige Temperaturbehandlung auf höherem Temperaturniveau gewählt werden.
25

Patentansprüche

1. Verfahren zur gezielten Veränderung der Proteinstruktur von Prionen PrP^{SC} oder infektiösen PrP^{SC}-Ketten in tierischen, zum
 5 Verzehr oder zur Weiterverarbeitung vorgesehenen Rohprodukten, insbesondere Fleisch, Unterhäuten, Bindegewebe, Hirn und Knochen und/oder zur Sterilisation von Schlachthausgerätschaften, Operationsbestecken oder dergleichen mit infektiösen PrP^{SC} kontaminierten Gegenständen
 10 dadurch gekennzeichnet, daß die Rohprodukte und/oder Gerätschaften über ein Übertragungsmedium in einer feuchten Umgebung einer intensiven, von allen Seiten wirkenden Hochdruckbehandlung die eine oder mehrere Kompressions- bzw. Dekompressionsphasen beinhaltet unterzogen
 15 werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Hochdruckbehandlung kombiniert mit einer gezielten
 20 Temperaturbehandlung auf möglichst niedrigem Niveau erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß bei der Druckbehandlung die Kompressionswärme für die
 25 erforderliche Temperaturerhöhung des Behandlungsgutes genutzt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Behandlung erforderlichen Druck-Temperatur-Bedingungen
 30 bei vorgegebener Reduktionszahl aus nachstehender Gleichung ermittelt werden:

$$\ln(k) = 86,05 - 0,728 \cdot T + 0,00133 \cdot T^2 + \left(\frac{36,79}{R \cdot T} \right) \cdot p$$

35 mit: C_t/C₀: Reduktion der Prionenkonzentration
 k: Geschwindigkeitskonstante [1/min]
 R: molare Gaskonstante: 8,314 J/(mol K)
 p: Druck [MPa]
 T: Temperatur [K]

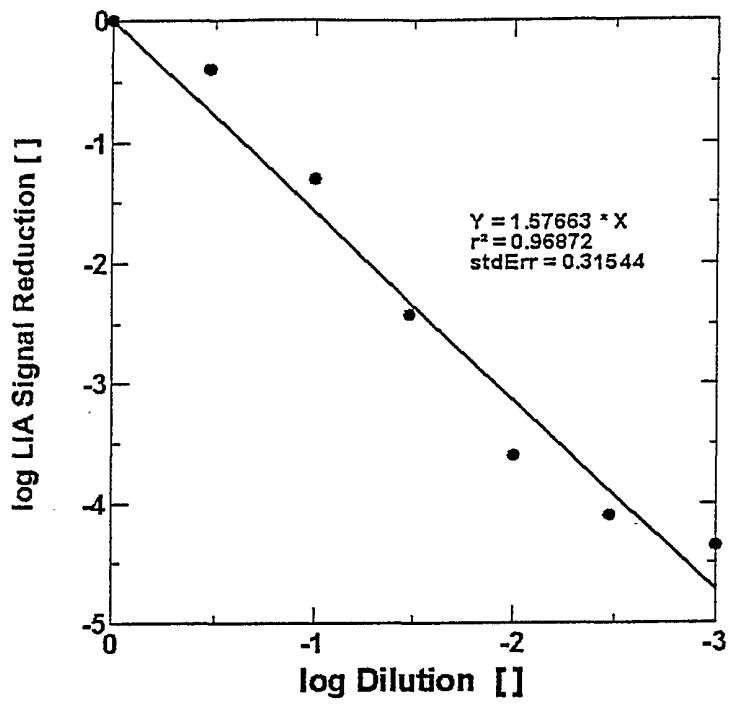


Fig. 1

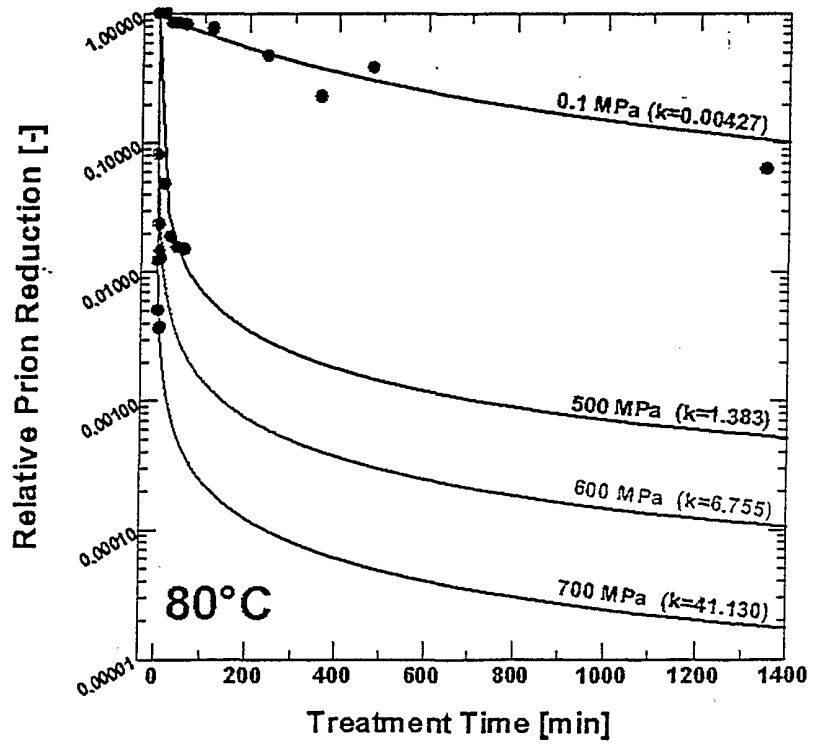


Fig. 2

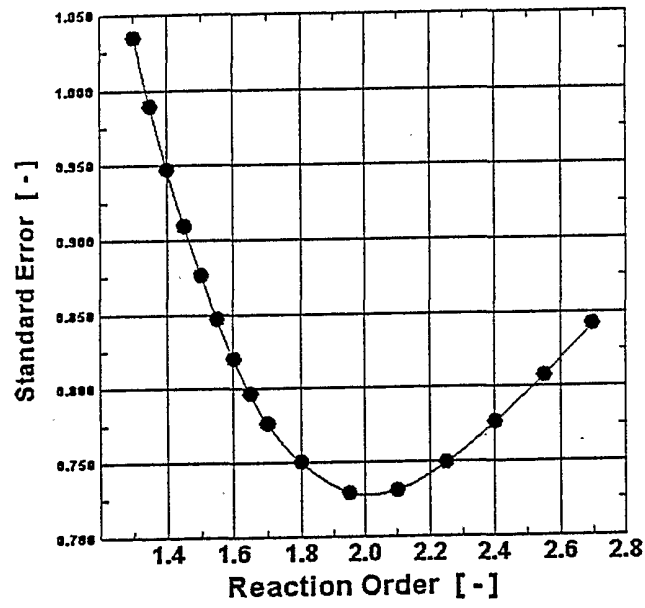


Fig. 3

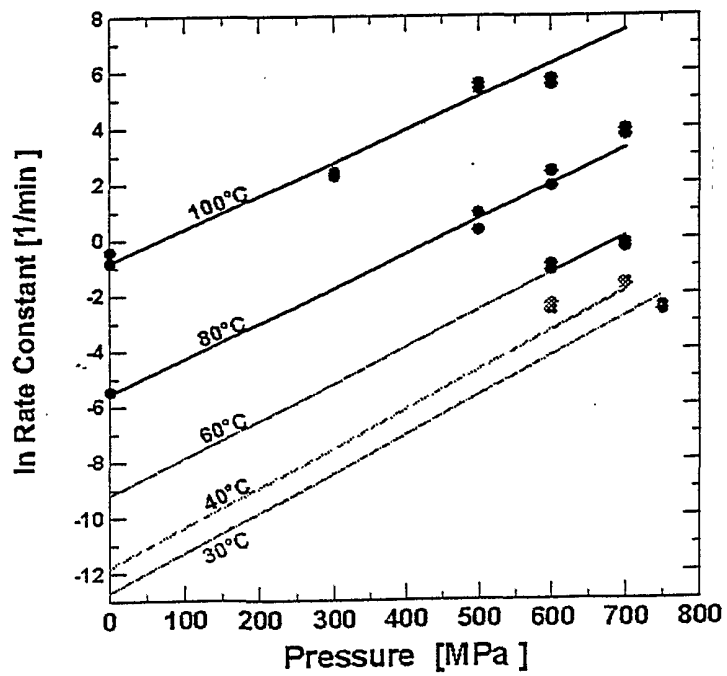


Fig. 4

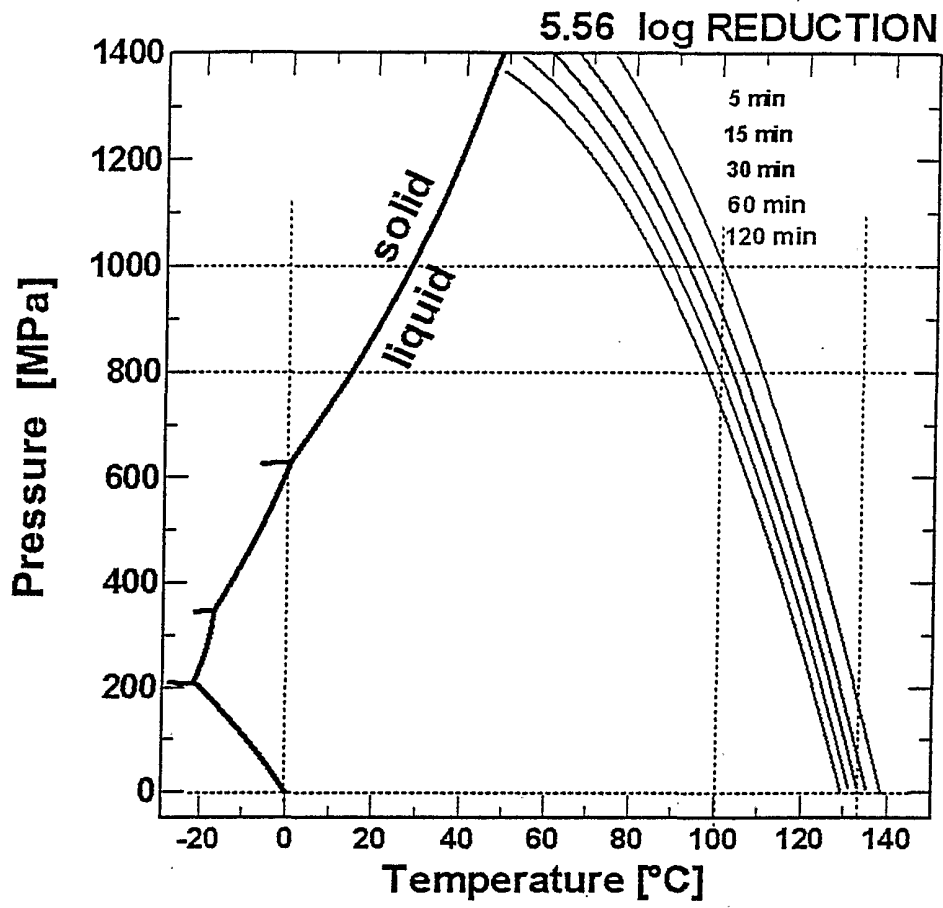


Fig. 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No .
PCT/EP 01/15027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 A23L3/015 A23B4/00 A61L11/00 A61L2/02 C07K1/113

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 7 A23L A23B A61L 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)
 EPO-Internal, WPI Data, PAJ, FSTA, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEHMANN G: "HOCHDRUCKBEHANDLUNG - EINE NEUE LEBENSMITTELTECHNOLOGIE" FLEISCHWIRTSCHAFT, FRANKFURT, DE, vol. 76, no. 10, 1996, pages 1004-1005, XP002061566 ISSN: 0015-363X page 1004 -page 1005	1-4
X	US 6 017 572 A (MEYER RICHARD S) 25 January 2000 (2000-01-25) claims; examples	1-4
X	US 6 086 936 A (BAKER ROBERT ET AL) 11 July 2000 (2000-07-11) the whole document	1-4
	-/--	

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	*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
E earlier document but published on or after the international filing date	*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
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)	*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.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 2 April 2002	Date of mailing of the international search report 17/04/2002
---	--

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 Boddaert, P
--	---------------------------------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/15027

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 021 958 A (S I C I T S P A) 26 July 2000 (2000-07-26) the whole document	1
P,X	WO 01 09287 A (MEYER PITTROFF ROLAND ;MITTELMEIER WOLFRAM (DE); HOEHN GERRIT (DE)) 8 February 2001 (2001-02-08) abstract; claims	1-3
X	WO 99 25206 A (STEWART CYNTHIA M ;DUNNE PATRICK (US); SIKES ANTHONY (US); UNIV DE) 27 May 1999 (1999-05-27) abstract; claims	1-4
P,X	ZHOU J. : "Pressure denaturation of the Yeast prion protein Ure2" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 287, no. 1, September 2001 (2001-09), pages 147-152, XP002192684 cited in the application the whole document	1
X	WO 98 26667 A (KORTSCHACK FRITZ) 25 June 1998 (1998-06-25) the whole document	1-4
X	US 5 213 029 A (YUTAKA HIDEKI) 25 May 1993 (1993-05-25) column 1 -column 2	1-4
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 124 (C-1035), 16 March 1993 (1993-03-16) -& JP 04 304838 A (TOPPAN PRINTING CO LTD), 28 October 1992 (1992-10-28) abstract	1-4
P,X	DE 200 21 445 U (SANCHEZ RAMOS GUSTAVO) 28 June 2001 (2001-06-28) page 1	1
P,X	DE 101 06 115 A (LOTTERMOSER MANFRED) 6 September 2001 (2001-09-06) the whole document	1
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 180 (C-1046), 8 April 1993 (1993-04-08) -& JP 04 335873 A (ATSUSHI SUZUKI;OTHERS: 01), 24 November 1992 (1992-11-24) abstract	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/15027

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6017572	A	25-01-2000	AU 2571299 A	03-04-2000
			BR 9913604 A	22-05-2001
			CN 1317939 T	17-10-2001
			EP 1112008 A1	04-07-2001
			JP 3062489 B2	10-07-2000
			JP 2000083633 A	28-03-2000
			NO 20011346 A	16-03-2001
			WO 0015053 A1	23-03-2000
			US 6177115 B1	23-01-2001
US 6086936	A	11-07-2000	AU 711708 B2	21-10-1999
			AU 1806797 A	03-07-1997
			BR 9611951 A	28-12-1999
			CA 2239291 A1	19-06-1997
			EP 0866667 A1	30-09-1998
			WO 9721361 A1	19-06-1997
			JP 2000501612 T	15-02-2000
			US 6207215 B1	27-03-2001
EP 1021958	A	26-07-2000	EP 1021958 A1	26-07-2000
WO 0109287	A	08-02-2001	DE 29913522 U1	09-12-1999
			DE 29913524 U1	02-12-1999
			DE 29913526 U1	27-01-2000
			AU 5969300 A	19-02-2001
			WO 0109287 A2	08-02-2001
WO 9925206	A	27-05-1999	WO 9925206 A1	27-05-1999
			US 6110516 A	29-08-2000
			ZA 9810405 A	13-05-1999
WO 9826667	A	25-06-1998	DE 19653677 C1	18-09-1997
			WO 9826667 A1	25-06-1998
			EP 0944329 A1	29-09-1999
			US 6117460 A	12-09-2000
US 5213029	A	25-05-1993	JP 5000071 A	08-01-1993
			KR 9502786 B1	27-03-1995
JP 04304838	A	28-10-1992	NONE	
DE 20021445	U	28-06-2001	DE 20021445 U1	28-06-2001
DE 10106115	A	06-09-2001	DE 10106115 A1	06-09-2001
JP 04335873	A	24-11-1992	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/15027

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 A23L3/015 A23B4/00 A61L11/00 A61L2/02 C07K1/113

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

B. RECHERCHIERTER GEBIETE
 Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 A23L A23B A61L 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)
 EPO-Internal, WPI Data, PAJ, FSTA, BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	LEHMANN G: "HOCHDRUCKBEHANDLUNG - EINE NEUE LEBENSMITTELTECHNOLOGIE" FLEISCHWIRTSCHAFT, FRANKFURT, DE, Bd. 76, Nr. 10, 1996, Seiten 1004-1005, XP002061566 ISSN: 0015-363X Seite 1004 -Seite 1005 ---	1-4
X	US 6 017 572 A (MEYER RICHARD S) 25. Januar 2000 (2000-01-25) Ansprüche; Beispiele ---	1-4
X	US 6 086 936 A (BAKER ROBERT ET AL) 11. Juli 2000 (2000-07-11) das ganze Dokument ---	1-4
	-/--	

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
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
2. April 2002	17/04/2002

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 Boddaert, P
---	--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 021 958 A (S I C I T S P A) 26. Juli 2000 (2000-07-26) das ganze Dokument ----	1
P,X	WO 01 09287 A (MEYER PITTROFF ROLAND ;MITTELMEIER WOLFRAM (DE); HOEHN GERRIT (DE)) 8. Februar 2001 (2001-02-08) Zusammenfassung; Ansprüche ----	1-3
X	WO 99 25206 A (STEWART CYNTHIA M ;DUNNE PATRICK (US); SIKES ANTHONY (US); UNIV DE) 27. Mai 1999 (1999-05-27) Zusammenfassung; Ansprüche ----	1-4
P,X	ZHOU J. : "Pressure denaturation of the Yeast prion protein Ure2" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd. 287, Nr. 1, September 2001 (2001-09), Seiten 147-152, XP002192684 inder Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	1
X	WO 98 26667 A (KORTSCHACK FRITZ) 25. Juni 1998 (1998-06-25) das ganze Dokument ----	1-4
X	US 5 213 029 A (YUTAKA HIDEKI) 25. Mai 1993 (1993-05-25) Spalte 1 -Spalte 2 ----	1-4
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 124 (C-1035), 16. März 1993 (1993-03-16) -& JP 04 304838 A (TOPPAN PRINTING CO LTD), 28. Oktober 1992 (1992-10-28) Zusammenfassung ----	1-4
P,X	DE 200 21 445 U (SANCHEZ RAMOS GUSTAVO) 28. Juni 2001 (2001-06-28) Seite 1 ----	1
P,X	DE 101 06 115 A (LOTTERMOSER MANFRED) 6. September 2001 (2001-09-06) das ganze Dokument ----	1
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 180 (C-1046), 8. April 1993 (1993-04-08) -& JP 04 335873 A (ATSUSHI SUZUKI;OTHERS: 01), 24. November 1992 (1992-11-24) Zusammenfassung -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/15027

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6017572	A	25-01-2000	AU 2571299 A 03-04-2000
			BR 9913604 A 22-05-2001
			CN 1317939 T 17-10-2001
			EP 1112008 A1 04-07-2001
			JP 3062489 B2 10-07-2000
			JP 2000083633 A 28-03-2000
			NO 20011346 A 16-03-2001
			WO 0015053 A1 23-03-2000
			US 6177115 B1 23-01-2001
			US 6086936
AU 1806797 A 03-07-1997			
BR 9611951 A 28-12-1999			
CA 2239291 A1 19-06-1997			
EP 0866667 A1 30-09-1998			
WO 9721361 A1 19-06-1997			
JP 2000501612 T 15-02-2000			
US 6207215 B1 27-03-2001			
EP 1021958	A	26-07-2000	EP 1021958 A1 26-07-2000
WO 0109287	A	08-02-2001	DE 29913522 U1 09-12-1999
			DE 29913524 U1 02-12-1999
			DE 29913526 U1 27-01-2000
			AU 5969300 A 19-02-2001
			WO 0109287 A2 08-02-2001
WO 9925206	A	27-05-1999	WO 9925206 A1 27-05-1999
			US 6110516 A 29-08-2000
			ZA 9810405 A 13-05-1999
WO 9826667	A	25-06-1998	DE 19653677 C1 18-09-1997
			WO 9826667 A1 25-06-1998
			EP 0944329 A1 29-09-1999
			US 6117460 A 12-09-2000
US 5213029	A	25-05-1993	JP 5000071 A 08-01-1993
			KR 9502786 B1 27-03-1995
JP 04304838	A	28-10-1992	KEINE
DE 20021445	U	28-06-2001	DE 20021445 U1 28-06-2001
DE 10106115	A	06-09-2001	DE 10106115 A1 06-09-2001
JP 04335873	A	24-11-1992	KEINE