



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 03 282 T2 2004.05.06**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 144 668 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12P 19/26**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 03 282.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB00/00082**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 900 777.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/44925**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.01.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **03.08.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **17.10.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.06.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.05.2004**

(30) Unionspriorität:
15499 28.01.1999 CH

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
TRB Chemedica S.A., Vouvry, CH

(72) Erfinder:
**CARLINO, Stefano, CH-1870 Monthey, CH;
MAGNETTE, François, CH-1633 Marsens, CH**

(74) Vertreter:
Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON HYALURONSÄURE MIT HOHEM MOLEKULARGEWICHT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

- [0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung von Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht oder eines Salzes davon.
- [0002] Hyaluronsäure ist ein Mucoïd-Polysaccharid biologischen Ursprungs, welches in der Natur weit verbreitet ist. Zum Beispiel ist bekannt, dass Hyaluronsäure in verschiedenen tierischen Geweben wie Nabelschnur, Synovialfluid, Glaskörperflüssigkeit, Hahnenkamm und verschiedenen Bindegeweben wie Haut und Knorpel vorhanden ist.
- [0003] Chemisch ist Hyaluronsäure ein Vertreter der Glycosaminglycane und sie ist aufgebaut aus abwechselnden und wiederkehrenden Einheiten von D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin, wodurch eine lineare Kette gebildet wird, die ein Molekulargewicht von bis zu 13×10^6 Dalton hat.
- [0004] In der Bedeutung der vorliegenden Erfindung ist Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von nicht weniger als etwa $0,5 \times 10^6$ Dalton.
- [0005] Es soll angemerkt sein, dass der Begriff "Hyaluronsäure" in der vorliegenden Beschreibung und den Patentansprüchen indifferent Hyaluronsäure in ihrer Säureform oder in ihrer Salzform, wie zum Beispiel Natriumhyaluronat, Kaliumhyaluronat, Magnesiumhyaluronat, Calciumhyaluronat oder andere, bedeuten kann.
- [0006] Hyaluronsäure ist bei hohem Molekulargewicht viskos und in der Lage, einen gelartigen Zustand beizubehalten, wodurch sie als Schmiermittel dient, das Eindringen von Bakterien verhindert und Wasser zurückhält.
- [0007] Wegen dieser Eigenschaften ist Hyaluronsäure in der Lage, die Tonizität und Elastizität der Haut aufrechtzuhalten.
- [0008] Die pharmazeutische Verwendung von Hyaluronsäure oder eines Salzes davon ist in der Literatur in breitem Umfang beschrieben.
- [0009] Da Hyaluronsäure eine nicht-immunogene Substanz ist und viskoelastische und hydrophile Eigenschaften hat, wird sie seit mehreren Jahren als ein Augenglaskörper- oder Gelenkfluid-Ersatz oder als ein Trägermedium in der Augen Chirurgie verwendet, wie es zum Beispiel in der US-A-4 141 973 von Balazs beschrieben wird.
- [0010] In Gelenkfluiden dient die viskose Hyaluronsäure als Schmiermittel, um eine schützende Umgebung für die Zellen vorzusehen, und aus diesem Grund wird sie bei der Behandlung von entzündeten Kniegelenken verwendet.
- [0011] Die EP-A-0 781 547 von Chemedica S. A. offenbart eine auf Natriumhyaluronat basierende phthalmische Formulierung zur Verwendung in der Augen Chirurgie.
- [0012] Die EP-A-0 719 559 von Chemedica S. A. offenbart viskose Natriumhyaluronat-Lösungen zur Verwendung als Maskierungsfluid in der therapeutischen Photokeratektomie mittels Excimer-Laser.
- [0013] Die EP-A-0 875 248 von Chemedica S. A. offenbart die Verwendung von Hyaluronsäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze für die Herstellung einer wässrigen Lösung, nützlich als intra-artikuläre Spülungsflüssigkeit.
- [0014] Die EP-A-0 698 388 von Chemedica S. A. offenbart eine ophthalmische Präparation zur Verwendung als künstliche Tränen, enthaltend Hyalwonat als einen Viskositäts-Verdicker.
- [0015] Dank ihrer stark hydrophilen Natur kann Hyaluronsäure auch in kosmetischen Produkten wie Lotionen und Cremes verwendet werden.
- [0016] Die pharmazeutische Verwendung von Hyaluronsäure oder eines Salzes davon erfordert ein hoch reines Produkt.
- [0017] Hyaluronsäure kann zum Beispiel aus Nabelschnüren, aus Hahnenkämmen oder aus Gruppe-A- und C-Streptococcen extrahiert und gereinigt werden, wie zum Beispiel beschrieben in US-A-4 141 973 von Balazs und US-A-5 559 104 von Romeo et al.
- [0018] Die Herstellung von Hyaluronsäure durch Streptococcen wurde zuerst 1937 von Forrest et al. (J. Biol. Chem. 118, 61 (1937)) offenbart, und später wurde gezeigt, dass Hyaluronsäure aus einer tierischen Quelle identisch zu Hyaluronsäure aus einer mikrobiellen Quelle ist.
- [0019] Verfahren zur Herstellung von Hyaluronsäure aus einer mikrobiellen Quelle basieren auf der Eigenschaft von Streptococcen, Hyaluronsäure als Hauptkomponente ihrer Kapseln aufzuweisen.
- [0020] Solche Mikroorganismen sind in der Lage, die in ihrer Umgebung vorhandene Glucose zu D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin umzuwandeln und Hyaluronsäure als einen sekundären Metaboliten herzustellen, um ihre Schutzkapseln aufzubauen.
- [0021] Die Biosynthese von Hyaluronsäure durch Streptococcen wird zum Beispiel in der US-A-4 897 349 von Swann et al. offenbart.
- [0022] Eine Anzahl von Verfahren ist bekannt, um Hyaluronsäure von pharmazeutischem Reinheitsgrad oder ein Natriumsalz davon aus mikrobiellen Quellen zu erhalten.
- [0023] Zum Beispiel offenbaren die US-A-4 780 414 von Nimrod et al., US-A-4 517 295 von Bracke et al., und US-A-5 563 051 von Ellwood et al. Verfahren zum Gewinnen von Hyaluronsäure durch kontinuierliche Ferment-

tation von Streptococcus-Bakterien und dann Reinigen der so erhaltenen Hyaluronsäure zu einem pharmazeutischem Reinheitsgrad.

[0024] Allerdings beteiligt in allen diesen Verfahren die Reinigung von Hyaluronsäure die Fällung von Hyaluronsäure aus einer mikrobiellen Quelle unter Verwendung grosser Mengen von organischen Lösungsmitteln, wie Ethanol, Aceton, Isopropanol etc.

[0025] Es sind einige Reinigungsverfahren bekannt, in denen die Präzipitation von Hyaluronsäure aus einer mikrobiellen Quelle mittels quaternären Ammoniumsalzen (US-A-4 517 295 von Bracke et al.) oder mittels anionischer und kationischer Tenside (US-A-5 316 926 von Brown et al.) erfolgt.

[0026] Jedoch sind die beschriebenen Vorgehensweisen ziemlich komplex und führen zu hohen Produktionskosten.

[0027] Die EP-A-0 694 616 offenbart ein Verfahren zur Reinigung von Hyaluronsäure aus einer Streptococcus zooepidemicus-Fermentations-Nährlösung, umfassend einen Schritt des Einstellens des pH-Werts der Fermentations-Nährlösung auf einen pH von 3,5; einen Schritt der Filtration; einen Schritt des Entferns von Zellen aus der Hyaluronsäure-haltigen Lösung; und einen Schritt der Sterilisation.

[0028] Es sind einige Reinigungsverfahren bekannt, worin eine Hyaluronsäure-Lösung unter Verwendung eines Filters mit einem nominellen Molekulargewichts-Ausschluss von 10 000, 20 000 oder 30 000 Dalton diafiltriert wird, wie offenbart zum Beispiel in US-A-5 563 051 von Ellwood et al. und US-A-4 517 295 von Bracke et al.

[0029] Wegen des verwendeten kleinen Nominal-Molekulargewichts-Ausschlusses können diese Diafiltrations-Vorgehensweisen jedoch nur verwendet werden, um kleine lösliche Moleküle zu entfernen, und die diafiltrierte Hyaluronsäure-Lösung muss durch weitere Verarbeitung behandelt werden, wobei verschiedene Präzipitations-Systeme beteiligt sind, welche das ganze Reinigungsverfahren komplex machen.

[0030] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht von pharmazeutischem Reinheitsgrad oder ein Salz davon aus irgendeiner biologischen Quelle, insbesondere aus mikrobiellen Quellen, in hoher Ausbeute bei relativ geringen Kosten und vorzugsweise ohne die Verwendung organischer Lösungsmittel oder anderer zugesetzter Substanzen zu erhalten.

[0031] Gemäss der vorliegenden Erfindung ist dieses Ziel durch ein Verfahren zur Reinigung von Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht aus einer biologischen Quelle erreicht worden, welches gekennzeichnet ist durch:

a) einen Schritt der Einstellung des pH-Werts einer wässrigen Lösung, enthaltend hochmolekulargewichtige Hyaluronsäure aus einer biologischen Quelle, auf einen pH im Bereich von 1,7 bis 3,3 und dann des Diafiltrierens der wässrigen Lösung beim gleichen pH-Wert unter Verwendung eines Filters mit einer Porengrösse im Bereich von 100 000 Dalton Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss bis zu 0,45 µm;

b) einen Schritt des Entferns von Zellen aus der wässrigen Lösung, enthaltend hochmolekulargewichtige Hyaluronsäure aus einer biologischen Quelle, wobei der Schritt entweder vor dem Schritt a) oder nach dem Schritt a) durchgeführt wird;

c) einen Sterilisationsschritt.

Mittels eines Verfahrens, das einen Schritt der Diafiltration bei einem pH-Wert im Bereich von 1,7 bis 3,3 und einen Schritt des Entferns von Zellen einschliesst, ist es vorteilhaft möglich, Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht so zu reinigen, dass eine Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht oder ein Salz davon von pharmazeutischem Reinheitsgrad in hoher Ausbeute aus irgendeiner biologischen Quelle und insbesondere aus einer mikrobiellen Quelle erhalten wird.

[0032] Gemäss Schritt a) des Verfahrens der vorliegenden Erfindung wird Hyaluronsäure bei einem Nominal-Molekulargewicht-Ausschluss oder einer Porengrösse diafiltriert, welche das Zurückführen der Hyaluronsäure und den Durchtritt aller in der Lösung oder Nährlösung enthaltenen Substanzen gestattet.

[0033] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung kann unter Verwendung irgendeiner biologischen Quelle von Hyaluronsäure durchgeführt werden.

[0034] Vorteilhafterweise kann Hyaluronsäure von pharmazeutischem Reinheitsgrad durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung ohne Spuren organischer Lösungsmittel oder anderer zugegebener Substanzen erhalten werden, da im Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung Hyaluronsäure nicht mit organischen Lösungsmitteln oder anderen Substanzen gefällt wird, sondern während des ganzen Verfahrens in wässriger Lösung gehalten wird.

[0035] Andere Ziele, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden ausführlichen Beschreibung offensichtlich.

[0036] Hyaluronsäure aus einer beliebigen biologischen Quelle kann durch das Verfahren der vorliegenden Erfindung bis zu einem pharmazeutischen Reinheitsgrad gereinigt werden.

[0037] Zum Beispiel kann die wässrige Hyaluronsäure-Lösung, enthaltend Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht, welche zuerst entweder gemäss Schritt a) der vorliegenden Erfindung oder gemäss Schritt b) der vorliegenden Erfindung behandelt wird, eine wässrige, Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht enthalten-

de Lösung sein, welche durch Extraktion aus Nabelschnur, Hahnenkamm oder anderen erhalten wird.

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die wässrige Hyaluronsäure-Lösung, welche zuerst entweder gemäss Schritt a) oder gemäss Schritt b) behandelt wird, jedoch eine wässrige, Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht aus einer mikrobiellen Quelle enthaltende Nährlösung.

[0039] Die mikrobielle Quelle ist vorzugsweise eine Streptococcus-Spezies, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht herstellt, und weiter bevorzugt wird die mikrobielle Quelle aus Streptococcus zooepidemicus, Streptococcus equi und Streptococcus pyogenes gewählt.

[0040] Eine Nährlösung, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht enthält, kann durch irgendein gut bekanntes Verfahren, einschliesslich Fermentation einer Streptococcus-Kultur, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht herstellt, in einem geeigneten Medium und unter geeigneten Bedingungen hergestellt werden. Solche Verfahren werden zum Beispiel offenbart in der US-A-4 780 414 von Nimrod et al., US-A-5 563 051 von Ellwood et al. oder US-A-5 316 916 von Brown et al.

[0041] Das Verfahren zur Herstellung eines wässrigen Nährmediums, enthaltend Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht gemäss der vorliegenden Erfindung, kann beispielsweise das folgende sein:

[0042] Am Ende eines gewöhnlichen Fermentations-Verfahrens wird das Hyaluronsäure enthaltende Nährmedium mit einem pH-Wert von etwa 7,4 geerntet und in einen Tank überführt, der mit einer automatischen Temperatur-Regeleinrichtung ausgerüstet ist.

[0043] Die Temperatur wird auf einem Wert im Bereich von 15°C bis 25°C, vorzugsweise 20°C, gehalten.

[0044] Die so erhaltene wässrige Hyaluronsäure-Lösung oder -Nährlösung kann dann gemäss des Reinigungsverfahrens der vorliegenden Erfindung behandelt werden.

[0045] Die Diafiltration gemäss Schritt a) der vorliegenden Erfindung einer Lösung von Hyaluronsäure aus einer biologischen Quelle bei einem pH-Wert im Bereich von 1,7 bis 3,3 unter Verwendung eines Filters mit einer Porengrösse im Bereich von 100 000 Dalton Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss bis zu 0,45 µm, führt zur Entfernung aller Proteine und anderen löslichen Materialien, die in der wässrigen Lösung vorhanden sind.

[0046] Es wird angenommen, dass wenn der pH-Wert eine Hyaluronsäure-Lösung im Bereich von 1,7 bis 3,3 eingestellt wird, eine Art reversibler Vernetzung stattfindet, in welcher die Hyaluronsäure-Moleküle ein Netzwerk bilden, das unter anderen pH-Bedingungen zerbrochen werden kann.

[0047] Im pH-Bereich von 1,7 bis 3,3 ist das Netzwerk in der Lage, von dem Filter zurückgehalten zu werden, der eine Porengrösse im Bereich von 100 000 Dalton Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss bis zu 0,45 µm aufweist, wohingegen Proteine und andere Materialien durch den Filter hindurchtreten, wodurch es möglich wird, Hyaluronsäure von jeglichen in der Lösung enthaltenen löslichen Substanzen zu trennen.

[0048] Im Schritt a) wird der pH der wässrigen Lösung vorzugsweise auf einen Wert im Bereich von 2,0 bis 2,7 eingestellt, und dann wird diese Lösung beim gleichen pH-Wert diafiltriert.

[0049] Weiter bevorzugt wird im Schritt a) der pH-Wert der wässrigen Lösung auf einen Wert im Bereich von 2,3 bis 2,7 eingestellt, und dann wird diese Lösung beim gleichen pH-Wert diafiltriert.

[0050] Im Schritt a) wird der pH-Wert vorzugsweise mittels einer wässrigen HCl-Lösung eingestellt.

[0051] In einer ersten bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung, worin der Schritt b) des Entfernens von Zellen nach dem Diafiltrationsschritt a) durchgeführt wird, wird der pH-Wert der wässrigen Hyaluronsäure-Lösung oder -Nährlösung, erhalten aus einer biologischen Quelle, zuerst auf einen Wert im Bereich von 1,7 bis 3,3, vorzugsweise 2,5–2,6, vorzugsweise mit einer wässrigen HCl-Lösung eingestellt.

[0052] Bei diesem pH-Wert wird die wässrige Hyaluronsäure-Lösung oder -Nährlösung zu einer sehr viskoelastischen wässrigen Lösung oder Nährlösung umgewandelt, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht in einer Netzwerk-Anordnung enthält.

[0053] Die so erhaltene wässrige Lösung oder Nährlösung, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht enthält, wird dann vorzugsweise gemäss eines Querstrom-Diafiltrations-Verfahrens diafiltriert, während der gleiche pH-Wert während des gesamten Diafiltrationsschritt beibehalten wird.

[0054] Im Schritt a) des Reinigungsverfahrens gemäss der ersten bevorzugten Ausführungsform hat ein Filter besonders bevorzugt eine Porengrösse von 0,2 µm.

[0055] Im Diafiltrationsschritt a) wird die viskoelastische wässrige Lösung oder Nährlösung, enthaltend Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht, in einen Querstrom-Filterhalter gepumpt, der mit einer geeigneten Anzahl von Filterpatronen mit einer Porengrösse im Bereich von 100 000 Dalton Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss bis zu einer Porengrösse von 0,45 µm, vorzugsweise einer Porengrösse von 0,2 µm, ausgestattet ist, und dann wird pyrogenfreies destilliertes Wasser in den Tank, der die viskoelastische wässrige, Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht enthaltende Lösung enthält, bei der gleichen Fließgeschwindigkeit zugegeben wie das abfließende Filtrat, so dass ein konstantes Volumen beibehalten wird.

[0056] Im Schritt a) des Reinigungsverfahrens gemäss der ersten bevorzugten Ausführungsform wird die viskoelastische wässrige Lösung oder Nährlösung, enthaltend Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht, vorzugsweise diafiltriert, bis das Filtrat, das verworfen wird, eine optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 280 nm gleich oder weniger als 0,02 aufweist. In diesem Fall sollte die optische Dichte des Filtrats bei dieser Wellenlänge während des gesamten Diafiltrations-Verfahrens überwacht werden.

- [0057] Gemäss der ersten bevorzugten Ausführungsform schliesst sich an den Schritt a) der Diafiltration ein Schritt b) des Entfernens von Zellen an, vorzugsweise ein Schritt b) der Zentrifugation zur Entfernung jeglicher Zellen oder Proteine, die noch in der diafiltrierten Lösung oder Nährlösung vorhanden sind.
- [0058] Im Falle einer mikrobiellen Quelle, kann der Schritt der Zentrifugation zum Beispiel das Einstellen des pH der diafiltrierten Nährlösung auf einen pH-Wert im Bereich von 3,5 bis 5,0, vorzugsweise 4,0, und dann des Zentrifugierens der diafiltrierten wässrigen Nährlösung umfassen, wodurch ein Überstand erhalten wird, der Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht enthält.
- [0059] Vorzugsweise wird der pH-Wert der diafiltrierten Nährlösung mittels einer wässrigen NaOH-Lösung eingestellt. Allerdings könnten andere basische wässrige Lösungen ebenfalls verwendet werden.
- [0060] Gemäss der ersten bevorzugten Ausführungsform schliesst sich an den Schritt b) des Entfernens von Zellen ein Schritt c) der Sterilisation an.
- [0061] Gemäss einer zweiten bevorzugten Ausführungsform wird der Schritt b) des Entfernens von Zellen vor dem Diafiltrationsschritt a) durchgeführt.
- [0062] In der zweiten bevorzugten Ausführungsform ist der Schritt b) des Entfernens von Zellen vorzugsweise ein Querstrom-Diafiltrationsschritt zum Entfernen von Zellen.
- [0063] In dem Diafiltrationsschritt zum Entfernen von Zellen b), wird der pH-Wert der wässrigen Hyaluronsäure-Lösung oder -Nährlösung, erhalten aus einer biologischen Quelle, zuerst auf 3,5, vorzugsweise mit einer wässrigen HCl-Lösung, eingestellt, und dann wird die so erhaltene wässrige Lösung oder Nährlösung beim gleichen pH-Wert unter Verwendung eines Filters mit einer Porengrösse von 0,2 µm diafiltriert.
- [0064] Im Diafiltrationsschritt b) zum Entfernen von Zellen wird die wässrige Lösung oder Nährlösung, welche Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht enthält, in einen Querstrom-Filterhalter gepumpt, der mit einer geeigneten Anzahl von Filterpatronen mit einer Porengrösse von 0,2 µm ausgestattet ist; und dann wird pyrogenfreies destilliertes Wasser in den Tank, der die wässrige, Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht enthaltende Lösung oder Nährlösung enthält, bei der gleichen Fliessgeschwindigkeit zugegeben wie das abfliessende Filtrat, damit ein konstantes Volumen beibehalten wird.
- [0065] Bei diesem pH-Wert erlaubt der Filter mit der Porengrösse 0,2 µm das Zurückhalten von Zellen und den Durchtritt von Hyaluronsäure durch den Filter.
- [0066] Im Schritt b) des Reinigungsverfahrens gemäss der zweiten bevorzugten Ausführungsform wird die Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht enthaltende wässrige Lösung vorzugsweise diafiltriert, bis 10 Äquivalentvolumen steriles pyrogenfreies destilliertes Wasser zugegeben wurden.
- [0067] Im Schritt a) der zweiten bevorzugten Ausführungsform wird der pH-Wert der in Schritt b) erhaltenen, im wesentlichen zellfreien, wässrigen Hyaluronsäurelösung zuerst auf 1,7 bis 3,3, bevorzugt 2,4, vorzugsweise mit einer wässrigen HCl-Lösung eingestellt.
- [0068] Bei diesem pH-Wert wird die wässrige Hyaluronsäurelösung zu einer sehr viskoelastischen wässrigen Lösung umgewandelt, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht in einer Netzwerk-Anordnung enthält.
- [0069] Die so erhaltene wässrige Lösung, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht enthält, wird dann vorzugsweise gemäss eines Querstrom-Verfahrens diafiltriert, während der gleiche pH-Wert während des gesamten Diafiltrationsschritt beibehalten wird.
- [0070] Im Schritt a) des Reinigungsverfahrens der vorliegenden Erfindung gemäss der zweiten bevorzugten Ausführungsform hat ein Filter besonders bevorzugt einen Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss von 300 000 D.
- [0071] Im Diafiltrationsschritt a) wird die viskoelastische wässrige Lösung, enthaltend Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht, vorzugsweise in einen Filterhalter gepumpt, der mit einer geeigneten Anzahl von Filterpatronen mit einer Porengrösse im Bereich von 100 000 Dalton Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss bis zu einer Porengrösse von 0,45 µm, vorzugsweise 300 000 D Nominal-Molekulargewicht-Ausschluss ausgestattet ist, und konzentriert, und dann wird steriles pyrogenfreies destilliertes Wasser in den Tank, der die konzentrierte viskoelastische, Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht enthaltende wässrige Lösung enthält, bei der gleichen Fliessgeschwindigkeit zugegeben wie das abfliessende Filtrat, damit ein konstantes Volumen beibehalten wird.
- [0072] Im Schritt a) des Reinigungsverfahrens der vorliegenden Erfindung gemäss der zweiten bevorzugten Ausführungsform wird die viskoelastische wässrige Lösung, enthaltend Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht, vorzugsweise diafiltriert, bis 15 Äquivalentvolumen steriles pyrogenfreies destilliertes Wasser zugegeben wurden. Das Filtrat, wird verworfen.
- [0073] Bei der Anwendung der zweiten bevorzugten Ausführungsform, wird eine Zentrifugation vorteilhafterweise vermieden.
- [0074] Gemäss der zweiten bevorzugten Ausführungsform, schliesst sich an den Schritt a) der Diafiltration ein Sterilisations-Schritt c) an.
- [0075] Der Schritt der Sterilisation gemäss der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise ein Filtrier-Sterilisations-Schritt.

- [0076] In der vorliegenden Erfindung kann die Filtrier-Sterilisation gemäss eines Standard-Sterilfiltrier-Verfahrens durchgeführt werden.
- [0077] Gemäss der ersten bevorzugten Ausführungsform, wird der Filtrier-Sterilisations-Schritt durch Einstellen des pH-Werts des im Zentrifugationsschritt b) erhaltenen Überstands auf einen Wert von 7,0 und dann Filtrieren des Überstands durch einen Filter mit einer Porengrösse von 0,2 µm durchgeführt.
- [0078] Gemäss der zweiten bevorzugten Ausführungsform wird der Filtrier-Sterilisations-Schritt durchgeführt durch Einstellen des pH der Hyaluronsäure enthaltenden diafiltrierten Lösung, erhalten in Schritt a), auf einen Wert von 7,0 und dann Filtrieren der Lösung durch einen Filter mit einer Porengrösse von 0,2 µm durchgeführt.
- [0079] In diesen zwei bevorzugten Ausführungsformen, wird der pH-Wert vorzugsweise mittels einer wässrigen NaOH-Lösung eingestellt. Allerdings könnten andere basische wässrige Lösungen verwendet werden.
- [0080] Dann kann die sterile Lösung unter Verwendung eines Filters mit 5000–10000 Dalton Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss konzentriert werden.
- [0081] Nach der Konzentrierung, kann die sterile Lösung schliesslich gefriergetrocknet werden, um ein trockenes Pulver von Hyaluronsäure oder eines Salzes hiervon zu erhalten.
- [0082] Die durch das Reinigungsverfahren nach der vorliegenden Erfindung erhaltene Hyaluronsäure oder ein Salz hiervon haben einen pharmazeutischen Reinheitsgrad, und die Ausbeute beträgt etwa 70–90 Gew.-% hinsichtlich des Hyaluronsäure-Gehalts in der Rohlösung.
- [0083] Die durch das Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung erhaltene Hyaluronsäure oder das Salz hiervon ist hinsichtlich der Abwesenheit von Pyrogenität und entzündlicher Aktivität bemerkenswert.
- [0084] Die durch das Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung erhaltene Hyaluronsäure oder das Salz hiervon enthält zwischen 90 Gew.-% und 95 Gew.-% Hyaluronsäure, bestehend aus D-Glucuronsäure und N-Acetyl-D-glucosamin in einem Verhältnis von 1 : 1, etwa 3 Gew.-% bis 5 Gew.-% Wasser, weniger als 0,2 Gew.-% Proteine, weniger als 0,3 Gew.-% Nukleinsäuren und weniger als 0,3 Gew.-% neutralen Zucker.
- [0085] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist sehr einfach und sehr vorteilhaft vom ökonomischen und ökologischen Gesichtspunkt, da keine andere Substanz als HCl oder NaOH beteiligt sind.
- [0086] Wenn das Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung angewandt wird, enthält die Hyaluronsäure oder das Salz davon keine Spur von organischen Lösungsmitteln.
- [0087] Die folgenden Beispiele des Verfahrens zum Erhalten von hochmolekulargewichtiger Hyaluronsäure pharmazeutischer Reinheit oder eines Salzes hiervon gemäss der vorliegenden Erfindung sind nur aus Zwecken der Veranschaulichung angegeben, und mit ihnen wird nicht beabsichtigt, den Umfang der Erfindung zu beschränken.

Beispiele

[0088] Herstellung einer wässrigen Nährlösung, enthaltend Hyaluronsäure mit hohem Molekulargewicht aus einer mikrobiellen Quelle Zellen von Streptococcus equi wurden bei einer Temperatur von 37°C in einem angemessenen Medium kultiviert, welches besteht aus:

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Glucose | 60 g |
| Soytone | 15 g |
| Hefeextrakt | 5 g |
| einwertiges Kaliumphosphat | 2,5 g |
| Magnesiumsulfat-Heptahydrat | 1,2 g |
| gereinigtes und pyrogenfreies Wasser | 1 Liter |

[0089] Zehn Liter dieses Mediums wurden sterilisiert und mit einer 1–2%igen Kultur von Streptococcus equi mit einer optischen Dichte (D) von etwa 7, gemessen bei einer Wellenlänge von 650 nm, inokuliert.

[0090] Während der Fermentierung wurde der pH-Wert der Nährlösung automatisch durch Zugabe von 5 N NaOH bei 7,4 gehalten. Die Belüftung wurde bei 1 Volumen Luft pro Volumen Medium pro Minute gehalten, und die Bewegung wurde während der gesamten Fermentations-Dauer bei 250 U/min gehalten.

[0091] Nach 20 Stunden wurde die Nährlösung geerntet und in einen geeigneten Tank mit einer Volumenkapazität von 50 Litern überführt.

Reinigungsverfahren gemäss einer ersten bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

[0092] Unter kontinuierlichem Rühren wurde der pH-Wert der wie obenstehend hergestellten Nährlösung mit 6 N HCl auf 2,5 eingestellt, wodurch eine sehr viskose Nährlösung erhalten wurde, welche als ein dicker Klumpen erscheint.

[0093] Die wässrige Nährlösung wurde dann in einen Querstromfilter-Halter gepumpt, ausgestattet mit drei 0,2 µm Filter-Patronen, welche übereinander angeordnet waren. Der verwendete Filter ist eine SARTO-

CON-Kassette, Mod. Nr. 302 186 07 06 W-SG, hergestellt von SARTO-RIUS, mit einer Porengrösse von 0,2 µm.

[0094] Zum Beginn der Einspeisung der wässrigen Nährlösung in den Filter, wurde das Filtrat-Ventil geschlossen gehalten, um die wässrige Nährlösung mehrere Minuten lang zu rezirkulieren, bis das System stabil war und keine Blasen im Retentat vorhanden waren.

[0095] Das Filtratventil wurde dann geöffnet und steriles pyrogenfreies destilliertes Wasser wurde kontinuierlich in den Tank, der die wässrige Nährlösung enthält, bei der gleichen Fließgeschwindigkeit zugegeben wie das abfließende Filtrat, damit ein konstantes Volumen der wässrigen Nährlösung beibehalten wird. Der Eingangsdruck wird im Bereich von 1 bis 3 Bar, vorzugsweise bei 2 Bar gehalten.

[0096] Die Diafiltration wurde beendet, als die Extinktion des Filtrats bei einer Wellenlänge von 280 nm 0,012 OD betrug. Das Filtrat wurde verworfen.

[0097] Der pH-Wert der diafiltrierten Nährlösung wurde dann mit 5 N NaOH auf 4 eingestellt, und daraufhin wurde die Nährlösung bei 9000 U/min und bei 15°C mit einer Kühlzentrifuge zentrifugiert.

[0098] Der pH-Wert des Überstands wurde dann mit 5 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, und die Lösung wurde durch einen Filter mit 0,2 µm Porengrösse filtriert, um die Lösung gemäss eines Standard-Filtrier-Sterilisationsverfahrens zu sterilisieren.

[0099] Die sterile Lösung wurde dann gemäss eines Standardgefrieretrocknungs-Verfahrens gefriergetrocknet, um ein trockenes Pulver von Natriumhyaluronat zu erhalten.

[0100] In diesem Beispiel belief sich die Ausbeute an Hyaluronsäure auf etwa 85–87% in Hinblick auf den Hyaluronsäure-Gehalt in der Rohlösung, und das Produkt hatte die folgenden Merkmale;

| | |
|--|-------|
| – Natriumhyaluronat-Gehalt | 96,5% |
| – Grenzviskosität (25°C) = 2100 ml/gr (entsprechend einem Molekulargewicht von $1,7 \times 10^6$ Dalton) | |
| – Wassergehalt | 3,1 |
| – Proteingehalt | 0,08% |
| – Nukleinsäuregehalt | 0,01% |
| – Gehalt an neutralem Zucker | 0,01% |

[0101] Das so erhaltene Natriumhyaluronat von hohem Molekulargewicht kann zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen verwendet werden.

Reinigungsverfahren gemäss einer zweiten bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

[0102] Unter kontinuierlichem Rühren wurde der pH-Wert von 5 Litern der wie obenstehend hergestellten wässrigen Nährlösung, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht aus einer mikrobiellen Quelle enthält, mit 6 N HCl auf 3,5 eingestellt und während des gesamten Querfluss-Diafiltrationsschrittes zur Entfernung von Zellen auf diesem Spiegel gehalten.

[0103] Die wässrige Nährlösung (5 Liter) wurde dann in einen Querstromfilter-Halter gepumpt, ausgestattet mit drei 0,2 µm Filter-Patronen, welche übereinander angeordnet waren. Der verwendete Filter ist eine SAR-TOCON-Kassette, Mod. Nr. 302 186 07 04 O-SG, hergestellt von SARTORIUS, mit einer Porengrösse von 0,2 µm.

[0104] Zum Beginn der Einspeisung der wässrigen Nährlösung in den Filter, wurde das Filtrat-Ventil geschlossen gehalten, um die wässrige Nährlösung mehrere Minuten lang zu rezirkulieren, bis das System stabil war und keine Blasen im Retentat vorhanden waren.

[0105] Das Filtratventil wurde dann geöffnet und 10 Äquivalent-Volumen steriles pyrogenfreies destilliertes Wasser wurden kontinuierlich in den Tank, der die wässrige Nährlösung enthält, bei der gleichen Fließgeschwindigkeit zugegeben wie das abfließende Filtrat, damit ein konstantes Volumen der wässrigen Nährlösung beibehalten wird. Der Eingangsdruck wird im Bereich von 1 bis 3 Bar, vorzugsweise bei 2 Bar gehalten.

[0106] Das Retentat wurde verworfen und das zellfreie Filtrat (50 Liter) mit der Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht wurde weiter behandelt.

[0107] Der pH-Wert der diafiltrierten Lösung (50 Liter) mit der so erhaltenen Hyaluronsäure wurde danach auf 2,4 eingestellt, wodurch eine sehr viskose Lösung erhalten wurde, und während des gesamten Querfluss-Diafiltrations-Verfahrens auf diesem Spiegel gehalten.

[0108] Die wässrige Nährlösung (50 Liter) wurde dann in einen Querstromfilter-Halter gepumpt, ausgestattet mit drei 300 000 D-Filter-Patronen, welche übereinander angeordnet waren. Der verwendete Filter ist eine SAR-TOCON-Kassette, Mod. Nr. 302 146 790 07 7E-SG, hergestellt von SARTORIUS, mit einer Porengrösse von 300 000 D.

[0109] Zum Beginn der Einspeisung der wässrigen Nährlösung in den Filter, wurde das Filtrat-Ventil geschlossen gehalten, um die wässrige Nährlösung mehrere Minuten lang zu rezirkulieren, bis das System stabil war

und keine Blasen im Retentat vorhanden waren.

[0110] Das Filtratventil wurde dann geöffnet, und die wässrige Nährlösung wurde dann konzentriert, um das Volumen auf 7,5 Liter zu verringern. Das Filtrat (42,5 Liter) wurde verworfen.

[0111] Dann wurden 15 Äquivalent-Volumen steriles pyrogenfreies destilliertes Wasser kontinuierlich in den Tank, der die wässrige Nährlösung enthält, bei der gleichen Fließgeschwindigkeit zugegeben wie das abfließende Filtrat, damit ein konstantes Volumen der wässrigen Nährlösung beibehalten wird. Der Eingangsdruck wird im Bereich von 1 bis 3 Bar, vorzugsweise bei 2 Bar gehalten. Das Filtrat (116 Liter) wurde verworfen.

[0112] Die Zufuhr von Wasser wurde dann gestoppt und die wässrige Nährlösung wurde konzentriert.

[0113] Der pH-Wert der konzentrierten diafiltrierten Lösung (4 Liter) wurde dann mit 5 N NaOH auf einen pH von 7 eingestellt, und die Lösung wurde durch einen statischen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert, um die Lösung gemäss eines Standard-Sterilfiltrier-Verfahrens zu sterilisieren.

[0114] Die sterile Lösung wurde dann gemäss eines Standardgefrieretrocknungs-Verfahrens gefriergetrocknet, um ein trockenes Pulver von Natriumhyaluronat zu erhalten.

[0115] In diesem Beispiel belief sich die Ausbeute an Hyaluronsäure auf etwa 83–85% in Hinblick auf den Hyaluronsäure-Gehalt in der Rohlösung, und das Produkt hatte die folgenden Merkmale;

| | |
|--|-------|
| – Natriumhyaluronat-Gehalt | 97,0% |
| – Grenzviskosität (25°C) = 2100 ml/gr (entsprechend einem Molekulargewicht von $1,7 \times 10^6$ Dalton) | |
| – Wassergehalt | 2,9% |
| – Proteingehalt | 0,08% |
| – Nukleinsäuregehalt | 0,01% |
| – Gehalt an neutralem Zucker | 0,01% |

[0116] Das so erhaltene Natriumhyaluronat von hohem Molekulargewicht kann zur Herstellung pharmazeutischer Zusammensetzungen verwendet werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Reinigung hochmolekulargewichtiger Hyaluronsäure mit einem Molekulargewicht von nicht weniger als $0,5 \times 10^6$ Dalton aus einer biologischen Quelle, um hochmolekulargewichtige Hyaluronsäure von pharmazeutischem Reinheitsgrad oder ein Salz davon zu erhalten, **dadurch gekennzeichnet**, dass es folgendes umfasst:

- einen Schritt der Einstellung des pH-Werts einer wässrigen Lösung, welche hochmolekulargewichtige Hyaluronsäure aus einer biologischen Quelle enthält, auf einen pH im Bereich von 1,7 bis 3,3 und dann des Diafiltrierens der Lösung beim gleichen pH-Wert unter Verwendung eines Filters mit einer Porengröße im Bereich von 100 000 Dalton Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss bis zu 0,45 µm;
- einen Schritt des Entfernens von Zellen aus der wässrigen Lösung, welche hochmolekulargewichtige Hyaluronsäure aus einer biologischen Quelle enthält, wobei der Schritt entweder vor dem Schritt a) oder nach dem Schritt a) durchgeführt wird;
- einen Sterilisationsschritt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die wässrige Lösung, enthaltend hochmolekulargewichtige Hyaluronsäure aus einer biologischen Quelle, welche zuerst entweder gemäss Schritt a) oder gemäss Schritt b) behandelt wird, eine wässrige Nährlösung ist, welche hochmolekulargewichtige Hyaluronsäure aus einer biologischen Quelle enthält.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die mikrobielle Quelle eine Streptococcus-Spezies ist, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht herstellt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Streptococcus-Spezies, welche Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht herstellt, aus der Gruppe gewählt wird, welche aus Streptococcus zooepidemicus, Streptococcus equi und Streptococcus pyogenes besteht.

5. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt a) der pH-Wert der wässrigen Lösung, enthaltend Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht, auf einen Wert im Bereich von 2,0 bis 2,7 eingestellt wird, und die Lösung dann bei dem gleichen pH-Wert diafiltriert wird.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt a) der pH-Wert der wässrigen Lösung, enthaltend Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht, auf einen Wert im Bereich von 2,3 bis 2,7 ein-

gestellt wird, und die Lösung dann bei dem gleichen pH-Wert diafiltriert wird.

7. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt a) der pH-Wert der wässrigen Lösung, enthaltend Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht, mittels einer wässrigen HCl-Lösung eingestellt wird.

8. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der Sterilisationsschritt c) ein Filtrier-Sterilisationsschritt ist.

9. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sich an den Schritt c) der Sterilisation ein Schritt d) des Gefriertrocknens der sterilisierten Lösung anschliesst, um ein trockenes Pulver von Hyaluronsäure oder einem Salz hiervon zu erhalten.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die sterilisierte Lösung vor dem Gefriertrocknungs-Schritt konzentriert wird.

11. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt b) des Entfernens von Zellen nach der Diafiltration von Schritt a) durchgeführt wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt a) der pH-Wert der wässrigen Lösung, enthaltend Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht, auf 2,5–2,6 eingestellt wird, und die Lösung dann bei dem gleichen pH-Wert diafiltriert wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass der für die Diafiltration von Schritt a) verwendete Filter eine Porengrösse von 0,2 µm hat.

14. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt a) die Hyaluronsäure-Lösung diafiltriert wird, bis das zu verwerfende Filtrat eine optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 280 nm aufweist, die gleich oder geringer als 0,02 ist.

15. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt b) des Entfernens von Zellen ein Zentrifugationsschritt ist.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Zentrifugationsschritt das Einstellen des pH der im Schritt a) erhaltenen diafiltrierten wässrigen Lösung auf einen pH-Wert im Bereich von 3,5 bis 5,0 und das Zentrifugieren der diafiltrierten wässrigen Lösung zum Erhalt eines Überstands, der Hyaluronsäure enthält, umfasst.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der im Schritt a) erhaltenen diafiltrierten wässrigen Lösung auf 4,0 eingestellt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert mittels einer wässrigen NaOH-Lösung eingestellt wird.

19. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Sterilisationsschritt c) ein Filtrier-Sterilisationsschritt ist, umfassend das Einstellen des pH-Werts des im Zentrifugationsschritt b) erhaltenen Überstands auf einen Wert von 7 und das Filtrieren des Überstands durch einen Filter mit einer Porengrösse von 0,2 µm.

20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert mittels einer wässrigen NaOH-Lösung eingestellt wird.

21. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt b) des Entfernens von Zellen vor dem Schritt a) durchgeführt wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt b) des Entfernens von Zellen ein Diafiltrationsschritt zum Entfernen von Zellen ist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass der Diafiltrationsschritt b) des Entfernens von Zellen das Einstellen des pH einer wässrigen Lösung, enthaltend Hyaluronsäure von hohem Molekularge-

wicht aus einer biologischen Quelle, auf einen pH-Wert von 3,5 und dann das Diafiltrieren der Lösung beim gleichen pH-Wert unter Verwendung eines Filters mit einer Porengröße von 0,2 µm umfasst.

24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert mittels einer wässrigen HCl-Lösung eingestellt wird.

25. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass der für den Diafiltrationsschritt a) verwendete Filter eine Porengröße von 300 000 D Nominal-Molekulargewichts-Ausschluss hat.

26. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass im Schritt a) der pH-Wert der wässrigen Lösung, enthaltend Hyaluronsäure von hohem Molekulargewicht, auf 2,4 eingestellt wird, und die Lösung dann bei dem gleichen pH-Wert diafiltriert wird.

27. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 21 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass der Sterilisationsschritt c) ein Filtrier-Sterilisationsschritt ist, umfassend das Einstellen des pH der im Schritt a) der Diafiltration erhaltenen wässrigen Lösung auf einen Wert von 7 und das Filtrieren der wässrigen Lösung durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm.

28. Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert mittels einer wässrigen NaOH-Lösung eingestellt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen