



(19)

REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer: **AT 409 336 B**

(12)

## PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 2166/99  
(22) Anmeldetag: 22.12.1999  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.2001  
(45) Ausgabetag: 25.07.2002

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **A61K 38/36**

(56) Entgegenhaltungen:  
US 5681750A

(73) Patentinhaber:  
BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1221 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER C1-ESTERASE-INHIBITOR (C1-INH)-HÄLTIGEN ZUSAMMENSETZUNG

**AT 409 336 B**

- (57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung einer C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH)-hältigen Zusammensetzung, welches die folgenden Schritte beinhaltet:
- Behandeln eines C1-INH-enthaltenden Ausgangsmaterials mit einem Anionenaustauscher unter sauren Bedingungen und
  - Eluieren des C1-INH vom Anionenaustauscher, wobei eine C1-INH-hältige Zusammensetzung erhalten wird.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH)-haltigen Zusammensetzung sowie verbesserte Zusammensetzungen, enthaltend C1-INH, und C1-INH-hältige Kombinationspräparate.

C1-INH ist ein Plasmaproteaseinhibitor, welcher eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Aktivierung des Komplements und des Kiningenerierungssystems ist. C1-INH ist der einzige Inhibitor von C1r und C1s im Plasma und ist für ungefähr die Hälfte der Kallikrein-aktivierenden Aktivität und den Großteil an Blutgerinnungsfaktor XII-Inaktivierung verantwortlich. Weiters inhibiert C1-INH auch den Blutgerinnungsfaktor XIa.

C1-INH besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 478 Aminosäuren und wird mit einer 22-Aminosäure-Signalsequenz synthetisiert. Auf Grund der Sequenzhomologie zu den Serpinen wird C1-INH der Serpin-"Superfamilie" der Serinprotease-Inhibitoren zugerechnet, was auch schon durch funktionelle Analysen erwartet werden konnte.

Im Gegensatz zu anderen Proteasen, insbesondere aus dieser Familie oder anderen Proteinen im Blutplasma, weist C1-INH einen extrem hohen Glykosylierungsgrad auf. Ungefähr 50 % der Gesamtmasse von C1-INH (rund 105 kD) machen Kohlehydrate aus; das Molgewicht der Peptidkette beträgt knapp 53 kD).

Der isoelektrische Punkt von C1-INH liegt bei 2,7 bis 2,8 in der  $\alpha_2$ -elektrophoretischen Mobilitätsbestimmung.

C1-INH kann auch rekombinant hergestellt werden. Es zeigte sich, dass auch C1-INH-Varianten mit nicht-physiologischem Glykosylierungsmuster (etwa ohne N-Glykosylierung; durch Expression in Hepatomazelllinien in Gegenwart von Tunicamycin) die Inhibitoraktivität, insbesondere gegenüber C1s, beibehalten. Auch aminoterminal trunkierte C1-INH-Moleküle weisen dabei unveränderte Aktivität gegenüber C1s auf, und dies, obwohl der Hauptteil der Glykosylierungsstellen im aminoterminalen Bereich liegt (siehe Davis "Structure and Function of C1 Inhibitor", Behring Inst. Mitt., 84 (1989), 142-150).

C1-INH wird im Rahmen der Humanmedizin vor allem auf Grund seiner bekannten inhibierenden Aktivität auf das Komplementsystem verwendet. So kommt C1-INH in Proteinpräparationen, die aufgrund von unerwünschten pharmakologisch aktiven Substanzen Nebenwirkungen aufweisen können, zum Einsatz, um diese Nebenwirkungen hintanzuhalten. Hierbei kann C1-INH unmittelbar vor der Applikation der jeweiligen, potentiell Nebenwirkungs-behafteten Präparation am Patienten verabreicht oder aber bereits in Kombination mit dem zu verabreichenden Wirkstoff aus biologischen Quellen, insbesondere mit Plasmaproteinen oder Plasmaderivaten, vorgesehen werden (EP-0 119 990 B1).

Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet von C1-INH ist die Behandlung von hereditären oder erworbenen Angioödem.

Das hereditäre Angioödem (HAE) ist eine seltene, autosomal-dominant vererbare gynäkotrope Erkrankung, die durch einen Mangel an C1-INH oder durch Bildung eines defekten C1-INH gekennzeichnet ist. Bei HAE-Patienten treten häufig durch Stresssituationen ausgelöste akute Anfälle mit ödematösen Schwellungen im Bereich der Haut (vor allem im Gesicht und an den Extremitäten) und der Schleimhäute auf. Bei Ödemen der gastrointestinalen Schleimhaut kann es zu schweren abdominalen Koliken führen, die oft mit Erbrechen und Durchfällen verbunden sind.

Die größte Gefahr bei HAE geht allerdings von dem Befall der oberen Atemwege aus. Bei solchen Larynxödem kann es zu lebensbedrohlichen Erstickungsanfällen kommen. Die hohe Letalität von HAE (rund 20 bis 30 %) ist auch im wesentlichen auf das Auftreten derartiger Larynxödeme zurückzuführen.

HAE wird neben der Behandlung mit Adrenalin, Cortison, Danazol und  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure vor allem mit Gaben von C1-INH behandelt (siehe Mohr et al.; Anaesthesist 45 (1996), 626-630 sowie Davis, Immunodeficiency Reviews 1 (1989), 207-226).

Bei erworbenen Angioödem sind vor allem diejenigen von Relevanz, die durch C1-INH-Mangel im Rahmen von Tumorleiden oder Autoimmunkrankheiten auftreten (siehe Pschyrembel, "Klinisches Wörterbuch", 257. Auflage, Seite 71).

Zur Herstellung von C1-INH-haltigen Zusammensetzungen sind eine Vielzahl von Verfahren vorgeschlagen worden, die u.a. affinitätschromatographische, ionenaustauscherchromatographische, Gelfiltrations-, Fällungs- und hydrophobe interaktionschromatographische Schritte umfassen. Es zeigte sich aber, dass mit diesen Verfahren C1-INH oft nicht genügend von seinen unmittel-

baren Begleitproteinen abgetrennt werden konnte (EP-0 101 935 B1). Es wurden daher im Stand der Technik vermehrt Kombinationen aus spezifischen Reinigungsschritten vorgeschlagen.

So wird in der EP-0 101 935 B1 ein C1-INH-Herstellungsverfahren beschrieben, bei welchem ein C1-INH-hältiges Ausgangsmaterial durch eine Kombination von Fällungsschritten und hydrophober Chromatographie zu einer C1-INH-Präparation aufgearbeitet wird, welche bei einer Ausbeute von rund 20 % ungefähr zu 90 % rein war.

In der US 5,030,578 A wird eine Kombination aus PEG-Fällung und Chromatographie über Jacalin-Agarose und hydrophober Chromatographie vorgeschlagen.

Von Poulle et al. (Blood Coagulation and Fibrinolysis 5 (1994), 543-549; US 5,681,750 A) wurde eine Kombination aus Anionenaustauscherchromatographie an DEAE-Gruppen, Affinitätschromatographie über immobilisiertes Heparin und Behandlung mit einem starken Kationenaustauschergel vorgeschlagen. Die mit diesem Verfahren erhaltene C1-INH-Präparation wies eine spezifische Aktivität von  $6,5 \pm 0,5$  Einheiten/mg auf, jedoch nur ein Antigen/Aktivitätsverhältnis von 1,7 bis 2, wobei im Plasma ein Antigen/Aktivitätsverhältnis von 1:1 definiert wird.

Es zeigte sich, dass bei den im Stand der Technik beschriebenen Verfahren entweder die Begleitproteine nicht effizient genug von C1-INH abgetrennt werden konnten (vor allem Albumin ist mit den beschriebenen Methoden nur ungenügend von C1-INH abtrennbar) oder aber, dass die befriedigende Abtrennung von diesen Begleitproteinen auf Kosten der C1-INH-Aktivität in Kauf genommen werden muss und daher die spezifische Aktivität oder das Antigen/Aktivitätsverhältnis im erhaltenen C1-INH-Präparat unbefriedigend ist. Weiters ist das Vorsehen von zahlreichen Chromatographieschritten ebenfalls nachteilig für Ausbeute und Aktivität des erhaltenen Präparates, da mit jedem Chromatographieschritt sowohl Ausbeuteverluste als auch Aktivitätsverluste, beispielsweise durch Denaturierung, in Kauf genommen werden müssen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung eines verbesserten Verfahrens zur Herstellung einer C1-INH-haltigen Zusammensetzung, das eine einfache und trotzdem effiziente Abtrennung von C1-INH-Begleitproteinen, insbesondere von Albumin, ermöglicht, und darüberhinaus auch im Industriemaßstab anwendbar ist und gegebenenfalls in Kombination mit bereits bekannten Verfahrensschritten zu verbesserten C1-INH-Präparaten führen kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung einer C1-INH-haltigen Zusammensetzung, welches die folgenden Schritte beinhaltet:

- Behandeln eines C1-INH enthaltenden Ausgangsmaterials mit einem Anionenaustauscher unter sauren Bedingungen, wobei C1-INH an den Anionenaustauscher gebunden wird, und
- Eluieren des C1-INH vom Anionenaustauscher, wobei eine C1-INH-hältige Zusammensetzung erhalten wird.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, dass eine Behandlung von C1-INH-hältigem Material mit Anionenaustauscher bei saurem pH (also unter pH 7) zu einer effizienten Abtrennung von unerwünschten Begleitproteinen führt. Zwar ist die Anionenaustauscherbehandlung als Maßnahme bei der C1-INH-Reinigung seit langem bekannt, bislang wurde aber nie die Adsorption von C1-INH an einen Anionenaustauscher unter sauren Bedingungen erprobt. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, dass die übliche Behandlung mit Anionenaustauschern (nicht nur bei C1-INH) bei neutralem oder basischem pH durchgeführt wird, da nur in diesen Bereichen die Anionenaustauscherkapazität als ausreichend angesehen wird, vor allem bei Reinigungsverfahren im industriellen Maßstab.

Es zeigte sich aber erfindungsgemäß, dass gerade unter sauren Bedingungen die Bindung von C1-INH an den Anionenaustauscher effizient funktioniert und darüberhinaus unerwünschte Begleitproteine nicht gebunden werden bzw. abgereichert werden können. Dies trifft auch überraschenderweise für Proteine zu, die ebenfalls, wie C1-INH, einen niedrigen pI-Wert aufweisen, wie z.B. Albumin. Es stellte sich erfindungsgemäß heraus, dass die Anionenaustauscherchromatographie auch bei einem pH, der über dem pI-Wert von den abzureinigenden Proteinen liegt, diese Proteine noch effizient von C1-INH abgetrennt werden können.

Bevorzugterweise wird das C1-INH-hältige Ausgangsmaterial mit dem Anionenaustauscher bei einem pH-Wert von 3 bis 6, insbesondere bei pH 4,5 bis 6, vorgenommen. Bei pH-Werten von 7,0 und höher treten die erfindungsgemäßen Effekte, insbesondere die effiziente Abtrennung von Begleitproteinen mit niedrigerem pI-Wert, nicht mehr in befriedigender Weise auf. Bei pH-Werten von unter 3,0 ist zwar die Erfindung prinzipiell ausführbar, jedoch muss man dabei das Risiko von

Denaturierungsverlusten von säurelabilen Proteinen oder anderen Materialien, die im Zuge der Reinigung eingesetzt werden, in Kauf nehmen. Bevorzugter Weise wird bei der Adsorption eine Ionenstärke von 30 mS (0,5 M NaCl) oder höher angewendet.

Da die C1-INH-Präparation, die mit der vorliegenden Erfindung erhalten wird, vorwiegend pharmazeutisch verwendet werden soll, wird im erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise  
5  
weilers mindestens ein Schritt zur Inaktivierung von potentiell vorhandenen Viren vorgesehen. Dieser kann vor, während oder nach dem Anionenaustauscherschritt erfolgen. Geeignete Virusinaktivierungsschritte sind allgemein bekannt. Dazu zählen chemische, chemisch-physikalische und physikalische Methoden. Auch Methoden unter Einsatz von viruziden Substanzen können vor,  
10 während und nach einem chromatographischen Reinigungsverfahren vorgenommen werden.

Vorzugsweise werden mindestens zwei Maßnahmen vorgenommen, die die Inaktivierung bzw. Abreicherung von human-pathogenen Infektionserregern, darunter die durch Blut übertragbaren Viren, wie HIV-, HAV-, HBV-, HCV-, HGV- und Parvoviren, aber auch infektiöse Erreger von BSE und CJD, bewirken.

15 Zu den effektiven Maßnahmen zur Inaktivierung von Viren zählen beispielsweise die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln und/oder Detergentien (EP-0 131 740 A, EP-0 050 061 A, WO98/44941 A), die Behandlung mit chaotropen Mitteln (WO90/15613 A), Hitzebehandlungsverfahren, vorzugsweise in lyophilisiertem, trockenem oder feuchtem Zustand (EP-0 159 311 A), Kombinationsverfahren (EP-0 519 901 A) und physikalische Methoden. Letztere bewirken die  
20 Inaktivierung von Viren beispielsweise durch Bestrahlung mit Licht, etwa in Gegenwart von Photosensibilisatoren (EP-0 471 794 A und WO97/3768 A).

Besonders bevorzugt werden erfindungsgemäß Abreicherungsverfahren für Human-Pathogene unter Verwendung von Ultrafiltern, Tiefenfiltern und vor allem Nanofiltern (WO97/40861 A, WO98/57672 A), aber auch Fällungsschritte bzw. andere Proteinreinigungsmaßnahmen, wie die  
25 der Adsorption, tragen prinzipiell zur Abreicherung von möglicherweise vorhandenen Pathogenen bei.

Die erfindungsgemäß besonders bevorzugte Nanofiltration wird bevorzugterweise derart durchgeführt, dass die C1-INH-enthaltende Zusammensetzung vor dem Nanofiltrationsschritt verdünnt wird. Dadurch werden Probleme von vornherein vermieden, die durch das relativ hohe Molekulargewicht von C1-INH auftreten können und beispielsweise zu einer Verstopfung der Filterporen  
30 führen könnten. Die Nanofiltration wird im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens vorzugsweise nach der Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt und bevorzugterweise mit Filtern vorgenommen, die eine Porengröße von 10 bis 40 nm aufweisen.

Als C1-INH-hältiges Material ist prinzipiell jedes C1-INH-hältige Material geeignet. Bevorzugterweise werden aber Plasma, Kryoüberstand, C1-INH-hältige Cohn-Fraktion, C1-INH-hältige Zellkulturüberstände, transgen hergestelltes C1-INH-hältiges Material oder ein vorgereinigtes C1-INH-Präparat verwendet. Das vorgereinigte C1-INH-Präparat kann dabei durch bereits im Stand der Technik beschriebene Verfahren erhalten werden, bevor es dem erfindungsgemäßen Anionenaustauscherschritt unter sauren Bedingungen unterzogen wird.  
35

40 Noch weiter verbesserte Reinigungsergebnisse lassen sich erfindungsgemäß durch eine Wiederholung des Anionenaustauscherschrittes unter sauren Bedingungen erzielen. Dabei wird der pH der erhaltenen Lösung gegebenenfalls wiederum auf einen sauren Wert gebracht, dann abermals mit einem Anionenaustauscher kontaktiert, wobei wiederum C1-INH gebunden wird. Wie bei der ersten Anionenaustauscherbehandlung kann auch hier der adsorbierte C1-INH ein oder mehreren  
45 Waschschritten unterzogen werden, bevor erneut vom Anionenaustauscher eluiert wird.

Die nach dem Eluieren erhaltene C1-INH-hältige Zusammensetzung kann - neben der bevorzugten abermaligen Behandlung mit dem erfindungsgemäßen Anionenaustauscherschritt - auch auf andere Arten weiter gereinigt werden. Zu den erfindungsgemäß bevorzugten weiteren Reinigungsschritten zählen erfindungsgemäß bevorzugt diejenigen Schritte, deren prinzipielle Effektivität im Hinblick auf C1-INH-Reinigung bereits im Stand der Technik beschrieben worden ist, wie  
50 etwa die Fällung (mit PEG, Ammoniumsulfat, etc.), die hydrophobe Chromatographie, insbesondere über Phenylsepharose, Affinitätschromatographie, insbesondere über Heparinsepharose oder Jacalin-Agarose, oder Kationenaustauscherchromatographie.

Als Anionenaustauscher kommen im Prinzip alle Anionenaustauscher in Frage, die eine Affinität zu C1-INH aufweisen, wie z.B. Anionenaustauscher auf Zellulosebasis (Whatman® DE52,  
55

QAE52, Express Ion®Q und D, alle Fa. Whatman) mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sephacel®), Anionenaustauscher auf Basis von quervernetztem Dextran mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sephadex®), Anionenaustauscher auf Agarosebasis mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sephacel CL6B®, DEAE-Sephacel Fast Flow®), Anionenaustauscher auf Basis von quervernetztem Dextran mit Diethyl[2-hydroxypropyl]aminoethyl-Gruppen (QAE-Sephadex®), Anionenaustauscher auf Agarosebasis mit  $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen (Q-Sephacel Fast Flow®, Q-Sephacel High Performance®, Q-Sephacel Big Beads®) (alle Fa. Pharmacia), sphärische Chromatographiegele, hergestellt durch Copolymerisation von N-Acryloyl-2-amino-2-hydroxy-methyl-1,3-propandiol und einem anionischen Acrylderivat mit Diethylaminoethyl-Gruppen als funktionellem Anionenaustauscher (DEAE-Tris-Acryl®), nicht kompressible Silica-Dextran-Matrizes, bei welchen poröses Silicagel in einer quervernetzten Dextranmatrix eingebettet ist, mit reaktiven Diethylaminoethyl-anionenaustauscherguppen (DEAE-Spherodex®), Gele aus rigiden Polystyrolpartikeln, deren Poren mit einem Hydrogel gefüllt sind, welches quarternäre Amingruppen mit starker Anionenaustauscherwirkung trägt (Q-Hyper-D®) (alle Fa. Sepacor); rigide macroporöse hydrophile Oberflächen mit  $\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  oder  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen (Macroprep DEAE®, Macroprep Q® (alle Fa. BioRad); Anionenaustauscher mit Diethylaminoethyl-diethyl(2-hydroxypropyl)aminoethyl und  $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen (DEAE-Toyopearl®, QAE-Toyopearl®, Toyopearl Super-Q® (alle Fa. Tosohaas); Anionenaustauscherharze bestehend aus porösem Polymethacrylat/Polyacrylat-Gel (Protein PAK DEAE®, Fa. Waters); Anionenaustauscher auf Basis von Copolymeren bestehend aus Oligoethylenglycol-dimethylacrylat, Glycidylmethacrylat und Pentaerythrit-dimethylacrylat mit einer hydrophoben Oberfläche (Fractogel EMD-TMAE®, Fractogel EMD-DEAE®, Fractogel EMD-DMAE®), Anionenaustauscher auf Kieselgelbasis mit porösen kugelförmigen druckstabilen Chromatographiepartikeln (Licrospher 1000 TMAE®, Licrospher 1000 DEAE® und Licrospher 4000 DMAE®) (alle Fa. MERCK).

Erfindungsgemäß sind Anionenaustauschermaterialien wie DEAE-Sephadex®, QAE-Sephadex® A50 oder Toyopearl Super-Q® 650C sowie Whatman® DE52, QAE52, Express Ion®Q und D besonders bevorzugt.

Bevorzugterweise wird die erhaltene gereinigte C1-INH-Zusammensetzung lyophilisiert und gegebenenfalls einer (weiteren) Virusinaktivierungsbehandlung unterzogen. Hierbei ist erfindungsgemäß eine Hitzebehandlung, insbesondere bei einem Temperaturbereich zwischen 60°C und 100°C über einen Zeitraum von 10 bis 80 Stunden bevorzugt.

Für die Verwendung als pharmazeutisches Mittel wird die erhaltene C1-INH-Zusammensetzung (lyophilisiert oder in Lösung) zu einem pharmazeutischen Präparat fertiggestellt und in den entsprechenden Behältnissen entkonfektioniert. Dabei können sowohl Stabilisatoren als auch andere Hilfssubstanzen oder aber auch andere aktive Komponenten (zur Herstellung eines Kombinationspräparates) mit der C1-INH-enthaltenden Zusammensetzung gemischt werden, wie beispielsweise gemäß der EP-0 480 906 A, wo beispielsweise Lys-Plasminogen mit C1-INH kombiniert verabreicht wird.

Eine besonders bevorzugte Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist durch die Abfolge der folgenden Schritte gekennzeichnet:

- Behandeln eines C1-INH-enthaltenden Ausgangsmaterials mit einem Anionenaustauscher unter sauren Bedingungen, wobei C1-INH an den Anionenaustauscher gebunden wird,
- gegebenenfalls Waschen des adsorbierten C1-INH-haltigen Materials,
- Eluieren des C1-INH vom Anionenaustauscher, wobei ein C1-INH-hältiges Eluat gewonnen wird,
- Behandeln des C1-INH-hältigen Eluats mit PEG, bevorzugterweise mit PEG 4000, insbesondere in einer Menge von unter 15 %, wobei ein Präzipitat und ein C1-INH-haltiger Überstand erhalten wird,
- Behandeln des C1-INH-hältigen Überstandes mit einem Detergens, wobei gegebenenfalls vorhandene Viren inaktiviert werden,
- Behandeln des Detergens-haltigen C1-INH-haltigen Überstandes mit einem Anionenaustauscher, wobei C1-INH wiederum gebunden wird und das Detergens und gegebenenfalls noch vorhandene Verunreinigungen entfernt werden,
- gegebenenfalls Waschen des gebundenen C1-INH-haltigen Materials,
- Eluieren des C1-INH vom Anionenaustausch, wobei ein virusinaktiviertes C1-INH-hältiges

- Eluat erhalten wird,
- Nanofiltrieren dieses Eluats,
  - Lyophilisieren der nanofiltrierten C1-INH-Lösung, und
  - Hitzebehandeln der lyophilisierten C1-INH-hältigen Zusammensetzung.

Die Elution vom Anionenaustauscher erfolgt bevorzugterweise mit einem Puffer, der eine Salzkonzentration aufweist, die höher ist als die Salzkonzentration beim Adsorptionsschritt, wobei die besten Ergebnisse mit derartigen Salzkonzentrationen erzielt werden, die zumindest um das 3-fache höher als die der Adsorptionslösung liegen.

Die Waschschriffe des adsorbierten C1-INH werden bevorzugterweise mit dem Adsorptionspuffer vorgenommen oder einem Puffer, der in etwa dem Adsorptionspuffer entspricht, vor allem was seine Leitfähigkeit anbelangt. Die Salzkonzentration des Waschpuffers liegt vorzugsweise nicht mehr als 10 bis 100 % über der der Adsorptionslösung.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung C1-INH-hältige Zusammensetzungen, die sich dadurch auszeichnen, dass sie eine spezifische Aktivität von 2,0 Einheiten/mg Protein oder mehr bei einem Antigen/Aktivitätsverhältnis von weniger als 1,5 aufweisen. Wie auch in den Beispielen demonstriert wird, kann das erfindungsgemäße Verfahren zu derart hochgereinigten Präparaten führen. Zwar sind im Stand der Technik C1-INH-hältige Zusammensetzungen mit einer spezifischen Aktivität von höher als 2 Einheiten/mg Protein oder mit einem Antigen/Aktivitätsverhältnis von weniger als 1,5 bereits erhalten worden, die Kombination dieser Reinigungsgrade konnte aber bislang nie erreicht werden, da, wie zuvor beschrieben, bislang die erhöhte spezifische Aktivität stets auf Kosten des Antigen/Aktivitätsverhältnisses ging bzw. ein verbessertes Antigen/Aktivitätsverhältnis nie mit derartig hohen spezifischen Aktivitäten erzielt werden konnte.

Erfindungsgemäß sind Zusammensetzungen mit einer spezifischen Aktivität von 4 bis 8, insbesondere von 5 bis 7, Einheiten/mg Protein ohne weiteres erzielbar. Gleichzeitig sind Antigen/Aktivitätsverhältnisse von 1 bis 1,4, insbesondere von 1,1 bis 1,3, erzielbar.

Die erfindungsgemäßen Präparate liegen bevorzugterweise als pharmazeutische Präparation in entkonfektionierter Form vor und sind gegebenenfalls virusinaktiviert.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Kombinationspräparate, die eine erfindungsgemäße C1-INH-hältige Zusammensetzung mit mindestens einer weiteren pharmazeutisch aktiven Substanz umfasst (analog zu den in der EP-0 119 990 B1 und der EP-0 480 906 A beschriebenen Arzneimitteln).

Die Erfindung wird an Hand des folgenden Beispiels näher erläutert.

### Beispiel:

2,5 g trockenes QAE-Sephadex A50® wird mit einer C1-INH-Lösung (1000 IE C1-INH (eine Internationale Einheit (IE) oder Einheit (E) C1-INH entspricht der C1-INH-Aktivität in 1 ml Frischplasma), 100 mM Natriumacetat, 50 mM Natriumchlorid, pH 5,5) equilibriert und der pH auf 5,5 eingestellt. Die Adsorption wird für 2 Stunden bei 4°C vorgenommen.

Anschließend wird das Gel mit dem adsorbierten C1-INH mit

- a) 100 mM Natriumacetat und 50 mM Natriumchlorid, pH 5,5, und
- b) 20 mM Tris und 200 mM Natriumchlorid, pH 7,5,

gewaschen. Eluiert wird mit 20 mM Tris und 750 mM Natriumchlorid, pH, 7,5.

Die erhaltene C1-INH-Lösung wird wieder auf einen pH von 5,5 gebracht und PEG 4000 bis zu einer Endkonzentration von 12 % (W/W) zugegeben. Dann wird 1 Stunde bei 4°C präzipitiert und anschließend zentrifugiert, wobei das Präzipitat verworfen wird.

Dem Überstand wird 12,5 % Tween 80® (W/W) zugegeben und 4 Stunden bei 35°C gerührt.

Diese Tween 80®-haltige Lösung bzw. Suspension wird mit 10 mM Natriumacetat und 50 mM Natriumchlorid, pH 5,5, equilibriert, wobei rund 20 IE C1-INH pro ml Gel adsorbiert werden. Das adsorbierte Gel wird anschließend mit

- a) 10 mM Natriumacetat und 50 mM Natriumchlorid, pH 5,5,
- b) 154 mM NaPO<sub>4</sub>-Puffer bei pH 5,5, und
- c) 10 mM Tris und 100 mM Natriumchlorid bei pH 7,0

gewaschen. Die Elution wird mit einer Lösung enthaltend 10 mM Tris und 250 mM Natriumchlorid bei pH 7,0 durchgeführt.

Das erhaltene Eluat wird mit einem Asahi-Planova 15N-Filter nanofiltriert; die nanofiltrierte Lösung wird anschließend ultra-/diafiltriert.

Die erhaltene Lösung wird auf die erwünschte Konzentration standardisiert (50, 100 oder 200 internationale Einheiten pro ml). Im Puffer werden 1 g/l Natriumcitrat, 1 g/l Trehalose und 9 g/l Natriumchlorid vorgesehen. Diese Präparation wird auf einen Feuchtigkeitsgehalt von unter 1,5 % lyophilisiert und in den Endbehältern bei zumindest 80°C für mindestens 72 Stunden erhitzt.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

T a b e l l e

Probe	Ausbeute/Schritt Mittel (Beispiel)	spezifische Aktivität IE C1-INH/mg Protein
Ausgangsmaterial	100 % (100 %)	0,02
Eluat 1. Anionen- austausch	70-115 % ( 71 % )	1,1
PEG-Überstand	75-115 % ( 88 % )	1,8
Nach Tween 80	75-115 % (110 %)	1,8
Eluat 2. Anionen- austausch	75-115 % (100 %)	5,2
Nach 15 nm Nanofiltration	75-115 % ( 85 % )	6,0
Nach Lyophili- sierung	75-115 % ( 79 % )	6,0
Nach Hitzebe- handlung	75-115 % (110 %)	6,0

Das so erhaltene Endprodukt verfügt über ein Antigen/Aktivitätsverhältnis von 1,15 : 1.

#### PATENTANSPRÜCHE:

- Verfahren zur Herstellung einer C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH)-haltigen Zusammensetzung, welches die folgenden Schritte beinhaltet:
  - Behandeln eines C1-INH-enthaltenden Ausgangsmaterials mit einem Anionenaustauscher unter sauren Bedingungen und
  - Eluieren des C1-INH vom Anionenaustauscher, wobei eine C1-INH-hältige Zusammensetzung erhalten wird.
- Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Behandeln des Ausgangsmaterials mit dem Anionenaustauscher bei einem pH von 3 bis 6 insbesondere bei 4,5 bis 6, vorgenommen wird.
- Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass weiters mindestens ein Schritt zur Inaktivierung von potentiell vorhandenen Viren durchgeführt wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass als Ausgangsmaterial Plasma, Kryüberstand, C1-INH-hältige Cohn-Fraktionen, C1-INH-hältige Zellkulturüberstände, transgen hergestelltes C1-INH-hältiges Material oder ein vorgereinigtes C1-INH-Präparat verwendet wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die nach dem Eluieren erhaltene Zusammensetzung erneut mit einem Anionenaustauscher kontaktiert wird, wobei der C1-INH gebunden wird, gegebenenfalls der gebundene C1-INH mindestens einem Waschschrift unterzogen wird und erneut eluiert wird.
- Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die nach dem Eluieren erhaltene Zusammensetzung mindestens einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen wird, insbesondere einer PEG-Fällung, einer hydrophoben Chromatographie, einer

Affinitätschromatographie oder einer Kationenaustauscherchromatographie.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene Zusammensetzung lyophilisiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die lyophilisierte Zusammensetzung einer Hitzebehandlung, insbesondere in einem Temperaturbereich zwischen 60°C und 100°C über einen Zeitraum von 10 bis 80 Stunden, unterzogen wird.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene Zusammensetzung zu einem pharmazeutischen Präparat fertiggestellt wird.
10. Verfahren zur Herstellung einer C1-INH-hältigen Zusammensetzung umfassend die folgenden Schritte:
  - Behandeln eines C1-INH-enthaltenden Ausgangsmaterials mit einem Anionenaustauscher unter sauren Bedingungen, wobei C1-INH an den Anionenaustauscher gebunden wird,
  - gegebenenfalls Waschen des adsorbierten C1-INH-haltigen Materials,
  - Eluieren des C1-INH vom Anionenaustauscher, wobei ein C1-INH-hältiges Eluat gewonnen wird,
  - Behandeln des C1-INH-hältigen Eluats mit PEG, bevorzugterweise mit PEG 4000, insbesondere in einer Menge von unter 15 %, wobei ein Präzipitat und ein C1-INH-hältiger Überstand erhalten wird,
  - Behandeln des C1-INH-hältigen Überstandes mit einem Detergens, wobei gegebenenfalls vorhandene Viren inaktiviert werden,
  - Behandeln des Detergens-haltigen C1-INH-hältigen Überstandes mit einem Anionenaustauscher, wobei C1-INH wiederum gebunden wird und das Detergens und gegebenenfalls noch vorhandene Verunreinigungen entfernt werden,
  - gegebenenfalls Waschen des gebundenen C1-INH-haltigen Materials,
  - Eluieren des C1-INH vom Anionenaustausch, wobei ein virusinaktiviertes C1-INH-hältiges Eluat erhalten wird,
  - Nanofiltrieren dieses Eluats,
  - Lyophilisieren der nanofiltrierten C1-INH-Lösung, und
  - Hitzebehandeln der lyophilisierten C1-INH-hältigen Zusammensetzung.
11. C1-INH-hältige Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine spezifische Aktivität von 2,0 E/mg Protein oder mehr bei einem Antigen/Aktivitätsverhältnis von weniger als 1,5 aufweist.
12. C1-INH-hältige Zusammensetzung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine spezifische Aktivität von 4 bis 8, insbesondere von 5 bis 7, E/mg Protein aufweist.
13. C1-INH-hältige Zusammensetzung nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Antigen/Aktivitätsverhältnis von 1 bis 1,4, insbesondere von 1,1 bis 1,3, aufweist.
14. C1-INH-hältige Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie als pharmazeutische Präparation vorliegt und gegebenenfalls virusinaktiviert ist.
15. Kombinationspräparat umfassend eine Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 11 bis 14 und mindestens einer weiteren pharmazeutisch aktiven Substanz, insbesondere eines Plasmaproteins oder eines Plasmaderivats.

KEINE ZEICHNUNG