

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: AT 407 750 B

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 283/99
(22) Anmeldetag: 19.02.1999
(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.2000
(45) Ausgabetag: 25.05.2001

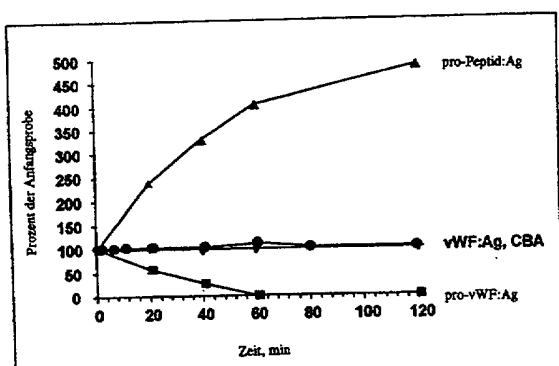
(51) Int. Cl.⁷: C12P 21/02
A61K 38/36

(73) Patentinhaber:
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).
(72) Erfinder:
VARADI KATALIN DR.
WIEN (AT).
TURECEK PETER
KLOSTERNEUBURG, NIEDERÖSTERREICH (AT).
SCHWARZ HANS-PETER
WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINER VWF-PRÄPARATION

AT 407 750 B

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Herstellung einer von Willebrand-Faktor (VWF)-Präparation aus pro-von Willebrand-Faktor (pro-vWF), welche sich dadurch auszeichnet, dass pro-vWF mit Thrombin behandelt wird, wobei VWF generiert wird und eine VWF enthaltende Präparation erhalten wird.



Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer von Willebrand-Faktor (vWF)-Präparation.

Von Willebrand-Faktor ist ein Glykoprotein, das im Plasma als Serie von Multimeren im Größenbereich von etwa 500 bis 20.000 kD zirkuliert. Multimere Formen von vWF bestehen aus 5 250 kD Polypeptid-Untereinheiten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. vWF vermittelt die anfängliche Thrombozytenadhäsion am Sub-Endothel der beschädigten Gefäßwand, wobei nur die größeren Multimeren auch hämostatische Aktivität aufweisen. Man nimmt an, dass Endothelzellen große polymere Formen von vWF sekretieren, und dass jene Formen von vWF, die ein niedriges Molekulargewicht (niedrigmolekularer vWF) aufweisen, durch proteolytische Spaltung entstanden sind. Die Multimeren mit großen Molmassen werden in den Weibel-Pallade-Körpern 10 der Endothelzellen gelagert und bei Stimulierung freigesetzt.

vWF wird durch Endothelzellen und Megakaryozyten als pre-pro-vWF synthetisiert, der in großem Maß aus wiederholten Domänen besteht. Nach Spaltung des Signalpeptids dimerisiert pro-vWF durch Disulfidbrücken an seinem C-terminalen Bereich. Die Dimere dienen als Protomere für die Multimerisierung, die von Disulfidbrücken zwischen den Termini mit freiem Ende gesteuert wird. Der Anordnung zu Multimeren folgt die proteolytische Entfernung des pro-Peptids (Leyte et al., Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

Die gesamte Länge der c-DNA von vWF wurde kloniert. Das pro-Polypeptid entspricht den Aminosäureresten 23 bis 764 des pre-pro-vWF der gesamten Länge (Eikenboom et al., Haemophilia 1 (1995), 77 bis 90).

Es zeigt sich, dass das pro-Peptid von vWF (pp-vWF) mit dem von Willebrand-Antigen II, dem zweiten identifizierten Antigen, das im Plasma und in den Blutplättchen von Patienten mit schwerer von Willebrand-Krankheit (vWD) fehlt, identisch ist. pp-vWF ist spezifisch in Blutplättchen und Endothelzellen synthetisiert. Das Molekularverhältnis von pp-vWF zu vWF im Plasma ist 1 : 10, die Plasmakonzentration des pp-vWF beträgt etwa 5 nmol/l. Wie bereits bekannt, wird pp-vWF nach Aktivierung durch verschiedene Agonisten aus Endothelzellen freigesetzt.

Es wird postuliert, dass die physiologische Rolle von pp-vWF in der Steuerung der Anordnung von vWF-Multimeren entweder vor oder nach der Abspaltung von pp-vWF-Molekülen liegt. (Takagi et al., JBC 264 (18) (1989) 10425-10430). Es hat sich auch gezeigt, dass pp-vWF die Thrombozytencollagen-Interaktionswirkung hemmt (Takagi et al., JBC 264 (11) (1989) 6017-6020).

Die von Willebrand-Krankheit (vWD; von Willebrand-Syndrom; Willebrand-Jürgens-Syndrom) ist generell durch eine Verminderung oder einen Strukturdefekt von vWF gekennzeichnet, wodurch mangelnde Thrombozytenaggregation und -adhäsion am Sub-Endothel und somit Defekte in der primären Hämostase auftreten können. Diese Defekte verursachen bei vWD-Patienten verlängerte 30 Blutungszeiten.

Zur Behandlung der vWD wird in der Regel versucht, den Mangel von funktionell aktivem vWF auszugleichen, etwa durch Präparate, die auch zur Therapie der Hämophilie A verwendet werden, wie Kryopräzipitat oder daraus hergestellte Faktor VIII-Konzentrate, die Komplexe aus Faktor VIII und vWF enthalten. Da jedoch die Präparate zur Behandlung der Hämophilie A durch Verbesserungen der Aufreinigungsmethoden immer reiner hinsichtlich Faktor VIII werden, und vWF nicht oder nur mehr in Spuren enthalten ist, werden solche Präparate zur Behandlung an vWD-Patienten immer ungeeigneter. Man geht daher dazu über, derartigen Patienten gezielt spezifische vWF-Präparate zu verabreichen. Es wird auch versucht, derartige vWF-Präparate möglichst Faktor VIII-frei zu halten, da Patienten mit von Willebrand-Syndrom eigentlich keine Supplementierung mit Faktor VIII benötigen und bei Faktor VIII-Anwendung immer die Gefahr einer Induktion von inhibitorischen Faktor VIII-Antikörpern im Patienten gegeben sein kann.

Zur Aufreinigung von vWF ist daher eine ganze Reihe verschiedenster, meist chromatographischer Verfahren beschrieben worden. Da das Quellenmaterial für die vWF-Präparation oft ein Gemisch aus reifem vWF und vWF-Vorstufen wie pro-vWF enthält, oder sogar nur (pre-)pro-vWF 50 beinhaltet (etwa bei rekombinant hergestellten Präparaten) ist es erforderlich, bei der Herstellung von vWF-Präparationen den (pre-)pro-vWF in reifen vWF umzuwandeln. Im Stand der Technik ist die Behandlung des pro-vWF mit Furin oder PACE (siehe EP 0 775 750 A) als ein geeignetes System beschrieben, um die Spaltung von pro-vWF in pp-vWF und reifen vWF zu ermöglichen. Furin ist ein endoproteolytisches Enzym welches im trans-Golgi-Netzwerk durch eine transmembrane Domäne verankert ist. Bei der rekombinanten Herstellung von reifem vWF wurde vor

geschlagen, Furin und vWF zu coexprimieren, um eine geeignete Reifung des vWF in situ herbeizuführen (EP 0 775 750 A). Dies stellte sich jedoch als äußerst schwierig heraus und kann mit einer empfindlichen Reduzierung des Expressionsniveaus verbunden sein. Außerdem tritt im Zusammenhang mit der Coexpression von Furin mit einem pro-Protein im großtechnischen Ansatz in Zellkultur das Problem auf, dass eine hohe Expressionsrate der Protease toxisch für die Zellen ist, was ebenfalls zu einer geringen Ausbeute an Furin und an reifem Protein führt.

Neben Furin oder ähnlichen PACE-Enzymen aus der Gruppe der Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen sind vWF-prozessierende Proteasen auch in der AT-PS 404 554 und in der AT-PS 404 359 beschrieben.

Thrombin (Faktor IIa der Blutgerinnung) ist ein aus Prothrombin entstehendes Enzym im Blutplasma mit einem Molekulargewicht von etwa 35.500. Thrombin führt die Fibrinogenmoleküle unter Abspaltung der Fibrinopeptide A und B in Fibrinmonomere über, die spontan zu Fibrinpolymeren aggregieren. Weiters werden durch Thrombin Faktor XIII, Faktor VIII und Protein C aktiviert. Daher findet Thrombin als proteolytisches Enzym bei der Herstellung dieser aktivierte Proteine eine Rolle (vgl. EP 0 416 890 A bezüglich der Herstellung von aktivem rekombinantern humanen Protein C durch Behandlung mit immobilisiertem Thrombin).

Es zeigt sich, dass die im Stand der Technik beschriebenen Verfahren zur Aktivierung von pro-vWF entweder sehr umständlich oder mit niedrigen Ausbeuten verbunden waren oder aber aufgrund der mangelnden ausreichenden kommerziellen oder biologischen Verfügbarkeit der Verfahrenskomponenten nicht oder nur begrenzt großtechnisch einsetzbar waren. Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung liegt daher darin, die Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und ein Verfahren zur Aktivierung von pro-vWF zur Verfügung zu stellen, das hoch-selektiv ist und trotzdem auch großtechnisch angewendet werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung einer vWF-Präparation aus pro-vWF, welches sich dadurch auszeichnet, dass pro-vWF mit Thrombin behandelt wird, wobei vWF generiert wird und so eine Präparation an reifem vWF erhalten werden kann.

Es stellt sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung überraschenderweise heraus, dass nicht nur Furin ein selektives Enzym zur Spaltung von pro-vWF in pp-vWF und reifen vWF ist, sondern auch Thrombin. Es zeigte sich, dass durch Verwendung von Thrombin als Prozessierungs-Protease ein einfaches Verfahren zur Reifung von pro-vWF zur Verfügung gestellt werden konnte, welches - bedingt durch die etablierte großtechnologische Verfügbarkeit von Thrombin - auch im industriellen Maßstab angewendet werden kann.

Bevorzugterweise wird beim erfindungsgemäßen Verfahren eine pro-vWF-haltige Lösung mit Thrombin behandelt, wobei prinzipiell jede pro-vWF-enthaltende Lösung geeignet ist. Pro-vWF kann aber auch als Immobilisat an einem festen Träger maturiert werden.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird pro-vWF vorzugsweise mit immobilisiertem Thrombin behandelt, da dadurch die Proteasereaktion noch effizienter gesteuert werden kann und die oftmalige Verwendung des Immobilisats sowie eine kontinuierliche Durchführung der Behandlung in einfacher Weise ermöglicht wird. Verfahren zur Immobilisierung von Thrombin sind im Stand der Technik hinreichend bekannt. Den Umstand, dass die Immobilisierung von Thrombin dessen pro-vWF-spaltende Aktivität im Wesentlichen unbeeinflusst belässt, stellt einen weiteren entscheidenden Vorteil dieser Ausführungsform dar.

Gerade die Stabilität von immobilisiertem Thrombin und dessen nicht beeinträchtigte Aktivität gegenüber pro-vWF ermöglichen die besonders bevorzugte kontinuierliche Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, beispielsweise in einem Reaktor, enthaltend eine feste Oberfläche mit immobilisiertem Thrombin, durch welchen eine pro-vWF-haltige Lösung geleitet wird, so dass reifer vWF generiert wird. Die einzelnen Prozessparameter, wie Durchflussmenge, Thrombin-Immobilisationsmenge, Reaktorquerschnitt, Verweildauer, Reaktordimensionen und -steuerung, usw., sind von einem Fachmann ohne weiteres anhand üblicher verfahrenstechnischer Methoden optimierbar.

Das pro-vWF enthaltende Ausgangsmaterial für das erfindungsgemäße Verfahren ist für die vorliegende Erfindung nicht kritisch. Mögliche Ausgangsmaterialien sind Blutserum, Blutfractionen, Plasma, Colostrum oder Milch transgener Tiere oder Zellkulturlösungen, insbesondere von Zellen, die mittels rekombinanter DNA-Technik erzeugt wurden (siehe z.B. FEBS-Letters 351 (1994) 345-348 oder Blood 88 (8) 1996 2951-2958).

Bevorzugterweise wird das pro-vWF-haltige Ausgangsmaterial vor der Thrombinbehandlung

zunächst einem oder mehreren Aufreinigungsschritten unterzogen, so dass die pro-vWF-hältige Lösung pro-vWF in gereinigter Form enthält. Geeignete Vorreinigungsschritte schließen dabei Fällung (z.B. mit Ethanol, Ammonsulfat oder PEG), Adsorbieren (wie z.B. Behandlung mit Aluminiumhydroxid) oder chromatographische Verfahren (wie z.B. Affinitäts-, Gel-, oder Ionenaustausch-chromatographie) mit ein. Derartige Vorbehandlungsverfahren sind insbesondere dann günstig, wenn im pro-vWF hältigen Quellenmaterial Substanzen enthalten sind, die die proteolytische Prozessierung von pro-vWF durch Thrombin stören können, etwa Inhibitoren von Thrombin oder der gleichen. Obgleich das Vorliegen von Thrombin-Inhibitoren im Ausgangsmaterial, die erfolgreiche Durchführung des erfindungsgemäß Verfahrens nicht prinzipiell behindern muss (da Thrombin in der Regel ohnehin in Überschussmengen vorgegeben wird), können derartige Inhibitoren doch beispielsweise die Ausbeute des Verfahrens oder die Lebenszeit des Thrombinimmobilisats reduzieren, so dass ein einfacher Vorreinigungsschritt oft (vor allem bei Vorliegen von Thrombin-Inhibitoren) ratsam erscheint.

Es ist auch möglich, dass in der vWF-hältigen Lösung, welche der Thrombin-Behandlung unterworfen wird, pro-vWF in Mischung mit anderen, vorzugsweise ebenfalls zumindest teilweise aufgereinigten Proteinen vorliegt. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn pro-vWF durch Teilreinigung von anderen Proteinen oder Bestandteilen der Ausgangslösung getrennt worden ist, aber andere Proteine, vor allem solche, die natürlicherweise eine gewisse Affinität zu pro-vWF oder vWF aufweisen, in der mit Thrombin zu behandelnden Lösung vorhanden sind. Zu solchen Proteinen zählen vorzugsweise Aktivatoren und Inhibitoren von Thrombin, wie beispielsweise Heparin, Calcium, Thrombomodulin, Antithrombin III, Peptidinhibitor, unspezifische Thrombininhibitoren, Thrombinmutanten, Prothrombin, alpha₂-Macroglobulin, Faktor VIII, Collagen, Oberflächenproteine von Thrombozyten.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäß Verfahrens wird die pro-vWF-hältige Lösung durch ein biotechnologisches Verfahren hergestellt, beispielsweise durch ein Zell- oder Gewebeinkubationsverfahren. Besonders bevorzugt ist dabei, dass pro-vWF von einer transformierten Zelle exprimiert wird. Bei biotechnologisch hergestellten pro-vWF-hältigen Lösungen wird pro-vWF vorzugsweise von einer Zellkultur, insbesondere von einer Säugetier-Zellkultur, exprimiert.

Im Gegensatz zu Furin ist die Co-Expression von pro-vWF mit Thrombin kein Problem, welches zu einer signifikanten Reduktion der Expression oder der Ausbeute an pro-vWF führen könnte, wobei aber trotzdem die in der EP 0 775 750 A2 und EP 0 319 944 B1 offenbarten Vorteile der in situ-Prozessierung eintreten.

Es kann - je nach Aufreinigungsgrad der dem Thrombinproteolyseschritt unterworfenen pro-vWF-Präparation - auch vorteilhaft sein, nach erfolgter proteolytischer Spaltung von pro-vWF in vWF die erhaltene vWF-Lösung weiter aufzureinigen, wobei das Vorsehen eines chromatographischen Reinigungsschrittes für vWF besonders bevorzugt ist. Derartige Reinigungsverfahren sind beispielsweise in der EP 0 503 991 A, in der WO 89/12 065 A, in der EP 0 469 985 A, in der EP 0 383 234 A, der WO 96/10 584 A, der EP 0 705 846 A sowie der WO 98/38 219 A beschrieben.

Mit dem vorliegenden Verfahren ist es auch möglich, vWF und Thrombin gemeinsam zu gewinnen, z.B. nach erfolgter Co-Expression oder konzertierter Aufreinigung und Spaltung aus einem Quellenmaterial, das sowohl pro-vWF als auch Thrombin enthält, da sich erfindungsgemäß gezeigt hat, dass entstandener vWF durch die bloße Anwesenheit von Thrombin nicht weiter proteolytisch degradiert wird. Die Gewinnung von vWF und Thrombin in einem Kombinationspräparat ist daher in einfacher Weise dadurch möglich, dass Thrombin nach erfolgter proteolytischer Behandlung zur Generierung von vWF nicht vom entstandenen vWF abgetrennt wird. Das Verfahrensprodukt - also der reife vWF - mit oder ohne Thrombin kann gegebenenfalls noch ein durch die Thrombinbehandlung generiertes Spaltprodukt der pro-Sequenz des vWF enthalten. Dieses Spaltprodukt zeichnet das neuartige Verfahrensprodukt aus.

Es ist auch möglich, pp-vWF bzw. dessen Spaltprodukt, welches bei der Behandlung von pro-vWF mit Thrombin entsteht, aus der proteolytisch behandelten Lösung zu gewinnen. Beispielsweise kann pp-vWF durch Behandlung mit immobilisiertem Heparin gewonnen werden. Dabei wird reifer vWF und gegebenenfalls auch pro-vWF und Thrombin am immobilisierten Material gebunden, während pp-vWF im Durchlauf erhalten wird und gegebenenfalls weiter gereinigt wird.

Gegebenenfalls kann pp-vWF gemäß der österreichischen Anmeldung A 917/97 verwendet werden. pp-vWF-Präparationen sowie Präparationen, die zusätzlich etwa vWF, Faktor VIII, andere aktivierte Blutgerinnungsfaktoren, Blutfaktoren mit FEIB-Aktivität und FEIBA enthalten, können ebenfalls etwa zur Behandlung von Patienten mit einem Risiko für Blutgerinnungsstörungen oder für Patienten mit vWD, phenotypischer Hämophilie, Hämophilie A und Faktor VIII-Inhibitoren verwendet werden.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung eine vWF-Präparation, welche neben (reifem) vWF noch Thrombin enthält. Eine derartige Präparation kann beispielsweise zur direkten lokalen Anwendung bei Wunden oder blutendem Gewebe verwendet werden, um die primäre Hämostase und die Wundheilung zu verbessern oder zu unterstützen.

Bevorzugterweise enthält eine derartige Kombinationspräparation aus vWF und Thrombin weiter Kalziumionen, da die in der Wunde vorhandenen Kalziumionen möglicherweise für eine optimale Funktion des applizierten Thrombins bzw. der Wundenzyme nicht ausreichen könnten.

Die erfindungsgemäß hergestellte vWF-Präparation, welche gegebenenfalls auch Thrombin und pp-vWF enthalten kann, ist bevorzugterweise durch eine Behandlung zur Virusaktivierung oder Entfernung virussicher gemacht worden.

Die Virusaktivierungs- oder Entfernungsbehandlung kann mittels jeder als effizient akzeptierten Behandlung durchgeführt werden. Gemäß bevorzugter Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung wird die pharmazeutische Zusammensetzung mit Tensiden und/oder Wärme behandelt, beispielsweise mittels Wärmebehandlung in festem Zustand, insbesondere mittels einer Dampfbehandlung gemäß der EP 0 159 311, der EP 0 519 901 oder der EP 0 637 451, mittels einer Hydro-lasebehandlung gemäß der EP 0 247 998, mittels einer Bestrahlungsbehandlung oder mittels einer Behandlung mit chemischen oder chemisch/physikalischen Verfahren, beispielsweise mit chaotropen Agentien gemäß der WO 94/13 329, mittels einer Behandlung mit organischen Lösungsmitteln und/oder Tensiden gemäß der EP 0 131 740 oder mittels Photoaktivierung. Filtrationstechniken, wie die der Tiefenfiltration oder Nanofiltration, stellen ebenfalls ein bevorzugtes Verfahren zur Virusabreicherung im Rahmen der vorliegenden Erfindung dar.

Das erfindungsgemäße vWF/Thrombin-Kombinations-)Präparat wird vorzugsweise als pharmazeutische Präparation zur Verfügung gestellt und enthält weiters geeignete pharmazeutisch akzeptable Träger und/oder geeignete Puffer-, Hilfs-, Konservierungs- und/oder Stabilisierungssubstanzen wie Kohlehydrate, Salze oder Proteasehemmer- bzw. Co-Faktoren. Bevorzugterweise wird die pharmazeutische Präparation durch Verpackung zwecks Lagerbarkeit im lyophilisierten oder gefrorenen Zustand zur Verfügung gestellt. Bei der Herstellung einer pharmazeutischen vWF-Präparation sind weitere Aufreinigungs- und Virusaktivierungsschritte vor der endgültigen Formulierung und Verpackung besonders bevorzugt. Die vorliegende Erfindung betrifft gemäß einem weiteren Aspekt ein Set zur Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation bzw. einer vWF-Präparation, welches in einer Komponente A pro-vWF und in einer Komponente B Thrombin enthält. Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Präparation von vWF werden die Komponenten A und B vereinigt, wobei diese Vereinigung sowohl durch in vitro-Mischen der beiden Komponenten, aber auch in situ, beispielsweise auf einer Wunde, erfolgen kann.

Demgemäß kann die Komponente A des erfindungsgemäßen Sets weiters Fibrinogen bzw. (Fibrin-)Kleberprotein enthalten.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele sowie der Zeichnungsfigur, auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt ist, näher erläutert.

Fig. 1 zeigt: die pro-vWF-Prozessierung durch Thrombin

Beispiel 1 : pro-vWF-Prozessierung durch Thrombin

Eine gereinigte rekombinante vWF-Präparation (10 Ag E/ml), enthaltend 50 % pro-vWF und 50 % reifen vWF, wurde mit menschlichem Thrombin (20 NIH E/ml) bei 37°C inkubiert, und Unterproben wurden in Zeitintervallen abgezogen, um die Veränderungen der verschiedenen Parameter zu messen. Wie in Fig. 1 dargestellt ist, wurde ein zeitabhängiges Absinken von pro-vWF und ein Steigen von pro-Peptid beobachtet, während bei der gesamten vWF-Antigen- und Collagenbindungsaktivität (CBA) keine Veränderungen festgestellt wurden, was anzeigt, dass es nicht zu einem Abbau, sondern zu einer spezifischen "Reifung" kam. Dies wurde durch Immunoblots

bestätigt, die mit einem polyklonalen anti-Human-vWF-Antikörper nach SDS-PAGE unter Reduktionsbedingungen entwickelt wurden, wobei das graduelle Verschwinden der pro-vWF-Bande ohne jeglichen weiteren signifikanten Abbau des reifen vWF-Bandes beobachtet werden kann. Der mit einem monoklonalen anti-pro-Peptid-Antikörper nach SDS-PAGE unter nichtreduzierenden Bedingungen entwickelte Immunoblot zeigte das graduelle Auftreten des entfernten pro-Peptids. Eine hochauflösende Multimeranalyse zeigte auch die Umwandlung von pro-vWF zu reifem vWF.

Beispiel 2: Aminoterminale Analyse der Prozessierungsprodukte

Der Zeitpunkt von 120 Minuten der Prozessierungsmischung (rpro-vWF und Thrombin) zeigte die SLS_RPPMV-Sequenz des reifen vWF und die AEGT_G_SS-Sequenz des pro-Peptids in etwa äquimolaren Mengen neben den ebenfalls vorhandenen schweren und leichten Kettensequenzen von Thrombin. Mögliche andere Abbauprodukte, soferne sie vorhanden waren, waren unter der Nachweisgrenze des Systems, was bestätigt, dass Thrombin spezifisch das pro-Peptid von vWF abspaltet.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Herstellung einer von Willebrand-Faktor (vWF)-Präparation aus pro-von Willebrand-Faktor (pro-vWF), dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF mit Thrombin behandelt wird, wobei vWF generiert wird, und eine vWF-Präparation erhalten wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine pro-vWF-haltige Lösung mit Thrombin behandelt wird.
3. Verfahren Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das pro-Peptid (pp-vWF) neben dem vWF gewonnen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF mit immobilisiertem Thrombin behandelt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Behandlung mit Thrombin kontinuierlich durchgeführt wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF biologischen Ursprungs eingesetzt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF in gereinigter Form eingesetzt wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF in Mischung mit anderen Proteinen eingesetzt wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF in Mischung mit mindestens einem weiteren Mittel, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Aktivatoren und Inhibitoren von Thrombin und Faktor VIII, eingesetzt wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als pro-vWF-haltige Lösung eine durch biotechnologische Verfahren hergestellte Lösung eingesetzt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF von einer transformierten Zelle exprimiert wird.
12. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass vWF an immobilisiertem Heparin gebunden und pp-vWF im Durchlauf erhalten wird.
13. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF in einer Zellkultur, insbesondere in Säugetierzellen, exprimiert wird.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass pro-vWF mit rekombinantem Thrombin prozessiert wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass nach erfolgter Generierung von vWF der erhaltene vWF und Thrombin gemeinsam zu einem Kombinationspräparat gewonnen werden.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass weiters ein chromatographischer Reinigungsschritt für vWF vorgesehen wird.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene vWF-Präparation gegebenenfalls mit Thrombin zu einer pharmazeutischen Präparation fertiggestellt wird, wobei vorzugsweise noch weitere Aufreinigungs- und Virusaktivierungsschritte vorgesehen werden.
- 5 18. Präparat, erhältlich nach Anspruch 15, enthaltend vWF und Thrombin und gegebenenfalls enthaltend pp-vWF.
19. Präparat nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass es weiters Kalziumionen enthält.
- 10 20. Präparat nach Anspruch 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, dass es pharmazeutisch formuliert und gegebenenfalls virusaktiviert ist.
21. Set zur Herstellung eines Präparates nach einem der Ansprüche 18 bis 20 enthaltend eine Komponente A, welche pro-vWF umfasst, und eine Komponente B, welche Thrombin umfasst.
- 15 22. Set nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Komponente A weiters Fibrinkleberprotein enthält.

HIEZU 1 BLATT ZEICHNUNGEN

20

25

30

35

40

45

50

55

FIG. 1

