

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 917/97

(51) Int.Cl.⁶ : **A61K 38/36**

(22) Anmeldetag: 28. 5.1997

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 1.1999

(45) Ausgabetag: 25. 8.1999

(56) Entgegenhaltungen:

US 5571784A

(73) Patentinhaber:

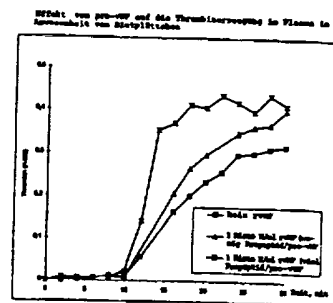
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

SCHWARZ HANS-PETER
WIEN (AT).
VARADI KATALIN DR.
WIEN (AT).
TURECEK PETER DR.
KLOSTERNEUBURG, NIEDERÖSTERREICH (AT).
HEMKER HENDRIK COENRAAD
LM MAASTRICHT (NL).
BEGUIN SUZETTE LUCETTE
MAASTRICHT (NL).

(54) EINE DAS VWF-PROPEPTID ENTHALTENDE PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATION

(57) Beschrieben sind eine pharmazeutische Präparation zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, welche eine wirksame Menge an vWF-Propeptid aufweist, sowie ein Verfahren zur Herstellung einer solchen Präparation.



Die Erfindung betrifft eine das vWF-Propeptid (pp-vWF) enthaltende pharmazeutische Präparation.

Von Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Glycoprotein, das im Plasma als Serie von Multimeren im Größenbereich von etwa 500 bis 20.000 kD zirkuliert. Multimere Formen von vWF bestehen aus 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 der Endothelzellen gelagert und bei Stimulierung freigesetzt.

vWF wird durch Endothelzellen und Megakaryozyten als Prepro-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 Propeptids (Leyte et al., Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

Die gesamte Länge der cDNA von vWF wurde kloniert; das Propolypeptid entspricht den Aminosäureresten 23 bis 764 des prepro-vWF der gesamten Länge (Eikenboom et al. (1995) Haemophilia 1, 77-90).

Es zeigte sich, daß das Propeptid 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 lokalisiert, da Plasma weniger als 5% des gesamten, im Blut vorhandenen vWF enthält, unter der Annahme, daß die Thrombozytenzahl 3×10^8 pro ml beträgt. Wie bereits bekannt, wird pp-vWF nach Aktivierung durch verschiedene Agonisten aus Blutplättchen freigesetzt. pp-vWF ist nicht nur deshalb ein Glykoprotein, weil es mit Schiff'schem Reagens periodischer Säuren reagiert, sondern auch, weil es an Linsen-Lectin bindet. pp-vWF bindet spezifisch an natives Kollagen vom Typ I, bindet jedoch nicht an wärmedenaturiertes Kollagen. Es hat sich gezeigt, daß die Affinität zwischen pp-vWF und Kollagen vom Typ I ziemlich hoch war, so daß die Bindung - die kein divalentes Kation erfordert und nicht durch Zugabe eines Peptids, das die Sequenz von Arginin-Glycin-Asparaginsäure enthält (von der bekannt ist, daß sie viele Zellanlagerungsprozesse hemmt) beeinträchtigt wird - rasch ein Gleichgewicht erreichte.

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 pro-vWF-Molekülen, liegt (Takagi et al., JBC 264 (18) (1989), 10425-10430).

Es hat sich auch gezeigt, daß pp-vWF die Thrombozyten-Kollagen-Interaktionswirkung hemmt (Takagi et al., JBC 264 (11) (1989), 6017-6020).

In Isobe et al. (JBC 272 (13) (1997), 6447-6453) wurde die Rolle von pp-vWF als neuer physiologischer Ligand und eines Adhäsionssubstrates für $\alpha 4 \beta 1$ -Integrin-exprimierende Leukämiezellen untersucht. Man fand, daß pp-vWF in dem der Melanom-Metastasierung wie auch der Gefäßentzündung zugrundeliegenden Mechanismus eine wichtige Rolle spielt.

Obwohl reifen vWF enthaltende pharmazeutische Präparationen bekannt sind (vgl. z.B. US 5 571 784), sind im Stand der Technik die pharmazeutische Verwendung von pp-vWF oder des pro-Form-vWF nicht beschrieben oder nahegelegt. Gemäß der US 5 571 784 stört vWF die systemische Antikoagulationswirkung des Antikoagulans Hirudin, wie mittels aPTT gemessen, nicht, sondern er verringert die Blutungsnebenwirkungen einer Therapie mit Antikoagulantien. vWF wird daher als Pseudo-Antidot in Verbindung mit Blutungen, die durch Verabreichung antithrombotischer und/oder fibrinolytischer Mittel erzeugt werden, vorgeschlagen.

Aus Blann et al. (Eur.J.Vasc.Surg.8 (1994), 10-15) ist auch bekannt, daß vWF-Mengen bei Risikofaktoren für Atherosklerose und bei Patienten mit diffuser Arterienerkrankung erhöht sind. Man nimmt an, daß vWF auch ein Maß für die Endothelschädigung bei den entzündlichen Vasculitiden ist. Es wird vorgeschlagen, daß geringe Mengen von vWF in einem Patienten als Schutz vor solchen Erkrankungen dient.

Es ist das Ziel der vorliegenden Erfindung, ein vWF-Pharmazeutikum mit verbesserten Eigenschaften zu schaffen. Die Präparation sollte die intrinsische Blutgerinnungsaktivität der Behandelten verbessern und das arterielle Thromboserisiko der vWF-Therapie verringern.

Dieses Ziel wird durch die vorliegende Erfindung erreicht, indem eine pharmazeutische Präparation zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen geschaffen wird, welche eine wirksame Menge an vWF-Propeptid aufweist. Es wurde festgestellt, daß pp-vWF eine wesentliche Rolle bei der Blutgerinnung spielt. Er fördert die intrinsische Blutgerinnung und wirkt dadurch auf sekundäre Hämostase. Gleichzeitig hemmt er die Thrombozytenadhäsion und steuert die primäre hämostatische Aktivität von reifem vWF durch Bindung an Kollagen. Aufgrund dieser Erkenntnisse kann eine vWF-Präparation verbessert werden, indem zusätzlicher

pro-vWF oder pp-vWF als separates, wirksames Protein in der vWF-Präparation vorgesehen wird. pp-vWF steuert die primäre hämostatische Aktivität des reifen vWF und verringert somit das potentielle Thrombose-risiko von vWF für beispielsweise die Herbeiführung einer arteriellen Thrombose, wie vom Stand der Technik angegeben.

- 5 Überraschenderweise fand man, daß eine beträchtliche Mengen an pp-vWF enthaltende rekombinante vWF-Präparation (rvWF) eine erhöhte Thrombingenerierung in vitro herbeiführt. Die Thrombingenerierung wurde durch einen in vitro-Test gemessen, der mit gewaschenen vWD-Plättchen in FVIIIc-substituiertem vWD-Plasma nach Zugabe von FEIBA (factor VIII inhibitor bypassing activity; Österreichische Patente Nr. 350 726, 368 883 und 398 079) zur Initiierung der Aktivierung von Prothrombin durchgeführt wurde. Wenn
10 die rvWF-Präparation eine vorherrschende Menge an pro-vWF und pp-vWF enthielt, wurde die Thrombingenerierung wesentlich erhöht. Der Beitrag des pp-vWF zum blutgerinnungsfördernden Effekt von vWF ist daher von überraschender Bedeutung.

- Da diese Ergebnisse darauf schließen lassen, daß die Wirkung von vWF als Blutgerinnungsfaktor in einer Beziehung zu pp-vWF steht, ist die auf pp-vWF oder pro-vWF basierende pharmazeutische Präpara-
15 tion auf Gebieten anwendbar, in welchen vWF vorgeschlagen wurde, und darüberhinaus auf vielen weiteren Gebieten, bei welchen eine blutgerinnungsfördernde Wirkung erwünscht ist.

- Die Präparation des pp-vWF oder pro-vWF gehört infolge vieler wissenschaftlicher Abhandlungen, die sich mit der Expression und mit Eigenschaften von vWF für diagnostische Zwecke befassen, zum Stand der Technik, vgl. z.B. experimentelle Verfahren in Isobe et al., Takagi et al. (beide Schriftstücke aus dem Jahr
20 1989), oder Leyte et al.. Es wurde jedoch bis jetzt noch von keiner einzigen blutgerinnungsfördernden Aktivität berichtet, daß sie mit vWF und der Propeptidregion von vWF in Verbindung steht, und es wurde daher auch keine entsprechende pharmazeutische Präparation für diese Zwecke vorgeschlagen. Da das pp-vWF ein genau definiertes Polypeptid ist und durch rekombinante DNA-Technik leicht herstellbar ist, ist die rekombinante Produktionsweise eine bevorzugte Ausführungsform zur Herstellung der vorliegenden phar-
25 mazeutischen Zusammensetzung. Das Polypeptid kann auch gereinigt oder weiter gereinigt werden mittels Chromatographie, wie Ionenaustauschchromatographie und/oder Affinitätschromatographie unter Verwendung monoklonaler Antikörper, Heparin, Kollagen, Faktor VIII-Protein oder Fragmenten davon als Affinitätsli-
ganden. Es ist auch möglich, pp-vWF von kontaminierenden Proteinen und/oder reifem vWF durch Gelfiltration zu trennen.

- 30 Eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Präparation, die im wesentlichen aus dem vWF-Propeptid besteht. Dadurch enthält die Präparation gereinigtes pp-vWF oder pro-vWF in einem Ausmaß, daß mindestens 80%, vorzugsweise mindestens 90%, am meisten bevorzugt mehr als 95% oder etwa 100% reiner pp-vWF oder pro-vWF enthalten sind.

- Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine Präparation, die im wesentlichen aus
35 dem pro-vWF besteht, welcher das vWF-Propeptid enthält, als pharmazeutische Präparation.

Wie voranstehend beschrieben, ist es bevorzugt, rekombinant erzeugten pro-vWF oder pp-vWF für die vorliegende Präparation zu verwenden. (FEBS Letters 351 (1994), 345-348 oder Blood 88 (8), 1996, 2951-2958).

- Die Präparationen der vorliegenden Erfindung enthalten vorzugsweise mindestens 10 nM pp-vWF, mehr
40 bevorzugt mindestens 30 nM, insbesondere mehr als 50 nM und/oder mindestens 10 nM pro-vWF, mehr bevorzugt mehr als 100 nM, insbesondere mehr als 250 nM. Die wirksame Menge ist definiert zum Erhalt einer pp-vWF-Menge von mindestens dem Doppelten der physiologischen Menge in Humanplasma. In Blood 88 (8), 1996, 2951-2958 ist berichtet, daß das Molverhältnis des Propeptids und der vWF-Konzentration in Normalplasma etwa 0,1 ist. pp-vWF wird als eher reichlich vorkommendes Protein
45 angesehen mit einer Konzentration von 5 bis 100 nmol/l, je nach dem Aktivierungszustand des Endothels.

- Wenn vWF in der Präparation zusätzlich zu pro-vWF enthalten ist, beträgt das Molverhältnis von pro-vWF und vWF mindestens 10%, welches als E-Antigen, detektiert durch eine gegen vWF-Antigen gerichtete polyklonale Antikörper-Präparation, gemessen wird. Bei der bevorzugten erfindungsgemäßen Präparation ist das Molverhältnis sogar noch höher, mindestens 20% oder, mehr bevorzugt, mindestens 50%. Die am
50 meisten wirksame erfindungsgemäße Präparation enthält mehr als 80% vWF-Antigen als pro-vWF.

Es zeigte sich, daß eine erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation auf Basis von pro-vWF nach Verabreichung in vivo rasch verarbeitet wird. Der so generierte pp-vWF ist in seinem Thrombinpotential und seiner blutgerinnungsfördernden Aktivität wirksam.

- Bei einer anderen bevorzugten Ausführungsform enthält die pharmazeutische Präparation gemäß der
55 vorliegenden Erfindung weiters ein Hämostase-Protein, vorzugsweise einen Blutfaktor. Bevorzugte Ausführungsformen dieser Blutfaktoren sind aus der Gruppe bestehend aus reifem vWF, Faktor VIII, aktivierten Blutgerinnungsfaktoren, Blutfaktoren mit FEIB-Aktivität und FEIBA ausgewählt. Jedes Hämostase-Protein, das die aPTT oder PT von Normalplasma verringert, ist eine geeignete Kombination mit dem pp-vWF oder

pro-vWF.

Eine Kombination der pp-vWF-Präparation mit FVIIIc ergibt eine pharmazeutische Präparation mit verbesserter Blutgerinnungsaktivität. Wenn das Propeptid in Form von pro-vWF vorliegt, das mit FVIIIc komplexiert ist, weist die pharmazeutische Präparation gemäß der vorliegenden Erfindung zusätzlich eine verbesserte FVIIIc-Stabilität auf.

Die weiteren Kombinationen sind bei einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparation mit einer Thrombozytenkomponente versehen. Einige der Komponenten mit Bindungseigenschaften oder einer Aktivität gegenüber vWF oder pro-vWF oder pp-vWF, die geeignet sind, einen Beitrag zu den physiologischen Eigenschaften zu leisten, sind Kollagen, Blutplättchen-Glycoprotein, Blutplättchen, Fibrinogen, Fibrin, Heparin oder ein Derivat davon.

Die pharmazeutische Präparation der vorliegenden Erfindung kann weiters auch Phospholipide enthalten.

Die pharmazeutische Präparation gemäß der vorliegenden Erfindung ist vorzugsweise durch eine Behandlung zur Virusinaktivierung oder -entfernung virussicher gemacht worden.

Die Virusinaktivierungs- 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 im festen Zustand, insbesondere mittels einer Dampfbehandlung gemäß der EP 0 159 311 oder der EP 0 519 901 oder der EP 0 637 451, mittels einer Hydrolasebehandlung 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 94/13329, mittels einer Behandlung mit organischen Lösungsmitteln und/oder Tensiden gemäß der EP 0 131 740, oder mittels Photoinaktivierung. Nanofiltration stellt ebenfalls ein bevorzugtes Verfahren zur Virusabreicherung im Rahmen der vorliegenden Erfindung dar.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation enthält weiters einen pharmazeutisch akzeptablen Träger und/oder geeignete Puffer-Hilfskonservierungs- und/oder Stabilisierungssubstanzen, wie Kohlehydrate oder Salze, oder Proteasehemmer bzw. Cofaktoren. Die Präparation wird schließlich insbesondere für parenterale oder topische Verwendung wie jede bekannte vWF-Präparation gemäß dem Stand der Technik formuliert. Dies kann durch Füllen in Behälter in einer zur Verabreichung geeigneten Form, und vorzugsweise durch Verpackung zwecks Lagerbarkeit, gegebenenfalls in lyophilisiertem oder gefrorenem Zustand, erfolgen.

Die Präparation gemäß der vorliegenden Erfindung kann durch Reinigung aus Blutserum oder Plasma und durch ein entsprechendes Expressionssystem hergestellt werden. Transgene Tiere können ebenfalls eine Quelle für pp-vWF oder pro-vWF darstellen.

Eine erfindungsgemäße Präparation kann auch durch Expression des pp-vWF oder des pp-vWF-enthaltenden pro-vWF in vivo oder ex vivo geschaffen werden. Besonders geeignet für eine solche Vorgangsweise sind Zellen, die von Säugern stammen, insbesondere menschliche Zellen, die in der Human-Genherapie gezüchtet oder verwendet werden können. Auch transformierte Zellen, die pp-vWF oder den pro-vWF als heterologes Protein exprimieren, sind eine geeignete Quelle für den Erhalt der erfindungsgemäßen Präparation.

Eine weitere Ausführungsform gemäß der vorliegenden Erfindung ist auch eine pharmazeutische Präparation, die eine pro-vWF-Mutante mit einer Mutation an der Schnittstelle enthält. Eine solche Mutante wurde von Borchellini et al. für experimentelle Zwecke beschrieben (Blood 88 (8), 2951-2958 (1996)). Das beschriebene vWF-Gly 763 hat eine Mutation, die einen pro-vWF schafft, der durch physiologische Enzyme nicht spaltbar ist. Die Resistenz des pro-vWF gegen Spaltung führt zu einer verlängerten Halbwertszeit der blutgerinnungsfördernden Aktivität des pp-vWF, der in der pro-vWF-Form mit umfaßt ist. Dadurch wird durch eine spezifische Mutation an der Schnittstelle eine verlängerte Wirkung ermöglicht.

Diese spezifische Mutation kann mittels der Techniken von Lankhof et al. (Thrombin and Haemostasis, 77 (5), 1008-13 (1997)) bewirkt werden, der eine Deletionsmutante ohne die A2-Domäne erzeugte, die resistent gegen Proteolyse war, bis sie nach Entfaltung des Moleküls empfindlich wurde.

Andere mutante Proteine von pp-vWF oder pro-vWF, die die Eigenschaften der nativen Proteine aufweisen, können ebenfalls für die vorliegenden Präparationen verwendet werden. In diesem Fall ist es bevorzugt, ein Analog oder eine Mutante mit mindestens 80% Homologie und der Funktion, als modifizierter pp-vWF oder pro-vWF zu wirken, zu verwenden.

Noch ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation, die eine wirksame Menge an pp-vWF enthält, wobei ein das vWF-Propeptid enthaltendes Quellenmaterial vorgesehen, der pp-vWF vom Quellenmaterial getrennt und der pp-vWF zu einer pharmazeutischen Präparation formuliert wird.

Quellenmaterial kann vorzugsweise Blut, Serum, Blutfraktionen, Kolostrum oder Milch transgener Tiere oder Zellkulturlösungen, insbesondere von Zellen, die mittels rekombinanter DNA-Technik erzeugt wurden, sein. Das pp-vWF enthaltende Quellenmaterial enthält vorzugsweise den pp-vWF in einem provWF. Verfahren und Techniken sind in FEBS Letters 351, 345-348 (1994) oder Borchellini et al., supra, beschrieben.

Die Expression wird vorzugsweise auf eine Weise durchgeführt, um die Verarbeitung und Reifung von vWF zu verhindern, um den pro-vWF zu erhalten. Dies kann durch Weglassen oder Hemmung verarbeitender Enzyme erfolgen. Die Hemmung verarbeitender Enzyme, wie Furin oder PACE oder die Multimerase, wie in der internationalen Anmeldung WO 97/41206 A beschrieben, verhindert die vorzeitige Verarbeitung von pro-vWF zu vWF. Andererseits könnte der pp-vWF als separates Protein exprimiert oder nach Spaltung und Verarbeitung des pro-vWF in vitro erhalten werden.

Noch eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Durchführung des Verfahrens unter Vorsehen eines Quellenmaterials, das den pro-vWF als mutierten pro-vWF enthält mit einer Mutation an der Schnittstelle des pp-vWF, wie einer Aminosäure-Änderung an 763, wie pro-vWF-Gly 763.

Alternativ kann die pharmazeutische Präparation in Anwesenheit eines Inhibitors erzeugt werden, der die Spaltung des pp-vWF vom pro-vWF hemmt. Beispiele für solche Inhibitoren sind Antikörper gegen die Schnittstelle oder ein Bindungspeptid, das gegen die Schnittstelle gerichtet ist, oder ein Inhibitor des Verarbeitungsenzyms.

Wie oben erwähnt, sind die Präparations- und Trennungsschritte von pp-vWF infolge verschiedener Berichte über mit pp-vWF durchgeführte Versuche (vgl. Isobe et al., Takagi et al., Leyte et al.) auf diesem Gebiet wohlbekannt.

Selbstverständlich weist das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung vorzugsweise eine Behandlung zur Inaktivierung oder Entfernung von Viren auf, da pp-vWF ein biologisches Protein ist und in einer Form vorliegt, die Menschen verabreicht wird.

Die Erfindung sieht weiters pp-vWF und/oder pro-vWF zur Verwendung als Arzneimittel vor. Die wirksame Dosis zur Erhöhung der pp-vWF-Menge in vivo auf mindestens das Doppelte der physiologischen Menge kann durch einmalige oder mehrmalige Verabreichung des pp-vWF oder des pro-vWF pro Tag vorgesehen werden. Infolge der ziemlich kurzen Halbwertszeit des pp-vWF in vivo kann es notwendig sein, das Protein häufig während der akuten Erkrankung zu verabreichen.

Noch ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des pp-vWF und/oder des den pp-vWF enthaltenden pro-vWF zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung eines Patienten, bei welchem ein Risiko einer Blutgerinnungsstörung besteht, insbesondere vWD, phenotypische Hämophilie, Hämophilie A und Faktor VIII-Inhibitoren.

Bei der medizinischen Anwendung variiert die wirksame Dosis der Präparation je nach dem entsprechenden Syndrom und sollte vorzugsweise nach Bestimmung der Blutwerte der kritischen Blutfaktoren oder dem Thromboserisiko des Patienten ausgewählt werden. Die optimale Dosierung hängt auch davon ab, ob die parenterale, vorzugsweise intravenöse, subkutane oder intramuskuläre Verabreichung in Bolus-Form oder als Depot erfolgen soll. Bei Verwendung eines geeigneten Trägermaterials, wie Liposomen, ist eine perorale Verabreichung möglich. Es hängt auch davon ab, ob sie systemisch und/oder lokal an der Stelle der Blutgerinnungsstörung angewendet werden soll.

Daher sieht die Erfindung auch ein Verfahren zur Behandlung eines Patienten mit einem Risiko einer Blutgerinnungsstörung vor, welches die Verabreichung einer wirksamen Menge an vWF-Propeptid oder pro-vWF an den Patienten umfaßt. Vorzugsweise wird ein Patient, der an vWD, phenotypischer Hämophilie, Hämophilie A oder Faktor VIII-Inhibitoren leidet, erfindungsgemäß behandelt.

Infolge der positiven Eigenschaften, die pp-vWF oder pro-vWF bei Kombination mit Präparationen mit einem Risiko für arterielle Thrombose, wie vWF-Präparationen, aufweisen, ist es ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung, pp-vWF oder pro-vWF zu verwenden, um das Thromboserisiko bei vWF-Präparationen zu verringern. Dadurch wird die potentielle Steigerung der arteriellen Thrombusbildung wirksam verringert, während die intrinsische und extrinsische Blutgerinnung im Falle einer mangelhaften Blutgerinnung gefördert wird.

Insbesondere wird die Verträglichkeit einer vWF-Präparation verbessert durch die Zugabe von und Kombination mit den pp-vWF oder pro-vWF in wirksamen Mengen. Wegen der Steuerfunktion des vWF-Propeptids trägt es weiters zur Behandlung und Verhinderung nachteiliger Reaktionen von endogenem und exogenem vWF, insbesondere erhöhten vWF-Mengen bei Patienten in Verbindung mit thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura, Henoch-Schönlein-Purpura, Präeklampsie, neonataler Thrombozytopenie oder hämolytisch-urämischem Syndrom, Myokardinfarkt oder einem schlechten Ergebnis einer Arterienoperation bei.

Die vorliegende Erfindung ist anhand der folgenden Beispiele und Zeichnungsfiguren näher beschrieben, auf welche sie jedoch nicht eingeschränkt sein soll.

Fig. 1 zeigt die Wirkung von pro-vWF auf die Thrombin-Erzeugung im Plasma in Anwesenheit von Blutplättchen,

5 Fig. 2 zeigt die dosisabhängige Wirkung von pro-vWF auf die Thrombinerzeugung im Plasma in Anwesenheit von Blutplättchen,

Fig. 3a und 3b zeigen den Vergleich des in vivo-Effekts von pro-vWF und von von Plasma abstammendem vWF bei einem Hund.

10 Beispiele:

Beispiel 1. Wirkung von pro-vWF und pp-vWF auf die Thrombinerzeugung im Plasma in Anwesenheit von Blutplättchen.

15 Plasma mit schwerer vWD (George King Bio-Medical Inc., USA), das zuvor mit 1 E/ml FVIII:C (Recombinant, Baxter, USA) (200 µl) rekonstituiert worden war, wurde mit 50 µl gewaschenen Blutplättchen von einem Patienten mit schwerer vWD (Type III) in Anwesenheit von 0,1 E/ml FEIBA (Immuno, Österreich) und 16 mM CaCl₂ inkubiert. Alternativ konnte FVIIa auch als Aktivator, vorzugsweise in einer Endkonzentration von 0,2 µg/ml verwendet werden. Teilproben von 10 µl wurden in Zeitabständen entnommen und zu
20 300 µl chromogenem Substrat für Thrombin (D-Cyclohexyl-Gly-L-Ala-L-Arg-pNA; Immuno, Österreich), enthaltend 3 mM EDTA zum Stoppen jeglicher Reaktionen zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 75% (V/V) Essigsäure gestoppt, und die Absorption, die eine Funktion der Thrombinkonzentration ist, wurde bei 405 nm gemessen.

Zwei verschiedene vWF-Präparationen (enthaltend geringere und höhere Mengen an pro-vWF und
25 Propeptid) wurden zu den Faktor VIII-rekonstituierten Plasmaproben in einer Endkonzentration von 1 Risto E/ml zugegeben, und die Thrombinerzeugung wurde verfolgt. (1 Risto E/ml = die Ristocetin-Cofaktoraktivität des vWF in Normalplasma). So enthielten die Plasmaproben im Fall der Präparation mit geringem pro-vWF und geringem Propeptid 0,24 nM pro-vWF und 0,19 nM Propeptid, wogegen die andere 34 nM pro-vWF bzw. 4 nM Propeptid enthielt.

30 Die Ergebnisse sind in Fig. 1 dargestellt.

Aus den Kurven geht klar hervor, daß, obwohl beide Präparationen die Thrombinerzeugungsrate erhöhten, das viel pro-vWF und viel Propeptid enthaltende Produkt eine stärkere Wirkung hatte und die verbesserte Thrombinerzeugung ergab.

35 Beispiel 2. Die Wirkung von pro-vWF auf die Thrombinerzeugung im Plasma in Anwesenheit von Blutplättchen.

Die Wirkung einer rekombinanten vWF-Präparation, die mehr als 90% pro-vWF des gesamten vWF-Antigens enthielt, auf die Thrombinerzeugung wurde in dem in Beispiel 1 beschriebenen System unter-
40 sucht. Gewaschene Blutplättchen eines anderen Patienten mit schwerer vWD (Type III) und die isolierte Plasmaprobe desselben Patienten, mit 1 E/ml FVIII:C rekonstituiert, wurden in den Versuchen verwendet. Rekombinanter pro-vWF von 2 bzw. 5 vWF-Ag E/ml (1 Ag E = die vWF-Antigen-Menge in 1 ml Normalplasma) wurden zu den Plasmaproben zugegeben, und die Thrombinerzeugung wurde mit jener in Abwesenheit von vWF verglichen. Fig. 2 zeigt, daß über einer Schwelle von 2 vWF-Ag E/ml eine verstärkte
45 Thrombinerzeugung beobachtet wurde.

Beispiel 3. Vergleich des in-vivo-Effekts einer viel pro-vWF-enthaltenden rekombinanten mit einer von Plasma abstammenden vWF-Präparation.

50 Ein Hund mit vWF-Mangel (vWF-Antigen unter der Nachweisgrenze und Faktor VIII-Aktivität etwa 50% der normalen) wurde narkotisiert und mit 35 Risto E/ml des in Beispiel 2 verwendeten rekombinanten vWF, enthaltend mehr als 90% pro-vWF-infundiert. Vor der Infusion und 15, 30, 40 Minuten, 1, 2, 3, 6, 24, 48, 72 und 95 h nach der Infusion wurden Plasma-Proben genommen. 95 h später wurde eine von Plasma abstammende vWF-Präparation (Haemate HS - Behringwerke, Marburg, Deutschland) zugegeben, und
55 Plasmaproben wurden wieder in denselben Zeitintervallen nach der Infusion wie zuvor entnommen. Diese von Plasma abstammende vWF-Präparation enthielt weiters Faktor VIII:C, aber keinen pro-vWF und keinen pp-vWF. Die Plasmaproben wurden auf gesamtes vWF-Antigen (Asserachrom ELISA, Boehringer), pro-vWF und Propeptid-Antigen (gemäß Borchellini et al., Blood 88, 2951, 1996) analysiert, sowie auf das Thrombin-

erzeugungspotential, wie in Beispiel 1 beschrieben. Das Thrombinpotential ist als maximale Thrombinkonzentration, gemessen wie in Beispiel 1, definiert.

Fig. 3 zeigt die Korrelationen der verschiedenen Parameter, ausgedrückt als Prozent des Maximums, wobei die Anfangswerte als Null angenommen werden.

- 5 Das Thrombinpotential nahm parallel zum Ansteigen des Propeptids nach der Behandlung mit einer rekombinanten pro-vWF-Präparation zu. ELISA-Ergebnisse zeigten, daß einige Prozent pro-vWF nach 15 min im Blutkreislauf blieben, und es konnte nicht mehr nachgewiesen werden (Daten nicht angegeben), doch wurde ein signifikanter Anstieg an Propeptid und vWF beobachtet. Dagegen wurde kein Propeptid und auch kein wesentliches Thrombinpotential beim Hund nach der von Plasma abstammenden vWF-Infusion
10 trotz eines Anstiegs in der vWF-Antigen-Menge beobachtet.

Patentansprüche

1. Pharmazeutische Präparation zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine wirksame Menge an vWF-Propeptid enthält.
15
2. Präparation nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie im wesentlichen aus vWF-Propeptid besteht.
- 20 3. Präparation nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie den das vWF-Propeptid enthaltenden pro-vWF aufweist.
4. Präparation nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pro-vWF ein rekombinanter pro-vWF ist.
25
5. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie weiters ein Hämostase-Protein, vorzugsweise einen Blutfaktor, enthält.
6. Präparation nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Blutfaktor aus der Gruppe bestehend aus reifem vWF, Faktor VIII, aktivierten Blutgerinnungsfaktoren, Blutfaktoren mit FEIB-Aktivität und FEIBA ausgewählt ist.
30
7. Präparation nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pro-vWF mit Faktor VIII komplexiert ist.
35
8. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie weiters eine Thrombozytenkomponente, vorzugsweise zumindest eine von Kollagen, einem Blutplättchen-Glycoprotein, einem Blutplättchen, Fibrinogen, Fibrin, Heparin oder einem Derivat davon, enthält.
- 40 9. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie weiters Phospholipide enthält.
10. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie weiters virusinaktiv oder frei von Viren ist.
45
11. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie weiters einen pharmazeutisch akzeptablen Träger enthält.
12. Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß das vWF-Propeptid rekombinantes vWF-Propeptid ist.
50
13. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation, die eine wirksame Menge an vWF-Propeptid enthält, **dadurch gekennzeichnet**, daß es das Vorsehen eines das vWF-Propeptid enthaltenden Quellenmaterials, das Abtrennen des vWF-Propeptids vom Quellenmaterial und das Formulieren des vWF-Propeptids zu einer pharmazeutischen Präparation umfaßt.
55
14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß das vWF-Propeptid zur Inaktivierung oder Entfernung von Viren behandelt wird.

15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Quellenmaterial Plasma oder eine Plasmafraktion ist.
16. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Quellenmaterial aus einer Zellkultur erhalten wird.
17. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß das vWF-Propeptid durch rekombinante DNA-Technik hergestellt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß das vWF-Propeptid in einem pro-vWF enthalten ist.
19. Verfahren nach Anspruch 18, **dadurch gekennzeichnet**, daß der pro-vWF ein mutierter pro-vWF mit einer Mutation an der Schnittstelle des vWF - Propeptids ist.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß die pharmazeutische Präparation in Anwesenheit eines Inhibitors, der die Spaltung des vWF-Propeptids vom pro-vWF hemmt, erzeugt wird.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 20, **dadurch gekennzeichnet**, daß das vWF-Propeptid durch Chromatographie, vorzugsweise durch Affinitätschromatographie, vom Quellenmaterial getrennt wird.
22. Verfahren nach Anspruch 21, **dadurch gekennzeichnet**, daß für die Affinitätschromatographie Trägermaterialien mit für das vWF-Propeptid spezifischen Liganden verwendet werden.
23. vWF-Propeptid als Arzneimittel.
24. pro-vWF, enthaltend vWF-Propeptid, als Arzneimittel.
25. Verwendung von vWF-Propeptid und/oder das vWF-Propeptid enthaltendem pro-vWF zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung eines Patienten, bei welchem ein Risiko für Blutgerinnungsstörungen besteht.
26. Verwendung von vWF-Propeptid und/oder einer pro-vWF-Zusammensetzung zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von von Willebrand-Krankheit (vWD), phenotypischer Hämophilie, Hämophilie A und Faktor VIII-Inhibitoren.
27. Verwendung von pp-vWF oder pro-vWF zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation zur Verbesserung der Verträglichkeit pharmazeutischer vWF-Präparationen.
28. Verwendung von pp-vWF oder pro-vWF zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung oder Verhinderung der negativen Wirkungen von endogenem oder exogenem vWF, insbesondere erhöhten vWF-Mengen, die mit thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura, Henoch-Schönlein-Purpura, Präeklampsie, neonataler Thrombozytopenie oder hämolytisch-urämischem Syndrom, Myokardinfarkt oder einem schlechten Ergebnis nach einer Arterienoperation verbunden sind.

Hiezu 4 Blatt Zeichnungen

Fig. 1: Effekt von pro-vWF auf die Thrombinerzeugung im Plasma in Anwesenheit von Blutplättchen

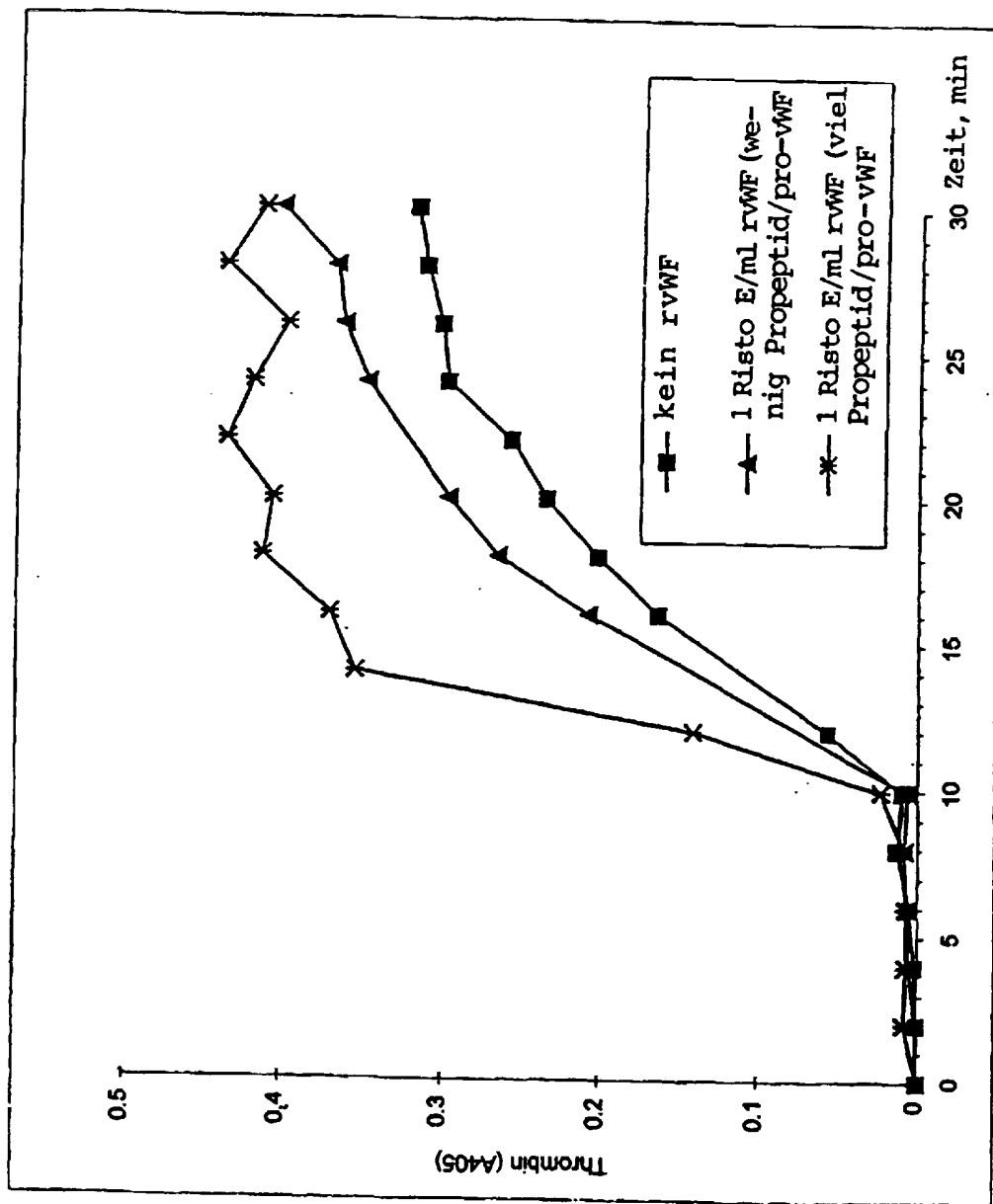


Fig 2: Dosis-abhängiger Effekt von pro-vWF auf die Thrombinerzeugung im Plasma in Anwesen-
 heit von Blutplättchen

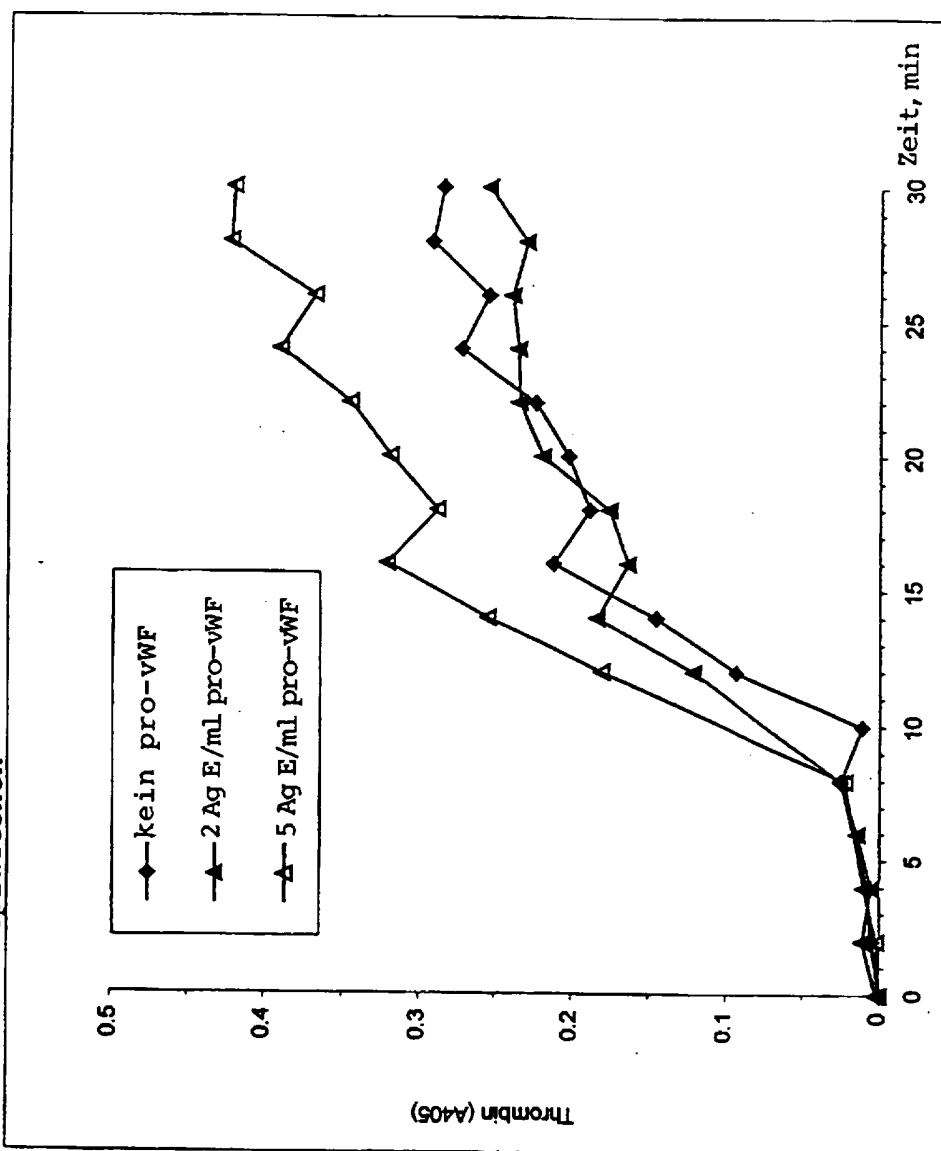


Fig. 3a Vergleich des in vivo-Effekts einer rekombinanten vWF- (pro-vWF)-
 und einer von Plasma stammenden vWF-Präparation bei einem Hund

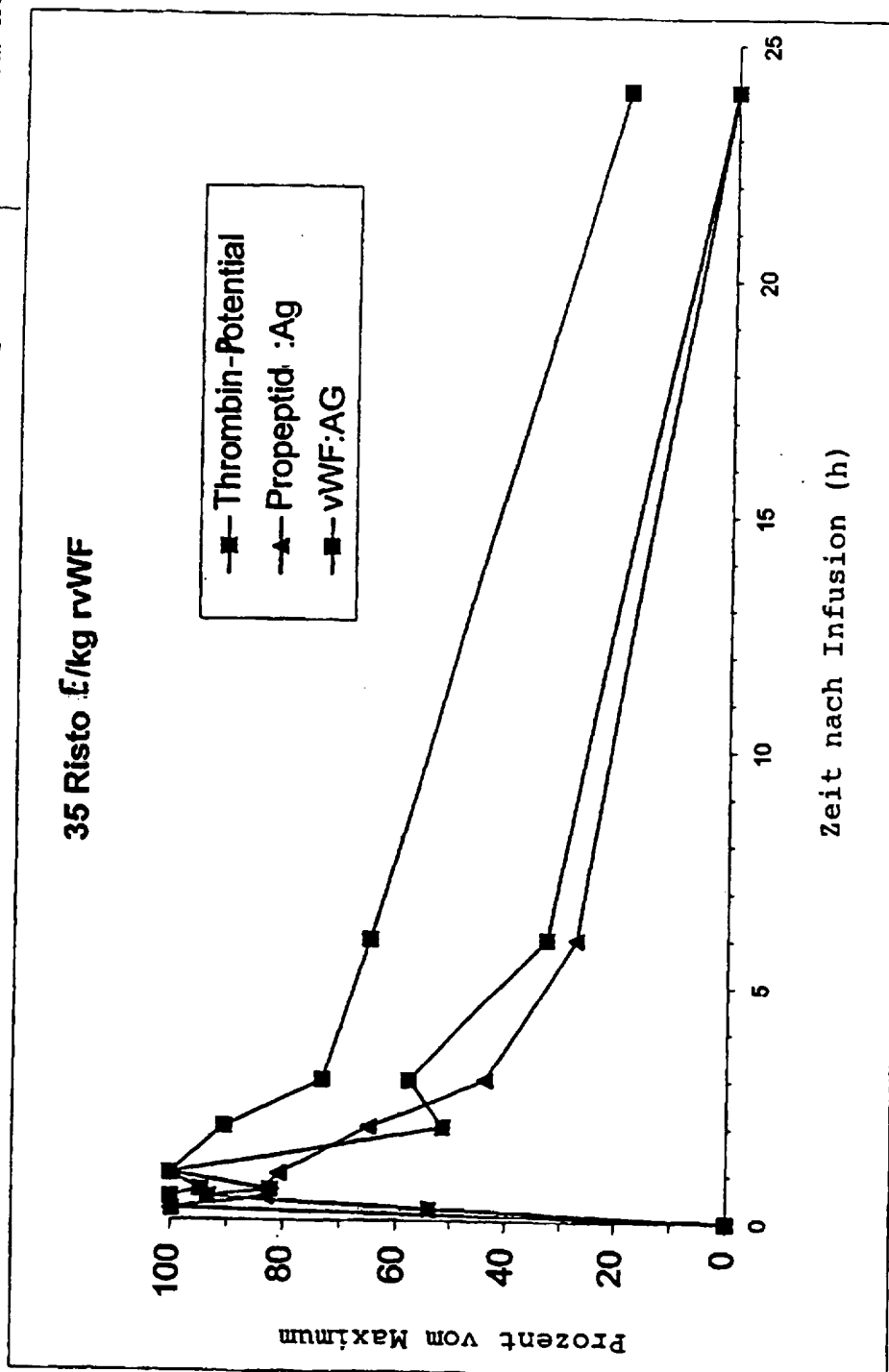


Fig. 3b

