


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation</b> <sup>6</sup> :  <b>C07K 16/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 99/02565</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 21. Januar 1999 (21.01.99)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/04090  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 2. Juli 1998 (02.07.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 29 591.6            10. Juli 1997 (10.07.97)            DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> THERASORB MEDIZINISCHE SYSTEME GMBH [DE/DE]; Edisonstrasse 6, D-85716 Unterschleißheim (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KOLL, Robert [DE/DE]; Heckenkirschenweg 4, D-85551 Kirchheim (DE). RICHTER, W.-O. [DE/DE]; Blumenstrasse 6, D-86949 Windach-Schöffelding (DE). BIEBER, Franz [DE/CA]; 6 Queen Street, Guysborough, Nova Scotia B0H 1N0 (CA). TSCHÖPE, W. [DE/DE]; Therasorb GmbH, Edisonstrasse 6, D-85716 Unterschleißheim (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
<b>(54) Title:</b> AGENT FOR THE TREATMENT AND/OR PROPHYLAXIS OF MICROCIRCULATION DISORDERS  <b>(54) Bezeichnung:</b> MITTEL ZUR BEHANDLUNG UND/ODER PROPHYLAXE VON MIKROZIRKULATIONSSTÖRUNGEN  <b>(57) Abstract</b>  The present invention concerns the use of a ligand for fibrinogen and/or fibrin in order to produce an agent for the treatment and/or prophylaxis of microcirculation disorders and/or for influencing the rheology of a mammal.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Liganden für Fibrinogen und/oder Fibrin zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen und/oder zur Beeinflussung der Rheologie eines Säugers.		

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Mittel zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines Liganden für Fibrinogen und/oder Fibrin zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen und/oder zur Beeinflussung der Rheologie eines Säugers.

Die Erfindung betrifft ferner eine Adsorbersäule, die eine Matrix und einen Liganden enthält, wobei der Ligand eine Spezifität für Fibrin und/oder Fibrinogen besitzt. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Beeinflussung der Mikrozirkulation eines Säugers und eine pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend einen Liganden für Fibrinogen und/oder Fibrin.

Es ist seit langem bekannt, daß bestimmte Störungen und Krankheitszustände mit einem Überschuß einer bestimmten Substanz im Blut eines Patienten assoziiert sind. Zum Beispiel sind bei der Hypercholesterolämie die Spiegel des Low Density Lipoproteins (LDL) im Patientenblut aufgrund eines genetischen Defekts im LDL-Rezeptor deutlich erhöht. Die Erhöhung des LDLs kann zur Entwicklung von Arteriosklerose in den Koronararterien eines Patienten führen, was unter Umständen einen frühen Herzinfarkt oder den Tod verursachen kann.

Auch bestimmte Autoimmun- und andere Erkrankungen sind mit erhöhten Spiegeln von Substanzen im Patientenblut verbunden. Es wird zum Beispiel angenommen, daß die Symptome von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel systemischer Lupus erythematosus (SLE), rheumatoide Arthritis, idiopathische Thrombozytopenie, Myasthenia gravis und Vaskulitis durch Autoantikörper und zirkulierende Immunkomplexe im Patientenblut ausgelöst werden, die gegen die eigenen Antigene des Patienten gerichtet sind. Es wurde daher angenommen, daß die Entfernung eines großen Teils des Immunglobulins von Patienten, einschließlich Autoantikörpern und zirkulierenden Immunkomplexen (CIC), zur Verbesserung der Symptomatik führen könnte und unter Umständen sogar zu einer Heilung.

Auch für Interferon wurde diskutiert, daß es eine pathogene Substanz im Blut von Patienten sein könnte, die an Autoimmunerkrankungen, einer Allergie oder einer Abstoßung von transplantiertem Gewebe leiden. Es wurde vorgeschlagen, daß Anti-

Interferon-Immunglobuline, die an einen festen Träger gekuppelt sind, die Entfernung von Interferon aus Blut solcher Patienten bewirken könnten.

Es ist daher möglich, bestimmte Autoimmunerkrankungen zu behandeln, indem ein großer Teil der Immunglobuline des Patienten unter Verwendung einer Säule, die mit gegen menschliches Immunglobulin gerichteten Antikörpern beladen ist. Die Verwendung solcher Säulen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wurde zum Beispiel in den folgenden Druckschriften offenbart: Schaumann D. et al., Nieren und Hochdruckkrankheiten Nr. 9, Sept. 1994; Knöbl P. et al., Thrombosis and Haemostasis, 74 (4), 1035-1038 (1995); Tribl B. et al., Ann. Hematology 71 (1995); Richter W.-O. et al., ASAIO Journal Vol. 41, No. 1, Suppl. P. 2 (1995); Schlee H. et al., Wiener Klinische Wochenschrift 108, Suppl. 1, 27 (1996); Dörffel et al., Zeitschrift für Kardiologie, Band 85, Suppl. 2, Abstr. 667 (1996).

Bei einer Transplantation ergibt sich ebenfalls ein Bedarf, bestimmte Substanzen aus dem Blut des Patienten zu entfernen. Im allgemeinen muß das transplantierte Organ immunologisch mit dem Empfänger übereinstimmen, um eine hyperakute Abstoßung des Donororgans zu verhindern. Wenn ein Donororgan transplantiert wird, gegen das der Empfänger Antikörper gebildet hat oder bildet, tritt eine Abstoßung des Donororgans kurz nach der Transplantation auf. Eine solche Reaktion tritt auf, wenn das eigene Immunsystem des Empfängers das transplantierte Organ innerhalb von Minuten bis typischerweise innerhalb von 48 Stunden nach der Transplantation attackiert und zerstört. Selbst wenn der Empfänger eine immunsuppressive Therapie erhält, kann diese schnelle Abstoßung nicht verhindert werden.

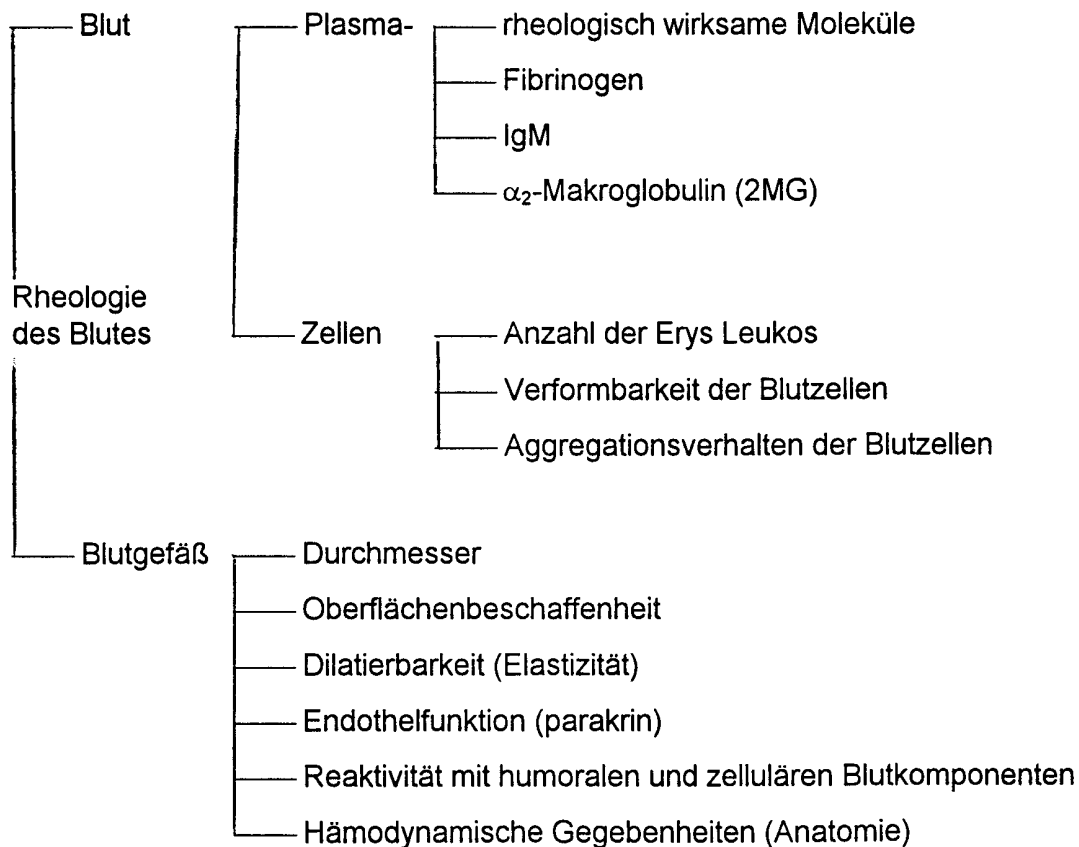
Es wurden daher Verfahren entwickelt, mit denen Anti-A/Anti-B-Antikörper aus dem Blut des Empfängers entfernt werden, wobei eine extrakorporale Perfusion des Plasmas des Empfängers über synthetische A/B-Blutgruppenantigene verwendet wurde, die kovalent an Silica gebunden waren.

Weiterhin gibt es eine ganze Reihe von Erkrankungen, denen eine Verschlechterung der Mikrozirkulation gemeinsam ist. Diese Veränderung kann primär die auslösende Ursache der Krankheit sein oder sie kann auf die Erkrankung folgen. In jedem Fall kann sie wesentlich zum klinischen Bild beitragen.

Die Ursache der verminderten Mikrozirkulation kann vom Gefäßsystem ausgehen, indem zum Beispiel entzündliche oder metabolische Veränderungen den Gefäßdurchmesser der Arteriolen, Kapillaren und Venolen reduzieren und damit die Mikro-zirkulation beeinträchtigen. Ebenso kann die Blutzusammensetzung die Mikro-zirkulation beeinflussen. Entscheidend sind hierbei die Viskosität des Plasmas und die Verformbarkeit der Erythrozyten. Auch bei Störungen der Makrozirkulation spielt die Blutzusammensetzung eine Rolle, entscheidend sind die Vollblutviskosität und die Erythrozytenaggregation.

Die Plasmaviskosität hängt von der Konzentration verschiedener Makromoleküle ab. Zum Beispiel beeinflussen Fibrinogen, IgM,  $\alpha_2$ -Makroglobulin, aber gering auch Chy-lomikronen, VLDL und LDL die Plasmaviskosität konzentrationsabhängig.

Die nachfolgende Übersicht zeigt die verschiedenen komplexen Bestandteile, die die Rheologie des Blutes und damit die Mikro-zirkulation beeinflussen:



Abgesehen von Herzinfarkt, koronarem Herztod oder Schlaganfall existieren eine Reihe anderer Erkrankungen, die mit Mikrozirkulationsstörungen einhergehen. Dazu gehört zum Beispiel der Typ-II-Diabetes. Die Patientengruppe der Diabetiker ist nicht zuletzt wegen der hohen Inzidenz und Prävalenz von Diabetes von erheblicher Bedeutung. Derzeit gibt es in der BRD etwa 4 Millionen Diabetiker. Etwa 15 bis 25 % haben oder entwickeln im Verlauf der Erkrankung Komplikationen, welche auf Mikrozirkulationsstörungen zurückzuführen sind.

Hierzu gehören zum Beispiel der diabetische Fuß, die Retinopathie, Polyneuropathien und beeinträchtigte Nierenfunktion. Die Bedeutung zum Beispiel des diabetischen Fußes läßt sich bereits aus der Tatsache ablesen, daß es in den USA Kliniken gibt, die sich ausschließlich auf die Therapie des diabetischen Fußes spezialisiert haben.

Weitere Krankheiten, die mit Mikrozirkulationsstörungen einhergehen, sind insbesondere die arterielle Verschlusskrankheit, Hörsturz und Sepsis. Die folgende Auflistung zeigt Krankheiten, die mit Mikrozirkulationsstörungen einhergehen können:

ZNS	Schlaganfall TIA (Transient Ischemic Attack) PRIND (Prolonged Reversible Ischemic Neurological Deficit) Chronische vaskuläre Erkrankungen des ZNS Chronische intracranielle Durchblutungsstörungen Chronische extracranielle Durchblutungsstörungen Zerebrovaskuläre Durchblutungsstörungen Demenz Alzheimer Krankheit Schwerer zentraler Schwindel
Auge	Chronische Durchblutungsstörung Akuter Gefäßverschluss
Ohr	Hörsturz Innenohr bedingter Schwindel

## Morbus Menière

Lunge	Primäre Pulmonale Hypertonie Venoocclusive Erkrankungen der Lunge Thrombotische primäre pulmonale Hypertonie Thromboembolische Erkrankungen der großen Gefäße
Herz	Transplantationsvaskulopathien Akuter Myokardinfarkt Instabile Angina pectoris Small vessel disease des Herzens Nicht operable schwere koronare Herzkrankheit Kardiomyopathien
Abdomen	Angina abdominalis
Nieren	Vaskulopathien der Nieren Glomerulonephritiden Chronische Niereninsuffizienz

Periphere arterielle Verschlusskrankheiten

Akute Gefäßverschlüsse

Vaskulitiden

Septischer Schock

Disseminierte intravaskuläre Coagulation (DIC) anderer Genese, z.B. bei Tumorerkrankungen

Diabetes Typ I + II

Diabetische Retinopathie

Diabetische Neuropathie

Diabetische Nephropathie

Die Behandlungsmöglichkeiten für die oben genannten Krankheiten, insbesondere für die dabei beteiligten Mikrozirkulationsstörungen, sind bis jetzt beschränkt.

Beispielsweise wurde die diabetische Gangrän bislang rein symptomatisch behandelt (Bettruhe, gute Blutzuckereinstellung, supportive Therapie). Venöse Thromboembolien werden mit Heparin oder Fibrinolysetherapie behandelt. Beim Schlaganfall kann z.B. Aspirin eingesetzt werden, das über die Hemmung der Aggregation von Blutplättchen wirkt. Der Schock wird beispielsweise mit adrenergen Mitteln, z.B. Epinephrin behandelt. Allen diesen Mitteln ist es jedoch gemeinsam, daß sie weder geeignet sind zu einer wirklich effektiven Vorbeugung noch daß sie zufriedenstellende Ergebnisse bei der Behandlung zeigen.

Es war daher eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine wirksame Möglichkeit zu schaffen, mit der Mikrozirkulationsstörungen und die Rheologie des Blutes behandelt und beeinflußt werden können. Es ist eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine Adsorbersäule anzugeben, die für eine Beeinflussung der Mikrozirkulation eines Säugers verwendet werden kann. Weiterhin ist es eine Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Beeinflussung der Mikrozirkulation eines Säugers anzugeben. Schließlich ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine pharmazeutische Zusammensetzung anzugeben, die geeignet ist zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen.

Diese Aufgaben werden durch die in den unabhängigen Ansprüchen genannten Gegenstände gelöst. Vorteilhafte Weiterbildungen sind in den Unteransprüchen angegeben.

Gemäß dem Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung wird ein Ligand für Fibrinogen und/oder Fibrin zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen und/oder zur Beeinflussung der Rheologie eines Säugers verwendet.

Ligand bedeutet in diesem Zusammenhang eine Substanz, die spezifisch an Fibrin und/oder Fibrinogen bindet, vorzugsweise ist die Bindung reversibel.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Liganden um ein Peptid, wobei dieses wiederum vorzugsweise 3 bis 10 Aminosäuren aufweist. Besonders bevorzugt enthält das Peptid die folgende Aminosäuresequenz:

Gly-Pro-Arg-Pro-X,

wobei X eine beliebige Aminosäure wie z.B. Lysin oder poly-Lysin oder ein Spacer sein kann.

Als Spacer kommen beispielsweise  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure oder 6-C-Moleküle in Betracht.

Als besonders geeignet hat sich die folgende Aminosäuresequenz für das Peptid erwiesen:

Gly-Pro-Arg-Pro-Lys.

Weitere geeignete Sequenzen sind:

Gly-Pro-Arg-X

Gly-Pro-Arg-Ser-NH<sub>2</sub>

Gly-Pro-Arg-Val-NH<sub>2</sub>

Arg-Gly-Asp-NH<sub>2</sub>

Glu-His-Ile-Pro-Ala-NH<sub>2</sub>

Gly-Pro-Arg-Pro-Glu-Arg-His-Glu-Ser-NH<sub>2</sub>

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann der Ligand ein Antikörper sein. Er kann ausgewählt werden aus polyklonalen und monoklonalen Anti-Fibrinogen-Antikörpern und Anti-Fibrin-Antikörpern.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist der Säuger ein Mensch.

Weiterhin kann der Ligand in dem Mittel an eine feste Matrix gebunden sein, wobei die Matrix aus Glas, Kohlenhydrate, Polymethacrylate und Polyamiden ausgewählt sein kann.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Matrix Sepharose.

Die Matrix kann aus Kügelchen, Fasern und/oder eine Membran bestehen.

Die Krankheiten, die mit Mikrozirkulationsstörungen einhergehen, können zum Beispiel Diabetes, Rhetinopathie, Polyneuropathie, Apoplex, Hörsturz, Sepsis, arterielle Verschlusskrankheiten und/oder eine beeinträchtigte Nierenfunktion sein.

Weiterhin ist die vorliegende Erfindung auf eine Adsorbersäule gerichtet, die eine Matrix und einen Liganden enthält, wobei der Ligand eine Spezifität für Fibrin und/oder Fibrinogen besitzt. Vorzugsweise ist der Ligand das Peptid mit der Aminosäuresequenz



wobei X jede beliebige Aminosäure oder ein Spacer sein kann, und besonders bevorzugt ein Peptid mit der Aminosäuresequenz



Die Matrix in der Adsorbersäule ist vorzugsweise Sepharose. Die Herstellung der Adsorbersäule kann beispielsweise gemäß WO 95/31727 erfolgen.

Weiterhin ist die vorliegenden Erfindung auf ein Verfahren zur Beeinflussung der Mikrozirkulation eines Säugers gerichtet, wobei in vitro Blut oder Plasma des Säugers in die oben beschriebene Säule geführt wird. Als bevorzugtes Verfahren wird ein Aphereseverfahren durchgeführt, bei dem in einem Kreislauf dem Patienten Blut entnommen, dieses in Blutzellen und Plasma aufgetrennt und über die Adsorbersäule geleitet und anschließend dem Patienten wieder zurückgeführt wird.

Schließlich ist die vorliegende Erfindung auf eine pharmazeutische Zusammensetzung gerichtet, die einen Liganden für Fibrinogen und/oder Fibrin enthält. Durch die vorliegende Erfindung wird es möglich, Blut eines Patienten mit Mikrozirkulationsstörungen über eine Säule zu führen, die beispielsweise als Matrix Sepharose und als Liganden das oben genannte Peptid enthält und dadurch Fibrinogen und/oder Fibrin aus dem Blut zu entfernen. Das Blut kann anschließend zum Patienten zurückgeleitet werden, woraufhin sich dessen Fibrinogen und/oder Fibringehalt im Blut deutlich verringert. Es wurde gefunden, daß ein verringerter Fibrinogen- und/oder Fibringehalt im Blut direkt mit einer Verringerung von Mikrozirkulationsstörungen und damit einer Verbesserung der jeweiligen Krankheitssymptome einher geht.

Eine hemorheologisch wirksame Absenkung der Gesamtfibrinogenmenge im Blut bedeutet eine deutliche Verbesserung der Situation und trägt erheblich zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen bei. Dies bedeutet in der Regel einen Zielwert von 50 bis 100 mg/dl des Patientenbluts oder eine zu entfernende Fibrinogenmenge von 12 bis 13,5 g pro Patient im Durchschnitt. Daher sollte ein Adsorber im Doppelsäulenprinzip etwa 2,5 bis 3 g Bindungskapazität aufweisen.

Die oben genannten Werte ergeben sich aus durchschnittlichen hohen Fibrinogenkonzentrationen von ca. 500 mg/dl und einem angenommenen Plasmavolumen von 3l, damit errechnet sich eine Gesamtfibrinogenmenge von ca. 15 g.

Gemäß der vorliegenden Erfindung werden eine oder zwei Adsorbersäulen eingesetzt, mit welchen die oben genannte Absenkung erzielt werden kann.

Wegen der zu erwartenden hohen Mengen des zu absorbierenden Fibrinogens wird vorzugsweise das Doppelsäulenprinzip angewendet, um

- die Größe des Adsorbers zu limitieren,
- die Kosten des Adsorbermaterials zu senken, und
- dadurch die zu behandelnde Plasmamenge unbegrenzt ist.

Durch den direkt mit dem Patienten verbundenen Kreislauf und der Anwendung des Doppeladsorberprinzips mit abwechselnder Beladung und Regeneration der Adsorber kann die Plasmamenge desorbiert werden, welche zur gewünschten Fibrinogenabsenkung führt. Diese Plasmabeladungsmenge sollte in der Regel nicht mehr als die 1,5- bis 2-fache Plasmamenge des Patienten darstellen.

Vorzugsweise wird eine Adsorbergröße von weniger als 200 ml verwendet.

Als Adsorbermaterial kommen die oben genannten Materialien in Frage, wobei besonders Sepharose und Membranen bevorzugt werden.

An den Liganden ist die Anforderung zu stellen, daß er eine hohe Affinität zu Fibrinogen aufweist und zu einer maximalen unspezifischen Absenkung von 10 bis 20 % pro Sitzung von Gerinnungsfaktoren, IgG, IgA, Albumin, Enzymen und Hormonen führt, wobei eine gleichzeitige Absorption von IgM, Makroglobulin, VLDL und LDL ebenfalls günstig ist. Diese liegt jedoch immer deutlich unter der prozentualen Fibrinogenabsenkung wegen des dadurch zu erwartenden günstigen rheologischen Effektes.

Eine durch Substitutionslösungen bewirkte geringe Hämodilution wirkt sich ebenfalls günstig auf die hämorheologischen Parameter aus.

Das Peptid mit der Aminosäuresequenz

Gly-Pro-Arg-Pro-Lys

weist eine sehr hohe Spezifität für Fibrinogen und/oder Fibrin auf.

Weitere Anforderungen an eine Adsorbersäule sind, daß es sich um ein Material handeln sollte, das einfach sterilisierbar sein sollte.

Im folgenden soll der Gegenstand der vorliegenden Erfindung im Hinblick auf die folgenden Beispiele im einzelnen beschrieben werden.

## BEISPIELE

### Beispiel 1 und 2

Das Pentapeptid Gly-Pro-Arg-Pro-Lys wurde als Trifluoracetat synthetisiert und an Cyanbromid-aktive Sepharose CL-4B gekoppelt. Die Spezifität der gekoppelten Sepharose wurde mittels SDS-Gelelektrophorese getestet. Das in den Säulen retendierende und anschließend eluierte Material und die Fibrinogenstandardpräparation wiesen identische Banden auf.

Mit der Peptid-gekoppelten Sepharose wurden Adsorptionssäulen hergestellt. Pro Säule wurden 3 g Sepharose (Naßgewicht) eingesetzt. Die Säulen wurden zuerst mit PBS und dann mit isotonischer Kochsalzlösung vorgespült und dann mit heparinisiertem Plasma (40 ml) beladen. Nach der Säule wurde das Plasma in Fraktionen von je 3 ml aufgefangen und in diesen Proben die Messung der Konzentration verschiedener Plasmakomponenten und der Plasmaviskosität vorgenommen. Anschließend wurden die Säulen mit Glycin-HCl-Puffer (pH 2,8) beladen und dadurch das gebundene Fibrinogen eluiert. Nach Beladung mit PBS und isotonischer Kochsalzlösung konnten die Säulen erneut beladen werden.

### Messmethoden:

Plasmaviskosität wurde bei 37°C mit einem Contraves 30 low shear Rotationsviskosimeter gemessen.

Fibrinogen und Immunoglobuline wurden mit einem Behring Laser Nephelometer immunnephelometrisch gemessen. Cholesterin und Triglyceride wurden enzymatisch bestimmt (Epos Autoanalyzer, Eppendorf, mit Reagenzien von Boehringer).

### Beispiel1

Die folgende Tabelle zeigt den Einfluß des Fibrinogenadsorbers auf die Plasmakonzentration von Fibrinogen und Cholesterin sowie den daraus resultierenden Effekt auf die Plasmaviskosität (n=7)

TABELLE 1

Fraktion	Fibrinogen (g/L)	Cholesterin (mmol/L)	Plasmaviskosität (mPas)
Plasma	3,31 ± 0,20	6,40 ± 0,23	1,27 ± 0,02
1	0,94 ± 0,16	6,23 ± 0,17	1,17 ± 0,01
2	1,27 ± 0,17	6,29 ± 0,17	1,17 ± 0,01
3	1,49 ± 0,17	6,31 ± 0,16	1,18 ± 0,01
4	1,60 ± 0,15	6,32 ± 0,19	1,19 ± 0,01
5	1,81 ± 0,17	6,32 ± 0,18	1,20 ± 0,02
6	1,87 ± 0,16	6,29 ± 0,19	1,20 ± 0,02

Die folgende Tabelle zeigt den Einfluß des Fibrinogenadsorbers auf die Plasmakonzentration von Fibrinogen und Triglyzeriden sowie den daraus resultierenden Effekt auf die Plasmaviskosität (n=7).

TABELLE 2

Fraktion	Fibrinogen (g/L)	Cholesterin (mmol/L)	Plasmaviskosität (mPas)
Plasma	4,29 ± 0,79	19,13 ± 7,04	1,42 ± 0,06
1	1,62 ± 0,70	16,28 ± 5,15	1,03 ± 0,05
2	1,90 ± 0,86	17,41 ± 5,86	1,22 ± 0,04
3	2,26 ± 0,92	17,54 ± 5,93	1,32 ± 0,05
4	2,52 ± 0,92	17,83 ± 5,97	1,34 ± 0,05
5	2,69 ± 0,90	18,12 ± 6,01	1,35 ± 0,05
6	2,85 ± 0,92	16,52 ± 5,15	1,33 ± 0,05

In beiden Versuchen korrelierte die Fibrinogenabsenkung hochsignifikant mit der Plasmaviskosität (Paired sample t test).

### Beispiel 2

In gleicher Weise hergestellte Säulen, welche statt des Pentapeptids einen polyklonalen anti-human-Immunglobulin-Antikörper vom Schaf gekoppelt an Sepharose CL-4B aufweisen (spezifische Bindung von humanen IgG- alle 4 Subklassen -, IgM, IgA, Immunkomplexe, Bruchstücke von Immunglobulinen) zeigten ebenfalls einen Einfluß

auf die Plasmaviskosität, der jedoch deutlich geringer war als mit dem Fibrinogenadsorber.

Die folgende Tabelle faßt die Ergebnisse zusammen (n=7).

TABELLE 3

Einfluß eines Immunglobulinadsorbers auf die Plasmakonzentration von  
Fibrinogen, Cholesterin, IgG, IgA, IgM  
sowie der daraus resultierende Effekt auf die Plasmaviskosität

Fraktion	Fibrinogen (g/L)	Cholesterin (g/L)	IgG (g/L)	IgA (g/L)	IgM (g/L)	Plasmaviskosität (mPas)
Plasma	3,21 ± 0,20	6,40 ± 0,23	11,80 ± 0,43	2,96 ± 0,22	1,89 ± 0,25	1,27 ± 0,02
1	3,10 ± 0,20	6,25 ± 0,22	7,72 ± 0,73	2,77 ± 0,30	1,71 ± 0,27	1,21 ± 0,01
2	3,15 ± 0,21	6,30 ± 0,16	9,97 ± 0,57	2,87 ± 0,24	1,75 ± 0,28	1,24 ± 0,01
3	3,13 ± 0,21	6,28 ± 0,18	10,75 ± 0,51	2,88 ± 0,24	1,80 ± 0,29	1,25 ± 0,02
4	3,11 ± 0,20	6,25 ± 0,17	10,99 ± 0,45	2,83 ± 0,22	1,79 ± 0,29	1,24 ± 0,02
5	3,10 ± 0,20	6,30 ± 0,18	11,36 ± 0,45	2,85 ± 0,22	1,81 ± 0,29	1,25 ± 0,02
6	3,10 ± 0,19	6,17 ± 0,21	11,42 ± 0,44	2,86 ± 0,20	1,81 ± 0,30	1,25 ± 0,02

Eine signifikante Veränderung in der Plasmaviskosität wird nur in Fraktion 1 und 2 gesehen und korrespondiert mit den niedrigsten IgG-Werten.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Therasorb Medizinische Systeme GmbH
- (B) STRASSE: Edisonstr.6
- (C) ORT: Unterschleissheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 85716

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Mittel zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly Pro Arg Pro Xaa  
1 5

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Gly Pro Arg Pro Lys  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Gly Pro Arg Xaa  
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- (ix) MERKMAL:  
(A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Aminosäure  
(B) LAGE:C-terminal  
(D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "die c-terminale  
Aminosäure trägt eine Säureamidgruppe als  
Endgruppe"  
/label=NH2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Gly Pro Arg Ser  
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM:  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Aminosäure
- (B) LAGE:C-terminal
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "die c-terminale Aminosäure trägt eine Säureamidgruppe als Endgruppe"  
/label=NH2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Gly Pro Arg Val  
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 3 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM:
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Aminosäure
- (B) LAGE:C-terminal
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "die c-terminale Aminosäure trägt eine Säureamidgruppe als Endgruppe"  
/label=NH2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Arg Gly Asp  
1

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM:
  - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Aminosäure
- (B) LAGE:C-terminal
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "die c-terminale Aminosäure trägt eine Säureamidgruppe als Endgruppe"  
/label=NH2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Glu His Ile Pro Ala  
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM:
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: modifizierte Aminosäure
- (B) LAGE:C-terminal
- (D) SONSTIGE ANGABEN:/product= "die c-terminale Aminosäure trägt eine Säureamidgruppe als Endgruppe"

/label=NH2

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Gly Pro Arg Pro Glu Arg His Glu Ser  
1 5

Patentansprüche

1. Verwendung eines Liganden für Fibrinogen und/oder Fibrin zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Mikrozirkulationsstörungen und/oder zur Beeinflussung der Rheologie eines Säugers.

2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ein Peptid ist, vorzugsweise mit 3 bis 10 Aminosäuren.

3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid die folgende Aminosäuresequenz enthält:

Gly-Pro-Arg-Pro-x

wobei x jede beliebige Aminosäure oder ein Spacer sein kann.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei das Peptid die folgende Aminosäuresequenz aufweist:

Gly-Pro-Arg-Pro-Lys.

5. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ein Antikörper ist.

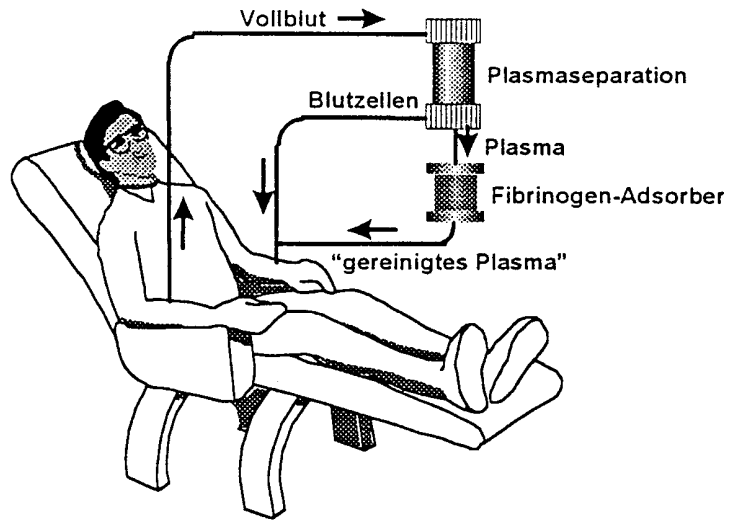
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Säuger ein Mensch ist.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand ausgewählt wird aus polyklonalen und monoklonalen Anti-Fibrinogen-Antikörpern und Anti-Fibrin-Antikörpern.

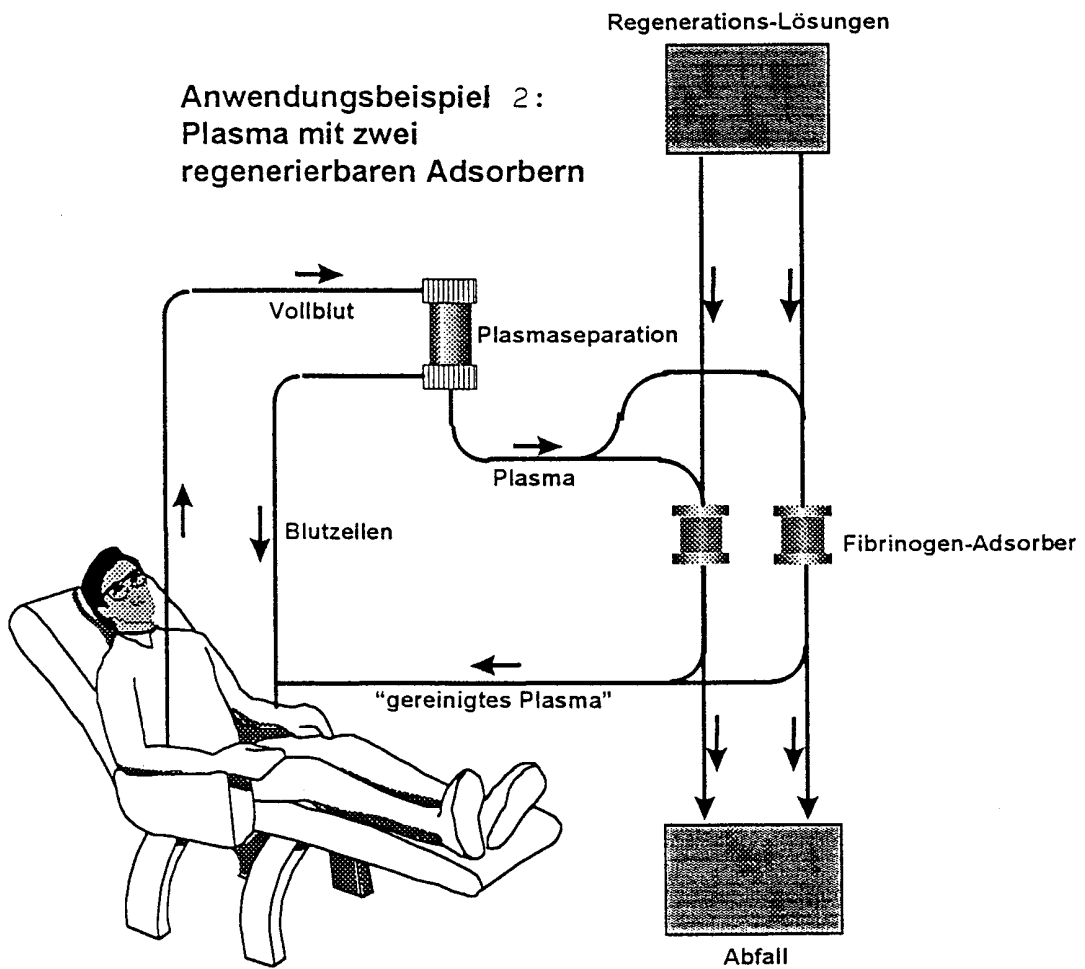
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligand in dem Mittel an eine feste Matrix gebunden ist.

9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix ausgewählt wird aus Glas, Kohlenhydraten, Polymethacrylaten und Polyamiden.
10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix Sepharose ist.
11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix aus Kügelchen, Fasern und/oder einer Membran besteht.
12. Verwendung nach einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikrozirkulationsstörung im Zusammenhang mit Diabetes, Retinopathie, Polyneuropathie, Apoplex, Hörsturz, Sepsis, arteriellen Verschlusskrankheiten und/oder beeinträchtigter Nierenfunktion auftritt.
13. Adsorbersäule, enthaltend eine Matrix und einen Liganden, wobei der Ligand eine Spezifität für Fibrin und/oder Fibrinogen besitzt.
14. Adsorbersäule nach Anspruch 13, wobei der Ligand das Peptid wie in einem der Ansprüche 3 oder 4 angegeben ist.
15. Adsorbersäule nach Anspruch 13 oder 14, wobei die Matrix Sepharose ist.
16. Verfahren zur Beeinflussung der Mikrozirkulation eines Säugers, wobei in vitro Blut des Säugers über die Säule gemäß Anspruch 13, 14 oder 15 geführt wird.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es als Aphereseverfahren im Plasma oder Vollblut durchgeführt wird.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend einen Liganden für Fibrinogen und/oder Fibrin.

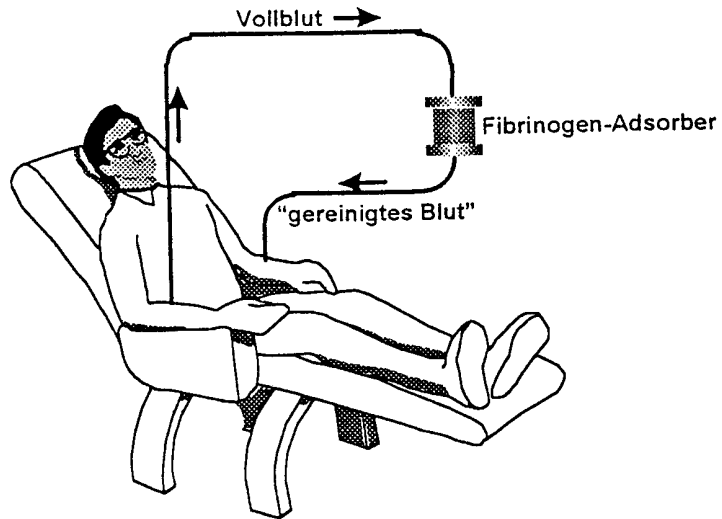
Anwendungsbeispiel 1:  
Plasma mit einem Adsorber



Anwendungsbeispiel 2:  
Plasma mit zwei regenerierbaren Adsorbern



Anwendungsbeispiel 3:  
Blut mit einem Adsorber



Anwendungsbeispiel 4:  
Blut mit zwei regenerierbaren Adsorbern

