



(19)

REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer:

AT 407 116 B

(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer:

1573/96

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

(22) Anmeldetag:

04.09.1996

(42) Beginn der Patentdauer:

15.05.2000

(45) Ausgabetag:

27.12.2000

(56) Entgegenhaltungen:

EP 0549964A2

(73) Patentinhaber:

IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1221 WIEN (AT).

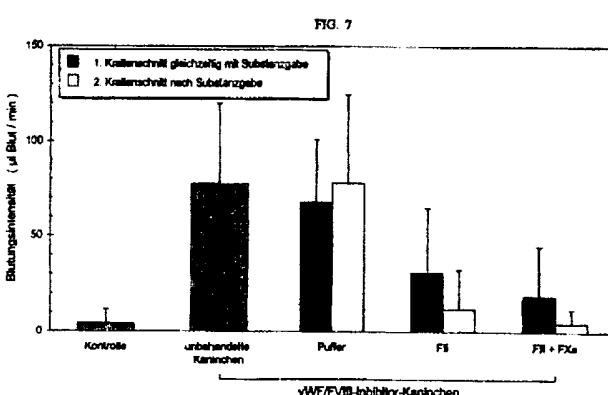
(72) Erfinder:

TURECEK PETER DR.  
KLOSTERNEUBURG/WEIDLING,  
NIEDERÖSTERREICH (AT).  
SCHWARZ HANS-PETER  
WIEN (AT).  
EIBL JOHANN DR.  
WIEN (AT).

## (54) PHARMAZEUTISCHES PRÄPARAT ZUR BEHANDLUNG VON BLUTGERINNUNGSSTÖRUNGEN

AT 407 116 B

(57) Beschrieben wird ein pharmazeutisches Präparat zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, welches gereinigte Prothrombinase-Faktoren, insbesondere gereinigtes Prothrombin und gegebenenfalls gereinigten Faktor Xa, als aktive Komponente enthält.



Die vorliegende Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat, insbesondere zur Behandlung von Bluterinnungsstörungen, enthaltend Gerinnungsfaktoren, die Bestandteil einer Prothrombinase bzw. Pro-Prothrombinase sind.

Die Prothrombinase ist ein Enzym-Substratkomplex, der sich an einer Phospholipidoberfläche bildet und die Aktivierung von Prothrombin ermöglicht. Die Prothrombinase besteht definitionsgemäß aus dem Faktor II (Prothrombin), dem aktivierte Faktor X (Faktor Xa), dem Kofaktor V bzw. Va, Phospholipiden und Calciumionen. Diese Faktoren liegen in vivo als transienter Komplex zur Aktivierung des Prothrombins und Bildung des Thrombins vor.

Eine entsprechende Pro-Prothrombinase ist als Komplex von Faktoren definiert, die zumindest teilweise modifiziert bzw. aktiviert zur Bildung einer Prothrombinase vorliegen. Die Pro-Prothrombinase ist daher als Komplex zu verstehen, bei welchem eine oder mehrere Komponenten in ihren Vorstufen, als Zymogene oder als Proformen vorliegen und der aufgrund von Affinitäten der Komponenten zueinander gebildet wird.

Haemophilie A entsteht durch einen X-chromosomal-rezessiv-erblichen Mangel an Faktor VIII und manifestiert sich in schweren Bluterinnungsstörungen. Zur aktuellen Blutstillung werden meist gerinnungssitive Plasmakonzentrate eingesetzt, vorwiegend Faktor VIII-Konzentrate. Bei der klassischen Behandlung von Haemophilie A-Patienten mit Faktor VIII-Präparaten kommt es in rund 20 % der Fälle jedoch zur Bildung von Antikörpern gegen Faktor VIII, welche zu einer Inhibition der Wirkung der verabreichten Faktor VIII-Präparate führen. Man spricht dann davon, daß ein Patient einen funktionellen Inhibitor gegen Faktor VIII gebildet und eine sogenannte Faktor VIII-Hemmkörperhaemophilie entwickelt hat.

Für die Therapie von Haemophilie A-Patienten mit einer Faktor VIII-Hemmkörperhaemophilie werden gegenwärtig mehrere Methoden angewendet:

25 1.) Behandlung mit hohen Dosen eines Faktor VIII-Präparates:

Damit wird der gegen Faktor VIII gerichtete Antikörper in vivo neutralisiert, und der überschüssige Faktor VIII kann seine haemostatische Cofaktoraktivität entfalten. Durch wiederholte Verabreichung über einen längeren Zeitraum wird der betroffene Patient gegen Faktor VIII desensibilisiert und kann anschließend in vielen Fällen der üblichen Faktor VIII-Konzentrattherapie unterzogen werden. Diese Vorgangsweise benötigt außerordentlich große Mengen Faktor VIII, ist zeitaufwendig und kann zu Beginn der Behandlung mit massiven anaphylaktischen Nebenwirkungen behaftet sein.

35 2.) Behandlung von Faktor VIII-Inhibitorpatienten mit Immunglobulinpräparaten, die antiidiotypische Faktor VIII-Antikörper enthalten:

Dieser Therapieweg ist derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Für die Effizienz einer solchen Behandlung besteht heute noch keine abschließende Beurteilungsmöglichkeit.

40 3.) Immunadsorption:

Eine weitere aufwendige Methode zur Entfernung der Faktor VIII-Inhibitoren ist die extrakorporale Immunabsorption an entweder Lektine, die Immunglobuline binden (Protein A, Protein G), oder immobilisierten Faktor VIII, an welchem der gegen Faktor VIII gebildete Antikörper gebunden wird. Diese Methode ist für den Patienten aufwendig, weil er dabei an eine Apheresemaschine gebunden ist, kann so wie die vorangegangenen zu keiner Stillung einer akuten Blutung führen und ist außerdem teuer.

50 4.) APCC und Derivate:

Therapie der Wahl ist derzeit die Gabe von aktivierte Prothrombinkomplexbekonzentraten (APCC), FEIBA, AUTOPLEX, die bei Patienten auch mit hohem Hemmkörpertiter zur Stillung akuter Blutungen eingesetzt werden können (siehe z.B. DE-PS 31 27 318 (2)).

Basierend auf den aktivierte Prothrombinkomplexfaktoren-Konzentraten wurde ein

Bestandteil, welcher in diesen u.a. auch enthalten ist, nämlich aktiver Faktor VIIa, als therapeutisches Prinzip für Faktor VIII-Inhibitorpatienten über den Weg der extrinsischen Gerinnung vorgeschlagen. Ein entsprechendes Präparat, nämlich rekombinanter Faktor VIIa, ist derzeit in klinischer Erprobung (Hedner et al., Transfusion Medicine Reviews 7 (2): 78-83 (1993)).

- 5 Präklinische Untersuchungen, z.B. an Hunden mit Haemophilie A, haben jedoch gezeigt, daß die Behandlung mit rekombinantem Faktor VIIa ineffektiv ist. Ähnlich ist auch die Erfolgsrate in der Humananwendung nur schwankend. Ein weiterer Nachteil des rekombinanten Faktor VIIa besteht darin, daß dieser aufgrund seiner kurzen *in vivo*-Halbwertszeit oftmals in hohen Dosen pro Tag gegeben werden muß, um schwere Blutungen, wenn überhaupt, beherrschen zu können. In solchen Fällen wird versucht, Faktor VIIa gemeinsam mit Antifibrinolytika zu verabreichen, um die Wirkung zu unterstützen.

In der Literatur (z.B. DE 44 16 180 A1) wurde auch vorgeschlagen, eine Kombination von Faktor Xa und Phospholipid therapeutisch zur Behandlung von Haemophilie A-Inhibitorpatienten einzusetzen. *In vivo*-Versuche an Faktor VIII-defizienten Hunden mit Inhibitor zeigen, daß eine derartige Kombination in einer geeigneten Dosierung in der Lage ist, eine akute Blutung zu stillen. Die therapeutische Breite eines solchen Präparates ist jedoch verhältnismäßig gering, weil die effektive und die thrombogene Dosis, was z.B. im Wessler-Modell im Kaninchen gezeigt werden kann, eng beieinander liegen, da insbesondere Phospholipide ein erhöhtes Thrombogenitäts-Risiko darstellen.

- 20 Aus der EP 0 549 964 A2 ist die Herstellung eines Prothrombinkomplex (PPSB)-Präparates durch Aufreinigung eines Gemisches am Faktor II, Faktor VII, Faktor IX und Faktor X an Plasma bekannt. Hierbei wird allerdings nur der Prothrombinkomplex als solcher, also als Gerinnungsfaktoren-Gemisch, aufgereinigt, nicht jedoch ausgehend von hochgereinigten Einzelfaktoren zu einem Kombinationspräparat vereinigt.

- 25 Die vorliegende Erfindung stellt sich daher zur Aufgabe, die Nachteile der geschilderten Methoden zu vermeiden und ein Therapieprinzip für die Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, insbesondere für die Behandlung von Faktor VIII-Hemmkörperhaemophilie, zur Verfügung zu stellen, welches u.a. eine einfache Anwendung, einen effektiven Wirkungseintritt, eine verlängerte Halbwertszeit sowie eine Vermeidung von thrombogenen Nebenwirkungen ermöglicht.

- 30 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß mit einer pharmazeutischen Gerinnungsfaktor-Präparation zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, enthaltend mindestens zwei hochgereinigte Einzelfaktoren, die Bestandteile einer Prothrombinase oder Pro-Prothrombinase und frei von Phospholipiden sind, als aktive Komponenten, insbesondere mit einer Präparation enthaltend gereinigtes Prothrombin und gereinigten Faktor Xa als aktive Komponenten, gelöst, wobei vorzugsweise einer der Faktoren aktiviert ist. Die Komponenten sind zumindest so weit gereinigt, daß sie von endogenen, d.h. aus dem Ausgangsmaterial stammenden, Phospholipiden, insbesondere von Phospholipidvesikeln, befreit sind.

- 35 Damit wird einerseits eine vorzeitige Thrombinbildung unterbunden und die Stabilität der pharmazeutischen Präparation gewährleistet und andererseits das Risiko von thromboembolischen Nebenwirkungen minimiert.

Ein Gemisch bzw. Komplex aus mindestens zwei Bestandteilen der Prothrombinase wird erfindungsgemäß als "partielle Prothrombinase" verstanden.

- 40 Neben den Bestandteilen der Prothrombinase bzw. Pro-Prothrombinase sind vorteilhafterweise weitere Faktoren der Blutgerinnung und Fibrinolyse enthalten, um eine attenuierte Wirkung, insbesondere eine Verstärkung, Abschwächung, Beschleunigung oder Verzögerung der Hämostase, zu erzielen. Dementsprechend können Aktivatoren oder Proaktivatoren der Blutgerinnung, darunter Faktoren der intrinsischen oder extrinsischen Blutgerinnung, als Zymogen oder als aktivierte Faktoren, sowie deren Agonisten oder Antagonisten bzw. Inhibitoren weiters enthalten sein. Daneben sind auch die entsprechenden Kombinationen als Präparate möglich, die separat zur Anwendung kommen.

- 45 Entsprechend einer bevorzugten Ausführungsform besteht die pharmazeutische Präparation jedoch im wesentlichen aus der "partiellen Prothrombinase", wobei vorzugsweise die Bestandteile der Prothrombinase bzw. Pro-Prothrombinase als Komplex gebunden vorliegen. Dieser Komplex kann in einfacher Weise gereinigt und behandelt werden, insbesondere zur Inaktivierung von molekularen oder viralen Pathogenen chemisch und/oder physikalisch behandelt werden.

Die Faktoren der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparation sind in einer Form enthalten, die die Aktivierung mindestens eines Faktors ermöglicht bzw. in der mindestens ein Faktor bereits aktiviert ist. Als Faktoren sind in der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparation vorzugsweise jene enthalten, die aus der Gruppe bestehend aus den Faktoren II, V, Va, X und Xa ausgewählt sind.

Als erfindungsgemäße Präparation einer partiellen Prothrombinase bzw. Pro-Prothrombinase werden vorzugsweise Kombinationen der Faktoren II und V bzw. Va sowie X und V bzw. Va zur Verfügung gestellt. Dabei ist besonders bevorzugt, daß die erfindungsgemäße Präparation im wesentlichen aus diesen Kombinationen besteht. Gleichermassen ist auch eine Pro-Prothrombinase bestehend aus den Faktoren II und X, gegebenenfalls in Kombination mit Faktor V bzw. Va, eine bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung.

Dabei können native Faktoren, etwa aus Plasma oder einer Plasmafraktion gewonnene Proteine bzw. deren Äquivalente, die beispielsweise von rekombinanten Nukleinsäuren kodiert werden, eingesetzt werden. Des weiteren eignen sich aber auch entsprechende Derivate, welche die modifizierten Proteine oder Fragmente umfassen, solange sie aktivierbar sind bzw. die entsprechende Aktivität aufweisen, um die Generierung von Thrombin zu modulieren.

Die erfindungsgemäße Präparation hat den Vorteil, daß sie trotz der hohen Stabilität in vitro auch in vivo solange stabil ist, bis sich dessen Wirksamkeit durch die Aktivierung von Prothrombin und die Entwicklung von Thrombin am Ort der Wunde bzw. Blutung zeigt. Durch den Kontakt mit den Blutungsmarkern, insbesondere phospholipidhaltigen Oberflächen, wird in situ Thrombin generiert und die Hämostase gefördert. Aufgrund der lokalen Wirksamkeit werden systemische Nebenwirkungen, wie z.B. thromboembolische Komplikationen, vermieden.

Um eine kontrollierte Beeinflussung der Hämostase zu bewirken, ist es bevorzugt, hochgereinigte Faktoren einzusetzen, die von störenden Verunreinigungen, insbesondere von einer Thrombinaktivität, befreit sind. Dafür eignen sich im wesentlichen Faktoren, die durch chromatographische Reinigungsverfahren, wie der Ionenaustauschchromatographie, Hydrophoben Chromatographie, Affinitätschromatographie und/oder Molekularausschlußchromatographie gereinigt sind. Damit können jeweils spezifische Aktivitäten von mindestens 50% der theoretischen Reinheit, insbesondere mindestens 70%, vorzugsweise mindestens 90% bis zur theoretischen Reinheit für den Einzelfaktor erreicht werden. Dementsprechend ist es auch bevorzugt, Faktoren zu verwenden, die im wesentlichen frei von Denaturierungsprodukten sind und daher als gereinigte aktive Enzyme bzw. aktivierbare Zymogene vorliegen.

Es ist weiters auch bevorzugt, eine Behandlung zur Inaktivierung von infektiösen Krankheitserregern vorzunehmen, beispielsweise durch eine Behandlung mit Chemikalien und/oder eine physikalische Behandlung, wie die der Hitzebehandlung, Bestrahlung bzw. der Filtration, insbesondere der Nanofiltration. Gemäß einer bevorzugten Variante sind die Faktoren der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparation mit Detergentien behandelt, was einerseits zur Inaktivierung von Viren führt und andererseits möglicherweise vorhandene Phospholipide solubilisiert.

Phospholipide können in Präparationen von Blutgerinnungsfaktoren beispielsweise aus Plasma oder aus einer Plasmafraktion bzw. aus einer Zellkultur enthalten sein. Die spezielle Behandlung der Faktoren zur Abtrennung der natürlicherweise vorhandenen Phospholipide umfaßt einerseits die Solubilisierung dieser und andererseits die Abtrennung der Phospholipide durch die erwähnten Reinigungsverfahren.

Entsprechend einer weiteren Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Präparation weiters Magnesiumionen. Diese Ionen wirken kompetitiv zu Calciumionen und können die Calciumionen in der Prothrombinase bzw. Pro-Prothrombinase verdrängen. Damit wird eine vorzeitige Thrombinbildung in einer Lösung der erfindungsgemäßen Präparation unterbunden und damit diese soweit stabilisiert, daß sie in einer Lösung auch nach Stunden stabil bleibt.

Es hat sich herausgestellt, daß die pharmazeutische Präparation sogar als stabile Infusionslösung zur Verfügung gestellt werden kann, vor allem wenn gewährleistet ist, daß sie keine freien Calciumionen enthält. Zur Komplexierung der Calciumionen eignet sich auch ein Gehalt an einem pharmazeutisch akzeptablen Chelatbildner, beispielsweise EDTA, und verwandte Strukturen, wie Citrat.

Das erfindungsgemäße Präparat weist eine FEIBA-vergleichbare biologische Wirksamkeit in

Tiermodellen auf und ist in der Lage, die Gerinnungszeit eines Faktor VIII-Inhibitorplasmas deutlich zu verringern. Es kann die verlängerte Blutungszeit und Blutungsneigung von Faktor VIII-Inhibitor-kaninchen und von von Willebrand-Faktor-Inhibitorkaninchen gänzlich normalisieren. Durch das Bereitstellen von gereinigten Blutgerinnungsfaktoren, z.B. von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa, ist die Toxizität des erfindungsgemäßen Präparates im Vergleich zu FEIBA deutlich reduziert. So erweist sich beispielsweise die effektive Kombination von Faktor Xa und Prothrombin im Wessler-Thrombose-Modell (J.Appl.Phys. 14 (1959), 943-946) als negativ, d.h., es können für diese Kombination auch bei sehr hohen Dosen keine thrombogenen Effekte im Wessler-Modell nachgewiesen werden.

- Bei diesem Thrombogenitätsmodell werden Kaninchen mit Pentobarbital narkotisiert, dann wird unter zusätzlicher Lokalanästhesie die Vena jugularis freipräpariert und mit losen Ligaturen im Abstand von 2 cm versehen. Schließlich wird die zu testende Substanz in die der Vena jugularis gegenüberliegende Ohrvene innerhalb von 15 s injiziert. Nach weiteren 25 s werden die Ligaturen zugezogen und 10 min gewartet bis das abgebundene Venenstück entnommen und in einer mit Citratpuffer gefüllten Petrischale aufgeschnitten und bewertet werden kann. Die Bewertungskriterien, modifiziert nach Wessler, sind: keine Thrombenbildung = 0, wenige kleine Thromben = 0,5 - 1, wenige mittelgroße und viele kleine Thromben = 2, viele mittelgroße Thromben = 3, wenige große Thromben = 3,5, ein zusammenhängender Thrombus = 4.

- Die Komponenten des erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparates sind vorzugsweise bis zu einer derartigen Reinheit aufgereinigt, daß es sogar bei einer Dosis von mindestens 150 E Prothrombin/kg frei an thromboembolischen Nebenwirkungen, ausgedrückt durch einen Score im Wessler-Thrombosemodell von höchstens 3, vorzugsweise höchstens 2, insbesondere weniger als 2 Punkten, ist. Prothrombin ist im erfindungsgemäßen Kombinationspräparat, vorzugsweise in einer spezifischen Aktivität von mindestens 5 E/mg Protein, noch bevorzugter mindestens 6, insbesondere mindestens 7, entsprechend 50, 60 oder 70 % der theoretischen Reinheit, enthalten. Die eingesetzte Faktor X- bzw. Xa-Präparation sollte vorzugsweise eine spezifische Aktivität von mindestens 100 E/mg Protein aufweisen, wobei Faktor Xa vorzugsweise vorwiegend als Faktor Xaß enthalten ist. Faktor V bzw. Va wird als Cofaktor in einem etwa äquimolaren Verhältnis zum Gerinnungsfaktor der partiellen Prothrombinase bzw. Pro-Prothrombinase eingesetzt. Das Verhältnis beträgt vorzugsweise (0,01-2):1 (mol/mol), am meisten bevorzugt (0,5-2):1.

Das eingesetzte Präparat sollte möglichst frei an Thrombin sein, wobei die Freiheit an Thrombin durch geeignete, vorzugsweise chromogene Tests, nachgewiesen werden kann (z.B. mit dem chromogenen Substrat TH-1 der IMMUNO AG.).

- Es zeigte sich, daß, wenn die Gerinnungsfaktoren, wie z.B. Prothrombin und Faktor Xa, im erfindungsgemäßen Präparat als Komplex vorliegen, das Präparat eine erhöhte Stabilität gegenüber herkömmlichen Präparaten aufweist und der Komplex darüberhinaus noch einer weiteren Behandlung zur Reinigung und/oder Inaktivierung von Viren unterzogen werden kann. Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Präparates umfaßt dieses weiters Antithrombin III in stabilisierenden Mengen, gegebenenfalls gemeinsam mit Heparin, wobei jedoch auch bei einem solchen Präparat die Freiheit an thromboembolischen Nebenwirkungen gemäß dem Wessler-Test in Abwesenheit bzw. auch nach Demaskierung des Heparins, d.h. Neutralisation und/oder Abtrennung des Heparins, nachgewiesen werden kann, in dem Sinne, daß der Wert von 3 Punkten nicht erreicht wird.

- Ein Komplex, bestehend aus mindestens zwei Gerinnungsfaktoren, die Bestandteile einer Prothrombinase oder Pro-Prothrombinase sind, insbesondere in hochgereinigter Form, hat als "partieller Prothrombinase-Komplex" grundlegende Bedeutung. Die Aktivität eines Präparates auf Basis dieses Komplexes kann durch die Gegenwart von Calciumionen, wie Calciumchlorid, um ein Vielfaches beschleunigt werden. Auch hat sich herausgestellt, daß ein Präparat, enthaltend diesen Komplex und weiters Calciumionen, zur Herstellung eines Reagens für diagnostische Zwecke verwendet werden kann. Ein Reagens, welches weiters Thrombinaktivität und gegebenenfalls Phospholipide enthält, ist beispielsweise zur Bestimmung der Faktor V-Cofaktoraktivität geeignet. Ein diagnostisches Verfahren unter Verwendung dieses Reagens mit bzw. ohne aktiviertem Protein C, einem proteolytischen Inaktivator von Faktor V, ermöglicht darüberhinaus noch die Abschätzung eines Ausmaßes einer Inaktivierung von Faktor V bzw. eine mutationsbedingte Resistenz gegenüber aktiviertem Protein C.

- Vorzugsweise ist das Prothrombin in der erfindungsgemäßen Präparation bis zu einem Grad aufgereinigt, daß es sogar bei einer Dosis von mindestens 150 E Prothrombin/kg frei an thromboembolischen Nebenwirkungen, ausgedrückt durch einen Score im Wessler-Thrombosemodell von höchstens 3, vorzugsweise höchstens 2, insbesondere weniger als 2 Punkten ist.
- 5 Das erfindungsgemäße Kombinationspräparat enthält bevorzugterweise weniger als 0,1 E Faktor VIII:C oder Faktor VIII:Ag/E Prothrombin bzw. weniger als 0,1 E Faktor IX/E Prothrombin bzw. weniger als 0,1 E Faktor X/E Prothrombin. Dadurch kann die unerwünschte Bildung von bzw. Reaktion mit Antikörpern gegen diese Proteine effizienter hintangehalten und das Risiko von Nebenwirkungen verringert werden.
- 10 Obwohl das Präparat in Kombination mit Phospholipiden eingesetzt werden kann, sind gemäß einer weiteren bevorzugten Variante der erfindungsgemäßen Präparate diese frei an zugesetzten Phospholipiden und enthalten weniger als 0,01 mg Phospholipide/E Prothrombin, was aufgrund der möglichen thrombogenen Wirkung von Phospholipiden zu einer weiteren erheblichen Verringerung des Thrombogenitätsrisikos führt. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Präparate frei von nachweisbarem Phospholipid.
- 15 Die Dosierung der erfindungsgemäßen Präparate orientiert sich an der Dosierung der äquivalenten Komponenten in FEIBA. Die Factor Eight Inhibitor Bypassing-Aktivität (FEIBA) wird definiert als jene Aktivität einer derartigen Präparation, die die Gerinnungszeit eines Faktor VIII-Inhibitorplasmas in einem Gerinnungstest, wie er in AT 350726 beschrieben wird, auf 50 % des Leerwertes reduziert. Die Vorteile der erfindungsgemäßen Präparate im Vergleich zu FEIBA liegen bedingt durch die hohe Reinheit der Komponenten in einer reduzierten Belastung des Patienten mit Plasmaproteinen, die zur Therapie der Faktor VIII-Inhibitorhaemophilie nicht immer oder unbedingt erforderlich sind. Insbesondere ist durch das Fehlen von Faktor VIII:Ag die anaphylaktische Nebenwirkung ausgeschlossen. Es ist daher möglich, die erfindungsgemäßen Präparate in einer Dosis zu verabreichen, welche beispielsweise mindestens 50 E Prothrombin/kg Körpergewicht umfaßt, wobei diese Dosis auf Grund der Nebenwirkungsfreiheit erstmalig bei dieser Art von Präparaten sogar in einer Bolusinjektion verabreicht werden kann, womit die ansonsten langwierige Verabreichung derart hoher Dosen vermieden werden kann.
- 20 Üblicherweise werden die erfindungsgemäßen Präparate in einer Dosis von beispielsweise 50 bis 150 E Prothrombin/kg Körpergewicht verabreicht, wobei die maximalen Dosen jedoch auch weit über den 150 E/kg Körpergewicht liegen können (z.B. bis 300 bzw. bis 500), ohne daß es zu thromboembolischen Nebenwirkungen kommen kann.
- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch Darreichungsformen der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate, welche eine Dosis von mindestens 50 E Prothrombin/kg Körpergewicht, vorzugsweise zwischen 50 und 500 E/kg Körpergewicht, umfassen.
- 30 Diese Darreichungsformen können bereits zur direkten Verabreichung vorgesehene Ampullen, Spritzen, oder ähnliche direkt oder indirekt applizierbare Formen sein. Dazu zählen Behälter geeignet zur Infusion, intramuskulären bzw. subkutanen Anwendung oder Sets, bestehend aus Behälternetz mit den Wirkstoffen als Lyophilisat und einem Behälter mit einer pharmazeutisch akzeptablen Lösung, geeignet zur Rekonstitution des Lyophilisats. Üblicherweise enthält die pharmazeutisch akzeptable Lösung bzw. das pharmazeutische Präparat Salze, Konservierungsstoffe, Puffer und dgl. in einer wässrigen Lösung (siehe Remington's Pharmaceutical Sciences, 15. Aufl., Easton: Mack Publishing Co., S. 1405-1412 und 1461-1487 (1975) und The National Formulary XIV., 14. Aufl., Washington: American Pharmaceutical Association (1975)). Beispielhaft für nicht-wässrige Lösungen sind Propylenglykol, Polyethyenglykol, pflanzliche Öle und injizierbare organische Ester, Lösungen sind Ethyoleat. Wässrige Träger sind beispielsweise Wasser, gegebenenfalls mit Alkohol wie Salzlösungen (NaCl), Ringer's Dextrose, etc.. Als Konservierungsstoffe können gemischt, Salzlösungen (NaCl), Ringer's Dextrose, etc.. Als Konservierungsstoffe können antimikrobielle Substanzen, Antioxidantien, Chelatbildner oder Inertgase verwendet werden.
- 35 Die eingesetzten Gerinnungsfaktoren können sowohl plasmatischen Ursprungs als auch durch rekombinante DNA-Technologie hergestellte Proteine sein. Wesentlich ist in beiden Fällen, daß sie in gereinigerter Form, insbesondere in einer von endogenen und exogenen Phospholipiden befreiter Form im pharmazeutischen Präparat vorliegen.
- 40 Bevorzugterweise werden die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate in lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt, was die bekannten Transport-, Lagerungs- und Applikationsvorteile mit sich bringt. Als Rekonstitutionslösung bietet sich eine pharmazeutisch
- 45
- 50
- 55

akzeptable Lösung an, die gegebenen ATIII bzw. Heparin enthält. Durch den hohen Reinheitsgrad der Komponenten der erfindungsgemäßen Präparate können diese nach geringer Lösungszeit, vorzugsweise unter 5 min, insbesondere unter 1 min, zu einer optisch klaren Lösung mit beispielsweise mindestens 10 E Prothrombin/ml rekonstituiert werden, wobei sogar Konzentrationen von bis zu 200 E Prothrombin/ml Lösung erreicht werden können. Eine optisch klare Lösung ist dabei definiert durch ein Maximum der Extinktion bei 600 nm von 0,1 (für eine Lösung mit mindestens 5 Gew.% Proteingehalt, bei einer Schichtdicke von 1 cm), bezogen auf die reine (Puffer-) Lösung als Referenz. Alternativ dazu gilt auch eine Lösung mit weniger als 70 Light Scattering Units (LSU), ermittelt durch Messung im Nephelometer bei 340 nm und einer Schichtdicke von 1 cm als klar.

Die erfindungsgemäßen Präparate sind im Gegensatz zu den bisher bekannten Präparaten zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen außerordentlich stabil, d.h., sie können für eine längere Zeitperiode vor der Verabreichung stehen gelassen werden. Beispielssowie sollte FEIBA im verabreichungsfertigen Zustand gemäß der Produktinformation nicht länger als 1 Stunde stehen gelassen werden, wohingegen die erfindungsgemäßen Präparate als gebrauchsfertige Lösung auch während eines Zeitraums von 3 Stunden oder länger bei Raumtemperatur keinerlei Thrombogenizität bzw. Gerinnungsaktivierung zeigen, weshalb die erfindungsgemäßen Präparate auch als Infusionslösung zur Verfügung gestellt werden können, die auch über einen Zeitraum von mehreren Stunden verabreicht werden kann. Aus den gleichen Gründen ist es auch möglich, die erfindungsgemäßen Präparate über einen längeren Zeitraum als Infusionslösung zu verabreichen, wobei es sich gezeigt hat, daß in bezug auf die thromboembolischen Nebenwirkungen kein wesentlicher Unterschied zwischen einer Bolusinjektion und einer langsamen Infusion mit den erfindungsgemäßen Präparaten auftritt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die pharmazeutischen Präparate in geeigneten Applikationsvorrichtungen vorgegeben, vorzugsweise als Lyophilisat in Spritzen, welche eine *in situ*-Rekonstitution mit einer pharmazeutisch akzeptablen Lösung erlauben. Beim Kombinationspräparat empfiehlt sich eine Applikationsvorrichtung, wie in Fig. 1 gezeigt, worin die Lyophilisate von beispielsweise Prothrombin und Faktor Xa vorzugsweise getrennt aufbewahrt werden und bei Bedarf nach einer *in situ*-Rekonstitution mittels einer Doppelkammerspritze verabreicht werden können.

Beim reinen Prothrombinpräparat reicht es aus, Prothrombin in einer einfachen Spritze, vorzugsweise in lyophilisierter Form, gegebenenfalls mit einer pharmazeutisch akzeptablen Lösung für die Rekonstitution, vorzugeben (siehe Fig. 2).

Das Prothrombinpräparat kann jedoch auch als Flüssigpräparat bzw. in flüssig-tiefgefrorener Form zur Verfügung gestellt werden.

Die pharmazeutischen Präparate gemäß der vorliegenden Erfindung können, insbesondere wenn sie aus plasmatischen Proteinen oder Zellkulturen gewonnen werden, einer oder mehreren Virus-Inaktivierungsbehandlungen bzw. Behandlungen zur Virus-Abreicherung unterzogen werden, beispielsweise einer chemischen oder chemisch-physikalischen Behandlung, einer Hitze- und/oder Detergentsbehandlung gemäß der EP 0 159 311, der EP 0 519 901 oder der EP 0 674 531 oder einer physikalischen Behandlung, wie die der Nanofiltration.

Die erfindungsgemäßen Präparate ermöglichen eine sichere und einfache Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, bei welcher ein effektiver Wirkungseintritt innerhalb kürzester Zeit beobachtet werden kann.

Es zeigt sich, daß der effektive Wirkungseintritt bei der Gabe des Komplexes von Faktor II und Faktor Xa schneller erfolgt, als für ein Präparat, welches ausschließlich Faktor II enthält. Zur Behandlung einer Blutungskomplikation bei einem Patienten mit Hemmkörperhaemophilie ist es daher vorteilhaft, das Blutungsereignis initial durch die Gabe des Faktor II/Xa-Komplexes zu behandeln und somit zu einer schnellen Blutstillung zu kommen und die Therapie zur Vermeidung weiterer Blutungen mit Erhaltungsdosen eines Präparates, welches ausschließlich Faktor II enthält, fortzusetzen.

Darüberhinaus ermöglichen die lange Halbwertszeit der erfindungsgemäßen Präparate und deren Freiheit an thrombogenen Nebenwirkungen bzw. das Ausbleiben einer anaphylaktischen Reaktion, welche zur Verstärkung des Inhibitortiters führt, eine gegenüber bekannten Verfahren erheblich verbesserte Behandlung des Patienten mit Blutgerinnungsstörungen. Der Patient kann

durch die hohe Konzentration bzw. Dosis des erfindungsgemäßen Präparates ein Wirkstoffdepot erhalten, was den Bedarf an oftmaligen Behandlungen herabsetzt. Der Patient kann also auch über einen längeren Zeitraum von mehreren Tagen ohne Behandlung bleiben und sich gegebenenfalls durch Selbsteinjektion, eventuell subkutan, ambulant behandeln.

5 Prothrombin kann für die Zwecke der vorliegenden Erfindung durch ein Verfahren hergestellt werden, bei welchem ein Prothrombinkomplexkonzentrat einer chromatographischen Reinigung unterzogen wird und die Fraktion, enthaltend Prothrombin, zu einer pharmazeutischen Präparation verarbeitet wird. Mit diesem Verfahren wird eine Prothrombin-Präparation zur Verfügung gestellt, die die Anforderungen an die Reinheit für die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate, 10 insbesondere was die mit dem Wessler-Test ermittelte Nebenwirkungsfreiheit anbelangt, voll erfüllt.

Insbesondere ist dieses Verfahren gekennzeichnet durch die Kombination der folgenden Schritte:

- 15 - Bereitstellen eines Prothrombinkomplexpräparates in festem Zustand oder als Prothrombin-hältige Lösung,
- Virusaktivierungsbehandlung, vorzugsweise durch Hitzebehandlung, insbesondere in festem Zustand,
- gegebenenfalls Lösen des Prothrombinkomplexpräparates, wobei eine Prothrombin-hältige Lösung erhalten wird,
- 20 - gegebenenfalls Behandeln der Prothrombin-hältigen Lösung mit einem Erdalkalisalz als festem Träger, wobei Prothrombin adsorbiert und anschließend desorbiert wird,
- gegebenenfalls ein- oder mehrmaliges Konzentrieren, vorzugsweise durch Präzipitation oder Ultra-/Diafiltration, und Gelfiltrieren der Prothrombin-hältigen Lösung,
- 25 - Behandeln der Prothrombin-hältigen Lösung mit einem Anionenaustauscher, wobei Prothrombin adsorbiert und anschließend selektiv desorbiert wird,
- Behandeln der Prothrombin-hältigen Lösung mit einem hydrophoben Chromatographiematerial, und
- Fertigstellen der Prothrombin-hältigen Lösung zu einem pharmazeutischen Präparat.

30 Als Erdalkalisalz können dabei vorzugsweise Calciumphosphat, Bariumsulfat oder Aluminiumhydroxid eingesetzt werden. Als Anionenaustauscher kommen im Prinzip alle Anionenaustauscher in Frage, die eine Affinität zu Prothrombin aufweisen, wie z.B. Anionenaustauscher auf Zellulosebasis mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sephadex®), 35 Anionenaustauscher auf Basis von quervernetztem Dextran mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sephadex®), Anionenaustauscher auf Agarosebasis mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sepharose CL6B®, DEAE-Sepharose Fast Flow®), Anionenaustauscher auf Basis von quervernetztem Dextran mit Diethyl[2-hydroxypropyl]aminoethyl-Gruppen (QAE-Sephadex®), 40 Anionenaustauscher auf Agarosebasis mit  $\text{CH}_2\text{N}^+$  ( $\text{CH}_3)_3$ -Gruppen (Q-Sepharose Fast Flow®, Q-Sepharose High Performance®, Q-Sepharose Big Beads®) (alle Fa. Pharmacia), sphärische Chromatographiegele, hergestellt durch Copolymerisation von N-acryloyl-2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol und einem anionischen Acrylderivat mit Diethylamino-ethyl-Gruppen 45 als funktionellem Anionenaustauscher (DEAE-Tris-Acryl®), nicht kompressible Silica-Dextran-Matrizes, bei welchen poröses Silicagel in einer quervernetzten Dextransmatrix eingebettet ist, mit reaktiven Diethylaminoethylanionenaustauschergruppen (DEAE-Spheredex®), Gele aus rigidem Polystyrolpartikeln, deren Poren mit einem Hydrogel gefüllt sind, welches quarternäre Amingruppen mit starker Anionenaustauscherwirkung trägt (Q-Hyper-D®) (alle Fa. Sepracor); 50 rigitide 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 55  $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen (DEAE-Toyopearl®, QAE-Toyopearl®, Toyopearl Super-Q® (alle Fa. Tosohas); Anionenaustauscherharze bestehend aus porösem Polymethacrylat/ Polyacrylat-Gel (Protein PAK DEAE®, Fa. Waters); Anionenaustauscher auf Basis von Copolymeren bestehend aus Oligoethylenglycol-

dimethylacrylat, Glycidyl-methacrylat und Pentaerythrit-Dimethylacrylat mit einer hydrophoben Oberfläche (Fractogel EMD-TMAE®, Fractogel EMD-DEAE®, Fractogel EMD-DMAE®), Anionenaustauscher auf Kieselgelbasis mit porösen kugelförmigen druckstabilen Chromatographiepartikel (Licrospher 1000 TMAE®, Licrospher 1000 DEAE® und Licrospher 4000 DMAE®) (alle Fa. MERCK).

5 Als Gel für die hydrophobe Interaktionschromatographie wird vorzugsweise ein hydrophobes Gel auf Basis von Agarose mit Phenyl-Gruppen (Phenyl-Sepharose High Performance® (Fa. Pharmacia);

10 aber auch andere Chromatographiegele wie z.B. hydrophobe Gele auf Basis von Agarose mit Butyl-Gruppen (Butyl-Sepharose®), Octyl-Gruppen (Octyl-Sepharose®), Phenyl-Gruppen (Phenyl-Sepharose®, Phenyl-Sepharose Fast Flow High Sub®, Phenyl-Sepharose Fast Flow Low Sub®) (alle Fa. Pharmacia);

15 Copolymeren bestehend aus Oligoethylenglycol-dimethylacrylat, Glycidyl-methacrylat und Pentaerythrit-Dimethylacrylat mit einer hydrophilen Oberfläche (Fractogel TSK-Butyl®, Fa. MERCK);

20 Gele auf Basis von Metacrylat (Macroprep-Methyl-HIC-Support®, Macroprep t-Butyl-HIC-Support® (alle Fa. BioRad); TSK-Gel Butyl Toyopearl®, TSK-Gel Phenyl Toyopearl® und TSK-Gel Ether Toyopearl® (alle Fa. Tosohas), eingesetzt.

Eine mögliche Ausführungsform dieses Verfahrens ist in Fig. 3 dargestellt.

25 Die Prothrombin-Präparation, welche mit diesem Verfahren hergestellt werden kann, zeichnet sich nicht nur durch eine äußerst hohe Reinheit, welche nahe der theoretisch möglichen Reinheit von 10 E/mg liegt, sondern auch dadurch, daß es sogar bei einer Dosis von mindestens 150 E Prothrombin/kg frei an thromboembolischen Nebenwirkungen, ausgedrückt durch einen Score im Wessler-Thrombosemodell von höchstens 3 Punkten, vorzugsweise höchstens 2 Punkten, insbesondere weniger als 2 Punkten ist, und darüberhinaus als Lyophilisat mit einer Lösezeit von höchstens 1 min zu einer klaren Lösung mit einer Aktivität von zumindest 10 E Prothrombin/ml bis zu 200 E Prothrombin/ml rekonstituierbar ist. Die biologische Aktivität dieses Prothrombin-Präparates wird verstanden als die enzymatische Aktivität, welche nach Aktivierung des Prothrombins erhalten wird.

30 Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von gereinigten Prothrombinase-Faktoren, insbesondere von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Etablierung von Supranormalen Prothrombin-Konzentrationen im Blut eines Patienten, bzw. zur Etablierung von normalen Prothrombin-Konzentrationen im Blut bei Zuständen mit erniedrigtem Prothrombin-Level.

35 Es zeigte sich, daß mit den erfindungsgemäßen Präparaten solche Supranormalen Faktor II-Levels sogar permanent, d.h. über längere Zeiträume erhalten werden können, was einerseits darauf zurückzuführen ist, daß Prothrombin eine für Blutgerinnungsfaktoren sehr hohe Halbwertszeit als Medikament aufweist und andererseits auch in der Nebenwirkungsfreiheit der erfindungsgemäßen Präparationen besteht, so daß sogar eine subkutane Verabreichung etwa 40 durch Depotverabreichung möglich ist. Die supranormalen Konzentrationen von Prothrombin, die im Blut durch Gabe von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa bzw. anderen Prothrombinase-Faktoren möglich sind, betragen zumindest 150 %, vorzugsweise sogar mindestens 200 %, entsprechend einer Aktivität von mindestens 1,5 E Prothrombin/ml Blut, vorzugsweise mindestens 2,0 bis zu 10 E/ml.

45 Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung von gereinigten Prothrombinase-Faktoren, insbesondere von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung von Faktor VIII-Inhibitorzuständen, Haemophilie A oder B und von Willebrand-Krankheit. Es hat sich gezeigt, daß in Tiermodellen für alle diese Indikationen mit den erfindungsgemäßen Präparaten eine rasche, effiziente und 50 Nebenwirkungs-freie Behandlung möglich ist.

55 Die erfindungsgemäßen Präparate werden bevorzugt in einer Lösung mit physiologischem pH zur Verfügung gestellt, welche vorzugsweise keine freien Calciumionen enthalten. Es ist aber auch möglich, einen beispielsweise vom Faktor Xa-Optimum entfernten sauren Puffer im Bereich von pH 4,5-6,5, vorzugsweise 5-6, zu verwenden, mit welchem die Stabilität des Kombinationspräparates nochmals gesteigert werden kann. Es versteht sich, daß sämtliche für Faktor II, V, Va,

X und Xa geeigneten pharmazeutischen Zusatzstoffe und Lösungen zur Verabreichungsfertigen Herstellung der erfundungsgemäßen Präparate verwendet werden können.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele und der dazugehörigen Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert.

- 5 Fig. 1 und Fig. 2 mögliche Darreichungsformen der erfundungsgemäßen Präparate;
- Fig. 3 das Flußdiagramm einer Ausführungsform des Herstellungsverfahrens;
- Fig. 4 den Nachweis des partiellen Prothrombinasekomplexes;
- Fig. 5 die spektroskopische Analyse eines Beispiels der erfundungsgemäßen Präparate (A) im Vergleich zu Standardpräparaten [aktivierter Prothrombinkomplex (B), Prothrombinkomplex (C)];
- 10 Fig. 6 die in vivo-Wirkung einer Faktor II-Präparation auf Faktor VIII-Inhibitorkaninchen;
- Fig. 7 und Fig. 8 die in vivo-Wirkung der erfundungsgemäßen Präparate im von Willebrand Faktor/Faktor VIII-Inhibitormodell.

#### BEISPIEL 1:

##### Herstellung von Faktor X und Faktor II aus einer virusinaktivierten Plasmafraktion mittels Ionenaustauschchromatographie.

Eine lyophilisierte Prothrombinkomplexfaktorenpräparation, welche die Faktoren II, IX, X sowie Protein C und Protein S enthielt, wurde nach der Methode von Brummelhuis, H.G.J., Preparation of the Prothrombincomplex. In: Methods of Plasma Protein Fractionation, Curling, J.M. ed., 117-128, Academic Press, New York, (1980), hergestellt und zur Virusinaktivierung nach EP 159 311 hitzebehandelt. Entsprechend wurde das Lyophilisat (1000 E Faktor X/g, 1200 E Faktor II/g) in destilliertem Wasser gelöst, sodaß dieses 50 000 E Faktor XI enthielt, und auf pH 7,0 eingestellt. Nach Zusatz von 12 % (v/v) Polyoxyethylensorbitanmonooleat (TWEEN 80) wurde 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde mit einem 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, 1:5 verdünnt und die Prothrombinkomplexproteinfraktion an Calciumphosphat  $[Ca_3(PO_4)_2]$  in einer Konzentration von 30 g  $Ca_3(PO_4)_2$  pro l Prothrombinkomplexlösung durch einstündiges Rühren bei Raumtemperatur adsorbiert. Anschließend wurde die feste Phase durch Zentrifugation, 20 Minuten bei 5000 rpm, abgetrennt und der Niederschlag zweimal mit 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, enthaltend 10 % Ammoniumsulfat, durch Resuspension und erneute Zentrifugation gewaschen. Eine dritte Waschung wurde mit 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, enthaltend 150 mM NaCl in analoger Weise durchgeführt. Die Elution der Prothrombinkomplexfraktion erfolgte mit 1 M Natriumphosphatlösung, pH 7,0, wobei 25 ml dieser Lösung pro g Calciumphosphat 1 Stunde bei Raumtemperatur gerührt und anschließend der verbleibende Niederschlag durch Zentrifugation wie oben abgetrennt wurde. Der Überstand wurde anschließend einer Ammoniumsulfatfällung mit 366 g Ammoniumsulfat pro l 15 h bei 4°C unter Rühren unterzogen. Das Präzipitat, enthaltend die Prothrombinkomplexfraktion, wurde wie oben abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in einem 25 mM Trinatriumcitratdihydrat-Puffer, enthaltend 100 mM NaCl, 1 mM Benzamidinhydrochlorid, pH 6,0, aufgenommen und auf einer Säule, gefüllt mit einem Gelchromatographiematerial aus quervernetztem Dextran (Sephadex® G-25), bei 4°C mit einem linearen Fluß von 1 cm/min gegen 25 mM Trinatriumcitratdihydrat-Puffer, enthaltend 100 mM NaCl und 1 mM Benzamidinhydrochlorid, pH 6,0, umgepuffert, um das Ammoniumsulfat abzutrennen. Dabei wurde im Eluatstrom die UV-Absorption bei 280 nm und die elektrische Leitfähigkeit gemessen. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und anschließend einer Ionenaustauschchromatographie über DEAE-Sephadose FF® (Fast Flow), Fa. Pharmacia, unterzogen. Die Fraktionen wurden auf einer Säule (Innendurchmesser : Gelbett Höhe = 1 : 1,3) mit einem Gelvolumen von 8,2 l, 0,55 g Protein/l Gel, bei einem linearen Fluß von 0,36 cm/min aufgetragen. Die Chromatographie erfolgte bei 22°C. Vor Auftrag der Proteine war die Säule mit einem 25 mM Trinatriumcitratdihydrat-Puffer, enthaltend 100 mM NaCl, 1 mM Benzamidinhydrochlorid, pH 6,0, äquilibriert worden. Die Elution der Proteinfractionen erfolgte in mehreren Stufen mit einem Puffer 1 (25 mM Trinatriumcitratdihydrat, 1 mM Benzamidinhydrochlorid, 245 mM NaCl, pH 6,0), Puffer 2 (25 mM Trinatriumcitratdihydrat, 1 mM Benzamidinhydrochlorid, 270 mM NaCl, pH 6,0) und einem Puffer 3 (25 mM Trinatriumcitratdihydrat, 1 mM Benzamidinhydrochlorid, 400 mM NaCl, pH 6,0). Die Elution mit Puffer 1 wurde mit 2,4 Säulenvolumen durchgeführt, dabei wurde Inertprotein abgetrennt. Die Elution wurde mit 5,6 Säulenvolumen mit Puffer 2 durchgeführt, wobei hier Fraktionen gesammelt

wurden, die auf Gehalt von Faktor II, Faktor X, Protein C und Faktor IX analysiert wurden. Die Faktor X enthaltenden Fraktionen, die frei von Faktor II, IX und Protein C wurden vereinigt. Durch Elution mit Puffer 3 (1,9 Säulenvolumen) wurde Faktor II desorbiert, wobei wieder Fraktionen gesammelt und auf den Gehalt an Faktor X, Faktor IX und Faktor II untersucht wurde. Die Faktor II enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt. Sowohl der Faktor II, als auch der Faktor X enthaltende Pool konnten gegebenenfalls durch Zusatz von 1 M KSCN und Inkubation bei 22°C für mehrere Stunden einer zusätzlichen Behandlung zur Inaktivierung pathogener Verunreinigungen unterworfen werden.

**BEISPIEL 2 :**  
**Reinigung von Faktor II mittels hydrophober Interaktionschromatographie**

Der in Beispiel 1 gewonnene Faktor II-Pool wurde durch Zugabe von Natriumchlorid auf 1,8 M NaCl eingestellt und der pH-Wert auf pH 7,0 korrigiert. Diese Lösung wurde anschließend durch hydrophobe Interaktion an ein Gel, Phenylsepharose High Performance®, Fa. Pharmacia, adsorbiert, wobei 3 g Protein/l Gel gebunden wurden. In einer Säule mit einem Verhältnis Innendurchmesser : Gelbett Höhe = 1 : 1,9 wurde bei einem linearen Fluß von 0,25 cm/min die Proteinfraktion adsorbiert und anschließend durch Waschen mit einem Puffer (25 mM Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,4) vom Inertprotein befreit. Durch Gradientenelution mit 11,5 Säulenvolumina von 3 M - 0,9 M NaCl unter gleichzeitiger Sammlung von Fraktionen wurde Faktor II von der Säule eluiert, wobei jene Fraktionen gepoolt wurden, die Faktor II-Aktivität enthielten, aber frei von Faktor X und Faktor IX waren. Die gesammelten Faktor II-Fraktionen wurden anschließend durch Ultra-/Diafiltration über eine Ultrafiltrationsmembran mit einem cut-off von 30 kD zehnfach aufkonzentriert und gegen einen Puffer enthaltend 4 g Trinatriumcitratdihydrat/l, 8 g NaCl/l, pH 7,0, umgepuffert. Eine so hergestellte Faktor II-Präparation wies eine spezifische Aktivität von 6,9 E/mg Protein auf. Die Bestimmung der Faktor II-Aktivität erfolgte mit der 1-Stufen-Methode, basierend auf der Thromboplastinzeit, unter Verwendung eines Faktor II-Mangelplasmas gegen den Internationalen Faktor II-Standard unter Verwendung der Reagenskombination von IMMUNO, Wien. Andere Gerinnungsfaktoren waren in Gerinnungsanalysen in Spuren oder gar nicht mehr nachweisbar (Faktor VII < 0,00002 E/E Faktor II, Faktor IX 0,0002 E/E Faktor II, Faktor X 0,004 E/E Faktor II, Protein C 0,003 E/E Faktor II und Faktor VIII < 0,0002 E/E Faktor II).

**BEISPIEL 3 :**  
**Reinigung von Faktor II mittels hydrophober Interaktionschromatographie und Hydroxylapatitchromatographie**

Als alternatives Herstellungsverfahren für einen hochgereinigten Faktor II wurde auch ein Verfahren verwendet, bei dem aus einem lyophilisierten Prothrombinkomplexfaktorenpräparat (siehe Beispiel 1) durch hydrophobe Chromatographie zuerst Faktor IX abgetrennt, anschließend Faktor II isoliert und dieser dann durch Chromatographie an Hydroxylapatit hochgereinigt wurde.

Die Prothrombinkomplexfaktorenpräparation wurde wie in Beispiel 1 gelöst und mit Detergens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde durch Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose FF®, Fa. Pharmacia, wie in Beispiel 1, eine Faktor II, IX und X-hältige Fraktion isoliert. Aus dieser wurde anschließend durch Interaktion mit Butyl-Toyopearl®, Fa. Toso Haas, die Faktor IX-enthaltende Fraktion entfernt. Der Adsorptionsüberstand wurde anschließend an Phenyl-Sepharose High Performance®, Fa. Pharmacia, durch eine weitere hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt, wobei ca. 4g Protein/l Gel adsorbiert werden konnten. In einer Säule mit einem Verhältnis Innendurchmesser : Gelbett Höhe = 1 : 1,9 wurde bei einem linearen Fluß von 0,25 cm/min die Proteinfraktion adsorbiert, anschließend durch Waschen mit 20 mM Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,4, das Inertprotein entfernt und schließlich durch stufenweise Elution die Faktor II enthaltende Fraktion isoliert, die bei fallender Leitfähigkeit bei 1,9 M NaCl vom Gel desorbierte. Die Faktor II enthaltende Fraktion wurde anschließend direkt an einen Hydroxylapatit-Träger (Ceramik-Hydroxylapatit®, Fa. Biorad) adsorbiert. Dies erfolgte auf einer Säule mit einem Verhältnis Innendurchmesser : Gelbett Höhe = 1 : 4,8. Die Elution erfolgte bei einem linearen Fluß von 3 cm/min. Durch Elution mit einem Salzgradienten konnte Faktor II von der Säule desorbiert

werden. Die Faktor II enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und über Ultra-/Diafiltration über Polysulfonmembranen mit einem cut-off von 30 kD aufkonzentriert bis die Faktor II-Konzentration 5 50 - 100 E/ml betrug. Eine so hergestellte Faktor II-Präparation wies eine spezifische Aktivität von mindestens 7 E/mg Protein auf. Andere Gerinnungsfaktoren, insbesondere Faktor IX und Faktor VIII, waren nur mehr in Spuren oder gar nicht mehr, wie im Präparat aus Beispiel 2, nachweisbar. Durch Wahl eines geeigneten Diafiltrationspuffers wurde die Faktor II-Präparation in einem pharmazeutisch verträglichen Puffer (z.B. 4 g Trinatriumcitratdihydrat/l, 8 g NaCl/l, pH 7,0) übergeführt.

10 **BEISPIEL 4 :**  
**Gewinnung von Faktor Xa**

Die wie in Beispiel 1 beschriebene hergestellte Faktor X-Fraktion wurde anschließend wie in DE 43 25 872 beschrieben zu Faktor Xab weiterverarbeitet, wobei die so gewonnene hochgereinigte Faktor Xa-Präparation in Gegenwart von 1 g/100 ml Humanalbumin lyophilisiert wurde. Ein solches Präparat war frei von anderen Gerinnungsfaktoren; der enthaltene Faktor Xa wies eine spezifische Aktivität von 120 E/mg Protein vor Zugabe zum Albumin auf.

15 **BEISPIEL 5:**  
**Gefrieretrocknung von Faktor II**

Die in Beispiel 3 beschriebene, hochgereinigte Faktor II enthaltende Präparation wurde ohne Zusatz von Stabilisatoren gefriergetrocknet, wobei nach Lyophilisierung mehr als 80 % der Ausgangsaktivität erhalten blieben.

20 **BEISPIEL 6 :**  
**Colyophilisierung von Faktor II und Faktor Xa**

Eine gemäß Beispiel 3 hergestellte Faktor II-Präparation wurde in einer Konzentration von 30 100 E/ml zu 20 ml in ein 50 ml-Fläschchen abgefüllt und bei -80°C schockgefroren. Anschließend wurde eine Lösung eines hochgereinigten Faktor Xa, der gemäß DE 43 25 872 hergestellt worden war und eine Konzentration von 500 E/ml aufwies, in einer Menge von 30 µl auf die gefrorene Faktor II-Lösung dosiert. Durch das sofortige Einfrieren des geringen Volumens wurde eine Mischung von Faktor II- und Faktor Xa-Phase verhindert. Anschließend wurde gefriergetrocknet. Zur Bereitung der Infusionslösung wurde das Lyophilisat mit 20 ml A.dest. rekonstituiert, gemischt und sofort zur Verabreichung vorbereitet.

35 **BEISPIEL 7 :**  
**Pharmazeutische Formulierung von Faktor II, Faktor Xa und Antithrombin III und/oder Antithrombin III-Heparinkomplex**

Der hochgereinigte Faktor II in Kombination mit Faktor Xa und Antithrombin III oder Antithrombin III-Heparinkomplex wurden in einem Puffer, enthaltend 4 g Trinatrium-citratdihydrat/l und 8 g NaCl/l, pH 7,0, auf die Anwendungskonzentration verdünnt. Diese Lösungen konnten gefriergetrocknet werden, wobei eine Aktivität von zumindest 80 % der jeweiligen Komponenten erhalten blieb.

40 **BEISPIEL 8 :**  
**Nachweis der partiellen Prothrombinase**

50 Die Bildung eines Komplexes aus Faktor II und Faktor Xa zur "partiellen Prothrombinase" wurde durch folgendes Experiment nachgewiesen:  
57 E Faktor II aus Beispiel 3 und 1,2 E Faktor Xa aus Beispiel 4 wurden in 20 mM Tris-HCl-Puffer, enthaltend 150 mM NaCl, pH 7,4, gelöst und 15 min bei Raumtemperatur zur Bildung des Komplexes inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot der Lösung durch Gelpermeations-

chromatographie über quervernetzte Agaroseperlen (Superose 12 (HR10/30) (Pharmacia)) mit einer Flußrate von 0,25 ml/min chromatographiert. Das Auftragsvolumen betrug 200 µl. Der Durchfluß durch die Säule wurde bei 280 nm UV-spektrophotometrisch gemessen und in Fraktionen zu 0,5 ml gesammelt. Anschließend wurde in den Fraktionen Faktor Xa, der mit der in DE 43 25 872 beschriebenen Methode in einem photometrischen Test mit chromogenem Substrat bestimmt wurde, quantitativ gemessen. Ebenso wurde die Faktor II-Aktivität wie in Beispiel 2 in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Das Resultat ist Fig. 4 zu entnehmen. Faktor Xa [Fig. 4: - ■ - Akt. Xa (FII/Xa)] und Faktor II [Fig. 4: - ● - Akt. II x 10(FII/Xa)] eluierten gemeinsam mit der Proteinfraktion [Fig. 4: — A280nm (FII/Xa)]. Unter identen Bedingungen wurde nun Faktor Xa alleine auf die Säule aufgetragen, das Elutionsprofil nach der Gelpassage durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm bestimmt [Fig. 4: ' ' ' ' ' A280nm (FXa)] und Faktor Xa-Aktivität [Fig. 4: - ▲ - Akt. Xa x10 (FXa)] in den Fraktionen nachgewiesen. Der dem Faktor Xa entsprechende Protein-Peak lag deutlich abgesetzt vom Faktor Xa im Komplex mit Faktor II. Durch Reduktion der Retentionszeit des Faktor Xa im Komplex auf der Säule und damit verbunden zur Verschiebung zu einer scheinbar höheren Molmasse, konnte der Nachweis einer Komplexbildung von Faktor II und Faktor Xa (partielle Prothrombinase) erbracht werden.

#### **BEISPIEL 9 :** **Formulierung des Präparates im Zweikammerspritzensystem**

Zur Vereinfachung der Anwendung des Mehrkomponentensystemen, wie z.B. Mischungen von Faktor II und Faktor Xa oder Faktor II, Faktor Xa und Antithrombin III, kann als Applikationsvorrichtung ein doppelter Doppelkammerspritzenkörper, wie er in AT 382 783 beschrieben ist, verwendet werden. Bei der klinischen Anwendung von lyophilisierten Mehrkomponentensystemen müßten diese sonst jeweils rekonstituiert werden und in einem definierten Verhältnis miteinander gemischt werden, bevor sie dem Patienten verabreicht werden können. Die Verfüllung der entsprechenden Lyophilisate in einem Doppelkammerspritzensystem ermöglicht eine exakte Dosierung auf eine vorherbestimmbare Aktivität des Präparates zur Behandlung von Inhibitorhaemophilie, z.B. auf konventionelle FEIBA-Einheiten, die gemäß AT 350 726 ermittelt werden können. Unter Verwendung eines solchen Systems wird die wirksame Mischung in situ bei der Injektion hergestellt. In einer Ausführungsform liegen in den beiden Doppelkammerspritzenköpfen jeweils Lyophilisate der Wirkstoffe, Faktor II und Faktor Xa, vor, die durch Zugabe des Lösungsmittels, Adest., aufgrund der leichten Löslichkeit der hochgereinigten Proteine sofort in Lösung treten und unmittelbar durch Weiterdrücken der Spritzenkolben nach Mischung im Mischkopf dem Patienten infundiert werden (siehe Fig. 1).

Aufgrund der hohen Stabilität des Faktor II in Lösung eignet sich diese auch als Lösungsmittel für den Faktor Xa in der Darreichungsform einer Doppelkammerspritze. Eine Lösung von hochgereinigtem Faktor II, z.B. hergestellt gemäß Beispiel 2, in einem physiologisch verträglichen Citratpuffer (4 g Trinatriumcitratdihydrat/l, 8 g NaCl/l, pH 7,0) in einer Konzentration von 100 E Faktor II/ml wird mit Antithrombin III, Immuno Wien, versetzt (1 mE Antithrombin III/E Faktor II). In einer Doppelkammerspritze (siehe Fig. 2) wird diese Lösung als Lösungsmittel für das gefriergetrocknete Pulver eines hochgereinigten Faktor Xa verwendet.

#### **BEISPIEL 10 :** **Stabilität des hochgereinigten Faktor II**

Faktor II wurde wie in Beispiel 2 beschrieben gereinigt und als Lösung in einer Konzentration von 60 E/ml in einem Puffer, enthaltend 4 g/l Trinatriumcitratdihydrat, 8 g/l NaCl, pH 7,0, bei 5°C, bei 22°C, bei 37°C und bei 50°C gelagert. Bei den Lagerungstemperaturen 5°C und 22°C wurden Proben jeweils alle 24 h gezogen, bei der Lagerung bei 37°C und bei 50°C erfolgten die Probenentnahmen über 24 h zum Zeitpunkt 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h. In den Proben wurde jeweils Faktor II-Aktivität bestimmt.

Bei 5°C konnten auch noch 86 Tage nach Lagerungsbeginn mehr als 80 % der Ausgangsaktivität festgestellt werden. Bei 22°C wurde über 14 Tage mehr als 80 % der Ausgangsaktivität gefunden; bei 37°C konnten 24 h nach Lagerungsbeginn 95 % der Ausgangsaktivität

wiedergefunden werden. Sogar bei 50°C wurden 8 h nach Beginn der Lagerung noch 94 % der ursprünglichen Aktivität gefunden.

**BEISPIEL 11 :**  
5      **Autoaktivierung und Stabilität der erfindungsgemäßen Präparate**

Erfindungsgemäße Präparate gemäß Beispiel 5 (Faktor II) und Beispiel 6 (Faktor II/Xa-Komplex) wurden im Vergleich zu zwei handelsüblichen Prothrombinkomplexkonzentraten in einem in vitro-Test auf ihre prothrombotischen Eigenschaften insbesondere des extrinsischen 10 Gerinnungssystems untersucht. Vor Einsatz im Test wurde das im Prothrombinkomplexkonzentrat vorhandene Heparin entsprechend der Konzentration mit Protaminsulfat neutralisiert, um thrombogene Bestandteile, die durch das Heparin maskiert würden, darzustellen.

Der Analysenansatz bestand aus 250 µl Thrombotest® (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen), einem Präparat enthaltend Thromboplastin aus Rinderhirn und adsorbiertem Rinderplasma, welches 3 min bei 37°C vorinkubiert wurde. Anschließend wurden 50 µl einer Probe 15 zugesetzt und die Gerinnungszeit mit einem Kugelkoagulometer (KC4, Amelung) bestimmt. Rinderthromboplastine gelten als besonders sensitiv für aktivierte Gerinnungsfaktoren. Entsprechend kann das Testsystem eine Aussage über die in vitro-Thrombogenität der untersuchten Präparate 20 geben. In diesem Testansatz wurde humanes Normalplasma als Kontrolle unverdünnt eingesetzt. Dieses zeigt eine Gerinnungszeit von 74 s. Die beiden untersuchten erfundungsgemäßen Präparate 25 zeigten unverdünnt eingesetzte Gerinnungszeiten von mehr als 100 s, wobei die Konzentration einer möglichen Anwendungskonzentration von 30 E Faktor II/ml entsprach. Ein handelsübliches Prothrombinkomplexkonzentrat, ebenfalls gelöst in der Anwendungskonzentration und verdünnt auf 30 E/ml, mußte mit Puffer 1 : 32 weiterverdünnt werden, um auf die Gerinnungszeit des 30 Normalplasmas (74 s) zu kommen. Ein anderes handelsübliches, aktiviertes Prothrombinkomplexbikonzentrat mußte sogar 1 : 216 mit Puffer verdünnt werden, um auf die Gerinnungszeit eines Normalplasmas von 74 s zu kommen. Anschließend wurden die erfundungsgemäßen Präparate bis zu 4 h bei Raumtemperatur gelöst gelagert und ein mal pro Stunde Proben gezogen und neuerlich 35 zu bestimmen. Dabei kam es zu keiner Veränderung, d.h. auch die Gerinnungszeit mit Thrombotest® bestimmt. Dabei zeigten die unverdünnt eingesetzten Proben immer noch Gerinnungszeiten über 100 s. nach 4 h zeigten die unverdünnt eingesetzten Proben immer noch Gerinnungszeiten über 100 s. Aus diesen Versuchen war zu ersehen, daß die erfundungsgemäßen Präparate gegenüber handelsüblichen Prothrombinkomplexkonzentraten ein deutlich geringeres Thrombogenitätspotential aufweisen.

35      **BEISPIEL 12 :**  
Lösungsverhalten des erfundungsgemäßen Präparates

Eine hochgereinigte Faktor II enthaltende Präparation wurde, wie in Beispiel 5 beschrieben, hergestellt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat war so eingestellt, daß die Volumsaktivität nach 40 Rekonstitution mit destilliertem Wasser 50 E/ml war. Dies war eine typische Anwendungskonzentration. Aufgrund der hohen Reinheit des Präparates konnten jedoch auch Anwendungskonzentrationen von 100 und mehr Einheiten Faktor II pro ml erzielt werden. Die Lösezeit Volumskonzentrationen von 100 und mehr Einheiten Faktor II pro ml erzielt werden. Die Lösezeit des Präparates, definiert als jene Zeit die von der Zugabe des Lösungsmittels (destilliertes Wasser) 45 bis zum vollständigen Auflösen des Pulvers, wurde bestimmt. Im Vergleich dazu wurden die Lyophilisate zweier handelsüblicher Präparate, nämlich Prothrombinkomplex und aktiverter Prothrombinkomplex, nach Angabe des Herstellers jeweils in der Anwendungskonzentration durch Zugabe von destilliertem Wasser rekonstituiert und ebenso die Lösezeit bestimmt. Die Lösezeit der untersuchten Präparate ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen:

| 50 | erfindungsgemäßes Präparat | APCC <sup>1</sup> | PCC <sup>2</sup> |
|----|----------------------------|-------------------|------------------|
| 55 | Lösezeit (s)               | < 30              | 240              |

<sup>1</sup>APCC = aktiviertes Prothrombinkomplexkonzentrat

<sup>2</sup>PCC = Prothrombinkomplexkonzentrat

Nach erfolgter Lösung der jeweiligen Präparate wurde von diesen jeweils ein UV/VIS-Spektrum zwischen 280 und 750 nm gegen einen Citrat-Kochsalzpuffer gemessen. Die Spektren sind Fig. 5a, b und c zu entnehmen (a: erfindungsgemäßes Präparat, b: aktiverter Prothrombinkomplex, c: Prothrombinkomplex). Der Vergleich der Spektren zeigte, daß das erfindungsgemäße Präparat im sichtbaren Bereich bis 700 nm eine deutlich niedrigere Lichtabsorption aufwies als die Vergleichspräparate. Das erfindungsgemäße Präparat zeichnete sich also durch eine hervorragende Löslichkeit aus und war in gelöster Form als klare, ungefärbte Lösung, wie für ein verbessertes pharmazeutisches Präparat charakteristisch, vorliegend.

10

#### BEISPIEL 13 :

#### Wirkung des Präparates im Faktor VIII-Inhibitorplasma

Ein hochtitriges Faktor VIII-Inhibitorplasma (55 BU/ml) wurde im Eisbad vorgekühlt und mit einem Prothrombinzeit-Meßseagens (PTT-Reagens (IMMUNO, Wien)) und der zu testenden Probe, beide ebenfalls im Eisbad vorgekühlt, in einem Verhältnis von 1 + 1 + 1 bei 37°C 1 min inkubiert. Anschließend wurde 1 Teil einer 0,05 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung zugesetzt und die Gerinnungszeit des Testansatzes mit einem Kugelkoagulometer der Fa. Amelung, Modell KC-4, bestimmt. Die zu testenden Präparationen wurden in einem Puffer, enthaltend 7 g NaCl/l und 6 g Trinatriumcitratdihydrat/l, 1 : 10 weiterverdünnnt und mit dieser Konzentration im Test eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wurde hochgereinigter Faktor II, alleine und in Kombination mit hochgereinigtem Faktor Xa, in Kombination mit Antithrombin III und Heparin getestet. Die Gerinnungszeiten sind nachfolgender Tabelle zu entnehmen.

25

| Testsubstanzen<br>(Konzentration) |           |                  |         | Gerinnungszeit<br>(s) |
|-----------------------------------|-----------|------------------|---------|-----------------------|
| Faktor II                         | Faktor Xa | Antithrombin III | Heparin |                       |
| 10 E/ml                           | -         | -                | -       | 147                   |
| 10 E/ml                           | 0,1 E/ml  | -                | -       | 63                    |
| 10 E/ml                           | 0,1 E/ml  | 1 E/ml           | -       | 55                    |
| 10 E/ml                           | 0,1 E/ml  | 1 E/ml           | 6 E/ml  | 49                    |

35

Als Kontrolle wurde die Gerinnungszeit des Testansatzes mit reinem Natriumchlorid-Trinatriumcitrat-Puffer bestimmt. Diese betrug 148 s. Somit konnte nur durch den Zusatz von Faktor II/Xa mit oder ohne Antithrombin III oder Heparin die Gerinnungszeit des Inhibitorplasmas deutlich reduziert werden. Durch Messung einer FEIBA-Standardpräparation (FEIBA STIM 4, Immuno), welche das konventionelle Präparat zur Behandlung von Faktor VIII-Inhibitorpatienten darstellt, in verschiedenen Konzentrationen im selben Testansatz konnte ermittelt werden, daß die FEIB-Aktivität des Präparates, enthaltend 10 E/ml Faktor II und 0,1 E Faktor Xa/ml, ca. 25 E FEIBA/ml entspricht.

40

#### BEISPIEL 14 :

#### In vivo-Wirkung bei Faktor VIII-Inhibitorhaemophilie

45

Zur Testung der in vivo-Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Präparates wurde ein Faktor VIII-Inhibitorhaemophilie Kaninchenmodell verwendet. Ca. 2 kg schwere, weiße Neuseeland-kaninchen wurden narkotisiert. Nach Eintritt der Narkose wurde jeweils die rechte Vena femoralis präpariert und ein permanenter venöser Zugang geschaffen. Durch diesen wurden 0,5 ml/kg Körpergewicht eines humanen Faktor VIII-Inhibitorplasmas (1500 BU/ml) über 10 min infundiert. 30 min nach Abschluß der Infusion wurde die Blutungscharakteristik unter Verwendung einer modifizierten Methode nach Giles et al., Blood 60:727-730 (1982), bestimmt. Dazu wurde das Fell um eine Kralle der Hinterpfote des Kaninchens rasiert, um zu verhindern, daß bei der späteren Blutung austretendes Blut vom Fell absorbiert wird. Die Nagelhaut wurde mittels einer

Krallenzange verletzt; unmittelbar danach wurden Filter darunter so etabliert, daß das Blut direkt auf den Filter tropfen konnte, ohne von diesem durch Kapillarwirkung aufgesogen zu werden, um zu verhindern, daß ein sich formierendes Blutgerinnsel zerstört würde. Die Filtereinheiten wurden alle 2 min gewechselt, das austretende Blut in Fraktionen gesammelt. Die Blutsammlung wurde  
5 30 min fortgesetzt, danach wurde, sofern die Blutung nicht zum Stillstand gekommen war, die Wunde verödet. Zur Quantifizierung der Blutungscharakteristik wurden die Filter mit jeweils 0,04 %iger Ammoniumhydroxidlösung über 5 h extrahiert, dabei lysierten die Erythrozyten, die mit dem Blut im Filter gesammelt wurden. Durch eine 10-minütige Ultraschallbehandlung wurde das Haemoglobin extrahiert und quantitativ, photometrisch bei 416 nm gegen eine Eichkurve bestimmt.  
10 Diese wurde so erstellt, indem Kaninchenblut in Volumina zwischen 10 µl und 1 ml auf Filter pipettiert wurden, diese wie oben extrahiert und das Haemoglobin photometrisch bei 416 nm bestimmt wurde. Die Blutungscharakteristik des Nagelschnittes wurde ermittelt, indem graphisch die Blutmengen pro 2 Minuten-Fraktion gegen die Zeit aufgetragen wurden. Zur Beurteilung wurde der kumulierte Blutverlust ermittelt, indem das Volumen der einzelnen Blutfractionen graphisch  
15 gegen die Zeit eingetragen wurde. Als für die Blutung relevantes Kriterium wurde die Steigung der kumulierten Blutung zwischen 10 und 20 min herangezogen. Dieser Wert war unabhängig von der initialen Blutmenge, die von Kaninchen zu Kaninchen je nach Krallenschnitt Schwankungen unterworfen war. Die Steigung der Blutungscharakteristik in 10 bis 20 min Beobachtungsintervallen diente als Maß für die Intensität der Blutung. Eine Steigung gleich Null bedeutete, daß die Blutung  
20 zum Stillstand gekommen war, eine Steigung >0 mit einem Korrelationskoeffizienten von >0,8, daß eine konstante Blutung vorlag. Gesunde Kaninchen wiesen unter den Testbedingungen eine Blutungsintensität von <2 µl Blut/min auf. Faktor VIII-Inhibitorkaninchen zeigten eine Blutungsintensität von ca. 50 µl Blut/min (siehe Fig. 6). Faktor VIII-Inhibitorkaninchen, die mit einer Faktor  
25 II-Präparation gemäß Beispiel 3 in einer Dosierung von 75 E/kg Körpergewicht als Infusion über 30 Minuten behandelt wurden, zeigten im Mittel ( $n = 6$ ) eine Blutungsintensität von 9,3 µl/min und somit eine signifikante Reduktion gegenüber dem unbehandelten Inhibitortier.

**BEISPIEL 15 :**  
**In vivo-Wirkung bei von Willebrand Faktor/Faktor VIII-Inhibitor**

Analog zu Beispiel 14 wurde ein von Willebrand Faktor/Faktor VIII-Inhibitormodell etabliert, indem Kaninchen ein anti-von Willebrand Faktor/Faktor VIII-Antiplasma aus der Ziege, welches durch Immunisierung von Ziegen mit einer gereinigten Faktor VIII/von Willebrand Faktor-Präparation gewonnen wurde, in einer Dosierung von 1 ml/kg Körpergewicht infundiert wurde.  
30 Derart vorbehandelte Tiere zeigten eine gesteigerte Blutungsneigung (siehe Fig. 7). Die Blutungscharakteristik wurde durch Krallenschnitte bei diesen Tieren gleichzeitig mit Infusion der Testsubstanz und 30 min nach Abschluß der Infusion der Testsubstanz gemessen. Durch Gabe von Faktor II als Bolus von 2,5 ml in einer Dosierung von 75 E/kg konnte die initial gesteigerte Blutungsintensität von 77 µl/min auf 31 µl/min (1. Krallenschnitt) bzw. 12 µl/min (2. Krallenschnitt)  
35 reduziert werden. Durch Kombination von Faktor II (75 E/kg) mit einem Faktor Xa (hergestellt gemäß Beispiel 4) in einer Dosierung von 0,55 E/kg als Bolus mit einem Injektionsvolumen von 2,5 ml konnte die Blutungsneigung vom Ausgangswert auf 18 µl/min beim 1. Krallenschnitt und 5 µl/min beim 2. Krallenschnitt reduziert werden. Damit wurde das abnorm gesteigerte Blutungsverhalten der Inhibitortiere auf das Niveau der gesunden Vergleichstiere normalisiert  
40 (4 µl/min).

Zusätzlich wurde auch die Kombination von Faktor II (75 E/kg), Faktor Xa (0,55 E/kg) und Antithrombin III, Immuno Wien, (75 mE/kg) im selben Modell untersucht. Dabei konnte beim 1. Krallenschnitt eine Reduktion auf 35 µl/min und beim 2. Krallenschnitt auf 7 µl/min erreicht werden (siehe Fig. 8). Der Zusatz von Antithrombin III sollte eine Generierung von Thrombin aus Prothrombin durch das Enzym Faktor Xa in der verabreichten Lösung verhindern.  
45

**BEISPIEL 16 :**  
**Thrombogenität des erfindungsgemäßen Präparates**

50 Die Einzelkomponenten und Mischungen derselben des erfindungsgemäßen Präparates

wurden auf ihre thrombogene Aktivität unter Verwendung der von Wessler beschriebenen Methode, J.Appl.Phys. 14:943-946 (1959), im stasierenden venösen Blut in Kaninchen getestet.

Kaninchen wurden in Pentobarbital-Narkose versetzt, die Vena jugularis der Tiere wurde freipräpariert und mit losen Ligaturen im Abstand von 1 - 2 cm versehen. Die zu testenden Substanzen wurden den Tieren in die der freipräparierten Vena jugularis gegenüberliegende Ohrvene injiziert. Die Injektion erfolgte innerhalb von 15 s. Nach einer Wartezeit von 10 - 15 s wurde das Venenstück abgeklemmt. Nach weiteren 10 min wurde das abgeklemmte Venenstück entnommen und in einem Citratpuffer in einer Petrischale aufgeschnitten und die erhaltenen Thromben mittels einer Skalierung zwischen 0 und 4 bewertet (siehe Tabelle).

10

| THROMBOSEGRAD                                |  | BEWERTUNG |
|--|--|-----------|
| keine Thrombenbildung                        |  | 0         |
| wenige kleine Thromben                       |  | 0,5 - 1   |
| wenige mittelgroße und viele kleine Thromben |  | 2         |
| viele mittelgroße Thromben                   |  | 3         |
| wenige große Thromben                        |  | 3,5       |
| ein zusammenhängender Thrombus               |  | 4         |

20

15

25

Die Substanzen wurden an jeweils sechs Tieren untersucht, die je 75 E Faktor II/kg, 0,55 E Faktor Xa/kg und 75 mE Antithrombin III/kg entweder alleine oder in Kombination erhielten. Die nachfolgende Tabelle gibt den Mittelwert des Wessler-Scores von jeweils sechs untersuchten Tiere wieder. Als Kontrolle wurde reiner Citratpuffer, der auch als Verdünnungspuffer verwendet wurde, herangezogen.

20

30

35

40

| Testsubstanz |           |                  |               |
|--------------|-----------|------------------|---------------|
| Faktor II    | Faktor Xa | Antithrombin III | Wessler Score |
| +            | -         | -                | 0,17          |
| -            | +         | -                | 0,17          |
| -            | -         | +                | 0,08          |
| +            | +         | -                | 0,25          |
| +            | -         | +                | 0,08          |
| -            | +         | +                | 0,17          |
| +            | +         | +                | 0,17          |
| -            | -         | -                | 0,2           |
| (Puffer)     | (Puffer)  | (Puffer)         |               |

Es zeigte sich, daß keine der eingesetzten Komponenten, weder alleine noch in Kombinationen, eine thrombogene Aktivität im Kaninchen aufwies.

45

#### BEISPIEL 17 :

#### Wirkung des erfundungsgemäßen Präparates in Abhängigkeit der Darreichungsform

50

Eine Faktor II und Faktor Xa enthaltende Präparation gemäß Beispiel 6 wurde in jeweils 6 Kaninchen mit induzierter Faktor VIII-Inhibitorhaemophilie (siehe Beispiel 14) auf seine Wirksamkeit getestet. Die untersuchte Dosis war wie in Beispiel 15 beschrieben. Als Kontrolle wurde den Tieren reiner Puffer infundiert.

55

Im ersten Versuch wurde eine Infusion der Testsubstanzen über 30 min, entsprechend ca. 15 ml/kg Körpergewicht, mittels einer automatischen Infusionspumpe, bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt. In einem zweiten Versuch wurde die selbe Dosis, jedoch als Bolus innerhalb von 30 s in einem kleinen Injektionsvolumen von 2,5 ml/kg

Körpergewicht den Tieren gegeben. Wie in Beispiel 14 wurde nun die Blutungsintensität während und nach erfolgter Substanzgabe gemessen. Es zeigte sich, daß sowohl bei langsamer Infusion mit einem großen Infusionsvolumen, als auch bei der schnellen Injektion einer kleinen Volumen-dosis, aber mit identen Dosen bezogen auf das Körpergewicht, die pathologisch verlängerte 5 Blutungsintensität von 67 µl/min auf ca. 5 µl/min, entsprechend dem Blutungsverhalten der gesunden Vergleichstiere, normalisiert werden konnte. Durch Gabe von Puffer, ebenso mit beiden Infusionsmodalitäten, wurde keine Änderung der Blutungsintensität gefunden. Trotz der schnellen 10 Injektion als Bolus wurde keine Unverträglichkeitsreaktion bei der Injektion, wie auch bei der langsamen Infusion beobachtet. Für handelsübliche Präparate mit vergleichbarer Indikation (aktivierte) Prothrombinkomplexpräparate werden Infusionsgeschwindigkeiten im Bereich von < 0,05 ml/min/kg Körpergewicht empfohlen, um akute thromboembolische Nebenwirkungen 15 und Unverträglichkeitsreaktionen zu vermeiden. Wie der Versuch zeigte, konnte das erfindungsgemäße Präparat aufgrund seiner hohen Reinheit mit 5 ml/min/kg Körpergewicht, also mit der 100-fachen Injektionsgeschwindigkeit, nebenwirkungsfrei verabreicht werden.

15

#### PATENTANSPRÜCHE:

1. Pharmazeutisches Gerinnungsfaktor-Präparat zur Behandlung von Blutgerinnungs-störungen, enthaltend mindestens 2 hochgereinigte Einzelfaktoren, die Bestandteile einer Prothrombinase oder Pro-Prothrombinase und frei von Phospholipiden sind.
2. Präparat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Faktoren aktiviert ist.
3. Präparat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens zwei Gerinnungsfaktoren, ausgesucht aus der Gruppe bestehend aus den Faktoren II, V, Va, X und Xa, enthält.
4. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es im wesentlichen aus den Faktoren II und V bzw. Va besteht.
5. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es im wesentlichen aus den Faktoren X und V bzw. Va besteht.
6. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es im wesentlichen aus den Faktoren II und X, gegebenenfalls in Kombination mit Faktor V bzw. Va besteht.
7. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Gerinnungsfaktoren als Komplex vorliegen.
8. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es Magnesiumionen enthält.
9. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es keine freien Calciumionen enthält.
10. Präparat nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Chelatbildner zum Komplexieren von freien Calciumionen enthält.
11. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß es im wesentlichen aus gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa als aktiven Komponenten besteht und frei von Phospholipiden ist.
12. Präparat nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß es bei einer Dosis von mindestens 150 E Prothrombin/kg frei an thromboembolischen Nebenwirkungen, ausgedrückt durch einen Score im Wessler-Thrombosemodell von höchstens 3 Punkten, ist.
13. Präparat nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß es Prothrombin mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 5 E/mg Protein enthält.
14. Präparat nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß es Faktor Xa mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 100 E/mg Protein enthält.
15. Präparat nach einem der Ansprüche 11 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß es Faktor Xa vorwiegend als Faktor Xaβ enthält.
16. Präparat nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß Prothrombin

- und Faktor Xa als Komplex vorliegen.
17. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß es weiters Antithrombin III in stabilisierenden Mengen, gegebenenfalls gemeinsam mit Heparin, enthält.
- 5       18. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß es bei einer Dosis von mindestens 150 E Prothrombin/kg frei an thromboembolischen Nebenwirkungen, ausgedrückt durch einen Score im Wessler-Thrombosemodell von höchstens 3 Punkten, ist.
- 10      19. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß es weniger als 0,1 E Faktor VIII:C oder Faktor VIII:Ag/E Prothrombin enthält.
- 20      20. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß es weniger als 0,1 E Faktor IX/E Prothrombin enthält.
- 15      21. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß es weniger als 0,1 E Faktor X/E Prothrombin enthält.
- 25      22. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß es weniger als 0,01 mg Phospholipide/E Prothrombin enthält.
- 30      23. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 22 in einer Darreichungsform, welche eine Dosis von mindestens 50 E Prothrombin/kg Körpergewicht umfaßt und gegebenenfalls eine Bolus-Injektion erlaubt.
- 35      24. Präparat nach Anspruch 23 in einer Darreichungsform, welche eine Dosis von 50 bis 500 E Prothrombin/kg Körpergewicht umfaßt.
- 40      25. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Gerinnungsfaktoren durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt sind.
- 45      26. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß es als Lyophilisat vorliegt, welches vorzugsweise zu einer optisch klaren Lösung rekonstituiert werden kann.
- 50      27. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß es in einer geeigneten Applikationsvorrichtung vorliegt, vorzugsweise als Lyophilisat in einer Spritze, welche eine in situ-Rekonstitution mit einer pharmazeutisch akzeptablen Lösung erlaubt.
28. Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß es virusaktiviert bzw. virusabgereichert ist.
29. Komplex, bestehend aus Prothrombin, Faktor Xa und gegebenenfalls Faktor V bzw. Va.
30. Komplex, bestehend aus Prothrombin und Faktor V bzw. Va.
31. Komplex, bestehend aus Faktor X und Faktor V bzw. Va.
32. Präparat, enthaltend einen Komplex nach einem der Ansprüche 29 bis 31 und weiters Calciumionen.
33. Diagnostisches Präparat, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 28 bzw. einen Komplex nach einem der Ansprüche 29 bis 32 und weiters Thrombin und gegebenenfalls Phospholipide enthält.
34. Verwendung von gereinigten Prothrombinase-Faktoren, insbesondere von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Etablierung von supranormalen Prothrombin-Konzentrationen im Blut eines Patienten.
35. Verwendung nach Anspruch 34, wobei die supranormale Konzentration mindestens 1,5 E Prothrombin/ml Blut, vorzugsweise mindestens 2 E/ml, beträgt.
36. Verwendung von gereinigten Prothrombinase-Faktoren, insbesondere von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa, zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung von Faktor VIII-Inhibitorzuständen, Hämophilie A oder B oder von Willebrand-Krankheit.

50

HIEZU 8 BLATT ZEICHNUNGEN

55

FIG. 1

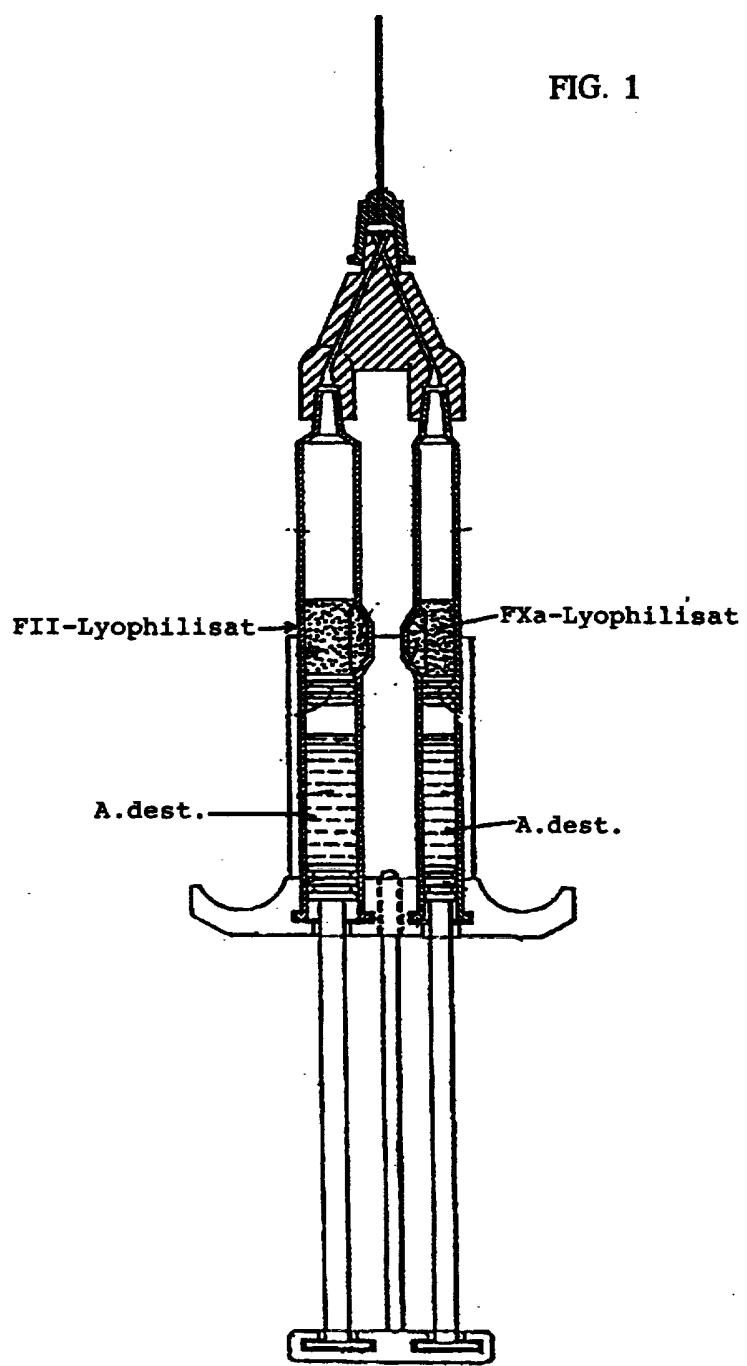
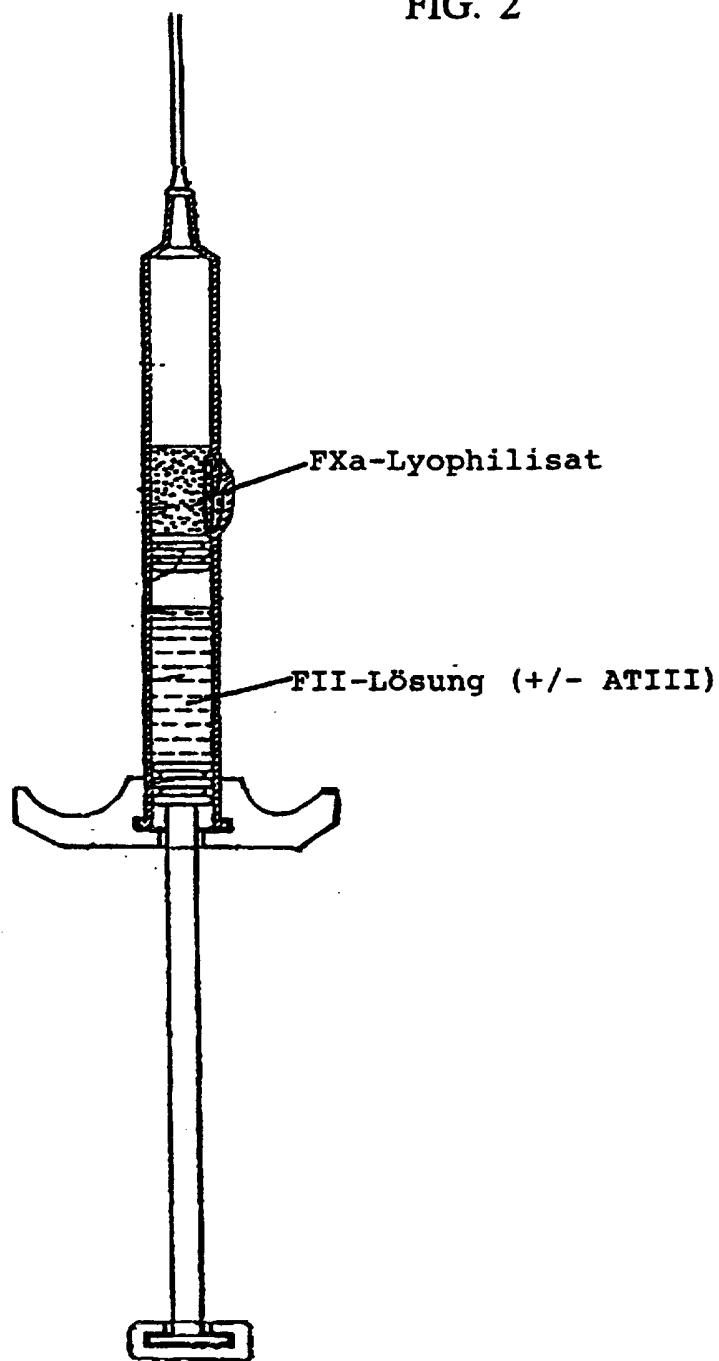


FIG. 2



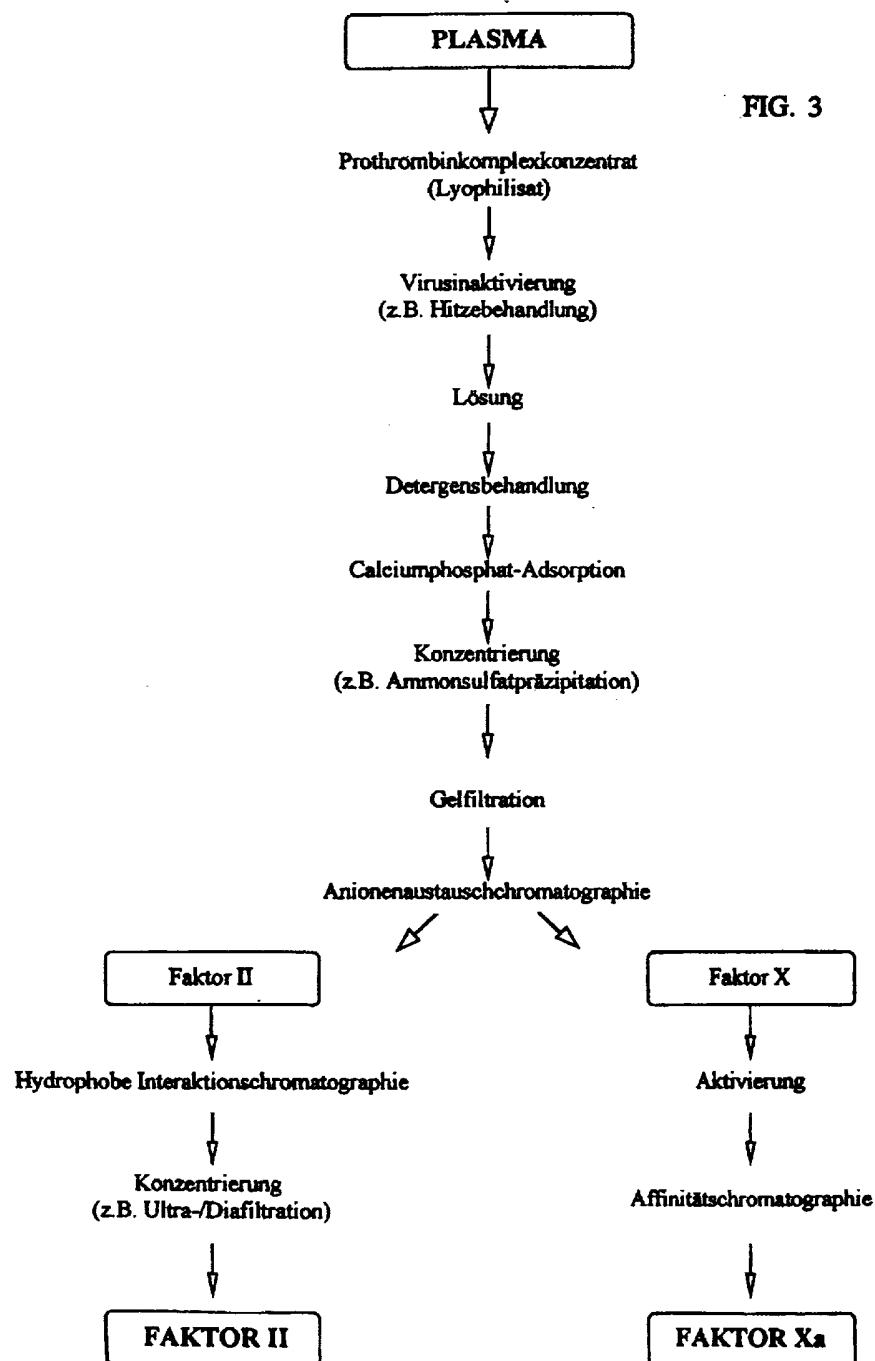


FIG. 4  
Gelfiltration: Superox-12 (HR10/30)

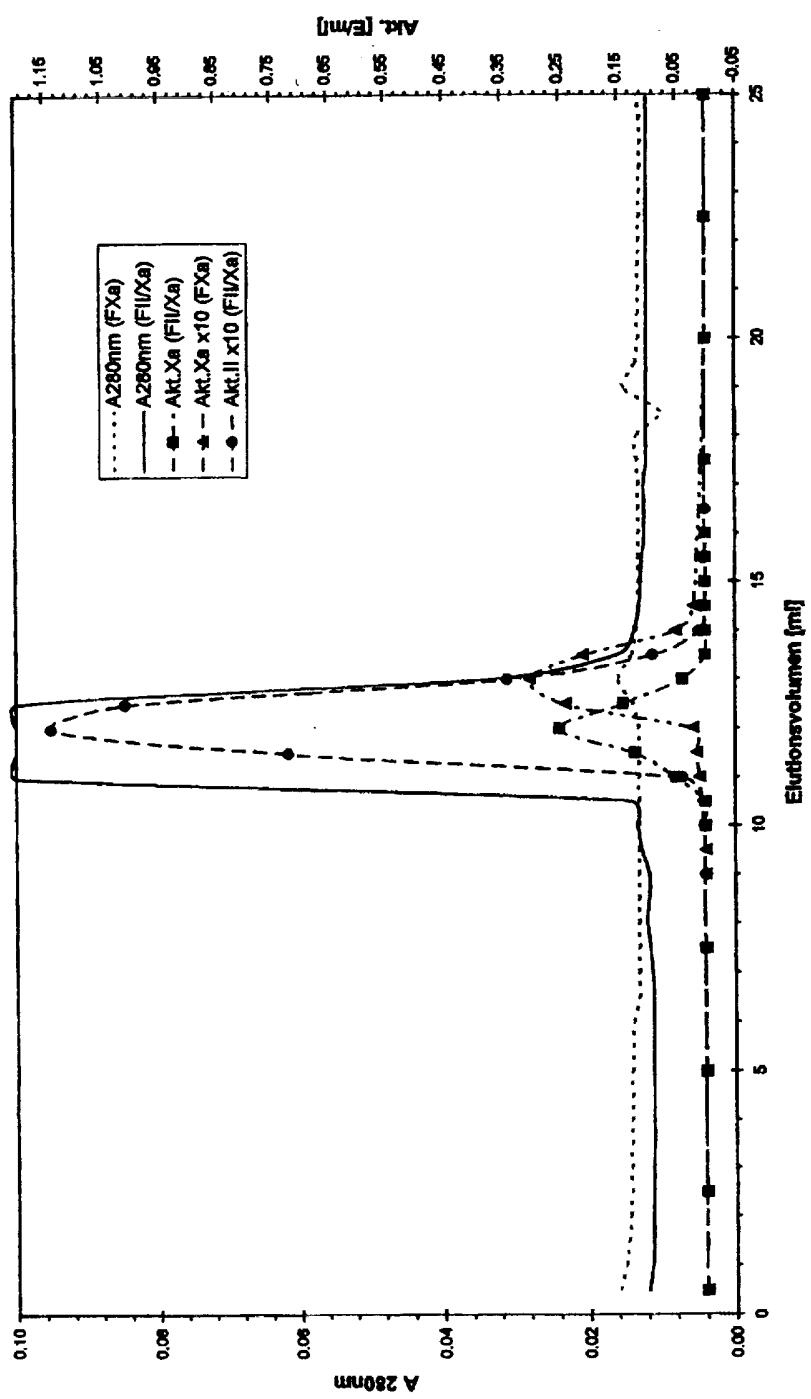
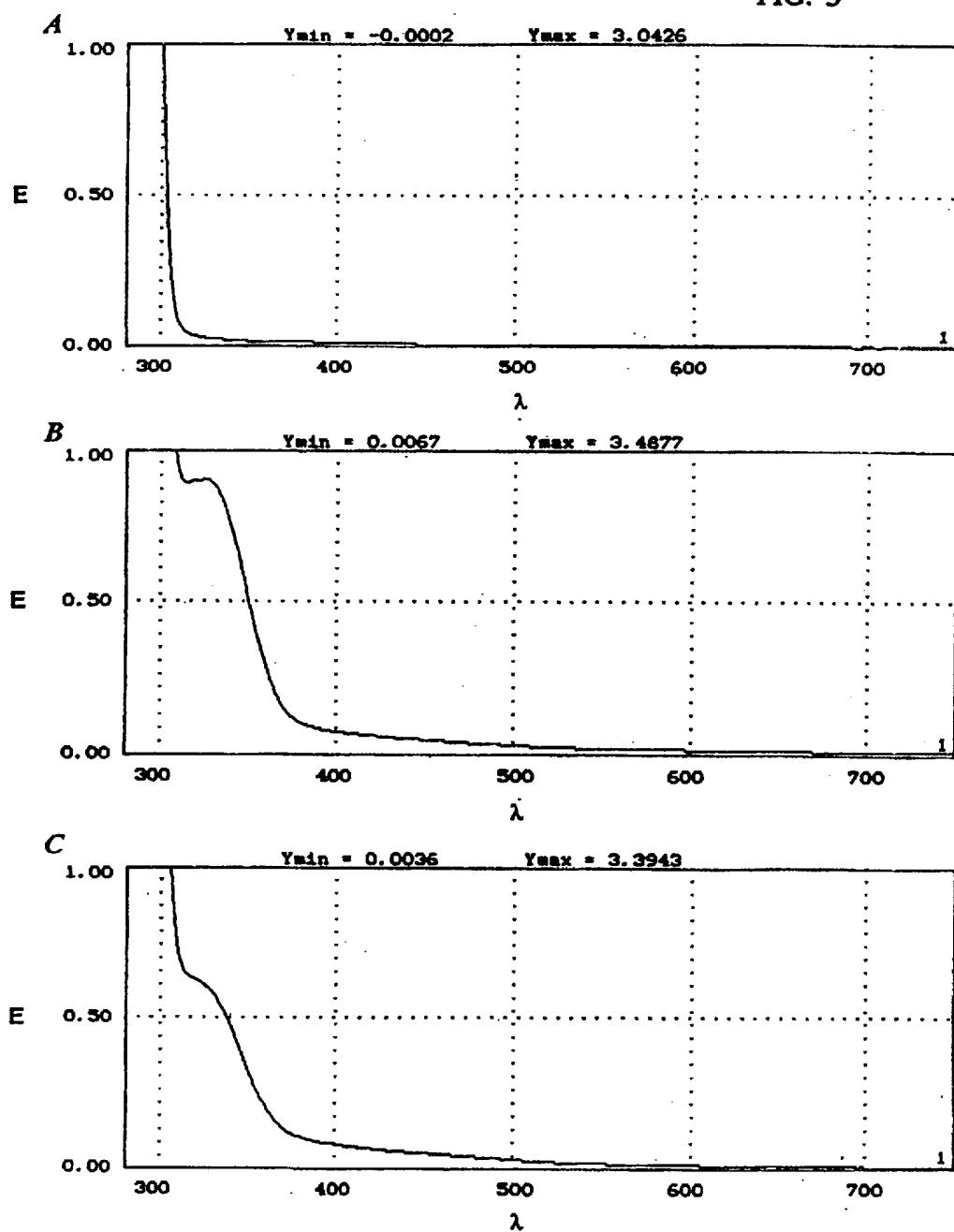


FIG. 5



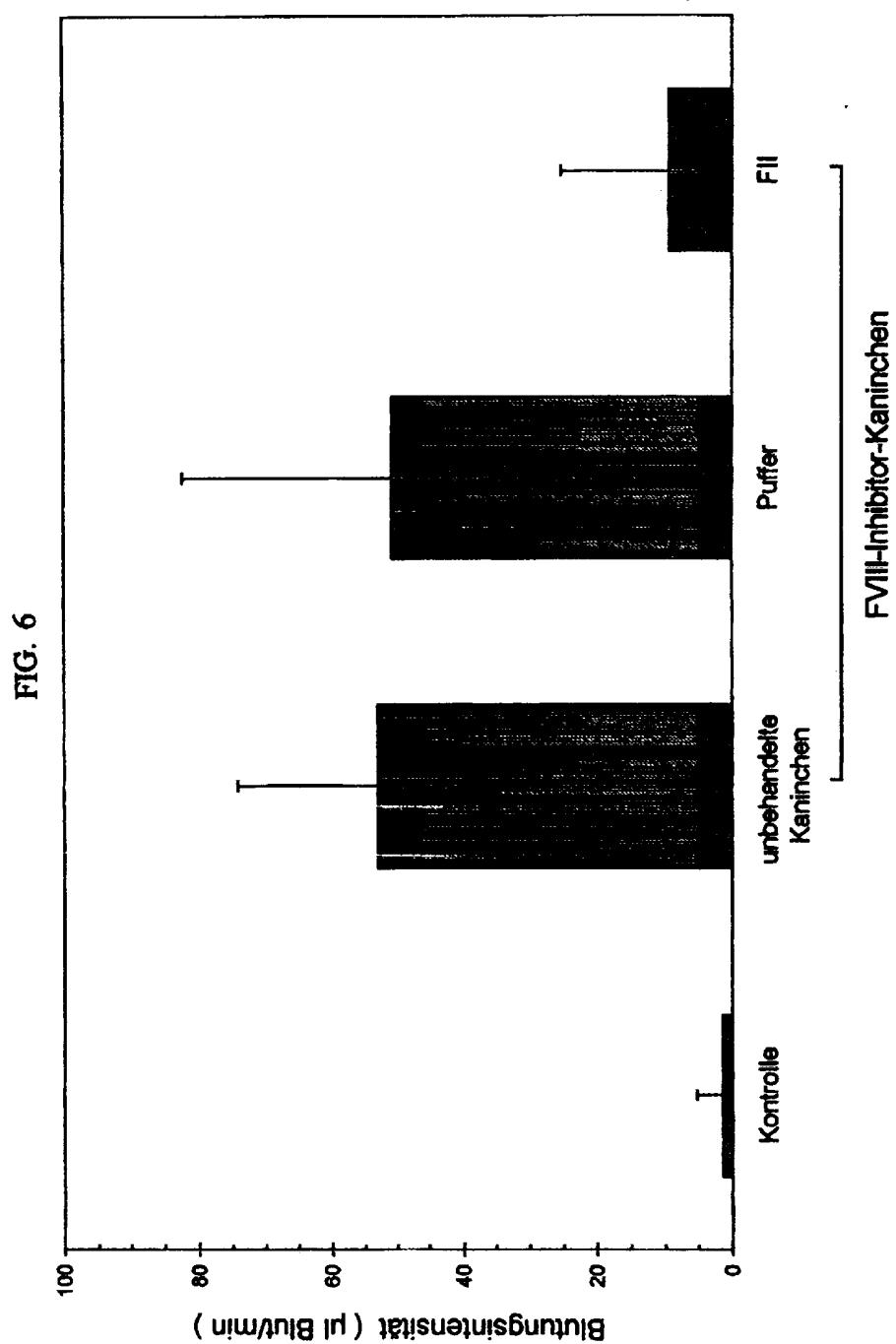


FIG. 7

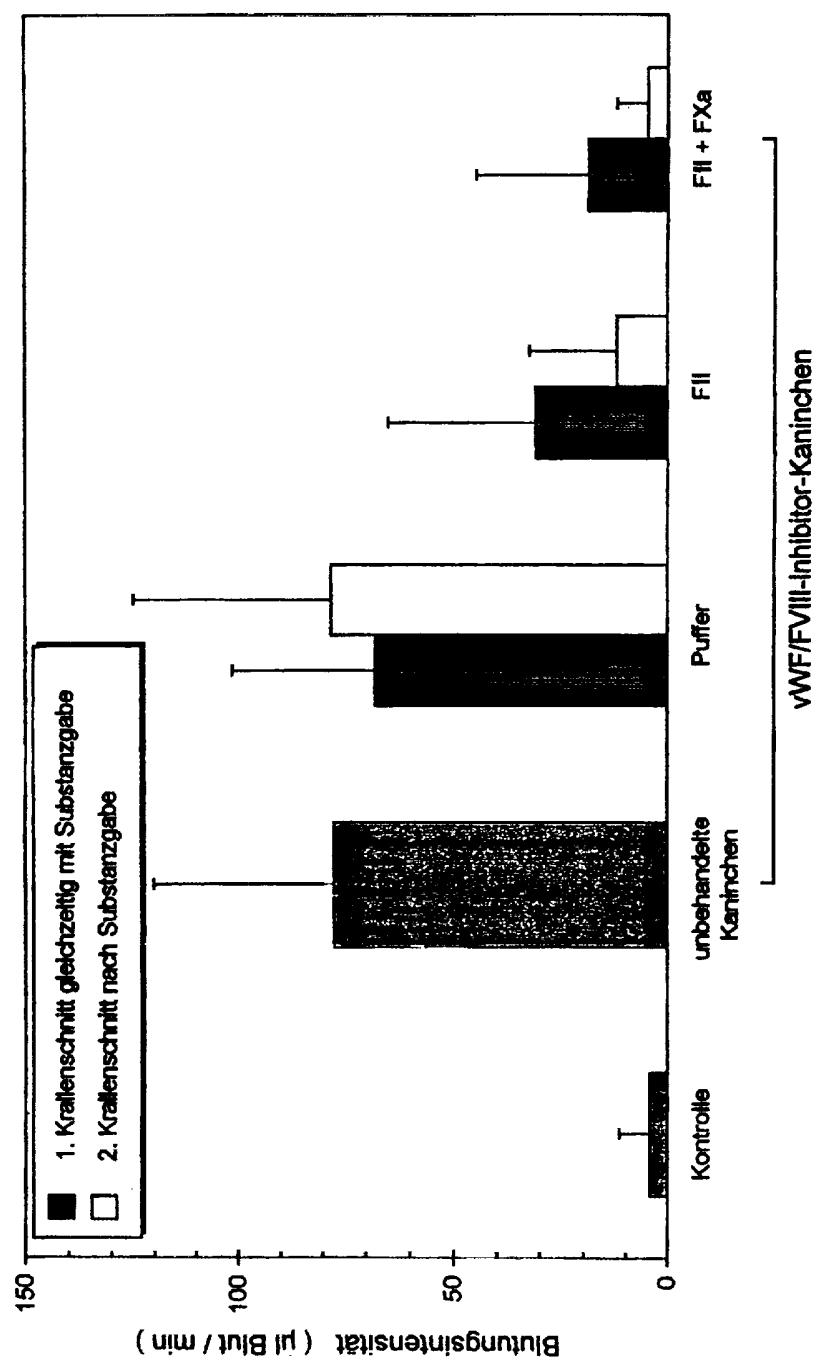


FIG. 8

