



(12)

# PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 518/96

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> : **A61K 38/36**  
A61K 38/48

(22) Anmeldetag: 20. 3.1996

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 6.1998

(45) Ausgabetag: 25. 1.1999

(56) Entgegenhaltungen:

US 4501731A DE 4430205A1

(73) Patentinhaber:

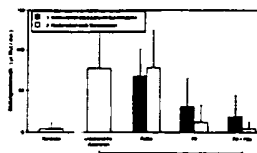
IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1221 WIEN (AT).

(72) Erfinder:

TURECEK PETER DR.  
KLOSTERNEUBURG, NIEDERÖSTERREICH (AT).  
SCHWARZ HANS-PETER  
WIEN (AT).

(54) PHARMAZEUTISCHES PRÄPARAT ZUR BEHANDLUNG VON BLUTGERINNUNGSSTÖRUNGEN

(57) Beschrieben wird ein pharmazeutisches Präparat zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, welches gereinigtes Prothrombin und gereinigten Faktor Xa als aktive Komponenten enthält.



Die vorliegende Erfindung betrifft ein pharmazeutisches Präparat, insbesondere zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, enthaltend Prothrombin und Faktor Xa.

Haemophilie A entsteht durch einen X-chromosomal-rezessiv-erblichen Mangel an Faktor VIII und manifestiert sich in schweren Blutgerinnungsstörungen. Zur aktuellen Blutstillung werden meist gerinnungs-aktive 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 Inhibierung 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:

#### 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.

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

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

#### 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.

#### 4.) APCC und Derivate:

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

Basierend auf den aktivierten Prothrombinkomplexfaktoren-Konzentraten wurde ein Bestandteil, welcher in diesen u.a. auch enthalten ist, nämlich aktivierter 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)). 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 Thrombogenizitäts-Risiko darstellen.

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.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß mit einer pharmazeutischen Präparation zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen enthaltend gereinigtes Prothrombin und gereinigten Faktor Xa als aktive Komponenten gelöst. Die Komponenten sind zumindest so weit gereinigt, daß sie von endogenen, d.h. aus dem Ausgangsmaterial stammenden, Phospholipiden befreit sind.

Das erfindungsgemäße Kombinationspräparat aus Prothrombin und Faktor Xa zeigt eine FEIBA-vergleichbare biologische Wirksamkeit in Tiermodellen 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-Inhibitor Kaninchen gänzlich normalisieren. Durch das Bereitstellen von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa ist die Toxizität des erfindungsgemäßen Präparates im Vergleich zu FEIBA deutlich reduziert. Die effektive Kombination von Faktor Xa und Prothrombin ist im Wessler-Thrombose-Modell (J.Appl.Phys. 14 (1959), 943-946) 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 es wird 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 Xa-Präparation sollte vorzugsweise eine spezifische Aktivität von mindestens 100 E/mg Protein aufweisen, wobei Faktor Xa vorzugsweise vorwiegend als Faktor Xa $\beta$  enthalten ist.

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 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 Prothrombin und Faktor Xa, 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.

Überraschenderweise wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch festgestellt, daß ein pharmazeutisches Präparat, enthaltend gereinigtes Prothrombin als einzige aktive Komponente eine dem erfindungsgemäßen Kombinationspräparat vergleichbare Wirkung bei der Behandlung von Gerinnungsstörungen aufweist und dies, obwohl mit Prothrombin alleine in vitro keine Verkürzung der Gerinnungszeit eines Faktor VIII-Inhibitorplasmas erzielt werden konnte.

Damit wird erstmals eine medizinische Indikation für eine pharmazeutische Präparation, die Prothrombin als einzige Wirkstoffkomponente beinhaltet, aufgezeigt.

Vorzugsweise ist das Prothrombin im erfindungsgemäßen Präparat 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.

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.

Obwohl das Präparat in Kombination mit Phospholipiden eingesetzt werden kann, ist gemäß einer weiteren bevorzugten Variante des erfindungsgemäßen Präparates dieses frei an zugesetzten Phospholipiden und enthält weniger als 0,01 mg Phospholipide/E Prothrombin, was aufgrund der möglichen thrombogenen Wirkung von Phospholipiden zu einer weiteren erheblichen Verringerung des Thrombogenizitätsrisikos führt. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Präparat frei von nachweisbarem Phospholipid.

Die Dosierung des erfindungsgemäßen Präparates 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 der AT 350726 B beschrieben wird, auf 50 % des Leerwertes reduziert. Die Vorteile des erfindungsgemäßen Präparates 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, das erfindungsgemäße Präparat in einer Dosis zu verabreichen, welche 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.

Üblicherweise wird das erfindungsgemäße Präparat in einer Dosis von 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.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher auch Darreichungsformen des erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparates, welche eine Dosis von mindestens 50 E Prothrombin/kg Körpergewicht, vorzugsweise zwischen 50 und 500 E/kg Körpergewicht, umfassen.

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 Behälter 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)). Beispielfür nicht-wässrige Lösungen sind Propylenglykol, Polyethylenglykol, pflanzliche Öle und injizierbare organische Ester, wie Ethyloleat. Wässrige Träger sind beispielsweise Wasser, gegebenenfalls mit Alkohol gemischt, Salzlösungen (NaCl), Ringer's Dextrose, etc.. Als Konservierungsstoffe können antimikrobielle Substanzen, Antioxidantien, Chelatbildner oder Inertgase verwendet werden.

Prothrombin bzw. Faktor Xa können sowohl plasmatischen Ursprungs als auch durch rekombinante DNA-Technologie hergestellte Proteine sein. Wesentlich ist in beiden Fällen, daß sie in gereinigter Form, insbesondere in einer von endogenen und exogenen Phospholipiden befreiter Form im pharmazeutischen Präparat vorliegen.

Bevorzugterweise wird das erfindungsgemäße pharmazeutische Präparat in lyophilisierter Form zur Verfügung gestellt, was die bekannten Transport-, Lagerungs- und Applikationsvorteile mit sich bringt. Als

Rekonstitutionslösung bietet sich eine pharmazeutisch akzeptable Lösung an, die gegebenenfalls ATIII bzw. Heparin enthält. Durch den hohen Reinheitsgrad der Komponenten des erfindungsgemäßen Präparates können diese nach geringer Lösungszeit, vorzugsweise unter 5 min, insbesondere unter 1 min, zu einer optisch klaren Lösung mit 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.

Das erfindungsgemäße Präparat ist im Gegensatz zu den bisher bekannten Präparaten zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen außerordentlich stabil, d.h., es kann für eine längere Zeitperiode vor der Verabreichung stehen gelassen werden. Beispielsweise sollte FEIBA im verabreichungsfertigen Zustand gemäß der Produktinformation nicht länger als 1 Stunde stehen gelassen werden, wohingegen das erfindungsgemäße Präparat als gebrauchsfertige Lösung auch während eines Zeitraums von 3 Stunden oder länger bei Raumtemperatur keinerlei Thrombogenizität bzw. Gerinnungsaktivierung zeigt, weshalb das erfindungsgemäße Präparat auch als Infusionslösung zur Verfügung gestellt werden kann, das auch über einen Zeitraum von mehreren Stunden verabreicht werden kann. Aus den gleichen Gründen ist es auch möglich, das erfindungsgemäße Präparat 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 dem erfindungsgemäßen Präparat auftritt.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das pharmazeutische Präparat in geeigneten Applikationsvorrichtungen vorgegeben, vorzugsweise als Lyophilisat in Spritzen, welche eine in situ-Rekonstitution mit einer pharmazeutisch akzeptablen Lösung erlauben. Es empfiehlt sich eine Applikationsvorrichtung, wie in Fig. 1 gezeigt, worin die Lyophilisate von 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.

Das pharmazeutische Präparat gemäß der vorliegenden Erfindung kann, insbesondere wenn es aus plasmatischen Proteinen oder Zellkulturen gewonnen wird, einer oder mehreren Virus-Inaktivierungsbehandlungen bzw. Behandlungen zur Virus-Abreicherung unterzogen werden, beispielsweise einer chemischen oder chemischphysikalischen Behandlung, einer Hitze- und/oder Detergensbehandlung 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.

Das erfindungsgemäße Präparat ermöglicht 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 des erfindungsgemäßen Präparates und dessen Freiheit an thrombogenen Nebenwirkungen bzw. das Ausbleiben einer anaphylaktischen Reaktion, welche zur Verstärkung des Inhibitoriters 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 Selbstinjektion, eventuell subkutan, ambulant behandeln.

Die Prothrombin-Komponente des erfindungsgemäßen Kombinationspräparates kann durch ein Verfahren hergestellt werden, bei welchem ein Prothrombinkomplekonzentrat einer chromatographischen Reinigung unterzogen wird und die Fraktion, enthaltend Prothrombin, zu einer pharmazeutischen Präparation verarbeitet wird. Mit diesem Verfahren wird eine Prothrombin-Präparation erhalten, die die Anforderungen

an die Reinheit für das erfindungsgemäße pharmazeutische Präparat, insbesondere was die mit dem Wessler-Test ermittelte Nebenwirkungsfreiheit anbelangt, voll erfüllt.

Insbesondere wird dieses Verfahren durch die Kombination der folgenden Schritte vorgenommen:

- Bereitstellen eines Prothrombinkomplexpräparates in festem Zustand oder als Prothrombin-hältige Lösung,
- Virusinaktivierungsbehandlung, vorzugsweise durch Hitzebehandlung, insbesondere in festem Zustand,
- gegebenenfalls Lösen des Prothrombinkomplexpräparates, wobei eine Prothrombin-hältige Lösung erhalten wird,
- 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,
- 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-haltigen Lösung zu einem pharmazeutischen Präparat.

Als Erdalkalisalz können dabei vorzugsweise Kalziumphosphat, 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-Sephacel®), Anionenaustauscher auf Basis von quervernetztem Dextran mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sephadex®), Anionenaustauscher auf Agarosebasis mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sephacel CL6B®, DEAE-Sephacel Fast Flow®), Anionenaustauscher auf Basis von quervernetztem Dextran mit Diethyl[2-hydroxypropyl] aminoethyl-Gruppen (QAE-Sephadex®), Anionenaustauscher auf Agarosebasis mit  $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen (Q-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 als funktionellem Anionenaustauscher (DEAE-Tris-Acryl®), nicht kompressible Silica-Dextran-Matrizes, bei welchen poröses Silicagel in einer quervernetzten Dextranmatrix eingebettet ist, mit reaktiven Diethylaminoethylanionenaustauscherguppen (DEAE-Spherodex®), Gele aus rigiden Polystyrolpartikeln, deren Poren mit einem Hydrogel gefüllt sind, welches quarternäre Amingruppen mit starker Anionenaustauscherwirkung trägt (Q-Hyper-D®) (alle Fa. Sepracor); rigide macroporöse hydrophile Oberflächen mit  $\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  oder  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen (Macroprep DEAE®, Macroprep Q® (alle Fa. BioRad);

Anionenaustauscher mit Diethylaminoethyl-Diethyl(2-hydroxypropyl)aminoethyl und  $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppen (DEAE-Toyopearl®, QAE-Toyopearl®, Toyopearl Super-Q® (alle Fa. Tosohaas), Anionenaustauscherharze bestehend aus porösem Polymethacrylat/Polyacrylat-Gel (Protein PAK DEAE®, Fa. Waters); Anionenaustauscher auf Basis von Copolymeren bestehend aus Oligoethylenglycol-dimethylacrylat, 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).

Als Gel für die hydrophobe Interaktionschromatographie wird vorzugsweise ein hydrophobes Gel auf Basis von Agarose mit Phenyl-Gruppen (Phenyl-Sepharose High Performance®; (Fa. Pharmacia), 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), Copolymere bestehend aus Oligoethylenglycol-dimethylacrylat, Glycidyl-methacrylat und Pentaerythrit-Dimethylacrylat mit einer hydrophilen Oberfläche (Fractogel TSK-Butyl®; Fa. MERCK), 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. Tosohaas)), eingesetzt.

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

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.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung 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.

Es zeigte sich, daß mit dem erfindungsgemäßen Präparat solche supranormalen Faktor II-Levels sogar permanent, d.h. über längere Zeiträume erhalten werden können, was einestheils darauf zurückzuführen ist, daß Prothrombin eine für Blutgerinnungsfaktoren sehr hohe Halbwertszeit als Medikament aufweist und andererseits auch in der Nebenwirkungsfreiheit der erfindungsgemäßen Präparation besteht, so daß sogar eine subkutane Verabreichung etwa durch Depotverabreichung möglich ist. Die supranormalen Konzentrationen von Prothrombin, die im Blut durch Gabe von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa 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.

Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung 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 dem erfindungsgemäßen Präparat eine rasche, effiziente und Nebenwirkungsfreie Behandlung möglich ist.

Das erfindungsgemäße Präparat wird bevorzugt in einer Lösung mit physiologischem pH zur Verfügung gestellt, welche vorzugsweise keine freien Calciumionen enthält. Es ist aber auch möglich, einen vom Faktor Xa-Optimum entfernten sauren Puffer zu verwenden, mit welchem die Stabilität des Kombinationspräparates nochmals gesteigert werden kann. Es versteht sich, daß sämtliche für Faktor II und Xa geeigneten pharmazeutischen Zusatzstoffe und Lösungen zur verabreichungsfertigen Herstellung des erfindungsgemäßen Präparates verwendet werden können.

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

Es zeigen:

- Fig. 1 eine mögliche Darreichungsformen des erfindungsgemäßen Präparates;
- Fig. 2 eine Einzelkomponentenspritze;
- Fig. 3 das Flußdiagramm einer Ausführungsform des Herstellungsverfahrens für die Prothrombin-Komponente;
- Fig. 4 den Nachweis des partiellen Prothrombinasekomplexes;
- Fig. 5 die spektroskopische Analyse eines Beispiels des erfindungsgemäßen Präparates (A) im Vergleich zu Standardpräparaten [aktivierter Prothrombinkomplex (B), Prothrombinkomplex (C)];
- Fig. 6 die in vivo-Wirkung einer Faktor II-Präparation auf Faktor VIII-Inhibitorkaninchen;
- Fig. 7 und Fig. 8 die in vivo-Wirkung des erfindungsgemäßen Präparates 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 enthält, wurde nach der Methode von Brummelhuis, H.G.J., Preparation of the Prothrombin-complex. 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 X/l enthielt, und auf pH 7,0 eingestellt. Nach Zusatz von 12 % (v/v) Polyoxyethylen sorbitan monooleat (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 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 einen Anionenaustauscher auf Basis von Agarose mit Diethylaminoethyl-Gruppen (DEAE-Sepharose FF®, Fa. Pharmacia), unterzogen. Die Fraktionen wurden auf einer Säule (Innendurchmesser : Gelbetthöhe = 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 hydrophobes Gel auf Basis von Agarose mit Phenyl-Gruppen (Phenylsepharose High Performance®, Fa. Pharmacia), adsorbiert, wobei 3 g Protein/l Gel gebunden wurden. In einer Säule mit einem Verhältnis Innendurchmesser : Gelbetthöhe = 1 : 1,9 wurde bei einem linearen Fluß von 0,25 cm/min die Proteinfraction adsorbiert und anschließend durch Waschen mit 11,5 Säulenvolumina von 3 M - 0,9 M NaCl, pH 7,4) vom Inertprotein befreit. Durch Gradientenelution mit 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-Fractionen 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 Reagenkombination 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**

5

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.

10

Die Prothrombinkomplexfaktorenpräparation wurde wie in Beispiel 1 gelöst und mit Detergens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde durch Ionenaustauschchromatographie auf einem Anionenaustauscher auf Basis von Agarose mit Diethylaminoethyl-Gruppen (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 einem hydrophoben Chromatographie material mit Butyl-Gruppen (Butyl-Toyopearl®, Fa. Toso Haas) die Faktor IX-enhaltende Fraktion entfernt. Der Adsorptionsüberstand wurde anschließend an ein hydrophobes Gel auf Basis von Agarose mit Phenyl-Gruppen (Phenyl-Sepharose High Performance®, Fa. Pharmacia), durch eine weitere hydrophobe Interaktionschromatographie gereinigt, wobei ca. 4 g Protein/l Gel adsorbiert werden konnten. In einer Säule mit einem Verhältnis Innendurchmesser : Gelbetthöhe = 1 : 1,9 wurde bei einem linearen Fluß von 0,25 cm/min die Proteinfraction 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 eine Hydroxylapatit-Oberfläche (Ceramik-Hydroxylapatit®, Fa. Biorad), adsorbiert. Dies erfolgte auf einer Säule mit einem Verhältnis Innendurchmesser : Gelbetthöhe = 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 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.

30

**BEISPIEL 4 :**

35

**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.

40

**BEISPIEL 5:**

45

**Gefriertrocknung 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.

50

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

55

Eine gemäß Beispiel 3 hergestellte Faktor II-Präparation wurde in einer Konzentration von 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.

5

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

10

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.

15

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

20 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 Gelpermeationschromatographie über quervernetztes Agarose perlen (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 der 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 Proteinfraction [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.

40

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

45 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 der AT 382 783 B 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 Doppelkammerspritzen-  
50 zensystem ermöglicht eine exakte Dosierung auf eine vorherbestimmbare Aktivität des Präparates zur Behandlung von Inhibitorhaemophilie, z.B. auf konventionelle FEIBA-Einheiten, die gemäß der AT 350 726 B ermittelt werden können. Unter Verwendung eines solchen Systemes wird die wirksame Mischung in situ bei der Injektion hergestellt. In einer Ausführungsform liegen in den beiden Doppelkammerspritzenkörpern  
55 jeweils Lyophilisate der Wirkstoffe, Faktor II und Faktor Xa, vor, die durch Zugabe des Lösungsmittels, A. dest., 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  
 5 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 :

##### 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  
 15 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  
 20 50 °C wurden 8 h nach Beginn der Lagerung noch 94 % der ursprünglichen Aktivität gefunden.

#### BEISPIEL 11 :

##### Autoaktivierung und Stabilität des erfindungsgemäßen Präparates

25 Ein Prothrombinpräparat gemäß Beispiel 5 und ein erfindungsgemäßes Präparat gemäß 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 Gerinnungssystems untersucht. Vor Einsatz im Test wurde das im Prothrombinkomplexkonzentrat vorhandene Heparin  
 30 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 zugesetzt und die Gerinnungszeit mit  
 35 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 geben. In diesem Testansatz wurde humanes Normalplasma als Kontrolle unverdünnt eingesetzt. Dieses zeigt eine Gerinnungszeit von 74 s. Die gemäß Beispiel 5 und 6 hergestellten Präparate zeigten unverdünnt eingesetzt Gerinnungszeiten von mehr als 100 sek, wobei die  
 40 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 Normalplasmas (74 s) zu kommen. Ein anderes handelsübliches, aktiviertes Prothrombinkomplexkonzentrat mußte sogar 1 : 216 mit Puffer verdünnt werden, um auf die Gerinnungszeit eines Normalplasmas von 74 s zu kommen.  
 45 Anschließend wurden die gemäß Beispiel 5 und 6 hergestellten Präparate bis zu 4 h bei Raumtemperatur gelöst gelagert und ein mal pro Stunde Proben gezogen und neuerlich die Gerinnungszeit mit Thrombotest® bestimmt. Dabei kam es zu keiner Veränderung, d.h. auch nach 4 h zeigten die unverdünnt eingesetzten Proben immer noch Gerinnungszeiten über 100 sek. Aus diesen Versuchen war zu ersehen, daß das erfindungsgemäße Präparat gegenüber handelsüblichen Prothrombinkomplexkonzentraten ein  
 50 deutlich geringeres Thrombogenitätspotential aufweisen.

#### BEISPIEL 12 :

##### Lösungsverhalten des Prothrombin-Präparates

55 Eine hochgereinigten Faktor II enthaltende Präparation wurde, wie in Beispiel 5 beschrieben, hergestellt und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat war so eingestellt, daß die Volumsaktivität nach Rekonstitution mit destilliertem Wasser 50 E/ml war. Dies war eine typische Anwendungskonzentration. Aufgrund der hohen

Reinheit des Präparates konnten jedoch auch 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) bis zum vollständigen Auflösen des Pulvers, wurde bestimmt. Im Vergleich dazu wurden die Lyophilisate zweier handelsüblicher Präparate, nämlich Prothrombinkomplex und aktivierter 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:

	Prothrombin- Präparat	APCC <sup>1</sup>	PCC <sup>2</sup>
<b>Lösezeit(s)</b>	< 30	240	300

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

<sup>2</sup>PCC = Prothrombinkomplekonzentrat

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: aktivierter Prothrombinkomplex, c: Prothrombinkomplex). Der Vergleich der Spektren zeigte, daß das Prothrombin-Präparat im sichtbaren Bereich bis 700 nm eine deutlich niedrigere Lichtabsorption aufwies als die Vergleichspräparate. Das Prothrombin-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.

### BEISPIEL 13 :

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

Ein hochtitriges Faktor VIII-Inhibitorplasma (55 BU/ml) wurde im Eisbad vorgekühlt und mit einem partielle Thromboplastinzeit-Reagens (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 weiterverdünnt 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.

Testsubstanzen (Konzentration)				Gerinnungszeit (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

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.

**BEISPIEL 14 :****In vivo-Wirkung bei Faktor VIII-Inhibitorhaemophilie**

- 5 Zur Testung der in vivo-Wirksamkeit des erfindungsgemäßen Präparates wurde ein Faktor VIII-Inhibitorhaemophilie Kaninchenmodell verwendet. Ca. 2 kg schwere, weiße Neuseelandkaninchen 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 human Faktor VIII-Inhibitorplasmas (1500 BU/ml) über 10 min infundiert. 30 min nach Abschluß der Infusion wurde die
- 10 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
- 15 verhindern, daß ein sich formierendes Blutgerinnsel zerstört würde. Die Filtereinheiten wurden alle 2 min gewechselt, das austretende Blut in Fraktionen gesammelt. Die Blutsammlung wurde 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-
- 20 minütige Ultraschallbehandlung wurde das Haemoglobin extrahiert und quantitativ, photometrisch bei 416 nm gegen eine Eichkurve bestimmt. 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
- 25 kumulierte Blutverlust ermittelt, indem das Volumen der einzelnen Blutfraktionen graphisch 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
- 30 Steigung gleich Null bedeutete, daß die Blutung 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 II-Präparation gemäß Beispiel 3 in einer Dosierung von 75 E/kg Körpergewicht als Infusion über 30 Minuten
- 35 behandelt wurden, zeigten im Mittel (n = 6) eine Blutungsintensität von 9,3 µl/min und somit eine signifikante Reduktion gegenüber dem unbehandelten Inhibitor-tier.

**BEISPIEL 15 :****40 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
- 45 einer Dosierung von 1 ml/kg Körpergewicht infundiert wurde. 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
- 50 µl/min (2. Krallenschnitt) reduziert werden. Durch Kombination von Faktor II (75 E/kg) mit einem Faktor Xab (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 Inhibitor-tiere auf das Niveau der gesunden Vergleichstiere normalisiert (4 µl/min).
- 55 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.

#### BEISPIEL 16 :

##### 5 Thrombogenität des erfindungsgemäßen Präparates

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.

10 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 sek. 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  
15 Petrischale aufgeschnitten und die erhaltenen Thromben mittels einer Skalierung zwischen 0 und 4 bewertet (siehe Tabelle).

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

30 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.

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

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

#### 50 BEISPIEL 17 :

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

55 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.

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 Volumsdosis, aber mit identen Dosen bezogen auf das Körpergewicht, die pathologisch verlängerte Blutungsintensität von 67  $\mu$ l/min auf ca. 5  $\mu$ l/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 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 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.

### Patentansprüche

1. Pharmazeutisches Präparat zur Behandlung von Blutgerinnungsstörungen, enthaltend eine partielle Prothrombinase, bestehend aus gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa als aktive Komponenten, welche frei von Phospholipiden sind.
2. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß es bis zu einer Dosis von mindestens 150 E Prothrombin/kg frei an thromboembolischen Nebenwirkungen, ausgedrückt durch einen Score im Wessler-Thrombosemodell von höchstens 3 Punkten, ist.
3. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Prothrombin mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 5 E/mg Protein enthält.
4. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Faktor Xa mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 100 E/mg Protein enthält.
5. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß es Faktor Xa vorwiegend als Faktor Xa $\beta$  enthält.
6. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß Prothrombin und Faktor Xa als Komplex vorliegen.
7. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß es weiters Antithrombin III in stabilisierenden Mengen, gegebenenfalls gemeinsam mit Heparin, enthält.
8. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß es weniger als 0,1 E Faktor VIII:C oder Faktor VIII:Ag/E Prothrombin enthält.
9. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß es weniger als 0,1 E Faktor IX/E Prothrombin enthält.
10. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß es weniger als 0,1 E Faktor X/E Prothrombin enthält.
11. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß es weniger als 0,01 mg Phospholipide/E Prothrombin enthält.
12. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 11 in einer Darreichungsform, welche eine Dosis von mindestens 50 E Prothrombin/kg Körpergewicht umfaßt und gegebenenfalls eine Bolus-Injektion erlaubt.

## AT 404 673 B

13. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 12 in einer Darreichungsform, welche eine Dosis von 50 bis 500 E Prothrombin/kg Körpergewicht umfaßt.
- 5 14. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß Prothrombin und/oder Faktor Xa durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt sind.
15. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß es als Lyophilisat vorliegt, welches vorzugsweise zu einer optisch klaren Lösung rekonstituiert werden kann.
- 10 16. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 15, **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.
- 15 17. Pharmazeutisches Präparat nach einem der Ansprüche 1 bis 16, **dadurch gekennzeichnet**, daß es virusinaktiviert bzw. virusabgereichert ist.
18. Komplex, bestehend aus Prothrombin und Faktor Xa.
19. Präparat, enthaltend den Komplex nach Anspruch 18 und weiters Calciumionen.
- 20 20. Präparat nach Anspruch 19, **dadurch gekennzeichnet**, daß es weiters Thrombin und gegebenenfalls Phospholipide enthält, zur diagnostischen Verwendung.
- 25 21. Verwendung von gereinigtem Prothrombin und gereinigtem Faktor Xa zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Etablierung von supranormalen Prothrombin-Konzentrationen im Blut eines Patienten.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die supranormale Konzentration mindestens 1,5 E Prothrombin/ml Blut, vorzugsweise mindestens 2 E/ml, beträgt.
- 30 23. Verwendung 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.

Hiezu 8 Blatt Zeichnungen



FIG. 1

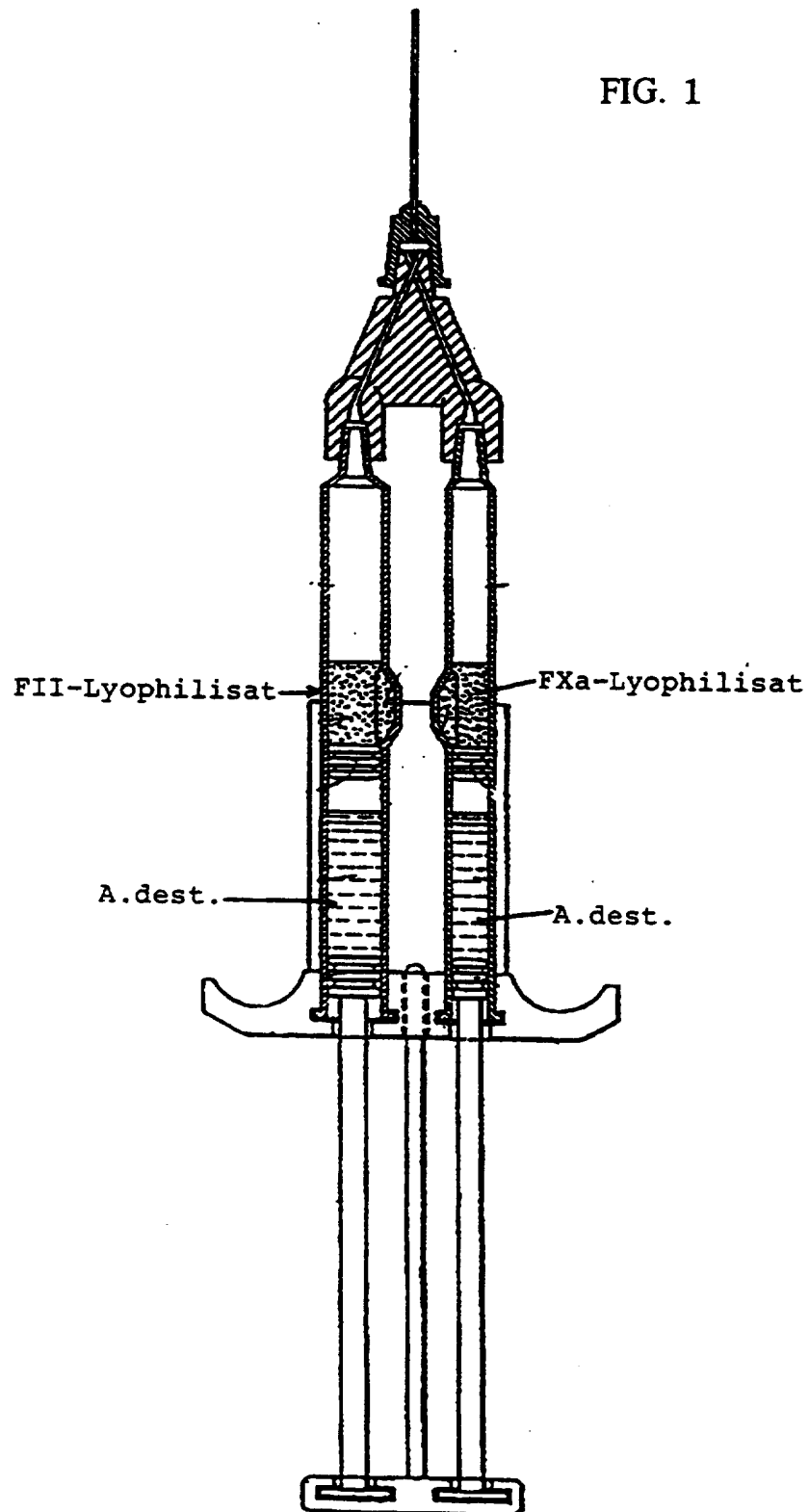


FIG. 2

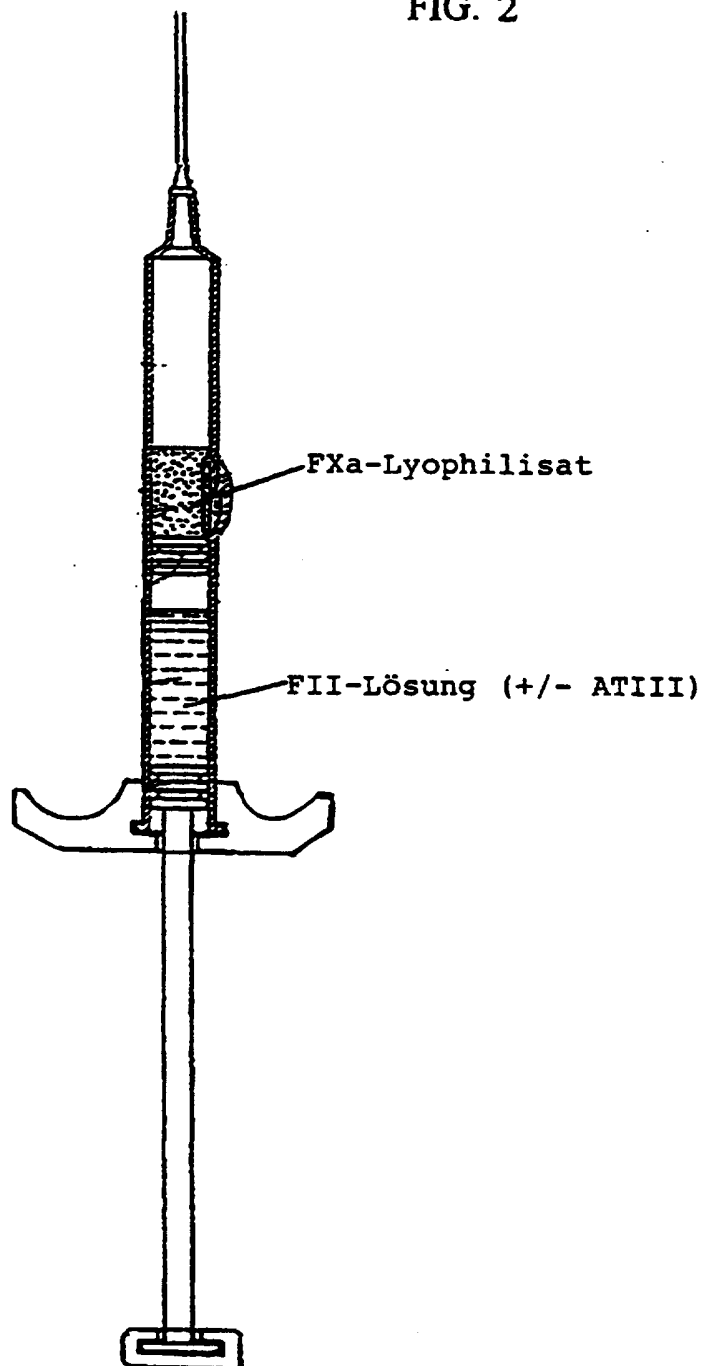


FIG. 3

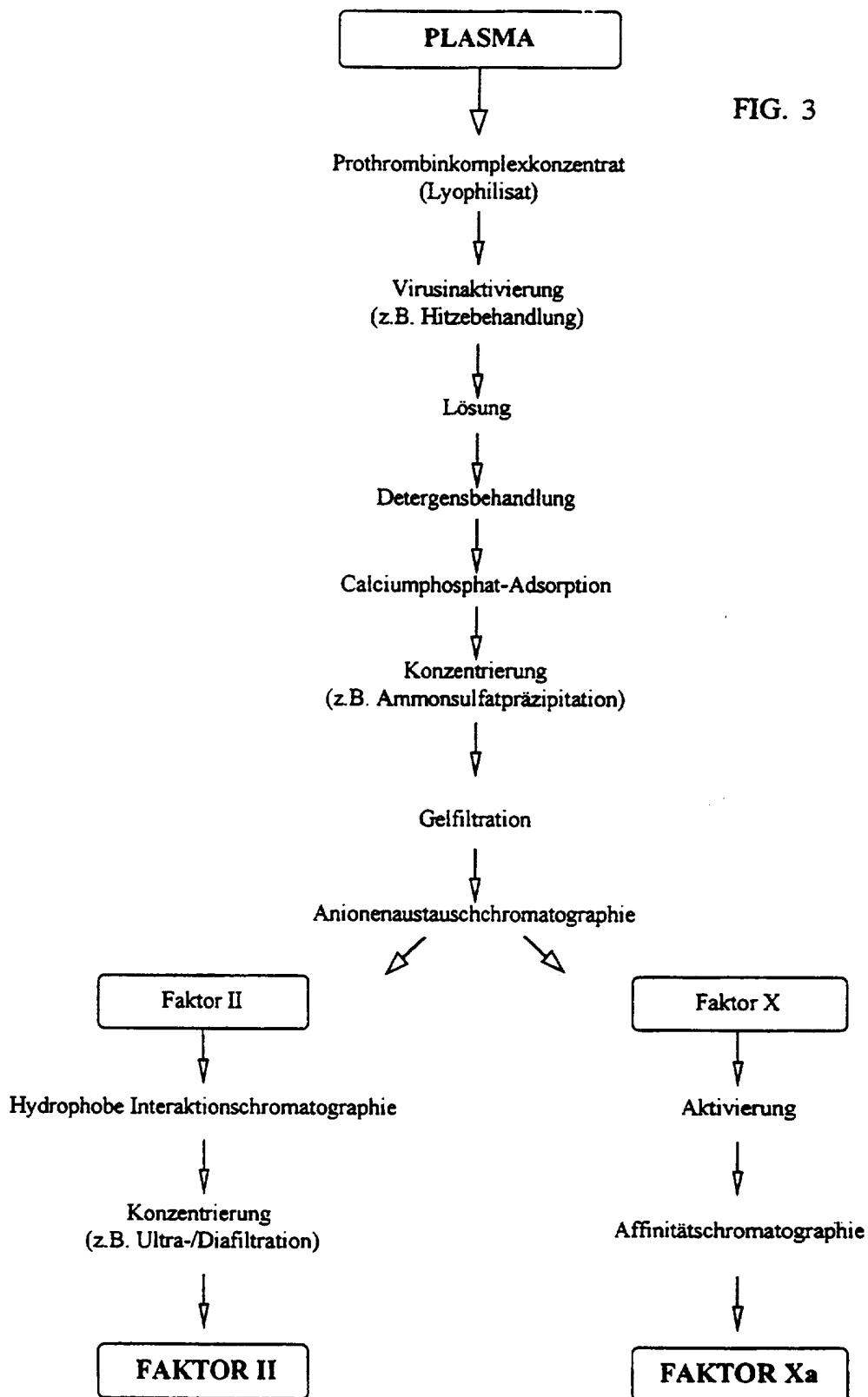


FIG. 4  
Gelfiltration: Superose-12 (HR10/30)

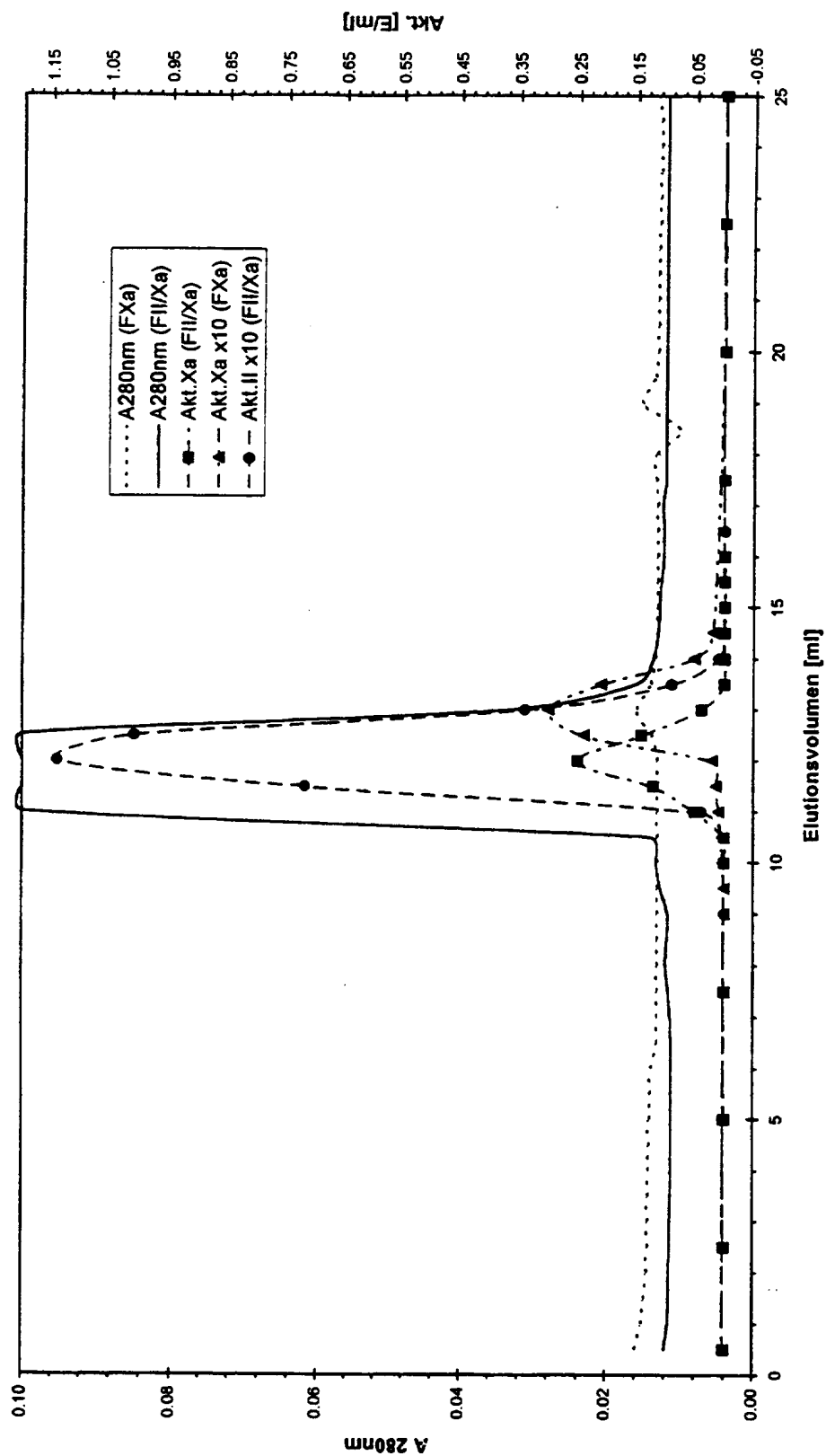
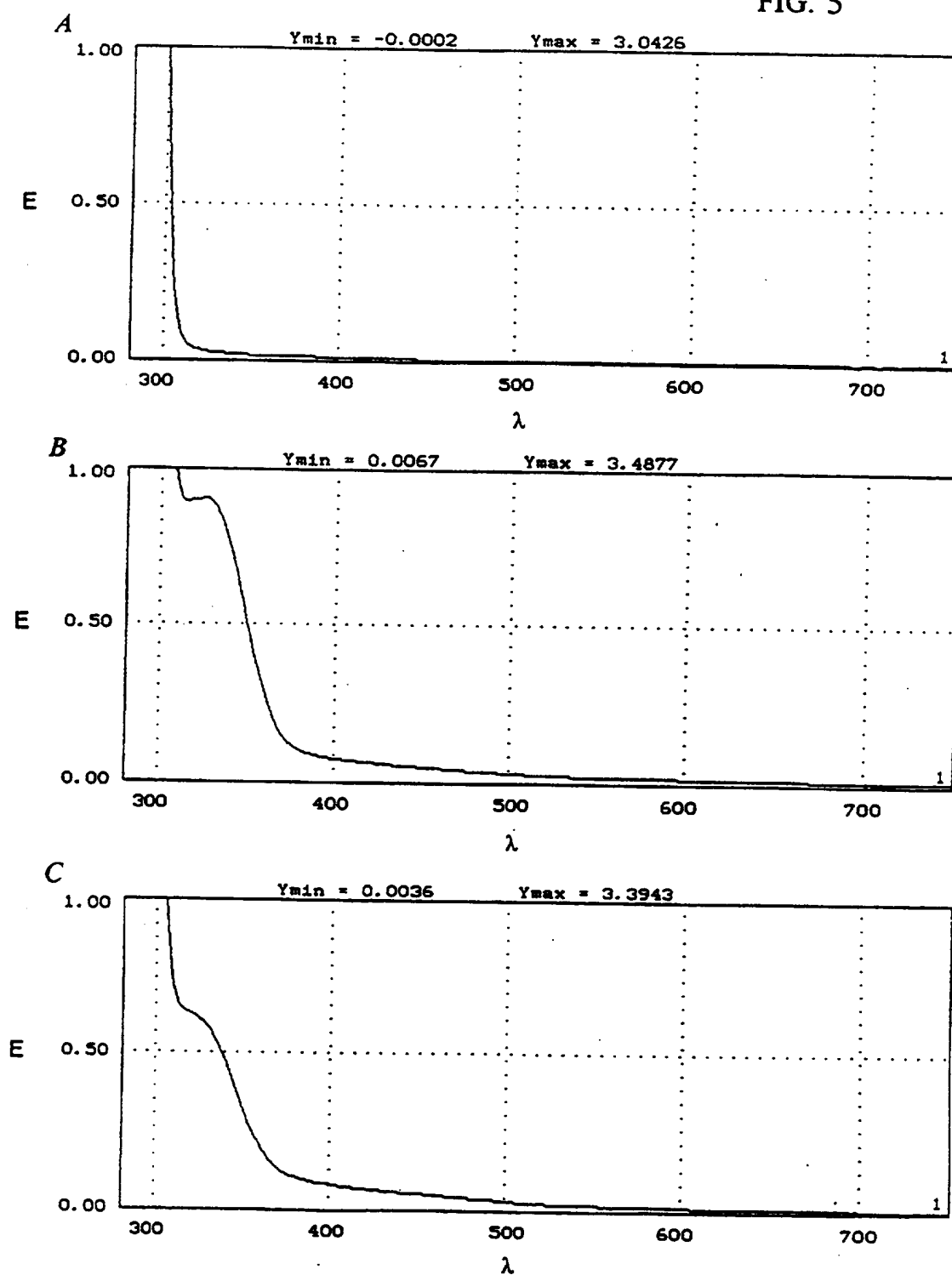


FIG. 5



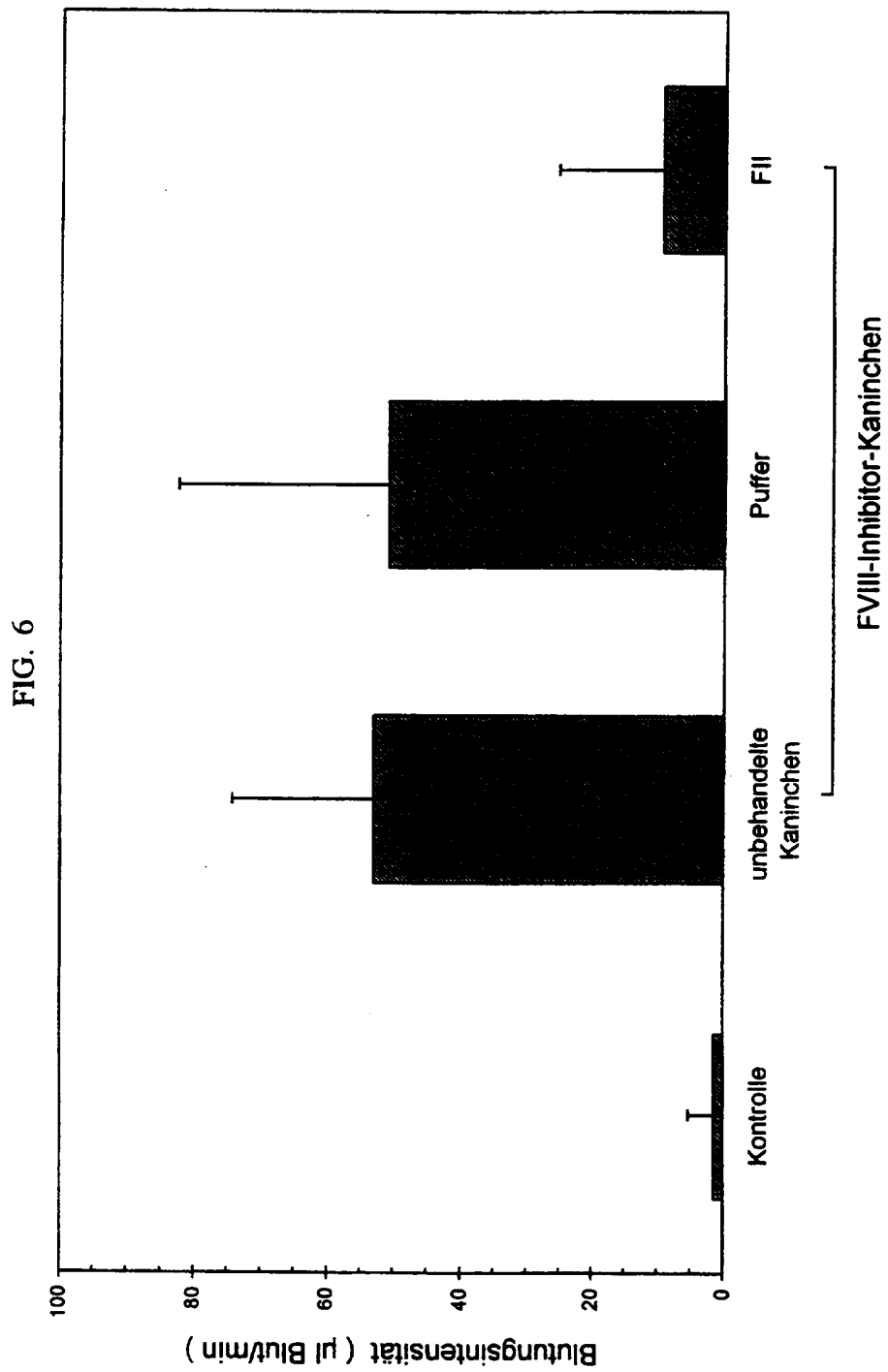


FIG. 7

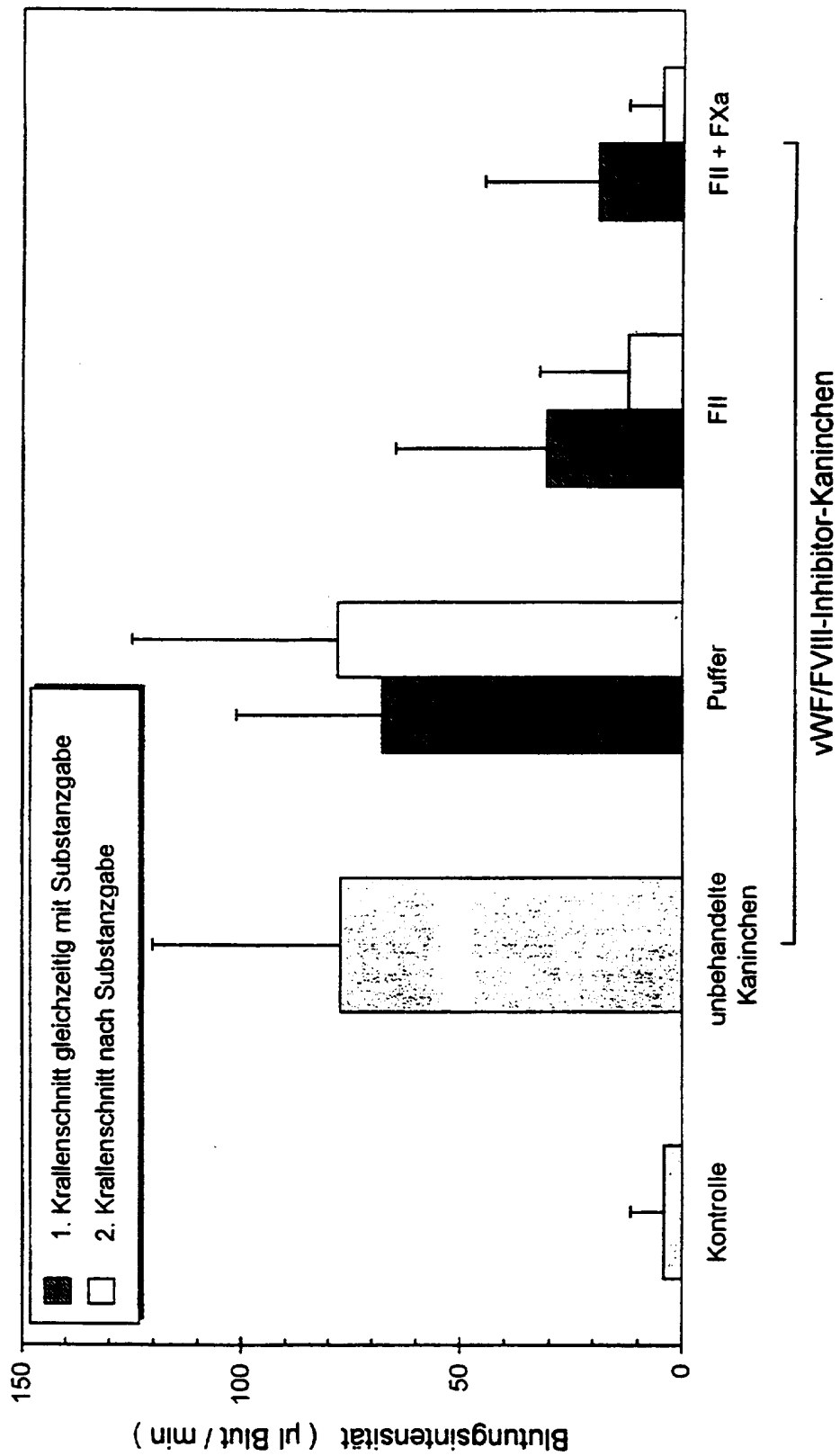


FIG. 8

