



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **251 078 A1**

4(51) A 61 K 37/475

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP A 61 K / 292 592 7

(22) 04.01.79

(44) 04.11.87

(71) Bezirksinstitut für Blutspende- und Transfusionswesen Suhl, Albert-Schweitzer-Straße 14, Suhl, 6013, DD
(72) Dornheim, Günter, Dr. rer. nat., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Prothrombinkonzentraten

(57) Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Prothrombinkomplexkonzentraten. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von Prothrombinkomplexkonzentraten zur Therapie angeborener oder erworbener Mangelzustände der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X zur Verfügung zu stellen. Dabei sollen die Ausbeute und der auf Protein bezogene Anreicherungsgrad (spezifische Aktivität) der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X erhöht und die Gefahr thromboembolischer Komplikationen bei der Therapie verringert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß aus einem zitratfreiem Plasma der Prothrombinkomplex und eine zur Stabilisierung der Präparate ausreichende Menge Antithrombin III durch Adsorptionschromatographie an tri-Calciumphosphat entfernt und entweder nach Auswaschen des Adsorbens-Protein-Präzipitates oder unmittelbar nach der Adsorption der Prothrombinkomplex und das Antithrombin III in einer 2stufigen Elution freigesetzt und Heparin dem Eluat zugesetzt wird. Das nach der Elution vom tri-Calciumphosphat erhaltene Prothrombinkomplexkonzentrat kann nach der Lyophilisation direkt therapeutisch eingesetzt werden. Das Verfahren kann als Kleinpolverfahren im geschlossenen System unter Wahrung der Sterilität durchgeführt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Herstellung eines Prothrombinkomplexkonzentrates, das mindestens jeweils 200 Einheiten der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X, 5 bis 30 Einheiten Antithrombin III und 100 IE Heparin je Transfusionseinheit enthält, aus zitratfreiem stabilisiertem Humanplasma durch Adsorptionschromatographie unter Verwendung von tri-Calciumphosphat als Adsorptionsmittel, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine Konzentration von 3,75 bis 7,50 g tri-Calciumphosphat pro 1 Humanplasma verwendet wird, der pH-Wert der Calciumphosphat-Plasma-Suspension 7,2 bis 8,2 beträgt, das Adsorbens-Protein-Präzipitat entweder unmittelbar zur Elution eingesetzt oder zuvor mit 10 bis 30%, bezogen auf Ausgangsvolumen, einer Waschflüssigkeit, bestehend aus 0,05 mol/l Tris, 0,15 mol/l Natriumchlorid und 0,001 mol/l Chelaplex III bei -2°C bis 25°C und einem pH-Wert von 7,1 bis 9,0 behandelt wird und anschließend der Prothrombinkomplex und das Antithrombin III durch zweistufige Elution mit 6,8 bis 7,5%, auf eingesetztes Plasmavolumen bezogen, einer Lösung bestehend aus 0,05 mol/l Natriumzitrat und 0,01 mol/l Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 freigesetzt wird.
2. Verfahren nach Pkt. 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Ausgangsmaterial Aedetatplasma, Heparinplasma, Ionenaustauschplasma oder der Äthanol enthaltende Aedetatplasmaüberstand der Cohn-I-Fraktion eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Pkt. 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß zur Freisetzung eine nichtgepufferte 0,05 mol/l Natriumzitratlösung in einer Menge von 6,8 bis 7,5%, auf eingesetztes Plasmavolumen bezogen, verwendet wird.
4. Verfahren nach Pkt. 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß alle Verfahrensstufen im geschlossenen System unter aseptischen Bedingungen bei Wahrung der Sterilität durchgeführt werden können.
5. Verfahren nach Punkt 1 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß das Hepatitisrisiko durch die Beschränkung des für eine Charge eingesetzten Ausgangsmaterials auf ein 2-Spenderplasma bzw. einen 18-Spenderpool verringert werden kann.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Prothrombinkomplexkonzentraten, die neben den Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X auch Antithrombin III in einer zu deren Stabilisierung ausreichenden Menge enthalten.

Das Risiko thromboembolischer Komplikationen bei der Therapie angeborener oder erworbener Mangelzustände der Faktoren des Prothrombinkomplexes kann durch den Antithrombin-III-Gehalt der Prothrombinkomplexkonzentrate verringert werden.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Es ist bekannt, daß die Gerinnungsfaktoren des Prothrombinkomplexes u. a. an anorganischen Adsorbentien wie Bariumsulfat, tri-Calciumphosphat und Aluminiumhydroxid zumindest teilweise reversibel adsorbiert werden. Der Einsatz der Adsorptionsmittel Bariumsulfat und tri-Calciumphosphat erfordert die Verwendung zitratfreier Konservierungslösungen mit z. B. Chelaplex III (Dinatriumhydrogenäthylendiamintetraacetat-2-hydrat) als Calcium-bindendes Agens bzw. den Einsatz von Ionenaustausch- oder Heparin-Plasma.

Nach dem von C. Blatrix und J. P. Soulier (Path. et Biol. 7 [1959] 2477) angegebenen und später nur geringfügig modifizierten Verfahren erfolgt die Adsorption der Faktoren des Prothrombinkomplexes an tri-Calciumphosphat (Amend Drug) mit einer Menge von 7,5 g/l Aedetatplasma. Die Elution der adsorbierten Gerinnungsfaktoren erfolgt mit 0,18 mol/l enthaltender Natriumzitratlösung. Anschließend werden die Eluate durch eine 2stufige Fraktionierung mit Äthanol gereinigt. Die Ausbeuten betragen nur ca. 25%. Der Reinigungsschritt ist aufwendig und für die Herstellung eines Präparates im Kleinpoolsverfahren nicht geeignet.

Diese Prothrombinkomplexkonzentrate sowie auch die aus Humanzitratplasma durch Adsorption an DEAE-Zellulose, DEAE-Sephadex A-50 (Heystek, I., Brummelhuis, H. G. J., Krijnen, H. W.: Contributions to the optimal use of human blood. II. The large scale preparation of prothrombin complex. Vox. Sang. 25 [1973] 113; Suomela, G., Myllylä, G., Raska, E.: Preparation and properties of a therapeutic factor IX concentrate. Vox. Sang. 33 [1977] 37-51) enthalten in unterschiedlicher Menge aktivierte Gerinnungsfaktoren.

Die aktivierten Gerinnungsfaktoren u. a. VIIa, IXa, Xa, XIa oder Reaktionsprodukte aktivierter Gerinnungsfaktoren sind sehr wahrscheinlich die Ursache gefährlicher Nebenwirkungen, wie arterieller Thrombosen, venöser Thromboembolien oder einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC).

Zur Charakterisierung der Menge aktivierter Gerinnungsfaktoren kann der Quotient aus der Gerinnungszeit eines nicht kontaktaktivierten Humanplasmas mit und ohne Zusatz von Prothrombinkomplexkonzentrat (NAPTT) angegeben werden. Antithrombin III ist ein natürlicher Proteaseinhibitor, der die in den Prothrombinkomplexkonzentraten möglicherweise vorhandenen aktivierten Gerinnungsfaktoren irreversibel neutralisiert, wobei die Geschwindigkeit dieser Reaktion durch Heparin beträchtlich erhöht wird.

Nach J. P. Soulier und M. Steinbuch (Zeitschr. Ges. Inn. Med. 20, Suppl. [1965] 311) hat Heparin eine stabilisierende Wirkung auf den Prothrombinkomplex, seine Gegenwart kann jedoch nicht in jedem Falle eine Aktivierung der Gerinnungsfaktoren bis zur Bildung von Thrombin verhindern.

Die Bedeutung des vom International Committee on Thrombosis and Haemostasis (Menaché, D., Roberts, H. R.: Summary report and recommendations of the task force members and consultants. Thromb. et Diath. haemorrh. 33 [1975] 675) empfohlenen Zusatzes von 5-10 IE Heparin/ml Anwendungsvolumen PKK wird deshalb unterschiedlich beurteilt.

Auch wird der Zusammenhang zwischen dem Antithrombin-III- und Heparin Gehalt der Prothrombinkomplexkonzentrate und ihrer Thrombogenität nicht einheitlich bewertet.

Von G. C. White et al. (Prothrombin complex concentrates: Potentially thrombogenic materials and clues to the mechanism of thrombosis in vivo. Blood 49 [1977] 159) wird vermutet, daß die Menge des in einigen Konzentraten nachweisbaren Antithrombin III nicht zur Neutralisation der Gesamtmenge aktivierter Gerinnungsfaktoren ausreicht. Ohne die Gegenwart von biologisch aktivem Antithrombin III ist der Einfluß von Heparin auf die in vitro gemessene Thrombogenität von Prothrombinkomplexkonzentraten wenig ausgeprägt oder nicht nachweisbar. Es ist bekannt, daß Prothrombinkomplexkonzentrate in Abhängigkeit von dem angewandten Herstellungsverfahren unterschiedliche Mengen Antithrombin III enthalten können. Die in zunehmenden Umfang aus Humanzitratplasma durch Adsorption des Prothrombinkomplexes an DEAE-Sephadex A-50 oder DEAE-Zellulose hergestellten Prothrombinkomplexkonzentrate enthalten kein Antithrombin III.

Von S. Chandra und M. Wickerhauser (Large scale preparation of a nonthrombogenic prothrombin complex. Thrombosis Research 12 [1978] 571) wird deshalb Antithrombin III bei der Elution des Prothrombinkomplexes zur Verringerung der Thrombogenität zugesetzt.

Bei dem gegenwärtigen Stand der Technik sind bei dem Hersteller produktionsbegleitende Prüfungen notwendig, die u. a. auch die Menge der in den Konzentraten vorhandenen thrombogen wirkenden Substanzen erfassen sollen. Die Standardisierung und das Festlegen von Grenzwerten für die nicht aktivierte partielle Thromboplastinzeit (NAPTT) und die Thrombinbildungsrate (TG_{150} nach Sas) ist auf Grund der Heterogenität der mit beiden Untersuchungsverfahren nachgewiesenen Faktoren außerordentlich schwierig.

Von S. Elödi und K. Varadi (Activation of clotting factors in prothrombin complex concentrates as demonstrated by clotting assays for factors IXa and Xa. Thrombosis Research 12 [1978] 597) ist auf die ungenügende Stabilität von Prothrombinkomplexkonzentraten nach Auflösen der lyophilisierten Präparate hingewiesen worden.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Herstellung eines Prothrombinkomplexkonzentrates mit einem ausreichend hohen Gehalt an Antithrombin III, um die Stabilität des Präparates zu gewährleisten und das Risiko thrombogener Nebenwirkungen beim therapeutischen Einsatz der Präparate zu verringern.

Es wird weiterhin angestrebt, daß gegenüber dem Stand der Technik die Ausbeute an den Gerinnungsfaktoren II, IX, X sowie der auf den Proteingehalt bezogene Grad ihrer Anreicherung (spezifische Aktivität) erhöht wird.

Der dazu notwendige Verfahrensschritt soll gegenüber dem Stand der Technik technisch einfach sein und nicht zu einer Verringerung der Ausbeute und einer Beeinträchtigung der Stabilität führen.

Es soll weiterhin gewährleistet sein, daß das gesamte Verfahren im geschlossenen System unter Wahrung der Sterilität durchgeführt werden kann, um das Hepatitisrisiko auch durch die Beschränkung der Menge des je Charge eingesetzten Ausgangsmaterials (Kleinpulververfahren) zu verringern.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von Prothrombinkomplexkonzentraten mit einer zu deren Stabilisierung ausreichenden Menge Antithrombin III.

Erfindungskennzeichnend ist, daß tri-Calciumphosphat nicht nur bekanntermaßen die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X (Prothrombinkomplex), sondern auch Antithrombin III aus zitratfreiem Plasma adsorbiert.

Es wurde gefunden, daß verschiedene Handelsformen des tri-Calciumphosphats nicht nur unterschiedliche Adsorptionseigenschaften für die Faktoren des Prothrombinkomplexes besitzen, sondern sich auch hinsichtlich des Adsorptionsvermögens für Antithrombin III beträchtlich unterscheiden.

So wurde gefunden, daß z. B. penta-Calciumhydroxidtriphosphat der ungefähren Zusammensetzung $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ als eine Handelsform des tri-Calciumphosphats eine wesentlich größere Adsorptionskapazität sowohl für die Faktoren des Prothrombinkomplexes als auch für Antithrombin III besitzt als eine andere Handelsform, die der ungefähren Zusammensetzung $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ entspricht. Es ist deshalb notwendig, bei der Herstellung eines stabilisierten Prothrombinkomplekonzentrates das einzusetzende tri-Calciumphosphat-Präparat hinsichtlich seines Adsorptionsvermögens für die Faktoren des Prothrombinkomplexes und für Antithrombin III zu charakterisieren.

Es wurde gefunden, daß die Unterschiede im Adsorptionsvermögen der tri-Calciumphosphat-Präparate mit unterschiedlicher Zusammensetzung mit Unterschieden in dem Grad der Freisetzung des Prothrombinkomplexes und des Antithrombin III bei der Elution verbunden sind.

Es ist deshalb notwendig, bei der Herstellung eines Prothrombinkomplekonzentrates, das eine zu dessen Stabilisierung ausreichende Menge Antithrombin III enthalten soll, das einzusetzende tri-Calciumphosphat-Präparat hinsichtlich seines Adsorptionsvermögens für die Faktoren des Prothrombinkomplexes und für Antithrombin III auszuwählen und dabei auch sicherzustellen, daß bei der Elution des Prothrombinkomplexes auch eine ausreichende Menge Antithrombin III freigesetzt wird.

Es wurde gefunden, daß die Adsorptionskapazität des gleichen tri-Calciumphosphat-Präparates für die Faktoren des Prothrombinkomplexes in der Regel größer als für die Adsorption einer ausreichenden Menge Antithrombin III ist. Das bedeutet, daß in der Regel eine größere Adsorptionsmittelmenge einzusetzen ist, wenn die Aufgabe gelöst werden soll, einen ausreichend hohen Gehalt des Prothrombinkomplekonzentrates an Antithrombin III sicherzustellen.

Es wurde gefunden, daß tri-Calciumphosphat in der Handelsform als penta-Calciumhydroxidtriphosphat in einer Menge von 3,8 bis 5,0 g/Liter Aedetatplasma die Faktoren des Prothrombinkomplexes nahezu vollständig adsorbiert und eine Freisetzung in hoher Ausbeute bereits bei niedrigen Konzentrationen an Natriumzitatrat erfolgt.

Es wurde gefunden, daß bei Einsatz von 5 g $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ je Liter Aedetatplasma bis zu 10% des im Ausgangsmaterial vorhandenen Antithrombin III adsorbiert werden.

Es wurde festgestellt, daß ca. 60% des adsorbierten Antithrombin III bei der Elution zusammen mit den Faktoren des Prothrombinkomplexes freigesetzt werden.

Es wurde gefunden, daß die so hergestellten Prothrombinkomplekonzentrate 14 bis 22 Einheiten Antithrombin III je Transfusioneinheit (TE) des Prothrombinkomplekonzentrates enthalten, wobei 1 Einheit Antithrombin III der AT-III-Aktivität von 1 ml frischem Zitratmischplasma entspricht.

Es wurde gefunden, daß durch eine Erhöhung der Menge eingesetzten penta-Calciumhydroxidtriphosphat auf 12 g je Liter Aedetatplasma ohne Beeinträchtigung der Ausbeute an den Faktoren II, VII, IX und X Prothrombinkomplekonzentrate hergestellt werden können, die 50 bis 70 Einheiten Antithrombin III je TE enthalten.

Es wurde gefunden, daß die Menge der bei der Isolierung des Prothrombinkomplexes entstehenden aktivierten Gerinnungsfaktoren abhängig ist von der Art und Qualität des eingesetzten Ausgangsmaterials und den verfahrenstechnischen Parametern.

Es wurde gefunden, daß bei gleichen Adsorptionsmittelmengen, die aus dem alkoholhaltigen Aedetatplasmaüberstand hergestellten Prothrombinkomplekonzentrate im Mittel 8 Einheiten Antithrombin III je TE mehr enthalten als Vergleichspräparate, bei denen Aedetatplasma ohne vorangegangene Alkoholfällung eingesetzt wurde.

Es wurde gefunden, daß die Bestimmung des in den Prothrombinkomplekonzentraten vorhandenen Antithrombin III vorzugsweise durch eine Aktivitätsbestimmung z. B. mittels chromogener Substrate und nicht durch eine immunologische Bestimmung der Antithrombin-III-Konzentration erfolgen sollte, weil bei den immunologischen Bestimmungsmethoden auch die Komplexe der aktivierten Gerinnungsfaktoren mit dem Antithrombin III in das Ergebnis eingehen.

Bei der Herstellung der Prothrombinkomplekonzentrate ist deshalb sicherzustellen, daß Antithrombin III in ausreichender Menge als biologisch aktives Antithrombin III vorhanden ist.

Es wurde bestätigt, daß durch einen Zusatz von 5 bis 10 IE Heparin/ml Prothrombinkomplekonzentrat nach Abtrennung des Prothrombinkomplexes die Menge der nachweisbaren aktivierten Gerinnungsfaktoren verringert werden kann.

Es wurde jedoch gefunden, daß diese Wirkung eines Heparinzusatzes nur eintritt, wenn die Präparate biologisch aktives Antithrombin III in einer ausreichenden Menge enthalten.

Es wurde gefunden, daß als Ausgangsmaterial Aedetatplasma, der alkoholhaltige Aedetatplasmaüberstand nach Abtrennung der Fraktion Cohn I, Heparinplasma und Ionenaustauschplasma eingesetzt werden können.

Dabei ist sicherzustellen, daß die beobachtete Abhängigkeit der Antithrombin-III-Adsorption von der Zusammensetzung des Ausgangsmaterials durch den Einsatz ausreichender Mengen tri-Calciumphosphat berücksichtigt wird.

Es wurde gefunden, daß die Adsorption der Faktoren des Prothrombinkomplexes und des Antithrombin III vorteilhaft bei einem pH-Wert der Adsorptionsmittel-Plasma-Suspension von 7,2 bis 8,2 erfolgt.

Es wurde gefunden, daß die Freisetzung der Faktoren des Prothrombinkomplexes vom tri-Calciumphosphat mit einer 0,05 mol/l Natriumzitatrat enthaltenden Lösung zu einer geringeren Freisetzung von unerwünschten Begleitproteinen führt, als eine nach dem Stand der Technik eingesetzte Natriumzitatratkonzentration von 0,13 mol/l.

Es wurde gefunden, daß durch Auswaschen des tri-Calciumphosphats nach der nahezu vollständigen Adsorption der Faktoren des Prothrombinkomplexes und der teilweisen Adsorption des Antithrombin III mit einer zitratfreien Waschflüssigkeit unerwünschte Begleitproteine entfernt werden können, ohne daß ein nennenswerter Verlust an den Faktoren des Prothrombinkomplexes und an adsorbiertem Antithrombin III beobachtet wird und ohne daß eine die Stabilität des Prothrombinkomplekonzentrates negativ beeinflussende Wirkung festgestellt wird.

Es wurde jedoch auch gefunden, daß ein Auswaschen der Adsorbens-Protein-Präzipitate vor der Elution des Prothrombinkomplexes und des Antithrombin III kein obligatorischer Verfahrensschritt ist, da die spezifische Aktivität der Faktoren II, VII, IX und X, ausgedrückt in Einheiten/mg Protein bei Adsorptionsmittelmengen von 5 g tri-Calciumphosphat je Liter Aedetatplasma zwischen 0,5 und 0,75 liegt, wenn die Elution mit einer 0,05 mol/l Natriumzitatrat enthaltenden Lösung durchgeführt wird.

Durch ein Auswaschen der Adsorbens-Protein-Präzipitate kann die spezifische Aktivität auf 1,2 bis 2,0 in Abhängigkeit von der eingesetzten Adsorptionsmittelmenge erhöht werden.

Es wurde gefunden, daß für das Auswaschen hypo-, iso- oder hypertonische Tris/Natriumchlorid-Puffer eingesetzt werden können.

Es wurde gefunden, daß es zweckmäßig sein kann, der Waschflüssigkeit Chelaplex III (Dinatriumhydrogenäthylendiamintetraacetat-2-hydrat) in einer Menge zwischen 0,001 und 0,003 mol/l zuzusetzen.

Es wurde gefunden, daß der als Waschflüssigkeit eingesetzte Tris/NaCl-Puffer (Tris = 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol) einen pH-Wert von 7,2 bis 9,0 haben kann.

Es wurde gefunden, daß die Waschflüssigkeit bei einem pH-Wert von 7,15 zweckmäßigerweise 0,05 mol/l Tris, 0,15 mol/l Natriumchlorid sowie 0,001 mol/l Chelaplex III enthält.

Es wurde gefunden, daß es zweckmäßig sein kann, die Adsorbens-Protein-Präzipitate ein- oder zweimal mit einer Menge Waschflüssigkeit auszuwaschen, die 10 bis 30%, bezogen auf eingesetztes Plasmavolumen, beträgt.

Es wurde gefunden, daß die gemeinsame Freisetzung der Faktoren des Prothrombinkomplexes und des Antithrombin III zweckmäßigerweise mit einer 0,05 mol/l enthaltenden Natriumzitratlösung erfolgt.

Es wurde gefunden, daß es zweckmäßig sein kann, die Freisetzung mit einer Elutionsflüssigkeit durchzuführen, die 0,01 mol/l Tris und 0,05 mol/l Natriumzitratlösung enthält und deren pH-Wert 7,2 beträgt.

Es wurde gefunden, daß es zweckmäßig ist, die Elution 2stufig mit einer Menge Elutionsflüssigkeit durchzuführen, die 6,8 bis 7,5%, bezogen auf die Menge Ausgangsmaterial, beträgt.

Es wurde gefunden, daß die Adsorption, das Auswaschen des Protein-Adsorbats und die Elution des Prothrombinkomplexes sowie des Antithrombin III bei Temperaturen zwischen –5°C und 37°C durchgeführt werden können, vorzugsweise wird bei Temperaturen zwischen –2°C und 25°C gearbeitet.

Zur Senkung des Hepatitisrisikos wird gewährleistet, daß die Menge je Charge eingesetzten Ausgangsmaterials auf einen vertretbaren Umfang, vorzugsweise auf einen 2-Spenderpool mit 400 bis 450 ml Plasma oder einen 18-Spenderpool mit ca. 4 l Plasma beschränkt bleibt.

Das Hepatitisrisiko kann weiterhin durch intensives Auswaschen des Adsorptionsmittels verringert werden.

Gleichermaßen wird gewährleistet, daß bei Beschränkung der Chargengröße auf 450 ml bzw. ca. 4 l Ausgangsmaterial das gesamte Verfahren im geschlossenen System bei Wahrung der Sterilität durchgeführt wird und deshalb eine Sterilfiltration durch eine Sterilitätsprüfung des Prothrombinkomplekonzentrates ersetzt werden kann.

Ausführungsbeispiel

Das Aedetatplasma wird innerhalb von 4 Stunden von den Erythrozyten durch Zentrifugation abgetrennt. Zur Stabilisierung des Blutes kann ein Stabilisator folgender Zusammensetzung verwendet werden:

Natriumaedetat (Chelaplex III)	
(Dinatriumhydrogenäthylendiamintetraacetat-2-hydrat)	6,0 g
Natriumchlorid	3,5 g
Glucose	21,5 g
Wasser zur Injektion ad	1 000 ml

Für 400 ml Blut sind 50 ml Stabilisator notwendig. Das nach Abtrennen des Plasmas erhaltene Erythrozytenkonzentrat wird retransfundiert, wenn die Blutentnahme durch Plasmapherese erfolgt, oder in einer geeigneten Konservierungslösung unter den üblichen Bedingungen der Flüssigkonservierung von Erythrozyten aufbewahrt.

Heparinblut

400 ml Blut wird in 50 ml einer 0,15 mol/l Natriumchlorid enthaltenden Lösung stabilisiert, der 2500 IE Heparin zugesetzt wurden. Nach Abtrennung des Plasmas werden die Erythrozyten mit einer zur Flüssigkonservierung geeigneten Konservierungslösung versetzt, sofern keine Retransfusion im Falle der Blutentnahme durch Plasmapherese erfolgt.

Der alkoholhaltige Aedetatplasmaüberstand wird nach Abtrennung der Fraktion Cohn I durch Fällung mit Äthanol erhalten. Der Plasmaüberstand enthält 8 bis 10 Vol.-% Äthanol.

400 ml Aedetatplasma, Heparinplasma oder Ionenaustauschplasma werden im geschlossenen System unter aseptischen Bedingungen zu einer Suspension von 1,5 bis 3,0 g, vorzugsweise 2,0 g tri-Calciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{OH}$ -penta-Calciumhydroxidtriphosphat), in 10 ml 0,15 mol/l Natriumchlorid enthaltender Lösung in einer 500-ml-Blutkonservenflasche gegeben.

Während der Adsorption (25 min bei Raumtemperatur) wird der Flascheninhalt auf geeigneten Schüttelgeräten gründlich gemischt, wobei eine Schaumbildung weitgehend auszuschließen ist.

Bei dem Einsatz von 450 ml Aedetatplasmaüberstand nach Abtrennung der Cohn-I-Fraktion wird die Adsorption bei -2°C begonnen und bei Raumtemperatur fortgesetzt.

Nach Abtrennen des tri-Calciumphosphats durch Zentrifugation (25 min, 2000 U/min, 0 bis -2°C) wird das Präzipitat entweder mit 50 ml einer Pufferlösung (0,05 mol/l Tris, 0,15 mol/l Natriumchlorid, 0,001 mol/l Chelaplex III, pH 7,15) ein- oder zweimal gewaschen oder der Prothrombinkomplex und das Antithrombin III werden unmittelbar in einer 2stufigen Elution mit einer 0,05 mol/l Natriumzitat enthaltenden Lösung freigesetzt, wobei bei der 1. Elution 20,0 ml und bei der 2. Elution 10,0 ml eingesetzt werden. Die Dauer der Elution beträgt 25 min bei Raumtemperatur, wobei auf eine gründliche, eine Schaumbildung vermeidende Suspendierung des tri-Calciumphosphats zu achten ist.

Das nach Zentrifugation erhaltene Eluat wird mit 100 IE Heparin/Transfusionseinheit nach Abschluß der 1. Elution versetzt und anschließend bei -40°C tiefgefroren und abschließend lyophilisiert, wobei während der Eisphase eine Temperatur von -10°C nicht überschritten wird. Im Anwendungsvolumen von 20 ml (1 Transfusionseinheit) sind jeweils 200 bis 250 Einheiten Faktor II, 200 bis 250 Einheiten Faktor X, 200 bis 250 Einheiten Faktor IX und 220 bis 280 Einheiten Faktor VII enthalten. Im Mittel werden Ausbeuten von 65 bis 70 % erreicht.

Die spezifische Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X (angegeben in Einheiten Gerinnungsfaktor/mg Protein) beträgt 0,50 bis 0,75, wenn das Protein-Adsorbat nicht ausgewaschen wird. Durch Auswaschen des Protein-Adsorbats kann die spezifische Aktivität auf 1,2 bis 2,0 Einheiten Gerinnungsfaktor/mg Protein erhöht werden.

Werden wie im Ausführungsbeispiel angegeben zwischen 1,5 und 3,0 g tri-Calciumphosphat eingesetzt, dann enthalten die Prothrombinkomplexkonzentrate zwischen 7 und 20 mg Antithrombin III/TE bzw. zwischen 5 und 30 Einheiten biologisch aktives AT III/TE. Prothrombinkomplexkonzentrate, die mit der vorzugsweise eingesetzten Menge von 2,0 g tri-Calciumphosphat hergestellt werden, enthalten im Mittel 22 Einheiten Antithrombin III, wenn zur Herstellung der Äthanol enthaltende Aedetatplasmaüberstand eingesetzt wird und 14 Einheiten Antithrombin III/TE, wenn Aedetatplasma ohne vorangegangene Alkoholfällung der Cohn-I-Fraktion eingesetzt wurde.

Der Quotient (NAPTTR) der nicht aktivierten partiellen Thromboplastinzeit nach Kingdon mit und ohne Zusatz einer 1:10 Verdünnung des Prothrombinkomplexkonzentrates, dem 100 IE Heparin/TE nach Abschluß der 1. Elution zugesetzt wurden, beträgt im Mittel $0,82 \pm 0,08$, die TG_{150} nach Sas beträgt mehr als 800 min. In keinem der Präparate konnte Thrombin mit Fibrinogen als Substrat nachgewiesen werden.

Die Aktivität des Antithrombin III wurde amidolytisch mit Chromozym TH (Fa. Boehringer Mannheim) mit der kinetischen Methode bei 25°C nach den Angaben des Herstellers bestimmt.

Immunologisch bestimmt wurde das Antithrombin III mit M-Partigenplatten der Fa. Behring, Marburg, nach den Angaben des Herstellers. Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren wurde mit entsprechenden Testbestecks der Firmen Behring, Marburg, bzw. Boehringer, Mannheim, nach den Angaben der Hersteller bestimmt.
