

Aus dem *pharmazentrum frankfurt* der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Institut für klinische Pharmakologie. Direktor: Prof. Dr. Dr. G. Geißlinger

**Interaktionen zwischen Phenprocoumon beziehungsweise Acenocoumarol
und dem direkten Thrombinhemmer Argatroban:
Eine Phase I-Studie an Probanden**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des
Fachbereichs Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von Nils von Hentig aus Berlin-Tempelhof

Frankfurt am Main, 2004

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. S. Harder
Korreferent: PD Dr. E. Lindhoff-Last

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1	Thromboembolische Ereignisse, Prophylaxe und Behandlung	4
1.2	Gerinnungshemmung durch Heparin	4
1.3	Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT)	5
1.4	Therapiealternativen bei HIT Typ 2	6
1.5	Argatroban	7
1.5.1	Mögliche Anwendung von Argatroban in Europa	8
1.5.2	Eigenschaften und Wirkmechanismus	8
1.5.3	Pharmakokinetik / Pharmakodynamik	9
1.6	Orale Antikoagulation	10
1.6.1	Cumarinderivate	10
1.6.2	Pharmakokinetik der Cumarinderivate	10
1.7	Studienziele	11
1.7.1	Studienprotokoll	12
1.7.2	Dosisplan	13
1.7.3	Primär- und Sekundärparameter der Untersuchung	14
2.	Material und Methoden	15
2.1	Labor	15
2.1.1	Blutentnahme und Probenaufarbeitung	15
2.1.2	Prothrombinzeitbestimmung (PT)	16
2.1.3	Bestimmung der partiellen Thromboplastinzeit (aPTT)	17
2.1.4	Bestimmung der Ecarinzeit (ECT)	18
2.1.5	Bestimmung der Blutungszeit	19
2.2	Statistische Methoden	19
2.2.1	INR-Datenpaare	19
2.2.2	aPTT- und ECT-Analyse	20
2.2.3	Statistische Auswertung	21
3.	Ergebnisse	22
3.1	INR	22
3.2	Nomogramm	28
3.3	Argatroban-Plasmaspiegel	31
3.4	aPTT	32
3.5	ECT	37
3.6	Blutungszeit	39
4.	Diskussion der Ergebnisse	40
4.1	Zusammenhang von Argatroban-Dosis und INR	40
4.2	Interaktionen zwischen oraler Antikoagulation und Argatroban hinsichtlich der aPTT	41
4.3	Ecarin Clotting Time als Alternative	42
4.4	Anwendung in der Klinik	42
4.5	Zusammenfassung	44
5.	Literaturverzeichnis	46
6.	Summary	51
7.	Ehrenwörtliche Erklärung	53
8.	Lebenslauf	54
9.	Danksagung	55

1. Einleitung

1.1 Thromboembolische Ereignisse, Prophylaxe und Behandlung

Atherosklerotische Veränderungen der Gefäßwände und die damit verbundenen Risiken thromboembolischer Ereignisse gehören mit zu den häufigsten Erkrankungen in der heutigen Industriegesellschaft. Ein erhöhtes Risiko arterieller Thrombosen besteht in den fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose, bei Lipidstoffwechselstörungen sowie dem Diabetes mellitus. Die folgenden Komplikationen sind in jedem Fall gravierend: Akuter Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall, periphere arterielle Durchblutungsstörungen wirken akut lebensbedrohend oder chronisch die Lebensqualität mindernd.

Tiefe Beinvenenthrombosen hingegen sind mögliche Komplikationen größerer Operationen sowie größerer Verletzungen im Verbund mit langer Bettlägerigkeit, insbesondere nach größeren Operationen an der Hüfte oder im kleinen Becken. Weitere Patientengruppen, die von einer Thromboseprophylaxe profitieren sind Polytraumapatienten, Neurochirurgische Patienten und Patienten mit instabiler Angina pectoris bzw. non-Q-wave-Myokardinfarkt ¹. Zur Thromboseprophylaxe stehen im wesentlichen zwei Hauptgruppen von Arzneimitteln zur Verfügung: Gerinnungshemmer und Thrombozytenaggregationshemmer ².

1.2 Gerinnungshemmung durch Heparin

Heparin ist der am häufigsten verwendete Gerinnungshemmer, sowohl im klinischen als auch zunehmend im ambulanten Bereich. Chemisch handelt es sich bei Heparin um eine inhomogene Mischung aus Mucopolysaccharid-Polyschwefelsäureester mit sulfatierten, saueren, kettenförmig angeordneten Disaccharideinheiten (Iduronsäure und Glucosamin), die in unregelmässigen Abständen durch Glucuronsäure und Acetyl-Glucosamin unterbrochen sind. Da Heparin ein Molekulargewicht von etwa 3000-9000 (niedermolekulares Heparin - NMH) bzw. 15000 (unfraktioniertes Heparin - UFH) Dalton besitzt, wird es wegen seiner Molekülgröße nicht über den Darm resorbiert, sondern

muss intravenös bzw. subcutan zugeführt werden. Nur etwa ein Drittel des in einer therapeutischen Dosis applizierten Heparins bindet an Antithrombin (AT III) und ist für dessen Wirkungsverstärkung an den Faktoren IIa und Xa verantwortlich. Der Heparin-Antithrombin-Komplex inaktiviert zwar auch eine Anzahl anderer Gerinnungsenzyme (IXa, Xa und XIIa), die jedoch eine untergeordnete Rolle spielen. Sehr kleine Heparinfragmente, welche die hochaffine Pentasaccharid-Sequenz besitzen, katalysieren die Hemmung von Faktor Xa alleine durch ihre Bindung an AT III³. Durch die Fraktionierung des Heparins ändern sich auch dessen Eigenschaften. Mit sinkendem Molekulargewicht steigt die Wirkung auf den Faktor Xa an und nimmt die Wirkung auf den Faktor IIa (Thrombin) ab. Heute werden vorwiegend die niedermolekularen Heparine (NMH) verwendet. Ihr Vorteil ist vor allem bei der Prophylaxe die einmal tägliche Gabe, die durch ihre günstigere Pharmakokinetik möglich wird: Heparine großen Molekulargewichts (30 000 d) werden in-vivo schneller ausgeschieden als die NMH, welche kumulieren. Durch ihre größere Wirkung am Faktor Xa weisen NMH eine geringere Wirkung auf die aPTT auf und werden, falls nötig, mithilfe des Anti-Xa-Assays kontrolliert.

1.3 Heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT)

Bei der nichtimmunologischen Heparin-assoziierten Thrombozytopenie (Typ I) bindet das Heparin sowohl an Plasmaproteine als auch Thrombozyten. Die HIT I führt in den ersten ein bis zwei Tagen der Behandlung mit unfraktioniertem Heparin bei etwa 25% der Patienten zu einem geringen Abfall der Thrombozytenwerte (<30%). Diese normalisieren sich jedoch unter weiterer Heparin-gabe spontan⁴.

Die HIT II hingegen ist eine IgG-vermittelte Immunreaktion mit Plättchenaktivierung und erhöhter Thrombozytenclearance durch das RES. Sie tritt mit ca. 5-10 Tagen Latenz nach erstmaliger Heparin-gabe auf. Zielantigen ist ein Komplex aus Heparin und Plättchenfaktor 4 (PF4), neben Interleukin 8 und Neutrophilen-aktivierendem Peptid-2. Nachdem Heparin an PF4 bindet, wird ein Autoantigen exponiert. PF4 wiederum vernetzt den auf der Thrombozytenoberfläche gelegenen Fc-Rezeptor FcγIIa. Durch die in dieser Zeit vermehrte Thrombozytenaktivierung entsteht in der Folge sowohl eine Thrombozytopenie als auch Thrombinbildung mit entsprechenden klinischen Folgen:

Diese werden noch verstärkt durch Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade, die Bildung von thrombozytären Mikropartikeln und der Alterierung von Endothelzellen sowie Monozyten. In ca. 40% der Fälle kommt es zu thromboembolischen Komplikationen (Extremitätenthrombosen, Lungenembolien, Myokardinfarkt, Verbrauchskoagulopathie), in 5 % zu Blutungen. Die Inzidenz für eine HIT Typ 2 beträgt nach Gabe von unfraktioniertem Heparin (UFH) i.v. immerhin etwa 2-4% bzw. 0,1-0,3% für niedermolekulares Heparin bei großen orthopädischen Eingriffen^{4,5,6}. Auch Schlaganfallpatienten bzw. Patienten aus dem kardiologischen oder intensivmedizinischen Spektrum tragen ein erhöhtes Risiko für eine HIT. Die wichtigste Maßnahme zur Vorbeugung einer HIT ist somit weiterhin die Gabe von niedermolekularem Heparin anstatt unfraktioniertem Heparin oder den unten aufgeführten Therapiealternativen, z.B. mit direkten Thrombinhemmern⁷.

1.4 Therapiealternativen bei HIT Typ 2

Patienten, die trotz oder gerade wegen einer HIT weiter antikoaguliert werden müssen, können in Deutschland bisher alternativ z.B. Hirudin-Derivate erhalten: Lepirudin bzw. Desirudin sind, ebenso wie das in dieser Arbeit untersuchte Argatroban, direkte Thrombinhemmer, welche ohne Antithrombin wirken. Auch das Heparinoid Danaparoid, ebenfalls ein Thrombinhemmer, steht zur Verfügung. Der Nachteil dieser Wirkstoffe ist jedoch ihre im Verhältnis zu Argatroban längere Wirkzeit und somit Steuerbarkeit unter schwierigen klinischen, z.B. postoperativen, Bedingungen. So besitzt Danaparoid beispielsweise eine Halbwertszeit von 24 Stunden. Weder Danaparoid noch Lepirudin sind antagonistisierbar⁸.

1.5 Argatroban

Argatroban wurde als erster synthetischer direkter Thrombinhemmer^{9,10,11}. durch die United States Food and Drug Administration (FDA) für die Thromboseprophylaxe zugelassen, wenn auch zunächst beschränkt auf diejenigen Patienten, die in ihrer Anamnese eine HIT Typ 2 aufweisen¹². Über die Thromboseprophylaxe hinaus hemmen die direkten Thrombinhemmer auch bereits gebundenes Thrombin¹³.

Solche Patienten können zunächst, bzw. bei vorheriger oraler Antikoagulation vorübergehend, mit Argatroban bzw. anderen direkten Thrombinhemmern (Melagatran, Napsagatran – noch in der klinischen Erprobung) intravenös behandelt und anschließend auf die orale Antikoagulation mit dem in den USA gebräuchlichen Warfarin umgestellt. Dabei wird während der ersten Tage der Einnahme von Warfarin die Argatrobaninfusion kontinuierlich fortgesetzt, bis Warfarin genügende antikoagulatorische Wirkung entfaltet. Als Vitamin-K-Antagonist greift Warfarin in den Syntheseprozess der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X ein. Da auch Protein C und Protein S von Vitamin K abhängig sind, ist sogar in den ersten Tagen der Gabe von Warfarin ein erhöhtes Thromboserisiko gegeben, wenn nicht gleichzeitig, z.B. mit Argatroban, antikoaguliert wird.

Durch in-vitro-Untersuchungen ist bekannt, daß Argatroban während der Umstellungsphase zu hohen INR (International Normalized Ratio)-Werten bis 8.0 führt. Ursache ist eine Wechselwirkung zwischen freiem Argatroban und dem in-vitro-Koagulationsassay¹⁴. Gleiches wurde auch für einen anderen direkten Thrombinhemmer Napsagatran beschrieben¹⁵. Im Gegenzug wird auch die aPTT als ein Parameter der Wirkung von Thrombinhemmern durch Warfarin beeinflusst. Jedoch ist nicht ganz klar, wie die PT-Verlängerung mit anderen Gerinnungsparametern korrespondiert und ob diese wirklich als ein höheres Blutungsrisiko zu bewerten ist.

1.5.1 Mögliche Anwendung von Argatroban in Europa

In den meisten europäischen Ländern werden andere Cumarin-Derivate als das mittellang wirksame Warfarin zur oralen Antikoagulation eingesetzt; in Deutschland, Österreich, der Schweiz, Polen, Ungarn, Tschechien sowie Frankreich ist das zumeist das lang wirksame Phenprocoumon. In Frankreich, der Schweiz und Italien findet zusätzlich Acenocoumarol, ein kurz wirksames Dicoumarol, Anwendung.

Die Untersuchung der Umstellung von Argatroban auf Warfarin war Bestandteil der Zulassungsstudien von Argatroban für die USA und Japan. Über die Umstellung auf Phenprocoumon bzw. Acenocoumarol hingegen lagen bisher keine Daten vor.

1.5.2 Eigenschaften und Wirkmechanismus

Argatroban ist ein L-Arginin-Derivat^a. Argatroban ist ein direkter Thrombin-Hemmer. Es bindet reversibel an Thrombin und benötigt keinen Kofaktor Antithrombin III für die antithrombotische Aktivität. Argatroban entfaltet seine Wirkung durch die Hemmung von thrombin-induzierten oder -katalysierten Reaktionen: Das schließt sowohl die Fibrin-Bildung ein als auch die Thrombin-aktivierte Aktivierung der Gerinnungsfaktoren V, VIII und XIII, des Protein C und die Plättchenaggregation.

Dabei ist Argatroban hoch selektiv für Thrombin mit einer Hemmkonstante (K_i) von $0,04\mu\text{M}$.

In der zur Thromboseprophylaxe gebräuchlichen Dosis von $1-3\mu\text{g/kg/min}$ bei Infusion, hat Argatroban wenig oder gar keinen Einfluss auf andere Serin-Proteasen (Trypsin, Faktor Xa, Plasmin und Kallikrein)¹⁶.

Argatroban ist in der Lage, sowohl die Aktivität von freiem als auch von im Thrombus gebundenen Thrombin zu hemmen. Argatroban interagiert nicht mit Heparin-induzierten Antikörpern und induziert selbst, soweit bekannt, keine Antikörperbildung¹⁷.

^a Strukturformel: (1-[5-[(aminoiminomethyl)amino]-1-oxo-2-[[1,2,3,4-tetrahydro-3-methyl-8-quinoliny]sulfonyl]amino]pentyl]-4-methyl-2-piperidincarboxylsäure,monohydrat)..

1.5.3 Pharmakokinetik/Pharmakodynamik

Argatroban wird oral nicht resorbiert und muß parenteral verabreicht werden. Argatroban verteilt sich größtenteils in der Extrazellulärflüssigkeit. Die Proteinbindung beträgt 54%, davon 20% an Albumin und 34 % an α 1-Säureglykoprotein¹⁸.

Argatroban wird in der Leber durch CYP 3A4/5 in insgesamt 4 Metaboliten hydroxyliert bzw. am 3-Methyltetrahydroquinolinring aromatisiert. Der primäre Metabolit (M1) weist eine 3-5 fach erniedrigte Antikoagulatorische Aktivität auf als Argatroban selbst. Nicht verstoffwechseltes Argatroban ist die Hauptkomponente im Plasma, die Plasmakonzentration des M1 beträgt 0-20% der verabreichten Dosis. Die anderen drei Metaboliten (M2-4) können nur in sehr geringen Konzentrationen im Urin gefunden werden und nicht in Plasma oder Stuhl¹⁶. Die Gesamtkörperclearance beträgt ca. 5,1mL/kg/min bei Infusionsdosen bis zu 40 μ g/kg/min.

Die terminale Halbwertszeit von Argatroban ist kurz und liegt bei 45 Minuten. Das Verhältnis der Stereoisomere zueinander bleibt durch Abbau und Ausscheidung hindurch unverändert. Argatroban wird vor allem durch biliäre Sekretion ausgeschieden, ein geringerer Anteil auch im Urin.

Bei intravenöser Verabreichung zeigen antikoagulatorischer Effekt und Plasmakonzentration von Argatroban einen engen Zusammenhang bei geringer interindividueller Variabilität. Nach Beginn der Argatrobaninfusion, wenn die Argatroban Plasmakonzentration messbar ansteigt, setzt die antikoagulatorische Wirkung ein. Das Fließgleichgewicht (steady state) wird nach ca. 1-3 Stunden erreicht. Bis zu einer Argatrobandosis von 40 μ g/kg/min verhalten sich antikoagulatorischer Effekt und Plasmakonzentration proportional zueinander¹⁸. Der antikoagulatorische Effekt findet sich vor allem in der Dosis-abhängigen Beeinflussung von aPTT und Ecarinzeit¹⁹. Der Einfluss auf die INR wird in dieser Arbeit dargestellt.

Nach Ende der Argatrobaninfusion zeigt sich ein schneller Wirkabfall, der bei einer Dosis von 3 μ g/kg/min nach durchschnittlich 30 Minuten gegen Null geht.

1.6 Orale Antikoagulation

1.6.1 Cumarinderivate

Die heute verwendeten oralen Antikoagulantien sind Derivate des 4-Hydroxycumarins Phenprocoumon (PC). Phenprocoumon gehört, genauso wie Acenocoumarol und Warfarin, zu den Vitamin-K-Antagonisten, welche hemmend in den Stoffwechsel der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie den antikoagulatorischen Gerinnungsfaktoren Protein-C und Protein-S eingreift. Deren Vorläufer-Proteine werden durch Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung aktiviert, wobei Vitamin K zu Vitamin-K-2,3-Epoxid oxidiert wird. Cumarine verhindern nun die im Anschluss stattfindende Reduktion des Epoxids zu nativem Vitamin K und unterbrechen diesen Zyklus. Da zu Beginn der Gabe von Vitamin-K-Antagonisten noch eine ausreichende Menge von Gerinnungsfaktoren vorhanden ist, setzt die antikoagulatorische Wirkung erst nach mehreren Tagen (Spitzeneffekt nach 48-72 Stunden) voll ein. Da Protein-C eine sehr viel kürzere Halbwertszeit als (wenige Stunden) als z.B. Faktor X (mehrere Tage) hat, entsteht zu Beginn der Therapie sogar ein erhöhtes Thromboserisiko, wenn die Gerinnung nicht anderweitig gehemmt wird²⁰. Das unterstreicht die Notwendigkeit einer überlagernden Therapie, z.B. mit intravenös verabreichten Antikoagulantien.

1.6.2 Pharmakokinetik der Cumarinderivate

Nach oraler Gabe werden die Cumarinderivate sehr gut resorbiert und besitzen eine sehr hohe Plasmaeiweißbindung (Phenprocoumon >99%). Phenprocoumon wird genauso wie Warfarin über das Cytochromsystem (CYP2C9) verstoffwechselt und ist mit einer Halbwertszeit von 150 Stunden ein Arzneistoff mit Langzeitwirkung: In der Regel 4-7 Tage, in Einzelfällen bis zu 14 Tage.

Hierbei schwankt die Eliminationsgeschwindigkeit interindividuell erheblich. Die Ausscheidung erfolgt nach Biotransformation vorwiegend renal in Form der Metabolite. Acenocoumarol wird fast nicht metabolisiert und über die Niere ausgeschieden. Es besitzt eine Eliminationshalbwertszeit von 24 Stunden und eine Wirkdauer von 2-4 Tagen (Spitzeneffekt nach ca. 24-48 Stunden)²¹.

1.7 Studienziele

Die beschriebene Probandenstudie wurde zu folgenden Zwecken durchgeführt:

1. Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen Argatroban und Phenprocoumon bzw. Acenocoumarol.
2. Erstellen eines Nomogramms für die Überwachung der oralen Antikoagulation (INR) während der Umstellung von Argatroban auf Phenprocoumon bzw. Acenocoumarol.
3. Untersuchung eines möglichen Einflusses der oralen Antikoagulation und Argatroban auf aPTT und Ecarin Clotting Time (ECT).
4. Beschreibung der Plasmaspiegel von Argatroban unter Koadministration von Phenprocoumon bzw. Acenocoumarol.
5. Beschreibung der Blutungszeit unter Argatroban und oraler Antikoagulation.

Da Argatroban als direkter Thrombinhemmer auch die INR beeinflusst, hat die Gabe von Argatroban zu Cumarinderivaten einen kombinierten Effekt auf die Labormessung der INR. Argatroban hat jedoch keine eigenständige Wirkung auf die Vitamin-K-abhängige Faktor Xa-Aktivität, wie sie durch die Cumarine hervorgerufen wird.

Die im Labortestverfahren *in vitro* aufgetretene und für Warfarin auch *in vivo* bereits beschriebene¹³ Wechselwirkung auf die INR zwischen Cumarinderivaten und Argatroban ist abhängig sowohl von der Argatrobangabe als auch dem Thromboplastinreagenz, welches benutzt wird. Letzteres wird durch den ISI von Thromboplastin beeinflusst. Thromboplastine mit einem höheren ISI wiesen auch eine höhere INR bei Komedikation von Warfarin und Argatroban oder Melagatran auf^{22,23}.

Das Primärziel dieser Studie war die Erstellung des Nomogramms für die INR der in der Thromboseprophylaxe verwendeten oralen Gerinnungshemmer Phenprocoumon und Acenocoumarol alleine im Vergleich zu Phenprocoumon und Acenocoumarol plus verschiedene Dosierungen Argatroban (1,2 und 3 µg/kg/min). Die beobachteten Interaktionen sollten in Handlungsanweisungen bzw. die Produktinformation für die Umstellung von Argatroban *i.v.* auf eine orale Antikoagulans eingehen. Es wurden zwei verschiedene Thromboplastine verwendet, da aus Voruntersuchungen mit Warfarin bereits bekannt war, daß die ISI (International Sensitivity Index) des PT-Reagens einen Einfluss auf die Interaktion hat²².

1.7.1 Studienprotokoll

Die offene Phase I-Studie wurde an insgesamt 39 gesunden männlichen Probanden im Alter zwischen 22 und 41 Jahren durchgeführt. Nach dem positiven Votum durch die Ethikkommission des Klinikums der J.W.Goethe-Universität und der ausführlichen schriftlichen und mündlichen Probandenaufklärung bzw. Einverständniserklärung erfolgte der Einschluss in die Studie durch Randomisierung in Parallelgruppen. Der Altersdurchschnitt betrug 28,7 Jahre ($\pm 4,1$), die durchschnittliche Größe betrug 183 cm (± 7), das Durchschnittsgewicht 77,5 kg ($\pm 9,5$), der mittlere body mass index (BMI) 23,2 kg/m² ($\pm 2,5$). 36 vollständige Datensätze lagen zur Auswertung vor.

Von diesen erhielten je 18 Probanden Acenocoumarol bzw. Phenprocoumon. Diese beiden Gruppen wurden jeweils in drei Studienarme unterteilt, welche 1, 2 und 3 µg/kg/min Argatroban i.v. erhielten: Unter diesen, in vorhergehenden Studien untersuchten, Dosierungen war eine aPTT-Verlängerung im Bereich zwischen 1,5-fach bis 2,5-fach erreicht worden, wie sie normalerweise zur Thromboseprophylaxe in Patienten angestrebt wird²⁴.

Alle für die Auswertung der pharmakodynamischen Parameter nötigen Laborproben wurden verblindet. 3 Probanden beendeten die Studienteilnahme vorzeitig aufgrund des Überschreitens des im Studienprotokoll vorgegebenen Grenzwertes der INR von 3,5 vor erneutem Start der Argatrobaninfusion an den Studientagen 3 bzw. 4. Keiner der Probanden hatte Drogen bzw. Medikation während der letzten 14 Tage vor Studienbeginn eingenommen. Die Einnahme Xanthin-haltiger Getränke, Kaffee oder Tee war vor und während der Studie untersagt, die Nahrungsaufnahme folgte einem standardisierten Zeitplan.

1.7.2 Dosisplan

Phenprocoumon – Gruppe (n=18)

Argatroban wurde an den Studientagen 1,3,4 und 5 jeweils vormittags über 5h mit Dosierungen von 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (n=6), 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (n=6), und 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (n=6) infundiert.

Tag 1 abends: 9mg Phenprocoumon 4 h nach dem Ende der Argatroban-Infusion

Tag 2 morgens: 9mg Phenprocoumon

Tag 3 morgens, vor der Argatroban-Infusion:

wenn $\text{INR} < 1,5$: 6mg Phenprocoumon

$\text{INR} = 1,5-3,0$: 3mg Phenprocoumon

$\text{INR} > 3,0$: 1,5mg Phenprocoumon

Tag 4 morgens, vor der Argatroban-Infusion:

wenn $\text{INR} < 1,5$: 6mg Phenprocoumon

$\text{INR} = 1,5-3,0$: 3mg Phenprocoumon

$\text{INR} > 3,0$: kein Phenprocoumon

Acenocoumarol -Gruppe (n=18)

Argatroban wurde an den Studientagen 1,3,4 und 5 jeweils vormittags über 5h mit Dosierungen von 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (n=6), 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (n=6), und 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (n=6) infundiert.

Tag 1 abends: 8mg Acenocoumarol 4 h nach dem Ende der Argatroban-Infusion

Tag 2 morgens: 4mg Acenocoumarol

Tag 3 morgens, vor der Argatroban-Infusion:

wenn $\text{INR} < 1,5$: 8mg Acenocoumarol

$\text{INR} = 1,5-3,0$: 4mg Acenocoumarol

$\text{INR} > 3,0$: 2mg Acenocoumarol

Tag 4 morgens, vor der Argatroban-Infusion:

wenn $\text{INR} < 1,5$: 8mg Acenocoumarol

$\text{INR} = 1,5-3,0$: 4mg Acenocoumarol

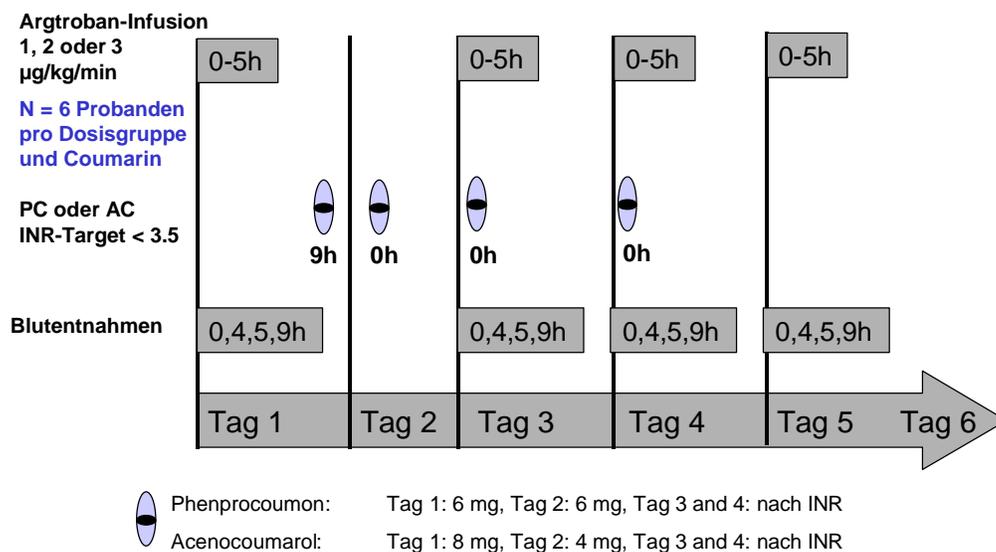
$\text{INR} > 3,0$: 2mg Acenocoumarol

1.7.3 Primär- und Sekundärparameter der Untersuchung

Durch den Studienablauf (s.u.) wurde die Zeit des Behandlungsbeginns mit einer oralen Antikoagulation unter Argatroban i.v., wie sie unter klinischen Bedingungen vorkommen können, simuliert. Dabei enthielten die Ergebnisse eine Messung der Gerinnungsparameter unter Argatroban i.v. alleine im Vergleich zu Argatroban i.v. mit Dicoumarol-Koadministration. Parameter der Untersuchung waren: INR, aPTT, Ecarin Clotting Time (ECT), Blutungszeit, Plasmaspiegel von Argatroban.

Die Datenpaare der INR zu den Zeitpunkten 0h/4h und 9h/5h desselben Studientages und deren Korrelation mit den Daten unter Argatroban alleine (1.Studientag) erlauben dabei folgende Unterscheidungen bei der Wirkung auf die INR:

1. Argatroban alleine (1. Studientag, 4h und 5h)
2. Argatroban + orale Antikoagulation (Studientage 3-5, 4h und 5h)
3. Orale Antikoagulation alleine (Studientage 3-5, 0h und 9h)



2. Material und Methoden

2.1 Labor

2.1.1 Blutentnahme und Probenaufarbeitung

Über eine venöse Verweilkanüle wurde Blut aus einer Kubitalvene entnommen und direkt bei 2000g für 10 Minuten zentrifugiert, um Plättchenarmes Plasma (PPP) zu gewinnen. Das Laborpersonal war im Hinblick auf die Herkunft der Proben verblindet. Die Argatroban Plasmaspiegel wurden mithilfe eines Gaschromatographen/Massenspektrometers (GC/MS) ermittelt. PT, aPTT und Ecarin Clotting Time (ECT) wurden auf dem Gerinnungsanalysegerät ACL 700 der Firma IL (München) bestimmt. Zwei PT-Reagenzien kamen dabei zur Anwendung: [1] PT-Fibrinogen mit einem ISI (International Sensitivity Index, Abweichung des Reagenz vom WHO-Standard, welcher gleich 1 gesetzt ist) von 2,13 und [2] PT-Recombiplastin mit einem ISI von 1.02. Für die Bestimmung der aPTT wurde Ellagsäure verwendet. Die Blutungszeit wurde mithilfe eines Simplate II-Device Gerätes der Firma Organon Teknika zu den Zeitpunkten 0h und 5h, d.h. vor und unter Argatrobanwirkung an den Studientagen 1 und 5 bestimmt.

2.1.2 Prothrombinzeitbestimmung (PT)

Die klinische Indikationen der Untersuchung sind zum Einen die Erfassung von Gerinnungsstörungen, die auf einer Verminderung der Faktoren II, VII und X beruhen und zum Anderen die Erfassung der Wirkung von oralen Antikoagulantien.

Die Prothrombinzeitbestimmung ist nicht geeignet, um eine allgemeine Gerinnungsstörung zu erfassen. Die Bestimmung der Prothrombinzeit erfolgte in dieser Studie ebenfalls mit dem ACL 700 der Fa. IL (München) Mit den Reagenzien PT-Fibrinogen (Fa. IL) oder Rekombiplastin (Fa. IL) erfolgt durch die Messung der sich ändernden Lichtstreuung in einer Plasmaprobe während der Gerinnselfbildung. Die Zeit bis zur maximalen Steigung des Messsignals bis zur Gerinnselfbildung ist das Maß für die PT und die Ableitung der INR nach folgender Formel:

$$\text{INR} = \text{PR}^{\text{ISI}} \quad [\text{Formel 1}]$$

Die PR ist die Thromboplastinzeit -Ratio, d.h. das Verhältnis der Gerinnungszeit des Patientenplasmas zu Referenz-Normalplasma (im sogenannten Quick-Wert als Prozentzahl angegeben)

Dieses Verfahren ist ein allgemein in der Klinik angewendetes Verfahren und wird deshalb nicht näher ausgeführt.

Die Bestimmung der Plasmagerinnungszeit mit dem ACL 700 der Fa. IL, München:

1. PT-Fibrinogen (Fa. IL) Artikel-Nr. 097567-10. ISI-Bereich am ACL 7000 1,98 – 2,24.
2. Rekombiplastin (Fa. IL) Artikel-Nr. 49732750. ISI-Bereich am ACL 7000 0,93-1,03
3. Kalibrierungsplasma (Fa. IL) Artikel-Nr. 084673-00.
4. Normal Kontrollplasma (Fa. IL) Artikel-Nr. 084670-11
5. Abnormal Kontrollplasma Bereich II (H) (Fa. IL) Artikel-Nr. 084677-00
6. Steriles Aqua dest.

Durchführung der Untersuchung und Vorbereitung der Reagenzien:

Die Untersuchung erfolgte jeweils direkt an frisch gewonnenem, plättchenarmem Plasma. Die Plasmaproben können aber auch bei -20°C oder mehr eingefroren werden. Nach Wiederauftauen sollte die Bestimmung innerhalb von 4-5 Stunden erfolgen^{25,26,27,28,29}.

2.1.3 Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT)

Mithilfe des Reagenz aPTT-Ellagsäure (Fa. IL) wird Plasma mit Phospholipiden und einem Oberflächenaktivator versetzt. Dies führt zur Aktivierung des endogenen Gerinnungssystems.

Durch die Zugabe von Kalziumchlorid wird die Gerinnung gestartet. Die aPTT-Bestimmung erfasst Aktivitätsstörungen und Mangelzustände der endogenen Faktoren IX, XI, XII sowie der gemeinsamen Endstrecke der Gerinnung mit den Faktoren II, V, VIII und X. Faktor VII wird nicht erfasst. Die aPTT ist vor allem empfindlich für die gerinnungshemmende Wirkung durch Heparin und auch Argatroban, wird jedoch auch beeinflusst durch eine Antikoagulantientherapie mit Cumarin-Derivaten.

Die Analyse im ACL 700 erfolgt durch Messung der sich ändernden Lichtstreuung in einer Plasmaprobe während der Gerinnselbildung. Die Zeit bis zur maximalen Steigung des Messsignals bis zur Gerinnselbildung ist das Maß für die partielle Thromboplastinzeit (aPTT). Dieses Verfahren ist ebenfalls ein in der Klinik-Laborroutine eingesetztes Messverfahren.

Die Anforderungen an die Blutentnahme sowie die Methode der Gewinnung von PPP wurden bereits oben im Zusammenhang mit dem Gebrauch des ACL 700 beschrieben.

Es werden folgende Reagenzien dabei verwendet:

1. aPTT-Ellagsäure (Fa. IL) Artikel-Nr. 097570-10 (Testkit enthält Rindercephalin und Kalziumchlorid). Referenzbereich am ACL 7000: 18 – 23 Sekunden.
2. Kalibrationsplasma (Fa. IL) Artikel-Nr. 084673-00
3. Normal Kontrollplasma (Fa. IL) Artikel-Nr. 084670-11
4. Abnormal Kontrollplasma Bereich II (H) (Fa. IL) Artikel-Nr. 084677-00
5. Steriles Aqua dest.

Die Untersuchung erfolgte ebenfalls direkt an frisch gewonnenem, plättchenarmem Plasma^{29,30,31,32}.

2.1.4 Bestimmung der Ecarinzeit (ECT)

Ecarin wird aus dem Gift der Schlange *Echis carinatus* gewonnen und verwandelt Prothrombin in Meizothrombin. Meizothrombin hat nur etwa 5% der Gerinnungsaktivität von Alphathrombin, besitzt aber eine hohe Affinität gegenüber Thrombinhemmern. Die Ecaringerinnungszeit ist deshalb eine schnelle Methode für die Bestimmung spezifischer Thrombinhemmer wie Hirudin, PEG-Hirudin oder Argatroban. In Abhängigkeit von der Konzentration des Thrombinhemmers im Plasma ist die Zeit, bis nicht gebundenes Meizothrombin Fibrinogen in Fibrin verwandeln kann (Gerinnungszeit) verlängert. Die Bildung des Fibringerinnsels kann man mit optischen oder mechanischen Verfahren messen. Für Hirudin besteht eine Linearität im Konzentrationsbereich von 50 – 2000 ng/ml. Da die Bindung von Meizothrombin an Antithrombin durch Heparin nicht beeinflusst wird, kann die Methode auch zur Bestimmung von Thrombinhemmern in Gegenwart von Heparin verwendet werden ³³.

Folgende Reagenzien fanden Anwendung:

1. Ecarin der Fa. Pentapharm (Jena) wird verwendet in einer Endkonzentration von 5 EU/ml in einem Tris-Puffer 50µMol/Tris, 154 µMol/l NaCl, pH 7.4
2. CaCl₂-Lösung 50 µMol/l
3. Kalibrierungs-Plasma und Kontroll-Plasma P: Bestell-Nr. OUPZ

Vorbereitung des Reagenz:

Ecarin-Lyophilisat wird in der auf dem Etikett angegebenen Menge destilliertem Wasser aufgelöst und vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Nach Erreichen von 37°C muß das Reagenz mindestens 30 Minuten lang bei dieser Temperatur inkubiert werden und bleibt insgesamt für mindestens 4 Stunden stabil.

Die Untersuchung der ECT muss innerhalb von 3 Stunden an frisch gewonnenem PPP erfolgen. Nach dieser Methode ist die ECT spezifisch für Thrombinhemmer und wird weder durch Acenocoumarol noch Phenprocoumon beeinflusst ³⁴.

2.1.5 Bestimmung der Blutungszeit

30-60 Sekunden nach Anlegen eines venösen Staus von 40mm Hg mit Hilfe einer Blutdruckmanschette am Oberarm, wird mit einem sterilen Spezialschnäpper (Simplate, Organon Teknika GmbH, Eppelheim) ein standardisierter horizontaler Hautschnitt von 5mm Länge und 1mm Tiefe an der Ventralseite des Unterarms angebracht. Gleichzeitig wird mit Zelluloseputfern ohne Berührung der Wundränder in Intervallen von 15 Sekunden das austretende Blut aufgesaugt und die Blutungsdauer mit einer Stoppuhr bestimmt.

2.2 Statistische Methoden

2.2.1 INR-Datenpaare

Die lineare Regressionsanalyse und die Nomogramme wurden aus der INR zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen oraler Antikoagulation (0h und 9h) und oraler Antikoagulation plus Argatroban (4h und 5h) ermittelt. Die Messwerte vom 1. Studientag sind in die Berechnungen einbezogen worden, weil ARG alleine bereits einen Effekt auf die INR hat. Grundlage der Berechnung waren deshalb die Datenpaare 0h/4h bzw. 9h/5h desselben Studientages.

Die INR unter oraler Antikoagulation (OAK) und Argatroban wurde mithilfe der linearen Regressionsanalyse bestimmt, unter Verwendung folgender Formel

$$Y = a + bx + \varepsilon \quad \text{[Formel 2]}$$

für Phenprocoumon und Acenocoumarol.

Es gilt: $y = \text{INR}$ unter Oraler Antikoagulation + Argatroban,

$0h; 4h$ und $x =$ korrespondierende INR unter oraler Antikoagulation, $5h; 9h$

Die 95%igen individuellen Vorhersageintervalle (individual prediction interval = ipred) von INR_{OAK} alleine wurden aus der $\text{INR}_{\text{OAK} + \text{Argatroban}}$ wie folgt berechnet:

$$y = \hat{a} + \hat{b}x \pm t_{1-0.05/2, S} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{S_{xx}}} \quad \text{[Formel 3]}$$

wenn gilt:

$$\hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\bar{x}$$

$$\hat{b} = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$s = \sqrt{\frac{S_{yy} - \hat{b}S_{xy}}{n - 2}}$$

$$t_{1-0.05/2} = t(n - 2; 1 - 0.05/2)$$

Die halbe Spannweite der 95%igen individuellen Vorhersage-Intervallkurven in der Horizontalen bezeichnen die Vorhersagefehler einer Monotherapie-INR, kalkuliert aus der Kootherapie-INR. Die endgültigen Vorhersagefehler wurden als Konstante der maximal halben Spannweite dieser beiden Kurven über die gesamten Werte berechnet, dem statistischen Verfahren folgend, welches Sheth et. al. in ihrer Untersuchung angewendet haben ³⁵.

2.2.2 aPTT- und ECT-Analyse

Die aPTT- bzw. ECT-Werte von Studientag 1 (Argatroban alleine) wurden mit denen von Studientag 3 und 5 (Argatroban + orale Antikoagulation) verglichen. ECT und aPTT wurden mit der Argatroban-Plasmakonzentration korreliert. Diese Konzentrations-Effekt-Analysen sind für diejenigen Tage ausgeführt worden, an denen Argatroban-Plasmakonzentrationen ermittelt wurden (Studientage 1; 3 und 5). Dadurch konnte eine pharmakokinetische Interaktion (Einfluss der aktuellen Höhe der Plasmakonzentration) von einer pharmakodynamischen Interaktion (wenn dieselben Plasmakonzentrationen von Argatroban zu unterschiedlichen Effekten -bedingt durch die Komedikation- führen) unterschieden werden.

Die Daten der drei Argatroban-Dosierungen wurden gepoolt und nach Studientag und oraler Antikoagulation unterschieden. Abschließend erfolgte die Analyse nach einem sigmoidalen E_{\max} -Modell, da andere Modelle aufgrund schlechter Datenanpassung verworfen wurden, nach der folgenden Formel:

$$E = E_0 + [(E_{\max} * C^N)/(EC_{50}^N + C^N)] \quad [\text{Formel 4}]$$

Die Kurvenparameter wurden abgeleitet, nachdem die Anpassung der Konzentrations (C)/Effekt (E)-Daten mithilfe eines Least-Squares Iteration-Programms nach dem Marquard-Algorithmus (WinNonlin[®]) erfolgt war. Dabei wurde E_{\max} absichtlich bei 90 Sekunden für die aPTT bzw. 250 Sekunden für die ECT während der Berechnungen festgesetzt, um die Kurven in einem sigmoidalen Profil zu stabilisieren (angezeigt durch den Hill-Koeffizienten N). E_0 war hierbei der Ausgangswert für die aPTT und ECT, wenn die Konzentration von Argatroban (C) gleich Null war.

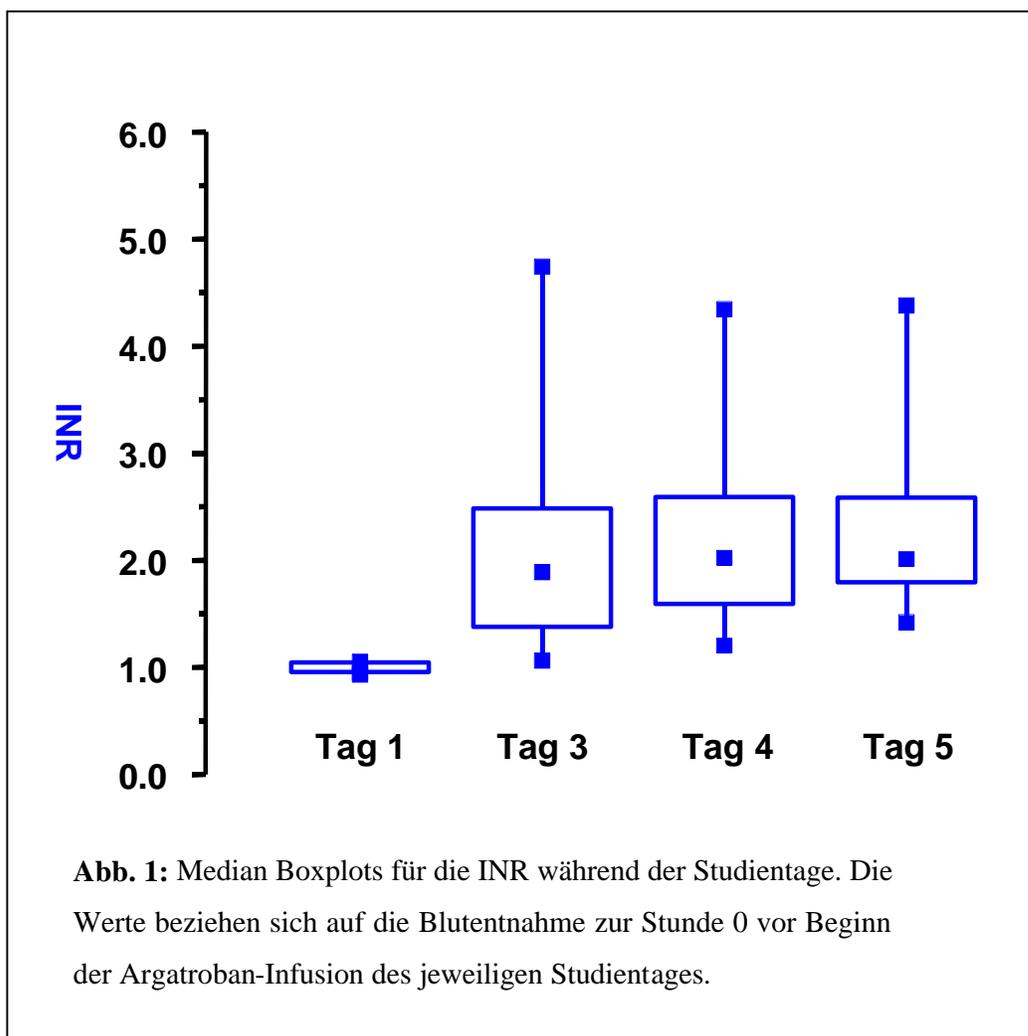
2.2.3 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mithilfe deskriptiver Statistik für jeden Messzeitpunkt, Studientag, jede Argatroban-Dosierung und oraler Antikoagulation (OAK) zusammengefasst.

3. Ergebnisse

3.1 INR

Die Verteilung der INR während der Studienperiode ist in Abbildung 1 dargestellt (Median-Boxplots für alle Gruppen).



Beobachtet wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der INR_{OAK} (orale Antikoagulation) allein (0h vs. 4h) und $\text{INR}_{\text{OAK+Argatroban}}$ (9h vs. 5h). Der Anstieg der Regressionsgeraden wird mit Zunahme der Argatroban-Dosis steiler. Unterschiede zwischen den oralen Antikoagulantien waren nicht signifikant. Jedoch stieg auch bei Verwendung der höheren ISI des Thromboplastin-Reagens die Steigung der Regressionsgeraden an. In den Abbildungen 2A-D sind alle gemessenen Werte und jeweils drei Regressionsgeraden für die Argatroban-Dosierungen 1, 2 und 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ dargestellt.

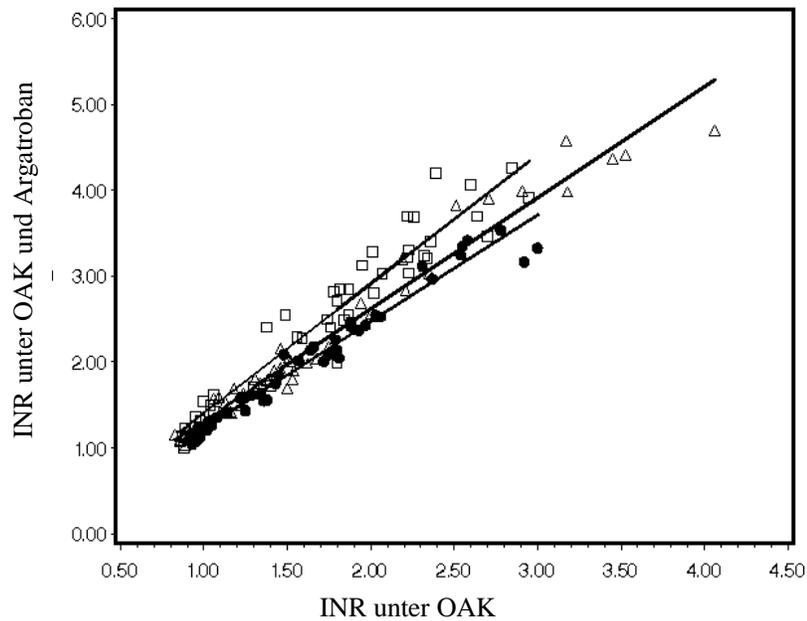


Abb. 2A: Regressionsgeraden für INR_{OAK} (orale Antikoagulation) allein (0h vs. 4h) vs. $\text{INR}_{\text{OAK+Argatroban}}$ (9h vs. 5h). Phenprocoumon: (PC) ISI 1.02; Argatroban-Dosierungen: Werte für 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (●), 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (Δ), and 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (□) überlagernd dargestellt.

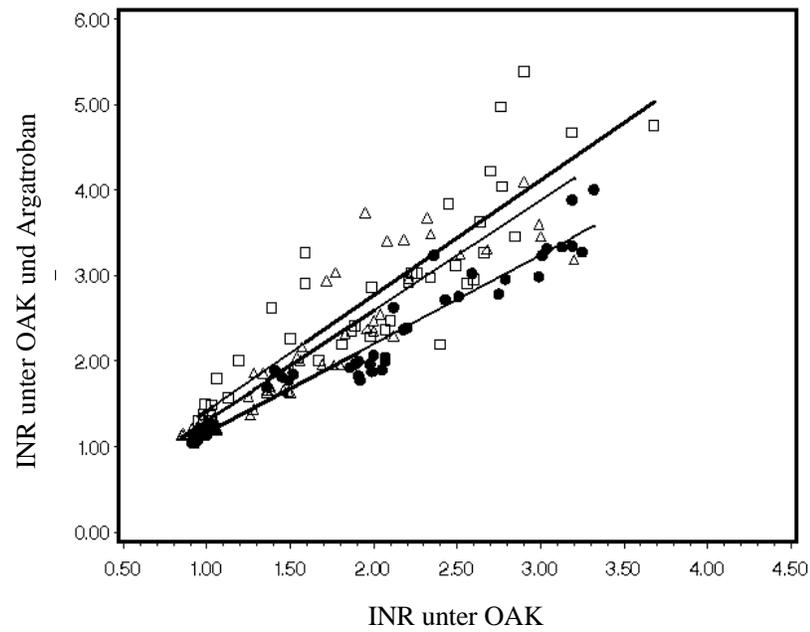


Abb. 2B: Regressionsgeraden für INR_{OAK} (orale Antikoagulation) allein (0h vs. 4h) vs. $\text{INR}_{\text{OAK}+\text{Argatroban}}$ (9h vs. 5h). Acenocoumarol: (AC) ISI 1.02; Argatroban-Dosierungen: Werte für $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (\bullet), $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (Δ), and $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (\square) überlagernd dargestellt.

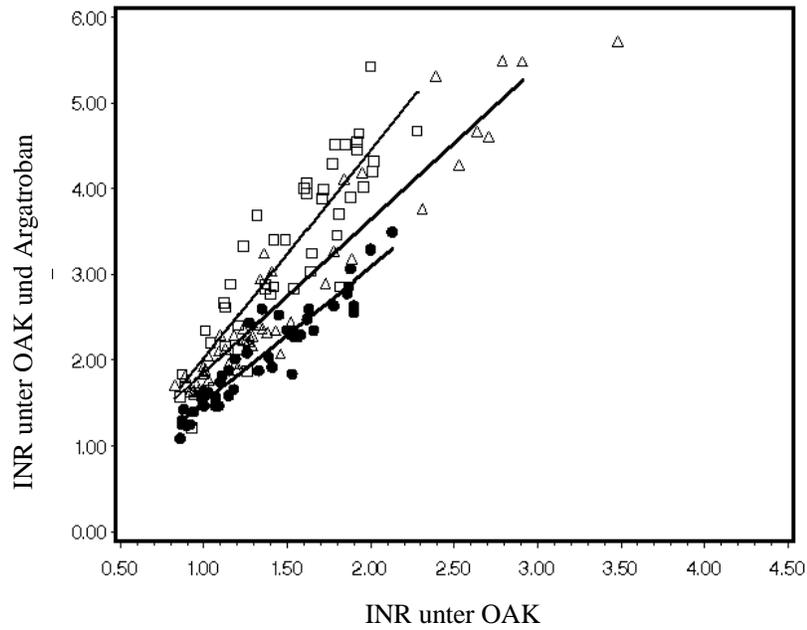


Abb. 2C: Regressionsgeraden für INR_{OAK} (orale Antikoagulation) allein (0h vs. 4h) vs. $\text{INR}_{\text{OAK}+\text{Argatroban}}$ (9h vs. 5h). Phenprocoumon: (PC) ISI 2.13; Argatroban-Dosierungen: Werte für $1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (\bullet), $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (Δ), and $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (\square) überlagernd dargestellt.

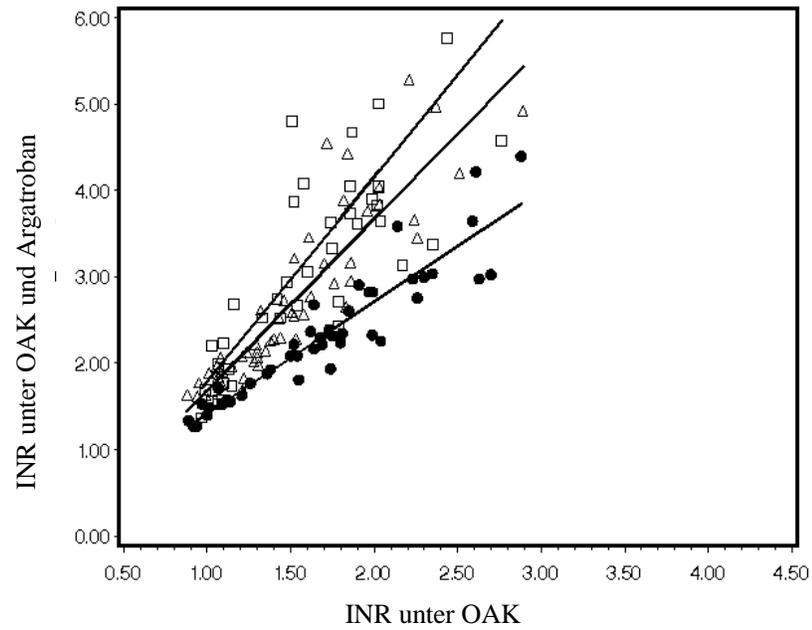


Abb. 2D: Regressionsgeraden für INR_{OAK} allein (0h vs. 4h) vs. $INR_{OAK+Argatroban}$ (9h vs. 5h). Acenocoumarol: (AC) ISI 2.13. Argatroban-Dosierungen: Werte für 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (●), 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (Δ), and 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (□) überlagernd dargestellt.

In den Tabellen 1 und 2 sind als Beispiel die INR -Werte aufgeführt, die für die orale Antikoagulation abgelesen werden können, wenn die INR = 4 für die Kombinationstherapie Argatroban + orale Antikoagulation ist.

Tabelle 1: Gleichungen der Regressionsgeraden aus den Abbildungen 2A und 2B (ISI 1,02)

Argatroban ($\mu\text{g/kg/min}$)	OAK	Gleichung	$\text{INR}_{\text{OAK alleine, wenn}} \text{INR}_{\text{OAK+Argatroban}} = 4$	Vorhersagefehler
1	PC	$Y = 1,25X - 0,02$	3,2*	0,24
2	PC	$Y = 1,30X + 0,02$	3,1	0,28
3	PC	$Y = 1,51X - 0,11$	2,7	0,38
1	AC	$Y = 1,04X + 0,11$	3,7	0,44
2	AC	$Y = 1,29X + 0,01$	3,1	0,60
3	AC	$Y = 1,35X + 0,07$	2,9	0,82

PC = Phenprocoumon; AC = Acenocoumarol; OAK = orale Antikoagulation

* Wenn die INR = 4 unter oraler Antikoagulation + Argatroban, so ist mit 95% Wahrscheinlichkeit die wahre INR = $3,2 \pm 0,24$.

Tabelle 2: Gleichungen der Regressionsgeraden aus den Abbildungen 2C und 2D (ISI 2,13)

Argatroban ($\mu\text{g/kg/min}$)	OAK	Gleichung	$\text{INR}_{\text{OAK alleine, wenn}} \text{INR}_{\text{OAK+Argatroban}} = 4$	Vorhersagefehler
1	PC	$Y = 1,58X - 0,08$	2,6*	0,28
2	PC	$Y = 1,79X + 0,06$	2,2	0,39
3	PC	$Y = 2,42X - 0,40$	1,8	0,44
1	AC	$Y = 1,29X + 0,13$	3,0	0,48
2	AC	$Y = 1,99X - 0,30$	2,2	0,48
3	AC	$Y = 2,37X - 0,58$	1,9	0,93

PC = Phenprocoumon; AC = Acenocoumarol; OAK = orale Antikoagulation

* Wenn die INR = 4 unter oraler Antikoagulation + Argatroban, so ist mit 95% Wahrscheinlichkeit die wahre INR = $2,6 \pm 0,28$.

3.2 Nomogramm

Aus den oben aufgeführten Werten wurde, wie im Methodenteil beschrieben, das Nomogramm erstellt. Auch hier wurde aus praktischen Gründen eine $INR_{OAK+Argatroban}$ von 4 gewählt, um den Gebrauch des Nomogramms zu verdeutlichen: Bei einer ISI von 1,02 korrespondiert eine $INR_{OAK+Argatroban}$ von 4 für Phenprocoumon mit einer $INR_{OAK\text{ allein}}$ von 3,2 (ARG 1,0 $\mu\text{g/kg/min}$) bis 2,7 (ARG 3,0 $\mu\text{g/kg/min}$) und eine $INR_{OAK+Argatroban}$ von 4 für Acenocoumarol korrespondiert mit einer $INR_{OAK\text{ allein}}$ von 3,7 (ARG 1,0 $\mu\text{g/kg/min}$) bis 2,9 (ARG 3,0 $\mu\text{g/kg/min}$). Bei einer ISI von 2,13 korrespondiert eine $INR_{OAK+Argatroban}$ von 4 für Phenprocoumon mit einer $INR_{OAK\text{ allein}}$ von 2,6 (ARG 1,0 $\mu\text{g/kg/min}$) bis 1,8 (ARG 3,0 $\mu\text{g/kg/min}$) und eine $INR_{ARG+OAK}$ von 4 für Acenocoumarol korrespondiert mit einer $INR_{OAK\text{ allein}}$ von 3,0 (ARG 1,0 $\mu\text{g/kg/min}$) bis 1,9 (ARG 3,0 $\mu\text{g/kg/min}$) (Siehe Tabelle 1). Der Vorhersagefehler für die ermittelte „wahre“ $INR_{OAK\text{ allein}}$ in Unterscheidung von der $INR_{OAK+Argatroban}$ liegt zwischen $\pm 0,24$ und $\pm 0,6$ INR-Einheiten für die Argatroban-Dosierungen 1,0 und 2,0 $\mu\text{g/kg/min}$, genauso wie für 3,0 $\mu\text{g/kg/min}$ bei Gabe von Phenprocoumon. Nur die Regressionsgerade für Acenocoumarol unter einer Dosis von 3,0 $\mu\text{g/kg/min}$ weist einen größeren Vorhersagefehler von $\pm 1,0$ auf. Die Nomogramme sind in den Abbildungen 3A und 3B beispielhaft dargestellt.

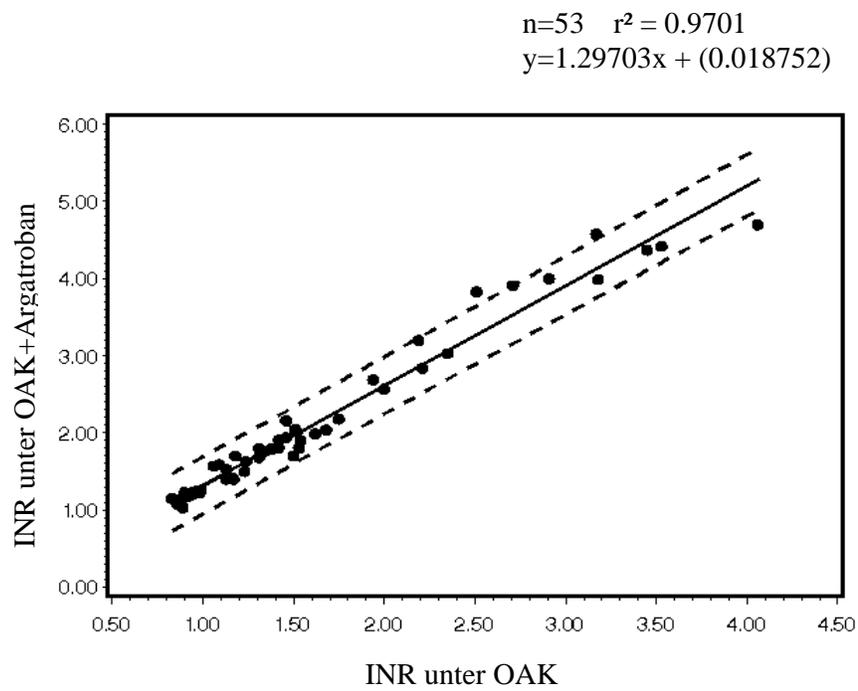
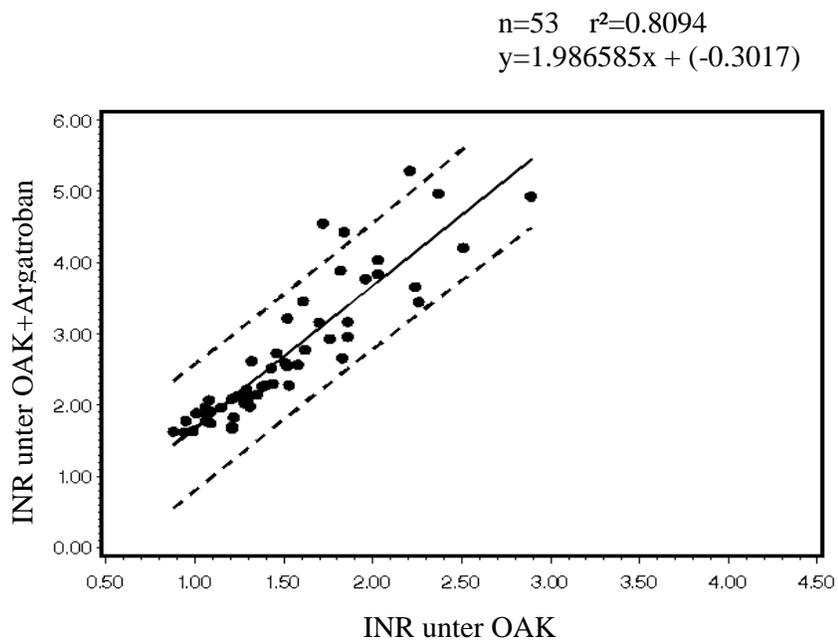


Abb. 3A:

Regressionsgeraden INR_{OAK} allein vs. $INR_{OAK+Argatroban}$ und 95% Vorhersageintervall für:

A = Argatroban 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, Phenprocoumon (PC), ISI 1.02.

**Abb. 3B:**

Regressionsgeraden INR_{OAK} allein vs. $INR_{OAK+Argatroban}$ und 95% Vorhersageintervall für:

B = Argatroban 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, Acenocoumarol (AC), ISI 2.13.

3.3 Argatroban-Plasmaspiegel

Die orale Antikoagulation begann am Abend des ersten Studientages. An Tag 3, vor Beginn der Argatrobaninfusion bewegte sich die INR in allen Behandlungsgruppen zwischen 1,5-2,6, an Tag 4 zwischen 1,8 und 3,6 und an Tag 5 zwischen 1,8 und 3,4 (s. Abbildungen 2A-D). Die maximalen Plasmakonzentrationen von Argatroban, welche zur Stunde 5 der Infusionstage im Steady State gemessen wurden, variierten entsprechend der Argatroban-Dosis. Sie waren unter der oralen Antikoagulation nicht signifikant verändert. Zur Stunde 9 der jeweiligen Infusionstage fielen die Plasmaspiegel von Argatroban bei allen Probanden unter 35 ng/ml (s. Tabelle 3).

Tabelle 3:							
Argatroban -Plasmakonzentration in ng/ml; Mittelwert (Standardabweichung).							
Infusionsdauer für Argatroban war 5 Stunden (steady state):							
Argatroban - Dosis		1,0 µg/kg/min		2,0 µg/kg/min		3,0 µg/kg/min	
OAK		PC (n=6)	AC (n=6)	PC (n=8)	AC (n=7)	PC (n=6)	AC (n=6)
Tag 1	0h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	5h	160 (49)	165 (12)	327 (34)	320 (52)	412 (174)	327 (109)
	9h	6 (3)	4 (1)	6 (3)	9 (9)	17 (9)	15 (9)
OAK		PC (n=6)	AC (n=6)	PC (n=8)	AC (n=6)	PC (n=6)	AC (n=6)
Tag 3	0h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	5h	201 (44)	170 (25)	352 (84)	312 (76)	469 (141)	325 (105)
	9h	5 (2)	3 (1)	7 (5)	6 (2)	11 (7)	18 (11)
OAK		PC (n=6)	AC (n=5)	PC (n=6)	AC (n=7)	PC (n=6)	AC (n=5)
Tag 5	0h	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	5h	176 (27)	151 (28)	300 (47)	261 (34)	398 (91)	405 (61)
	9h	10 (11)	5 (1)	6 (2)	5 (4)	9 (5)	11 (4)

PC = Phenprocoumon; AC = Acenocoumaol; OAK = orale Antikoagulation

3.4 aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Die aPTT-Zeit-Profile sind in den Abbildungen 4A (Argatroban + Phenprocoumon) und 4B (Argatroban + Acenocoumarol) dargestellt. Die Argatroban-Infusion alleine führte vor Beginn der oralen Antikoagulation zu einer 1,5- bis 3-fach verlängerten aPTT, abhängig von der Argatroban -Dosisrate. Während des Beginns der oralen Antikoagulation war die aPTT vor dem Start der Argatroban-Infusion nicht verändert. Unter Argatroban im steady state (5h-Wert) war die aPTT jedoch im Vergleich zum ersten Infusionstag ohne orale Antikoagulation um 10-15 Sekunden verlängert.

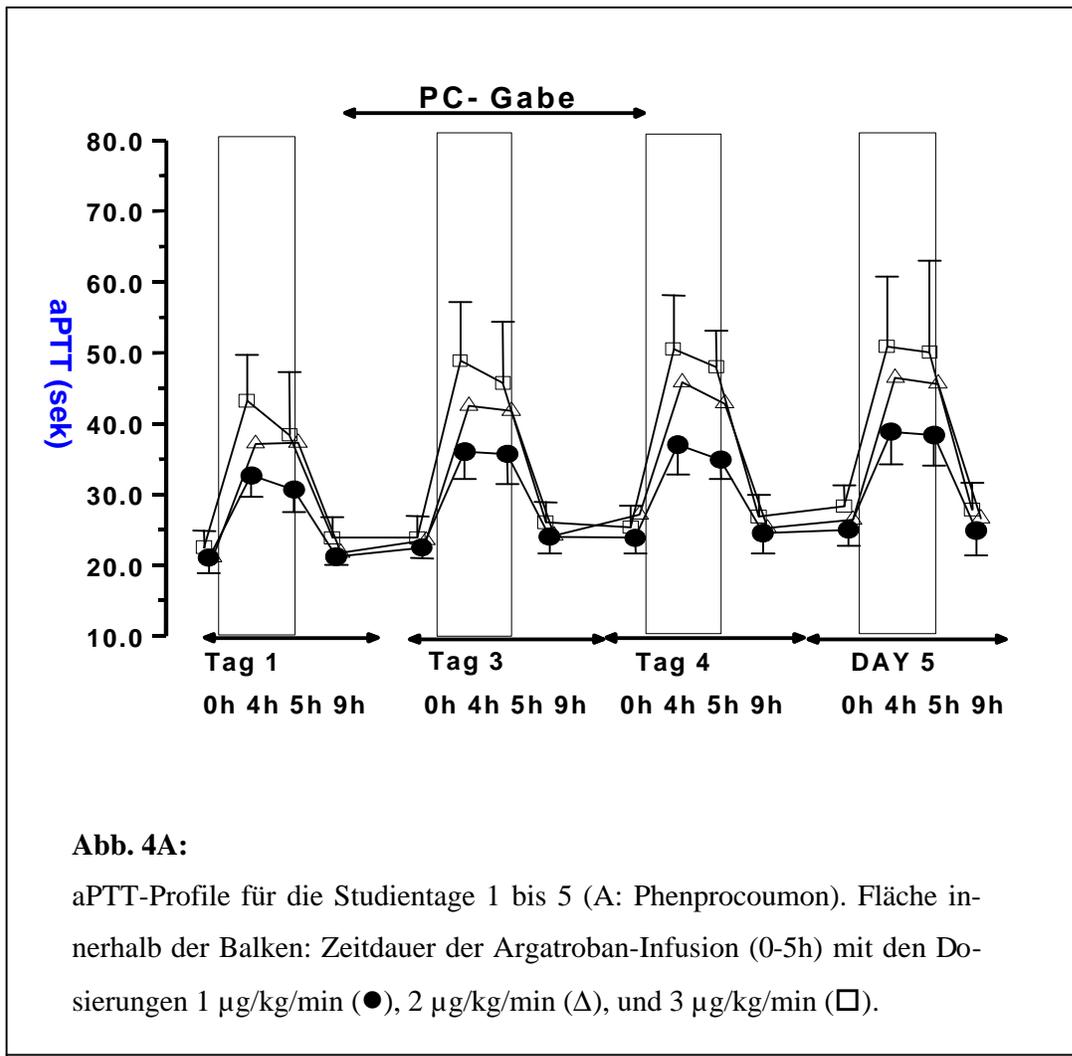
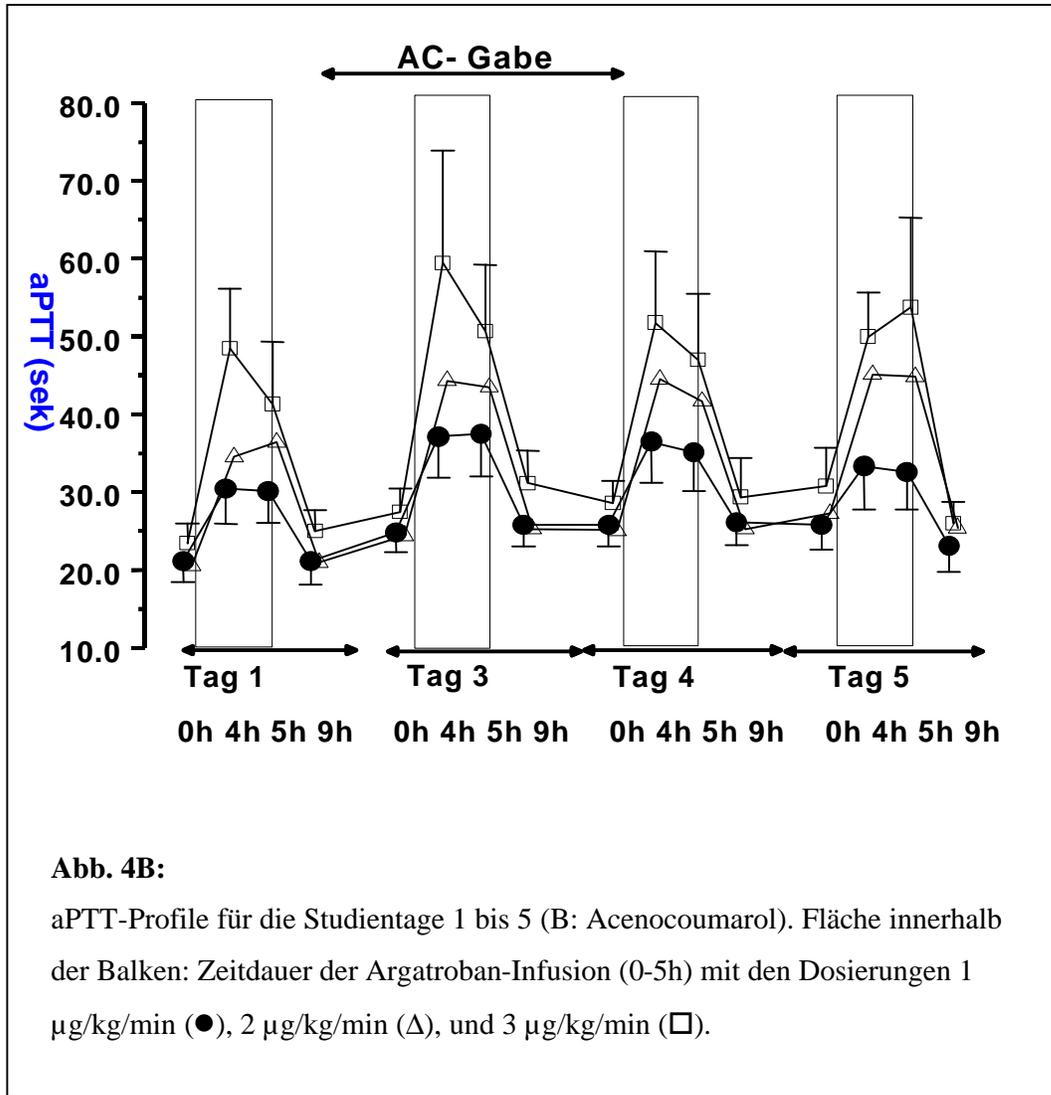


Abb. 4A:

aPTT-Profile für die Studientage 1 bis 5 (A: Phenprocoumon). Fläche innerhalb der Balken: Zeitdauer der Argatroban-Infusion (0-5h) mit den Dosierungen 1 µg/kg/min (●), 2 µg/kg/min (Δ), und 3 µg/kg/min (□).



Das sigmoidale Verhältnis zwischen der Plasma Konzentration von Argatroban und den daraus resultierenden Verlängerungen der aPTT wird in Tabelle 3A sowie den Abbildungen 5A (Argatroban + Phenprocoumon) und 5B (Argatroban + Acenocoumarol) gezeigt. Im Vergleich dieser Kurven und der EC_{50} , der halbmaximalen Effekt-Konzentration zeigt sich eine Linksverschiebung hin zu höheren abgelesenen aPTT-Werten an Tag 5, trotzdem die Argatroban-Plasmaspiegel gleich mit denen an Tag 1 sind. Zum Beispiel war die EC_{50} von Argatroban für Probanden unter Phenprocoumon 2072ng/ml an Tag 1 und fiel auf 901ng/ml an Tag 5.

Tabelle 3A:

Konzentrations-Effekt Analyse der Argatroban Plasmakonzentration vs. aPTT entsprechend einem sigmoidalen Emax-Modell: Mittelwert (Standard Abweichung).

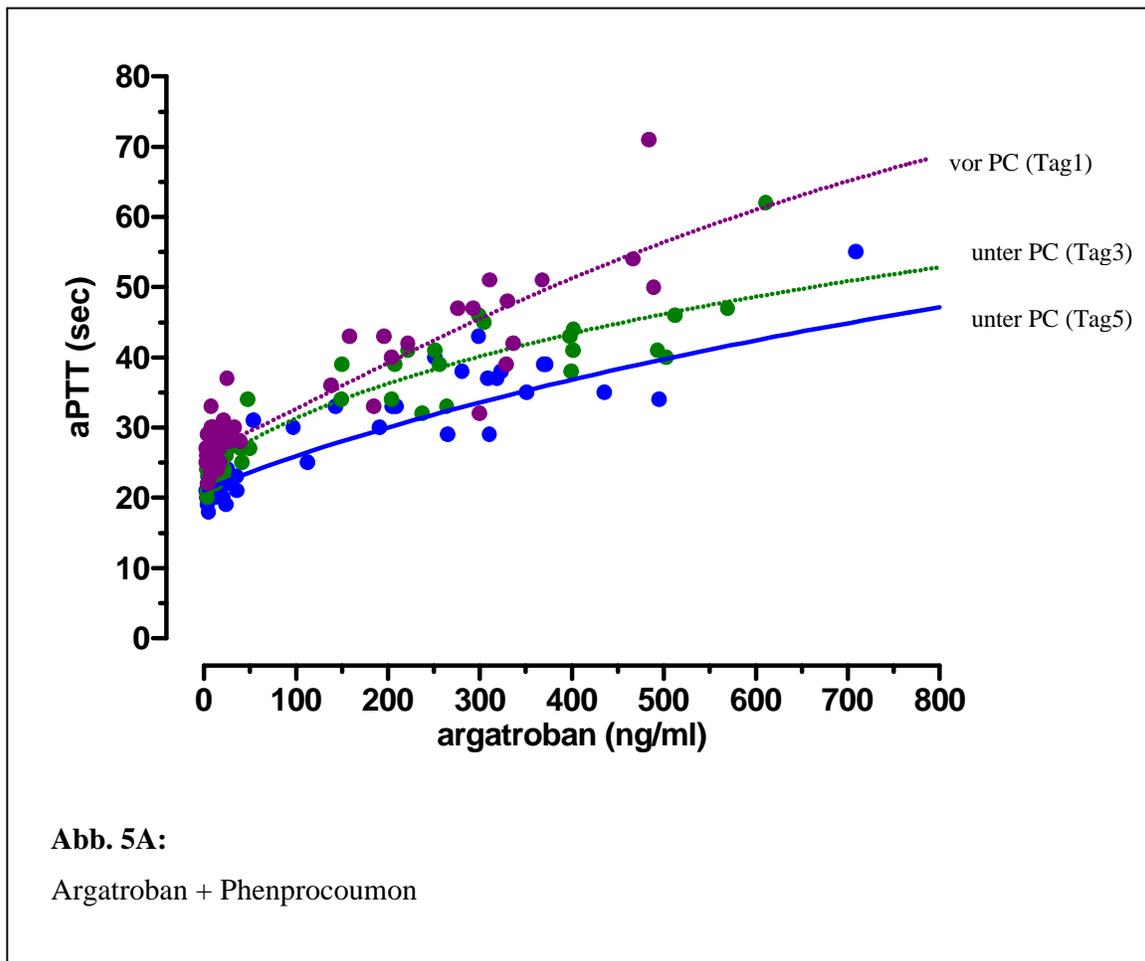
Definition der Parameter s. Kapitel „Statistische Methoden“

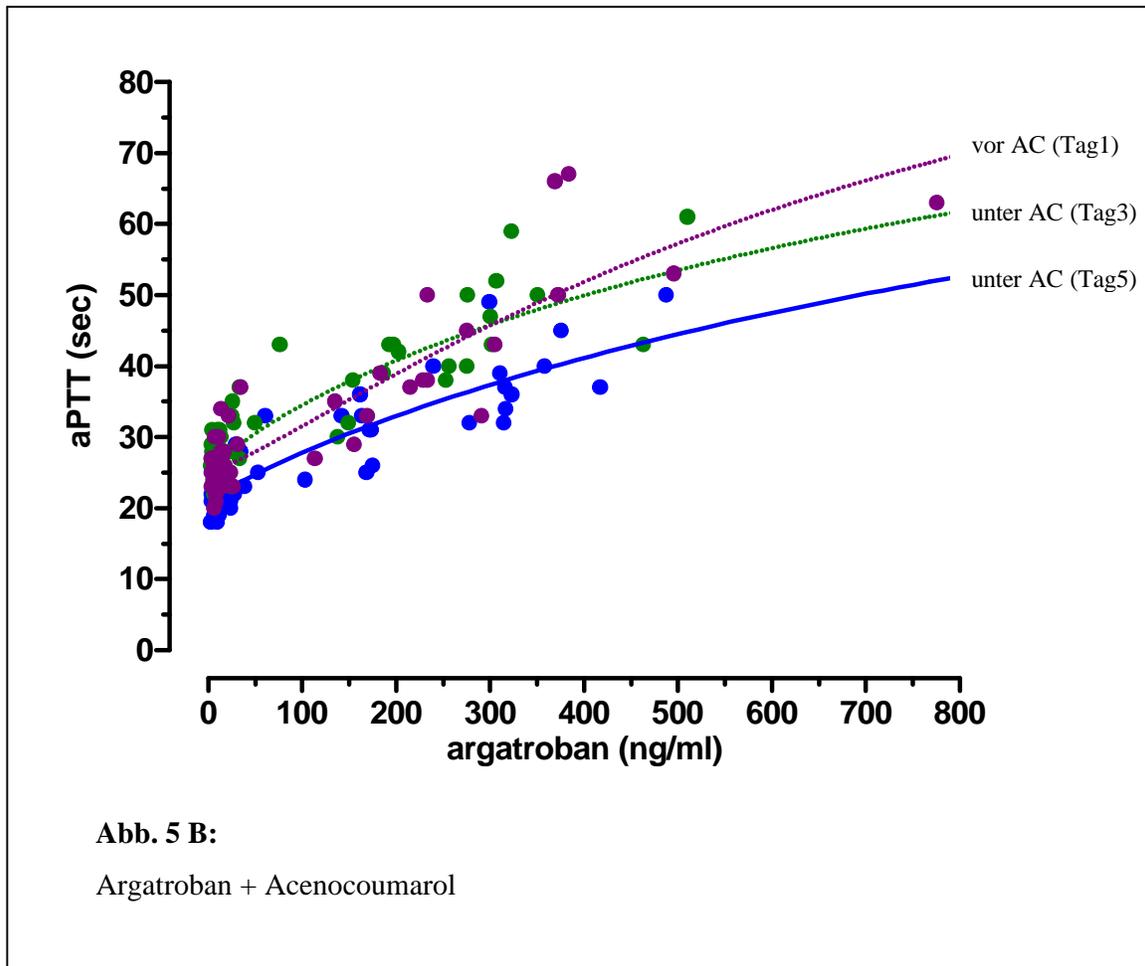
OAK	Tag	Emax (sek)	EC50 (ng/ml)	Hill-Koeffizient	E0 (sek)
PC	1	90	2072(573)	0.83 (0.15)	21 (1)
PC	3	90	2014(506)	0.76 (0.14)	23 (1)
PC	5	90	901(161)	1.23 (0.24)	27 (1)
AC	1	90	1569(499)	0.90 (0.20)	21 (1)
AC	3	90	1236(336)	0.85 (0.19)	26 (2)
AC	5	90	806(118)	1.21 (0.20)	25 (1)

PC=Phenprocoumon; AC=Acenocoumarol; OAK=orale Antikoagulation;

EC50=Konzentration bei halbmaximalem Effekt; E0=Effekt, wenn Argatroban-

Konzentration=0 ng/ml





3.5 ECT

Im Gegensatz zur aPTT differierte die EC50 der Argatroban-induzierten Verlängerung der ECT nicht wesentlich während der gesamten Studientage (Tabelle 4B).

Die Konzentrations-Effekt-Analyse von Argatroban-Plasmakonzentration und ECT entspricht auch hier wieder einem sigmoidalen Emax-Modell, wobei die Veränderungen der EC50 von Tag 1 zu Tag 5 kaum ins Gewicht fallen: Die EC50 von Argatroban beispielsweise steigt von 580 ng/ml an Tag 1 zu Tag 5 auf 638 ng/ml Plasmakonzentration. Die Abbildungen zeigen die ECT-Werte unter Argatroban + Phenprocoumon (6A) und Argatroban + Acenocoumarol (6B):

Tabelle 4B:					
Konzentrations-Effekt Analyse der Argatroban Plasmakonzentration vs. ECT entsprechend einem sigmoidalen Emax-Modell (Mittelwert, in Klammern: Standard Abweichung. Definition der Parameter s. Kapitel „Statistische Methoden“					
OAK	Tag	Emax (sek.)	EC50 (ng/ml)	Hill-Koeffizient	E0 (sek.)
PC	1	250	580 (42)	0.87 (0.09)	42 (4)
PC	3	250	518 (26)	0.98 (0.08)	42 (3)
PC	5	250	638(48)	0.68(0.07)	31(4)
AC	1	250	487 (17)	1.2 (0.07)	47 (1)
AC	3	250	547(24)	0.96 (0.06)	42 (2)
AC	5	250	557 (30)	0.92 (0.07)	40 (2)

PC=Phenprocoumon; AC=Acenocoumarol; OAK=orale Antikoagulation

EC50= halbmaximale Effekt-Konzentration; ECT=Ecarin Clotting Time; E0= Effekt, wenn Argatroban-Konzentration=0 ng/ml

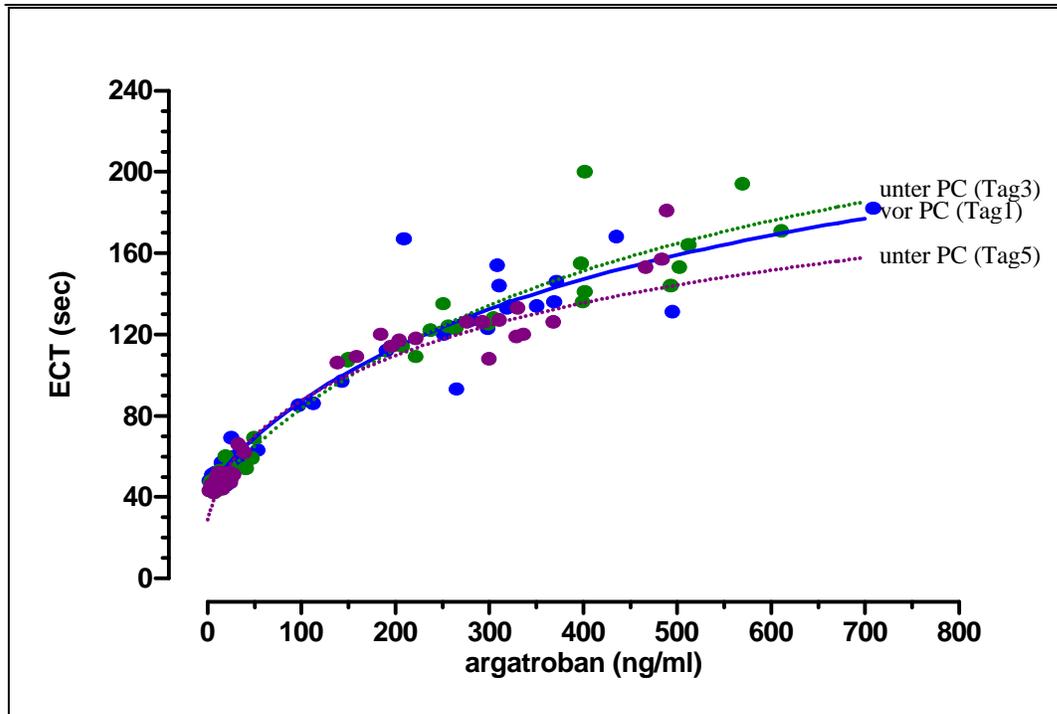


Abb. 6A : Argatroban und Phenprocoumon (PC)

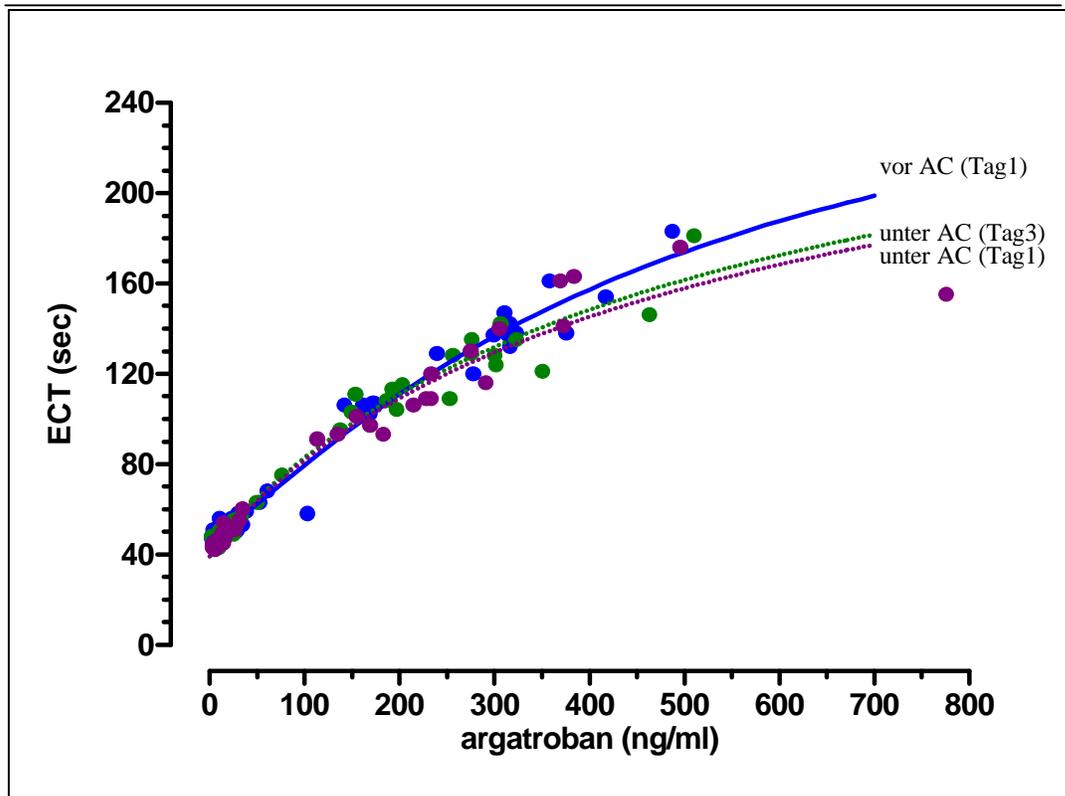


Abb. 6B : Argatroban und Acenocoumarol (AC)

3.6 Blutungszeit

Weder Argatroban alleine (Tag 1/Stunde 5 vs. Tag 5/Stunde 0) noch die orale Antikoagulation alleine (Tag 5/Stunde 0 vs. Tag 1Stunde 0) hatten einen Effekt auf die Blutungszeit und es war kein Unterschied zwischen Tag 1 ohne bzw. Tag 5 unter kombinierter Behandlung feststellbar (Tabelle 4).

Tabelle 4:
Blutungszeit in Minuten (n = 6 – 7).

OAK	Argatroban (µg/kg/min)	Tag 1 Vor OAK		Tag 5 Unter OAK	
		0h (vor ARG)	5h (+ARG)	0h (vor ARG)	5h (+ARG)
PC	1.0	6 (3-10)	5 (3-10)	5 (4-9)	7 (5-8)
PC	2.0	5 (3-7)	6 (3-9)	6 (5-9)	6 (4-10)
PC	3.0	4 (3-8)	5 (5-6)	5 (4-7)	5 (3-6)
AC	1.0	4 (4-5)	5 (3-5)	5 (4-7)	4 (4-6)
AC	2.0	4 (3-5)	5 (3-12)	4 (2-5)	5 (4-6)
AC	3.0	4 (4-7)	5 (4-9)	5 (4-11)	6 (5-14)

PC=Phenprocoumon; AC=Acenocoumarol; OAK=orale Antikagulation; ARG=Argatroban

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1 Zusammenhang von Argatroban-Dosis und INR

Nachdem bereits in-vitro-Daten aus Plasmaproben von Patienten unter Warfarin, denen Argatroban in therapeutischen Konzentrationen zugesetzt wurde, eine verlängerte PT aufwies³⁶, wurden in der ersten in-vivo-Studie mit Warfarin die Effekte einer Argatroban-Komedikation unter Warfarin-Einnahme beschrieben und damit der Ansatz für die Interpretation der INR unter einer Therapie mit Warfarin und Argatroban geliefert³⁷. Die Koadministration von Argatroban bedingte eine dosisabhängige lineare Steigerung der INR in Relation zur Warfarin-Monotherapie. Auch hier wurde die Regressionsgerade in Abhängigkeit von höheren Dosierungen Argatroban steiler. Die Vorhersagefehler dieser Nomogramme beliefen sich auf kleiner oder gleich $\pm 0,4$ für die INR bei Dosierungen von 1-2 $\mu\text{g/kg/min}$ Argatroban und größer oder gleich $\pm 1,0$ für die INR bei höheren Dosierungen von Argatroban³⁷. Aus diesen Fällen wurde geschlossen, dass die Gabe von Dosierungen von 1-2 $\mu\text{g/kg/min}$ Argatroban zu Warfarin zu einer vorhersagbaren Steigerung der INR führt und im Umkehrschluss nach Abzug dieser Differenz die INR unter Warfarin alleine berechnet werden kann. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie mit Phenprocoumon und Acenocoumarol befinden sich grundsätzlich in Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungsergebnissen aus Studien mit Warfarin. Trotzdem Phenprocoumon und Acenocoumarol jeweils andere Kinetiken zeigen als Warfarin, haben auch wir in allen Phasen der Untersuchung einen linearen Zusammenhang zwischen der gemessenen INR unter oraler Antikoagulation alleine versus orale Antikoagulation plus Argatroban festgestellt. Dabei wurde der Vorhersagefehler mit der Dosiserhöhung von Argatroban, wie bereits in den Ergebnissen dargestellt, größer. Dieser war ebenfalls bei Acenocoumarol größer als bei Phenprocoumon.

4.2 Interaktion zwischen Oraler Antikoagulation und Argatroban hinsichtlich der aPTT

Wie erwartet war die aPTT durch Argatroban alleine verlängert, abhängig von der Argatrobankonzentration im Plasma. Darüber hinaus war die aPTT im Mittel um bis zu 15 Sekunden verlängert, wenn Argatroban mit Acenocoumarol oder Phenprocoumon kombiniert wurde.

Die aPTT-Interaktion zwischen Argatroban und oraler Antikoagulation reflektiert nicht notwendigerweise die wirkliche in vivo Situation, sondern wird erzeugt durch eine ex vivo-in vitro-Interferenz des Gerinnungsassays. APTT Reagenzien aktivieren die intrinsische Gerinnungskaskade zu einem sehr frühen Zeitpunkt (gleich zu Beginn derselben bei Faktor XI). Dadurch werden die Interaktionen zwischen der oralen Antikoagulation und den Rückkopplungsmechanismen zwischen beiden Gerinnungswegen, welche durch die orale Antikoagulation teilweise erschöpft sind, begreifbar.

Ebenso wurde die Interaktion zwischen anderen direkten Thrombinhemmern und der oralen Antikoagulation am Beispiel Napsagatran mit Warfarin beschrieben³⁵: Die Gabe von Napsagatran alleine führte zur Erhöhung von aPTT und Prothrombinzeit (PT), die zusätzliche Einmaldosis Warfarin erhöhte die AUEC (Fläche unter der Effekt-Kurve) für die PT zusätzlich um das vierfache und für die aPTT um 45%. Obwohl die PT unter dem Einfluss direkter Thrombinhemmer verlängert ist, wird sie nicht als Parameter des Monitorings der Wirkung therapeutischer Dosierungen von Argatroban und anderen direkten Thrombinhemmern bei der Thrombosephylaxe und Behandlung tiefer Beinvenenthrombosen empfohlen³⁹. Die aPTT wird hingegen, neben ihrem Einsatz zur Überwachung der klinischen Therapie direkter Thrombinhemmer^{40,41}, auch als pharmakodynamischer Schlüsselparameter in Phase-I-Studien derselben eingesetzt^{42,43}. Da jedoch höhere Konzentrationen der Thrombinhemmer die aPTT-Werte für die Kalibrierung verändern und darüber hinaus verschiedene aPTT-Reagenzien mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber den Thrombinhemmern angeboten werden, ist die aPTT nicht der ideale Parameter zur Überwachung der Wirkung direkter Thrombinhemmer. Die ECT ist hierfür wesentlich spezifischer^{40,41}. Dennoch werden validierte ECT-Assays nicht kommerziell vertrieben, was deren Einsatz in der Klinik bisher unmöglich macht.

4.3 Ecarin Clotting Time als Alternative

Die Messung der Ecarine Clotting Time (ECT) ist eine Endstreckenmethode, welche direkt die hemmende Wirkung von Argatroban auf die Formierung von Meizothrombin (direkt aus Prothrombin) reflektiert. Die ECT basiert auf der Spaltung von Prothrombin zu Meizothrombin durch das Gift der Schlange *Echis carinatus*^{33,34}. Die reduzierte Verfügbarkeit von Prothrombin unter oraler Antikoagulation limitiert die Meizothrombin-Formationsrate nicht ausreichend und andere, von der oralen Antikoagulation abhängige, Faktoren sind nicht beteiligt. Die Unempfindlichkeit der ECT-Methode gegenüber der oralen Antikoagulation wurde bei in vitro-Experimenten bewiesen, in denen Blut von Personen unter oraler Antikoagulation mit verschiedenen direkten Thrombinhemmern versetzt wurde³⁴.

Während Hirudin-Infusionen existiert eine enge Korrelation zwischen ECT, aPTT und FIIa-Aktivität⁴², die auch für Argatroban in der hier vorgestellten Untersuchung bestätigt wurde.

4.4 Anwendung in der Klinik

Inwieweit jedoch die pharmakodynamische Interaktion zwischen direkten Thrombinhemmern und oraler Antikoagulation auch eine reale Blutungsgefahr darstellt, ist noch nicht geklärt. Zwar war die Blutungszeit durch die zusätzliche Gabe von Argatroban zur oralen Antikoagulation nicht verlängert, doch hat ein anderer Test aufgezeigt, dass die Formierung von Thrombin unter diesen Umständen durchaus beeinflusst wird. Der hierzu verwendete Test von Hemker (ETP) reflektiert die Thrombinaktivität und deren Verstärkung durch aktivierte Blutplättchen während der primären Blutstillung⁴⁴. Verschiedene Beispiele von Patienten mit symptomatischen Gerinnungs- oder Plättchendefekten wiesen eine reduzierte Thrombin-Formation auf, welche mithilfe der ETP-Methode bestimmt werden konnten^{45,46}. Der ETP ist auch bei Gabe von GIIb/IIIa-Hemmern erniedrigt⁴⁴. Ob und inwieweit daraus eine verstärkte Blutungsneigung resultiert ist nicht klar. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die kurze Überlappungszeit zwischen oraler Antikoagulation und Gabe von Argatroban hier negative Effekte verhindert. Sowohl in der Studie von Sheth et

al.³⁵ als auch in der hier vorgestellten Studie traten keine größeren Blutungsereignisse auf.

Die aPTT-Werte unter Argatroban und oraler Antikoagulation sind aufgrund der oben genannten Einflüsse im Laborassay um etwa 15-20 Sekunden zu hoch gegenüber der realen aPTT. Auch sollten die Steigerungen der aPTT unter Argatroban nicht zum Anlass genommen werden, die Dosierungen von Argatroban unter oraler Antikoagulation falsch niedrig anzupassen bzw. die Infusion ganz zu stoppen.

Bei mit Heparin behandelten Patienten wird die orale Antikoagulation unter Heparininfusion begonnen und erhält eine aPTT-Verlängerung um das 1,5- bis 2-fache solange, bis eine INR von 2 erreicht wird³⁹. Heparin beeinflusst unter diesen Dosierungen nicht die PT, weshalb die PT/aPTT-Ratio unter diesen Umständen für das Monitoring jedes einzelnen beteiligten Wirkstoffes herangezogen werden kann. Ein gleicher Ansatz ist notwendig im Hinblick auf Argatroban. Da jedoch Argatroban einen größeren Effekt auf die PT hat als Heparin, kann das zu falsch hohen Werten der INR unter Argatroban kommen und damit zur Notwendigkeit der Anpassung der oralen Antikoagulation nach Beendigung der Argatroban-Komedikation oder sogar einem Neustart der Argatroban-Infusion.

Deshalb und um die o.g. Schwierigkeiten zu umgehen, sollte in zukünftigen klinischen Untersuchungen die aPTT durch die Ecarinzeit als alternativem Gerinnungssassay ersetzt werden. Das betrifft sowohl die Gabe von Argatroban alleine als auch im Zusammenwirken mit anderen oralen Gerinnungshemmern.

Bei mit Heparin behandelten Patienten wird die orale Antikoagulation unter der laufenden Heparin-Infusion begonnen. Dabei wird eine um 1,5 bis 3-fach verlängerte aPTT angestrebt, bis eine INR von 2 erreicht ist⁴⁷. Heparin beeinflusst bei diesen Dosierungen die PT nicht, weshalb ein Quotient aus PT/aPTT zur Überwachung der Effekte jedes einzelnen Wirkstoffes einer Kombinationstherapie benutzt werden kann. Der gleiche Ansatz ist für Argatroban nötig. Da jedoch Argatroban einen größeren Effekt auf die PT hat als Heparin, kann ein falsch hoher INR zu einer zu geringen Dosierung der oralen Antikoagulation führen. Wenn in dieser Situation die Argatroban-Infusion gestoppt wird, muss unter Umständen entweder die orale Antikoagulation neu angepasst oder erneut mit Argatroban gegengesteuert werden.

4.5 Zusammenfassung

Die Analyse der Regressionsgeraden erlaubt die Unterscheidung zwischen verschiedenen Dosierungen und ISI des PT-Reagens genauso wie der verwendeten oralen Antikoagulanzen: Man könnte z.B. für eine bestimmte Argatroban-Dosierung von 1, 2 oder 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ das Nomogramm für die entsprechende ISI (1 bzw. 2) des Hauslabors verwenden, um von einem gemessenen INR -Wert im Patienten auf den „wahren“ INR - Wert zu schließen und die Therapie zu kontrollieren. Eine komplizierte Methode eignet sich jedoch weniger für den Gebrauch im klinischen Alltag. Deshalb mag es zulässig sein, die Nomogramme für Acenocoumarol und Phenprocoumon in einfache Regeln zu übersetzen, ohne daß ein Sicherheitsproblem entsteht. Vorausgesetzt, ein Vorhersagefehler von $<\pm 0,6$ wird als annehmbar akzeptiert,³⁵ so erlaubt das Nomogramm für Phenprocoumon und Acenocoumarol eine valide Vorhersage der realen Gerinnungsverhältnisse bis zu einer Dosis von 2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ unter Verwendung eines ISI von 1-2. Derzeitige Richtlinien für die Heparinisierung nach tiefer Beinvenenthrombose⁴⁷ erlauben den Stopp der Infusionstherapie mit niedermolekularen Heparinen (bei gleichzeitiger Gabe einer oralen Antikoagulation), wenn der INR wenigstens 2,0 erreicht hat. Um den Übergang von Argatroban zu einer oralen Antikoagulation zu vereinfachen, wird eine Regel für die Berechnung der „wahren“ INR während der Übergangsperiode vorgeschlagen:

1. Die Argatrobaninfusion kann eingestellt werden, wenn unter gleichzeitiger oraler Antikoagulation die INR für einen angemessenen Zeitraum der Kommedikation bei 4,0 angekommen ist. Das gilt für einen ISI des PT-Reagens von 1-2. Die reale INR befindet sich dann im therapeutischen Bereich zwischen 2,2 und 3,7.
2. aPTT-Ergebnisse unter Argatroban und beginnender oraler Antikoagulation müssen um 5-15 Sekunden verkürzt abgelesen werden. Die Verlängerung der aPTT während des Übergangs von Argatroban auf die oraler Antikoagulation sollten nicht zu einer Unterbrechung bzw. Dosiserniedrigung der Argatroban-Infusion während dieses Zeitraums führen.

Prinzipiell sollte die Dosis von Argatroban während der Übergangszeit auf die orale Antikoagulation bei 1-2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ fixiert werden. Genauso wie bei Hirudin⁴⁸ sollte die ECT, wenn klinisch angezeigt, zur Überwachung der direkten Argatroban-

Effekte auf die Gerinnung benutzt und hierbei der aPTT als Alternative vorgezogen werden. Das gilt sowohl für die Anwendung von Argatroban alleine als auch die Kombination mit oralen Antikoagulanzen. Wie bereits oben erwähnt steht die ECT als validierte Messmethode für die Klinik bisher jedoch nicht zur Verfügung.

Die Blutungszeit war in dieser Untersuchung in der Periode der Umstellung von Argatroban auf orale Antikoagulation nicht wesentlich verlängert, so daß für Patienten keine zusätzliche Blutungsgefahr entstanden ist. Einschränkend ist dennoch zu bemerken, daß obwohl in den erwähnten Phase-I-Untersuchungen an gesunden Probanden keine größeren Blutungsereignisse aufgetreten sind, bei Patienten durchaus ein erhöhte Blutungsgefährdung bei einer INR von $> 3,0$ bestehen kann. Dies ist in der Praxis aufmerksam zu kontrollieren.

Argatroban ist also für HIT Typ II-Patienten, die unter klinischen Bedingungen antikoaguliert werden müssen, eine gut steuerbare Alternative, bei welcher auch die anschließende Umstellung auf orale Antikoagulation kontrolliert sicher handhabbar ist.

5. Literaturverzeichnis:

1. Gurfinkel EP, Manos EJ, Mejail RI, et al. Low molecular weight heparin versus regular heparin or aspirin in the treatment of unstable angina and silent ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 313-18)
2. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, WVG Stuttgart, 8. Auflage 2002, S. 506ff
3. Hirsh J, Warkentin T, Shaughnessy S, Anand S, Halperin J, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen J. Heparin and Low-Molecular-weight Heparin. Sixth ACCP Consensus Conference on Antithrombotic Therapy. *Chest* 2001 (Suppl 1) 119; 64S-94S
4. Wenzel E, Keller-Stanislawski B, Tiaden JD, Mörsdorf S, Pindur G, Graul A, Seyfert UT. Antithrombotische, blutstillende und antianämische Mittel – Handbuch der unerwünschten Arzneimittelwirkungen; Verlag Urban und Fischer München, 1. Auflage 1999; S. 128f
5. Gawaz M. Das Blutplättchen, Thieme Verlag Stuttgart, 1999, S.82
6. Greinacher A, Lubenow N, Hinz P., Ekkernkamp A., Heparininduzierte Thrombozytopenie, *Dt. Ärzteblatt* 2003; (JG 100) 34-35: C1753-59
7. Hirsh J, Heddle N, Kelton JG. Treatment of heparin-induced thrombocytopenia: a critical review. *Arch Intern Med.* 2004 Feb 23; 164(4): 361-369
8. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, WVG Stuttgart, 8. Auflage 2002, S. 509f
9. Okamoto S, Hijikata-Okunomiya A. Synthetic selective inhibitors of thrombin. *Methods Enzymol.* 1993; 222: 328-40
10. Hauptmann J. Pharmacokinetics of an emerging new class of anticoagulant/antithrombotic drugs. A review of small-molecule thrombin inhibitors. *Eur. J Clin Pharmacol* 2002; 57: 751-58
11. McKeage K, Plosker GL. Argatroban. *Drugs* 2001; 61: 515-22
12. Chen JL. Argatroban: a direct thrombin inhibitor for heparin-induced thrombocytopenia and other clinical implications. *Heart Dis* 2001; 3: 189-98

13. Fareed J, Callas D, Hoppensteadt DA, Lewis BE, Bick RL, Walenga JM. Antithrombin agents as anticoagulants and antithrombotics: Implications in drug development. *Semin Hematol* 1999; 36 (suppl.1): 42-56
14. Hursting MJ, Becker JC, Joffrion JL, Knappenberger GD, Schwarz RP. Monitoring warfarin during concurrent argatroban therapy in healthy volunteers: Use of the International Normalized Ratio versus factor X by amidolytic assay (abstract). *Blood* 1997; 90 (Suppl 1): 116b
15. Faaij RA, van Griensven JM, Schoemaker RC, Goggin T, Guenzi A, Kroon JM, Burggraaf J, Cohen AF. The effect of warfarin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of napsagatran in healthy male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57: 25-9
16. Texas Biotechnology Corporation: Investigator Brochure, Argatroban Injection. Houston 2001: 8-13
17. Walenga JM, Lewis BE, Ahmad S, Prechel M, Messmore HL, Bakhos M, Fareed J. Lack of antibody generation after continuous and repeated administration of argatroban. Abstract CD 3687; XVIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Paris 2001
18. Glaxo Smith Kline: Pharmacology of argatroban. www.argatroban.com/clinic 2003: 3
19. Texas Biotechnology Corporation: Investigator Brochure, Argatroban Injection. Houston 2001: 46-56
20. Rietbrock N, Staib AH, Loew D. (eds): *Klinische Pharmakologie*, Steinkopff Verlag Darmstadt; 4. Auflage 2001: S. 236
21. Füllgraff G, Palm D, *Pharmakotherapie*, 10. Auflage Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1997
22. Walenga JM, Fasanella AR, Iqbal O, Hoppenstaedt DA, Ahmad S, Wallis DE, Bakhos M. Coagulation laboratory testing in patients treated with argatroban. *Semin Thromb Haemost.* 1999; 25 Suppl 1: 61-6
23. Mattsson C, Menschiek-Lundin A, Wahlander K, Lindahl TL. Effect of Melagatran on Prothrombin Time Assays Depends on the Sensitivity of the Thromboplastin and the Final Dilution of the Plasma Sample. *Thromb Haemost* 2001; 86: 611-15

24. Hirsh J, Poller L, Deykin D, Levine M, Dalen JE. Optimal therapeutic range for oral anticoagulants. *Chest* 1989; 95: 5S-11S
25. Quick AJ. A study of the coagulation defect in haemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci* 1935, 190: 501
26. Hirsh J, Dalen JE, Deykin D, Poller L: Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness and optimal therapeutic range. *Chest* 1992; 102: 312S-26S
27. Poller L: laboratory control of anticoagulant therapy. *Sem Thromb haemost* 1986; 12: 13-18
28. Barthels M, Bruhn HD, Duckert F, Meyer JG, Dall F, Fughe P: Bestimmung der Thromboplastinzeit mit einem neuen standardisierten Thromboplastin aus menschlicher Plazenta: Ergebnisse einer kooperativen Studie. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987, 25: 267-280
29. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S.Department of Health and Human Services. Washington 1993; HHS Publication No. (CDC): 6393-95
30. Thomas L: Partielle Thromboplastinzeit, Labor und Diagnose. Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg, 4. Auflage 1992: S. 694-98
31. Poller L, Thomson JM: The activated partial thromboplastin time (aPTT). Jespersen J, Bertina RR, Haverkate (eds): *A Manual of Laboratory Techniques*. Kluwer Academic Publishers, Hingham 1992: S35-40
32. Brack MJ, More RS, Hubner JB, Gershlick AH. The effect of low dose nitroglycerine on plasma heparin concentrations and activated partial thromboplastin times. *Blood Coagul Fibrinol* 1993; 4: 183-86)
33. Nowak G, Bucha, *Thromb Haemost* 1993; 69: 1306
34. Nowak G. Clinical monitoring of hirudin and direct thrombin inhibitors. *Semin Thromb Haemost* 2000; 27: 537-41
35. Sheth SB, DiCiccio RA, Hursting MJ, Mantague T, Jorkasy DK. Interpreting the International Normalized Ratio (INR) in individuals receiving argatroban and warfarin. *Tromb Haemost* 2001; 85: 435-40
36. Hursting MJ, Zehnder JL, Joffrion JL, Becker JC, Knappenberger GD, Schwarz RP Jr. The International Normalized Ratio during concurrent warfarin and

- argatroban anticoagulation: differential contributions of each agent and effects of the choice of thromboplastin used. *Clin.Chem* 1999; 45: 409-12
37. Faaij RA, van Griensven JM, Schoemaker RC, Goggin T, Guenzi A, Kroon JM, Burggraaf J, Cohen AF. The effect of warfarin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of napsagatran in healthy male volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 57: 25-9
 38. Chen JL. Argatroban: a direct thrombin inhibitor for heparin-induced thrombocytopenia and other clinical implications. *Heart Dis* 2001; 3: 189-98
 39. Hyers TM, Agnelli, Hull RD, Morris TA, Samama M, Tapson V, Weg JG. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. *Chest* 2001; 119 (1 Suppl): 176S-193S
 40. Eriksson UG, Bredberg U, Gislen K, Johansson LC, Frison L, Ahnhoff M, Gustafsson D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ximelagatran, a novel oral direct thrombin inhibitor, in young healthy male subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; 59: 35-43
 41. Fenyvesi T, Jorg I, Harenberg J. Monitoring of anticoagulant effects of direct thrombin inhibitors. *Seminob Thromb Haemost* 2002; 28: 361-68
 42. Esslinger HU, Köhne S, Radziwon P, Walenga JM, Breddin HK. Effects of PEG-hirudin in clotting parameters and platelet function and its interactions with aspirin in healthy volunteers. *Clin App. Thromb Haemost* 2003; 9 79-88
 43. Fenyvesi T, Joerg I, Harenberg J. Influence of lepirudin, argatroban and melagatran on prothrombin time and additional effect of oral anticoagulation. *Clin Chem* 2002; 48: 1791-94
 44. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoord R, Beguin S. The thrombogram: monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost* 2000; 83: 589-91
 45. Faber CG, Lodder J, Kessels F, Troost J. Thrombin generation in platelet-rich plasma as a tool for the detection of hypercoagulability in young stroke patients. *Pathophysiol Haemst thromb* 2003; 33: 52-58
 46. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PL, Tripodi A. Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica* 2003; 88: 547-54

47. Hyers TM, Agnelli, Hull RD, Morris TA, Samama M, Tapson V, Weg JG. Antithrombotic therapy for venous thromboembolic disease. *Chest* 2001; 119 (1 Suppl): 176S-193S
48. Moser M, Ruef J, Peter KH, Kohler B, Gulba DC, Paterna N, Nordt T, Kübler W, Bode C. Ecarin Clotting Time but not aPTT Correlates with PEG-Hirudin Plasma Activity. *J Thromb Haemost* 2001; 12(2): 165-69

6. Summary

This clinical phase I - study with 39 healthy male volunteers was performed to evaluate the safety and efficacy of an intravenous anticoagulation with the direct thrombin inhibitor argatroban. The study was designed to simulate different situations in a clinical setting where a transition from intravenous to oral anticoagulation is needed. We investigated healthy subjects with either three different doses argatroban alone or in combination with the oral anticoagulants acenocoumarol and phenprocoumon. A comparison of INR, aPTT, ECT and bleeding time was performed in order to find a suitable solution for the clinical monitoring of the anticoagulation effects of the described drugs.

As a main result of the study the regression analysis allows the differentiation between argatroban doses and the ISI of the PT-reagent as well as the used oral anticoagulants. Thus we could use the nomogram for a certain argatroban dosage of either 1,2 or 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ and the ISI of the inhouse laboratory to conclude from the in vivo assessed INR to the “real” INR value and control therapy in patients. But a complicated method might not be useful in practice.

Therefore it can be more suitable to translate the nomograms of acenocoumarol and phenprocoumon into general rules, without creating a safety problem. Assuming that a prediction error of $< \pm 0.6$ is acceptable, the nomograms of acenocoumarol and phenprocoumon allow a prediction of the real coagulation conditions up to a dose of 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, if an ISI of 1-2 of the PT-reagent is used. Actual guidelines describe a stop of the infusion therapy with heparines, if the INR has reached 2.0. Yet we do propose an easy-to-use and safe rule for the calculation of the “real” INR for the transition from argatroban to oral anticoagulation :

1. The i.v. application of argatroban can be stopped, if under simultaneous oral anticoagulation INR has reached 4.0 for an appropriate period. This applies to an ISI of 1-2 of the PT reagent. In this case the real INR will be in between 2.2 and 3.7.
2. The clinician has to subtract 5-15 seconds from the aPTT-results under argatroban and beginning oral anticoagulation. This leads to the conclusion that a prolongation of the aPTT during the transition from argatroban to oral anticoagulation should not lead to an interruption or dose reduction of the argatroban infusion in this period.

Generally the dose of argatroban should be fixed to 1-2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ during the transition period. As well as with hirudin, the ecarin clotting time should be, if clinically indicated, preferably used for the monitoring of the direct argatroban effects on coagulation. In this case the aPTT does not deliver exact results, which might be as well needed in high risk patients. This applies to either the use of argatroban alone or its coadministration with oral anticoagulants.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

„Interaktionen zwischen Phenprocoumon beziehungsweise Acenocoumarol und dem direkten Thrombinhemmer Argatroban: Eine klinische Phase I-Studie an 39 Probanden“

im *pharmazentrum frankfurt*, Institut für Klinische Pharmakologie unter Leitung von Herrn Professor Dr. med. Sebastian Harder ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die bei der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher weder an einer sonstigen in- oder ausländischen medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, 01.03. 2004

Lebenslauf von Nils von HENTIG

Geboren am 21.06.66 in Berlin-Tempelhof

Grundschule 1972-74 in Rüdesheim am Rhein

Gymnasium 1974-1984 in Geisenheim am Rhein, Abitur.

1985-86 Germanistikstudium an der Johannes Gutenberg Universität Mainz

1986-87 Zivildienst im Krankenhaus Paulinenstift in Wiesbaden

1987-92 Studium der Romanistik und Philosophie, Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main

1989-1992 Volontariat und Redaktion der Monatszeitschriften Pädagogik-Extra und Sozial-Extra in Wiesbaden, seit 1989 Tätigkeit als freier Journalist und Übersetzer.

1992-2000 Medizinstudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Physikum August 1996

1. Staatsexamen August 1997

2. Staatsexamen März 2000

3. Staatsexamen Mai 2001

Berufliche Tätigkeiten 1993-1999

1993-1995 Krankenpflege (50%) Medizinische Klinik III der Universitätsklinik Frankfurt am Main

1995-1999 Studienassistent (50%) in der HIV-Studienambulanz der Universitätsklinik Frankfurt am Main

2001-02 Arzt im Praktikum im Institut für Klinische Pharmakologie, Pharmazentrum im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main sowie dem ZIM, Medizinische Klinik III, Infektiologie, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Seit 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Klinische Pharmakologie, Pharmazentrum im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Nils von Hentig

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Sebastian Harder, meinem Doktorvater, danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit und seine Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Breddin und den Mitarbeitern des Instituts für klinische Pharmakologie, Frau Dr. med. Ute Klinkhardt, Herrn Dr. med. Jochen Graff danke ich für die praktische Anleitung und Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen im Labor.