Aus der

Abteilung Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. H. Döhner

Doppelbolus - versus Einzelbolus - Thrombolyse mit Reteplase bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt

PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Altan Güloglu

Izmit

2005

Amtierender Dekan: **Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin**

Erster Berichterstatter: **Prof. Dr. Erhard Seifried**

Zweiter Berichterstatter: **Prof. Dr. Lorenz Lampl**

Tag der Promotion: **27.04.2006**

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis 5
1. Einleitung 7
1.1. Der akute Myokardinfarkt (AMI) 7
1.2. Ziele der eigenen Untersuchungen 10
2. Patienten, Material und Methoden 11
2.1. Studienprotokoll der GRECO MF 4292 – Monocenterstudie 11
2.1.1. Reteplase, die K_2P – Deletionsmutante des Gewebeplasminogen - aktivators 11
2.1.2. Rationale der Prüfung 12
2.1.3. Studienziele 14
2.1.4. Studiendesign 14
2.1.5. Ein – und Ausschlusskriterien 15
2.1.6. Blutprobenabnahme und ihre Aufbereitung 16
2.2. Laborbestimmungen 18
2.2.1. Labormethodik für Patientenproben 18
2.2.1.1. Amidolytische, spektralphotometrische Aktivitätsbestimmungen 18
2.2.1.1.1. r – PA (t – PA) – Aktivität 18
2.2.1.1.2. Plasminogenaktivator – Inhibitor Typ 1 (PAI 1) - Aktivität 19
2.2.1.2. Reteplase – Antigen - Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) 21
2.3. Datenanalyse und statistische Methoden 23
3. Ergebnisse 23
3.1. Patienten der Studie 26
3.2. Klinische Ergebnisse 27
3.2.1. Patency, Reokklusionen und Revaskularisierungen 27
3.2.2. Komplikationen 27
3.3. Pharmakokinetik 27
3.3.1. r – PA – Antigen 27
3.3.2. r – PA – Aktivität 29
3.4. Pharmakodynamischer Parameter PAI 1 30
3.4.1. PAI – 1 - Aktivität 30
4. Diskussion 41
4.1. Grundlagen der Gerinnung und der Fibrinolyse 41
4.2. Plasminogenaktivatoren 41
4.2.1. Streptokinase 41
4.2.2. APSAC 42
4.2.3. Urokinase – Typ – Plasminogenaktivatoren (u – PA) 42
4.2.4. Tissue – type plasminogenactivator (Gewebeplasminogenaktivator oder t – PA) 43
4.2.4.1. Struktur – Wirkungs - Beziehungen und Wirkmechanismus von t – PA 44
4.2.5. Tenecteplase (TNK – t – PA) 46
4.2.6. Lanoteplase (n – PA) 47
4.2.7. Monteplase und YM866 47
4.2.8. Saruplase (Prourokinase) 48
4.2.9. Staphylokinase 48

4.3. Pharmakokinetik.....49
4.3.1. Struktur - / Wirkungsbeziehungen von Reteplase.. 49
4.3.2. 15 MU Einzelbolus r – PA versus 10 + 5 MU Doppel – Bolus.....50
4.3.3. 15 MU Einzelbolus r – PA versus 10 + 10 MU Doppel – Bolus 51
4.3.4. Pharmakokinetikdaten - Vergleich von rt - PA mit den ermittelten Reteplase - Ergebnissen.....52
4.3.5. Pharmakokinetik im Tierversuch bzw. an Freiwilligen.....54
4.4. Pharmakodynamik.....55
4.4.1. PAI – 1 – Aktivität.....55
4.5. Wirksamkeit und Sicherheit.....57
4.5.1. Patency/Mortalität 57
4.5.2. Die Früh – bzw. Spätlyse bei AMI.....59
4.5.3. t – PA – Mutanten und andere Plasminogenaktivatoren.....60
4.6. Die perkutane koronare Angioplastie (PTCA) mit STENT - Implantation und additive Gabe von Glykoprotein - IIb/IIIa - Inhibitoren bei AMI.....63
4.7. Schlussfolgerung.....67
5. Zusammenfassung 69
6. Literaturverzeichnis 71
7. Tabellarischer Anhang 96
8. Danksagung 101

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACVB:	aortokoronarer Venenbypass
Ak:	Antikörper
AMI:	akuter Myokardinfarkt
Apl:	Antiplasmin
APSAC:	anisoylated plasminogen – streptokinase – activator complex
AS:	Aminosäure(n)
ASS:	Acetylsalicylsäure
AT:	Antithrombin
AW:	Ausgangswert
d:	day (Tag)
ELISA:	enzyme linked immunosorbent assay
et al.:	und andere
Fbg:	Fibrinogen
FCB:	künstliche Fbg. - Fragmente als t – PA – Stimulator
FTT:	Fibrinolytic Therapy Trialists`
g:	Gramm
h:	Stunde(n)
HWZ:	Halbwertszeit
IE:	internationale Einheiten
i. v.:	intravenös
kD:	KiloDalton
kg:	Kilogramm
KG:	Körpergewicht
KH -:	Kohlenhydrat -…
KHK:	koronare Herzkrankheit
mg:	Milligramm
MG:	Molekulargewicht
µm:	Mikrometer
min:	Minute(n)
ml:	Milliliter
ms:	Millisekunden
MTP:	Mikrotiterplatte
MU:	Megaunits

MW:	Mittelwert
ng:	Nanogramm
nm:	Nanometer
PA:	Plasminogenaktivator(en)
PAI 1:	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
PCI:	percutaneous coronary intervention
Plg:	Plasminogen
PPACK:	D – Phe – Pro – Arg – Chloromethylketon (- CH_2CL), künstliches Tripeptid zur Inhibition von t – PA
PTCA:	perkutane transluminale Koronar - Angioplastie
rt – PA:	rekombinanter tissue type - Plasminogenaktivator
r - PA :	Reteplase
s. c.:	subcutan
sct – PA:	single - chain – t – PA
SK:	Streptokinase
tct – PA:	two chain – t – PA
TIMI:	« Thrombolysis in Myocardial Infarction » - Studiengruppe der NHLBI, Bethesda, USA
TMB:	3, 3´- 5, 5´- Tetramethylbenzidin
t – PA:	tissue type - plasminogen activator = Gewebe – Plasminogen-aktivator
WHO:	World Health Organization

1.EINLEITUNG

1.1. Der akute Myokardinfarkt (AMI)

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist nach wie vor die häufigste Todesursache und eine der häufigsten Ursachen für eine chronische Herzinsuffizienz in Deutschland und den anderen Industrienationen. Obwohl seit mehr als zehn Jahren die KHK - Prävalenz in diesen Ländern abnimmt, steigt sie weltweit. So ist es seit dem Zusammenbruch der Sowjetunion 1989 zu einer alarmierenden Zunahme der koronaren Arteriosklerose in den ehemaligen Ostblockländern gekommen. Laut WHO haben die nichtinfektiösen Erkrankungen die infektiösen Krankheiten als Todesursache weltweit übertroffen. Aus diesen Gründen ist eine effektive Prophylaxe der KHK weltweit dringender denn je geboten (33).

Bis Ende der siebziger Jahre war trotz vieler Studien nicht entgültig geklärt, in welcher Beziehung die Läsionen der Koronararterien und der akute Myokardinfarkt (AMI) zueinander stehen. Es bestand sogar zum Teil die Ansicht, dass die Koronarthrombose die Folge des AMI sein könnte (139). Weitere Studien (34, 38, 139) konnten dann aber aufzeigen, dass in den meisten Fällen ein okkludierender Thrombus die Ursache für den akuten Myokardinfarkt ist. Ein Thrombus im betreffenden Infarktgefäss als Ursache des AMI bietet somit einen kausalen Ansatz für die thrombolytische Therapie. Die Pathogenese des AMI ist damit weitgehend geklärt: Ausgehend von einem auf dem Boden einer Atherosklerose der Koronararterien enstandenen atheromatösen Plaque kommt es durch Ruptur der Plaquekappe mit nachfolgender Exposition stark thrombogenen Materials (Kollagen Typ I und III, Lipidkomponenten) zur Thrombusbildung. Die hierdurch bedingte akute Verminderung bzw. das Sistieren des koronaren Blutflusses resultiert in einem akuten Koronarsyndrom (ACS), dessen klinisches Bild von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist (Stenosegrad der Arterie, Morphologie des rupturierten Atheroms, Lokalisation im Koronarsystem, Ausmass der Kollateralversorgung) (163).

Die Thrombolyse als die kausale Therapie des AMI hat nach zahlreichen Studien weltweite Akzeptanz erlangt. Unter dieser Medikation kann die Mortalität um circa 25% und in Kombination mit Acetylsalicylsäure um bis zu 42% gesenkt werden (131).

Das primäre Ziel der thrombolytischen Therapie ist die schnelle und vollständige Eröffnung der Infarktarterie (200). Je früher mit der Fibrinolyse begonnen wird, desto grösser ist der Nutzen (32, 114). In der Übersicht der **F**ibrinolytic **T**herapy **T**rialists` (FTT) Collaborative Group (43), welche neun grosse Lysestudien bis 1994 erfasst, wurde eine hoch signifikante Reduktion der Mortalität mit Rettung von 30 Patientenleben bei 1000 therapierten Patienten ermittelt, wenn das Fibrinolytikum innerhalb von sechs Stunden nach Infarkteintritt eingesetzt wurde, innerhalb von sieben bis zwölf Stunden waren es noch 20 Patientenleben und über zwölf Stunden war der Benefit statistisch nicht mehr gesichert.

Streptokinase, ein indirekter Plasminogenaktivator und Fibrinolytikum der ersten Generation, konnte in kleineren (77, 98) und grösseren Studien (45, 72, 73) die Infarktgrösse und Mortalität signifikant senken. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass dieser Benefit für einen Zeitraum von zehn Jahren nach Therapiebeginn erhalten blieb. Dieser Überlebensvorteil war um so grösser, je früher mit der Thrombolyse begonnen wurde (45). Ein Thrombolytikum der zweiten Generation, Anistreplase oder ***a**nisoylated **p**lasminogen **s**treptokinase **a**ctivator **c**omplex (APSAC)* ist ein effektives und verhältnismässig sicheres Thrombolytikum mit langer Wirkdauer (1, 2). Vergleiche zwischen Streptokinase und Anistreplase bei AMI fanden in einigen Studien (3, 74) statt, ohne dass sich eines der beiden Medikamente als überlegen herausstellte. Die aus dem menschlichen Urin gewonnene Urokinase führt nicht wie Streptokinase und APSAC zu Antikörperbildung und kann damit wiederholt angewandt werden (153). Urokinase ist ein potentes Thrombolytikum, welches als Bolus verabreicht werden kann (113). Die bisher am besten untersuchte, fibrinselektive, thrombolytisch wirksame Substanz ist der Gewebe - (oder tissue – type –) Plasminogenaktivator (t - PA), der in rekombinanter Form (rt - PA) biotechnisch hergestellt wird und für den klinischen Einsatz zur Verfügung steht (147). Unter Berücksichtigung mehrerer Studien (19, 20, 56, 61, 125, 135) hat sich die t - PA - Applikation nach „akzeleriertem“ Schema (oder „Neuhaus“ – Schema: Initial 15 mg als Bolus, dann 50 mg über 30 min und 35 mg über 1 h) bei AMI durchgesetzt, da dieses Therapiekonzept im Vergleich zum üblichen Schema (100mg rt - PA über 3h) zu einer schnelleren kompletten koronaren Reperfusion und somit zu einer geringeren Mortalität führte (58). Reteplase (r - PA), ein in Escherichia coli exprimiertes neuartiges Thrombolytikum der dritten Generation (200), ist eine

nichtglykosylierte K_2P - Deletionsmutante von t - PA, welche die Kringel 2 – und die Protease - Domäne enthält, aber nicht die Kringel 1 -, Finger - und Wachstumsfaktor - Domäne von Alteplase (3, 76, 102, 108, 112, 157, 159). Auf Grund der - im Vergleich zu t – PA - längeren Halbwertszeit von r - PA sowie der Möglichkeit zur Bolusgabe bei erhaltener Fibrinselektivität (99, 102, 105, 108, 112) und erfolgversprechenden Versuchen an Kaninchen (99, 102, 105, 108, 109), die zum Teil eine höhere lytische Potenz für r – PA als für t – PA ergaben, erwartete man in den danach folgenden Studien bei Patienten mit AMI ähnlich gute Ergebnisse. In diesen Studien (3, 59, 60, 70, 157) zeichnete sich gegenüber den Fibrinolytika Streptokinase und der t – PA - Standarddosis (100 mg über drei Stunden) zwar eine Überlegenheit von Reteplase als Doppelbolus mit 10 + 10 MU (Zeitabstand zwischen den Boli 30 min.) bei der Therapie des AMI ab, die Fibrinolyse mit r – PA war aber der mit „frontloaded“ – rt – PA (100 mg über 90 min), die ja insbesondere in der GUSTO – 1 -Studie (59) die besten Patencyraten nach 90 Minuten aufwies und effektiver war als nach dem üblichen S20, 58, 125, 135), nicht überlegen.

1.2. Ziele der eigenen Untersuchungen

Die K_2P - Deletionsmutante Reteplase stellt ein in Escherichia coli exprimiertes, neuartiges Thrombolytikum dar. Eine erstmalige Verabreichung als Einzelbolus mit 10 bzw. 15 MU an insgesamt 142 AMI - Patienten fand im Rahmen der multizentrischen Dosisfindungsstudie GRECO I (**G**erman **R**ecombinant Plasminogen Activator Expressed in **E**scherichia **co**li) (122) statt. Trotz der dort ermittelten, gegenüber rt - PA 2 bis 5 - mal längeren HWZ von ca. 19 min (121), stellten die 90 min - Patencyrate von 76 % und eine Frühreokklusionsrate von 13 % in der höheren Dosisgruppe noch keine befriedigenden Ergebnisse dar. Eine weitere Dosissteigerung des Einzelbolus erschien nicht zweckmässig, da die Mutante aufgrund der bei hoher Dosierung verringerten Fibrinselektivität bereits eine deutliche systemische Fibrinolyse zeigte. An Hunden konnte auch gezeigt werden, dass nicht die Erhöhung der Dosis des Einzelbolus, sondern die Doppelbolus - Gabe eine Erhöhung des maximalen Koronarblutflusses bewirkte (109). Die Pilotstudie GRECO II (163) untersuchte erstmals an 52 Patienten mit AMI dieses veränderte Applikationsschema vor allem unter pharmakodynamischen Gesichtspunkten und ermittelte unter der Therapie mit

Reteplase (10 + 5 MU, Zeitabstand zwischen den Boli 30 min.) eine 90 - Minuten – Patency (TIMI – Grad 3) von 58% und eine Reokklusionsrate von 13,2 %. Ziel der in dieser Arbeit vorgestellten Monocenterstudie GRECO III war es, die Antigen – und Aktivitätswerte von r – PA nach Thrombolyse mit Einzel – oder Doppelbolus – Reteplase unter pharmakokinetischen Gesichtspunkten zu vergleichen und unter Berücksichtigung der Studienlage zu interpretieren. Zusätzlich sollte als pharmakodynamischer Parameter die PAI – 1 Aktivität gemessen und in Beziehung zu den klinischen Ergebnissen gesetzt werden.

2. PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

2.1. Studienprotokoll GRECO MF 4292 - Monocenter-Studie

2.1.1. Reteplase, eine K_2P - Deletionsmutante von t - PA

Die Mutante, auch als t - PA del (V4 - E175) oder t - PA ΔFEK1 (unglykosyliert) bezeichnet, wurde in E. coli exprimiert. Die Entfernung der Sequenzen für die ersten drei Domänen (Finger -, EGF - und Kringel - 1 - Domäne) an Hand der bekannten Intron - Exon - Organisation (128) der t - PA - DNA resultierte in einer cDNA, die für ein Protein von 356 AS codiert (Abb.1). Nach Abspaltung der N - terminalen AS Methionin durch die E. coli - eigene Methioninaminopeptidase entsteht somit eine Primärsstruktur mit einem N - terminalen Serin, welche die ersten drei N - terminalen AS, den kompletten Kringel 2 (AS 176 - 275) und die gesamte Proteasedomäne (AS 276 - 527) von nativem t - PA enthält. Aufgrund des in Bakterien fehlenden endoplasmatischen Retikulums fehlt der Mutante die dem t – PA eigene Glykosylierung. Ziel der Herstellung von Reteplase war es, unter weitestgehendem Erhalt der Fibrinselektivität, die für die schnelle Clearance verantwortlichen Domänen des t - PA - Moleküls zu deletieren. Zusammengefasst stellt der mit gentechnischen Methoden in Escherichia coli hergestellte rekombinante Plasminogenaktivator Reteplase eine K_2P – Deletionsmutante von humanem t - PA bei Fehlen der Finger -, EGF – und Kringel - 1 - Domänen dar. Biochemisch ist die Mutante ein Protein mit einem Molekulargewicht von 39 kD und einer spezifischen Aktivität von ca. 650.000 - 700.000 IU/mg Protein, welches einen konstanten N - Terminus (AS Serin) besitzt und vollständig in seiner einkettigen Form vorliegt.

Die plasminkatalysierte Spaltung von sc - r - PA in tc - r - PA erfolgt an derselben Stelle wie bei t - PA und führt zu einer ebensolchen Erhöhung der katalytischen Aktivität. Erwartungsgemäss erfährt Reteplase eine komplette Suppression der Fibrinaffinität durch ε – Aminocapronsäure (ε - ACA), welche die Lysinbindungsstellen des Kringel 2 belegt. Diese Befunde und die gleichartige Hemmung beider Plasminogenaktivatoren durch PAI - 1 belegen die korrekte dreidimensionale Faltung der Domänen im Renaturierungsprozess der Mutante

und die Unabhängigkeit der biochemischen Eigenschaften des Kringel 2 und der Proteasedomäne von den drei deletierten N - terminalen Domänen.
Der Nachweis der Wirksamkeit und der Sicherheit erfolgte zunächst imTiermodell an Kaninchen, Hunden und Primaten (100, 101, 102, 107, 108) sowie später an gesunden männlichen Probanden (Übersichten bei 99, 103, 104). Verantwortlich für diese Arbeiten waren die Forschungsgruppen um U. Kohnert und U. Martin (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland).
Die Firma Boehringer Mannheim stellte Reteplase in lyophylisierter Form in Ampullen zu je 10 MU bzw. 18 mg zur Verfügung. Auflösen der Lyophilisats einer Ampulle in 9, 2 ml des beigefügten Wassers für Injektionszwecke ergab 10 ml Lösung einer Konzentration von 1 MU/ml. Im Gegensatz zu rt - PA, welches fast ausschliesslich hepatisch eliminiert wird, konnten Martin et al. im Tierversuch an Ratten (106, 110) zeigen, dass für die Elimination von Reteplase hauptsächlich die Nieren und nur in zweiter Linie die Leber verantwortlich sind. Dies beruht neben dem Fehlen der für die Leberclearance verantwortlichen Domänen auf dem geringeren Molekulargewicht der Mutante. Dass die begleitende i. v. - Heparingabe zur Aufrechterhaltung der Patency notwendig ist, wurde im Hundemodell und auch nach erfolgreichem Abschluss der ersten Studie mit Einsatz an AMI - Patienten nochmals gezeigt (111).

2.1.2. Rationale der Prüfung

Obwohl Reteplase mit $t_{1/2\alpha}$ von ca. 19 min (121) eine ca. 4 - mal längere HWZ als nativer t - PA besitzt und sich somit für eine Bolusapplikation anbietet, wurde in der Dosisfindungsstudie GRECO I (122) klar, dass auch nach Verabreichung eines einzelnen 10 MU - bzw. 15 MU - Bolus noch kein optimaler thrombolytischer Effekt erzielt werden kann. Die 90 min - Patency der Infarktgefässe, d. h. der Anteil der Gefässe mit Blutfluss der TIMI – Grade 2 oder 3, lag bei 67 bzw. 76 % für die 10 MU – bzw. 15 MU - Behandlungsgruppe (126). Als optimales Ergebnis wäre eine frühe Patencyrate (TIMI 2/3) von ca. 85 % wünschenswert. Zum Zeitpunkt der ersten Angiographien (30 und 60 min) entsprachen die Raten noch in etwa den Erwartungswerten. Bis zur 90 min - Angiographie erfolgten jedoch bereits Frühreokklusionen (17 % bei 10 MU bzw. 13 % bei 15 MU). Da schon 15 MU zu einem Verlust an Fibrinselektivität führten, erschien eine weitere

Dosissteigerung eines Einzelbolus problematisch. Desgleichen war der Unterschied in den Offenheitsraten zwischen den beiden Einzelbolus - Dosierungen nicht sehr deutlich ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass nicht die Höchstkonzentration, sondern eher die Zeitdauer thrombolytisch wirksamer Plasmaspiegel für den Prozentsatz offener Gefässe entscheidend ist.

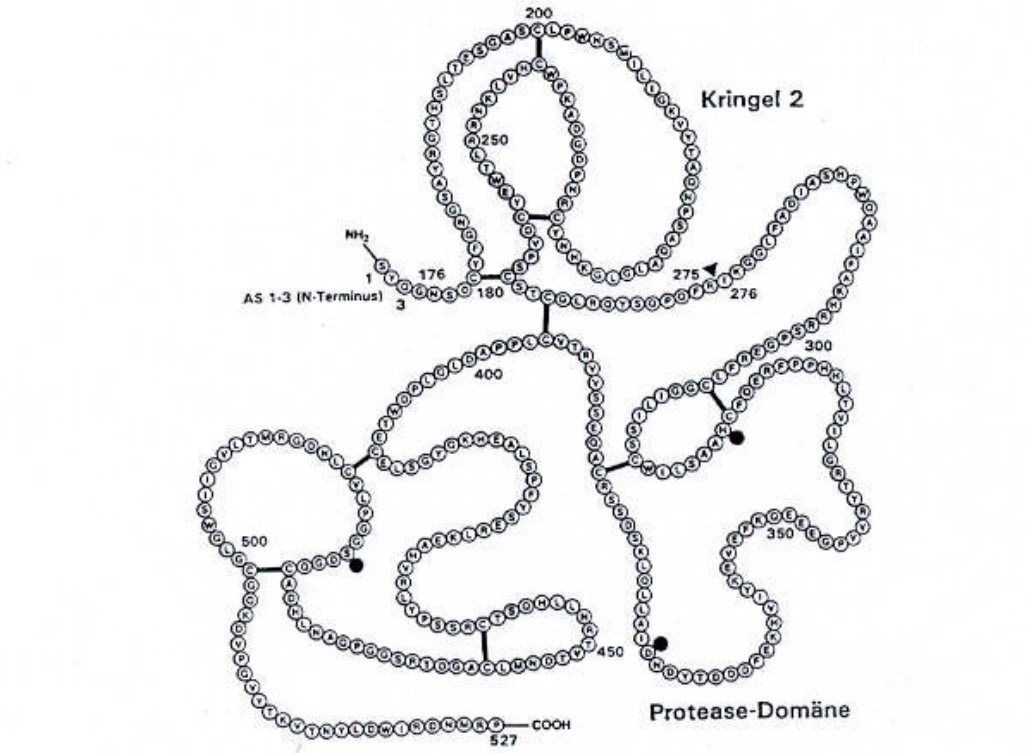

Abbildung 1: Zweidimensionale schematische Darstellung der Primärstuktur von Reteplase (nach U. Martin)

▼ = Plasmin - Spaltungsstelle von scr - PA in tcr - PA

● = AS des aktiven Zentrums der Serinprotease

— = Disulfidbrücken

Numerierung der AS gemäss der des nativen t - PA nach Pennica et al. (133)

Aus diesem Grund und anhand der Daten der Pharmakokinetik - Substudie (121) wurde in der zweiten Pilotstudie GRECO II (163) die Aufteilung des 15 MU - Bolus in einen anfänglichen 10 MU - und einen 30 min später zu verabreichenden 5 MU – Bolus bei der Therapie des AMI in Erwägung gezogen. Mit einer 90 min – Patency (TIMI 2/3) von 78% und angiographisch nachgewiesener Reokklusionsrate von 13,2% ergab sich gegenüber GRECO I lediglich eine geringe Verbesserung der Patency bei gleichzeitig diskret höherer

Reokklusionsrate (GRECO I: 13%). Da dieses Lyseregime unter Berücksichtigung der Ergebnisse noch nicht als ausreichend wirksam angesehen wurde, wurde die dritte Pilotstudie GRECO III initiiert, in der verschiedene r - PA - Doppelboli (10 + 10 MU, 10 + 5 MU) mit dem Einzelbolusregime (15 MU) verglichen werden sollten. Insbesondere sollte die Fragestellung erörtert werden, ob das neue Lyseregime 10 + 10 MU Reteplase die Zeitspanne thrombolytisch wirksamer r – PA - Plasmaspiegel weiter verlängern kann.

2.1.3. Studienziele

Das Hauptziel war die Abschätzung der thrombolytischen Wirkung verschiedener Doppel - Boli Reteplase (10 + 5 MU und 10 + 10 MU, 1. Bolus jeweils t = 0 gefolgt vom 2. Bolus nach 30 Minuten) und eines Reteplase - Einzelbolus von 15 MU bei Patienten mit AMI anhand der Patency - Rate 90 Minuten nach Verabreichung des 1. Bolus. Weitere Ziele waren die pharmakokinetischen Untersuchungen, die Bestimmung und Interpretation der PAI - 1 – Verlaufswerte sowie die Sicherheit und Verträglichkeit der verschiedenen Lyseregimes.

2.1.4. Studiendesign

Die Studie war eine offene, randomisierte, monozentrische und dreiarmige Pilotstudie. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkomission der Universitätsklinik Ulm geprüft und gebilligt. Alle Patienten, die die Auswahlkriterien erfüllten und ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie schriftlich erklärten, wurden in die Studie eingeschlossen. Vor Beginn der Behandlung mit Reteplase erhielten alle Patienten intravenös 5000 IE Heparin als Heparininfusion (therapeutischer Bereich: 2 - 3 - faches des oberen Norm - Grenzwertes) über eine Zeitdauer von 48 Stunden. Zusätzlich bekamen alle Patienten initial intravenös 500 mg Aspirin gefolgt von oral 100 mg/Tag Aspirin in den darauf folgenden Tagen. Alle anderen Medikamente wurden nach individueller Indikation verabreicht. Gemäss randomisierter Zuteilung erfolgte bei den Patienten die intravenöse Injektion eines der folgenden drei r - PA - Lyseregimes zur Thrombolyse:

Gruppe A (10 + 5 MU) bekam einen intravenösen Doppelbolus von 10 MU Reteplase (= 18 mg) bei t = 0 min gefolgt von 5 MU nach 30 Minuten.

Gruppe B (10 + 10 MU) bekam einen intravenösen Doppelbolus von 10 MU Reteplase bei t = 0 min gefolgt von 10 MU nach 30 Minuten.
Gruppe C (15 MU) bekam einen intravenösen Einzelbolus von 15 MU Reteplase (= 27 mg) bei t = 0 min.
Die Injektionsgeschwindigkeit betrug 5 MU/min. Die Applikation erfolgte über einen separaten Venenzugang. Eine erneute Applikation von Reteplase über die zweimalige Bolusgabe hinaus war nicht gestattet. Vor, während und nach Gabe der Boli fand eine engmaschige Überwachung der Vitalparameter und Laborwerte (Hämatokrit, Gerinnungsparameter) statt. Die Patienten wurden 90 Minuten nach der ersten Bolusinjektion des Thrombolytikums einer selektiven Koronarangiographie unterzogen. Zeigte die Angiographie nach 90 Minuten einen kompletten Verschluss (TIMI - Grad 0 bzw. 1), so wurde nach ärztlicher Indikationsstellung eine PTCA durchgeführt. Die TIMI – Grade 0 oder 1 bedeuten hierbei ein verschlossenes, TIMI - Grad 2 oder 3 ein offenes Infarktgefäss. Die TIMI – Klassifikation des koronarangiographisch bestimmten Blutflusses durch die vormals okkludierte Stelle (TIMI – Grade 0 – 3) ist das weitverbreitetste Quantifizierungsmass (178) für eine thrombolytische Rekanalisation der Koronarterien.

2.1.5. Ein - und Ausschlusskriterien

Nach entsprechender Aufklärung und dokumentiertem Einverständnis, mündlich oder schriftlich, wurden alle Patienten mit typischer Infarktsymptomatik von mehr als 30 min und weniger als sechs Stunden bis zum Injektionsbeginn eingeschlos - sen. Im EKG waren ST - Hebungen in mindestens zwei Standardableitungen gefordert, die mindestens 2 mm in den Extremitäten - und 3 mm in den Brustwandableitungen betragen mussten.

Ausschlusskriterien:

- Lebensalter des Patienten unter 18 bzw. über 75 Jahre
- Körpergewicht des Patienten unter 65 kg
- Zustand nach Infarkt im gleichen Areal
- Vorangegangener Infarkt vor < als 14 Tagen
- Zustand nach ACVB (aortokoronarer Venenbypass)
- Hämorrhagische Diathese

- Orale Antikoagulantien - Behandlung
- Nachgewiesenes Ulcus oder gastrointestinale Blutung während der letzten drei Monate
- Colitis, Oesophagusvarizen, Aortenaneurysma
- Schwere Leber - oder Niereninsuffizienz
- Erhebliche arterielle Hypertonie (systolischer Blutdruck trotz Behandlung > 200 mmHg, diastolischer Blutdruck > 100 mmHg)
- Zustand nach Herzmassage, evtl. Subclavia - oder Jugularis - Interna - Punktion, künstliche Beatmung
-Trauma oder Operation innerhalb der letzten acht Wochen (besonders am Schädel)
- Apoplex während der letzten sechs Monate
- Ungeklärter akuter Kopfschmerz oder Sehstörungen
- Klinisch apparente Endokarditis bzw. Sepsis
- Kompletter Linksschenkelblock
- Schwangerschaft und Stillzeit
- Teilnahme an einer klinischen Prüfung mit einem anderen Arzneimittel innerhalb der letzten 30 Tage vor Beginn der Studie.
- Jede andere Erkrankung, die nach Ansicht des behandelnden Arztes eine mög - liche Gefährdung des Patienten durch die Studienmedikation oder studien - bedingte Massnahmen mit sich bringen könnte.

2.1.6. Blutprobenabnahme und ihre Aufbereitung

Die Blutentnahmen für die Kinetikuntersuchungen wurden unmittelbar vor r - PA - Gabe und zu folgenden Zeitpunkten nach Injektion des 1. Bolus durchgeführt:
5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75 und 90 Minuten; 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden; 6, 9, 12, 15 und 18 Tage; für die Bestimmung der PAI - 1 - Aktivität :
30 und 60 Minuten; 2, 4, 8, 24, 48 und 72 Stunden; 6, 9, 12, 15 und 18 Tage. Alle Blutabnahmen erfolgten aus einem peripherven ösen Zugang an dem nicht für die Reteplase - Applikation verwendeten Arm. Nach Verwerfen der ersten 2 ml wurden jeweils 9 ml Blut auf 1 ml Natriumcitrat (als Antikoagulanz in Sarstedt Monovette R 10 ml, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland, mit Endkonzentration von 11mM/l) abgenommen. Die Blutproben wurden direkt in ein vorbereitetes,

silikonisiertes und mit lyophilisiertem t - PA - und Reteplase - spezifischem (122) Inhibitor (PPACK,) versehenes Glasröhrchen umgefüllt, gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Blutproben für die Bestimmung von Reteplase - und PAI - 1 - Aktivität wurden nicht mit PPACK inkubiert, um die in vitro – Inaktivierung von Reteplase zu vermeiden. Danach erfolgte eine Zentrifu - gation der Probe bei + 4 ° C und 4000 Umdrehungen/min (entsprechend 2000 g) für sieben Minuten in einer Kühlzentrifuge (Heraeus Minifuge T®, Heraeus Sepatech GmbH, Overath, Deutschland). Das daraufhin abgetrennte Plasma musste in einem beschrifteten Plastikröhrchen bei -20°C bis zum Transport zwischengelagert werden. Unter Einhaltung der Kühlkette erreichten die Proben unser Labor, wo die Identifikation und Kontrolle der Plasmen erfolgte. Die weitere Behandlung bestand in schnellem, schonendem Auftauen bei 37°C im Wasserbad, Aliquotierung in kleine Kunstoffgefässe (1.5 ml Eppendorf Reaktionsgefässe 3810, Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland) sowie Schockgefrieren und Endlagerung bei -70°C bis zur endgültigen Laborbestimmung.

Das oben erwähnte künstliche Tripeptid PPACK (D - Phe - Pro - Arg - CH_2Cl oder D - Phenylalanyl - Prolyl - Arginyl - Chloromethylketon der Fa. Calbiochem, Frankfurt) wählten wir als spezifischen Inhibitor der in den Proben enthaltenen Reteplase, um eine in vitro - Plasminogenaktivierung zu verhindern. Es stand in Röhrchen mit je 12, 6 μg Lyophilisat zur Verfügung, d. h. die Endkonzentration in der Blutprobe betrug 2 μmol/l. Dieser als Thrombinhemmstoff bekannte Inhibitor, der spezifisch und irreversibel das aktive Zentrum von t - PA inaktiviert (92), hatte sich in mehreren Untersuchungen (147, 148, 166) als wirksame Substanz zur Verhinderung von in vitro - Artefakten in Blutproben nach thrombolytischer Therapie mit rt - PA herausgestellt und war bereits in GRECO I (122) und II (163) mit Erfolg eingesetzt worden, nachdem seine Wirksamkeit auch für Reteplase belegt werden konnte.

2.2. Laborbestimmungen

2.2.1. Labormethodik für Patientenproben

2.2.1.1. Amidolytische, spektralphotometrische Aktivitätsbestimmungen

2.2.1.1.1. r - PA (t - PA)–Aktivität

Dieser Test wird an Hand der von Lill (92) modifizierten Verheijen - Methode (153) durchgeführt. Die Euglobulinfällung beruht auf einer "Titrations" - Ansäuerung der verdünnten Plasmaprobe, der Präzipitation und dem Abzentrifugieren, dem Dekantieren des Überstandes und der Resuspension des Pellets in Puffer. Die Euglobulinfraktion der Patientenplasmaprobe wird zusammen mit Cyanbromid - Fibrin(ogen) - Fragmenten (FCB - 2) als t - PA - Stimulatoren (122) und Plasminogen inkubiert. Durch die Euglobulinfällung werden Inhibitoren aus dem Plasma entfernt: Sie werden mit dem Überstand dekantiert. Das durch das t - PA der Patientenprobe aus Plasminogen aktivierte Plasmin spaltet vom künstlichen Substrat Tos - Gly - Pro - Lys - 4 - nitroanilid (Chromozym® PL, Boehringer Mannheim GmbH) das Chromophor 4 - Nitroanilin ab, dessen Farbintensität der t - PA - Aktivität der Probe proportional ist und bei 405 nm im Spektralphotometer gemessen wird.

Durchführung:

1. 200 µl Patientenplasmaprobe + 1800 µl eiskaltes bidestilliertes Wasser
2. 150 µl eiskalte Essigsäure (0, 25 %) unter Schütteln tropfenweise
3. 30 min. auf Eis inkubieren
4. 10 min. bei 2000 Umdrehungen/min. abzentrifugieren
5. Überstand abgiessen und Niederschlag in 200 µl Tris – Puffer aufnehmen
6. mit Tris – Puffer weiter bis in den Messbereich verdünnen (0, 5 – 2, 5 IU/ml)
7. 25 µl der „Euglobulin – Lösung“ + 25 µl Tris – Puffer in Mikrotiterplatte (Doppelbest.)
8. 200 µl Reagenzgemisch (t – PA – Stimulator (FCB – 2) + Substrat + Plasminogen in Trispuffer (erst kurz zuvor gemischt))
9. schütteln * und sofort E0 (Ausgangsextinktion) bei 405 nm bestimmen^
10. bei 37°C inkubieren und Messung nach t = 30, 60, 90 und 120 min. wiederholen
11. $\Delta E_{Probe} = (E_{Probe\ t} - E_{Probe\ 0}) - (E_{Leerwert\ t} - E_{Leerwert\ 0})$

12. mittels ΔE_{Probe} an der Standardkurve IU t – PA/ml Probe ablesen (evtl. Verdünnungsfaktor berücksichtigen)

* = Varishaker - Incubator Dynatech; ^ = SLT - Photometer, SLT - Labinstruments Deutschland GmbH, Overath

Es wir eine Standardkurve zur Auswertung der Testergebnisse (ΔE_{Probe}) in IU/ml erstellt: Die Extinktionsänderungen der Patientenproben (ΔE_{Probe}) können an der Standardkurve in IU/ml abgelesen und - da die spezifische Aktivität von Reteplase bekannt ist (1 IU/ml = 1,8 ng/ml) - in die entsprechende Proteinmenge umgerechnet werden, um einen direkten Vergleich mit der immunologischen t - PA - Bestimmung mittels ELISA (s.u.) zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wird aus einer t - PA - Standardlösung mit bekannter Aktivität (Boehringer Mannheim GmbH; kalibriert am internationalen Standard für t – PA) eine Verdünnungsreihe erstellt und die Messwerte der einzelnen Verdünnungen gegen die berechneten Aktivitäten in IU/ml aufgetragen

Unter Normalbedingungen, d. h. keiner vermehrten t - PA - Freisetzung oder therapeutischen Zufuhr, ist t - PA nur in Spuren nachweisbar. Nach Entfernung der Inhibitoren durch die Euglobulinfällung wurden von Martin et al. (104) an gesunden Freiwilligen Werte ≤ 0, 5 IU/ml gemessen.

Mögliche Ursachen von Fehlbestimmungen sind tageszeitliche Schwankungen der t - PA - und Inhibitoren - Aktivitäten (51, 78, 166), allen voran PAI - 1, und erhöhte t - PA - Spiegel nach Venenstauung. (s. o.) Diese spielen aber bei den hohen therapeutischen Spiegeln keine Rolle, wohl aber ein Verlust an t - PA - Aktivität durch Einfrier - /Auftau - Vorgänge und längere Aufbewahrung der Proben bei Raumtemperatur. Die exakte Einhaltung des Analyseablaufes ist für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unabdingbar.

2.2.1.1.2. Plasminogenaktivator - Inhibitor Typ 1 (PAI - 1) - Aktivität

Die Methode dieses Tests wurde erstmals von Nilsson et al. (127) beschrieben:.Zur unverdünnten Patientenplasmaprobe wird t - PA im Überschuss gegeben. In der Probe vorhandenes aktives PAI 1 bildet mit einem Teil des t - PA schnell inaktive Komplexe. Durch darauffolgende Zugabe des t - PA - Stimulators FCB - 2 (122) aktiviert das restliche t - PA Plasminogen zu Plasmin, welches das chromogene Substrat <Glu - Phe - Lys - pNA (S 2403, KABI Diagnostika, Mölndal,

Schweden) in das Peptid und para – Nitroanilin (PNA) spaltet. Die Menge an pNA und damit die Extinktionszunahme bei 405 nm nach einer definierten Inkubations - zeit ist proportional zur Plasminmenge, die gebildet wurde und damit auch proportional zur t - PA - Restmenge. Damit ergibt sich hier eine umgekehrte Proportionalität zur PAI - 1 - Aktivität der Plasmaprobe, d. h. je grösser die Plasminaktivität und damit die Extinktionszunahme, desto niedriger ist die PAI – 1 - Aktivität in einer Probe. Die PAI - 1 - Aktivität wird in diesem für PAI 1 spezifischen Test in Hemmeinheiten/ml Plasma (= arbitrary units/ml) gemessen. 1 arbitrary unit/ml (AU/ml) ist dabei als diejenige Menge an Inhibitor definiert, die unter den gegebenen Bedingungen 1 IU t - PA/ml Plasma hemmt. Extinktion und PAI - 1 - Aktivität stehen im Bereich von 0 bis 40 AU/ml in linearer Beziehung, bei höheren PAI - 1 - Konzentrationen muss das Plasma entsprechend mit PAI - 1 - Mangelplasma verdünnt werden.

Durchführung

1. 25 µl Plasmaprobe + 25 µl t – PA – Arbeitslösung (t – PA + Tris – Puffer; Konz. t – PA: 40 IU/ml) in Polystyrolröhrchen
2. 10 min. bei Raumtemperatur inkubieren; dabei Standards herstellen: Nullstandard: 25 µl t – PA – Arbeitslösung + 25 µl PAI 1 – Mangelplasma; 40 AU/ml – Standard: 25 µl Tris - Puffer + 25 µl PAI 1 – Mangelplasma
3. 4 ml bidestilliertes Wasser dazu und gut mischen
4. 100 µl vorverdünnte Probe oder Standard in Mikrotiterplatte (immer Doppelbest.)
5. 100 µl Lösung X (Plasminogen: S 2403: Trispuffer = 1:1:3; 4 – 8 °C!)
6. 50 µl t – PA – Stimulatorlösung (in Tris – Puffer; 20 °C)
7. gut mischen und 50 min. bei 37 °C inkubieren*
8. 50 µl Stopplösung (Essigsäure 20%) dazu und gut mischen*
9. mischen und Absorption bei 405 nm messen (Referenzwellenlänge: 492 nm)^; PAI – 1 - Gehalt der Proben von Standardkurve ablesen

* = Varishaker - Incubator Dynatech; ^ = SLT - Photometer, SLT - Labinstruments Deutschland GmbH, Overath

Eine Verdünnungsreihe wird aus den beiden Grundstandards, dem Null - und dem 40 AU/ml - Standard durch Mischen hergestellt, welche PAI - 1 - Aktivitäten zwischen 0 und 40 AU/ml wiedergibt, der Test damit durchgeführt und die erhaltenen Absorptionswerte gegen die errechneten PAI - 1 - Aktivitäten der

einzelnen Verdünnungsstufen aufgetragen. Zur Kontrolle wird auf jeder Platte sowohl ein hohe als auch eine niedrige Probe mit bekannten PAI - 1 – Aktivitäten mitgeführt. Alle Bestimmungen erfolgen im Doppelansatz

Bei Untersuchung von gesunden männlichen Freiwilligen (20 - 40 - jährig) wurden Werte zwischen 2 und 40 AU/ml gefunden (Median: 6, 7 AU/ml); 92 % dieser Freiwilligen hatten PAI - 1 - Aktivitäten kleiner 15 AU/ml. Die nicht normalverteilten PAI - 1 - Aktivitäten zeigen bereits in einer solch relativ homogenen Gruppe beträchtliche interindividuelle und tageszeitliche (4, 51, 79) Schwankungen. Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigen im Durchschnitt erhöhte PAI - Aktivitäten (Akute Phase). Überlebende eines AMI mit hohen PAI - 1 - Spiegeln haben eine deutlich schlechtere Prognose bezüglich Reinfarkten (Übersicht bei 83). Zur Vermeidung von Fehlbestimmungen ist die möglichst schnelle Durchführung des Tests nach der Verdünnung der Patientenproben bzw. der Herstellung der Arbeitslösungen wichtig, da die jeweiligen Lösungen sehr instabil sind. Eine ausreichende Kühlzentrifugation (z. B. 2000 g; 4°C) ist erforderlich, um die Thrombozyten möglichst vollständig aus der Plasmaprobe zu entfernen: Hohe Thrombozytenzahlen führen zu falsch hohen PAI - 1 - Werten durch PAI - Release aus den α - Granula der Plättchen (157).

2.2.1.2. Reteplase–Antigen- ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Dieser Sandwich - ELISA (MAk/Reteplase/POD-MAk) zur Bestimmung von Reteplase - Antigen (Ag) besteht primär aus einem monoklonalen Antikörper gegen t - PA (Kringel 2) welcher an die Festphase (= Mikrotiterplatte) gebunden wird. Zur Absättigung der unspezifischen Bindungen der Platte wurde ein Protein - Nachbelademedium gewählt (2% Milchpulver in 50 mmol Kaliumphosphatpuffer (KPP)/l). Nach drei Waschschritten mit Waschpuffer (50 mmol KPP/l pH 7, 0 mit 0, 1% Tween 20®) werden verdünnte bzw. unverdünnte Plasmaproben in den wells der Mikrotiterplatte inkubiert. In den Proben enthaltene Reteplase bindet neben den Spuren nativen t - PAs an den wandständigen Antikörper ("capture" - MAk). Nach weiteren Waschschritten, welche der Entfernung der übrigen Plasmabestandteile dienen, erfolgt der Nachweis von Reteplase über einen

zweiten MAk, der mit Peroxidase (POD) markiert wurde ("tagging" MAk). Nicht gebundener Antikörper wird durch mehrere Waschschritte weggewaschen. Die Visualisierung der zur Reteplase - Proteinkonzentration proportionalen, an die Festphase gebundenen ("Sandwich" - Prinzip) Peroxidaseaktivität erfolgt durch die POD - Nachweisreaktion mit Perborat und ABTS (2 – 2 – Azinobis – 3 – ethylbenzthiazolinesulfonsäure). Die entstehende Farbintensität, die im Spektralphotometer bei 405 gegen 492 nm bestimmt wird, ist - über die Menge immobilisierter POD - von der Menge von Reteplase und t - PA in der Plasmaprobe abhängig.

Durchführung

1. 125 µl Beschichtungslösung (5 µg/ml MAk<t – PA>III – M – IgG in 50 mmol KPP/l; pH 7, 0) /well
2. 30 min. bei Raumtemperatur unter Schütteln° (300 U/min.) inkubieren
3. Beschichtungslösung ausschütten; Platte auf Zellstoff gut ausklopfen
4. 150 µl Nachbeschichtungslösung (2% Milchpulver in 50 mmol KPP/l)/well
5. 30 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubieren
6. während Inkubation: Herstellung einer „Verdünnungsreihe“ aus Nullstandard und 500 ng Reteplase/ml – (normale Testversion) bzw. 50 ng Reteplase/ml – Standard (sensitive Testversion)
7. nur Plasmaproben aus Abnahmen zwischen 5 min. und 60 min. (s. o.) werden 1 + 9 in Nullstandard (t – PA – Mangelplasma) verdünnt
8. alle Proben und Standards werden 1 + 50 (normale Testversion; 20 µl Probe + 1000 µl LH – FSH – Puffer) bzw. 1:5 (sens. Version; 50 µl Plasma + 200 µl Puffer) in LH – FSH Puffer verdünnt
9. Platte 3 x mit Waschmedium (s. o.) waschen*
10. 100 µl der verdünnten Proben bzw. Standards/well (immer Doppelbestimmungen)
11. 60 min. bei RT unter Schütteln * inkubieren
12. Platte 3 x mit Waschmedium waschen* (ca 350 µl/well)
13. 100 µ verdünnte POD – Konjugatlösung# (s. o.)/well
14. 60 min. bei RT unter Schütteln° inkubieren
15. Platte 3 x mit Waschmedium waschen*
16. 100 µl ABTS Substrat – Farbstoff – Lösung/well

17. bei RT ohne Schütteln inkubieren bis zur kräftigen Farbentwicklung des höchsten Standards (ca. 30 min.); bei 405 nm (Referenzfilter: 492 nm)^ Extinktionsmessung durchführen; Probenwerte an der jeweiligen Eichkurve ablesen

* = SLT - Waschgerät, SLT - Labinstruments Deutschland GmbH, Overath; ° = Varishaker - Incubator Dynatech; ^ = SLT - Photometer; # = Nachweisantikörper - POD - Konjugat -

Die untere Nachweisgrenze dieses ELISA beträgt 3 ng/ml. Diese immunologische Nachweismethode für Reteplase - Ag wird durch PAI 1 nicht beeinflusst (Übersicht bei 99) . Es wurden zwei Testversionen entwickelt: Eine sensitive Testversion (0 - 50 ng Reteplase/ml) und eine normale Testversion (0 - 500 ng Reteplase/ml), wobei die sensitive Testversion bei allen Plasmaproben mit einem Reteplase - Ag - Gehalt < 50 ng/ml zusätzlich eingesetzt wurde.

Auf jede Platte wird mindestens eine Standardverdünnungsreihe pipettiert und nach Durchführung des Test die gemessenen Extinktionen gegen die errechneten Verdünnungen aufgetragen. An Hand dieser Eichkurve können dann die Patientenproben in ng/ml ausgewertet werden. Durch Mischen des Nullstandards mit dem 500 ng Reteplase/ml - Standard für die normale Testversion bzw. dem 1:10 in Nullstandard verdünnten 500 ng Reteplase/ml - Standard (50 ng Reteplase/ml - Standard für die sensitive Testversion) erhält man eine Standard - Verdünnungsreihe von 0, 50, 100, 250 und 500 ng Reteplase/ml für die normale und 0, 5, 10, 25 und 50 ng Reteplase/ml für die sensitive Testversion.

Für die normale Testversion dieses ELISA gilt eine untere Nachweisgrenze von 3 ng/ml (103), für die sensitive Testversion liegt sie tiefer.

2.3. Datenanalyse und statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Pharmakokinetikuntersuchungen der Ulmer GRECO MF 4292 - Monocenterstudie erfolgte gemäss den nachstehenden Gesichtspunkten: Nach den labortechnischen, analytischen Messungen der Plasmakonzentrationen und -aktivitäten von Reteplase wurde über die pharmakokinetischen Parameter oder Kenngrössen eine "Zusammenfassung" dieser Messwerte vorgenommen. Ermittlung solcher pharmakokinetischen

Kenngrössen dient sowohl diagnostischen Zielen als auch der Vorausberechnung einer klinischen Dosierung des neuen Pharmakons bzw. eines überlegenen Dosis - Regimes. Bevor eine Rohdatenauswertung für die pharmakokinetische Analyse durchgeführt wurde, wurden die basalen t - PA - Spiegel, welche aus den Vorwertbestimmungen sowohl von r - PA - Antigen als auch r - PA - Aktivität bekannt waren, von allen Messpunkten abgezogen, um eine alleinige Bewertung des applizierten Plasminogenaktivators ohne die physiologische t - PA - "Störung" zu ermöglichen Tabelle 1 zeigt die verwendeten pharmakokinetischen Kenngrössen, die Formeln zur Berechnung derselben und ihre Einheiten sowie ihre Bedeutung. Die terminale Eliminationskonstante λ_z wurde nach Logarithmieren der Konzentrationswerte zu den einzelnen Abnehmezeitpunkten (In zur Basis e) und Erstellung einer Grafik mit den logarithmierten Werten, aus dem linearen, terminalen Teil der resultierenden Kurve bestimmt. Die negative Steigung dieser Regressionsgeraden ist die gesuchte Eliminationskonstante.

Die Fläche unter der Plasmakonzentrations - Zeit - Kurve ($AUC_{0-\infty}$) entspricht dem Integral der Plasmakonzentration über die Zeit und wurde über die Trapezregel berechnet. Die Fläche wurde mit Hilfe von λ_z nach unendlich extrapoliert. Das Verteilungsvolumen V_z stellt diesen Proportionalitätsfaktor während der terminalen Eliminationsphase dar.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte in Anlehnung an das Lehrbuch "Statistik in der Praxis" von P. Zöfel computergestützt mit Hilfe des NCSS - Softwarepakets der Abteilung Innere Medizin III der Universitätsklinik Ulm. Der Verlauf der einzelnen Merkmale wurde graphisch in Form eines Polygonzugs dargestellt. Als Mass für die zentrale Tendenz der Parameter wurde der Median und als Streumasse die 25. und 75. Perzentile gewählt. Zum Vergleich der drei Lyse - Gruppen wurde der U – Test nach MANN und WHITNEY gerechnet. Die Ergebnisse obiger Berechnungen wurden nur angegeben, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p (= probability) für einen Fehler erster Art kleiner oder gleich 0,05 war ($P \leq 0,05$). Nur dann wurde die Nullhypothese: "Die Stichproben entstammen der gleichen Grundgesamtheit" abgelehnt. Die Daten der GRECO - Monocenterstudie sind auf Grund der geringen Stichprobenumfänge vorsichtig zu beurteilen.

Tabelle 1: Pharmakokinetische Parameter

Variable	Einheit	Formel bzw. Bestimmungsverfahren	Bedeutung
C_{max} (Maximalkonzentration)	ng/ml bzw. IU/ml	Gemessene Werte – Vorwerte	höchster gemessener Plasmaspiegel
λ_Z („Lamda z“ = terminale Eliminationskon – stante	1/h	Durch log – lineare Regression der terminalen Bestimmungen	Grundlage der weiteren Berechnungen
$t_{1/2\alpha}$/$t_{1/2\beta}$ (Halbwertszeiten)	min.	$t_{1/2\alpha}$ bestimmt durch „feathering“*; $t_{1/2\beta}$ = ln 2 / λ_Z	Verweildauer der Substanz im Plasma
$AUC_{0-\infty}$ („area under curve“ = „Fläche unter der Kurve“)	$ng*h*ml^{-1}$ bzw. $IU*h*ml^{-1}$	Integral über der Konzentrations-Zeit-Funktion (Trapezregel)	Biologische Verfügbarkeit
Cl (Clearance)	ml/min.	appl. Dosis/AUC	Eliminationsrate der Substanz
V_Z (Verteilungsvolumen)	Liter	Cl / λ_Z	Gewebeverteilung Gewebebindung

* = Feathering: Die initiale Halbwertszeit wird durch graphische Subtraktion des terminalen Anteils ($t_{1/2\beta}$) in der log - linearen Transformation der Konzentrations - Zeit - Kurve und darauffolgende Bestimmung der Steigung der verbliebenen Geraden festgelegt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Patienten der Studie

Vom 03.12.1992 bis 13.04.1994 wurden an der Universität Ulm insgesamt 25 Patienten mit akutem Myokardinfarkt in die Studie eingeschlossen. An der Studie waren die Abteilungen der Inneren Medizin II (Abteilung für Kardiologie/ Pulmonologie/Nephrologie: Ärztlicher Direktor Prof. Dr. Hombach) und Inneren Medizin III (Abteilung für Hämatologie/Hämostaseologie/Infektiologie: Ehemaliger Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Heimpel; aktueller Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Döhner) beteiligt. Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 2 aufgeführt. Acht Patienten sind in die Gruppe A randomisiert worden, in der ein Doppelbolus von 10 + 5 MU Reteplase gemäss Studienprotokoll appliziert wurde. Ein Patient musste aus der Analyse ausgeschlossen werden, da er den zweiten Bolus versehentlich schon fünf Minuten nach dem initialen Bolus bekommen hatte und die Blutabnahmen nicht korrekt durchgeführt wurden. Blutungskomplikationen traten bei diesem Patienten nicht auf. Die Infarktarterie war hier nach 90 Minuten offen und der Patient konnte nach komplikationslosem Aufenthalt wenige Tage nach der Lyse aus der Klinik entlassen werden. Acht Patienten wurden in die Gruppe B und neun Patienten in die Gruppe C randomisiert. Bis auf eine Ausnahme (1 Patient in der Gruppe A; siehe oben) konnten alle Patienten gemäss Studienprotokoll therapiert werden.

Tabelle 2: Patientencharakteristika

Parameter	Gruppe A (10 + 5 MU) (n = 7)	Gruppe B (10 + 10 MU) (n = 8)	Gruppe C (15 MU) (n = 9)
Alter*	67 (52/71)	63, 5 (56/72)	64 (55/66)
Geschlecht (w/m)	1/6	2/6	1/8
Körpergewicht* (kg)	77 (70/85)	78 (74/86)	78, 5 (72/81)
Infarktlokalisation (anterior/inferior)	3/4	2/6	4/5
KHK – Anamnese	5/7	4/8	5/9
Alter AMI	1/7	0/8	0/9
Symptomdauer bis zum ersten Bolus* (min)	163 (140/225)	228 (143/328)	190 (150/238)

- Median (Minimal -/Maximalwert)

3.2. Klinische Ergebnisse

3.2.1. Patency, Reokklusionen und Revaskularisierungen

Ein anteriorer (inferiorer) Myokardinfarkt konnte bei drei (vier) Patienten in der Gruppe A, bei zwei (sechs) Patienten in der Gruppe B und bei vier (fünf) Patienten in der Gruppe C diagnostiziert werden. Nur ein Patient in der Gruppe A hatte in seiner Vorgeschichte bereits einen Myokardinfarkt erlitten (s. Tab: 2). Eine Patency (TIMI 2, 3) der koronaren Infarktarterie nach 90 Minuten wurde in der Gruppe A bei fünf von sieben, in der Gruppe B bei vier von acht und in der Gruppe C bei acht von neun Patienten nachgewiesen. Insgesamt mussten sieben perkutane transluminale koronare Angioplastien (PTCA) in der Akutphase durchgeführt werden, um den normalen koronaren Blutfluss wiederherzustellen. Aortokoronare Venenbypässe waren nicht notwendig.

3.2.2. Komplikationen

Es trat keine symptomatische intrazerebrale Blutung auf. Ebenso wurden keine transfusionspflichtigen Blutungen beobachtet. Nur bei je einem Patienten in der Gruppe B und in der Gruppe C wurden katheterbedingte lokale Hämatome festgestellt. Ein Apoplex wurde bei keinem Patienten beobachtet. Todesfälle traten während der gesamten Hospitalphase nicht auf. Allergische Reaktionen auf die Injektion des Studienmedikaments wurden nicht verzeichnet.

3.3. Pharmakokinetik

3.3.1. r – PA – Antigen

Die pharmakokinetischen Parameter aller drei verschiedenen Reteplase – Gruppen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Im tabellarischen Anhang vor dem Literaturverzeichnis finden sich die r – PA – Antigen - und r – PA – Aktivitäts - sowie die PAI 1 – Aktivitäts - Verläufe. Die Basis – Reteplase – Antigen – Konzentrationen befanden sich unter der Nachweisgrenze der Assays. Die

medianen Plasma – r – PA – Antigen - Profile der Gruppen A, B und C sind in den Abbildungen 2 - 5 aufgeführt.

In den Gruppen A (10 + 5 MU), B (10 + 10 MU) und C (15 MU) betrugen die maximalen medianen Plasma – Reteplase – Antigen – Konzentrationen jeweils 3874, 4218 bzw. 5189 ng/ml, die fünf, 35 bzw. fünf Minuten nach Gabe des initialen Bolus erreicht worden sind. Zwischen den maximalen medianen Antigenkonzentrationen der beiden Dosisgruppen A und C konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im U – Test nach MANN und WHITNEY nachgewiesen werden ($p = 0.0009$). Zwischen Gruppe A und B bestand kein signifikanter Unterschied. Die meisten pharmakokinetischen Parameter der 10 + 5 – Gruppe A waren mit den Resultaten der 10 + 10 – Gruppe B vergleichbar (siehe Tabelle 6). Durch Aufteilung der identischen Gesamtdosis von 15 MU in einen Doppelbolus von 10 + 5 MU befand sich die mediane Antigenkonzentration 15 bis 20 Minuten länger über der „kritischen Grenze“ von 1000 ng/ml (Beobachtungszeit ab 30 Minuten nach Applikation des ersten Bolus) als in der Gruppe C. Unter der „kritischen Konzentration“ versteht man den Mindestspiegel von Reteplaseantigen bzw. – aktivität, der notwendig ist, um eine effiziente Thrombolyse zu ermöglichen. Er stellt einen wichtigen Prädiktor für den Lyseerfolg dar. Nach Gabe einer identischen zweiten Dosis 10 MU konnte im Vergleich zur Gruppe A (10 MU + 5 MU) dieser wichtige Mindestspiegel um weitere 30 Minuten überschritten werden. Die Abnahme des Antigenspiegels war in der Gruppe C mit einer medianen Halbwertszeit von 21,2 min gegenüber Gruppe B mit 16,8 min und Gruppe A mit 16,2 min am langsamsten. Die medianen Werte für $t_{1/2\beta}$ der Gruppe A waren mit den Resultaten der Gruppe B und C vergleichbar. Die mediane Gesamtclearance von Reteplase-Antigen war in der Gruppe A mit 152 ml/min am höchsten, gefolgt von der Gruppe C mit 145 ml/min. Den kleinsten Wert wies die Gruppe B mit 115 ml/min auf. Die Ausgangs – Antigen – Konzentrationen wurden nach 48 h post injektionem erreicht. Die Flächen unter den medianen Antigenzeitkurven ($AUCag_{0-\infty}$) betrugen in der Gruppe B (10 MU+ 10 MU) 4979 und in den Gruppen A und C (= identische Gesamtdosis) nahezu identische Werte, nämlich 2971 und 2925 ng·h/ml. Der mediane Wert für $AUCag_{0-\infty}$ in der Gruppe B (10 MU+ 10 MU) war im Vergleich mit der 15 MU – Gruppe signifikant höher ($p = 0.012$). Ein statistisch signifikant höherer Wert bestand ebenso im Vergleich mit der 10 + 5 MU – Gruppe ($p = 0.0018$).

3.3.2. r – PA – Aktivität

Um die r – PA – Aktivitäts – Zeit – Verläufe, die in aU/ml angegeben wurden, mit den r - PA – Ag – Werten in ng Protein/ml vergleichen zu können, wurden die Aktivitäten mit Hilfe des Umrechnungsfaktors 1,8 entsprechend der spezifischen Aktivität von Reteplase (1 aU r – PA – Aktivität/ml ~ 1,8 ng Protein/ml) in ng Protein/ml umgerechnet. Es wurden folgende Aktivitätswerte ermittelt (die entsprechenden Reteplase – Aktivitäts – Zeit – Profile sind in den Abbildungen 6 - 9 dargestellt): Nach medianen Vorwerten von 0,38 aU/ml (0,68 ng/ml), 0,26 aU/ml (0,47 ng/ml) bzw. 0,20 aU/ml (0,36 ng/ml) (Gruppe A:10 + 5 MU/B:10 + 10 MU/C:15 MU) betrugen die maximalen Reteplase – Aktivitätswerte in den Gruppen A , B und C 1190 aU/ml (2142 ng/ml), 2002 aU/ml (3604 ng/ml) und 1636 aU/ml (2945 ng/ml). Dies bedeutet im Vergleich zu den r – PA – Ag – Spitzenspiegel, dass nur 55 %, 85 % bzw. 57 % (10 + 5 MU/10 + 10 MU/15 MU) der mit dem ELISA gemessenen Maximalkonzentrationen als Aktivitäten messbar waren. War der maximale mediane Reteplase – Antigen – Wert in der Gruppe C (15 MU) am höchsten, so wurde der Höchstwert für die maximale mediane Reteplaseaktivität in der Gruppe B 35 Minuten nach der ersten Bolusgabe bestimmt. Basisaktivitätskonzentrationen wurden 24 h post injektionem erreicht. Die Flächen unter den medianen Aktivitätszeitkurven ($AUCact_{0-\infty}$) ergaben 1200, 2058 und 1023 $aU \cdot h \cdot ml^{-1}$ und waren somit für die Gruppen A und C vergleichbar. Die mediane $AUCact_{0-\infty}$ war nach Applikation von 10 + 10 MU verglichen mit der Gesamtdosis von 15 MU Reteplase (Gruppe A+C) signifikant höher ($p = 0.02$). Zwischen den beiden Gruppen A (10 + 5 MU) und B (10 + 10 MU) bestand ebenso ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0.0038$). Durch die Aufteilung der Gesamtdosis von 15 MU in zwei Boli 10 und 5 MU konnte der Zeitraum (ab Zeitpunkt 30 Minuten nach Gabe des ersten Bolus), in der sich die Aktivitätskonzentration über der „kritischen“ Grenze von 1000 ng/ml befand, um 15 bis 20 Minuten verlängert werden. Im Vergleich zur Einzelbolusgruppe verlängerte sich dieses Zeitintervall mit dem 10 + 10 MU – Doppelbolusregime um weitere 35 Minuten. Der mediane Gesamtclearancewert der Plasmaaktivität war in der Gruppe C mit 415 ml/min am höchsten, gefolgt von der Gruppe A mit 354 ml/min und der Gruppe B mit 275 ml/min. Die „höheren“ r – PA – Ag und „niedrigeren“ – Aktivitätsverläufe zeigten statistisch signifikante Unterschiede in der 10 + 5 MU –

und 15 MU - Gruppe zwischen allen Abnahmezeitpunkten mit p mindestens kleiner 0.05 im WILCOXON – Test für Paardifferenzen, in der 10 + 10 – Gruppe jedoch waren die r – PA – Antigen - versus r – PA - Aktivitätswerte zu den Abnahmezeitpunkten 35, 50, 60 und 75 Minuten nicht signifikant unterschiedlich. Die medianen Plasmakonzentrations – Zeit – Verläufe von r – PA – Antigen und – Aktivität sind in den Abbildungen 10 - 12 dargestellt. Im tabellarischen Anhang zeigen die Tabellen 1 - 3 in einer Gegenüberdarstellung die r – PA – Antigen – und r – PA – Aktivitäts – Verläufe.

3.4. Pharmakodynamischer Parameter PAI 1

3.4.1. PAI 1 – Aktivität

Ausgehend von einer PAI 1 – Aktivität von 9,5 aU/ml, 12,1 aU/ml bzw. 18,3 aU/ml (Gruppe A: 10 + 5 MU/Gruppe B: 10 + 10 MU/Gruppe C: 15 MU) fielen die PAI – 1 – Aktivitätswerte 30 Minuten nach dem initialen Bolus in allen Gruppen auf 0 aU/ml ab ($p < 0.02$ für alle Gruppen vs. den Ausgangswerten). Nach zwei bzw. vier Stunden wurde in allen Gruppen ein Wiederanstieg der Aktivitätswerte beobachtet, gefolgt von einem Rebound – Phänomen mit Spitzenwerten, die in der Gruppe A nach vier Stunden mit 183 % des Ausgangswerts (AW) ($p = 0.03$), in der Gruppe B nach 24 h mit 179 % des AW ($p = 0.018$) und in der Gruppe C nach 24 h mit 109 % des AW (nicht signifikant gegenüber AW) erreicht waren. Danach erfolgte in den Gruppen ein kontinuierlicher Abfall der PAI 1 – Aktivität bis in den Ausgangsbereich nach 18 Tagen (86 %, 107 % bzw. 54 % der AW). Die PAI 1 – Spiegel waren in allen Gruppen zwischen 0 und 60 Minuten nach der Medikamentenapplikation signifikant gegen den Vorwert erniedrigt (p mind. < 0.018). Nach zwei Stunden konnte in allen Gruppen ein Wiederanstieg der PAI 1 – Akt. beobachtet werden. Zu keiner Zeit wichen die PAI 1-Aktivitäten zwischen den einzelnen Therapiegruppen signifikant voneinander ab. Die PAI 1 – Aktivitätsverläufe finden sich in den Abbildungen 13 - 16 und den Tabellen 4 – 6 im tabellarischen Anhang, eine Gegenüberdarstellung der oben dargestellten r – PA – Aktivitäts – mit den PAI 1 – Aktivitätsverläufen ist in Abb. 17 - 19 realisiert. Es zeigte sich, dass die PAI 1 – Aktivitätsspiegel negativ mit den r – PA – Akt. -

Spiegeln korreliert sind: Der PAI 1 – Wiederanstieg erfolgte in allen Dosisstufen zu einem Zeitpunkt, an dem die r – PA – Aktivitäten praktisch auf 0 aU/ml zurückgefallen waren.

Tabelle 3: Pharmakokinetische Parameter der verschiedenen intravenösen Reteplase – Boli

	Parameter	Gruppe A (10 + 5 MU)	Gruppe B (10 + 10 MU)	Gruppe C (15 MU)	p
r – PA-Antigen:	C_{max}ag (ng/ml)	3874 (3039/3943)	4217.5 (3736/4925)	5189 (4776/5541)	Gruppe A vs. C: p = 0.0009
	$AUCag_{0-\infty}$ (ng·h·ml^{-1})	2971 (2549/3142)	4979 (4341/5527)	2925 (2467/4241)	Gruppe B vs. C: p = 0.012, A vs. B: p = 0.0018
	$t_{1/2\alpha}$ag (min)	16.2 (12/18.6)	16.8 (15/22.2)	21.2 (21/21.6)	
	$t_{1/2\beta}$ag (h)	5.41 (4.05/6.47)	5.5 (5.1/5.9)	5 (4.9/6)	
	Cl – ag (ml/min)	151.5 (135.3/166.7)	114.6 (105.5/130.6)	145.3 (100.2/172.2)	
r – PA–Aktivität :	C_{max}act (U/ml)	1190 (991/1263)	2001.5 (1483.5/2292)	1636 (1182/1835)	
	$AUCact_{0-\infty}$ (aU·h·ml^{-1})	1200 (873/1301)	2058 (1739/2681)	1024 (853/1165)	Gruppe B vs. C : p = 0.02, A vs.B: p=0.0038
	$t_{1/2\alpha}$act (min)	13.2 (11.4/14.4)	12.6 (10.8/16.2)	15 (12/17.4)	
	$t_{1/2\beta}$act (h)	1.65 (1.43/2.37)	1.38 (1.15/2.28)	3.5 (2.87/5.79)	
	Cl – act (ml/min)	354 (326.6/486.8)	275.4 (225.1/327)	415.2 (367.5/498.3)	

Alle Parameter stellen Medianwerte dar (25./75. Perzentile). C_{max}ag: maximale Antigenkonzentration; $AUCag_{0-\infty}$: Fläche unter der Reteplaseantigen – Kurve; $t_{1/2\alpha}$ag: Initiale Halbwertszeit von Reteplaseantigen; $t_{1/2\beta}$ag: Terminale Halbwertszeit von Reteplaseantigen; Cl – ag: Gesamtclearancerate von Reteplaseantigen im Plasma; ...act: Die jeweiligen Parameter für die Reteplase-Aktivität.

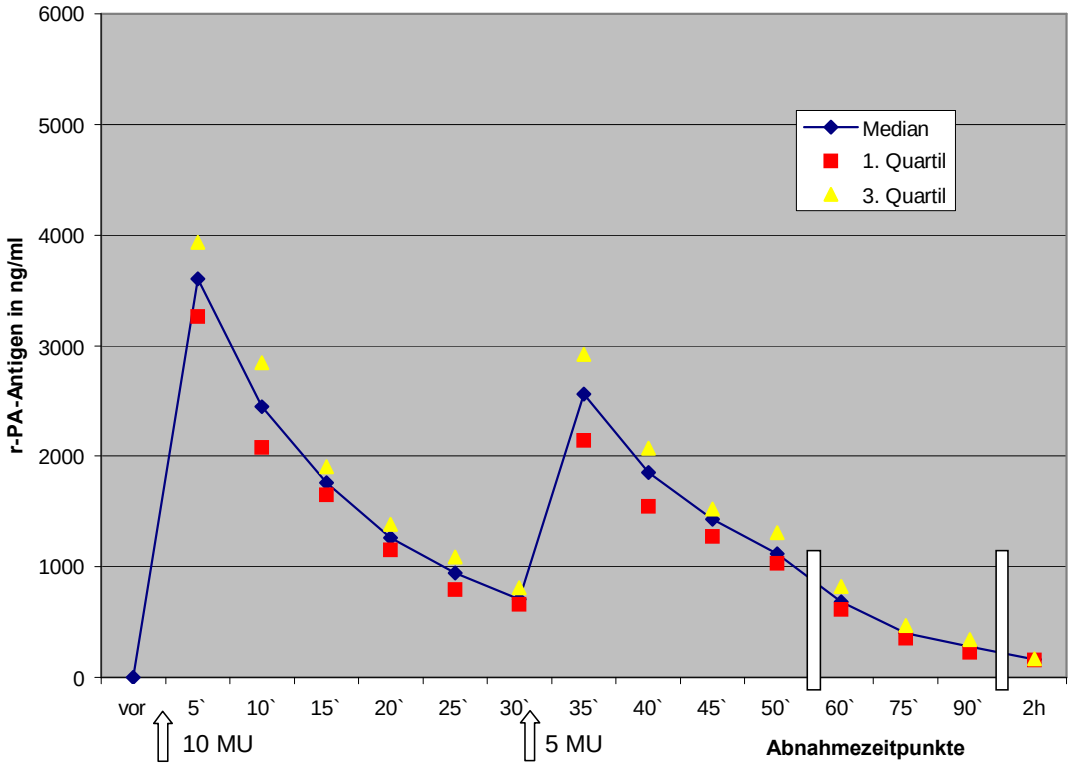

Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf der Reteplase - Antigenwerte nach intravenöser Applikation von 10 + 5 MU Reteplase (Gruppe A; n = 7 AMI-Patienten)

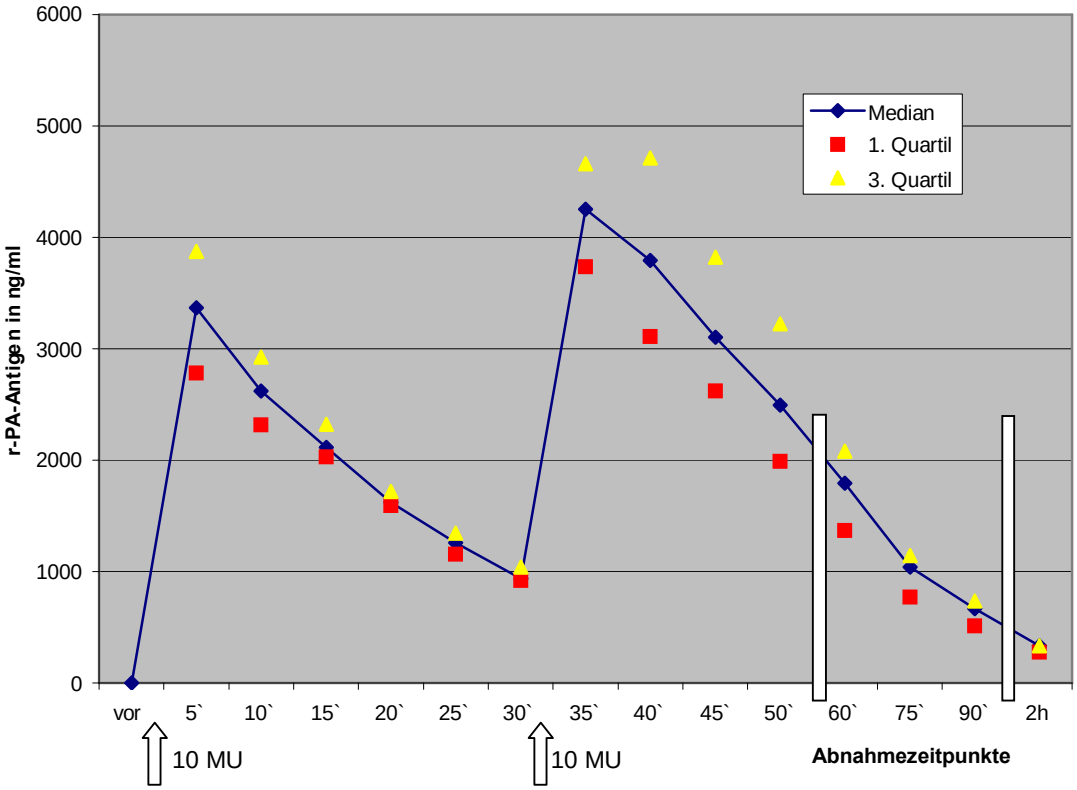

Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf der Reteplase - Antigenwerte nach intravenöser Applikation von 10 + 10 MU Reteplase (Gruppe B; n = 8 AMI-Patienten)

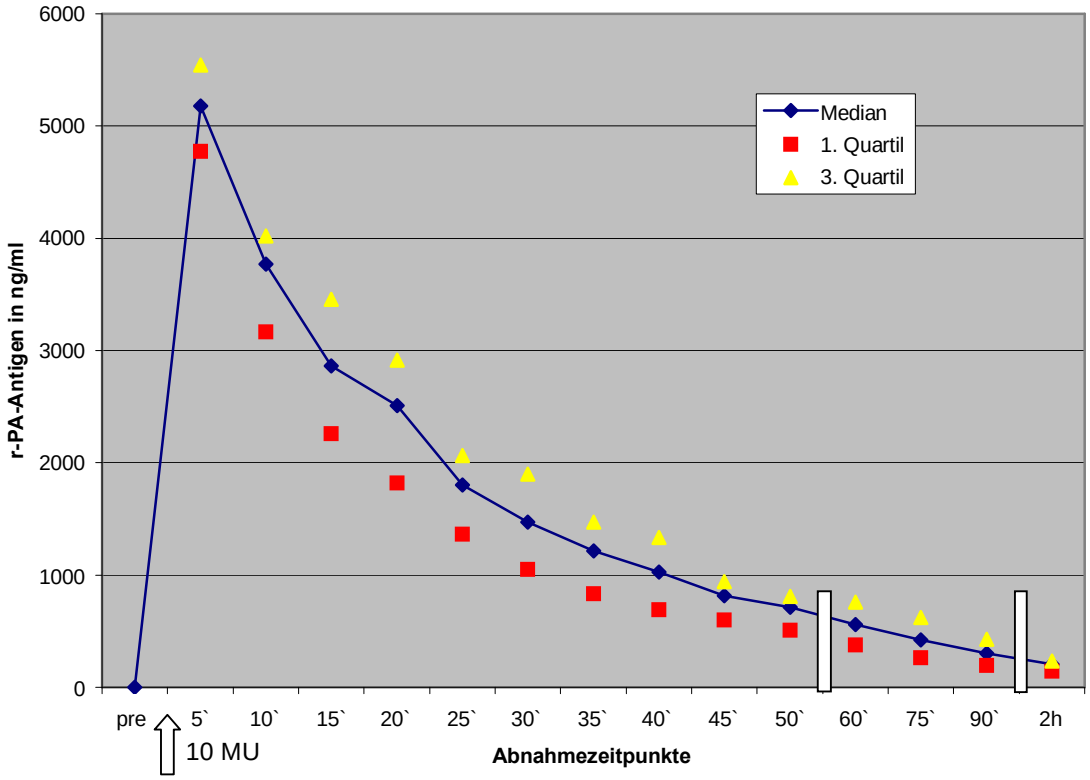

Abbildung 4: Zeitlicher Verlauf der Reteplase - Antigenwerte nach intravenöser Applikation von 15 MU Reteplase (Gruppe C; n = 9 AMI-Patienten)

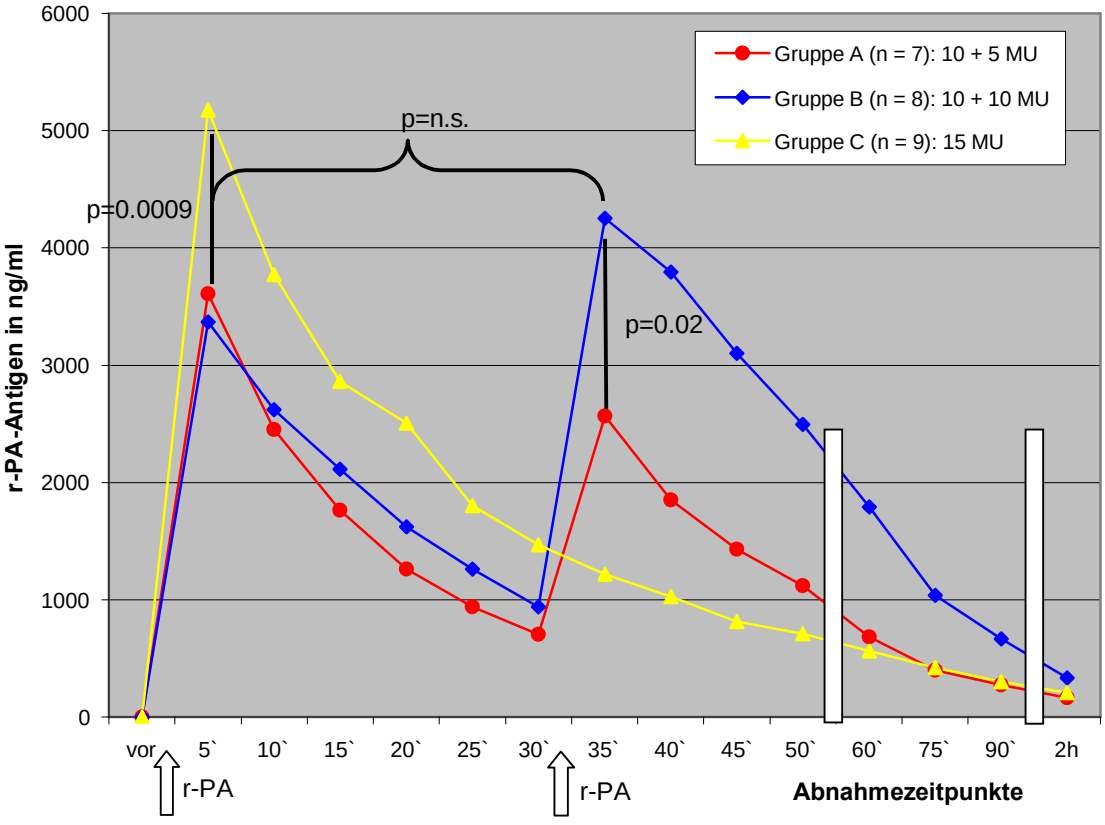

Abbildung 5: Zeitliche Verläufe der medianen Reteplase - Antigenspiegel nach Applikation von 10+5 MU, 10+10 MU und15 MU Reteplase (Gruppen A, B und C)

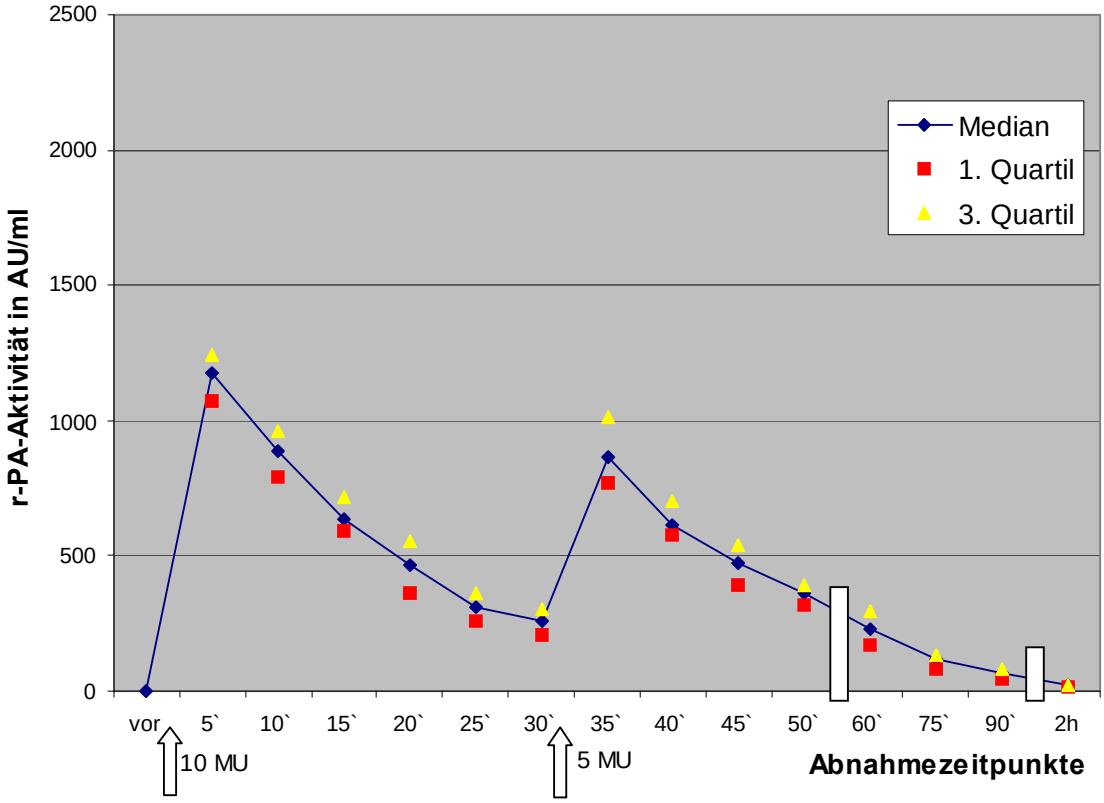

Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Reteplase - Aktivitätswerte nach intravenöser Applikation von 10 + 5 MU Reteplase (Gruppe A; n = 7 AMI-Patienten)

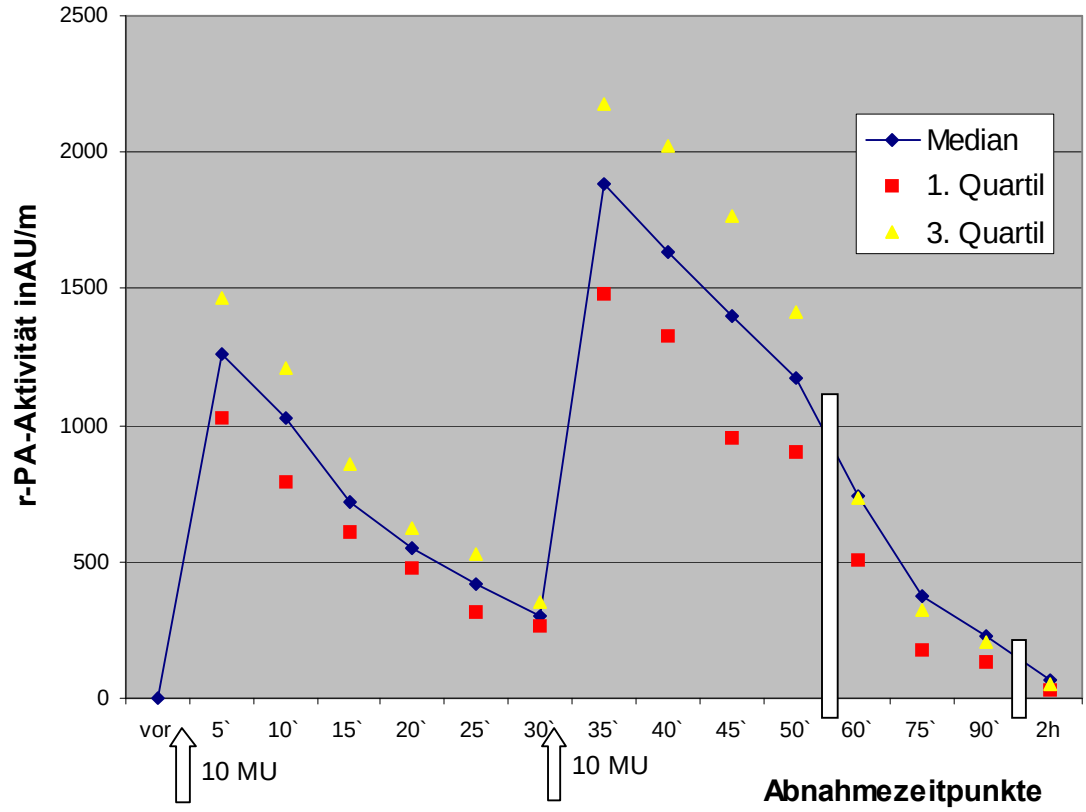

Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Reteplase - Aktivitätswerte nach intravenöser Applikation von 10 + 10 MU Reteplase (Gruppe B; n = 8 AMI-Patienten)

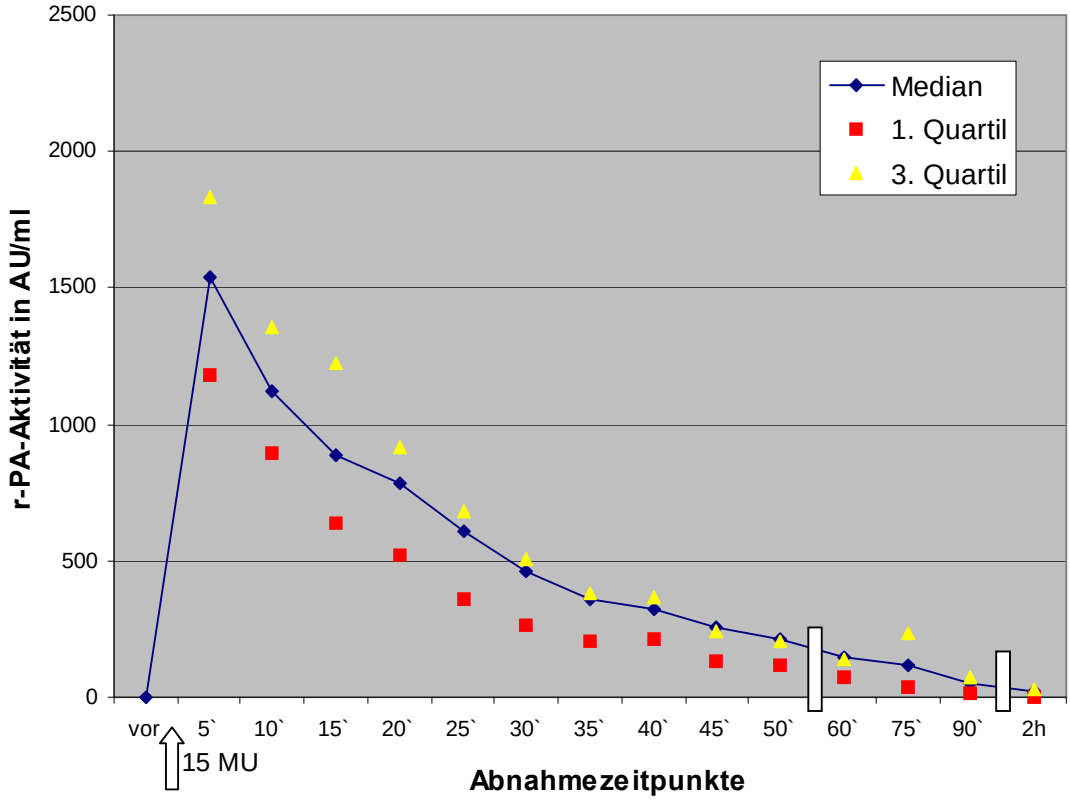

Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Reteplase - Aktivitätswerte nach intravenöser Applikation von 15 MU Reteplase (Gruppe C; n = 9 AMI-Patienten)

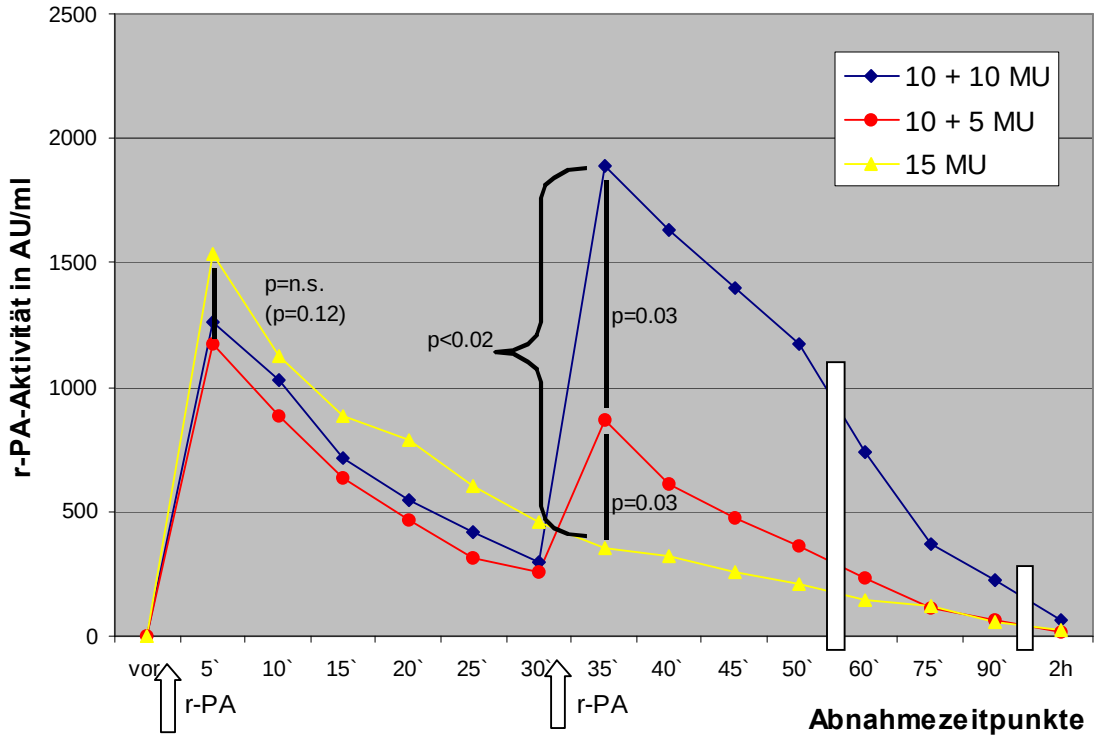

Abbildung 9: Verläufe der Reteplase - Aktivität nach Applikation von 10+5, 10+10 oder 15 MU Reteplase (Gruppen A (n=7), B (n=8) und C (n=9) Patienten)

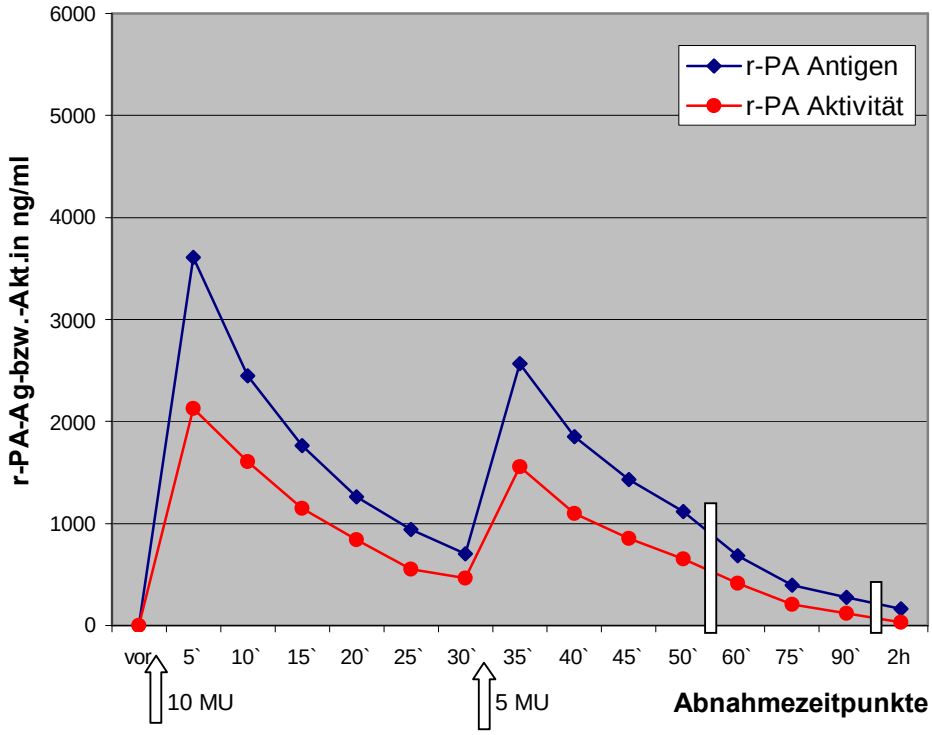

Abbildung 10: Gegenüberstellung der medianen r-PA-Ag- und der r-PA-Akt. Plasmaspiegelverläufe in der 10+5 MU Dosisgruppe (n= 7 AMI-Patienten)

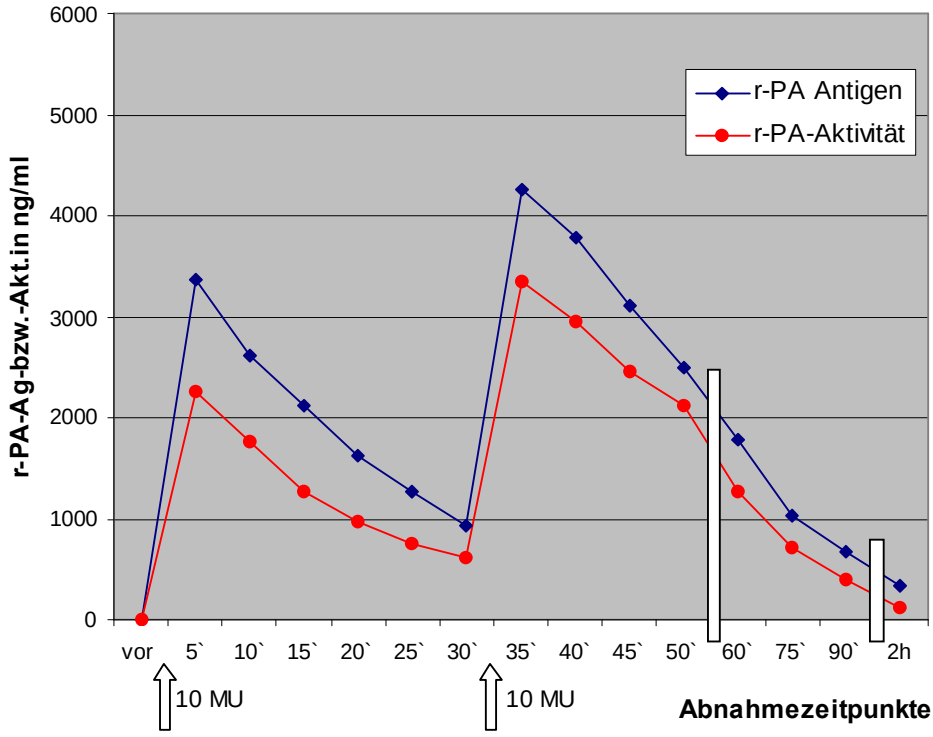

Abbildung 11: Gegenüberstellung der medianen r-PA-Ag- und der r-PA-Akt. Plasmaspiegelverläufe in der 10+10 MU Dosisgruppe (n= 8 AMI-Patienten)

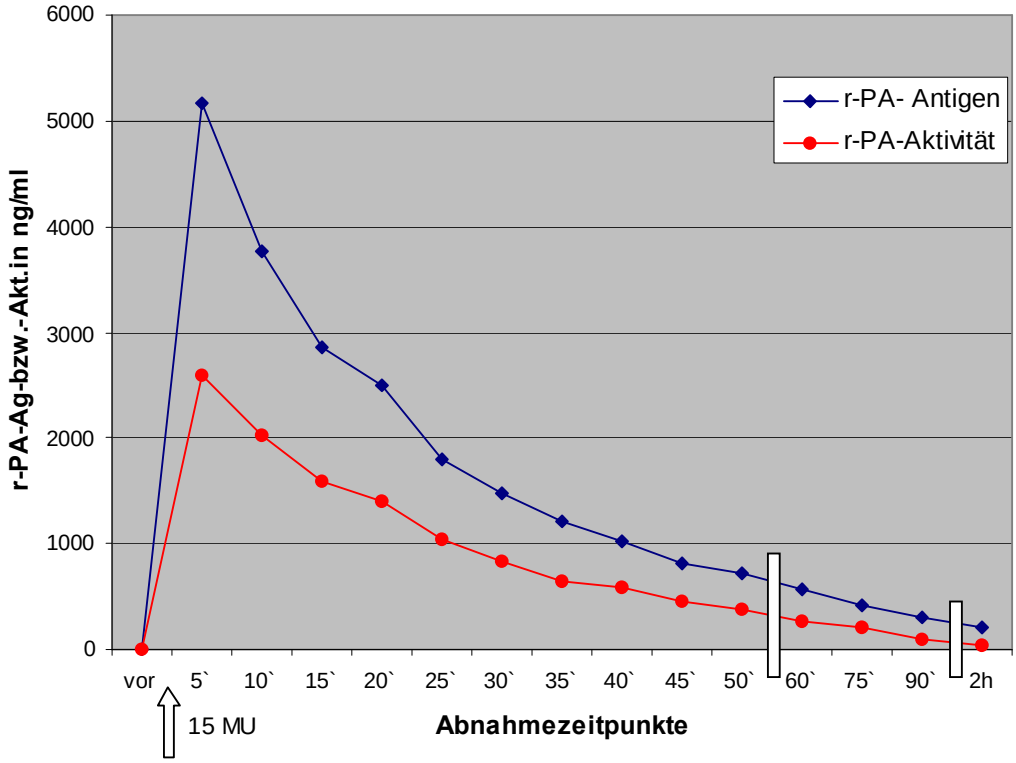

Abbildung 12: Gegenüberstellung der medianen r-PA-Ag- und der r-PA-Akt. Plasmaspiegelverläufe in der 15 MU Dosisgruppe (n= 9 AMI-Patienten)

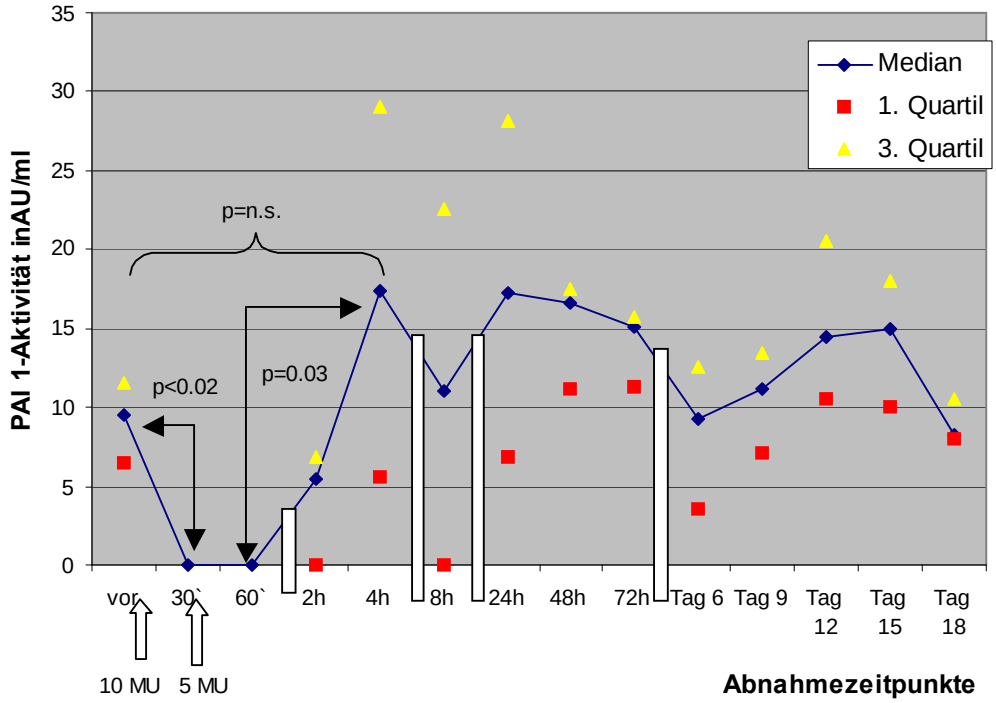

Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der PAI 1-Aktivität nach Applikation von 10+5 MU Reteplase (Gruppe A; n = 7 AMI-Patienten)

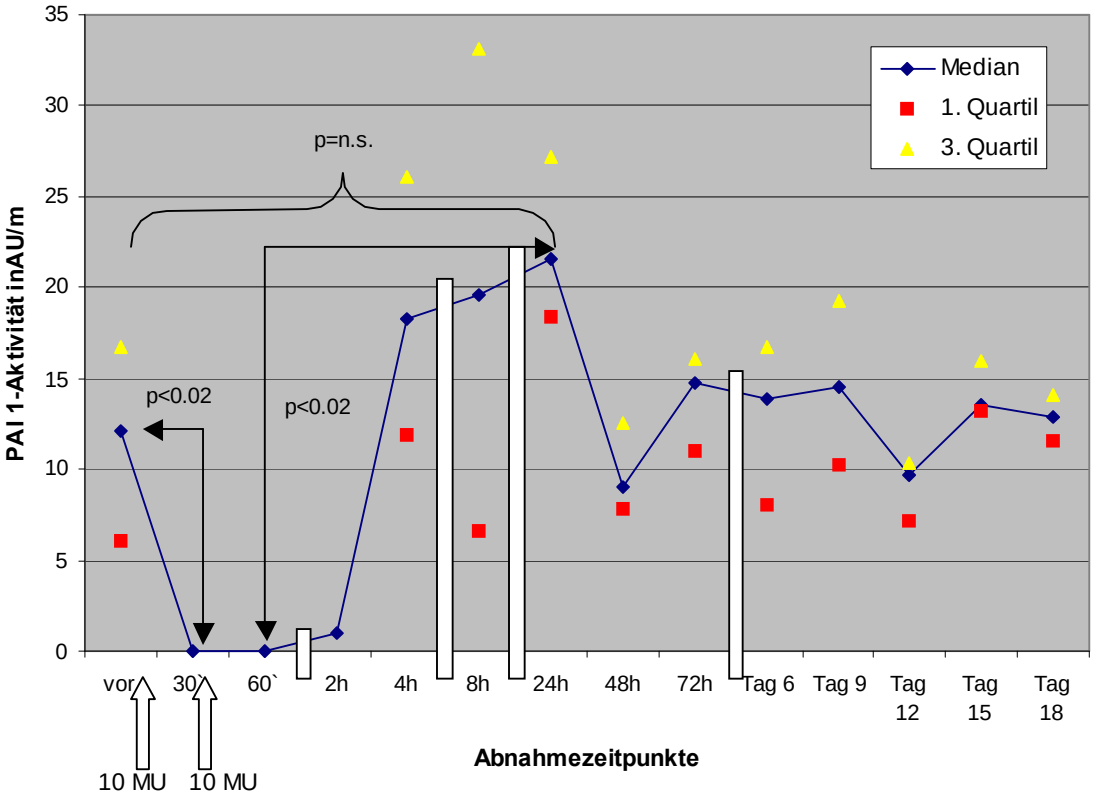

Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der PAI 1 - Aktivität nach Applikation von 10+10 MU Reteplase (Gruppe B; n = 8 AMI-Patienten)

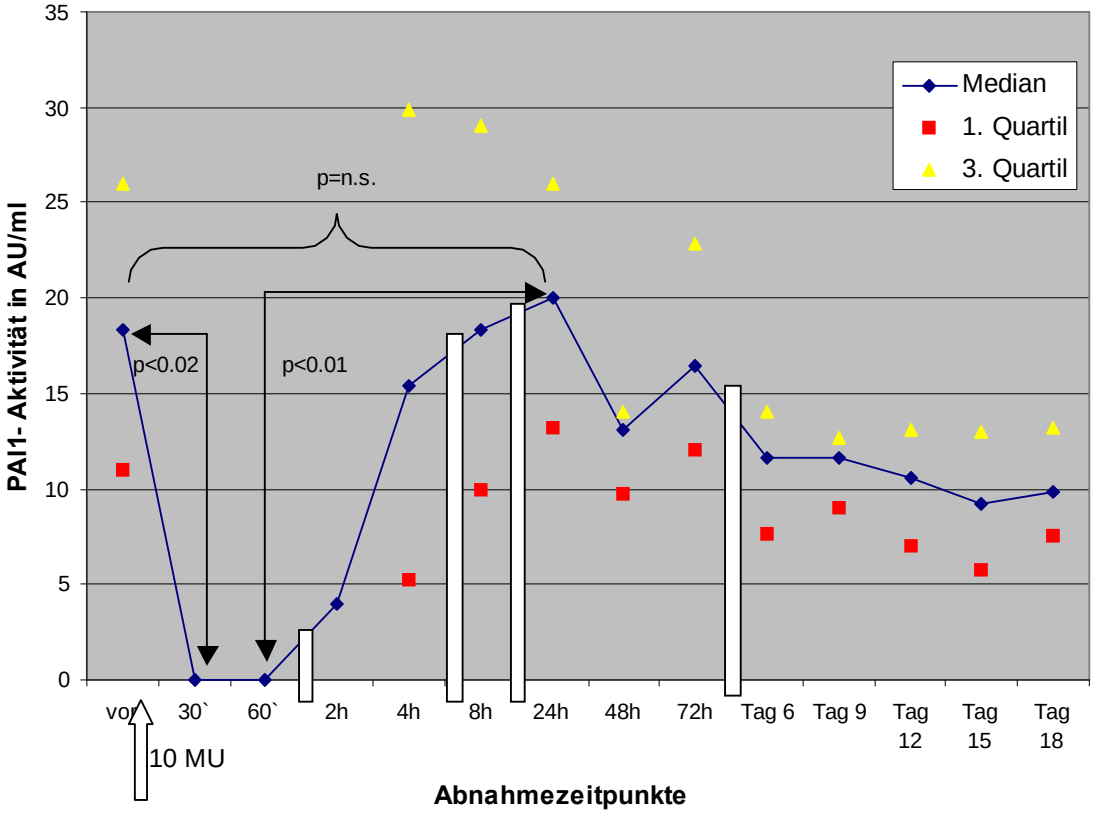

Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der PAI 1 - Aktivität nach Applikation von 15MU Reteplase (Gruppe C; n = 9 AMI-Patienten)

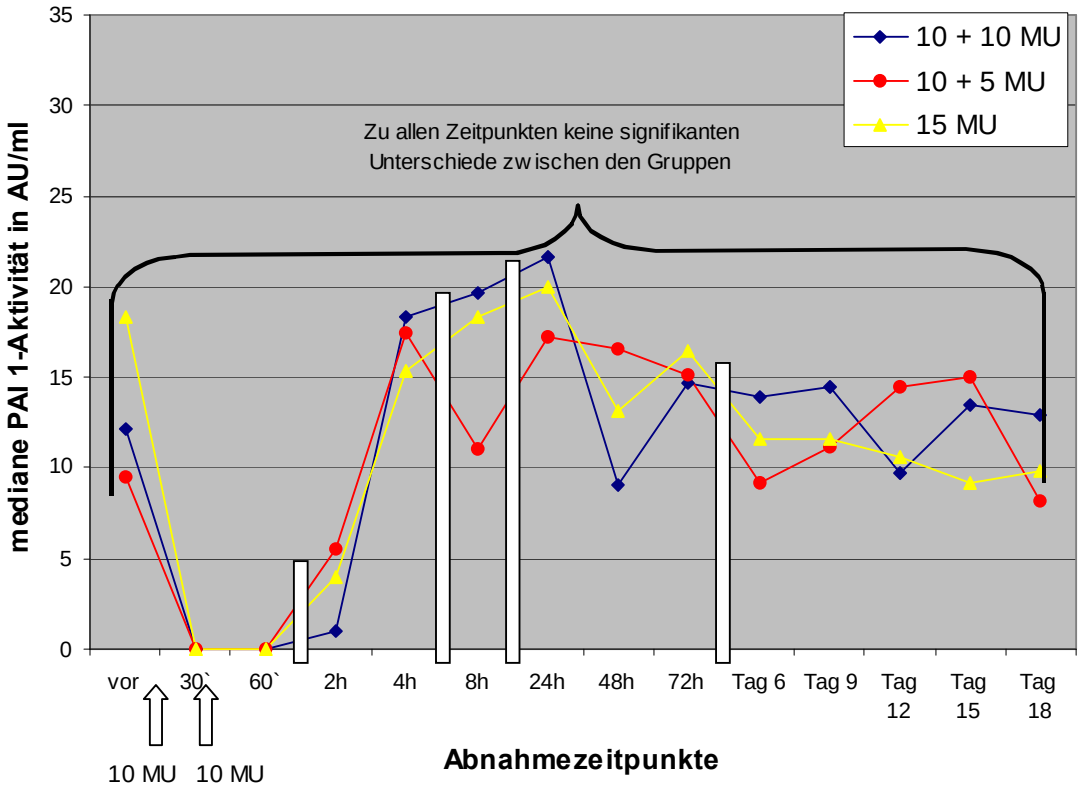

Abbildung 16: Verläufe der medianen PAI 1-Aktivität nach Applikation von 10+5, 10+10 oder 15 MU Reteplase (Gruppen A (n=7 Patienten), B (n=8) und C (n= 9))

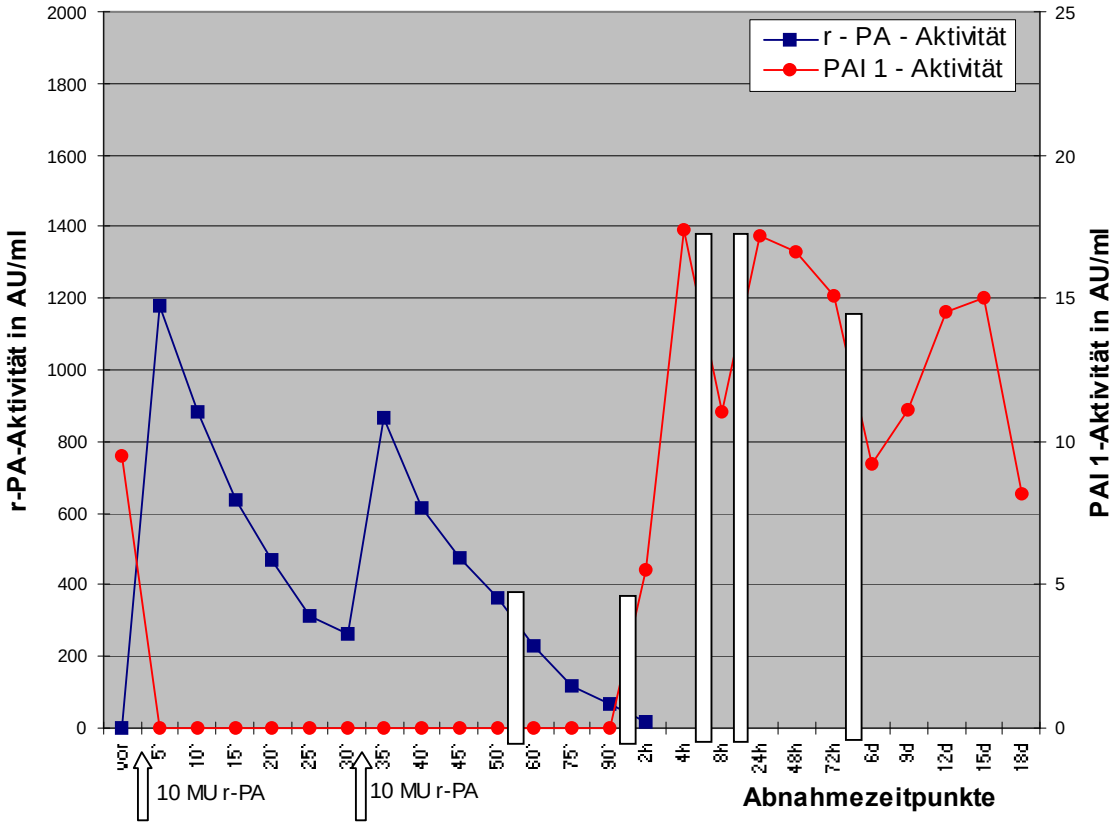

Abbildung 17: Gegenüberstellung der medianen r-PA- und PAI 1-Aktivitäts-Plasmaspiegelverläufe in der 10+5 MU Reteplase Gruppe (n=7 AMI-Patienten)

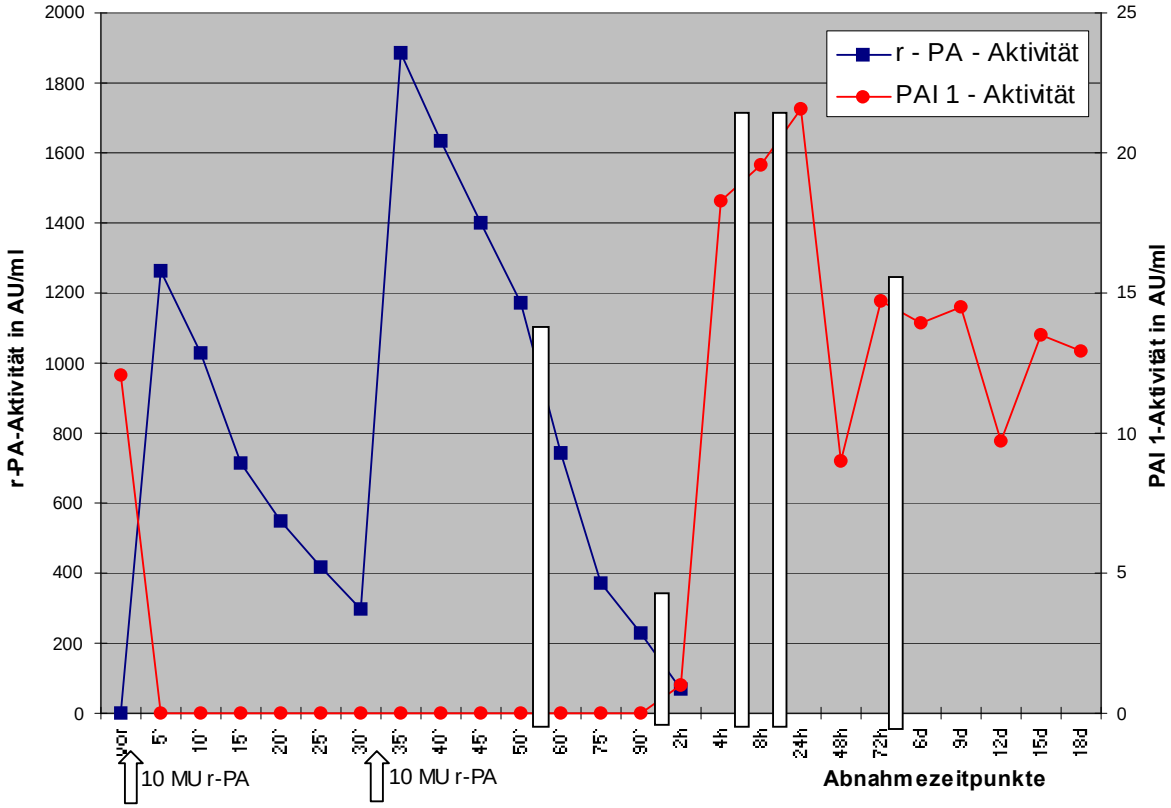

Abbildung 18: Gegenüberstellung der medianen r-PA- und PAI 1-Aktivitäts-Plasmaspiegelverläufe in der 10+10 MU Reteplase-Gruppe (n=8 AMI-Patienten)

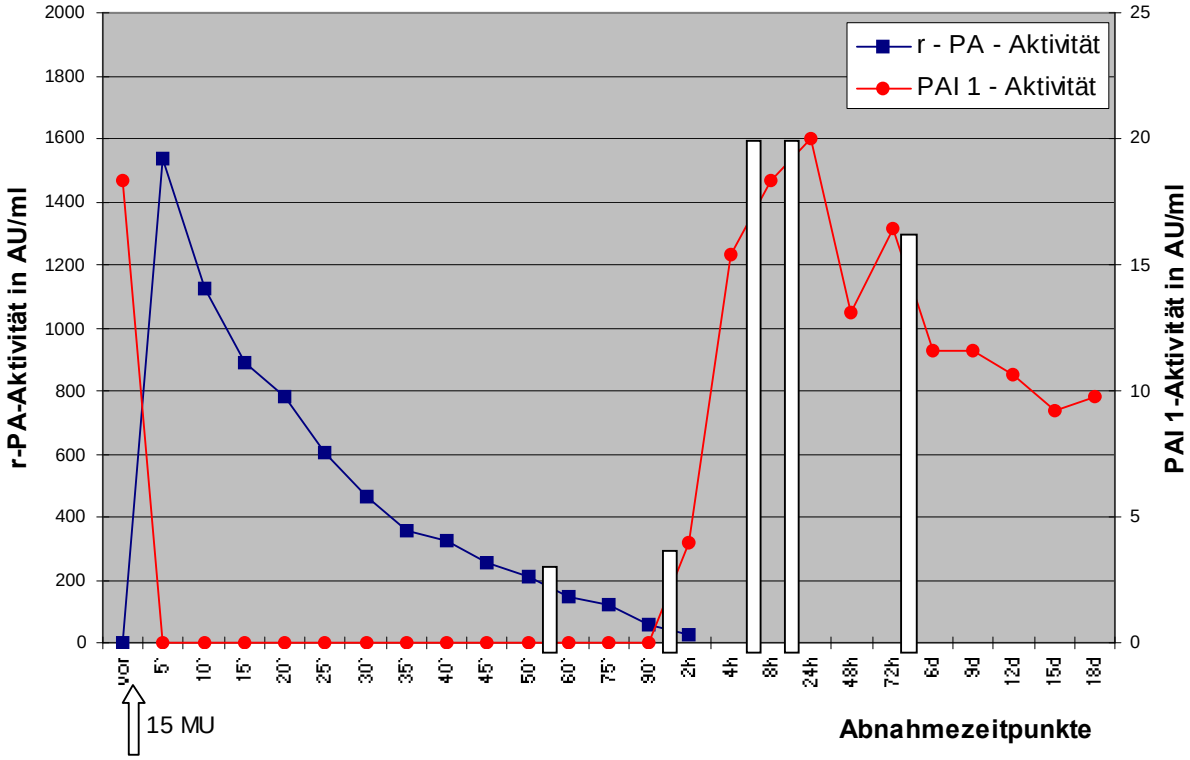

Abbildung 19: Gegenüberstellung der medianen r-PA- und PAI 1-Aktivitäts-Plasmaspiegelverläufe in der 15 MU Reteplase-Gruppe (n=9 AMI-Patienten)

4. DISKUSSION

4.1. Grundlagen der Gerinnung und der Fibrinolyse

Der kontinuierliche Blutfluss in den Blutgefässen wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Gefässwand, den zellulären Komponenten des Blutes, insbesondere den Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnung, gewährleistet. Fibrinbildung und Fibrinolyse stehen in einem hämostatischen Gleichgewicht. Die Verschiebung dieses Gleichgewichts bedingt entweder eine hämorrhagische oder thrombophile Diathese. Die Fibrinolyse ist ein proteolytischer enzymatischer Prozess im Blut, der die Funktion hat, intravaskuläre thrombotische Vorgänge örtlich zu begrenzen und thrombotisch verschlossene Gefässe wieder zu eröffnen. Das Hauptenzym des Fibrinolysesystems ist die aktive Protease Plasmin, die durch Aktivierung der inaktiven Vorstufe Plasminogen durch sogenannte Plasminogenaktivatoren über eine limitierte Proteolyse entsteht (Übersicht bei 149, 153)

4.2. Plasminogenaktivatoren

Plasminogenaktivatoren (PA) sind Substanzen, die Plasminogen in Plasmin um - wandeln können. Fibrinselektivität bedeutet Aktivierung des fibringebundenen und Schonung des zirkulierenden Plasminogens. Eine Unterscheidung zwischen physiologischen und pathologischen Thromben ist jedoch auch bei fibrinselektiven PA nicht möglich.

4.2.1. Streptokinase

Dieses aus β - hämolysierenden Streptokokken der Lancefield Gruppe C gewonnene, nichtphysiologische und nicht - fibrinselektive Thrombolytikum wirkt als indirekter, nicht - enzymatischer Aktivator und wurde bereits in vielen Studien erfolgreich eingesetzt (45, 72, 73, 77, 98). Die HWZ beträgt ca. 30 min (95). Nach 1:1 - Bindung an Plasminogen erlangt der Komplex Plasminaktivität und vermag andere Plasminogenmoleküle zu Plasmin zu aktivieren. Nachteile sind die

hierdurch induzierte Plasminämie mit Plasminogen - und Fibrinogenverbrauch und ein somit zumindest theoretisch erhöhtes Blutungsrisiko sowie die Antigenität, die wegen möglicher allergischer Reaktionen eine kurzfristige Therapiewiederholung nicht erlaubt, bzw. eine Wirkungsabschwächung durch Antikörperbildung nach früheren Streptokokkeninfekten bedingt (Übersichten bei 22, 55, 95, 147, 153).

4.2.2. APSAC

Durch in vitro - Komplexierung von SK und Lys - Plg sowie reversibler Vereste - rung des aktiven Zentrums des Komplexes mit p - Aminodiphenyl - p - Anisat - HCL entsteht der primär inaktive **a**nisoylated **p**lasminogen - **s**treptokinase - **a**ctivator - **c**omplex (APSAC), dessen langsame ($t_{0,5}$ = 40 - 100 min) Aktivierung durch spontane Deacylierung in vivo erfolgt. Von Vorteil ist die längere Plasma - HWZ ($t_{0,5}$ = 90 - 110 min), die eine Bolusapplikation ermöglicht, jedoch sind zusätzlich zu obigen Nachteilen der SK der höhere Preis und ein zumindest theoretisch mögliches Infektionsrisiko durch das verwendete humane Plasminogen zu berücksichtigen (Übersichten bei 22, 55, 95, 147, 153).

4.2.3. Urokinase - Typ - Plasminogenaktivatoren (u - PA)

Das Ausgangsmolekül dieser Gruppe von direkt enzymatisch wirkenden, endogenen und somit nicht immunogenen PA, die vor allem in Nierentubuluszellen gebildet und aus Urin gewonnen werden, stellt die fibrinspezifische Prourokinase oder scu - PA (= single chain urokinase - type plasminogen activator) dar. Durch limitierte Protolyse der Lys158 - Ile159 – Peptidbindung entsteht hochmolekulare zweikettige Urokinase (HMW - tc - UK) und durch nachfolgende Abspaltung des N - terminalen Anteils der Schwerkette zwischen Lys135 - Lys136 die niedermolekulare Form (LMW - tc - UK), die beide nicht mehr fibrinspezifisch sind. Das aktive Zentrum dieser Serinproteasen liegt im C – terminalen Teil, während der N - terminale Teil Domänenstruktur mit EGF – und Kringel - Domäne besitzt. (Übersichten bei 27, 95, 149, 153).

4.2.4. Tissue - type Plasminogen - Activator (Gewebeplasminogenaktivator oder t – PA)

Dieser wichtigste physiologische fibrinselektive PA (s. Abb. 20) besteht aus 527 AS mit einem Molekülgewicht (ohne Glykosylierung) von 59008 Dalton, wird vor allem in Endothelzellen synthetisiert und auf verschiedene Stimuli (Anstrengung, Venenstau, Adrenalin etc.) in die Blutbahn freigesetzt, wo er in sehr geringer Konzentration von ca. 4 - 5 ng/ml und zu 95% mit Plasminogenaktivator - Inhibitor Typ - 1 (PAI - 1) komplexiert zirkuliert. Anfang der 80er Jahre gelang die Isolierung aus humanem Uterusgewebe und Melanomzellkulturen (21, 30) sowie anschliessend der erste klinische Einsatz bei AMI - Patienten (182). Nach Klonierung und Exprimierung des auf Chromosom 8 lokalisierten t - PA - Gens in E. coli 1983 (133) konnte durch cDNA - Sequenzierung indirekt die primäre AS – Struktur ermittelt werden (Übersichten bei 8, 11, 12, 22, 30, 27, 28, 82, 90, 91, 93, 95, 140, 147, 149, 153, 168, 193). Das in einkettiger Form (sc - t - PA) sezernierte native Molekül kann, besonders an Fibrinoberflächen, durch Plasmin - katalysierte Peptidspaltung (Arg275 - Ile276), in zweikettige tc - t - PA überführt werden. Die N - terminale Schwerkette (A - Kette, AS 1 - 275) besteht aus der Fingerdomäne (AS 6 - 43) mit Homologie zur Fingerdomäne von Fibronektin, der EGF (**e**pidermal **g**rowth **f**actor = Wachstumsfaktor) - Domäne (AS 44 - 91) und schliesslich den Kringel – 1 - (AS 92 - 173) und Kringel - 2 - (AS 180 - 261) Domänen, die ähnlich auch in Plasminogen, Urokinase, Faktor II und Faktor XII vorkommen. Am Molekülanfang liegen Signal - und Pro - Sequenz. Die C - terminale Leichtkette (B - Kette, AS 276 - 527) beinhaltet das katalytische Zentrum mit den AS His322, Asp371 und Ser478, welches Homologien zu anderen Serinproteasen wie Plasmin, Urokinase, Thrombin, Trypsin etc. aufweist.

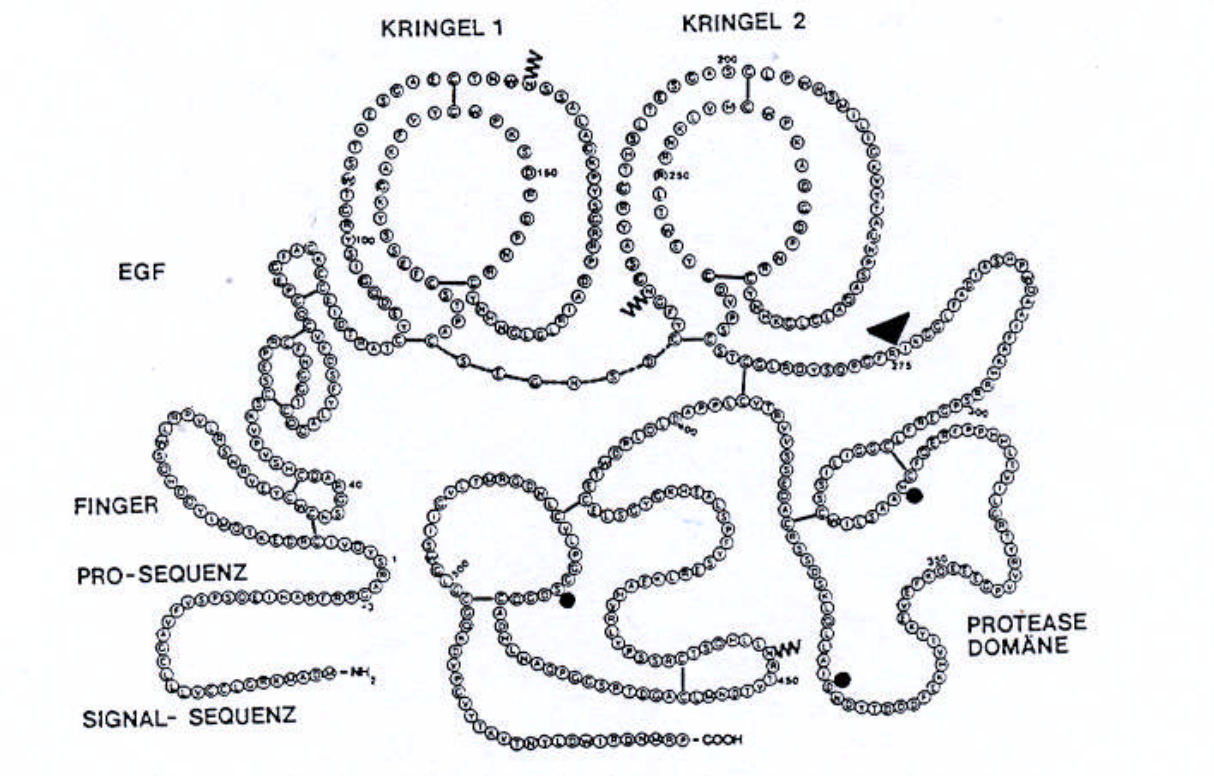

Abbildung 20: Zweidimensionale schematische Darstellung der Primärstruktur von humanem t - PA

(entnommen aus (147), S.18; modifiziertes Modell nach Ny et al. (128))

▼ = Plasmin - Spaltungsstelle von sct - PA in tct - PA

● = AS des aktiven Zentrums der Serinprotease

– = Disulfidbrücken

VVV = Glycosylierungsstellen

EGF = epidermaler Wachstumsfaktor

4.2.4.1. Struktur – Wirkungs - Beziehungen von t - PA

Während die A - Kette für Fibrin - und Endothelbindungsfähigkeit, Fibrinstimulierbarkeit und Clearance verantwortlich ist, liegt die enzymatische Aktivität in der Leichtkette (35, 69). Bereits die einkettige Form besitzt Enzymaktivität, die jedoch nur in Anwesenheit von Fibrin der zweikettigen Form entspricht, indem sct - PA auf der Fibrinoberfläche eine Konformationsänderung erfährt (94). Die Bindung an Fibrin und, davon nicht sicher abgrenzbar, auch die

Stimulation der Proteaseaktivität durch Fibrin konnten der Finger - und der Kringel - 2 – Domäne zugeordnet werden (16, 36, 37, 69, 85, 185, 186, 201). Die initiale hochaffine Bindung an intaktes Fibrin, wahrscheinlich über "intrachain" – Lysinreste, scheint durch die Fingerdomäne bedingt, während nach plasmininduzierter partieller Proteolyse mit Entstehung freier C - terminaler Lysinreste eine Bindungsverstärkung und Aktivitätssteigerung vor allem über die Lysinbindungsstelle des Kringel - 2 (35, 36). Die Fingerdomäne spielt in Abwesenheit von Plasminogen und bei niedriger Fibrinkonzentration eine übergeordnete Rolle, während t – PA über eine Lysinbindungsstelle der Kringel 2 – Domäne, gebildet aus den AS Asp236, Asp238 sowie Glu254, erst bei höheren Plasminogen - /Fibrin – Konzentrationen zusammen mit Plasminogen unter Ausbildung des sog. ternären Komplexes (68) auf der Fibrinoberfläche bindet. Ein weiterer Faktor der Fibrinselektivität besteht, neben der Fibrinbindung, in der Steigerung der plasminogenaktivierenden Kapazität des t - PA durch Fibrin. Hoylaerts et al. zeigten ein Absinken der Michaelis - Konstanten K_m der Glu - Plg - Aktivierung von 65 μMol ohne Fibrin auf 0,16 μMol mit Fibrin bei fast unveränderter katalytischer Konstante kcat und somit eine Zunahme des katalytischen Effektes von t - PA auf das 200 - 400 - fache (68). Vermittelt wird dieser Effekt hauptsächlich durch den Kringel 2, schwächer wohl auch durch die Fingerdomäne (186). Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt. Dieser theoretische Vorteil der viel geringeren Plasminogen - Aktivierung im Plasma gegenüber der Fibrinoberfläche wird jedoch bei der therapeutischen Fibrinolyse dadurch teilweise aufgehoben, dass auch lösliche Fibrinspaltprodukte eine Oberfläche für gesteigerte Plg - Aktivierung bieten (187, 199). Dies wird als eine der Ursachen für die systemische Plasminämie und den Fibrinogenabbau angesehen Die sehr kurze Halbwertszeit von t - PA, ermittelt bei Gesunden (150, 170, 195) und bei AMI - Patienten (46, 47, 151, 172, 173, 192), beträgt bei einer zumindest zweiphasigen Plasmaclearancekurve nur 3 - 6 Minuten für die dominante initiale α - Phase und 26 - 70 Minuten für die anschliessende β - Phase. Eine beobachtete dritte (γ) - Phase mit HWZ von 3,7 - 9 h trägt nur geringfügig zur Gesamtclearance bei. Den prozentual stärksten Anteil besitzt die α - Phase.

Diese Werte wurden sowohl bei gesunden Freiwilligen (150, 170), als auch bei Patienten mit AMI ermittelt (46, 47, 151, 172, 173, 192). Während sich im

Tierexperiment bei sehr hohen t – PA – Gaben eine sättigbare Clearance zeigt, ist die Elimination von t – PA beim Menschen im therapeutischen Dosisbereich linear (151, 173, Übersicht bei 171).

Eliminationsorte für t - PA sind die Parenchym -, Endothel - und von Kupf - fer`schen Sternzellen der Leber, die abhängig von der Art des verwendeten t - PA für ca. 55, 40 und 5 % der Clearance verantwortlich sind. Die Endozytose in Pa - renchymzellen geschieht mittels eines spezifischen Rezeptors, der am ehesten die EGF - und die Fingerdomäne, evtl. auch den Kringel 1 erkennt (26, 29, 39, 201), während auf Endothelzellen vornehmlich ein unspezifischer Mannose - (141, 169) oder Galactoserezeptor (160) für die Clearance verantwortlich ist. Im Anschluss an intrazellulären lysosomalen Abbau erfolgt v. a. die renale Ausscheidung der t - PA – Abbauprodukte.

Nach obigen Erkenntnissen kann somit gefolgert werden, dass Mutanten von t - PA mit Deletion der für die Clearance relevanten Domänen bzw. Kohlenhydrat - Seitenketten (67, 203) längere HWZ und teilweise auch höhere Aktivitäten besitzen (Übersicht bei 171).

4.2.5. Tenecteplase (TNK – t - PA)

TNK - t - PA oder Tenecteplase ist eine gentechnisch hergestellte glykosylierte Tripelkombinationsmutante von t - PA, die in einigen Pilotstudien (7, 17, 18, 183) erfolgreich getestet worden ist. Durch drei gerichtete Mutationen an der Bindungsstelle für PAI – 1 einerseits und an der Bindungsstelle, über die t – PA an die Leberzellen bindet andererseits, ist die TNK – Mutante des t – PA entstanden. An folgenden Stellen sind AS - Substitutionen vorgenommen worden:

Ein Threonin wurde durch Asparagin in Position 103 ersetzt, ein Asparagin wurde in Position 117 durch Glutamin ersetzt und vier AS, Lysin, Histidin und zwei Arginine, wurden in den Positionen 296 - 299 durch vier Alanine ersetzt (Übersicht bei 200). Die an den drei Positionen ersetzten AS Threonin, Asparagin und Lysin haben die Einzelbuchstaben – Symbole T, N und K, was zur Namensgebung „TNK – Mutante“ führte. Die Substitutionen resultieren in einer reduzierten Plasmaclearance (HWZ ca. 18 min) (17, 196, 200), einer gesteigerten Fibrin - spezifität und einer Resistenz gegenüber dem Plasminogenaktivator – Inhibitor – Typ 1 (PAI 1) (133). Die im Vergleich zum nativen Gewebe – Plasminogen – Aktivator auf das Doppelte erhöhte katalytische Aktivität und die zusätzlich auf ein

Zehntel verminderte PAI 1 – Inaktivierbarkeit (80 - fach höhere „PAI 1 - Resistenz“ verglichen mit nativem t-PA) bewirken, dass die TNK – Variante eine hundertfach erhöhte katalytische Konversionskonstante Kcat/Km aufweist. Auf Grund der veränderten pharmakokinetischen Parameter ist die Einzelbolusgabe von TNK - t - PA bei Herzinfarktpatienten ausreichend (17, 183), um vergleichbar gute Ergebnisse mit hohem Sicherheitsprofil zu erzielen wie unter der Therapie mit „frontloaded“ t – PA (7, 18). Somit kann das Fibrinolytikum ausserhalb und innerhalb des Krankenhauses schnell appliziert werden (7).

4.2.6. Lanoteplase (n - PA)

N – PA, oder auch n(ovel) – PA genannt, ist eine glykosylierte Deletionsmutante von Alteplase mit Fehlen der Finger – und EGF – Domänen sowie Verlust der Mannose – Seitenkette in Position 117 infolge Ersatz der AS Asparagin durch Glycin (Übersicht bei 200). Die anderen Seitenketten bleiben dagegen wie im nativen t – PA – Molekül erhalten, da Lanoteplase in CHO – Zellen (***C****hinese* ***h****amster* ***o****vary cells*), also eukaryontischen Zellen, exprimiert wird. Durch die genannten Veränderungen hat n – PA eine geringere Fibrinspezifität und niedrigere Clearancerate als rt – PA, weil die Bindung an die Rezeptoren der Leber wesentlich vermindert wird. Da die HWZ (30 – 45 min) ca. zehnfach länger ist als die von t – PA, kann die Mutante als Einzelbolus appliziert werden (196).

4.2.7. Monteplase und YM866

Monteplase ist eine modifizierter Gewebeplasminogenaktivator, welcher durch Substitution einer Aminosäure Cystein in der Position 84 durch Serin in der EGF – Domäne aus den Nierenzellen von syrischen Babyhamstern hergestellt wurde. Der Plasminogenaktivator hat eine verlängerte HWZ von mehr als 20 min im Vergleich zum nativen t – PA (vier Minuten). Eine andere Mutante von t – PA stellt YM866 dar, bei welcher die Aminosäuren 92 bis 173 der Kringel – 1 – Domäne entfernt und Arginin in Position 275 durch Glutaminsäure ersetzt wurde, was zu einer verlängerten HWZ der Mutante geführt hat (196).

4.2.8. Saruplase (Prourokinase)

Die Prourokinase (= single chain urokinase – type plasminogen activator (scu – PA)) ist das fibrinspezifische Ausgangsmolekül, das durch limitierte Proteolyse der Lys158 – Ile159 – Peptidbindung in hochmolekulare zweikettige Urokinase (HMW – tc – UK) umgewandelt wird. Durch Abspaltung eines N – terminalen An - teils der aminoterminalen Schwerkette von HMW – tc – UK an der Spaltungsstelle Lys135 – Lys136 entsteht die niedermolekulare Form (LMW – tc – UK). tc – UK besitzen keine Fibrinspezifität mehr. Beide tc – UK – Formen, deren zwei Ketten durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben, aktivieren Plasminogen direkt enzymatisch (122, Übersicht bei 200).

4.2.9. Staphylokinase

Neben einigen Streptokokken – Stämmen verfügen auch bestimmte Staphylokokken – Arten über ein Enzymsystem mit Plasminogen – aktivierenden Eigenschaften: die Staphylokinase. Staphylokinase, ein Protein bestehend aus 136 AS mit einem Molekulargewicht von 16,5 kD, wird von Staphylococcus aureus - Stämmen produziert und hat eine hohe Fibrinselektivität mit unbekanntem Mechanismus. Staphylokinase formt mit Plasminogen einen 1:1 - Komplex, welcher in einer Folgereaktion weitere Plasminogenmoleküle zu Plasmin aktivieren kann. In der Abwesenheit von Fibrin ist Staphylokinase nicht in der Lage, die Konversion von Plasminogen zu Plasmin zu katalysieren. Der indirekte Plasminogenaktivator mit einer HWZ von sechs Minuten führt zu einer effizienten und schnellen Rekanalisation (196). Die Elimination erfolgt überwiegend renal. Auf Grund des bakteriellen Ursprungs kann das Protein nach der Applikation die Antikörperbildung und nach wiederholter Gabe eine Resistenz induzieren. Jedoch haben die ersten Studien angedeutet, dass die Immunogenität von Staphylokinase durch Punktmutationen reduziert werden kann (Übersicht bei 200).

4.3. Pharmakokinetik

4.3.1. Struktur- Wirkungs-Beziehungen von Reteplase

Die Clearance von t – PA kann, wie oben erläutert, durch Entfernung spezifischer Domänen der aminoterminalen Schwerkette wie Finger-, EGF- und /oder Kringel 1 – Domäne (26, 116, 201) reduziert werden. Nichtglycosylierte t – PA – Mutanten erreichen in vivo ebenfalls längere Halbwertszeiten, weil t – PA – neben anderen Eliminationswegen (84) – auch über Mannose – und Galactose – Rezeptoren in der Leber aus der Zirkulation entfernt wird (67, 160, 169). Das Fehlen dieser Kohlenhydrat (KH) – Seitenketten erhöht die fibrinolytische Aktivität solcher t – PA - Abkömmlinge, vermutlich auch deshalb, weil die KH – Seitenketten die t – PA – Fibrin – Interaktion durch ihre Ladung und sterische Anordnung behindern (203). Unglycosylierte Mutanten sollten bei Erhaltung von Kringel 2 – und Protease – Domäne nur geringfügig an Fibrinstimulierbarkeit ihrer plasminogenaktivierenden Eigenschaften verlieren, denn die Stimulierbarkeit durch Fibrinoberflächen und in eingeschränktem Umfange auch die Fibrinbindung von t – PA werden durch Kringel 2 und die Fingerdomäne mediiert (36, 37, 185, 186).

Der Verlust von Finger -, EGF – und Kringel 1 – Domäne sowie der Glycosylierung (E. coli besitzt kein ER) bei Erhalt von Kringel 2 – und Proteasedomäne führt bei Reteplase zu einer reduzierten Clearance und einer dadurch verlängerten Halbwertszeit. Darüber hinaus sollte r – PA eine reduzierte Fibrinspezifität bei grösstenteils erhaltener Fibrinstimulierbarkeit aufweisen. Martin et al. (106) zeigten im Tierversuch an Ratten, dass die Nieren und nicht die Leber (110) die hauptsächlichen Eliminationsorgane für Reteplase darstellen. Diese interessante Tatsache beruht neben dem Fehlen der für die Leberclearance verantwortlichen Domänen auf dem geringeren Molekulargewicht der Mutante und steht im Gegensatz zu der fast ausschliesslich hepatischen Elimination von Alteplase. Kohnert et al. (80) verglichen die in vitro – Eigenschaften von Reteplase mit denjenigen von t – PA und konnten ähnliche amidolytische sowie plasminogenolytische Aktivitäten in Abwesenheit von Cyanbromid – Fragmenten von Fbg feststellen. Demgegenüber zeigt sich in vitro eine niedrigere plasminogenolytische Aktivität von Reteplase in Anwesenheit von FCB. Die

gleichartige Hemmung beider PA, sowohl von Reteplase, als auch von nativem t – PA, durch PAI 1 und die o. a. Befunde zeigen die korrekte dreidimensionale Faltung der Domänen im Renaturierungsprozess von Reteplase und die Unabhängigkeit der biochemischen Eigenschaften des Kringels 2 und der Proteasedomäne von den drei N – terminalen, bei r – PA entfernten Domänen an.

4.3.2. 15 MU Einzelbolus r – PA versus 10 + 5 MU Doppel – Bolus

Die Aufteilung der identischen Gesamtdosis von 15 MU Reteplase in zwei Boli von 10 und 5 MU ergab in den Gruppen A und C nahezu identische $AUCag_{0-\infty}$ und $AUCact_{0-\infty}$. Unter Berücksichtigung der Parameter $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$ und CI (siehe Tabelle 6) kann man bei Reteplase von einer linearen, dosisabhängigen Veränderung der pharmakokinetischen Parameter ausgehen, die auch früher bei Alteplase beobachtet wurde (171). Die maximale mediane Antigenkonzentration war in der Einzelbolus – Gruppe signifikant ($p = 0.0009$) höher als in den Doppelbolus – Gruppen, der Unterschied zwischen deren medianen maximalen Aktivitäten erreichte keine statistische Signifikanz ($p = 0.12$). Jedoch wurden in vorausgegangenen Studien an Hunden gezeigt, dass insbesondere die Dauer des Zeitintervalls, in welchem eine „kritische“ Konzentration von Reteplaseantigen bzw. – aktivität überschritten bleibt, einen wichtigeren Prädiktor für den Lyseerfolg darstellt als die maximale Antigenkonzentration oder die Aktivität (109). Von Seifried et al. (151) wurden in einer Pharmakokinetikstudie an 12 AMI – Patienten, die mit 100 mg rt – PA über 2,5 Stunden behandelt worden waren, eine „Grenzkonzentration“ von 1000 ng rt – PA/ml postuliert, die als „Mindest“ – Plasmaspiegel für eine effektive Koronarthrombolyse und Verhinderung von frühen Reokklusionen erforderlich ist. Die in der GRECO I – Multicenterstudie (126) beobachtete hohe Reokklusionsrate von 20 % bzw. 12,5 % in der 10 MU - bzw. 15 MU – Gruppe in der Zeit zwischen den 30 - min. – und 90 – min. – Angiographien könnte ihre Erklärung unter anderem auch in der kurzen Zeitspanne der „lytisch wirksamen Konzentrationen“ finden. In der Nachfolgestudie GRECO II (163) wurde zwar unter dem Doppelbolusregime von Reteplase (10 + 5 MU) eine geringgradig höhere Gesamt – Patency erreicht als in der Vorgängerstudie, der Anteil komplett offener Gefässe (TIMI – Grad 3) war jedoch in der ersten Nachfolgerstudie geringer, so dass unter Berücksichtigung des

kleinen Patientenkollektivs weitere grössere Studien notwendig waren, um den Benefit der Doppelbolusthrombolyse gegenüber den Einzelbolusregimes zu belegen.

Nach Aufteilung der Gesamtdosis von 15 MU Reteplase auf zwei Boli 10 und 5 MU und Gabe des zweiten Bolus von 5 MU Reteplase 30 Minuten nach der Initialdosis wurden der Antigenlevel und die Aktivitätskonzentration bis 60 Minuten länger über der „kritischen“ Grenze von 1000 ng/ml aufrechterhalten. Die Zeitunterschiede waren aber nicht signifikant unterschiedlich. Trotzdem könnte die Verlängerung der Dauer der Reteplase – Antigenkonzentration bzw. - Aktivität um 15 bis 20 min über jener kritischen Grenze, ebenso wie in früheren klinischen Studien beobachtet (126, 174), zu mehr kompletten koronaren Thrombolysen und zur Verminderung von Frühreokklusionen führen.

4.3.3. 15 MU Einzelbolus r – PA versus 10 + 10 MU Doppel – Bolus

Das Gros der Ergebnisse der 10 + 5 MU – Gruppe sind auch auf die 10 + 10 MU – Gruppe übertragbar. Durch Aufteilung in zwei gleiche Boli zu je 10 MU wurden die Dauer des Antigen - bzw. Aktivitätsspiegels über 1000 ng/ml bis auf 90 min bzw. 75 min verlängert ($p < 0.05$, siehe Abbildungen 2 - 5 und 6 - 9). Frühere Studien mit dem Einzelbolusregime waren mit einer hohen Frühreokklusionsrate verbunden, meistens innerhalb der ersten 90 Minuten nach Applikation des Thrombolytikums (126); in Einklang mit früheren Studien (174, 183) könnte mittels 10 + 10 MU – Regime mit den entsprechenden Antigen – und Aktivitätsspiegel die kritische Zeit von 90 min fast vollständig erfasst und die thrombolytische Wirkung somit verlängert werden. In der randomisierten, doppel – blind geführten INJECT – Studie (70), die an insgesamt 6010 Patienten r - PA (Applikation als Doppelbolus 10 + 10 MU, Zeitabstand 30 Minuten, n = 3004) und Streptokinase (1,5 MU über 60 min., n = 3006) verglich, zeigten sich beide Fibrinolytika gleich effektiv (Primärer Endpunkt Mortalität nach 35 Tagen: 9,02% in der r – PA – Gruppe und 9,53% in der Streptokinase – Gruppe). Die RAPID - Studie (157) rekrutierte weniger Patienten, insgesamt 606, und beinhaltete neben der Fibrinolyse mit 100 mg Alteplase über drei Stunden (n = 154) ebenso verschiedene Therapieschemata mit r - PA, nämlich als Einzelbolus mit 15 MU (n = 146), als Doppelbolus mit 10 + 10 MU (n = 154, Zeitabstand zwischen den Boli

30 min.) und als Doppelbolus mit 10 MU + 5 MU (n = 152, Zeitabstand 30 min.). Die Administration von 10 MU r - PA gefolgt von der gleichen Dosis nach 30 Minuten war der Therapie mit dem Standarddosis t - PA hinsichtlich der TIMI 3 - Patencyrate nach 90 Minuten und nach 14 Tagen überlegen. Das Blutungsrisiko aller r - PA - Therapieschemata waren mit dem von t - PA vergleichbar. In der RAPID - 2 – Studie (3) konnten für Reteplase signifikant höhere Frühreperfusionsraten der betreffenden Infarktarterie erzielt werden, welche zu weniger akuten koronaren Interventionen führte als für „frontloaded“ t – PA (100 mg rt – PA über 90 min.).

Um klinisch relevante Folgerungen abzuleiten, war eine grössere Studie notwendig, denn mit einer Fallzahl von 324 Patienten war die Aussagekraft von RAPID 2 zu gering. Im Jahre 1997 erschien die grosse Mortalitätsstudie GUSTO – 3 (60), welche die beiden Therapiestrategien an insgesamt 14 674 Patienten mit AMI verglich (n = 9885: 10 + 10 MU r – PA, n = 4789: frontloaded t – PA). Primärer Endpunkt der Studie war die Mortalitätsrate nach 30 Tagen. Nach einem Follow - up von 30 Tagen und einem Jahr kam es zu keinem signifikantem Unterschied in den Mortalitätsraten zwischen r - PA und t - PA. Während der Follow - up - Phase war im Vergleich zu den früheren Studien ein Anstieg der Mortalitätsrate zu verzeichnen, welcher wohl durch die höhere Anzahl von Risikopatienten (Alter über 75 Jahre, weibliches Geschlecht, Vorderwandinfarkt, hoher Blutdruck bei Aufnahme) in beiden Studienarmen bedingt war.

4.3.4. Pharmakokinetikdaten - Vergleich von rt – PA mit den ermittelten Reteplase-Ergebnissen

Betrachtet man die in der internationalen Literatur veröffentlichten Pharmakokinetikdaten zu rt – PA, so sind dort initiale HWZ ($t_{1/2\alpha}$) im Bereich von 3, 5 bis 9,1 Minuten (24, 25, 46, 47, 48, 151, 172, 173, 192) aufgeführt und damit konnte in unserer Studie mit $t_{1/2\alpha}$ von ca. 16 min in der Gruppe A, 17 min in der Gruppe B und 21 min in der Gruppe C eine deutlich längere initiale HWZ (GRECO I: $t_{1/2\alpha}$ = ca. 19 min (122)) bestimmt werden. Tebbe et al (173) zeigten in einer 50 mg rt – PA – Bolusstudie an sieben AMI – Patienten eine im Verhältnis zu Reteplase knapp vierfach erhöhte Alteplase - Clearance und eine initiale HWZ, die nur wenig mehr als einem Viertel der HWZ von r – PA entspricht. In einer weiteren

Bolus – Studie von Gemmill et al (48) wurden 33 AMI – Patienten zwei 35 mg rt – PA – Boli in 30 – minütigem Abstand verabreicht. $t_{1/2}$ war mit 5,9 min deutlich geringer, die Clearance ergab einen knapp dreifachen „Reteplase – Wert". Tiefenbrunn et al. (177) fanden in einer an 12 Patienten durchgeführten rt – PA – iv – bzw. – ic – Studie mit 20 – 40 mg rt – PA über 30 – 60 min eine initiale HWZ für t – PA von 8,3 Minuten. Auch Collen und vandeWerf (25) bestimmten in einer Prourokinase – rt – PA – Kombinationsstudie die initiale HWZ von rt – PA mit 8 Minuten. Tanswell et al. (172) stellten in einer Pharmakokinetikstudie zur TAPS – Studie, einer Vergleichsuntersuchung von APSAC mit einem „frontloaded" – rt – PA – Regime, eine für rt – PA verglichen mit r – PA um den Faktor 4,7 höhere Clearance und eine $t_{1/2\alpha}$ von 3,5 min fest. Eine weitere rt – PA – Bolusstudie (78) schloss 14 Patienten ein, denen vier konsekutive 25 mg Boli in 20 min - Abständen verabreicht wurden. Obwohl diese Studie nicht als Pharmakokinetikstudie ausgelegt war, wurden die rt – PA – Ag – Spiegel während der Medikamentenapplikation dreimal bestimmt: Während der ersten Stunde zeigten sich durchgehend Plasmaspiegel > 1000 ng/ml. Trotz dieser – wenn auch nur knappen – Überschreitung der Grenzkonzentration über mindestens eine Stunde zeigten zwei der 14 Patienten nach 24 Stunden eine Reokklusion. Auch die terminale HWZ mit Literaturwerten von 16 – 75 Minuten für rt – PA und den eigenen Ergebnissen mit 300 min bis 330 min für r – PA - Antigen (GRECO I: 379 min (122)) ist für r-PA signifikant verlängert. In einigen Studien (151, 173) liessen sich Verteilung, Metabolismus und Elimination von t - PA in drei Phasen einteilen, wobei $t_{1/2\gamma}$ allerdings nur einen sehr geringen Anteil der Gesamtkinetik ausmachte. Dadurch sind die sehr kurzen $t_{1/2\beta}$ von 16 bzw. 17 min in solchen Studien erklärbar. Vergleicht man die HWZ für rt – PA mit der von r – PA in unserer Studie, so wird für Reteplase eine fünffach längere $t_{1/2\beta}$ gefunden. Vergleiche von (rt – PA -) Clearancewerten aus der Literatur, die mit 355 – 640 ml/min und einem in einer Studie gemessenen Maximalwert von 1000 ml/min angegeben werden, und unseren GRECO III – Studienergebnissen (GRECO I: 122 ml/min (122)) von durchschnittlich 137,1 ml/min ergaben eine 2,6 bis 4,7 – fach niedrigere Clearance (GRECO I: 2,9 – 5,3 – fach (122)) für Reteplase.

In klinischen Studien erbrachte das 10 + 10 – Regime höhere Patencyraten als 15 MU (3, 157), d. h., dass eine höhere und verlängerte thrombolytische Aktivität in

der akuten Phase des AMI mit einer verbesserten koronaren Thrombolyse ohne Anstieg der Komplikationsrate verbunden war (3, 71, 157).

Die beobachteten Reteplase – Antigen – Halbwertszeiten $t_{1/2\alpha}$ und $t_{1/2\beta}$ waren 1,3 und 1,8 – fach länger und die Clearancerate 1,3 – fach geringer als die Werte bei gesunden Probanden (103), was wahrscheinlich durch die veränderte hämodynamische Situation der AMI – Patienten bedingt war mit der Konsequenz einer verminderten Nieren - und Leberdurchblutung und somit einer verlangsamten Clearance bei den Patienten (39). Wie oben beschrieben, zeigte Reteplase Halbwertszeiten $t_{1/2\alpha}$ und $t_{1/2\beta}$, welche 3,8 bzw. 18,9 – mal länger waren und eine Clearance, die 3,4 mal geringer war als die entsprechenden Werte von Alteplase (173). Diese Daten zeigen, dass Reteplase die entsprechenden pharmakokinetischen Eigenschaften für die Bolusapplikation besitzt.

4.3.5. Pharmakokinetik im Tierversuch bzw. an Freiwilligen

Auch die Reteplase – Tierversuche (99 - 102, 107) bzw. eine erste Dosisfindungsstudie an gesunden Freiwilligen (104) führten zu Ergebnissen, die durch unsere Pharmakokinetikresultate bestätigt werden: Martin et al. (107) fan - den in Pharmakokinetikuntersuchungen an Ratten, Hunden und Affen bei einem Aktivitätsvergleich von Alteplase mit Reteplase eine – je nach Spezies variierende – HWZ für Reteplase, die das 4,3 – 4,9 – fache der jeweiligen Alteplase – HWZ betrugen. Alteplase zeigte dagegen eine 3,4 – 5,7 – fach höhere Clearancerate im Vergleich zu r – PA. In einem Jugularvenen - Thrombosemodell am Kaninchen (96) wurde eine HWZ ermittelt, die das Neunfache von Alteplase betrug, und eine Clearancerate, die 4,3 – fach niedriger als die rt – PA – Clearancerate war. Ein Koronararterien – Thrombosemodell bei Hunden (102) ergab in einer gleichzeitig durchgeführten Pharmakokinetikstudie für rt – PA, verglichen mit r – PA, eine 3,1 – 6,4 – fach höhere Clearancerate. Die in den beiden letztgenannten Studien postulierte 4,6 – 11,5 – fach höhere thrombolytische Potenz von Reteplase im Vergleich zu Alteplase ist durch die – je nach Spezies – 4,5 – 10,2 – fach längere HWZ und die 3 – 8,4 – fach geringere Clearancerate im Vergleich zu Alteplase bedingt (99). Diese höhere thrombolytische Potenz im Tierversuch trotz niedrigerer spezifischer Aktivität von Reteplase im Verhältnis zu Alteplase (Reteplase: 550 kU/mg; Alteplase: 800 kU/mg (95)) ist vorsichtig zu beurteilen und

darf nicht einfach auf den Menschen übertragen werden: Eine durch verlangsamte Ausscheidung bedingte höhere thrombolytische Potenz erzeugt theoretisch auch einen höheren systemischen Gerinnungsdefekt, obwohl dieser in den Tierversuchen mit zu Alteplase äquipotenten Dosen nicht beobachtet wurde (100, 102).

4.4. Pharmakodynamik

4.4.1. PAI – 1 – Aktivität

In dieser Arbeit wurde neben der Pharmakokinetikuntersuchung auch die PAI 1 – Aktivität als einziger pharmakodynamischer Parameter erfasst. Die Untersuchung der eigentlichen Pharmakodynamik war einer zweiten Dissertationsarbeit vorbehalten.

In allen drei Behandlungsgruppen konnten nach Injektion von Reteplase signifikante Veränderungen der PAI 1 - Werte verzeichnet werden (s. Abbildungen 13 - 16 und Tabellen im Anhang). Die Gesamtveränderungen der PAI 1- Spiegel waren in den Gruppen A und C miteinander vergleichbar, was wohl darauf zurückzuführen ist, dass die Veränderungen eher mit der verabreichten Gesamtdosis als mit dem Applikationsmodus korrelieren. Die erhöhte applizierte Reteplase – Gesamtdosis in Gruppe B von 20 MU (entsprechend 133 % der in den Gruppen A und C applizierten Gesamtdosis) führte zu einem geringgradig schnelleren Abfall der PAI 1 – Aktivitäten auf „0“ als im Vergleich zu den Gruppen A und C, wohingegen die Unterschiede zwischen den 15 MU – Gesamtdosisgruppen A und C vernachlässigbar gering waren. Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen bei der Applikation von 100 mg Alteplase (173).

Der aus Thrombozytengranula nach Aktivierung freigesetzte PAI – 1 kann zu einer weiteren Verschiebung des hämostatischen Gleichgewichts hin zur Thrombophilie führen. Die leicht erhöhte PAI 1 – Aktivität, die bei unseren Patienten vor Lysebeginn gemessen wurde, fand sich auch bei anderen Untersuchern in Plasmen von AMI – Patienten (123, 145, 162). Auch bei Patienten mit KHK (132) wurden erhöhte PAI 1 – Aktivitäten beobachtet. Ob diese erhöhten PAI – 1 – Spiegel in ursächlichem Zusammenhang mit einer spezifischen Erkrankung stehen, kann bezweifelt werden, da PAI – 1 ein „Akut – Phase – Protein“ darstellt

und damit eher die akute Krankheit als solche repräsentiert (157). Dass aber erhöhte PAI 1 – Spiegel bei Überlebenden eines AMI mit einem erhöhten Reinfarktrisiko korreliert sind (Übersicht bei 83), steht ausser Frage.

Sofort nach Bolusgabe liess sich für 1,5 h keine PAI – Aktivität im Plasma unserer Patienten mehr nachweisen. Der daran anschliessende Wiederanstieg in Aktivitätsbereiche, die die Vorwerte bei weitem übertrafen (s. Abbildungen 16 - 19), wurde in der GRECO I (122) und in geringerem Ausmass auch in anderen Studien beobachtet (96) und könnte wenigstens zum Teil durch endotheliale Neusynthese im Sinne eines Reboundphänomens bedingt sein (Signifikanzen s. Tabellen im Anhang). Darüber hinaus könnte r – PA, wie auch bei Alteplase beobachtet, durch Stimulation der PAI 1 – Freisetzung aus Thrombozyten und Endothelzellen selbst zum rasanten und ausgeprägten Wiederanstieg der PAI 1 – Aktivität beitragen (12). Diese letzte Erkenntnis könnte das rasche Rebound – Phänomen mit PAI – 1 – Maximalaktivitäten nach 4 – 24 h erklären, das durch alleinige Neusynthese in dieser kurzen Zeit nicht erklärbar ist. Der Verlauf der PAI – 1 - Aktivität korrelierte negativ mit den r – PA – Aktivitätsspiegeln und zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen A, B und C. Zum Zeitpunkt 2 h nach Gabe des ersten Bolus wurde in der Gruppe B ein deutlich niedrigerer medianer PAI 1 – Wert gemessen als in den Gruppen A und C. Hier zeigte sich jedoch aufgrund der zu diesem Zeitpunkt breiten Streuung der Aktivitätswerte in den Gruppen A und C (Streubreite: 29,3 aU/ml und 22,1 aU/ml gegenüber 8,3 aU/ml in der Gruppe B) kein statistisch signifikanter Unterschied. Die PAI – 1 – Verläufe, die bei Normalpersonen ausgeprägte interindividuelle und tageszeitliche Schwankungen aufweisen (51, 79, 166), zeigten – trotz der aus klinischen Gründen nicht immer zur gleichen Tageszeit erfolgten Blutabnahme bei den einzelnen Patienten – mit geringen Schwankungsbreiten bei allen Patienten die gleichen prinzipiellen Eigenschaften: Von leicht erhöhten Ausgangswerten erfolgte ein primärer Abfall „auf Null“, anschliessend ein ausgeprägtes Rebound – Phänomen mit Spitzenwerten, die in der Gruppe A nach vier Stunden mit 183 % des Ausgangswerts (AW), in der Gruppe B nach 24 h mit 179 % des AW und in der Gruppe C nach 24 h mit 109 % des AW erreicht waren und die Rückkehr in den Ausgangsbereich. Dies spricht für ein allgemein gültiges Verlaufsmuster der PAI – 1 – Aktivität bei r – PA – Lyse,

das durch die o. g. Störgrössen bei den einzelnen Patienten nur geringgradig variiert wurde.

4.5. Wirksamkeit und Sicherheit

4.5.1. Patency / Mortalität

Die Bolusthrombolyse mit Reteplase wurde sowohl in der Einzelbolus - als auch in den Doppelbolusgruppen von allen Patienten gut vertragen. Es kam zu keinen allergischen oder anderen unerwarteten Komplikationen. Grössere Blutungsereignisse wurden nicht beobachtet. Ob dies zumindest teilweise mit den spezifischen Eigenschaften von Reteplase, zusammenhängt, ist rein hypothetisch und bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenso ist in diesem Zusammenhang unklar, ob Reteplase im Vergleich zu Alteplase hinsichtlich der unerwünschten Lyse von älteren Thromben ein geringeres Risikopotential besitzt (112).

Unsere Studie war zu klein, um verlässliche Angaben über klinische Endpunkte zu machen, aber trotzdem ist erwähnenswert, dass die Patencyraten in den Gruppen A und B entgegen unserer Erwartungen deutlicher niedriger waren als in anderen Studien (3, 70, 126, 157, 174). In der Dosisfindungsstudie GRECO I (122, 126) betrug die 90 min – Patency mit einem 15 MU – Einzelbolus Reteplase 76 % und erreichte somit fast die Ergebnisse der zeitaufwendigeren Standard – Lysetherapie mit so genanntem „frontloaded“ – rt – PA (100 mg rt – PA über 90 min). Die GRECO II – Pilotstudie (163) konnte mit einem an 52 Patienten erstmals angewendeten Doppelbolusregime mit 10 + 5 MU eine Patency von 78 % aufzeigen, wobei die Reokklusionsrate im Vergleich zur Vorgängerstudie nicht gesenkt werden konnte. Noch während der Durchführung von GRECO II wurde auf Grund von Ergebnissen aus Tierstudien die internationale Angiographie – Studie RAPID I (157) an 606 Patienten begonnen. Hauptprüfziel war der Vergleich der 90 min – Patency nach Gabe von verschiedenen Reteplasedosen (15 MU – Einzelbolus oder 10 + 5 bzw. 10 + 10 MU Doppelbolus) gegenüber 100 mg rt – PA über drei Stunden. Nach 10 + 5 MU fand sich zwar eine zu GRECO II identische 60 min – Patency von 72 %, jedoch kam es trotz unveränderter antithrombotischer Begleitmedikation verstärkt zu sehr frühen Reokklusionen, die einen Abfall der

Patency auf 66,7 % nach 90 min bedingten. Im Gegensatz dazu konnte mittels eines 10 + 10 MU – Doppelbolusregimes eine 90 min –Patency (TIMI 2/3) von 85, 2 % erreicht werden. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag jedoch lediglich zwischen der 10 + 5 MU – und der rt – PA - Gruppe (90 min – Patency: 77,2 %) vor. Der Anteil an komplett offenen Infarktgefässen mit TIMI – Grad 3 – Fluss zum Zeitpunkt 90 min betrug nach Gabe von 10 + 10 MU mit 62,7 % signifikant mehr als nach rt – PA mit 49 % (p = 0.019). Der Vergleich mit rt – PA nach dem „frontloaded“ - Schema wurde in der RAPID II – Studie (13) bis Oktober 1994 an 324 Patienten ohne oberes Alterslimit und bis zu 12 h Zeitdauer seit Infarktbeginn durchgeführt. Das Konzept mit 10 + 10 MU Reteplase zeigte einen deutlichen Vorteil gegenüber einer gewichtsadaptierten Dosis von rt – PA über 90 min. Während unter rt – PA - Lyse eine Patencyrate von 73,3% nach 90 min erzielt wurde, konnte mit Reteplase eine Patency – Rate von 83,4 % erreicht werden. Der Anteil an komplett offenen Gefässen (TIMI 3) war unter Reteplase ebenfalls höher mit 59,9 versus 45,2 %. Dass dieses neue Therapiekonzept sich in der Studie dem „frontloaded“ – Schema überlegen zeigte, sollte im Anbetracht der geringen Patientenzahl nicht überbewertet werden, zumal das schlechtere Resultat für rt – PA in RAPID II im Vergleich zu GUSTO I (59) sicherlich auch durch die etwas ungünstigere Patientenselektion (Patienten mit längerer Infarktdauer) bedingt war. Schließt man in RAPID II nämlich diejenigen Patienten aus, die mit einer Infarktdauer länger als sechs Stunden rekrutiert wurden, nähert sich die 90 min – Patency für rt – PA mit 77, 2 % in RAPID II derjenigen in GUSTO I mit 81 % an. Im Jahre 1997 erschien die grosse GUSTO III – Studie (60), in welcher 10 + 10 MU r – PA und frontloaded t – PA bei der Therapie des AMI miteinander verglichen wurden. Hier zeigte sich die r – PA – Lyse der mit t – PA während der Follow – up – Phase bezüglich der Mortalitätsrate nicht überlegen. Auffallend waren im Vergleich zu früheren Studien die höheren Mortalitätsraten in beiden Gruppen, die wahrscheinlich in dieser Studie durch Rekrutierung einer höheren Anzahl von Risikopatienten bedingt waren.

Unsere Ergebnisse könnten auf Grund der geringen Grösse der Studiengruppen auch zufallsbedingt sein. Folgender Faktor könnte unter anderem eine Rolle gespielt haben, welcher die niedrigen Patencyraten in den Gruppen A und B (die Gruppen mit der Doppelbolus – Lyse) erklären könnte: Der Zeitintervall bis zur Behandlung war in der Gruppe B (228 min), der Gruppe mit der niedrigsten

Patencyrate) deutlich länger als in den Gruppen A (163 min) und C (190 min) und in anderen Studien, z. B. RAPID II (150 min) (13). Dass ein kurzes Zeitintervall von Symptom – bis Lysebeginn einen starken Prädiktor für den Thrombolyseerfolg darstellt, ist allgemein akzeptiert (14).

4.5.2. Die Früh – bzw. Spätlyse bei AMI

Dass für eine erfolgreiche thrombolytische Therapie jegliche unnötige Verzögerung zwischen Symptom – und Lyse – Beginn vermieden werden sollte, ist eine allgemein akzeptierte Tatsache (154). In unserer Studie betrugen die Zeitspannen bis zum ersten Bolus (ab Symptombeginn) in den Gruppen A (10 + 5 MU), B (10 + 10 MU) und C (15 MU) 163, 228 und 190 min (Medianwerte) und liegen z. B. im Vergleich mit der RAPID II – Studie (150 min.) (13) zumindest für Gruppe B deutlich höher. Die Verlegung der Lysetherapie in die Prähospitalphase müsste auf Grund der Zeitersparnis zu noch besseren Patencyraten führen. Da besonders Patienten mit kurzer Symptomdauer (max. 3 – 4 h) von einer sofortigen Fibrinolyse profitieren, gewinnt die Tatsache eine besondere Bedeutung, dass etwa zwei Drittel aller Infarktpatienten im Rettungsdienst bereits innerhalb der ersten beiden Stunden behandelt werden können (7). Die initial dazu durchgeführten Studien erbrachten aber nicht die erwarteten Ergebnisse. Die diesbezüglich erste randomisierte, doppelblind durchgeführte Untersuchung mit Urokinase ($2 * 10^6$ Einheiten) ergab trotz eines Zeitgewinns von 45 Minuten keine bedeutsame Verkleinerung des Infarktausmasses, jedoch in Anbetracht der geringen Patientenzahl (n = 78) sind die Ergebnisse kritisch zu bewerten (115). Auch Roth et al. (143) (n = 118) konnten mit einer Zeitersparnis von 44 Minuten keinen signifikanten Vorteil der Frühlyse demonstrieren. Jedoch könnte die Ursache für das schlechte Abschneiden der Frühlyse auch an dem ungünstigen Lyseregime in dieser Studie gelegen haben, da hier 120 mg rt – PA über sechs Stunden gegeben wurde. Neuere Metaanalysen zeigen jedoch übereinstimmend, dass die prähospitale Thrombolyse, sofern sie innerhalb von sechs Stunden nach Symptombeginn durchgeführt wird, einen eindeutigen Vorteil gegenüber der erst intrahospital eingeleiteten Lyse besitzt (7). Dabei kam es im Vergleich zwischen der prä – und der intrahospitalen Lyse zu einer signifikanten Senkung der Sterblichkeit von 10,7 % auf 8,9 % (p = 0.01). Die **F**ibrinolytic **T**herapy **T**rialists`

(FTT) Collaborative Group (43) zeigte in ihrer Übersicht, dass die thrombolytische Therapie die Mortalität bei AMI noch um 14 % reduzierte, wenn die Patienten zwischen sieben und zwölf Stunden nach Symptombeginn behandelt wurden. Der Rückgang der Mortalität (5 %) war bei insgesamt 9000 Patienten, die erst nach zwölf Stunden lysiert wurden, nicht signifikant. Die LATE – Studie (86) (n = 5711) ergab eine signifikante Reduktion der Mortalität, wenn Alteplase (100 mg über 3 h) spätestens zwölf Stunden nach Infarkteintritt verabreicht wurde mit einer Mortalität nach 35 Tagen von 8,90 % (Placebo: 11,97%, p = 0.0229), wohingegen die Applikation in einem Zeitintervall von 12 und 24 h nach Symptombeginn mit einem nicht mehr signifikanten Überlebensvorteil zu Gunsten der fibrinolytischen Therapie verbunden war (8,7 % vs. 9,2 %). Die im gleichen Jahr veröffentliche EMERAS – Multicenterstudie (41) schloss insgesamt 4534 AMI – Patienten ein, die 24 h (oder später) nach Symptombeginn in der Klinik aufgenommen wurden. Die Patienten wurden entweder in die Verumgruppe randomisiert, die intravenös 1,5 MU Streptokinase bekam oder in die Placebogruppe. Es zeigte sich auch hier ein positiver, jedoch nicht statistisch signifikanter Trend zugunsten der fibrinolytischen Therapie (Mortalität während des Krankenhausaufenthalts 11,9 % vs. 12,4 %). Als Ursachen für die günstigen Auswirkungen der Spätlyse werden positive Effekte auf das ventrikuläre Remodeling und die Reduktion des linksventrikulären enddiastolischen Volumens diskutiert (15).

4.5.3. t – PA – Mutanten und andere Plasminogenaktivatoren

Reteplase stellt den ersten erfolgreichen Vertreter der so genannten „Drittgenerations – Thrombolytika“ dar. Es befinden sich aber auch zahlreiche andere gentechnisch hergestellte Varianten des t – PA – Moleküls in der klinischen Erprobung (s. auch Tabelle 4). Erfolgreich klinisch geprüft ist auch Tenecteplase (TNK – t – PA; siehe oben!) mit verlängerter Halbwertszeit, ausgeprägter Fibrinselektivität und verminderter Inhibition durch PAI 1. Die TIMI 10A – Studie (n = 114) zeigte nach einem 30 (n = 41) bzw. 50 mg (n = 22) Einzel - Bolus dieser Substanz eine 90min – Patency (TIMI 2/3) von 88 bzw. 86 % und eine TIMI 3 – Patency von 59 bzw. 64 % (15). Die Nachfolgestudie TIMI 10B an 886 Patienten ergab nach 40 mg TNK – t - PA bzw. 100 mg frontloaded – rt – PA eine identische 90 min (TIMI 3) - Patency von jeweils 63 % (18). Die Gabe der 50

mg – Dosis Tenecteplase musste auf Grund von gesteigerten intracraniellen Blutungen gestoppt und auf 40 mg reduziert werden (1,9 % für 40 mg und 3,8 % für 50 mg). Nach 30 mg TNK – t – PA war im Vergleich zu rt - PA die Patency mit 54,3 % signifikant niedriger (p = 0.035). In den Phase III – Studien ASSENT – 1 (183) und – 2 (7) erwies sich die Einzelbolusgabe von Tenecteplase genauso effektiv wie die Applikation von „frontloaded“ t – PA (ASSENT – 2, n = 16949: Primärer Endpunkt Gesamtmortalität nach 30 Tagen: 6,18 % für TNK – t – PA und 6,15 % für Alteplase). Die Rate der intracraniellen Blutungen waren in beiden Gruppen fast identisch (0,93 % vs. 0,94 %).

Ähnliche klinische Ergebnisse erzielte auch Lanoteplase, auch n (novel) – PA genannt (siehe ebenfalls oben!): Ein Einzelbolus von 120 IU/kg KG bewirkte in der InTIME - I - Studie eine TIMI 3 – Patency von 57 % gegenüber 46 % für rt – PA (200).

In der grossen Nachfolgestudie InTime – II (71) wurde an 15078 Patienten die Gabe eines Einzelbolus Lanoteplase (120 KU/kg KG) mit einem akzelerierten (100 mg über 90 min.) Alteplase - Regime bei Patienten mit AMI verglichen. Primärer Endpunkt war die Gesamtmortalität nach 30 Tagen. Der klinische Benefit unterschied sich nicht zwischen den Thrombolytika (Gesamtmortalität nach 30 Tagen: 6,61 % nach Alteplase und 6,75 % nach Lanoteplase), so dass n – PA hinsichtlich effektiver Thrombolyse und Risikoprofil mit Alteplase vergleichbar ist. Jedoch traten in der Lanoteplase – Gruppe gehäuft hämorrhagische Schlaganfälle auf (1,12 % vs. 0,64 %, p = 0.004). Die Mortalitätsraten nach sechs Monaten betrugen in der Alteplase – Gruppe 8,8 % und 8,7 % in der Lanoteplase – Gruppe. Das Regime der Einzelbolusgabe könnte das Zeitintervall bis Lysebeginn verkürzen und stellt insbesondere in der Notfallaufnahme oder ausserhalb des Krankenhauses eine einfacher durchzuführende Therapieform dar. Eine in Japan entwickelte t – PA – Mutante (E6010) mit Austausch der AS 84 (Cystein) gegen Serin und dadurch verlängerter Halbwertszeit von >23 min zeigte in einer Einmalbolus – Dosierung von 0,16 bzw. 0,33 mg/kg KG an je 50 AMI – Patienten eine 60 min – Reperfusionsrate (TIMI 2/3) von 73 bzw. 84 % (75).

Tabelle 4: Vergleich der verschiedenen Plasminogenaktivatoren

Thrombolytika	Reteplase (r – PA)	Tenecteplase (TNK – t – PA)	Lanoteplase (n – PA)
MW (kD)	39	70	53.5
Fibrinspezifität	vorhanden	stark ausgeprägt	vorhanden
HWZ (min.)	Ca. 21	18 - 24	30 - 45
Dosierung	10 + 10 MU (Zeitabstand zwischen den Boli 30 min.)	Einzelbolus 30 - 50 mg	Einzelbolus (120 kU/kg)
Patency nach 90 min. (TIMI 3) (%)	60 – 63	63	57
Studien	**GUSTO III (60), n = 15059:** 10 + 10 MU r – PA vs. „frontloaded“ t – PA (100 mg über 90 min.), Endpunkt: Mortalität nach 30 Tagen: Identische Mortalitätsraten in beiden Gruppen **RAPID I (157), n = 606:** r – PA (15, 10 + 5 oder 10 + 10 MU) vs. 100 mg t – PA über 3 h, Endpunkt: Patency (TIMI 2/3) nach 90 min.: 10 +10 MU: 85 %, t – PA: 78 %, p = 0.084. Niedrigere Patencyraten für 15 und 10 + 5 MU. **RAPID II (13), n = 324**: 10 + 10 MU r – PA vs. „frontloaded“ t – PA (= Neuhaus – Schema, 100 mg rt – PA über 90 min.) Endpunkt: Patency (TIMI 2/3 u. TIMI 3) nach 90 min.: TIMI 2/3: 83,4 % vs. 73,3 %, p = 0.03. TIMI 3: 59,9 % vs. 45,2 %, p = 0.01.	**TIMI 10 A – Phase I – Studie (17), n = 113:** Einzelboli Tenecteplase (5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 mg) bei AMI, Endpunkt: TIMI 3 – Patencyrate nach 90 min.: Verglichen mit niedrigeren Dosen signifikant (p = 0.032) höhere Patencyraten für 30 – 50 mg, für 30 mg TNK – t – PA 59 % und 50 mg 64%. **TIMI 10 B – Phase II – Studie (18), n = 886:** Einzelbolus (30, 50 mg) Tenecteplase vs. „frontloaded“ Alteplase Endpunkt: Patency (TIMI 3) nach 90 min.: Wegen vermehrten intracraniellen Blutungen Reduktion der 50 mg - Dosis auf 40 mg, 62,8 % für 40 mg Tenecteplase u. 62,7 % für t – PA, signifikant niedrigere Patency für 30 mg Tenecteplase mit 54,3 % (p = 0.035). **ASSENT II (7), n = 16949:** Einzelbolus Tenecteplase (30 – 50 mg, gewichtsadaptiert) vs. „frontloaded“ t – PA, Endpunkt: Gesamtmortalität nach 30 Tagen: 6,18 % vs. 6,15 %	**InTIME – 1 – Dosisfindungsstudie (201), n = 31:** 15, 30, 60 oder 120 kU/kg Lanoteplase vs. „frontloaded“ Alteplase, Endpunkt: Patency (TIMI 3) nach 90 min.: 57,1 % vs. 46,4 %. **InTIME – 2 – Studie (71), n = 15078:** 120 kU/kg Lanoteplase vs. „frontloaded“ Alteplase (100 mg rt – PA über 90 min.) Endpunkt: Gesamtmortalität nach 30 Tagen: 6,8 % vs. 6,6 %, unter Lanoteplase signifikant vermehrt hämorrhagische Schlaganfälle (1,12 % vs. 0,64 %, p = 0.004).

In vivo - Studien (87, 198) konnten hinsichtlich einer effektiven Fibrinolyse viel - versprechende Ergebnisse mit verkapselten Fibrinolytika zeigen, deren lytische Komponenten in mehrere Mikrokapsel - Polymere eingebettet worden sind. Die Verkapselung hat dabei den Vorteil, dass sie das Medikament wie ein Schutzschild vor Inaktivierung schützt und somit die Halbwertszeit des

Fibrinolytikums zu verlängern vermag. Dies würde auch bedeuten, dass eine niedrigere Dosis des Thrombolytikums verwendet werden könnte, um gleichwertige Effekte zu erzielen wie ohne die Verkapselungstechnik. Anfängliche Versuche, die Verkapselung mit Liposomenfraktionen durchzuführen, schlugen fehl, weil die Fettsäureanteile der Lipidmoleküle nach mehreren Tagen oxidiert wurden, was zur Folge hatte, dass die lytischen Komponenten durch die Liposomen zerstört wurden. Bessere Erfolge erzielte man mit wasserlöslichen Polymeren, die eine kontrollierte Freisetzung des Thrombolytikums ermöglichen. Jedoch kann die Freisetzung des Fibrinolytikums Wochen bis Monaten dauern, was für die thrombolytische Therapie in der Akutsituation undenkbar wäre. Im Karotisarterien – Thrombosemodell am Kaninchen zeigte Streptokinase mit Polyethylenglykol (PEG) gegenüber einer üblichen Streptokinase – Lyse signifikant geringere Reperfusionszeiten (87, 198). Auch konnte lichtmikroskopisch eine bessere Penetration des „PEG-ylierten“ Fibrinolytikums in den Thrombus beobachtet werden. Um aber klinisch relevante Folgerungen ableiten zu können, sind in der Zukunft weitere Studien notwendig, die die neue Therapiestrategie mit den jetzt zur Verfügung stehenden Thrombolytika, zum Beispiel in einer Pilotstudie mit angiographischen Endpunkten (TIMI – Flussrate), vergleichen.

4.6. Die perkutane koronare Angioplastie (PTCA) mit oder ohne STENT – Implantation bzw. die additive Gabe von Glykoprotein – IIb/IIIa – Inhibitoren im Vergleich zur medikamentösen Thrombolyse bei AMI

Neben der einfach zu handhabenden und ebenso breit verfügbaren Thrombolyse besteht als weitere effektive und sichere Therapiemöglichkeit die perkutane trans - luminale koronare Angioplastie (PTCA). Seit den Untersuchungen von Hartzler et al. (64) im Jahre 1983 an Patienten mit Myokardinfarkt ist bekannt, dass eine thrombotisch verschlossene Koronararterie mit gutem Erfolg mechanisch rekanalisiert und die zugrunde liegende arteriosklerotische Stenose dilatiert werden kann. Im Jahre 1993 wurde über die ersten 1000 konsekutiven Patienten berichtet (130). Die Klinikletalität war mit 8 % niedrig. Sie betrug bei Patienten unter 70 Jahren nur 6 %, bei älteren Patienten 13%. Mehrere kleinere Studien (54, 129, 156, 179, 180, 196, 206, 207) haben die Thrombolyse und PTCA bei der

Therapie des AMI miteinander verglichen beziehungsweise die Kombination beider Therapieformen überprüft. Zusammenfassend zeichneten sich bessere Kurzzeitergebnisse für die PTCA ab, jedoch waren die untersuchten Patientenpopulationen zu klein und es fehlen Langzeitergebnisse, um letztendlich Schlussfolgerungen abzuleiten.

In der PAMI - Studie (***P**rimary **A**ngioplasty in **M**yocardial **I**nfarction*) (53) wurden 395 Patienten entweder in die PTCA (n = 195) – oder in die Lysegruppe (100 mg rt – PA über drei Stunden, n = 200) randomisiert. Die Wiedereröffnungsrate bei den mittels PTCA behandelten Patienten betrug 97,1%. Die Klinikletalität (2,6% versus 6,5%) war in der PTCA - Gruppe deutlich niedriger als in der Lyse - Gruppe. Der Vorteil war noch größer bei der Behandlung von Risikopatienten (2,0% versus 10,4%) mit einem Vorderwandinfarkt, einer Herzfrequenz > 100/Minute oder einem Lebensalter > 70 Jahren. Apoplexe traten in der PTCA - Gruppe nicht auf, wohl aber in der Lyse -Gruppe mit 2%. Die klinischen Endpunkte Reinfarkt und Tod waren in der PTCA - Gruppe signifikant seltener als in der Lyse - Gruppe (5,1% versus 12,0%). Gleiches gilt für die Ergebnisse nach sechs Monaten (8,5% versus 16,8% für Reinfarkt und Tod). Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion sechs Wochen nach Infarkt war mit jeweils 53% nicht unterschiedlich. Bei dieser Studie muss jedoch berücksichtigt werden, dass die PTCA - Technik mit einem Lyseschema verglichen wurde (100 mg rt - PA über 3 h), welches nicht das optimale Lyseregime darstellt.

In der grösseren Studie von Every et al. (42) wurden über 3000 Patienten mit gesichertem AMI entweder mit einer thrombolytischen Therapie (Alteplase, Streptokinase oder Prourokinase) oder primär mit der PTCA behandelt. Das Er - gebnis fiel für die PTCA - Gruppe enttäuschend aus, da während des Krankenhausaufenthaltes (5,6 % vs. 5,5 %, p = 0,93) und der Langzeitbeobachtung kein signifikanter Rückgang in der Mortalitätsrate verzeichnet werden konnte. Eine der Ursachen, warum die Thrombolyse in der Studie von Every besser abschneiden konnte als zum Beispiel in der PAMI - Studie (53) könnte die schnellere Applikation des Fibrinolytikums (Zeit bis zur Applikation: 198 Minuten) gewesen sein (PAMI: 230 Minuten). Des Weiteren war eine gegenüber der PAMI – Studie niedrigere PTCA – Erfolgsrate (98 % vs. 89 %) auffallend (= geringere Erfahrung in der PTCA – Technik?).

Schömig et al. (146) verglichen die koronare Stentimplantation und Abciximab mit frontloaded t - PA an insgesamt 140 Patienten mit AMI (Stent + Abciximab: n = 71, Alteplase n = 69). Die Kombinationstherapie bestehend aus Stentbehandlung und Abciximabgabe resultierte nach sechs Monaten in einer kleineren Infarktgrösse als bei der Fibrinolyse mit Alteplase (14,3 % vs. 19,4 %, p = 0.002). Die kumulative Inzidenz von Tod, Reinfarkt und Schlaganfall war in der Stent – Gruppe ebenso signifikant niedriger als in der Alteplase – Gruppe (8,5 % vs. 23,2 %, p = 0.02). Die Autoren kamen somit zu der Schlussfolgerung, dass eine koronare Stent – Behandlung mit Abciximabgabe bei Patienten mit AMI zu einer geringeren Infarktgrösse und Verringerung der kumulativen Inzidenzrate von Tod, Reinfarkt und Schlaganfall führt als die Fibrinolyse mit rt – PA. Weil Pilotstudien (71, 171) günstige Effekte einer Kombination aus niedrigdosiertem Plasminogenaktivator und Glykoprotein - IIb/IIIa - Antagonisten auf die myokardiale Reperfusion aufgezeigt hatten, wurde die grosse GUSTO - 5 - Studie (61) initiiert, die diesen Zusammenhang untersuchen sollte. Insgesamt wurden 16 588 Patienten in die Standarddosis - Reteplase - Gruppe (10 + 10 MU, Zeitabstand zwischen den Boli 30 min.) oder in die Niedrigdosis – Gruppe Reteplase (5 + 5 MU, Zeitabstand zwischen den Boli 30 Minuten) plus Abciximab (0.25mg/kg KG als Bolus und dann 0.125 µg/kg KG pro Minute für 12 h)) randomisiert. Bezüglich der Mortalität konnte keine Überlegenheit der Kombinationstherapie über der alleinigen Lysetherapie mit 10 + 10 MU Reteplase nach 30 Tagen nachgewiesen werden, jedoch traten mehr nicht - intracranielle Blutungen in der Kombinationsgruppe auf, so dass weitere Analysen inklusive eines Follow - ups über mindestens ein Jahr notwendig sind, um diejenige Patienten ausfindig zu machen, die von der Kombinationsbehandlung profitieren. Im Jahr 2004 erschien die GRACIA – 1 – Studie (50), in der an 500 Patienten mit AMI die alleinige t – PA – Lyse mit der Kombinationsbehandlung bestehend aus initialer Lyse mit „frontloaded“ t – PA und nachfolgender invasiver Diagnostik (ggf. mit PTCA und Stent) innerhalb von 24 h verglichen wurde. In der konservativen Gruppe wurde erst nach einem Ischämienachweis katheterisiert. Primärer Endpunkt der Studie war die Kombination aus Tod, Reinfarkt oder Revaskularisierung innerhalb der folgenden zwölf Monate. 80 % der Patienten in der früh – invasiven Gruppe wurden mit einem Stent versorgt, 6 % operativ revaskularisiert. In der konservativen Gruppe wurden vor Entlassung 20 % der Patienten interventionell behandelt. Nach einem

Jahr kam es bei den Patienten, die die Kombinationsbehandlung aus Fibrinolyse und PCI (= „percutaneous coronary intervention“) bekommen hatten, in 9 % zum primären Endpunkt, in der konservativen Gruppe in 21 % (p = 0.0008). Dieser positive Effekt war in der früh – invasiven Gruppe umso grösser, je später die PCI durchgeführt wurde (mögliche Gründe: weniger katheterinduzierte Blutungen, bessere logistische Voraussetzungen z. Bsp. PTCA zur Tageszeit) (190). Die Hospitalisierungsdauer war in der früh – invasiven Gruppe kürzer. Die Rate schwerer Blutungen oder Gefässkomplikationen war nicht erhöht. Patienten der konservativen Gruppe mussten wegen Ischämien häufiger rehospitalisiert werden. Die Ergebnisse der GRACIA – 1 - Studie stehen in Kontrast zu denjenigen früherer randomisierter Studien (167, 178), in denen unter der Kombinationsbehandlung aus Thrombolyse und PCI kein Benefit für die Patienten erhoben wurde. Diese Resultate müssen aber insofern relativiert werden, als dass damals die Stent – Anwendung und die neueren Thrombozytenaggregationshemmer, wie zum Bsp. die Glykoprotein - IIb/IIIa – Rezeptorenblocker, noch nicht zur Verfügung standen. Die Studienleiter von GRACIA zogen somit die Schlussfolgerung, dass die koronare Angioplastie in den ersten 24 h nach der Fibrinolyse mit t – PA im Vergleich zur alleinigen t – PA – Lyse bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen in der Ära moderner Antikoagulantien und Materialien für Stents Vorteile bringen kann. Um Aussagen über die Langzeitsterblichkeit zu machen, sind aber Studien mit höheren Fallzahlen notwendig.

Unter Berücksichtigung der Studienlage scheint die Angioplastie mit der Stentimplantation die erfolgreichste Reperfusionsmethode zu sein. Der Vorteil der PCI ist im Vergleich zur Fibrinolyse umso grösser, je erfahrener die Katheterzentren sind (184). Die Erfolgsrate der primären PCI durch den routinemässigen Gebrauch von Stents und Glykoprotein – IIb/IIIa – Antagonisten ist in den letzten Jahren auf mehr als 90 % gestiegen, ohne dass dadurch vermehrt zerebrale Blutungen in Kauf zu nehmen sind, wohingegen bei der Fibrinolyse mit intrazerebralen Blutungen von ca. 1 % Häufigkeit zu rechnen ist und trotz aller Verbesserungen der Fibrinolytika und der Begleittherapie die Reperfusionsrate bei etwa 70 % eine nicht überwindbare Schwelle zu erreichen scheint (64). Prinzipiell ermutigende Hinweise für das Grundkonzept der „facilitated PCI“, d. h. einer der Intervention vorausgehenden Lyse, ergaben sich in

einigen Studien (5**,** 50). Die Studien zeigten überraschend hohe frühe Offenheitsraten und auch sehr gute Langzeitergebnisse. Mehrere randomisierte Studien haben aber auch ergeben, dass die Fibrinolyse bei Patienten mit AMI mit kurzer Symptomdauer (< 3h) der PTCA ebenbürtig zu sein scheint, bei einer Symptomdauer unter 2 h scheint die Thrombolyse sogar geringgradig effektiver zu sein, so dass AMI – Patienten mit kurzer Symptomdauer in Krankenhäusern, die kein Katheterlabor besitzen, einer Fibrinolyse zugeführt werden sollten. Eine Indikation für die PTCA ergäbe sich erst dann, wenn die Fibrinolyse kontraindiziert oder nicht erfolgreich ist, sich ein kardiogener Schock entwickelt, die Symptomdauer des AMI länger als drei Stunden beträgt oder wenn die Transportzeit bis zur nächst geeigneten Klinik mit einer Kathetereinrichtung nicht länger als 60 Minuten dauern würde (75). Zur Akut – PTCA ist kritisch anzumerken, dass die logistischen Probleme gross sind. Ein erfahrenes Katheterteam muss über 24 h an sieben Tagen in der Woche verfügbar und innerhalb von 30 bis 60 Minuten einsatzbereit sein. Weiterhin muss die Intensivstation aufnahmebereit sein. Es ist bekannt, dass sich die Situation für den Patienten weiter verschlechtern kann, wenn die Rekanalisation nicht gelingt. Eine unmittelbare Operationsbereitschaft auch nachts ist zwingend erforderlich, um symptomatische Patienten mit zum Beispiel katheterinduzierter, nicht angehbarer intrakoronarer Dissektion, schwerer koronarer Zwei – oder Drei – Gefässerkrankung oder Hauptstammstenose zu versorgen.

4.7. Schlussfolgerung

Gegenüber rt – PA zeigt die untersuchte neue t – PA - Mutante Reteplase (r-PA) eine auf das knapp Vierfache verlängerte HWZ durch eine entsprechende Clearancereduktion. Damit wird die Bolusapplikation beim akuten Myokardinfarkt möglich. Durch die 10 + 5 MU – bzw. 10 + 10 MU - Doppelbolusstrategie wurde im Vergleich zum 15 MU - Schema die Antigenkonzentration 15 min. bzw. 45 min. signifikant länger über der „kritischen“ Grenze von 1000 ng/ml, welche für einen klinischen Lyseerfolg als bedeutsam erachtet wird, aufrechterhalten, so dass unter dem 10 + 10 MU – Regime die längste Zeitspanne an thrombolytisch wirksamer Antigenkonzentration beobachtet werden konnte. Dass Reteplase auf Grund der deutlich verlängerten Plasmahalbwertszeit in einer Bolusform klinisch effektiv

appliziert werden kann, konnte mittels GRECO I – III auch im Einklang mit grösseren klinischen Studien gezeigt werden. Nachfolgende grössere Studien haben gezeigt, dass das Doppelbolusregime mit 10 + 10 MU Reteplase klinisch die effektivste Applikationsform darstellt und in Bezug auf Patency und Mortalitätssenkung eine vergleichbare thrombolytische Potenz besitzt wie Alteplase nach dem „frontloaded“ – Schema (100 mg Alteplase über 90 min).

Letztlich wird die Zukunft zeigen, wo die medikamentöse Thrombolyse mit den modernen Drittgenerations - Fibrinolytika neben der perkutanen koronaren Intervention wie PTCA mit oder ohne Stent - Implantation ihren Platz in der Therapie des akuten Myokardinfarktes findet.

5. ZUSAMMENFASSUNG

I. Vorbemerkung

Das neue Thrombolytikum Reteplase (r – PA), eine unglycosylierte, in Escherichia coli exprimierte, rekombinante Deletionsmutante des Gewebeplasminogenaktivators (t – PA) besitzt nur die für Fibrinspezifität bzw. Plasminogenaktivierung notwendigen Kringel 2 (K_2) - bzw. Protease (P) – Domänen von t – PA (K_2P – Deletionsmutante).

II. Ulmer Monocenterstudie MF 4292

Die Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit war die Ermittlung der Pharmakokinetik und die Bestimmung der Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI 1) – Werte unter den verschiedenen r – PA – Bolus - Dosisregimes 10 + 5 MU (Gruppe A), 15 MU (Gruppe C) sowie unter dem neuen Regime 10 + 10 MU (Gruppe B). Anschliessend erfolgte der Vergleich dieser Daten mit unseren Pilotstudien GRECO 1 + 2 und der internationalen Literatur.

Klinische Ergebnisse: Von den 24 eingeschlossenen Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt wurden sieben mit einem 10 + 5 MU (Mega - Units) – Doppelbolus, acht mit einem Doppelbolus 10 + 10 MU und neun mit einem 15 MU - Einzelbolus r – PA behandelt. Eine 90 min. – Patency (TIMI 2, 3) wurde in der 10 + 5 MU – Gruppe bei fünf Patienten von sieben (71%), in der 10 + 10 MU – Gruppe bei vier von acht (50%) und in der 15 MU – Gruppe bei acht von neun (89%) Patienten angiographisch nachgewiesen. Todesfälle, intracranielle Blutungen, allergische Reaktionen nach Reteplase – Gabe oder transfusionspflichtige Blutungen wurden nicht beobachtet. Unsere Studie war zu klein, um verlässliche Angaben über klinische Endpunkte zu erlauben. Trotzdem fielen die niedrigen Patencyraten in den Doppelbolusgruppen auf. Auf Grund der geringen Fallzahl der Studie könnte dieser Unterschied rein zufällig sein. Andere Faktoren wie das längere Zeitintervall bis zum Therapiebeginn in der 10 + 10 MU – Gruppe könnten eine zusätzliche oder kausale Rolle gespielt haben.

Pharmakokinetische Ergebnisse: Serielle Blutabnahmen erfolgten vor der ersten Bolusgabe und in regelmässigen Abständen danach. Bei den r – PA – ELISA – Messungen (r – PA – Antigen (Ag), Medianwerte) ergaben sich in den Gruppen A, B und C eine initiale Halbwertszeit (HWZ) von 16,2, 16,8 und 21,2 min. und eine terminale HWZ von 5,4, 5,5 und 5 h, sowie eine Clearancerate (Cl)

von 151,5, 114,6 und 145,3 ml/min. Bei der medianen Aktivitätsbestimmung wurde die initiale HWZ mit 13,2, 12,6 und 15 min. und die terminale HWZ mit 1,65, 1,38 und 3,5 h berechnet. Die CI betrug 354, 275 und 415 ml/min. Darüber hinaus wurde PAI 1 in seiner Aktivität über den zeitlichen Verlauf gemessen: 30 min nach dem initialen Bolus fielen in allen Gruppen die PAI – Aktivitätswerte auf 0 ab, um dann nach vier Stunden auf normale oder leicht erhöhte Werte anzusteigen. In der Gruppe B (10 + 10 MU) wurde zum Zeitpunkt 2 h nach Gabe des ersten Bolus eine niedrigere mediane Aktivität gemessen als in den Gruppen A (10 + 5 MU) und C (15 MU), was dafür sprechen würde, dass durch den zweiten Bolus 10 MU mehr PAI - 1 verbraucht wurde als in den anderen Gruppen. Jedoch war dieser Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen wie zu den übrigen Zeitpunkten auf Grund der grossen Streubreite der Daten statistisch nicht signifikant. Eine klinische Bedeutung, z. B. in Hinblick auf ein Reokklusionsrisiko, kann hieraus nicht abgeleitet werden.

III. Gesamtbeurteilung

r – PA zeigt eine gegenüber rt – PA auf das knapp Vierfache verlängerte HWZ durch eine entsprechende Clearancereduktion. Damit wird die Bolusapplikation möglich. Durch die 10 + 5 MU – bzw. 10 + 10 MU - Doppelbolusstrategie wurde im Vergleich zum 15 MU - Schema die Antigenkonzentration 15 min. bzw. 45 min. signifikant länger über der „kritischen“ Grenze von 1000 ng/ml, welche für einen klinischen Lyseerfolg als bedeutsam erachtet wird, aufrechterhalten, so dass unter dem 10 + 10 MU – Regime die längste Zeitspanne an thrombolytisch wirksamer Antigenkonzentration beobachtet werden konnte. Dass Reteplase auf Grund der deutlich verlängerten Plasmahalbwertszeit in einer Bolusform klinisch effektiv appliziert werden kann, konnte mittels GRECO I – III auch im Einklang mit grösseren klinischen Studien gezeigt werden. Nachfolgende grössere Studien haben gezeigt, dass das Doppelbolusregime mit 10 + 10 MU Reteplase klinisch die effektivste Applikationsform darstellt und in Bezug auf Patency und Mortalitätssenkung eine vergleichbare thrombolytische Potenz besitzt wie Alteplase nach dem „frontloaded“ – Schema (100 mg Alteplase über 90 min).

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. AIMS Trial Study Group
   Effect of Intravenous APSAC on Mortality After Acute Myocardial Infarction: Preliminary Report of a Placebo – Controlled Clinical Trial
   Lancet 1: 545 – 549 (1988)

2. AIMS Trial Study Group
   Long – term effects of intravenous anistreplase in acute myocardial infarction: final report of the AIMS study – AIMS Trial Study Group
   Lancet 335: 427 – 431 (1990)

3. Anderson JL, Sorensen SG, Morenos FL, Hackworthy RA, Browne KF, Dale HAT, Leya F, Dangoisse V, Eckerson HW, Marder VJ, and the TEAM – 2 Study Investigators
   Multicenter Patency Trial of Intravenous Anistreplase Compared With Streptokinase in Acute Myocardial Infarction
   Circulation 83: 126 – 140 (1991)

4. Andreotti F, Davies GJ, Hackett DR, Khan MI, deBart ACW, Aber VR, Maser A, Kluft C
   Major Circadian Fluctuations in Fibrinolytic Factors and Possible Relevance to Time of Onset of Myocardial Infarction, Sudden Cardiac Death and Stroke
   Am J Cardiol 62: 635 – 637 (1988)

5. Arntz HR
   Vorsprung durch prähospitale Thrombolyse?
   Cardiovasc 6: 14 – 15 (2004)

6. Arntz HR, Zeymer U, Schwimmbeck P
   Thrombolyse bei ST – Hebungsinfarkt
   Anaesthesist 53**:** 445 – 452 (2004)

7. The (ASSENT – 2) Assessment of the Safety and Efficacy of a New Thrombolytic Investigators
   Single – bolus tenecteplase compared with front – loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT – 2 double blind randomised trial
   Lancet 354: 716 – 722 (1999)

8. Bachmann F, Kruithof EKO
   Tissue Plasminogen Activator: Chemical and Physiological Aspects
   Sem Thromb Hemostas 10: 6 – 17 (1984)

9. Bar FW, Meyer J, Vermeer F, Michels R, Charbonnier B, Haerten K, Spiecker M, Macaya C, Hanssen M, Heras M, Boland JP, Morice MC, Dunn FG, Uebis R, Hamm C, Ayzenberg O, Strupp G, Withagen AJ, Klein W, Windeler J, Hopkins G, Barth H, von Fisenn MJ
Comparison of saruplase and alteplase in acute myocardial infarction. SESAM Study Group. The Study in Europe with Saruplase and Alteplase in Myocardial Infarction
Am J Cardiol 79: 727 – 732 (1997)

10. Barron HV, Bowlby LJ, Breen T, Rogers WJ, Canto JG, Zhang Y, Tiefenbrunn AJ, Weaver D, for the National Registry of Myocardial Infarction 2 Investigators
Use of Reperfusion Therapy for Acute Myocardial Infarction in the United States – Data From the National Registry of Myocardial Infarction 2
Circulation 97: 1150 – 1156 (1998)

11. Becker RC, Corrao JM, Harrington R, Ball SP, Gore JM
Recombinant Tissue – type Plasminogen Activator: Current Concepts and Guidelines for Clinical Use in Acute Myocardial Infarction – Part I
Am Heart J 121: 220 – 244 (1991)

12. Becker RC, Harrington R
Recombinant Tissue – type Plasminogen Activator: Current Concepts and Guidelines for Clinical Use in Acute Myocardial Infarction – Part II
Am Heart J 121: 627 – 640 (1991)

13. Bode C, Smalling RW, Berg G, Burnett C, Lorch G, Kalbfleisch JM, Chernoff R, Christie LG, Feldman RL, Seals AA, Weaver Wd for the RAPID II – Studygroup
Randomized Comparison for Coronary Thrombolysis Achieved With Double – Bolus Reteplase (Recombinant Plasminogen Activator) and Front – Loaded, Accelerated Alteplase (Recombinant Tissue Plasminogen Activator) in Patients With Acute Myocardial Infarction
Circulation 94: 891 – 898 (1996)

14. Boersma E, Maas ACP, Deckers JW, Simoons MI
Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour
Lancet 348: 771 – 775 (1996)

15. Bonaduce D, Petretta M, Villari B, Breglio R, Conforti G, Montemurro MV, Lanzillo T, Morgano G
Effects of Late Administration of Tissue – Type Plasminogen Activator on Left Ventricular Remodeling and Function After Myocardial Infarction
Am Coll Cardiol 16: 1561 – 1568 (1990)

16. Braunwald E
The open artery theory is alive and well – again
N Engl J Med 329: 1650 – 1652 (1993)

17. Cannon CP, Cannon MD, Mc Gabe CH, Gibson M, Ghali M, Sequeira RF, McKendall GR, Breed J, Modi NB, Fox NL, Tracy RP, Love TW, Braunwald E and the TIMI 10A Investigators
TNK – Tissue Plasminogen Activator in Acute Myocardial Infarction. Results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 10A Dose Ranging Trial
Circulation 95: 351 – 356 (1997)

18. Cannon CP, McCabe CH, Gibson MC, Adgey JA, Sweiger Mj, Sequeira RF, Muller HS, McCluskey ER, Fox NL, Van de Werf F, Braunwald E
TNK – Tissue Plasminogen Activator Compared With Front – Loaded Alteplase in Acute Myocardial Infarction. Results of the TIMI 10B Trial
Circulation 98: 2805 – 2814 (1998)

19. Carney RJ, Murphy GA, Brandt TR, Daley PJ, Pickering E, White HJ, McDonough TJ, Vermilya SK, Teichman SL, for the RAAMI Study Investigators
Randomized Angiographic Trial of Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator (Alteplase) in Myocardial Infarction
J Am Coll Cardiol 20: 17 – 23 (1992)

20. The COBALT Investigators (Continuous Infusion versus Double Bolus Administration of Alteplase)
A Comparison of Continuous Infusion of Alteplase with Double Bolus Administration for Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 337: 1124 – 1130 (1997)

21. Col JJ, Col – DeBeys CM, Renkin JP, Lavenne – Pardonge EM, Bachy JL, Moriau MH
Pharmacokinetics, Thrombolytic Efficacy and Hemorrhagic Risk of Different Streptokinase Regimens in Heparin – Treated Acute Myocardial Infarction
Am J Cardiol 63: 1185 – 1192 (1989)

22. Collen D
On the Regulation and Control of Fibrinolysis – Edward Kowalski Memorial Lecture
Thromb Haemostas 43: 77 – 89 (1980)

23. Collen D, Rijken DC, VanDamme J, Billiau A
Purification of Human Tissue – Type Plasminogen Activator in Centigramm Quantities from Human Melanoma Cell Culture Fluid and Its Conditioning for Use in Vivo
Thromb Haemostas 48: 294 – 296 (1982)

24. Collen D, Bounameaux H, deCock F, Lijnen HR, Verstraete M
Analysis of Coagulation and Fibrinolysis During Intravenous Infusion of Recombinant Human Tissue – Type Plasminogen Activator in Patients With Acute Myocardial Infarction
Circulation 73: 511 – 517 (1986)

25. Collen D, Van de Werf F
Coronary Arterial Thrombolysis with Low – Dose Synergistic Combinations of Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator (rt – PA) and Recombinant Single – Chain Urokina -se – Type Plasminogen Activator (rscu – PA) for Acute Myocardial Infarction
Am J Cadiol 60: 431 – 434 (1987)

26. Collen D, Stassen JM, Larsen G
Pharmacokinetics and Thrombolytic Properties of Deletion Mutants of Human Tissue – Type Plasminogen Activator in Rabbits
Blood 71: 216 – 219 (1988 a)

27. Collen D
Fibrin – Specific Thrombolytic Agents
Klin Wochenschr 66: Suppl XII, 15 – 23 (1988 b)

28. Collen D
Coronary Thrombolysis: Streptokinase or Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator?
Ann Int Med 112: 529 – 538 (1990)

29. Collen D, Lijnen HR, Vanlinthout I, Kieckens L, Nelles L, Stassen JM
Thrombolytic and Pharmacokinetic Properties of Human Tissue – Type Plasminogen Activator Variants, Obtained by Deletion and/or Duplication of Structural/Functional Domains, in a Hamster Pulmonary Embolism Model
Thromb Haemostas 65: 174 – 180 (1991)

30. Collen D, Lijnen HR
Tissue-type plasminogen activator: a historical perspective and personal account
J Thromb Haemostas 2: 541 – 546 (2004)

31. Coller BS, Scudder LE
Inhibition of dog platelet function by in vivo infusion of F (ab´) 2 fragments of a monoclonal antibody to the platelet glykoprotein IIb/IIIa receptor
Blood 66: 1456 – 1459 (1985)

32. Collins R, Peto R, Baigent C, Sleight P
Drug Therapy: Aspirin, Heparin, and Fibrinolytic Therapy in Suspected Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 336: 847 – 860 (1997)

33. Cullen P, Assmann G
Primäre und sekundäre Prävention der koronaren Herzkrankheit
Dtsch med Wochenschr 125: 881 – 888 (2000)

34. Davies MJ, Thomas AC
Plaque Fissuring – The Cause of Acute Myocardial Infarction, Sudden Ischaemic Death, and Crescendo Angina
Br Heart J 53: 363 – 373 (1985)

35. de Munk GAW, Caspers MPM, Chang GTG, Pouwels PH, Enger – Valk BE, Verheijen JH
Binding of Tissue – Type Plasminogen Activator to Lysine, Lysine Analogues, and Fibrin Fragments
Biochemistry 28: 7318 – 7325 (1989)

36. de Vries C, Veerman H, Pannekoek H
Identification of the Domains of Tissue – type Plasminogen Activator Involved in the Augmented Binding to Fibrin after Limited Digestion with Plasmin
J Biol Chem 264: 12604 – 12610 (1989)

37. de Vries C, Veerman H, Nesheim ME, Pannekoek H
Kinetic Characterization of Tissue – Type Plasminogen Activator (t – PA) and t – PA Deletion Mutants
Thromb Haemostas 65: 280 – 285 (1991)

38. DeWood MA, Spores J, Notske R, Mouser LT, Burroughs R, Golden MS, Lang HT
Prevalence of Total Coronary Occlusion During the Early Hours of Transmural Myocardial Infarction
N Engl J Med 303: 897 – 902 (1980)

39. Dodd I, Nunn B, Robinson JH
Isolation, Identification and Pharmacokinetic Properties of Human Tissue – Type Plasminogen Activator Species: Possible Localisation of a Clearance Recognition Site
Thromb Haemostas 59: 523 – 528 (1988)

40. Eisenberg PR, Sherman LA, Tiefenbrunn AJ, Ludbrook PA, Sobel BE, Jaffe AS
Sustained Fibrinolysis After Administration of t – PA Despite Its Short Half – Life in the Circulation
Thromb Haemostas 57: 35 – 40 (1987)

41. EMERAS (Estudio Multicentrico Estreptoquinasa Republicas de America del Sur) Collaborative Group
Randomised trial of late thrombolysis in patients with suspected acute myocardial infarction
Lancet 342: 767 – 772 (1993)

42. Every NR, Parsons LS, Hlatky M, Martin JS, Weaver WD, for The Myocardial Infarction Triage and Intervention Investigators
A Comparison of Thrombolytic Therapy with Primary Coronary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 335: 1253 – 1260 (1996)

43. Fibrinolytic Therapy Trialists (FTT) Collaborative Group
Indication for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients
Lancet 343: 311 – 322 (1994)

44. Forrester JS, Litvack F, Grundfest W, Hickey A
A Perspective of Coronary Disease Seen Through the Arteries of Livin Man
Circulation 75: 505 – 513 (1987)

45. Franzosi MG, Santoro E, De Vita C, Geraci E, Lotto A, Maggioni AP, Mauri F, Rovelli F, Santoro L, Tavazzi L, Tognoni G, on behalf ot the GISSI Investigators
Ten – Year Follow – Up of the First Megatrial Testing Thrombolytic Therapy in Patients With Acute Myocardial Infarction – Results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell`Infarto – 1 Study
Circulation 98: 2659 – 2665 (1998)

46. Garabedian HD, Gold HK, Leinbach RC, Yasuda T, Hohns JA, Collen D
Dose – Dependent Thrombolysis, Pharmacokinetics and Hemostatic Effects of Recombinant Human Tissue – Type Plasminogen Activator for Coronary Thrombosis
Am J Cardiol 58: 673 – 679 (1986)

47. Garabedian HD, Gold HK, Leinbach RC, Johns JA, Yasuda T, Kanke M, Collen D
Comparative Properties of Two Clinical Preparations of Recombinant Human Tissue – Type Plasminogen Activator in Patients With Acute Myocardial Infarction
J Am Coll Cardiol 9: 599 – 607 (1987)

48. Gemmill JD, Hogg KJ, MacIntyre PD, Booth N, Rae AP, Dunn FG, Hillis WS
A Pilot Study of the Efficacy and Safety of Bolus Administration of Alteplase in Acute Myocardial Infarction
Br Heart J 66: 134 – 138 (1991)

49. Giugliano RP, Braunwald E
Improving antithrombotic treatment in patients after myocardial infarction
Lancet 362: 757 (2003)

50. GRACIA – 1: a randomised controlled trial
Routine invasive strategy within 24 hours of thrombolysis versus ischaemia – guided conservative approach for acute myocardial infarction with ST – segment elevation
Lancet 364: 1045 – 1053 (2004)

51. Grimaudo V, Hauert J, Bachmann F, Kruithof EKO
Diurnal Variation of the Fibrinolytic System
Thromb Haemostas 59: 495 – 499 (1988)

52. Grines CL, Nissen SE, Booth DC, Gurley JC, Chelliah N, Wolf R, Blankenship J, Branco MC, Bennett K, DeMaria AN, and the Kentucky Acute Myocardial Infarction Trial (KAMIT) Group
A prospective, randomised trial comparing combination half – dose tissue – type plasminogen activator and streptokinase with full – dose tissue – type plasminogen activator
Circulation 84: 540 – 549 (1991)

53. Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O´Keefe J, Overlie P, Donohue B, Chelliah N, Timmis GC, Vlietstra RE, Strzelecki M, Puchrowicz – Ochicki S, O´Neill WW for The Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group
A Comparison Of Immediate Angioplasty With Thrombolytic Therapy For Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 328: 673 – 679 (1993)

54. Grines CL, Cox DA, Gregg SW, Garcia E, Mattos LA, Giambartolomei A, Brodie BR, Madonna O, Eijgelshoven M, Lansky AJ, O´Neill WW, Morice MC, for The Stent Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group
Coronary Angioplasty with or without Stent Implantation for Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 341:1949-1956 (1999)

55. Grünewald M
Überblick über Ergebnisse publizierter Studien zur Thrombolytischen Therapie des Akuten Myokardinfarkts von 1958 bis 1990 – Darstellung des gegenwärtigen Erkenntnisstandes und der Bedeutung offener Fragestellungen für die Planung zukünftiger Studien
Dissertation Universität Ulm (1992)

56. Grünewald M, Müller M, Ellbrück D, Osterhues H, Kochs M, Mohren M, Schirmer G, Ziesche S, Güloglu A, Bock R, Seifried E
Double – versus singel – bolus thrombolysis with reteplase for acute myocardial infarction: a pharmacokinetic and pharmcodynamic study
Fibrinolysis 11: 137 – 145 (1997)

57. Gulba DC, Praus M, Dechend R, Moll S, Dietz R
Thrombolyse – neue Thrombolytika, neue Begleittherapie: Update 1999
J Kardiol 1999 6: 142 – 153

58. The GUSTO Angiographic Investigators
The Effect of Tissue Plasminogen Activator, Streptokinase, or Both on Coronary – Artery Patency, Ventricular Function, and Survival after Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 329: 1615 – 1622 (1993)

59. The GUSTO Investigators
An International Randomized Trial Comparing Four Thrombolytic Strategies for Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 329: 673 – 682 (1993)

60. The (GUSTO III) Global Use of Strategies to open Occluded Coronary Arteries Investigators
A Comparison of Reteplase with Alteplase for Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 337: 1118 – 1123 (1997)

61. The GUSTO V Investigators
Reperfusion therapy for acute myocardial infarction with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa Inhibition: the GUSTO V randomised trial
Lancet 357: 1905 – 1914 (2001)

62. Hajjar KA, Hamel NM, Harpel PC, Nachman RL
Binding of Tissue Plasminogen Activator to Cultured Human Endothelial Cells
J Clin Invest 80: 1712 – 1719 (1987)

63. Hamm CW
Paradigmenwechsel in der Therapie des Herzinfarkts
Anaesthesist 53: 409 - 410 (2004)

64. Hartzler GO, Rutherford BD, McConahay DR, Johnson WL Jr, McCallister BD , Gura GM Jr, Conn RC, Crocket JE
Percutaneous transluminal coronary angioplasty with and without thrombolytic therapy for treatment of acute myocardial infarction
Am Heart J 106: 965 – 973 (1983)

65. Hasdai D, Homes DR, Topol EJ, Berger PB, Criger DA, Hochman JS, Bates ER, Vahanian A, Armstrong PW, Wilcow R, Ohman EM, Califf RM
Frequency and clinical outcome of cardiogenic shock during acute myocardial infarction among patients receiving reteplase or alteplase – Results from GUSTO – III
Eur Heart J 20: 128 – 135 (1999)

66. Herrmann HC, Moliterno DJ, Ohman EM, Stebbins AL, Bode Ch, Betriu A, Forycki F, Miklin JS, Bachinsky WB, Lincoff AM, Califf RM, Topol EJ
Facilitation of Early Percutaneous Coronary Intervention After Reteplase With or Without Abciximab in Acute Mocardial Infarction
Results From the SPEED (GUSTO – 4 Pilot) Trial
J Am Coll Cardiol 36: 1489 – 1496 (2000)

67. Hotchkiss A, Refino CJ, Leonard CK, O´Connor JV, Crowley C, McCabe J, Tate K, Nakamura G, Powers D, Levinson A, Mohler M, Spellman MW
The Influence of Carbohydrate Structure on the Clearance of Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator
Thromb Haemostas 60: 255 – 261 (1988)

68. Hoylaerts M, Rijken DC, Lijnen HR, Collen D
Kinetics of the Activation of Plasminogen by Human Tissue Plasminogen Activator – Role of Fibrin
J Biol Chem 257: 2912 – 2919 (1982)

69. Ichinose A, Takio K, Fujikawa K
Localization of the Binding Site of Tissue – Type Plasminogen Activator to Fibrin
J Clin Invest 78: 163 – 169 (1986)

70. International Joint Efficacy Comparison of Thrombolytics
Randomised, double – blind comparison of reteplase double – bolus administration with streptokinase in acute myocardial infarction (INJECT): trial to investigate equivalence
Lancet 346: 329 – 336 (1995)

71. The InTime – II Investigators
Intravenous NPA for the treatment of infarcting myocardium early; InTIME – II, a double – blind comparison of single – bolus lanoteplase versus accelerated alteplase for the treatment of patients with acute myocardial infarction
Eur Heart J 24: 2005 – 2013 (2000)

72. The ISAM Study Group
A prospective trial of intravenous streptokinase in acute myocardial infarction (ISAM)
N Engl J Med 314: 1465 – 1471 (1986)

73. ISIS – 2 (Second International Study of Infarct Survival Collaborative Group)
Randomised Trial of Intravenous Streptokinase, Oral Aspirin, Both, or Neither Among 17.187 Cases of Suspected Acute Myocardial Infarction: ISIS – 2
Lancet 1: 349 – 360 (1988)

74. ISIS – 3 (Third International Study of Infarct Survival) Collaborative Group
ISIS – 3: A Randomised Comparison of Streptokinase vs Tissue Plasminogen Activator vs Anistreplase and of Aspirin Plus Heparin vs Aspirin Alone Among 41299 Cases of Suspected Acute Myocardial Infarction
Lancet 339: 753 – 770 (1992)

75. Jacobs AK
Primary Angioplasty for Acute Myocardial Infarction – Is It Worth the Wait?
N Engl J Med 349: 798 – 800 (2003)

76. Kawai C, Hosoda S, Motomiya T, Kimata S, Yui Y, Kodama K, Minamino R, Sato H. And Noboyoshi M for the E6010 Investigators
Multicenter Trial of a Novel Modified t – PA, E 6010, by i. v. Bolus Injection in Patients with Acute Myocardial Infarction (AMI)
Circulation 86, Suppl. I: I – 409, 1630 (1992)

77. Kennedy JW, Martin GV, Davis KB, Maynard C, Stadius M, Sheehan FH, Ritchie JL
The Western Washington Intravenous Streptokinase in Acute Myocardial Infarction Randomized Trial
Circulation 77: 345 – 352 (1988)

78. Khan MI, Hackett DR, Andreotti F, Davies GJ, Regan T, Haider AW, McFadden E, Halson P, Maseri A
Effectiveness of Multiple Bolus Administration of Tissue – Type Plasminogen Activator in Acute Myocardial Infarction
Am J Cardiol 65: 1051 – 1056 (1990)

79. Kluft C, Jie AFH, Rijken DC, Verheijen JH
Daytime Fluctuation in Blood of Tissue – Type Plasminogen Activator (t – PA) and Its Fast – Acting Inhibitor (PAI – 1)
Thromb Haemostas 59: 329 – 332 (1988)

80. Kohnert U, Rudolph R, Verheijen JH, Weening – Verhoeff EJD, Stern A, Opitz U, Martin U, Lill H, Prinz H, Lechner M, Kresse G – B, Buckel P, Fischer S
Biochemical properties of the kringle 2 and protease domains are maintained in the refolded t – PA deletion variant BM 06.022
Protein Engineering 5: 93 – 100 (1992)

81. Kok P, Astrup T
Isolation and Purification of a Tissue Plasminogen Activator and Its Comparison with Urokinase
Biochemistry 8: 79 – 86 (1969)

82. Krause J
Catabolism of Tissue – Type Plasminogen Activator (t – PA), its Variants, Mutants and Hybrids
Fibrinolysis 2: 133 – 142 (1988)

83. Kruithof EKO
Plasminogen Activator Inhibitor Type 1: Biochemical, Biological and Clinical Aspects
Fibrinolysis 2, Suppl 2, 59 – 70 (1988)

84. Kuiper J, Van´t Hof A, Otter M, Rijken DC, van Berkel TJ
Interaction of t – PA Mutants With Liver Cells: Effect of Domain Deletions
Fibrinolysis 6, Suppl. 2, 1 (A 1) (1992)

85. Larsen GR, Henson K, Blue Y
Variants of Human Tissue – type Plasminogen Activator: Fibrin Binding, Fibrinolytic, and Fibrinogenolytic Characterization of Genetic Variants Lacking the Fibronectin Finger – Like and/or the Epidermal Growth Factor Domains
J Biol Chem 263: 1023 - 1029 (1988)

86. The LATE Study Group
Late Assessment of Thrombolytic Efficacy (LATE) study with Alteplase 6 – 24 hours after onset of acute myocardial infarction
Lancet 342: 759 – 766 (1993)

87. Leach JK, Patterson E, Rear AO
Distributed intraclot thrombolysis: mechanism of accelerated thrombolysis with encapsulated plasminogen activators
Thromb Haemostas 2: 1548 – 1555 (2004)

88. Lee L, Bates ER, Pitt B, Walton JA, Laufer N, O`Neill WW
Percutaneous transluminal coronary angioplasty improves survival in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock
Circulation 78: 1345 – 1351 (1988)

89. Leebeek FWG, Kluft C, Knot EAR, Los P, Cohen AF, Six AJ
Plasmin Inhibitors in the Prevention of Systemic Effects During Thrombolytic Therapy: Specific Role of the Plasminogen – Binding Form of α_2 – Antiplasmin
J Am Coll Cardiol 15: 1212 – 1220 (1990)

90. Lijnen HR, Collen D
New Strategies in the Development of Thrombolytic Agents
Blut 57: 147 – 162 (1988)

91. Lijnen HR, Collen D
Strategies for the Improvement of Thrombolytic Agents
Thromb Haemostas 66: 88 – 110 (1991)

92. Lill H
Biochemische und physiologische Grundlagen zum Gewebe – Plasminogenaktivator (t – PA)
Z gesamte inn Med 42: 478 – 486 (1987)

93. Loscalzo J, Braunwald E
Tissue Plasminogen Activator
N Engl J Med 319: 925 – 931 (1988 a)

94. Loscalzo J
Structural and Kinetic Comparison of Recombinant Human Single – and Two – chain Tissue Plasminogen Activator
J Clin Invest 82: 1391 – 1397 (1988 b)

95. Loscalzo J
An Overview of Thrombolytic Agents
Chest 97: Suppl., 117S – 123S (1990)

96. Lucore CL, Sobel BE
Interactions of Tissue – type Plasminogen Activator With Plasma Inhibitors and Their Pharmacologic Implications
Circulation 77: 660 – 669 (1988)

97. Magnani B, for the PAIMS Investigators
Plasminogen Activator Italian Multicenter Study (PAIMS): Comparison of Intravenous Recombinant Single – Chain Human Tissue – Type Plasminogen Activator (rt – PA) With Intravenous Streptokinase in Acute Myocardial Infarction
J Am Coll Cardiol 13: 19 – 26 (1989)

98. Martin GV, Sheehan FH, Stadius M, Maynard C, Davis KB, Ritchie JL, Kennedy JW
Intravenous streptokinase for acute myocardial infarction. Effects on global and regional systolic function
Circulation 78: 258 – 266 (1988)

99. Martin U, Fischer S, Kohnert U, Lill H, Rudolph R, Sponer G, Stern A, Strein K
Properties of a novel plasminogen activator (BM 06.022) produced in Escherichia coli
Z Kardiol 79: Suppl. 3, 167 – 170 (1990)

100. Martin U, Fischer S, Kohnert U, Opitz U, Rudolph R, Sponer G, Stern A, Strein K
Thrombolysis With an Escherichia coli – Produced Recombinant Plasminogen Activator (BM 06.022) in the Rabbit Model of Jugular Vein Thrombosis
Thromb Haemostas 65: 560 – 564 (1991 a)

101. Martin U, Fischer S, Kohnert U, Rudolph R, Sponer G, Stern A, Strein K
Pharmacokinetic Properties of an Escherichia – coli – Produced Recombinant Plasminogen Activator (BM 06.022) in Rabbits
Thromb Res 62: 137 – 146 (1991 b)

102. Martin U, Fischer S, Kohnert U, Rudolph R, Sponer G, Stern A, Strein K
Coronary thrombolytic properties of a novel recombinant plasminogen activator (BM 06.022) in a canine model
J Cardiovasc Pharmacol 18: 111 – 119 (1991 c)

103. Martin U, von Möllendorff E, Akpan W, Kientsch – Engel R, Kaufmann B, Neugebauer G
Pharmacokinetic and Hemostatic Properties of the Recombinant Plasminogen Activator BM 06.022 in Healthy Volunteers
Thromb Haemstas 66: 569 – 574 (1991a)

104. Martin U, von Möllendorff E, Akpan W, Kientsch – Engel R, Kaufmann B, Neugebauer G
Dose – Ranging Study of the Novel Recombinant Plasminogen Activator BM 06.022 in Healthy Volunteers
Clin Pharmacol Ther 50: 429 – 436 (1991b)

105. Martin U, Fischer S, Kohnert U, Opitz U, Rudolph R, Sponer G, Stern A, Strein K
Pharmacokinetic and thrombolytic properties of unglycosylated recombinant tissue – type plasminogen activator (BM 06.021) produced in Escherichia coli
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 346: 108 – 113 (1992)

106. Martin U, Gärtner D, Strein K
Contribution of the Kidneys to the Catabolism of the Novel Recombinant Plasminogen Activator BM 06.022 in Rats
Naunyn Schmiedeberg´s Arch. Pharmacol. 345: Suppl., R 98 (A 391) (1992)

107. Martin U, Köhler J, Sponer G, Strein K
Pharmacokinetics of the Novel Recombinant Plasminogen Activator BM 06.022 in Rats, Dogs, and Non – human Primates
Fibrinolysis 6: 39 – 43 (1992)

108. Martin U, Sponer G, Strein K
Evaluation of thrombolytic and systemic effects of the novel recombinant plasminogen activator BM 06.022 compared with alteplase, anistreplase, streptokinase and urokinase in a canine model of coronary artery thrombosis
J Am Coll Cardiol 19: 433 – 440 (1992 a)

109. Martin U, Sponer G, Konig R, Smolarz A, Meyer – Sabellek W, Strein K
Double bolus administration of the novel recombinant plasminogen activator BM 06.022 improves coronary blood flow after reperfusion in a canine model of coronary thrombosis
Blood Coagul Fibrinolysis 3: 139 – 147 (1992 b)

110. Martin U, Sponer G, Strein K
Role of the Liver in the Catabolism of the Novel Recombinant Plasminogen Activator BM 06.022 in Rats
Fibrinolysis 6, Suppl. 2: 139 (A 363) (1992 c)

111. Martin U, Fischer S, Sponer G
Influence of Heparin and Systemic Lysis on Coronary Blood Flow After Reperfusion Induced by the Novel Recombinant Plasminogen Activator BM 06.022 in a Canine Model of Coronary Thrombosis
J Am Coll Cardiol 22: 914 – 920 (1993)

112. Martin U, Sponer G, Strein K
Differential fibrinolytic properties of the recombinant plasminogen activator BM 06.022 in human plasma and blood clot systems in vitro
Blood Coagul Fibrinolysis 4: 235 – 242 (1993)

113. Mathey DG, Schöfer J, Sheehan FH, Becher H, Tilsner V, Dodge HT
Intravenous Urokinase in Acute Myocardial Infarction
Am J Cardiol 55: 878 – 882 (1985)

114. Mathey DG, Sheehan FH, Schofer J, Dodge HT
Time from Onset of Symptoms to Thrombolytic Therapy: A Major Determinant of Myocardial Salvage in Patients With Acute Transmural Infarction
J Am Coll Cardiol 6: 518 – 525 (1985)

115. Mathey DG, Büttner J, Geng G, Gutschmidt HJ, Herden HN, Moecke H, Polster H, Raftopoulo R, Schofer J, Sheehan FH, Voeltz P
Thrombolyse – Behandlung des akuten Myokardinfarktes am Notfallort – Eine randomisierte Doppelblindstudie
Dtsch med Wschr 115: 803 – 809 (1990)

116. Mattsson C, Wikström K, Sterky C, Pohl G
Synergism Between Tissue – Type Plasminogen Activator and a Genetically Engineered Variant Lacking the Finger Domain, the Growth Factor Domain and the First Kringel Domain
Thromb Haemostas 65: 286 – 290 (1991)

117. Mohler MA, Refino CJ, Chen SA, Chen AB, Hotchkiss AJ
D – Phe – Pro – Arg – Chloromehylketone: Its Potential Use in Inhibiting the Formation of In Vitro Artifacts in Blood Collected During Tissue – Type Plasminogen Activator Thrombolytic Therapy
Thromb Haemostas 56: 160 – 164 (1986)

118. Montalescot G, Barragan P, Wittenberg O, Ecollan P, Elhadad S, Villain P, Boulenc JM, Morice MC, Maillard L, Pansieri M, Choussat R, Pinton P, for the ADMIRAL Investigators
Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Inhibition with Coronary Stenting for Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 344: 1895 – 1903 (2001)

119. Morris JP, Castellino FJ
The Role of Lysine Binding Sites of Human Plasmin in the Hydrolysis of Human Fibrinogen
Biochim Biophys Acta 744: 99 – 104 (1983)

120. Müller – Ehmsen J
Fragen aus der Praxis: Lysetherapie bei Myokardinfarkt und älteren Patienten
Dtsch Med Wschr 126: 1058 – 1059 (2001)

121. Müller MM, Haerer W, Ellbrück D, Martin U, König R, Seifried D
Pharmacokinetics and Effects on the Hemostatic System of Bolus Application of a Novel Recombinant Plasminogen Activator in AMI Patients
Fibrinolysis 6, Suppl. 2: 26 (A 63) (1992)

122. Müller MM
Bolusapplikation einer neuen rekombinanten Tissue – type Plasminogenaktivatormutante bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt – Pharmakologische, Klinische und Klinisch – Experimentelle Untersuchungen zur Erstanwendung von BM 06.022
Dissertation Universität Ulm (1994)

123. Munkvad S, Jespersen J, Gram J, Kluft C
Interrelationship Between Coagulant Activity and Tissue – type Plasminogen Activator (t – PA) System in Acute Ischaemic Heart Disease. Possible Role of Endothelium
J Int Med 228: 361 – 366 (1990)

124. Neuhaus KL, Tebbe U, Gottwik M, Weber MAJ, Feuerer W, Niederer W, Haerer W, Praetorius F, Grosser KD, Huhmann W, Hoepp HW, Alber G, Sheikhzadeh A, Schneider B
Intravenous Recombinant Tissue Plasminogen Activator (rt – PA) and Urokinase in Acute Myocardial Infarction: Results of the German Activator Urokinase Study (GAUS)
J Am Coll Cardiol 14: 1566 – 1569 (1989)

125. Neuhaus KL, von Essen R, Tebbe U, Vogt A, Roth M, Riess M, Niederer W, Forycki F, Wirtzfeld A, Maeurer W, Limbourg P, Merx W, Haerten K
Improved Thrombolysis in Acute Myocardial Infarction With Front – Loaded Administration of Alteplase: Results of the rt – PA – APSAC Patency Study (TAPS)
J Am Coll Cardiol 19: 885 – 891 (1992)

126. Neuhaus KL, von Essen R, Vogt A, Tebbe U, Rustige J, Wagner HJ, Appel KF, Stienen U, Konig R, Meyer – Sabellek W
Dose finding with a novel recombinant plasminogen activator (BM 06.022) in patients with acute myocardial infarction: Results of the German Recombinant Plasminogen Activator Study
J Am Coll Cardiol 24: 55 – 60 (1994)

127. Nilsson K, Rosén S, Friberger P
A New Kit for the Determination of Tissue Plasminogen Activator and its Inhibitor in Blood
Fibrinolysis 1: 163 – 168 (1987)

128. Ny T, Elgh F, Lund B
The Structure of the Human Tissue – type Plasminogen Activator Gene: Correlation of Intron and Exon structures to Functional and Structural Domains
Proc Natl Acad Sci U.S.A. 81: 5355 – 5359 (1984)

129. O´Neill WW, Weintraub R, Grines CL, Meany TB, Brodie BR, Friedman HZ, Ramos RG, Gangadharan V, Levin RN, Choksi N
A prospective, placebo – controlled, randomised trial of intravenous streptokinase and angioplasty versus alone angioplasty therapy of acute myocardial infarction
Circulation 86: 1710 – 1717 (1992)

130. O'Keefe JH, Bailey WL, Rutherford BD
Primary angioplasty for acute myocardial infarction in 1000 consecutive patients. Results in an unselected population and high-risk subgroups
Amer J Cardiol 72: 107 - 115 (1993)

131. Ottesen MM, Kober L, Jorgensen S, Torp – Pederson C, on behalf of the TRACE Study Group
Consequences of Overutilization and Underutilization of Thrombolytic Therapy in Clinical Practice
J Am Coll Cardiol 37: 1581 – 1587 (2001)

132. Paramo JA, Colucci M, Collen D, Van de Werf F
Plasminogen Activator Inhibitor in the Blood of Patients With Coronary Artery Disease
Brit Med J 291: 573 – 574 (1895)

133. Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, Harkins RN, Vehar GA, Ward CA, Bennett WF, Yelverton E, Seeburg PH, Heyneker HL, Goeddel DV, Collen D
Cloning and Expression of Human Tissue – Type Plasminogen Activator cDNA in E. coli
Nature 301: 214 – 221 (1983)

134. Purvis JA, McNeill AJ, Siddiqui RA, Roberts MJ, McClements BM, McEneaney D, Campbell NP, Khan MM, Webb SW, Wilson CM, Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB
The Wavefront Phenomenon of Ischemic Cell Death – 1. Myocardial Infarct Size vs Duration of Coronary Occlusion in Dogs
Circulation 56: 786 – 794 (1977)

135. Purvis JA, McNeill AJ, Siddiqui RA, Roberts MJ, McClements BM, McEneaney D, Campbell NPS, Khan MM, Webb SW, Wilson CM, Adgey AAJ
Efficacy of 100 mg of double – bolus alteplase in achieving complete perfusion in the treatment of acute myocardial infarction
J Am Coll Cardiol 23: 6 – 10 (1994)

136. Rånby M
Studies on the Kinetics of Plasminogen Activation by Tissue Plasminogen Activator
Biochim Biophys Acta 704: 461 – 469 (1982)

137. Raum D, Marcus D, Alper CA, Levey R, Taylor PD, Starzl TE
Synthesis of Human Plasminogen by the Liver
Science 208: 1036 – 1037 (1980)

138. Rawles J on Behalf of The GREAT Group
Halving of Mortality at 1 Year by Domiciliary Thrombolysis in the Grampian Region Early Anistreplase Trial (GREAT)
J Am Coll Kardiol 23: 1 – 5 (1994)

139. Ridolfi RL, Hutchins GM
The Relationship Between Coronary Artery Lesions and Myocardial Infarcts: Ulceration of Atherosclerotic Plaques Precipitating Coronary Thrombosis
Am Heart J 93: 468 – 486 (1977)

140. Rijken DC
Relationships between Structure and Function of Tissue – Type Plasminogen Activator
Klin Wochenschr 66: Suppl. XII, 33 – 39 (1988)

141. Rijken DC, Otter M, Kuiper J, van Berkel TJ
Receptor – Mediated Endocytosis of Tissue – Type Plasminogen Activator (t – PA) by Liver Cells
Thromb Res Suppl. X: 63 – 71 (1990)

142. Risenfors M, Gustavsson G, Ekström L, Hartford M, Herlitz J, Karlson BW, Luepker R, Swedberg K, Wennerblom B, Holmberg S
Prehospital Thrombolysis in Suspected Acute Myocardial Infarction: Results from the TEAHAT Study
J Int Med 229, Suppl I, 3 – 10 (1991)

143. Roth A, Barbash GI, Hod H, Miller HI, Rath S, Modan M, Har – Zahav Y, Keren G, Bassan S, Kaplinsky E, Laniado S
Should Thrombolytic Therapy Be Administered in the Mobile Intensive Care Unit in Patients With Evolving Myocardial Infarction? – A Pilot Study
J Am Coll Cardiol 15: 932 – 936 (1990)

144. Sakata Y, Aoki N
Cross – Linking of α_2 – Antiplasmin Inhibitor to Fibrin by Fibrin – stabilizing Factor
J Clin Invest 65: 290 – 297 (1980)

145. Sane DC, Califf RM, Topol EJ, Sigmon KN, Kereiakes DJ, George BS, Mantell SJ, Macy E, Collen D, Califf RM
Correlation between Baseline Plasminogen Activator Inhibitor Levels and Clinical Outcome during Therapy with Tissue Plasminogen Activator for Acute Myocardial Infarction
Thromb Haemostas 65: 275 – 279 (1991)

146. Schömig A, Kastrati A, Dirschinger J, Mehilli J, Schricke U, Pache J, Martinoff S, Neumann FJ, Schwaiger M, for The Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators
Coronary Stenting plus Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Blockade Compared with Tissue Plasminogen Activator in Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 343: 385 – 391 (2000)

147. Seifried E
Tissue type Plasminogenaktivator: Pharmakokinetik und Wirkungen auf das Hämostasesystem des Menschen – Präklinische und klinische Untersuchungen
Habilitationsschrift Universität Ulm (1987)

148. Seifried E, Tanswell P
Comparison of Specific Antibody, D- Phe – Pro – Arg – CH_2CL and Aprotinin for Prevention of In Vitro Effects of Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator on Haemostasis Parameters
Thromb Haemostas 58: 921 – 926 (1987)

149. Seifried E
Klinische und biochemische Zielsetzungen bei der Thrombolysetherapie mit Neothrombolytika – speziell mit Gewebeplasminogenaktivator, Prourokinase und deren Kombinationen
Hämostaseologie 8: 199 – 213 (1988)

150. Seifried E, Tanswell P, Rijken DC, Barrett – Bergshoeff MM, Su CAPF, Kluft C
Pharmacokinetics of Antigen and Activity of Recombinant Tissue – type Plasminogen Activator after Infusion in Healthy Volunteers
Drug Res 38 (I): 418 – 422 (1988)

151. Seifried E, Tanswell P, Ellbrück D, Haerer W, Schmidt A
Pharmacokinetics and Haemostatic Status During Consecutive Infusions of Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator in Patients with Acute Myocardial Infarction
Thromb Haemostas 61: 497 – 501 (1989)

152. Seifried E, Oethinger M, Tanswell P, Hoegee – de Nobel H, Nieuwenhuizen W
Studies on the Functionality of Fibrinogen During rt – PA Therapy: Results of Three Different Methods of Fibrinogen Determination
Blood Coagul Fibrinolysis 3: 81 – 87 (1992a)

153. Seifried E
Fibrinolyse und Thrombolytika
Internist 33: 197 – 205 (1992 b)

154. Sharkey SW, Brunette DD, Ruiz E, Hession WT, Wysham DG, Goldenberg IF, Hodges M
An Analysis of Time Delays Preceding Thrombolysis for Acute Myocardial Infarction
JAMA 262: 3171 – 3174 (1989)

155. Sidelmann J, Gram J
The Influence of Venepuncture, Mixing and Separation of Blood on the Measurement of Thrombin – Antithrombin – III – Complex and Plasminogen Activator Inhibitor
Fibrinolysis 4, Suppl. 2, 124 – 126 (1990)

156. Simoons ML, Arnold AE, Betriu A, de Bono DP, Col J, Dougherty FC, von Essen R, Lambertz H, Lubsen J, Meier B, Michel PL, Raynaud P, Rutsch W, Sanz GA, Schmidt W, Serruys PW, Thery C, Uebis R, Vahanian A, Van de Werf F, Willems GM, Wood D, Verstraete M for the European Cooperative Study Group for Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator (rTPA)
Thrombolysis With Tissue Plasminogen Activator in Acute Myocardial Infarction: No Additional Benefit From Immediate Percutaneous Coronary Angioplasty
Lancet 1: 197 – 203 (1988)

157. Smalling RW, Bode C, Kalbfleisch JM, Sen S, Limbourg P, Forycki F, Habib G, Feldman R, Hohnloser S, Seals A, and The RAPID – Investigators
More Rapid, Complete, and Stable Coronary Thrombolysis With Bolus Administration of Reteplase Compared With Alteplase Infusion in Acute Myocardial Infarction
Circulation 91: 2725 – 2732 (1995)

158. Smalling RW
A fresh look at the molecular pharmacology of plasminogen activators: from theory to test tube to clinical outcomes
Am J Health Syst Pharm 54: 17 – 22 (1997 a)

159. Smalling RW
Pharmacological and clinical impact of the unique molecular structure of a new plasminogen activator
Eur Heart J 18: Suppl F, F11 – 6 (1997 b)

160. Smedsrød B, Einarsson M, Pertoft H
Tissue Plasminogen Activator Is Endocytosed by Mannose and Galactose Receptors of Rat Liver Cells
Thromb Haemostas 59: 480 – 484 (1988)

161. Spaethe R
Hämostase – Physiologie, Pathophysiolgie, Diagnostik
AHS/Deutschland GmbH, München (1984)

162. Sprengers ED, Kluft C
Plasminogen Activator Inhibitors
Blood 69: 381 – 387 (1987)

163. Stöckel H
Doppelbolusapplikation von Reteplase – Eine neue rekombinante tissue – type Plasminogenaktivator – Mutante bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt – Pharmakodynamische Untersuchungen und Korrelation zu klinischen Ergebnissen
Dissertation Universität Ulm (1999)

164. Stone GW, Grines CL, Cox DA, Garcia E, Tcheng JE, Griffin JJ, Guagliumi G, Stuckey T, Turco M, Carroll JD, Rutherford BD, Lansky AJ, for the Controlled Abciximab and Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications (CADILLAC) Investigators
Comparison of Angioplasty with Stenting, with or without Abciximab, in Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 346: 957 – 966 (2002)

165. The Strategies for Patency Enhancement in the Emergency Department (SPEED) Group
Trial of Abciximab With and Without Low – Dose Reteplase for Acute Myocardial Infarction
Circulation 101: 2788 – 2794 (2000)

166. Stump DC, Topol EJ, Chen AB, Hopkins A, Collen D
Monitoring of Hemostasis Parameters During Coronary Thrombolysis with Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator
Thromb Haemostas 59: 133 – 137 (1988)

167. The SWIFT (Should We Intervene Following Thrombolysis?) Trial Study Group
SWIFT trial of delayed elective intervention versus conservative treatment after thrombolysis with anistreplase in acute myocardial infarction – SWIFT Trial Study Group
BMJ 302: 555 – 560 (1991)

168. Tanswell P, Krause J
Die molekularbiologischen Eigenschaften des Gewebetyp – Plasminogenaktivators und seiner Varianten
Hämostaseologie 9: 114 – 121 (1989)

169. Tanswell P, Schlüter M, Krause J
Pharmacokinetics and Isolated Liver Perfusion of Carbohydrate Modified Recombinant Tissue – type Plasminogen Activator
Fibrinolysis 3: 79 – 84 (1989)

170. Tanswell P, Seifried E, Su PC, Feuerer W, Rijken DC
Pharmacokinetics and Systemic Effects of Tissue – type Plasminogen Activator in Normal Subjects
Clin Pharmaco Ther 46: 155 – 162 (1989)

171. Tanswell P, Seifried E, Stang E, Krause J
Pharmacokinetics and Hepatic Catabolism of Tissue – type Plasminogen Activator
Drug Res 41 (II): 1310 – 1319 (1991)

172. Tanswell P, Tebbe U, Neuhaus KL, Gläsle – Schwarz L, Wojcik J, Seifried E
Pharmacokinetics and Fibrin Specificity of Alteplase During Accelerated Infusion in Acute Myocardial Infarction
J Am Coll Cardiol 19: 1071 – 1075 (1992)

173. Tebbe U, Tanswell P, Seifried E, Feuerer W, Scholz KH, Herrmann KS
Single – Bolus Injection of Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator in Acute Myocardial Infarction
Am J Cardiol 64: 448 – 453 (1989)

174. Tebbe U, von Essen R, Smolarz A, Limbourg P, Rox J, Rustige J, Vogt A, Wagner J, Meyer – Sabellek W, Neuhaus KL
Open, noncontrolled dose – finding study with a novel recombinant plasminogen activator (BM 06.022) given as a double bolus in patients with acute myocardial infarction
Am J Cardiol 72: 518 – 524 (1993)

175. Tebbe U, Michels R, Adgery J, Boland J, Caspi A, Charbonnier B, Windeler J, Barth J, Groves R, Hopkins GR, Fennell W, Betriu A, Ruda M, Mlczoch J
Randomized, Double Blind Study Comparing Saruplase with Streptokinase Therapy in Acute Myocardial Infarction: The COMPASS Equivalence Trial
J Am Coll Cardiol 31: 487 – 493 (1998)

176. Thiemann DR, Coresh J, Schulman SP, Gerstenblith G, Oetgen WJ, Powe NR
Lack of Benefit for Intravenous Thrombolysis in Patients With Myocardial Infarction Who Are Older Than 75 Years
Circulation 101: 2239 – 2246 (2000)

177. Tiefenbrunn AJ, Robison AK, Kurnik PB, Ludbrook PA, Sobel BE
Clinical Pharmacology in Patients With Evolving Myocardial Infarction of Tissue – Type Plasminogen Activator Produced by Recombinant DNA Technology
Circulation 71: 110 – 116 (1985)

178. The TIMI Study Group
Comparison of Invasive and Conservative Strategies after Treatment with Intravenous Tissue Plasminogen Activator in Acute Myocardial Infarction – Results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Phase II Trial
N Engl J Med 320: 618 – 627 (1989)

179. Topol EJ, Califf RM, George BS, Kereiakes DJ, Abbottsmith CW, Candela RJ, Lee KL, Pitt B, Stack RS, O´Neill WW
A randomized trial of immediate versus delayed elective angioplasty after intravenous tissue plasminogen acitvator in acute myocardial infarction
N Engl J Med 317: 581 – 588 (1987)

180. Topol EJ, O´Neill WW, Langburd AB, Walton JA Jr, Bourdillon PD, Bates ER, Grines CL, Schork AM, Kline E, Pitt B
A randomized, placebo – controlled trial of intravenous recombinant tissue – type plasminogen activator and emergency coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction
Circulation 75: 420 – 428 (1987)

181. Vanderschueren S, Dens J, Kerdsinchai P, Desmet W, Vrolix M, De Man F, Van den Heuvel P, Hermans L, Collen D, Van de Werf F
Randomized Coronary Patency Trial of Double Bolus Recombinant Staphylokinase versus Frontloaded Alteplase in Acute Myocardial Infarction
Am Heart J 134: 213 – 219 (1997)

182. Van de Werf F, Ludbrook PA, Bergmann SR, Tiefenbrunn AJ, Fox KA, de Geest H, Verstraete M, Collen D, Sobel BE
Coronary Thrombolysis With Tissue – Type Plasminogen Activator in Patients With Evolving Myocardial Infarction
N Engl J Med 310: 609 – 613 (1984)

183. Van de Werf F, Cannon CP, Luyten A, Houbracken K, McCabe CH, Berioli S, Bluhmki E, Sarelin H, Wang – Clow F, Fox NL, Braunwald E
Safety assessment of single – bolus administration of TNK – tissue – plasminogen activator in acute myocardial infarction: the ASSENT – 1 trial. The ASSENT – 1 Investigators.
Am Heart J 137: 786 – 791 (1999)

184. Van de Werf F, Gore JM, Avezum Á, Gulba DC, Goodman SG, Budaj A, Brieger D, White K, Fox KA, Eagle KA, Kennelly BM, for the GRACE Investigators
Access to catheterisation facilities in patients admitted with acute coronary syndrome: multinational registry study
BMJ 330: 1136 – 1142 (2005)

185. van Zonneveld AJ, Veerman H, Pannekoek H
On the Interaction of the Finger and the Kringle – 2 Domain of Tissue – type Plasminogen Activator with Fibrin – Inhibition of Kringle – 2 Binding to Fibrin by ε - Amino Caproic Acid
J Biol Chem 261: 14214 – 14218 (1986a)

186. van Zonneveld AJ, Veerman H, Pannekoek H
Autonomous Functions of Structural Domains on Human Tissue – type Plasminogen Activator – (Exon Shuffling/Tissue – type Plasminogen Activator cDNA – Deletion Mutants)
Proc Natl Acad Sci U.S.A. 83: 4670 – 4674 (1986b)

187. Verheijen JH, Nieuwenhuizen W, Winjngaards G
Activation fo Plasminogen by Tissue Activator is Increased Specifically in the Presence of Certain Soluble Fibrin(ogen) Fragments
Thromb Res 27: 377 – 385 (1982)

188. Verheijen JH, Mullaart E, Chang GT, Kluft C, Wijngaards G
A Simple, Sensitive Spectrophotometric Assay for Extrinsic (Tissue – Type) Plasminogen Activator Applicable to Measurements in Plasma
Thromb Haemostas 48: 266 – 269 (1982)

189. Verheijen JH, Caspers MP, Chang GT, de Munk GA, Pouwels PH, Enger – Valk BE
Involvement of Finger Domain and Kringle 2 Domain of Tissue – type Plasminogen Activator in Fibrin Binding and Stimulation of Activity by Fibrin
EMBO J 5: 3525 – 3530 (1986)

190. Verheugt FW
Lyse now, stent later: the grace of CRACIA
Lancet 364: 1014 – 1015 (2004)

191. Verstraete M, Bernard R, Bory M, Brower RW, Collen D, deBono DP, Erbel R, Huhmann W, Lennane RJ, Lubsen J, Mathey D, Meyer J, Michels HR, Rutsch W, Schartl M, Schmidt W, Uebis R, von Essen R
Randomised Trial of Intravenous Recombinant Tissue – type Plasminogen Activator Versus Intravenous Streptokinase in Acute Myocardial Infarction – Report from the European Cooperative Study Group for Recombinant Tissue – type Plasminogen Activator
Lancet 1: 842 – 847 (1985)

192. Verstraete M, Bounameaux H, de Cock F, Van de Werf F, Collen D
Pharmacokinetics and Systemic Fibrinogenolytic Effects of Recombinant Human Tissue – Type Plasminogen Activator (rt – PA) in Humans
J Pharmacol Exp Ther 235: 506 – 512 (1985)

193. Verstraete M
Neuere Entwicklungen in der Fibrinolyse
Klin Wochenschr 66: Suppl. XII, 5 – 14 (1988)

194. Verstraete M, Su CA, Tanswell P, Feuerer W, Collen D
Pharmacokinetics and Effects on Fibrinolytic and Coagulation Parameters of Two Doses of Recombinant Tissue – Type Plasminogen Activator in Healthy Volunteers
Thromb Haemostas 56: 1 – 5 (1986)

195. Verstraete M
Newer Thrombolytic Agents
Ann Acad Med Singapore 28: 424 – 433 (1999)

196. Vogt A, Neuhaus KL
Thrombolysis and mechanical intervention following myocardial infarction
Eur Heart J 17: Suppl E, 49 – 54 (1996)

197. Von Essen R, Neuhaus KL, Markreiter M, Nebelsiek H, Vogt A, Appel KF, König R, Meyer– Sabellek W
Double bolus of r – PA in the dosage finding. Results of the GRE – CO – II study
J Am Coll Cardiol 19: 274 (1992)

198. Weisel JW, Collet JP
Packaging is important: accelerated thrombolysis with encapsulated plasminogen acitvators
Thromb Haemostas 2: 1545 – 1547 (2004)

199. Weitz JI, Leslie B, Ginsberg J
Soluble Fibrin Degradation Products Potentiate Tissue Plasminogen Activator induced Fibrinogen Proteolysis
J Clin Invest 87: 1082 – 1090 (1991)

200. White HD, Van de Werf F
Thrombolysis for Acute Myocardial Infarction
Circulation 97: 1632 – 1646 (1998)

201. Wikström K, Mattsson C, Sterky C, Pohl G
Tissue Plasminogen Activator Mutants Lacking the Growth Factor Domain and the First Kringle Domain: II – Enzymatic Properties in Plasma and In Vivo Thrombolytic Activity and Clearance Rate in Rabbits
Fibrinolysis 5: 31 – 41 (1991)

202. Wilcox RG, von der Lippe G, Olsson CG, Jensen G, Skene AM, Hampton JR
Effects of alteplase in acute myocardial infarction: 6 – month results from the ASSET study. Anglo – Scandinavian Study of Early Thrombolysis
Lancet 335: 1175 – 1178 (1990)

203. Wilhelm J, Kalyan NK, Lee SG, Hum WT, Rappaport R, Hung PP
Deglycosylation Increases the Fibrinolytic Activity of a Deletion Mutant of Tissue – Type Plasminogen Aktivator
Thromb Haemostas 63: 464 – 471 (1990)

204. Wiman B, Wallén P
The Specific Interaction Between Plasminogen and Fibrin. A Physiological Role of the Lysine Binding Site in Plasminogen
Thromb Res 1: 213 – 222 (1977)

205. Wiman B, Collen D
On the Mechanism of the Reaction between Human α_2 – Antiplasmin and Plasmin
J Bio Chem 254: 9291 – 9297 (1979)

206. Zijlstra F, de Boer JM, Hoorntje J, Stoffer R, Reiber J, Suryapranata H
A Comparison of Immediate Coronary Angioplasty with Intravenous Streptokinase in Acute Myocardial Infarction
N Engl J Med 328: 680 – 684 (1993)

207. Zijlstra F, Hoorntje JC, de Boer MJ, Reiffers S, Miedema K, Ottervanger JP, van´T Hof AW, Suryapranata H
Long – term benefit of primary angioplasty as compared with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction
Eur Heart J 18: 1487-1489 (2000)

208. Zöfel P
Statistik in der Praxis – Uni Taschenbuch Nr. 1293
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 2. Auflage (1988)

7.TABELLARISCHER ANHANG

Tabelle 1: **r - PA – Antigen - und – Aktivitätsverlauf unter Thrombolyse mit 10 + 5 MU r - PA bei sieben Patienten (alle Werte: Median (1. Quartil – 3.Quartil); Wahrscheinlichkeit (probability (p)) eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen r - PA - Antigen (ng/ml) und – Aktivität (ng/ml) zu jedem Abnahmezeitpunkt in Klammern in der jeweils untersten Reihe (WILCOXON – Test für Paardifferenzen); Angaben nur bei p ≤ 0.05; Probengewinnung zu den o. a. Zeitpunkten).**

Parameter	5 Minuten	10 Minuten	15 Minuten	20 Minuten	25 Minuten	30 Minuten	35 Minuten	40 Minuten
r-PA-Ag	3607 (3265-3932)	2450 (2077-2845)	1761 (1647-1901)	1262 (1154-1380)	941 (791-1088)	704 (657-809)	2564 (2138-2922)	1851 (1542-2073)
r-PA-Ak	2127 (1940-2243)	1606 (1428-1780)	1151 (1059-1292)	842 (666-997)	551 (452-650)	466 (359-546)	1558 (1380-1831)	1101 (971-1244)
r-PA-Ag/r-PA-Akt. stat. sign. Diff.?	(p = 0.02)	(p = 0.02)	(p = 0.02)	(p = 0.02)	(p = 0.03)	(p = 0.03)	(p = 0.02)	(p = 0.03)

Parameter	45 Minuten	50 Minuten	60 Minuten	75 Minuten	90 Minuten	2 h
r-PA-Ag	1432 (1271-1521)	1118 (1030-1306)	685 (614-823)	398 (351-466)	275 (224-342)	163 (158-165)
r-PA-Ak	856 (711-973)	651 (578-706)	417 (304-531)	206 (147-239)	117 (82-150)	31 (19-38)
r-PA-Ag/r-PA-Akt. stat. sign. Diff.?	(p = 0.018)	(p = 0.02)	(p = 0.02)	(p = 0.02)	(p = 0.02)	(p = 0.02)

Tabelle 2: r – PA – Antigen – und - Aktivitätsverlauf unter Thrombolyse mit einem 10 + 10 MU r-PA - Bolus bei acht Patienten (alle Werte: Median (1. Quartil - 3. Quartil); Wahrscheinlichkeit (probability (p)) eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen r – PA - Antigen (ng/ml) und – Aktivität (ng/ml) zu jedem Abnahmezeitpunkt in Klammern in der jeweils untersten Reihe (WILCOXON - Test für Paardifferenzen); Angaben nur bei p ≤ 0.05; Probengewinnung zu den o. a. Zeitpunkten).

Parameter	5 Minuten	10 Minuten	15 Minuten	20 Minuten	25 Minuten	30 Minuten	35 Minuten	40 Minuten	45 Minuten
r-PA-Ag (ng/ml)	3370 (2780-3871)	2621 (2316-2924)	2113 (2031-2322)	1619 (1592-1717)	1261 (1158-1347)	938 (918-1039)	4255 (3736-4662)	3792 (3111-4710)	3101 (2623-3820)
r-PA-Ak (ng/ml)	2257 (1842-2565)	1766 (1420-2074)	1260 (1091-1542)	969 (859-1047)	754 (561-955)	604 (466-672)	3343 (2670-3917)	2941 (2385-3637)	2451 (1718-3085)
r-PA-Ag/r-PA-Akt. stat. sign. Diff.?	(p = 0.01)	(p = 0.01)	(p = 0.01)	(p = 0.01)	(p = 0.01)	(p = 0.02)		(p = 0.04)	(p = 0.03)

Parameter	50 Minuten	60 Minuten	75 Minuten	90 Minuten	2h
r-PA-Antigen (ng/ml)	2493 (1986-3223)	1792 (1370-2079)	1039 (772-1144)	665 (511-733)	333 (278-334)
r-PA-Aktivität (ng/ml)	2112 (1625-2548)	1260 (911-1317)	716 (326-767)	399 (229-298)	127 (53-91)
r-PA-Ag/r-PA-Akt. stat. sign. Diff.?				(p = 0.03)	(p = 0.02)

Tabelle 3: r – PA - Antigen- und – Aktivitätsverlauf unter Thrombolyse mit einem intravenös applizierten 15 MU r - PA – Bolus bei neun Patienten (alle Werte: Median (1. Quartil - 3. Quartil); Wahrscheinlichkeit (probability (p)) eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen r - PA - Antigen (ng/ml) und – Aktivität (ng/ml) zu jedem Abnahmezeitpunkt in Klammern in der jeweils untersten Reihe (WILCOXON - Test für Paardifferenzen); Angaben nur bei p ≤ 0.05; Probengewinnung zu den o. a. Zeitpunkten).

Parameter	5 Minuten	10 Minuten	15 Minuten	20 Minuten	25 Minuten	30 Minuten	35 Minuten	40 Minuten	45 Minuten
r-PA-Ag (ng/ml)	5176 (4776-5541)	3772 (3168-4019)	2862 (2258-3459)	2507 (1819-2913)	1804 (1362-2067)	1469 (1047-1901)	1216 (834-1474)	1026 (688-1337)	816 (597-941)
r-PA-Akt. (ng/ml)	2601 (1978-3127)	2023 (1606-2444)	1596 (1147-2201)	1399 (942-1625)	1039 (648-1233)	832 (473-907)	643 (373-689)	582 (380-660)	461 (236-436)
r-PA-Ag/r-PA-Akt. stat. sign. Diff.?	(p = 0.008)	(p = 0.008)	(p = 0.008)	(p = 0.01)	(p = 0.008)	(p = 0.008)	(p = 0.008)	(p = 0.01)	(p = 0.008)

Parameter	50 Minuten	60 Minuten	75 Minuten	90 Minuten	2h
r-PA-Ag (ng/ml)	712 (508-812)	560 (374-756)	422 (262-620)	303 (195-430)	205 (141-233)
r-PA-Akt. (ng/ml)	375 (207-367)	260 (131-256)	205 (66-367)	97 (32-126)	41 (5-54)
r-PA-Ag/r-PA-Akt. stat. sign. Diff.?	(p = 0.008)	(p = 0.008)	(p = 0.01)	(p = 0.008)	(p = 0.008)

Tabelle 4: PAI 1 - Aktivitätsverläufe unter Thrombolyse mit 10 + 5 MU r – PA (n = 7 AMI-Patienten) (alle Werte: Median (1. Quartil - 3. Quartil); Wahrscheinlichkeit (probability (p)) eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen Vorwert und dem entsprechenden Wert zum Zeitpunkt x für jeden Parameter (in der jeweils untersten Reihe) in Klammern (WILCOXON - Test für Paardifferenzen); Angaben nur bei p ≤ 0.5).

Parameter	Vorwerte	30 Minuten	60 Minuten	2h	4h	8h	24h	48h	72h
PAI 1 – Aktivität (aU/ml) in 10 + 5 Gruppe	9.6 (6.5-11.6)	0 (0-0) (p < 0.02)	0 (0-0) (p < 0.02)	5.5 (0-6.8)	17.4 (5.6-29)	11 (0-22.6)	17.2 (6.9-28.2)	16.6 (11.1-17.5)	15.1 (11.3-15.7)
	Vorwerte vs. 60 Minuten - Werte: p = 0.018 60 Minuten - Werte vs. 8h - Werte: p = 0.11 60 Minuten - Werte vs. 24h - Werte: p = 0.03 60 Minuten - Werte vs. 48h - Werte: p = 0.018								

Parameter	6d	9d	12d	15d	18d
PAI 1 – Aktivität (aU/ml) in 10 + 5 Gruppe	9.2 (3.6-12.6)	11.1 (8-11.1)	14.5 (10.5-20.5)	15 (10-18)	8.2 (4.9-11.8)

Tabelle 5: PAI 1 - Aktivitätsverläufe unter Thrombolyse mit intravenös applizierten 10 + 10 MU r - PA bei acht Patienten (alle Werte: Median (1. Quartil - 3. Quartil); Wahrscheinlichkeit (probability (p)) eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen Vorwert und dem entsprechenden Wert zum Zeitpunkt x für jeden Parameter (in der jeweils untersten Reihe) in Klammern (WILCOXON - Test für Paardifferenzen); Angaben nur bei p ≤ 0.05).

Parameter	Vorwerte	30 Minuten	60 Minuten	2h	4h	8h	24h	48h	72h
PAI 1 - Aktivität (aU/ml) in 10 + 10 - Gruppe	12.1 (6.1-16.7)	0 (0-0) (p < 0.02)	0 (0-0) (p < 0.02)	1 (0-0) (p < 0.02)	18.3 (11.9-26.1)	19.6 (6.6-33.1)	21.6 (18.4-27.2)	9 (7.8-12.6)	14.7 (11-16.1)
	Vorwerte vs. 60 Minuten - Werte: p = 0.018 Vorwerte vs. 2h - Werte: p = 0.018 60 Minutenwerte vs. 8 Stundenwerte: p = 0.018 60 Minutenwerte vs. 24 Stundenwerte: p = 0.018								

Parameter	6d	9d	12d	15d	18d
PAI 1 - Aktivität (aU/ml) in 10 + 10 -Gruppe	13.9 (8-16.7)	14.5 (10.2-19.3)	9.7 (7.1-10.3)	15.5 (13.2-16)	12.9 (11.6-14.1)

<u>Tabelle 6</u>: Zeitlicher Verlauf der PAI 1 - Aktivitäten unter Thrombolyse mit 15 MU r-PA bei neun Patienten (alle Werte: Median (1. Quartil - 3. Quartil); Wahrscheinlichkeit (probability (p)) eines statistisch signifikanten Unterschieds zwischen Vorwert und dem entsprechenden Wert zum Zeitpunkt x für jeden Parameter (in der jeweils untersten Reihe) in Klammern (WILCOXON -Test für Paardifferenzen); Angaben nur bei p ≤ 0.05).

Parameter	Vorwerte	30 Minuten	60 Minuten	2h	4h	8h	24h	48h	72h
PAI 1 - Aktivität (aU/ml) in der 15 MU - Gruppe	18.3 (11-26)	0 (0-0) (p = 0.01)	0 (0-0) (p = 0.01)	4 (0-0) (p < 0.02)	15.4 (5.2-29.9)	18.3 (10-29)	20 (13.2-26)	13.1 (9.7-14)	16.4 (12-22.8)
	Vorwerte vs. 60 - Minutenwerte: p = 0.012 60 - Minutenwerte vs. 4 - Stundenwerte: p = 0.018 60 - Minutenwerte vs. 8 - Stundenwerte: p = 0.012 60 - Minutenwerte vs. 24 - Stundenwerte: p = 0.008								

Parameter	6d	9d	12d	15d	18d
PAI 1 - Aktivität (aU/ml) in der 15MU - Gruppe	11.6 (7.7-14)	11.6 (9-12.7)	10.6 (7-13.1)	9.2 (5.8-13)	9.8 (7.5-13.2)

8. DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung meiner Dissertation gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. E. Seifried, ein ganz besonderer Dank. Zu keiner Zeit liessen seine Ermunterungen und Hilfestellungen während der praktischen Durchführung und wissenschaftlichen Ausarbeitung der Promotionsarbeit nach.

Viele hilfreiche Anregungen hatte ich ebenso von Herrn Dr. M. Müller bekommen, der mir immer mit seinem Rat zur Seite stand und jederzeit ein offenes Ohr hatte.

Für die Einführung in die Methodik der Laborarbeit danke ich allen Mitarbeiterinnen des Gerinnungslabors.

Ganz herzlich möchte ich meiner Frau Gülay Güloglu danken, die mir wertvolle Aufmunterung spendete. Meine Dankbarkeit gilt ebenso meinen Eltern für die jahrelange Unterstützung, ohne deren Unterstützung das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.