

Methoden zur Bestimmung von Thrombininhibitoren

Methods for the determination of thrombin inhibitors

Gerd Hafner^{1,*} und Dirk Peetz²

¹ Zentrum für Labormedizin und Mikrobiologie, Essen, Deutschland

² Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz, Deutschland

Zusammenfassung

Thrombininhibitoren sind als Antikoagulans für spezielle Indikationen zur Therapie zugelassen. Studien, in denen diese Medikamente mit anderen Antikoagulantien verglichen wurden, zeigten z.B. auch bei Patienten mit Myokardinfarkt, instabiler Angina, tiefer Venenthrombose, disseminierter intravasaler Gerinnung und extrakorporaler Zirkulation Vorteile. Bei therapeutischer Dosierung ist ein Monitoring notwendig, für welches die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) und Modifikationen der aktivierten Gerinnungszeit (ACT) verwendet wurden. In vielen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Tests nicht sensitiv genug sind, um Spiegel im therapeutischen oder toxischen Bereich zu überwachen. Die Tests weisen bei gleicher Dosierung große interindividuelle Schwankungen auf, weswegen häufig eine Ratio angegeben wird. Die Korrelation mit den Ergebnissen der Ecarin-Gerinnungszeit (ECT), enzymimmunologischen und chromogenen Substrattests ist schlecht. Eine Bestimmung der Plasmaspiegel mit Hilfe chromogener Substrattests ist an Analysatoren oder als Bedside-Methode mit kleinen Photometern möglich. Diese Tests sind sehr präzise, weisen einen weiten Messbereich auf und werden nicht durch Heparin und Antithrombin gestört. Sie zeigen eine gute Korrelation mit der ECT. Die ECT kann aus Vollblut oder Plasma bestimmt werden, abhängig davon, ob eine mechanische oder eine optische Detektion der Gerinnungszeit verwendet wird. Die ECT kann ebenfalls als Bedside-Methode durchgeführt werden. Die Impräzisionen und der Messbereich des Tests sind mit denen der chromogenen Methoden vergleichbar. Testeinschränkungen sind nicht bekannt.

*Korrespondenz: Prof. Dr. Gerd Hafner, Zentrum für Labormedizin und Mikrobiologie, ZLM GmbH, Herwarthstr. 100, 45138 Essen, Deutschland
Tel.: +49 (0)201 897 3060
Fax.: +49 (0)201 897 3009
E-mail: g.hafner@elisabeth-essen.de

Chromogene Tests oder die ECT sind für das Monitoring der Therapie mit Thrombininhibitoren am besten geeignet. Die APTT sollte nur dann verwendet werden, wenn keine anderen Methoden verfügbar sind.

Schlüsselwörter: aktivierte partielle Thromboplastinzeit; chromogener Substrattest; Ecarin-Gerinnungszeit; therapeutisches Drugmonitoring; Thrombininhibitoren.

Abstract

Direct thrombin inhibitors are licensed for anticoagulant therapy in several indications. The results of studies comparing these drugs with other antithrombotics also indicate a benefit in patients with myocardial infarction, unstable angina, deep venous thrombosis, disseminated intravascular coagulation, and during extracorporeal circulation. It has been shown that the various indications for this agent require a monitoring of blood levels. Activated partial thromboplastin time (APTT) and modifications of activated clotting time (ACT) have been used for this purpose. However, it could be demonstrated that these methods cannot be adapted to the monitoring of thrombin inhibitors because they are not sensitive enough to measure relevant blood levels in the therapeutic or toxic range and individual values vary too much. The correlation with the results of ecarin clotting time (ECT) and enzyme immunological and chromogenic substrate assays is poor. Direct measurement of thrombin inhibitor plasma levels using chromogenic substrates can be performed with automated analyzers and with small photometers as a bedside method. These tests are very precise, offer a wide measuring range and are not disturbed by heparin and antithrombin. Chromogenic substrate assays show a good correlation with the ECT. Depending on whether mechanical or optical measurement of clotting time is used, the ECT can be performed in whole blood or plasma. The performance of ECT measurement also allows bedside monitoring. Test characteristics like imprecision and measuring range are comparable to the results of chromogenic substrate assays. Limitations of ECT monitoring are not known. In conclusion, the use of chromogenic substrate or ECT measurement is the best approach for monitoring thrombin inhibitor levels. APTT should be determined if other methods are not available.

Keywords: activated partial thromboplastin time; chromogenic substrate assay; ecarin clotting time; therapeutic drug monitoring; thrombin inhibitors.

Einleitung

Vor fast zehn Jahren sind Thrombininhibitoren (TI), insbesondere rekombinantes Hirudin (r-Hirudin) und Argatroban, erstmals als Antikoagulantien für spezielle Indikationen zur Therapie zugelassen worden. Diese und andere Präparate (z.B. Melagatran) sind in zahlreichen Untersuchungen getestet worden, so dass ausreichend Erfahrungen vorhanden sind, die zeigen, dass eine Therapie nicht in jedem Falle ohne ein Monitoring auskommt [1–9]. Nicht notwendig ist eine Therapieüberwachung während einer Thromboseprophylaxe bei Patienten ohne Gegenanzeigen und ohne Einnahme weiterer Medikamente [10].

Werden hingegen Patienten mit Leberfunktionsstörungen oder unter Kombinationstherapie mit oralen Antikoagulantien behandelt oder bei Anwendung der Präparate im Kindesalter ist eine Therapieüberwachung unerlässlich. Ebenfalls notwendig ist das Monitoring schon bei mäßiger Nieren- und Leberfunktionseinschränkung, da r-Hirudin renal bzw. Argatroban hepatisch eliminiert werden [11, 12]. Eine Kumulation z.B. des r-Hirudins im Blut um mehr als das 20-fache (Plasmahalbwertszeit bei normaler Nierenfunktion: 1–2 h) ist je nach Schweregrad der Nierenerkrankung zu beobachten [13, 14]. Aber auch bei Patienten unter Behandlung mit Plättchenaggregationshemmern und/oder nichtsteroidalen Antirheumatika sind TI mit Vorsicht anzuwenden, da vergleichbar mit anderen antikoagulatorisch wirksamen Medikamenten auch bei Verwendung von TI mit einem erhöhten Blutungsrisiko zu rechnen ist. Hinzu kommt, dass alle thrombinabhängigen Tests (z.B. Quick, APTT, TZ, Einzelfaktoren, Inhibitoren) bereits durch niedrige TI-Dosierungen gestört werden, so dass auch aus diagnostischen Gründen die Kenntnis der Plasmaspiegel zur Interpretation dieser Befunde hilfreich ist [15].

Aufgrund des engen therapeutischen Bereiches der TI sind Überdosierungen nicht immer zu vermeiden, so dass nur unter Therapiekontrolle rasche Dosisanpassungen durchgeführt werden können [1–3]. Problematisch ist, dass keine Antidote verfügbar sind. Ein solches Antidot zur Neutralisierung der TI-Wirkung stünde im Falle des r-Hirudins in Form von Meizothrombin oder eines Meizothrombinderivates prinzipiell zur Verfügung und könnte auch in seiner Wirksamkeit durch das Monitoring nachgewiesen werden. Die Substanzen sind jedoch kommerziell nicht erhältlich [16]. Zur Neutralisation anderer TI gibt es keine Antidote. Zur schnellen TI-Elimination aus dem Blut sind zurzeit nur die Hämofiltration oder eine Hämodialyse mit Highflux-Dialysatoren geeignet [11, 17].

Da in den Fachinformationen der Medikamentenhersteller detaillierte Angaben zur Therapiekontrolle enthalten sind, wird die Notwendigkeit für das Monitoring der

Therapie mit TI zusätzlich untermauert. Die Empfehlungen bezüglich des Testverfahrens sind einheitlich und sehen die Durchführung der APTT vor [18, 19]. Aufgrund der Bedeutung des Therapiemonitorings bei Verwendung von TI und der Vielzahl an Methoden zum Nachweis des Medikamentes stellte sich schon sehr früh die Frage, ob die APTT tatsächlich ein geeigneter Test zur Kontrolle der TI-Therapie ist [20, 21].

Prinzipiell stehen folgende Testverfahren zur Verfügung:

- Globaltests
 - Thrombinzeit (TZ) und quantitative Thrombinzeit (QTT)
 - aktivierte Gerinnungszeit (ACT)
 - aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT)
- immunologische Tests (ELISA)
- Thrombinhemmtests
 - chromogener Substrattest
 - Ecarin-Gerinnungszeit (ECT) und ECT-Modifikationen

Grenzen des bisherigen Monitorings mit Globaltests

Parallel zu den Untersuchungen über den Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Hirudins wurde von Markwardt und Mitarbeitern bereits in den Fünfzigerjahren eine Bestimmungsmethode für Hirudin beschrieben [22, 23]. Sie verwendeten eine Thrombintitrationsmethode, bei der die hirudinhaltige Lösung mit Citratplasma und steigenden Mengen einer kalibrierten Thrombinlösung bis zum Eintritt der Gerinnung versetzt wurde. Da viele Thrombinhandelspräparate nicht nur aus reinem α -Thrombin bestehen, sondern auch Autolyseprodukte enthalten, die zwar Hirudin binden, aber keine Gerinnung auslösen, wurden die Titrationstests durch amidolytische Verfahren (chromogene Substrattests) abgelöst [24–26].

Bei klinischen Untersuchungen (Thrombolyse bei Myokardinfarkt [1–3], Thromboseprophylaxe [10], Hämodialyse [13, 14], instabile Angina pectoris und perkutane transluminale Koronarangioplastie [18, 19, 27], Therapie tiefer Venenthrombosen [28], disseminierte intravasale Gerinnung [29], kardiochirurgische Eingriffe [30, 31]) wurden zur Kontrolle und Steuerung der Therapie mit TI mehrheitlich Globaltests verwendet, neben der aktivierten Gerinnungszeit (ACT) insbesondere die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) [30]. Betrachtet man jedoch die Dosis-Wirkungsbeziehung der TI-Plasmaspiegel zu den Sekundenzeiten der Globaltests, so erkennt man, dass ein linearer Zusammenhang bei der ACT völlig fehlt und bei der APTT nicht über einen weiten Messbereich gegeben ist [21, 30–33]. Bereits bei mittleren therapeutischen Spiegel (bei r-Hirudin $>0,6$ mg/L) ist im Gegensatz zu amidolytischen Tests und der ECT der APTT-Anstieg nicht mehr linear, so dass genaue Mess-

werte bei höheren TI-Konzentrationen wegen der geringen Sensitivität nicht erwartet werden können [33]. Dieses in mehreren Studien nachgewiesene Problem ist unter anderem auf die großen interindividuellen Schwankungen im Ansprechen auf die Medikamente zurückzuführen [20, 21, 34].

Diese Schwierigkeiten hat man durch Verwendung der APTT-Ratio (das Vielfache der Ausgangsmesszeit) zu umgehen versucht und konnte auch gute Ergebnisse erzielen [35]. Im Gegensatz dazu zeigten aber andere in vitro- wie in vivo-Untersuchungen, dass sich die APTT-Ratio bei Zusatz von Hirudin zu Normalplasma ebenfalls nicht linear zur Hirudin-Konzentration verhält [21, 34]. Nur geringe Steigerungen werden im Hochdosis-Bereich, z.B. bei r-Hirudin oberhalb von 1,0 mg/L, beobachtet. Erst bei einer doppeltlogarithmischen Darstellung erhält man eine lineare Beziehung zwischen der APTT-Ratio und der TI-Konzentration, jedoch nicht über den gesamten therapeutischen Bereich [21, 34]. Da nicht selten höhere Spiegel auftreten, kann diese Art der Bestimmung und ihre Form der Auswertung nicht als problemgerecht angesehen werden. Ein weiterer Nachteil der APTT-Ratio im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Messergebnisse liegt in den zum Teil erheblichen Abweichungen bei Verwendung unterschiedlicher Reagenzien [25, 34]. Hiervon sind neuere APTT-Reagenzien nicht ausgenommen. Bei r-Hirudin-Konzentrationen von 1,5 mg/L können je nach Reagenz APTT-Ratios von 2 bis fast 3,5 erreicht werden. Es ist bekannt, dass in einem Kontrollkollektiv unter Heparinmedikation ausgeprägtere Verlängerungen der APTT gemessen werden als unter einer gleich effektiven TI-Therapie [19, 36–38].

Eine etwas bessere Linearität der Dosis-Wirkungsbeziehung für die APTT findet sich bei Argatroban. In einer Untersuchung von Francis und Hursting zeigen 21 kommerzielle APTT-Reagenzien über den gesamten Messbereich einen nahezu linearen Anstieg der APTT (bei doppelt logarithmischer Darstellung). Jedoch besteht auch bei Argatroban das Problem, dass unterschiedliche APTT-Reagenzien sehr unterschiedlich sensitiv auf den TI reagieren. So kann eine APTT-Ratio von 3,0 in Abhängigkeit vom verwendeten Reagenz bei Argatroban-Konzentrationen von 1,0 bis 2,5 $\mu\text{g/mL}$ gefunden werden [58].

Da die APTT nicht als idealer Test für die Kontrolle und Steuerung der TI-Therapie gelten kann, können auch von der Bestimmung der ACT keine besseren Ergebnisse erwartet werden. Diese sehr einfach durchzuführende Methode wurde im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe mit extrakorporaler Zirkulation untersucht [30, 31, 34]. Übereinstimmend kommen die Untersucher zum Schluss, dass die ACT-Ratio wegen der sehr schlechten Beziehung zu den TI-Plasmaspiegeln für das Monitoring ungeeignet ist, obwohl Plasmakonzentrationen (bei r-Hirudin bis 6 mg/L) erfasst werden können. Auch die konventionelle TZ ist wegen eines massiven Anstiegs der Gerinnungszeit bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen und einer fehlenden linearen Dosis-Wirkungsbe-

ziehung zu den TI-Plasmakonzentrationen für das Monitoring nicht geeignet [33].

Wesentlich sensitiver sind immunologische Nachweisverfahren, die zur Bestimmung der r-Hirudin-Plasmakonzentration in wenigen Studien neben der APTT Verwendung fanden [37]. Diese Tests, die als Sandwich- wie auch als kompetitive ELISA-Methoden mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern verfügbar sind, zeichnen sich durch eine gute Reproduzierbarkeit (Intraassay-Impräzisionen $<4\%$, Interassay-Impräzisionen $<7\%$) und eine gute Wiederfindung (92–107%) aus [39–43]. Der Sandwich-Assay deckt einen weiten Messbereich (0,1–5,0 mg/L) ab, während die kompetitive Methode sehr sensitiv im niedrigen Konzentrationsbereich (0,02–1,0 mg/L) ist [43]. Nachteilig sind bei beiden Methoden die langen Messzeiten ($>1,5$ h) und die Tatsache, dass sie nicht rund um die Uhr durchgeführt werden können.

Optimierung des Monitorings durch automatisierte TI-Bestimmungen

Die APTT war in allen klinischen Studien die Nachweismethode der Wahl, obwohl Thrombinhemmtests schon früh zur Verfügung standen. Der erste Test, mit dem TI aus Plasmaproben unter Verwendung chromogener Substrate nachgewiesen werden konnten, wurde bereits 1982 von Markwardt beschrieben [45]. Die Reaktion des Thrombins mit Hirudin in Gegenwart des Substrates Chromozym TH in verdünnten Plasmaproben reduzierte die interferierenden Effekte von Fibrinogen und Antithrombin und war über einen weiten Messbereich (10 mg/L) linear. In verschiedenen pharmakologischen Studien mit natürlichem und rekombinantem Hirudin erwies sich diese Methode in humanen wie auch in Tier-Untersuchungen als sehr zuverlässig [46, 47]. Durch weitere Optimierungen in der Testdurchführung (z.B. Zugabe von Aprotinin und Polypren) sind chromogene Substratassays heute die am wenigsten störanfälligen Methoden zum Nachweis von TI im Plasma [48, 49]. Sie eignen sich zur Bestimmung von TI in allen Körperflüssigkeiten und korrelieren mit der HPLC-Bestimmung des reinen Wirkstoffs [50]. Darüber hinaus ermöglichen Adaptationen des amidolytischen Tests an Analytoren eine zeitnahe und kostengünstige Erstellung der Messergebnisse (<15 min.) [51].

Da interindividuelle Schwankungen bei diesen Bestimmungen in viel geringerem Maße beobachtet werden als bei der Messung der APTT, eignen sich die amidolytischen Tests besser zum Therapiemonitoring. Dies gilt insbesondere für die automatisierten Methoden [51]. Wird das Thrombinreagenz als Startreagenz nach Zugabe des chromogenen Substrates zum Plasma eingesetzt, kann eine mögliche Beeinflussung des Testergebnisses durch die langsamer ablaufende Inhibition über den Heparin-Antithrombin-Komplex vernachlässigt werden. Impräzisionen von Tag zu Tag mit VKs $<5\%$ und ein

Messbereich, der sich bei non-linearer Kalibration und geringem Probenvolumen (<15 µL) von 0,2 bis 4,0 mg/L TI im Plasma erstreckt, erweisen sich im Vergleich zur APTT als weit überlegen. Durch Modifikation des Probenvolumens lässt sich die Empfindlichkeit des Tests im unteren wie im oberen Messbereich erweitern. Die Messergebnisse der amidolytischen Assays sind mit den Resultaten immunologischer Tests gut vergleichbar. Der Methodenvergleich mit einer ELISA-Methode in einer eigenen Untersuchung ergab einen sehr guten Korrelationskoeffizienten ($r=0,964$, $n=323$) [51].

Ebenso wie die meisten immunologischen Tests erfasst dieser Thrombininhibitionstest keine TI-Thrombin-komplexe. Wie aus in vitro- und in vivo-Experimenten im Tiermodell bekannt ist, spielt der TI-Anteil in den TI-Thrombinkomplexen keine Rolle, da seine Konzentration nur etwa 1% der Plasmakonzentration des freien TI beträgt [44, 52].

Eine Alternative zu den chromogenen Substratassays ist ein koagulometrischer Thrombinhemmtest, die Ecarin-Gerinnungszeit (ECT) [33, 53]. Die ECT ist eine schnelle und sensitive Methode zur Bestimmung von TI in Vollblut und Plasma. Die Bestimmung in anderen Körperflüssigkeiten erfordert den Zusatz eines Standardplasmas [33]. Im ECT-Test wird ein gereinigtes Enzym der Echis carinatus-Schlange verwendet, das als Prothrombinaktivator fungiert [33]. Im Gegensatz zur Prothrombinase entstehen bei der Ecarin-induzierten Prothrombinaktivierung ohne Zuhilfenahme von Kofaktoren Intermediärprodukte wie z.B. das Meizothrombin [54]. Im Vergleich zum Thrombin besitzt das Meizothrombin eine deutlich geringere prokoagulatorische Aktivität, bindet aber ebenso rasch TI und wird dadurch inhibiert. Über Meizothrombin wird nach Neutralisation des in der Probe vorhandenen TIs der Gerinnungsprozess angestoßen, da durch Autokatalyse bzw. in Gegenwart von Spuren der Faktoren Xa und Va sehr schnell α -Thrombin entsteht [54]. Die Ecarin-induzierte Aktivierung des Prothrombins ist unabhängig von der Anwesenheit gerinnungsfördernder Phospholipide [55].

Zur Testdurchführung werden 100–200 µL Plasma oder Vollblut mit 20–50 µL Ecarin (4–10 U/mL) versetzt und die Gerinnungsbildung wird in weniger als 5 min. detektiert [33, 53]. Das Testergebnis kann als Messzeit in Sekunden, als Ecarinzeit-Ratio oder als TI-Konzentration angegeben werden. Die Impräzisionen von Tag zu Tag liegen mit 5–6% VK nur geringfügig über denen der chromogenen Assays [53]. Die Korrelation zwischen der ECT-Prolongation (Plasma) und der TI-Konzentration im Plasma zwischen 0,05 und 5 mg/L ist gut ($r=0,94$). Dies erlaubt nicht nur die Überwachung therapeutischer Plasmaspiegel, sondern auch die Erkennung möglicher Unter- oder Überdosierungen des Medikamentes. Die ECT ist nicht unabhängig von Verminderungen der Fibrinogenkonzentration (bis 750 mg/L) und der Prothrombinaktivität (bis 40%) im Plasma [53, 56]. Eine 1+1-Verdünnung eines Normalplasmapools mit der Patientenprobe kann jedoch eine Beeinflussung des

Testergebnisses durch erniedrigte Fibrinogen- und/oder Prothrombinspiegel in der Probe aufheben. Heparin ist nicht in der Lage, eine Inhibition des Meizothrombins durch Antithrombin zu katalysieren. Daher ist die Bestimmung von TI im Blut auch in Gegenwart hoher Heparindosen (bis 2 IU/mL) möglich. Ein weiterer Vorteil dieser Bestimmungsmethode ist, dass sie ohne Schwierigkeiten an Gerinnungsanalytoren adaptiert werden kann. Die Kalibrationskurve ist an den Geräten über mehrere Wochen stabil. Durch Auftauen von tiefgefrorenen Portionen des Testreagenzes (bei -70°C , haltbar mindestens 6 Monate) kann bei Testanforderung rasch und kostengünstig eine Bestimmung durchgeführt werden.

Die ECT wurde mit Hilfe entsprechender Cartridges auch an Point-of-Care-Test-Systemen (POCT) etabliert. Diese Testsysteme sind der Automaten-adaptierten ECT in ihren klinisch-chemischen Eigenschaften jedoch unterlegen (eigene unveröffentlichte Daten).

Eine interessante Variante der ECT ist der Ecarin Chromogenic Assay (ECA) [57]. Mit diesem Test werden die Nachteile der ECT umgangen, da Meizothrombin anstelle von Fibrinogen ein chromogenes Substrat umsetzt. Außerdem wird exogenes humanes Prothrombin über den Reaktionspuffer im Testansatz verwendet, so dass die Bestimmung vom endogenen Prothrombingehalt unabhängig ist. Durch entsprechende Adaptation der Methode können sowohl Hirudin als auch andere direkte Thrombininhibitoren gemessen werden. Die Validationsdaten zeigen, dass es sich um einen schnell durchführbaren, präzisen (VK <4%) und über einen weiten Messbereich (0,1–3,0 mg/L für r-Hirudin) linearen Test handelt [57]. Ebenso wie die ECT kann auch der ECA als POCT-Methode verwendet werden.

Eine optimal angepasste TI-Therapie in der klinischen Praxis ist am effektivsten über das Monitoring mit automatisierten amidolytischen oder ECT-Tests möglich, da sie im Vergleich zur APTT präzise sind, die klinische Situation besser wiedergeben und weit weniger interindividuelle Schwankungen aufweisen. Dadurch können unnötige Dosisadaptationen vermieden werden.

Literatur

1. Antman EM. Hirudin in acute myocardial infarction – safety report from the thrombolysis and thrombin inhibition in myocardial infarction (TIMI) 9A trial. *Circulation* 1994;90:1624–30.
2. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIA Investigators. Randomized trial of intravenous heparin versus recombinant hirudin for acute coronary syndromes. *Circulation* 1994;90:1631–7.
3. Topol EJ, Bonan R, Jewitt D, Sigwart U, Kakkar VV, Rothman M, et al. Use of a direct antithrombin, Hirulog, in place of heparin during coronary angioplasty. *Circulation* 1993;87:1622–9.
4. Berry CN, Girardot C, Lecoffre C, Lunven C. Effects of the synthetic thrombin inhibitor argatroban on fibrin- or clotin-

- corporated thrombin: comparison with heparin and recombinant hirudin. *Thromb Haemost* 1994;72:381–6.
5. Lewis BE, Wallis DE, Leya F, Hursting MJ, Kelton JG. Argatroban anticoagulation in patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Arch Intern Med* 2003;163:1849–56.
 6. Swan SK, Hursting MJ. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of argatroban: effects of age, gender, and hepatic or renal dysfunction. *Pharmacotherapy* 2000;20:318–29.
 7. Eriksson H, Eriksson UG, Frison L, Hausson PO, Held P, Holmström M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of melagatran, a novel synthetic LMW thrombin inhibitor, in patients with acute DVT. *Thromb Haemost* 1999;81:358–63.
 8. Gustafsson D, Elg M. The pharmacodynamics and pharmacokinetics of the oral direct thrombin inhibitor ximelagatran and its active metabolite melagatran: a mini-review. *Thromb Res* 2003;109(Suppl 1):S9–15.
 9. The Direct Thrombin Inhibitor Trialists' Collaboration Group. Direct thrombin inhibitors in acute coronary syndromes: principal results of a meta-analysis based on individual patients' data. *Lancet* 2002;359:294–302.
 10. Eriksson BI, Ekman S, Kälebo P, Zachrisson B, Bach D, Close P. Prevention of deep-vein thrombosis after total hip replacement: direct thrombin inhibition with recombinant hirudin, CGP 39393. *Lancet* 1996;347:635–9.
 11. Nowak G, Bucha E, Göck T, Thieler H, Markwardt F. Pharmacology of r-hirudin in renal impairment. *Thromb Res* 1992;66:707–15.
 12. Di Nisio M, Middeldorp S, Büller HR. Direct thrombin inhibitors. *N Engl J Med* 2005;353:1028–40.
 13. Bucha E, Markwardt F, Nowak G. Hirudin in haemodialysis. *Thromb Res* 1990;60:445–55.
 14. Vanholder R, Camez A, Veys N, Soria J, Mirshahi MC, Soria C, et al. Recombinant hirudin: a specific thrombin inhibiting anticoagulant for hemodialysis. *Kidney Int* 1994;45:1754–9.
 15. Lindhoff-Last E, Mosch G, Ehrly AM, Bauersachs R. The influence of recombinant hirudin on clotting- and chromogenic coagulation assays. [Abstract] *Ann Hematol* 1999;78(Suppl 1):A77.
 16. Irani MS, White HJ, Sexon RG. Reversal of hirudin-induced bleeding diathesis by prothrombin complex concentrate. *Am J Cardiol* 1995;75:422–3.
 17. Bauersachs RM, Lindhoff-Last E, Ehrly M, Betz C, Geiger H, Hauser IA. Treatment of hirudin overdose in a patient with chronic renal failure. [Letter] *Thromb Haemost* 1999;81:323–4.
 18. van den Bos AA, Deckers JW, Heyndrickx GR, Laarman GJ, Suryapranata H, Zijlstra F, et al. Safety and efficacy of recombinant hirudin (CGP 39393) versus heparin in patients with stable angina undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 1993;88:2058–66.
 19. Zoldhelyi P, Webster MWI, Fuster V, Grill DE, Gaspar D, Edwards SJ, et al. Recombinant hirudin in patients with chronic, stable coronary artery disease. Safety, half-life, and effect on coagulation parameters. *Circulation* 1993;88:2015–22.
 20. Verstraete M, Nurmohamed M, Kienast J, Siebeck M, Silling-Engelhardt G, Büller H, et al. Biological effects of recombinant hirudin (CGP 39393) in human volunteers. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:1080–8.
 21. Nurmohamed MT, Berckmans RJ, Morrien-Salomons WM, Berends F, Hommes DW, Rijnierse JJMM, et al. Monitoring anticoagulant therapy by activated partial thromboplastin time: hirudin assessment. *Thromb Haemost* 1994;72:685–92.
 22. Markwardt F. Untersuchungen über den Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Hirudins. N.-S. *Arch Pharmacol* 1956;229:389–99.
 23. Markwardt F, Walsmann P. Die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin. *Hoppe-Seyler's Z physiol Chem* 1958;312:85–98.
 24. Griesbach U, Stürzebecher J, Markwardt F. Assay of hirudin in plasma using a chromogenic thrombin substrate assay. *Thromb Res* 1985;37:347–50.
 25. Walsmann P. Einsatz von Hirudin zur Diagnostik von Gerinnungsvorgängen und Thrombin-induzierten Zellreaktionen. *Hämostaseologie* 1991;11:107–13.
 26. Spannagl M, Bichler J, Birg A, Lill H, Schramm W. Development of a chromogenic substrate assay for the determination of hirudin in plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991;2:121–7.
 27. Organisation to Assess Strategies for Ischemic Syndromes (OASIS-2) Investigators. Effects of recombinant hirudin (lepirudin) compared with heparin on death, myocardial infarction, refractory angina, and revascularisation procedures in patients with acute myocardial ischaemia without ST elevation: a randomised trial. *Lancet* 1999;353:429–38.
 28. Schiele F, Vuilleminot A, Kramarz P, Kieffer Y, Soria J, Camez A, et al. A pilot study of subcutaneous recombinant hirudin (HBW 023) in the treatment of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* 1994;71:558–62.
 29. Nowak G, Markwardt F. Hirudin in disseminated intravascular coagulation. *Haemostasis* 1991;21(Suppl 1):142–8.
 30. Koza MJ, Walenga JM, Fareed J, Pifarre R. A new approach in monitoring recombinant TI during cardiopulmonary bypass. *Semin Thromb Hemost* 1993;19:90–6.
 31. Pötzsch B, Madlener K, Seelig C, Riess CF, Greinacher A, Müller-Berghaus G. Monitoring of r-hirudin anticoagulation during cardiopulmonary bypass assessment of the whole blood ecarin clotting time. *Thromb Haemost* 1997;77:920–5.
 32. Tripodi A, Chantarangkul V, Arbini AA, Moia M, Mannucci PM. Effects of hirudin on activated partial thromboplastin time determined with ten different reagents. *Thromb Haemost* 1993;70:286–8.
 33. Nowak G, Bucha E. Quantitative determination of hirudin in blood and body fluids. *Semin Thromb Hemost* 1996;22:197–202.
 34. Walenga JM, Bakhos M, Messmore HL, Koza M, Wallock M, Orfei E, et al. Comparison of recombinant hirudin and heparin as an anticoagulant in a cardiopulmonary bypass model. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991;2:105–11.
 35. Gray E, Harenberg J. Collaborative study on monitoring methods to determine direct thrombin inhibitors lepirudin and argatroban. *J Thromb Haemost* 2005;3:2096–7.
 36. Lidon RM, Theroux P, Juneau M, Adelman B, Maraganore J. Initial experience with a direct antithrombin, hirulog, in unstable angina. Anticoagulant, antithrombotic, and clinical effects. *Circulation* 1993;88:1495–501.
 37. Rupprecht HJ, Terres W, Özbek C, Luz M, Jessel A, Hafner G, et al. Recombinant hirudin (HBW 023) prevents troponin-T release after PTCA in patients with unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1637–42.
 38. Hafner G, Rupprecht HJ, Luz M, Terres W, Schindel F, Friesen HJ, et al. Recombinant hirudin as a periprocedural antithrombotic in coronary angioplasty for unstable angina pectoris. *Eur Heart J* 1996;17:1207–15.

39. Spinner S, Stöffler G, Fink E. Quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for hirudin. *J Immunol Meth* 1986;87:79–83.
40. Bichler J, Fichtl B, Siebeck M, Fritz H. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hirudin in man after single subcutaneous and intravenous bolus administration. *Arzneimittel Forschung* 1988;38:704–10.
41. Spinner S, Scheffauer F, Maschler R, Stöffler G. A hirudin catching ELISA for quantitating the anticoagulant in biological fluids. *Thromb Res* 1988;51:617–25.
42. Schlaeppi JM, Vekemans S, Rink H, Chang JY. Preparation of monoclonal antibodies to hirudin and hirudin peptides. A method for studying the hirudin-thrombin interaction. *Eur J Biochem* 1990;188:463–70.
43. Iyer L, Adam M, Amiral J, Fareed J, Bermes E. Development and validation of two enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods for recombinant hirudin. *Semin Thromb Hemost* 1995;21:184–92.
44. Berscheid G, Grötsch H, Neubauer H, Pünter J, Reindl J, Seipp P. Determination of r-DNA hirudin and a human thrombin-hirudin complex in plasma samples: enzyme linked immunosorbent assays for hirudin and complex vs. chromogenic thrombin substrate assay. *Thromb Res* 1992;66:33–42.
45. Markwardt F, Hauptmann J, Nowak G, Klessen C, Walsmann P. Pharmacological studies on the antithrombotic action of hirudin in experimental animals. *Thromb Haemost* 1982;47:226–9.
46. Markwardt F, Nowak G, Stürzebecher J, Griessbach U, Walsmann P, Vogel G. Pharmacokinetics and anticoagulant effect of hirudin in man. *Thromb Haemost* 1984;52:160–3.
47. Markwardt F, Nowak G, Stürzebecher J, Vogel G. Clinico-pharmacological studies with recombinant hirudin. *Thromb Res* 1988;52:393–400.
48. Degryse E. Determination of the specific activity of recombinant hirudin. *Thromb Res* 1990;60:433–43.
49. Stürzebecher J. Methods for determination of hirudin. *Semin Thromb Hemost* 1991;17:99–102.
50. Grötsch H, Damm D, Ben Yussef R, Härtel D. Comparison of two methods for the determination of rDNA-hirudin in plasma samples: HPLC vs a chromogenic thrombin substrate assay. *Thromb Res* 1991;64:273–7.
51. Hafner G, Fickinscher K, Friesen HJ, Rupprecht HJ, Konheiser U, Ehrental W, et al. Evaluation of an automated chromogenic substrate assay for the rapid determination of hirudin in plasma. *Thromb Res* 1995;77:165–73.
52. Bichler J, Siebeck M, Maschler R, Pelzer H, Fritz H. Determination of thrombin-hirudin complex in plasma with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1991;2:129–33.
53. Pötzsch B, Hund S, Madlener K, Unkrig C, Müller-Berghaus G. Monitoring of recombinant hirudin: assessment of a plasma-based ecarin clotting time assay. *Thromb Res* 1997;86:373–83.
54. Novoa E, Seegers WH. Mechanisms of alpha-thrombin and beta-thrombin-E formation: use of ecarin for isolation of meizothrombin 1. *Thromb Res* 1980;18:657–68.
55. Solano C, Cobcroft G, Scott DC. Prediction of vitamin K response using the echis time and echis-prothrombin time ratio. *Thromb Haemost* 1990;64:353–7.
56. Lindhoff-Last E, Piechotka GP, Rabe F, Bauersachs R. Hirudin determination in plasma can be strongly influenced by the prothrombin level. *Thromb Res* 2000;100:55–60.
57. Lange U, Nowak G, Bucha E. Ecarin chromogenic assay – a new method for quantitative determination of direct thrombin inhibitors like hirudin. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003/04;33:184–91.
58. Francis JL, Hursting MJ. Effect of argatroban on the activated partial thromboplastin time: a comparison of 21 commercial reagents. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2005;16:251–7.