

# **Historic insights into thrombo-embolic mechanism of activated bypassing agents**

**Started 25 years earlier than the  
first aPCC FEIBA**

**Wolfgang Schramm**

Rudolf Marx Stiftung  
Ludwig Maximilians Universität München

WFH - World Congress  
Glasgow 23. Mai 2018

---

Conflict of interest :

Honoraria: Biotest, Roche

# Agenda

---

1. Haemostasis in the 1950ies
2. Simplified coagulation system
3. Thrombin – Anti-Thrombin Regulation
4. Development and insights of clottingfactor-concentrates (**aPCC**)
  - ACC76 – Behringwerke, Marburg
  - FEIBA – Immuno, Vienna
  - PPSB – CNTS, Paris

# Perspective of the 1950ies

---

## 1953:

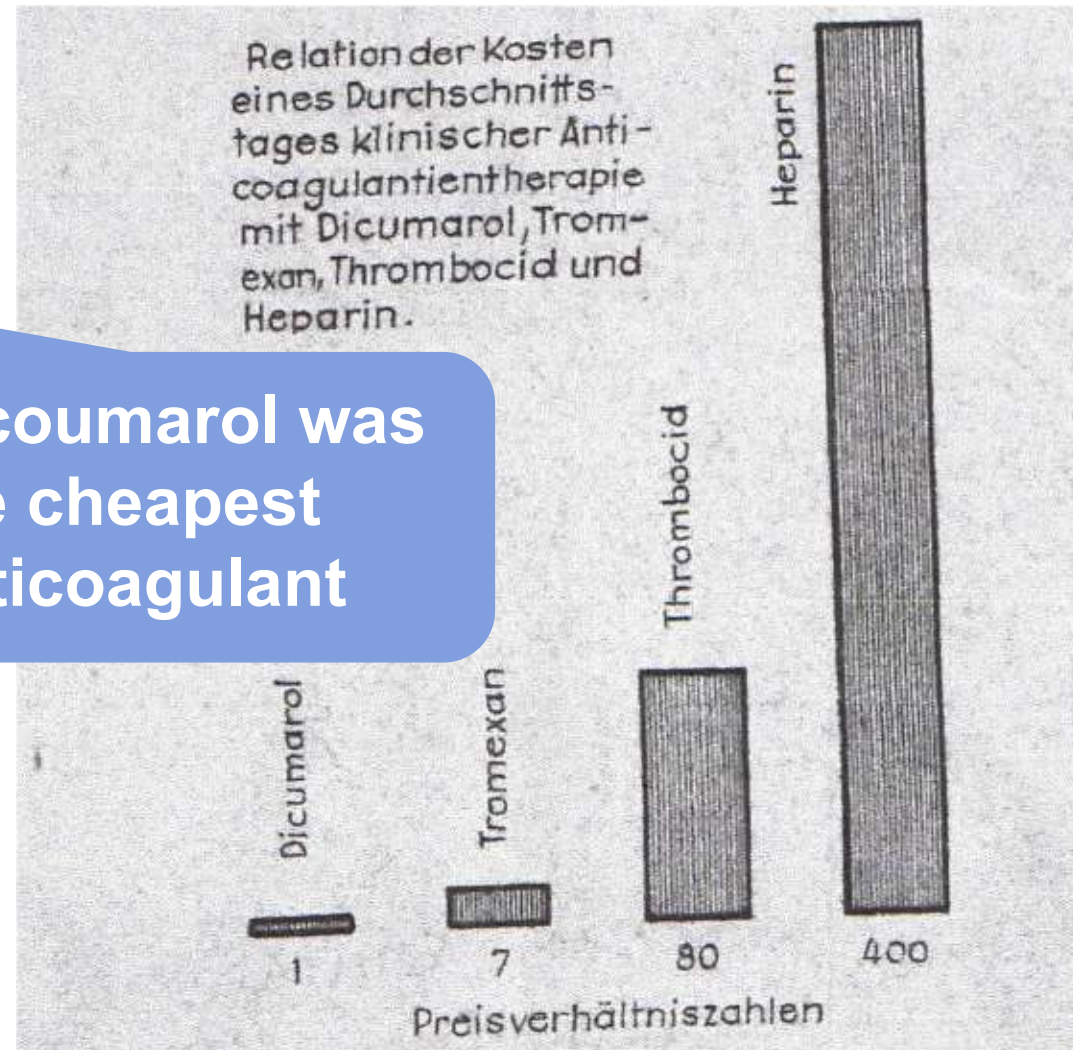
- Winston Churchill Nobel Prize for Literature
- Korean war ended
- R. Biggs publ.: Christmas disease- Haemophilia B, F IX
- Coumarin treatment available since 1940ies
- Österreich. Institut für Hämoderivate, later IMMUNO founded by J. Eibl, O. Schwarz
- Professorial dissertation of Rudolf Marx (Habilitationsschrift) „**Hämostaseologie**“
- 1956 DAB / GTH, DHG (Gerinnungssymposium Hamburg)

# Anticoagulation: economic aspects 1953

## background and stimulus for developement of first clotting factor concentrates

„... Auch ist in einem armen Lande ganz besonders **klinisch** zu bedenken, dass Dicumarol noch das billigste Anticoagulans ist und die Therapie damit im Tagesdurchschnitt auf etwa 10 Pfennige kommt, während z.B. beim Tromexan die Arzneikosten pro Therapietag mit etwa 70 Pfennigen anzusetzen sind.“

**Dicumarol was the cheapest anticoagulant**



# Coumarin-induced skin necrosis

---

**FLOOD: COUMADIN NECROSIS OF THE BREAST:  
THROMBOPHLEBITIS MIGRANS DISSEMINATA  
1943, NY STATE J. MED.**

**DEUTSCH: ZWISCHENFÄLLE DER DICUMAROLBEHANDLUNG  
1950, Zeitschrift f. Klin. Med.**

**VERHAGEN: 13 CASES OF SOFT TISSUE NECROSIS  
RELATED TO COUMARIN  
1954, ACTA MED. SCAN.**

**BROEKMANS: PROTEIN C AND THE DEVELOPMENT OF SKIN  
NECROSIS DURING ANTICOAGULANT THERAPY  
1983, THROMB. HAEM.**

**PABINGER: COUMARIN INDUCED ACRAL SKIN NECROSIS  
ASSOCIATED WITH HEREDITARY PROTEIN C DEFICIENCY  
1986, BLUT**

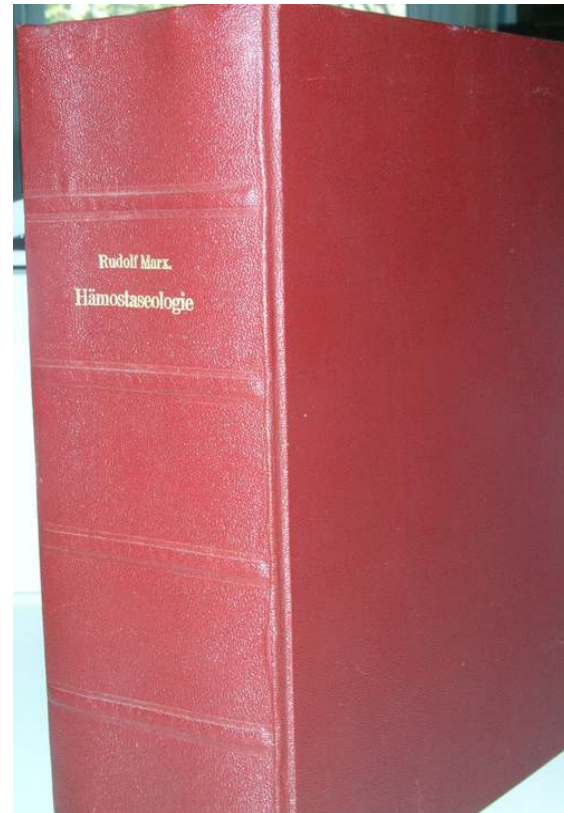
**GRIMAUDO: NECROSIS OF SKIN INDUCED BY COUMARIN  
IN A PATIENT DEFICIENT IN PROTEIN S  
1986, BRITISH MED. JOURNAL**

Die **Hämostaseologie** ist die Lehre von der Blutstillung, d.h. vom „Stehen und Steckenbleiben des Blutes“ (R. Marx)

---

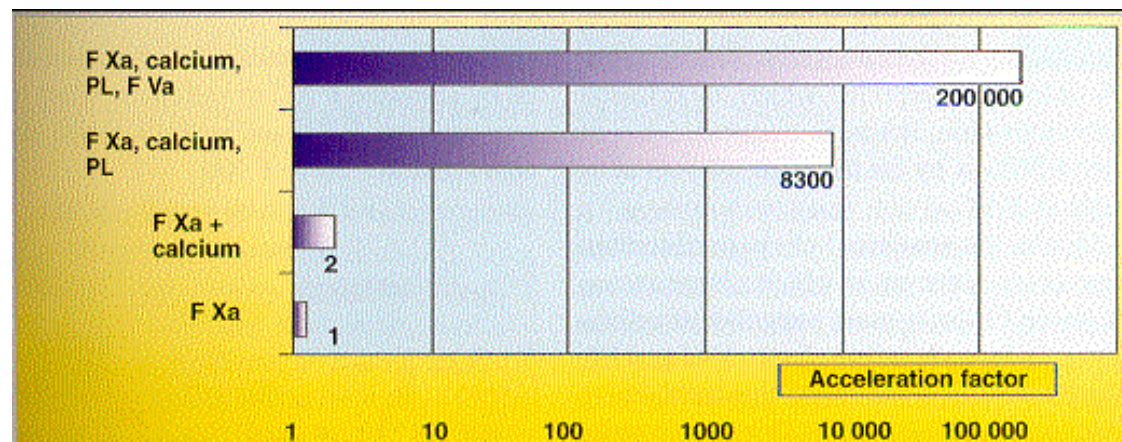
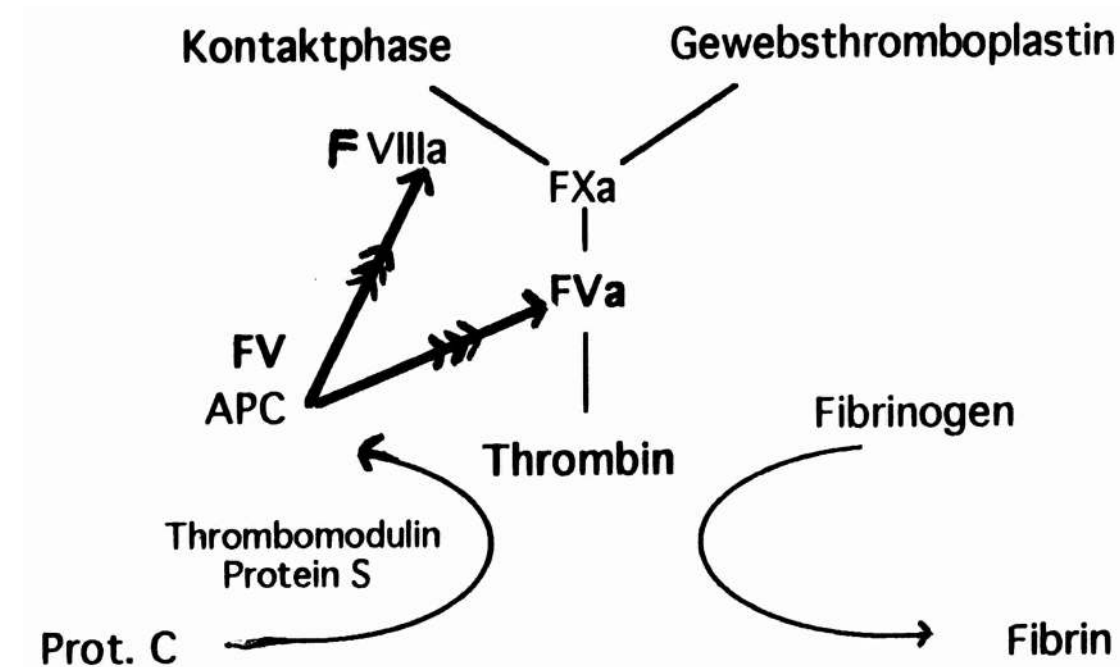
**“Haemostaseology is the doctrine of haemostasis, meaning blood to stand still and become stuck.” - R. Marx**

Professorial dissertation /  
Habilitationsschrift  
Prof. Dr. Rudolf Marx, 1953





# Simplified coagulationsystem incl. cofactors increased velocity several hundredfold





# Activation of coagulationfactor X

---

## **The contribution of $\text{Ca}^{2+}$ and phospholipids to the activation of human blood-coagulation Factor X by activated Factor IX**

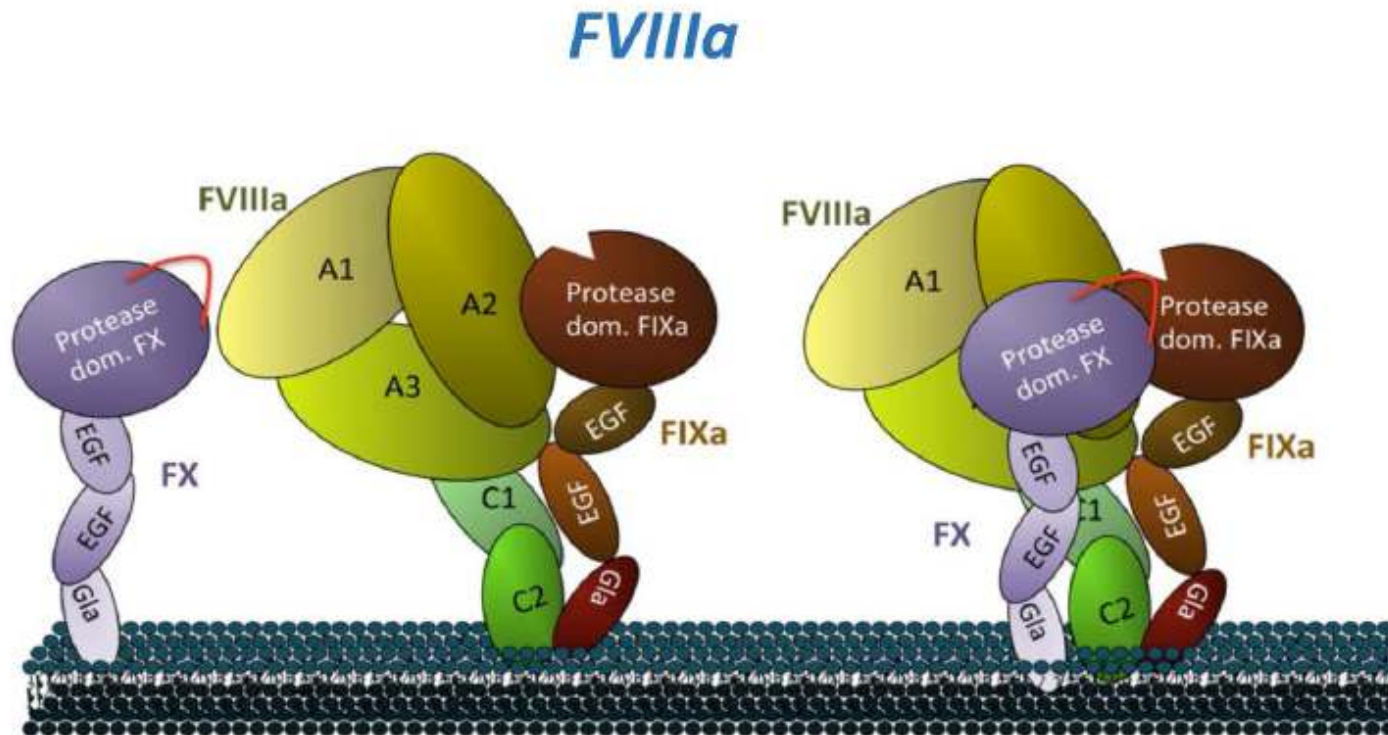
Koen MERTENS\* and Rogier M. BERTINA†  
*Haemostasis and Thrombosis Research Unit, Leiden University Hospital, Rijnsburgerweg 10,  
2333 AA, Leiden, The Netherlands*

„..., it was demonstrated that human Factor IXa can activate Factor X in the absence of cofactors. The presence of  $\text{Ca}^{2+}$  as the only cofactor resulted in a 7-fold stimulation of the Factor Xa formation. ...“

„... The presence of phospholipid as the only cofactor had no effect on the rate of Factor Xa formation. However, a several-hundred-fold stimulation was observed when  $\text{Ca}^{2+}$  and phospholipid were present in combination. ...“

# Activated Coagulation factor VIII

---

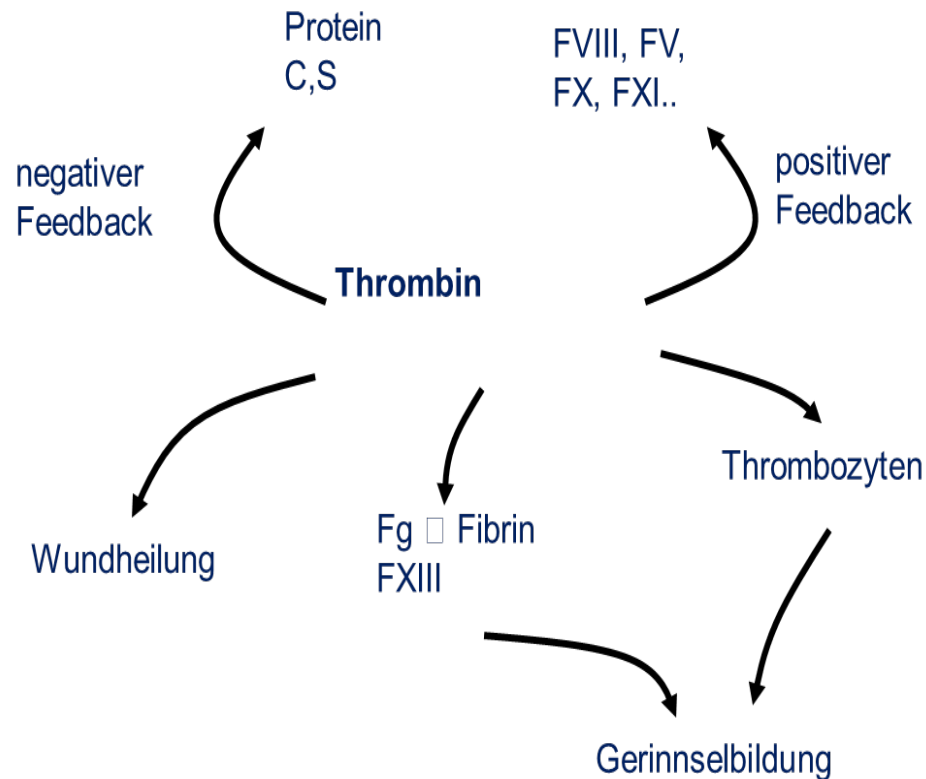


**FX activation is a highly regulated process where FVIIIa is the catalyst that facilitates the process through multiple protein-protein interactions allowing a controlled activation and inactivation**

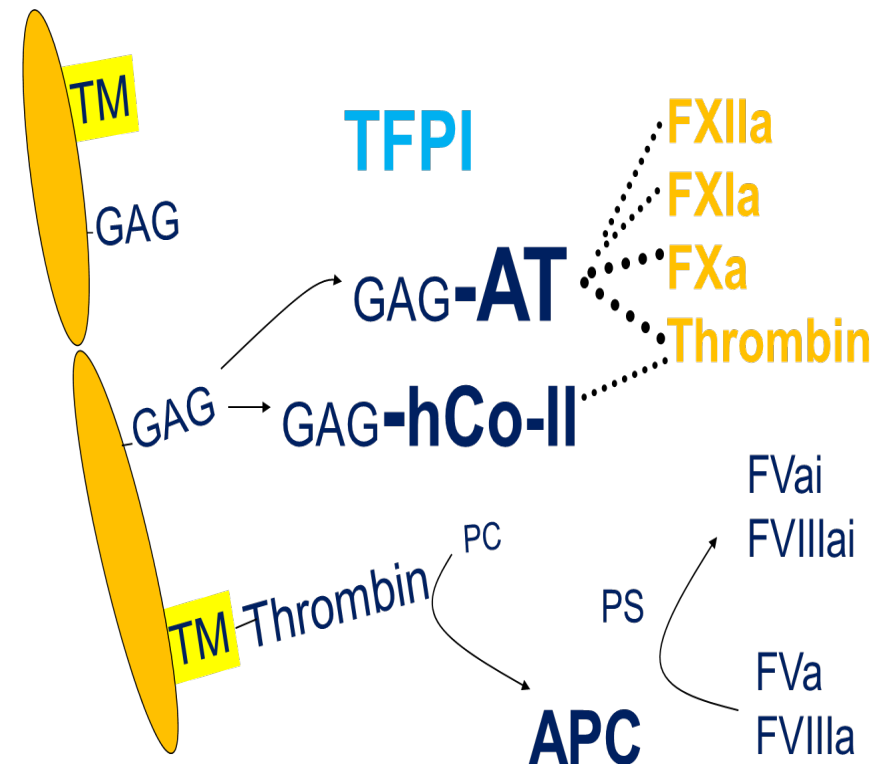
# Thrombin – Anti-Thrombin – Balance

## Complex interaction with many factors and cofactors and different mechanisms

### Thrombin



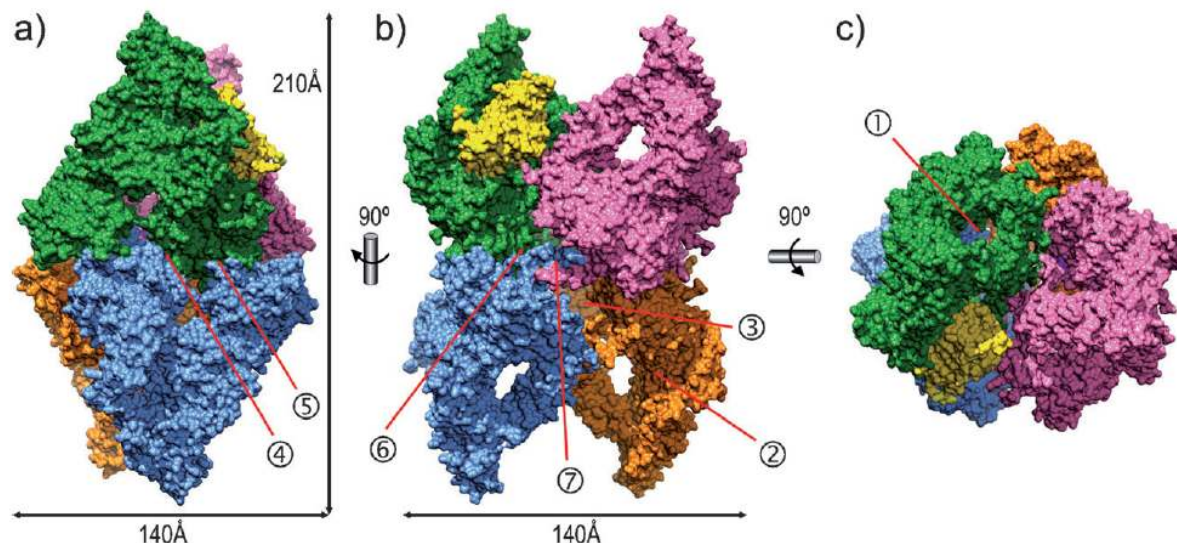
### Natural inhibitors





# The Crystal Structure of Human $\alpha_2$ -Macroglobulin Reveals a Unique Molecular Cage

Aniebrys Marrero, Stephane Duquerroy, Stefano Trapani, Theodoros Goulas, Tibisay Guevara, Gregers R. Andersen, Jorge Navaza, Lars Sottrup-Jensen, and F. Xavier Gomis-Rüth\*



*Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 3340–3344;



Pergamon

Thrombosis Research 98 (2000) 117–122

THROMBOSIS  
RESEARCH

## REGULAR ARTICLE

# Alpha<sub>2</sub>-Macroglobulin Levels Are High in Adult Patients with Congenital Antithrombin Deficiency

Armando Tripodi<sup>1</sup>, Veena Chantarangkul<sup>1</sup>, Valerio De Stefano<sup>2</sup> and PierMannuccio Mannucci<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Angelo Bianchi Bonomi Haemophilia and Thrombosis Centre, Department of Internal Medicine, University and IRCCS Maggiore Hospital, Milano; <sup>2</sup>Department of Haematology, Catholic University, Rome, Italy.

# Regulation of coagulation – do we know everything?

---

- Activation mechanisms - enzyme-substrate complexes
- **Cofactors: phospholipids, calcium, platelets, etc.**
- **Localization of activated factor complexes**
- Inhibitory mechanisms – specific, unspecific, proteolytic
- **3-dimensional and steric prerequisites**
- Interaction with other procoagulant and inhibitory compounds – mimetics
- **Control and monitoring of coagulation and haemostasis parameters**

---

# **Activated Coagulationfactors (aPCC)**

**ACC 76 & FEIBA**



# First application of aPCCs - antidote for anticoagulants

---

Wichtige durch R. Marx

erhobene Befunde auf dem Gebiet der Hämostaseologie:

- 1) Entdeckung der Wirkung des Bienengiftes auf die Blutgerinnung 1942
- 2) Erste Anwendung von Aethylenbisiminodiessigsäure auf die Blutkonservierung. 1941
- 3) Nachweis der Verkleinerung des Prothrombinmoleküls bei der Umwandlung von Prothrombin in Thrombin 1942/43
- 4) Einführung des Terminus "Heparinoid" und des ersten praktisch -klinisch brauchbaren Heparinoids "Thrombocid". (Terminus von Marx) 1948
- 5) Einführung des 1. Dicumarinantidots "Acc 76". 1952
- 6) Beobachtung der Stabilisierungswirkung von Antihistaminica und Antiproteolytika <sup>1960</sup> auf Thrombinpräparate. 1952
- 7) Steigerung der Thrombinwirkung im Blutmilieu durch Akridinverbindungen (Akriithrombin) 1950
- 8) Einführung des Begriffes "Hämostaseologie". 1953

59. Kongress f. innere Medizin  
München, 1958 —

Über eine neue Möglichkeit spezifischer Blutstillung über Förderung der Blutgerinnung durch Injektion von ACC 76, eines Konzentrates von Convertin-Accelerin (Plasmafaktor VII und VI) aus menschlichem Spenderblut.

---

Von

R. Marx und H.E. Schultze.

Man kann zwei grosse Gruppen von Hämostyptika unterscheiden, die Spezifika und die "Nonspezifika". Unter den ersteren wären diejenigen zu verstehen, welche bei hämorrhagischen Diathesen den bzw. die fehlenden Einzelfaktoren substituieren oder ihre Neuproduktion

Man kann zwei grosse Gruppen von Hämostyptika unterscheiden, die Spezifika und die "Nonspezifika". Unter den ersteren wären diejenigen zu verstehen, welche bei hämorrhagischen Diathesen den bzw. die fehlenden Einzelfaktoren substituieren oder ihre Neuproduktion kompensieren, bzw. die Konzentration erhöhen oder überkompensieren, und beeinflussen die Wirkung der anderen Faktoren spezifisch.

"There are two groups of haemostyptic agents, those acting specific, and those acting unspecific...."

Ausgedehnte Studien haben uns gezeigt, dass im allgemeinen eine klinisch genügende Beeinflussung eines Blutungszustandes (bedingt durch Mangel an Gerinnungsfaktoren) nur dann zu erwarten steht, wenn der fehlende Faktor ergänzt oder zumindest vermehrt werden kann und dass unter gewissen Minimalspiegeln von den wesentlichen Blutgerinnungsfaktoren kein genügender Blutstillungseffekt zu erwarten steht.



Über eine neue Möglichkeit spezifischer Blutstillung  
über Förderung der Blutgerinnung durch Injektion von **ACC 76**,  
eines Konzentrates von Convertin-Accelerin  
(Plasmafaktor VII und VI) aus menschlichem Spenderblut.

Von

R. Marx und H. E. Schultze.

„Man kann zwei gro  
Unter den ersteren  
Mangelzustände a  
oder ihre Neuprod  
diejenigen zusam  
verbesserten Funkt

“Wherever possible specific agents are preferred, which ideally should be identical (to the missing compound)...”

„... Wo immer es praktisch möglich ist Spezifika anzuwenden, wird es unerlässlich sein dieselben zu **benützen**, ohne daß deswegen „Nonspezifika“ ihren Wert verlören. Die Spezifika können vielmehr in manchen Fällen den „Nonspezifika“ erst eine genügende Wirkungsbasis schaffen. ...“

„... Nachdem nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse der Faktor V in einer durch Thrombinspuren aktivierten Form als Faktor VI (Accelerin) thrombinbildungsbeschleunigend zur Auswirkung kommt, schien es zweckmäßig, in dem **Acceleratorpräparat Faktor VII mit einer Dosis Faktor-VI-Aktivität zu kombinieren und damit eine Wirkungssteigerung zu ermöglichen.** ...“

“Accelerator product combines FVII with a dose of FVI (=FVa) to enable an increase of potency...”

Dicumarinpräparaten von Wert. ...“

R. Marx und H.E. Schultze in *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin* 1953 Wiesbaden, Kapitel XLIX 307-310

# Differentiated therapy with antithrombotics is equally relevant also 65 years later

---

„Studien ... geben einen gedrängten Überblick über die derzeitigen Therapiemöglichkeiten bei thromboembolischen Erkrankungen. Dabei werden die Grenzen der derzeitigen Möglichkeiten nicht übersehen werden, die aber immerhin durch die Einführung von Vitamin K<sub>1</sub> und „ACC76“ etwas erweitert werden konnten. ...“

**ACC 76 as a specific haemostyptic agent was introduced into therapy in 1952 !**

„Im Prinzip wird betont, dass die Antithrombotika nicht schematisch, sondern auf Grund genauer Kenntnis ihrer Einzeleigenschaften ganz nach Lage des Einzelfalles einzeln oder kombiniert angewendet werden sollten („Differentialtherapie“).“

**“Antithrombotics must not be used schematic, but based on detailed knowledge of the features of their components and the individual cases...”**

**= Personalized Therapy**

# ACC 76 Composition, D. Voss, Marburg, 1965

Tab.1. Gerinnungsaktivitäten des ACC 76 (Behringwerke).

| Faktor                                         | Aktivität in 200 E<br>ACC 76/ml |
|------------------------------------------------|---------------------------------|
| Prothrombin                                    | 30%                             |
| Faktor V                                       | <1%                             |
| Faktor VII                                     | 48%                             |
| Faktor VIII                                    | 20%                             |
| Faktor VIII nach BaSO <sub>4</sub> -Adsorption | <1%                             |
| Faktor IX                                      | 24%                             |
| Faktor X                                       | 22%                             |
| Faktor XI und XII als »activation product«     | +(?)                            |
| Thrombin                                       | Ø                               |
| Plasmin                                        | Ø                               |

Charge Nr. 375

VIII. Hamburger Symposion über Blutgerinnung: „Blutstillung“, 28./29. Mai 1965  
(funded by Hoffmann-La Roche) Suppl.19, Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica

# ACC 76: Hypothesis of mode of action (1)

---

- **Consist zymogen forms of F II, F VI (=FVa), F VII, F IX and F X along with trace amount of activation products (F XI and F XII)**
- **Manufactured from serum (fresh recalcified plasma)**
- **Heparin should prevent thrombotic events**
- **Factor VIII activity 20 %, reduced by barium sulfate-adsorption**
  - **no physiological F VIII activity**



## **ACC 76: Hypothesis of mode of action (2)**

---

- **Discussion: „Another substance or intermediate-product may simulate F VIII activity“**
- **„Injection of 5000 U ACC 76 increased in a mild haemophiliac measurable F VIII from 8% to 20 %**
- **Difficulties in valid measurement of coagulation factor-activities and standardisation**
- **Adverse events: „not rare, but not serious“**

# PPSB – CNTS, Paris, F. Josso, M. Steinbuch

---

- **Consist high amount of prothrombin and F VII (35 fold)**
- **Manufactured from serum (fresh recalcified plasma)**
- **Less adverse events (used by F. A. Loeliger, Leiden)**
- **Second PPSB –preparation, produced from serum**
- **Small amounts of thrombin adsorbed by  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$**

# Composition of FEIBA (aPCC)

**1 FU (FEIBA U) /mL is the amount of FEIBA decreasing the aPTT\* of a severe FVIII inhibitor plasma by 50%**

\*aPTT= Activated Partial Thromboplastin Time

| <u>Hemostatic components</u> |                              | <u>U/U FEIBA</u> |
|------------------------------|------------------------------|------------------|
| <u>ZYMOGENS</u>              | <u>Prothrombin</u>           | 0.9 – 1.4        |
|                              | <u>Factor VII</u>            |                  |
|                              | <u>Factor IX</u>             |                  |
|                              | <u>Factor X</u>              |                  |
| <u>INHIBITORS</u>            | <u>Protein C</u>             | Small amounts    |
| <u>ENZYMES</u>               | <u>Thrombin</u>              |                  |
|                              | <u>Factor IXa</u>            |                  |
|                              | <u>Factor Xa</u>             |                  |
|                              | <u>Factor VIIa</u>           |                  |
| <u>COFACTORS</u>             | <u>Factor VIII, Factor V</u> |                  |
|                              | <u>Protein S</u>             |                  |
| <u>Phospholipids</u>         |                              |                  |

# Activated Prothrombin Concentrate for Patients

---

164

THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE

July 25, 1974

## **ACTIVATED PROTHROMBIN CONCENTRATE FOR PATIENTS WITH FACTOR VIII INHIBITORS**

ELIZABETH M. KURCZYNSKI, M.D., AND JOHN A. PENNER, M.D.

„This complex appears to offer effective control of severe hemorrhage in patients with factor VIII inhibitors.“

# Activated Prothrombin Concentrate

**Table 1. Coagulation Factors in Activated Prothrombin Concentrate.\***

| FACTOR          | AMOUNT†     |                 |
|-----------------|-------------|-----------------|
|                 | <i>U/ml</i> | <i>U/bottle</i> |
| II              | 15.0        | 450.0           |
| V               | 0.06        | 1.8             |
| VII             | 200.0       | 6,000.0         |
| VIII            | 1.14        | 34.0            |
| IX              | 42.0        | 1,260.0         |
| X               | 58.0        | 1,740.0         |
| XI              | 12.0        | 360.0           |
| Thrombin        | 0.001-0.003 | 0.03-0.09       |
| IX <sup>a</sup> | 3.0-10.0    | 90.0-300.0      |
| X <sup>a</sup>  | 3.0-8.0     | 90.0-240.0      |

\*Average activity obtained from assay of 4 lots. The ranges of values are indicated for thrombin, IX<sup>a</sup> & X<sup>a</sup>.

†1 U defined as the activity present in 1 ml of pooled normal human plasma.



# First reports about FEIBA in the 1970ies and 80ies

---

**Zum Wirkungsmechanismus von Fraktion FEIBA, F. Elsinger,  
Immuno AG, Vienna**

## **6<sup>th</sup> Hämophilie-Symposion, Hamburg 1975**

Ich muß mich zuerst entschuldigen, wenn diese Ausführungen nicht sehr „geschliffen“ sind, Dr. Lechner hat mich erst hier informiert, daß ich über dieses Thema sprechen soll; aber ich werde trotzdem versuchen, über die bisher vorliegenden, wesentlichen Fakten zu berichten. Ich möchte auch noch vorausschicken, daß das alte griechische Wort „panta rei“ in diesem Fall besondere Gültigkeit hat; wir müssen von Monat zu Monat umdenken, es ist wirklich alles noch in Fluß.

Zuerst möchte ich die von Dr. Lechner schon erwähnten FEIBA-Einheiten erklären.

**panta rhei: παντα ρηει ~ everything flows**

The FEIB-activity can be explained as a F Xa-like activity in which **F Xa is complexed in a way that it is much less attacked by plasmatic inhibitors than uncomplexed F Xa**, which is important for a long lasting effect in the circulation

Farmington 1983.

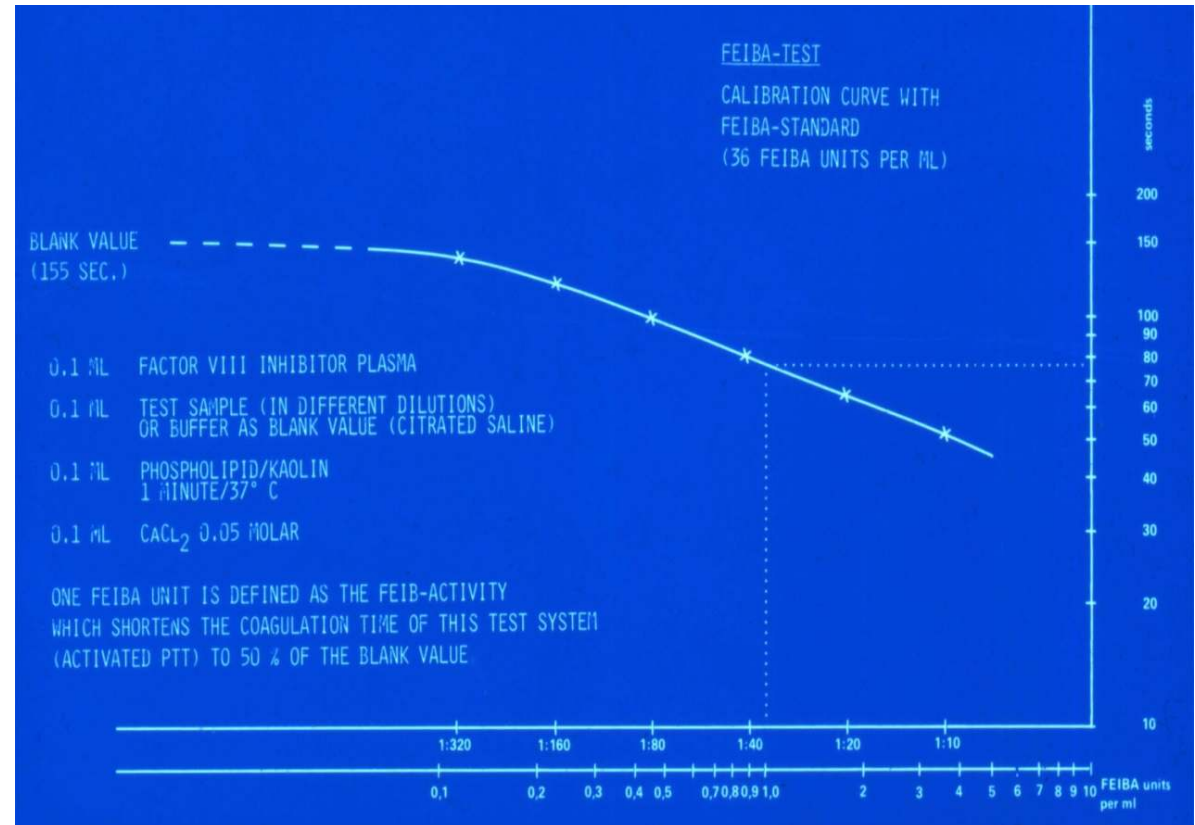
# FEIBA: Factor Eight Inhibitor Bypassing Activity

The 1<sup>st</sup> aPCC standardized for its cumulative haemostatic activity (FEIBA-activity)

## Calibration Curve with FEIBA-Standard

F. Elsinger, Poster  
Farmington 1983

**One unit of FEIBA-activity is defined as that amount of anti-inhibitor coagulant complex FEIBA, which shortens the aPTT of a high-titer factor VIII-inhibitor reference plasma to 50% of the blank value.**



The FEIBA assay was the basis for standardization and reproducibility of product and therapy

# **FEIBA: Hypothesis of mode of action**

- **Consist of zymogen forms of F II, F VII, F IX and F X along with trace amounts of their activated forms and the anticoagulant protein C in a balanced ratio**
- **Presence of pro- an anticoagulants may prevent thrombotic events**
- **High reproducibility of FEIB-activity in manufacturing process and standardisation**
- **Other procoagulant compound present in the circulation or given concomitantly may interfere / disturb the balanced pharmacological effect of FEIBA, demonstrated in clinical studies**

- Turecek PL, Váradi K, Gritsch H, Schwarz HP. Haemophilia. 2004; 10 Suppl 2:3-9. Review.
- Varadi K, Tangada S, Loeschberger M, Montsch P, Schrenk G, Ewenstein B, Turecek PL. Haemophilia. 2016; 22(4):615-24.

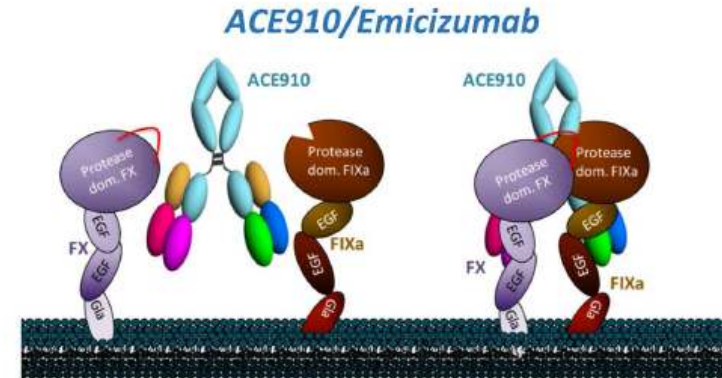
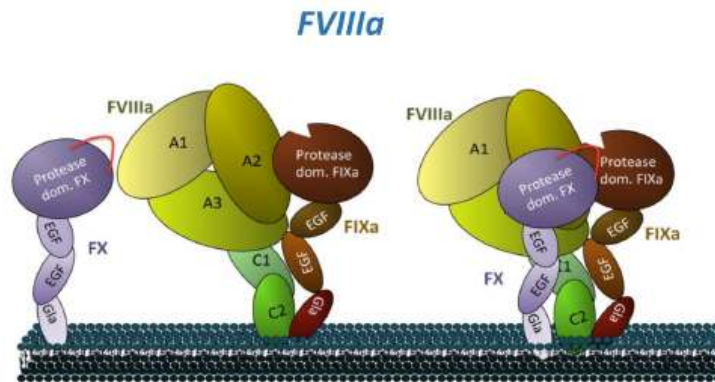
---

**Thank you for your attention !**

# Back up

---

# Comparison of FVIIIa und ACE910/Emicizumab



Multiple sites of interaction

Single sites of interaction

High affinity for enzyme & substrate  
(*low to high nanomolar range*)

Low affinity for enzyme & substrate  
(*micromolar range*)

Specific for FIXa and FX  
(*no binding to FIX and FXa*)

No distinction between zymogen and enzyme  
(*FIX vs FIXa and FX vs FXa*)

Full cofactor activity  
- *promotes phospholipid binding*  
- *stabilizes FIXa active site*  
- *bridges FIXa to FX*

Partial cofactor activity  
- *bridges FIXa to FX*

Enzyme and substrate are in excess over cofactor

Antibody is in excess over enzyme and substrate

FVIIIa has on/off mechanism

Emicizumab has no on/off mechanism

High level of self-regulation

Low level of self-regulation