

(19) **DANMARK**



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) **FREMLÆGGESESSKRIFT**

(11) **160511 B**

(21) Patentansøgning nr.: 2372/82

(51) Int.Cl.⁵ **C 12 Q 1/56**

(22) Indleveringsdag: 26 maj 1982

(24) Løbedag: 08 okt 1981

(41) Alm. tilgængelig: 26 maj 1982

(44) Fremlagt: 18 mar 1991

(86) International ansøgning nr.: PCT/DE81/00170

(86) International indleveringsdag: 08 okt 1981

(85) Videreførelsesdag: 26 maj 1982

(30) Prioritet: 09 okt 1980 DE 3038163 04 aug 1981 DE 3050268

(71) Ansøger: ***Boehringer Mannheim GmbH; Sandhofer Strasse 112-132; D-W-6800 Mannheim-Waldhof, DE**

(72) Opfinder: **Helmut *Lill; DE, Juergen *Schrenk; DE, Peter *Wunderwald; DE**

(74) Fuldmægtig: **Firmaet Chas. Hude**

(54) **Fremgangsmåde og reagens til bestemmelse af antithrombin-BM**

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g. skrift nr. 4271

FR off.g. skrift nr. 2338496

Andre publikationer. Chemical Abstracts 93, (1980), 21515g
" " " 90, (1979), 165628g

(57) Sammen drag:

2372-82

Til bestemmelse af antithrombin-BM sætter man til prøveopløsningen en antithrombin-BM-cofaktor, thrombin og et bestemt thrombinsubstrat og konstaterer spaltningen af thrombinsubstratet som et mål for antithrombin-BM-aktiviteten, idet man som cofaktor anvender heparin, xylan, λ -karrageenan, dextransulfat, mucopolysaccharid-polysvovlsyreester, pentosanpolysulfat eller ved kemisk eller enzymatisk spaltning af heparin fremstillet kortkædet heparinderivat.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til bestemmelse af en ny thrombin-inhibitor, der betegnes som antithrombin-BM, samt et reagens til udførelse af fremgangsmåden.

5 Det proteolytiske enzym thrombin spiller en vigtig rolle i blodstørkningssystemet. Det er kendt, at der i blodkoagulerings-
ringssystemet endvidere forekommer en specifik inaktivator for thrombin, som i nærværelse af heparin kan hæmme thrombin, og som betegnes som antithrombin III. Anvendelsen af heparin som antikoagulans spiller derfor en vigtig rolle i terapien
10 og forskningen. Ligeledes er AT III, der også betegnes som heparin-cofaktor, en vigtig bestanddel af prøvesystemer for plasmaens størkningsegenskaber. AT III hæmmer dog også thrombin i fravær af heparin ved en tidsafhængig reaktion og hæmmer foruden thrombin f.eks. også trypsin, plasmin og faktor Xa
15 og er altså relativt uspecifik.

Nu er der overraskende fundet en hidtil ukendt specifik thrombin-inhibitor, der i flere henseender adskiller sig fra AT III. Den er nærmere beskrevet i tysk patent (ansøgning) 30 38 163.

20 Den nye thrombin-inhibitor hæmmer thrombin i nærværelse af dextransulfat mindst dobbelt så stærkt som i nærværelse af heparin, men derimod praktisk taget ikke plasmin og trypsin, og adskiller sig immunologisk fra antithrombin III.

Da den nye thrombin-inhibitor binder sig mindre stærkt til heparin end AT III, betegnes den som AT-BM (Antithrombin
25 Binding Moderately to Heparin).

Medens AT III for at give optimal thrombinhæmning kun kræver en heparinkoncentration af størrelsesordenen 0,02 USP/ml, er for AT-BM den nødvendige heparinkoncentration til optimal thrombinhæmning over 1,0 USP/ml. [Her står USP for de en-
30 heder ifølge den amerikanske farmakopé, hvormed heparinkoncentrationen er defineret].

Medens human-AT-III bl.a. også hæmmer faktor Xa, plasmin og trypsin og reagerer med humanthrombin uvæsentligt stærkere end med oksethrombin, er den nye human-AT-BM næsten fuldstændigt thrombinspecifik og hæmmer humanthrombin tydeligt stærkere end oksethrombin. Endvidere fremmes thrombinhæmningen med AT III stærkere af heparin end af andre aktivatorer, såsom dextransulfat. Derimod opnås der med AT-BM med dextransulfat en 2 til 3 gange så stærk thrombinhæmning som i nærværelse af heparin.

Medens AT III hæmmer thrombin i en tidsafhængig reaktion, også i fuldstændigt fravær af cofaktorer, såsom heparin, viser AT-BM under disse omstændigheder ingen hæmningsvirkning.

På grund af de ovennævnte egenskaber kan den nye thrombininhibitor AT-BM ikke blot anvendes på lignende måde som AT III ved terapeutiske og diagnostiske metoder og er et interessant forskningskemikali-um, men det kan også bestemmes analytisk i nærværelse af AT III.

EP offentliggørelsesskrift nr. 4271 beskriver en fremgangsmåde til bestemmelse af den biologiske aktivitet af heparin, ved hvilken der ved tilsætning af thrombin eller faktor Xa og et kromogent substrat måles det af det kromogene substrat frigjorte farvestof i fravær af antithrombin III. Her drejer det sig altså om bestemmelse af et helt andet stof end ved den foreliggende opfindelse, og af skriftet kan man end ikke slutte sig til eksistensen af antithrombin-BM.

Ifølge opfindelsen sker bestemmelsen af AT-BM derfor ved udnyttelse af specificitetsforskellene i forhold til AT III med de forskellige cofaktorer. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til bestemmelse af AT-BM er derfor ejendommelig ved, at man til prøveopløsningen sætter en antithrombin-BM-cofaktor, thrombin og et substrat, der spaltes af thrombin og herved frigiver en detekterbar substans, og måler spaltningen af thrombinsubstratet som mål for antithrombin-BM-aktivitet, idet man

- a) udnytter specificitetsforskellene mellem antithrombin-BM og antithrombin III i nærværelse af forskellige mængder af cofaktorerne heparin, xylan eller λ -karrageenan og måler forskellen mellem de ved høje og ved lave cofaktorkoncentrationer fremkomne aktiviteter, eller
- b) direkte måler antithrombin-BM-aktiviteten med dextran-sulfat, mucopolysaccharid-polysvovlsyreester, pentosan-polysulfater eller ved kemisk eller enzymatisk spaltning af heparin fremstillede kortkædede heparinderivater som cofaktor.

Nedenstående tabel 1 viser specificitetsforskellene mellem AT-BM og AT III i nærværelse af forskellige mængder heparin.

TABEL 1.

Specificitetssammenligning AT-BM/AT III.

15	Protease	AT III (U/ml) med		AT-BM (U/ml) med	
		0,02 USP heparin/ml	1,75 prøverumfang	0,02 USP heparin/ml	1,75 prøverumfang
	Oksethrombin				
	Samlet	22,5	24,4	6,6	29,0
	" α -thrombin"	25,9	25,6	3,7	40,3
20	" β -thrombin"	20,0	23,5	0,4	4,5
	Humanthrombin				
	Samlet	29,4	30,8	8,4	74,0
	" α -thrombin"	23,0	31,7	6,2	101,1
	" β -thrombin"	29,0	37,7	0,1	18,9
25	Faktor Xa	5,6	29,5	0	0
	Plasmin	0	14,5	0	0,4
	Trypsin	23,5	16,5	0	0

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at man ved en koncentration på 1 - 20 USP heparin pr. ml bestemmer den samlede mængde af AT-BM og

AT III og i et parallelforsøg ved en lav cofaktorkoncentration på 0,01 - 0,03 USP heparin pr. ml bestemmer AT III alene og af forskellen mellem de to antithrombinmængdebestemmelser beregner indholdet af AT-BM.

- 5 I stedet for heparin kan der som cofaktor også anvendes xylan eller λ -karrageenan i analoge mængder.

Ved den anden udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvender man som cofaktorer dextransulfat, mucopoly=saccharid-polysvovlsyreester, pentosanpolysulfater eller et
10 ved kemisk eller enzymatisk spaltning af heparin fremstillet kortkædet heparinderivat. Sådanne heparinderivater eller heparinanaloge er kendt og findes i handelen f.eks. under betegnelsen Arteparon [®] eller SP 54. Ved koncentrationer mellem ca. 2,5 og 25 μ g/ml af disse cofaktorer er kun AT-BM aktiv,
15 således at indholdet af AT-BM herved bestemmes selektivt, også i nærværelse af AT III.

Ligegyldigt om man anvender differensmetoden eller den direkte specifikke AT-BM-bestemmelse, anvender man hensigtsmæssigt til bestemmelsen 0,01 - 0,1 U/ml thrombin, 0,5 - 1.000 μ mol/ml
20 thrombinsubstrat og 10 - 250 mmol/l stødpude, pH 7,5 - 8,5, idet man yderligere kan tilsætte indtil 200 mmol/l NaCl og indtil 50 IU/ml aprotinin. De to sidstnævnte stoffer er dog ikke væsentlige og kan også udelades.

Desuden har det vist sig gunstigt at tilsætte polyethylen=glycol og/eller en kompleksdanner for tunge metaller, såsom
25 f.eks. ethylendiamintetraeddikesyre og lignende polyaminaceta=ter.

Som thrombinsubstrat kan anvendes ethvert af de til thrombinbestemmelse kendte substrater. Der foretrækkes de i handelen
30 værende optisk bestemmelige substrater. Disse er lavmolekylære peptider med en optisk let bestemmelig fraspaltelig rest.

Især foretrækkes som substrat Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (hvor pNA er p-nitroanilid).

Som stødpudestoffer kan anvendes alle, der er virksomme i området fra 7,5 til 8,5. Der foretrækkes trisstødpude, triethanolaminstødpude og trisimidazolstødpude.

- 5 I normal humanplasma foreligger AT-BM ved siden af AT III og giver i gennemsnit ca. 20% af den samlede antithrombinaktivitet, idet de resterende ca. 80% skyldes AT III. Forholdet mellem AT-BM og AT III kan under visse omstændigheder været ændret. Dette viser de i tabel 2 sammenfattede forsøgsresultater.
- 10

TABEL 2.

Antithrombinbestemmelse med oksethrombin og 1,75 USP U/ml heparin ved 25°C.

Plasma	n	Samlet AT U/ml	% samlet AT	
			AT-BM	AT III
15 Normal	5	8,4 ± 0,3	20,8 ± 5,4	79,2 ± 5,4
Svangre	3	7,5 ± 2,5	14,0 ± 2,4	86,0 ± 2,4
Børn	6	6,1 ± 0,4	15,5 ± 0,5	84,5 ± 0,5
Marcumar	8	5,7 ± 1,4	11,4 ± 4,5	88,5 ± 3,9
20 Hepatitis-	3	4,6 ± 1,9	10,0 ± 5,6	90,0 ± 5,6
mistanke				
Serum	3	3,9 ± 0,7	32,0 ± 4,4	68,0 ± 4,4

- Som nævnt er også cofaktorspecificiteten af den nye AT-BM forskellig fra AT III. Især opnås med AT III den højeste hæmningskapacitet i nærværelse af heparin, medens der med AT-BM kan opnås væsentligt højere hæmningsværdier med dextransulfat.
- 25 De konstaterede værdier er vist i tabel 3.

TABEL 3.

Sammenligning af cofaktorspecificitet af AT III/AT-BM
ved hæmning af oksethrombin.

	Cofaktor (25 g/ml)	Antithrombinaktivitet U/ml af	
		AT III	AT-BM
5	Heparin (15 µg/ml = 1,75 USP/ml)	27,5	13,2
	λ-karrageenan	5,4	9,3
	Xylan	6,3	1,2
	Na-dextransulfat (MG = 500.000)	4,1	33,0
10	Polystyrolsulfonat	0	0

AT-BM adskiller sig også betydeligt i sine egenskaber fra andre kendte protease-inhibitorer i plasma. Dette fremgår af følgende tabel 4.

TABEL 4.

Sammenligning af AT-BM med kendte proteaseinhibitorer i menneskelig plasma.						
Inhibitor	Molekyl- Binding vægt i til KD	Immunol. kryds- reaktion	Hæmning af Faktor Xa	Thrombin	Trypsin	Chymo- trypsin
α -1-antitrypsin	54	-	-	+	+	+
α -1-antichymotrypsin	68	-	-	-	-	+
Inter- α -trypsin- inhibitor	140	+	-	+	+	+
Syrestabil proteinase- inhibitor	34	-	-	-	-	-
α -2-makroglobulin	725	-	-	+	+	+
α -2-antiplasmin	70	-	-	-	+	+
Antithrombin III	67	++	-	++	+	+
C 1-esterase- inaktivator I	105	+	-	-	-	-
C 1-esterase- inaktivator II	96	-	-	-	-	-
Antithrombin-BM	68-69	+	bortfalder	++	-	-

1) KD = kilodalton.

2) CRM = immunologisk krydsreagerende med hinanden.

Opfindelsen angår endvidere et reagens til bestemmelse af AT-BM. Reagenset ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved, at det indeholder thrombin, et bestemt thrombinsubstrat, stødepude pH 7,5 - 8,5, eventuelt NaCl og/eller aprotinin samt

5 en af cofaktorerne heparin, xylan, λ -karrageenan, dextran-sulfat, mucopolysaccharid-polysvovlsyreester, pentosanpoly-sulfater eller ved kemisk eller enzymatisk spaltning af heparin fremstillet kortkædet heparinderivat.

I en foretrukken udførelsesform er reagenset ifølge opfindelsen ejendommeligt ved, at det indeholder thrombin, heparin, aprotinin, polyethylenglycol, kompleksdanner, NaCl, thrombin-substrat og stødepude. Særligt foretrukne udførelsesformer er ejendommelige ved, at de indeholder thrombin, dextransulfat, aprotinin, NaCl, stødpude og thrombinsubstrat, at throm-

10 binsubstratet består af Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, at det indeholder 0,01 - 0,1 U/ml thrombin, 0,5 - 1.000 μ mol/ml thrombin-substrat, 0 - 200 mmol/l NaCl, 0 - 50 IU/ml aprotinin og

15 10 - 250 mmol/l stødpude.

Udvindingen af thrombin-inhibitoren AT-BM er beskrevet i tysk patent 30 38 163. Den beror på dens forskellige egenskaber sammenlignet med AT III, f.eks. over for heparin.

20

Når man behandler serum, plasma eller en deraf udvunden fraktion med uopløseligt bærerbundet heparin og eluerer sidstnævnte efter fjernelse af ikke-bundet materiale med en ionstyrke på 0,12 - 0,36 og en pH-værdi i området fra 6,5 til 8,3, udvinder man AT-BM. Under disse betingelser elueres AT III ikke.

25

Til indstilling af pH-intervallet kan anvendes de inden for dette område pufrende stødepudestoffer. Koncentrationen af stødpuden ligger hensigtsmæssigt mellem ca. 0,005 og 0,1 M.

30

De bedste resultater fås ved pH-værdier mellem 7,5 og 8,0.
Der foretrækkes phosphat- og tris-stødpuder.

Hensigtsmæssigt arbejdes i nærværelse af et kompleksbindings-
middel, såsom EDTA. Koncentrationen af dette ligger hensigts-
5 mæssigt mellem 5 og 20 mM.

De følgende eksempler belyser opfindelsen nærmere.

EKSEMPEL 1.

9 dele frisk udtaget blod blandes med 1 del 0,11 mol/l na=
triumcitrat og centrifugeres ved ca. 3.000 omdrejninger pr.
10 minut. 20 µl af den således fremkomne citratplasma fortyn-
des med 1,0 ml 0,9% NaCl.

5 ml af en opløsning, som indeholder 0,1 M tris/HCl, pH 8,1,
0,15 M NaCl, 0,01 M EDTA, 1% polyethylenglycol, 6,5 IU apro=
tinin/ml og 1,75 USP heparin/ml blandes med 0,25 ml af en
15 thrombinopløsning med 0,5 U/ml, og man lader den henstå i
30 minutter (= AT-reaktionsblanding). Derefter sker bestem-
melsen efter følgende skema ved en måletemperatur på 25°C,
en cuvette med en lagtykkelse på 1 cm og en bølgelængde
på 405 nm. Der måles ekstinktionstilvæksten over for luft.

Der pipetteres i kunststofcuvetter:

20		Thrombin- udgangsværdi	Prøveværdi
	0,9% NaCl	0,10 ml	-
	Fortyndet plasma	-	0,10 ml
	AT-reaktionsblanding	2,00 ml	2,00 ml

25	Der blandes og inkuberes i 5 minutter ved 25°C:		
	1,9 mM chromozym TH ¹⁾	0,20 ml	0,20 ml

Bland, aflæs inden for 30 sekunder begyndelsesekstinktionen og start samtidig stopuret. Gentag aflæsning efter nøjagtigt 30, 60 og 90 sekunder.

5 Af ekstinktionsforskellene pr. 30 sekunder ($\Delta E/30$ sekunder) dannes middelværdien, og denne indsættes i beregningen (jfr. nedenfor).

1) = Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.

Man får derved den samlede antithrombinaktivitet. Ved gentagelse af forsøget med en heparinkoncentration nedsat til 0,02 USP/ml får man AT III-koncentrationen. Af forskellen
10 samlet antithrombinaktivitet minus AT III fås mængden af AT-BM.

EKSEMPEL 2.

	<u>Reagenser</u>	<u>Koncentration af brugsfærdig opløsning</u>
15	1. Puffer:	
	Tris/HCl	100 mmol/l, pH 8,1
	Dextransulfat (molekylvægt 500.000)	1 mg/100 ml
	Aprotinin	6,5 IU/ml x)
	NaCl	150 mmol/l
	2. Thrombin	0,5 U/ml
20	3. Chromozym [®] TH (Tos-Gly-Pro-Arg-pNA)	1,9 mmol/l
	4. Blanding af 1 og 2:	
	Tris/HCl	90 mmol/l, pH 8,1
	Dextransulfat	0,9 mg/100 ml
	Aprotinin	5,9 IU/ml
	NaCl	136 mmol/l
25	Thrombin	0,045 U/ml

x) Inhibitor-enheder (trypsin, chromozym TH, 25°C).

Fremstilling af reagensblandingen (blanding af 1 og 2).

Der blandes i en kunststofbeholder, og man lader henstå ca. 30 minutter ved 25°C: 10 ml stødpude (opløsning 1) og 1 ml

thrombin (opløsning 2).

Tilberedelse af prøve:

- 5 Til bestemmelsen fortyndes 1 del citratplasma med 200 dele NaCl (0,9%-ig) (f.eks. 50 µl plasma + 10 ml 0,9%-ig NaCl-opløsning).

Bestemmelsesopstilling:

- Bølgelængde: 405 nm.
Cuvette: Kunststofcuvette, 1 cm lagtykkelse.
Måletemperatur: 25°C.
10 Måling over for luft (ekstinktionstilvækst).
Til hver måleserie kræves mindst 1 thrombin-tomværdi (TL).

Der pipetteres i kunststofcuvetter:

	Thrombin- tomværdi	Prøveværdi
NaCl 0,9%	0,05 ml	-
15 Fortyndet plasma	-	0,05 ml
Reagensblanding (4)	1,0 ml	1,0 ml

Der blandes og inkuberes i 5 minutter ved 25°C:

Opløsning 3	0,1 ml	0,1 ml
-------------	--------	--------

20 Der blandes og beregnes $\Delta E/30$ sekunder.

Beregning:

$$\Delta E_{TL}/30 \text{ sekunder} - \Delta E_{\text{prøve}}/30 \text{ sekunder} = \Delta E_{AT-BM}/30 \text{ sekunder}$$

$$IU_{AT-BM}/ml = \Delta E_{AT-BM}/30 \text{ sekunder} \times 951,1.$$

- 25 Til bestemmelsen blev fremstillet opløsninger af henholdsvis AT-BM og AT III, der har følgende indhold:

AT III: 12,5 IU/ml 25°C.

AT-BM: 12,1 IU/ml 25°C.

Denne koncentration svarer til humanplasmas normale indhold af AT III.

- 5 For at vise specificiteten af bestemmelsen også i nærværelse af AT III blev bestemmelsen udført både med AT-BM-opløsningen og med en blanding af de to opløsninger. Herunder gik man frem som følger:

1. Måling af AT-BM:

- 10 AT-BM-opløsningen blev fortyndet 1 + 100 med fysiologisk kog-saltopløsning (0,05 ml prøve + 5,0 ml NaCl-opløsning).

- For at fastlægge måleområdet blev der af denne prøvefortynding fremstillet yderligere fortyndinger med fysiologisk kogsalt-opløsning (9 dele AT-BM (fortynding 1 + 100) + 1 del NaCl,
15 8 + 2, 7 + 3 o.s.v.) indtil en endelig fortynding på 1:1.000.

Konstante rumfang (0,05 ml) af de fremstillede AT-BM-fortyndin-ger blev så anvendt til prøven.

- Resultatet er vist på tegningen (●●●●). Med prøven fås inden for de valgte grænser proportionale hæmningsværdier
20 (ΔE_{AT-BM}).

2. Måling af AT-BM i nærværelse af AT-III:

- 0,05 ml ufortyndet AT-BM-opløsning blev fortyndet med 0,05 ml AT III-opløsning (12,5 IU/ml, 25°C) og 4,95 ml fysiologisk kogsaltopløsning (svarende til en 1 + 100 fortynding af begge
25 komponenter).

Af denne prøveopløsning blev der fremstillet følgeforyndin-ger som beskrevet under 1, afsnit 2.

Konstante rumfang (0,05 ml) af disse fremstillede fortyndinger blev så anvendt i prøven.

Resultatet er vist på figuren (000000). Inden for prøvens nøjagtighed fås samme resultat som med AT-BM alene. Prøveresultatet påvirkes ikke af AT III. Der måles alene AT-BM.

Analoge resultater blev opnået, når dextransulfat blev erstattet med mucopolysaccharid-polysvovlsyreester, pentosanpoly=sulfater eller med de ovenfor nærmere beskrevne heparinderivater.

10 P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmådetil bestemmelse af antithrombin-BM, k e n - d e t e g n e t ved, at man til prøveopløsningen sætter en antithrombin-BM-cofaktor, thrombin og et substrat, der spaltes af thrombin og herved frigiver en detekterbar substans, og måler spaltningen af thrombinsubstratet som mål for antithrombin-BM-aktiviteten, idet man

a) udnytter specificitetsforskellene mellem antithrombin-BM og antithrombin III i nærværelse af forskellige mængder af cofaktorerne heparin, xylan eller λ -karrageenan og måler forskellen mellem de ved høj og ved lav cofaktorkoncentration fremkomne aktiviteter eller

b) direkte måler antithrombin-BM-aktiviteten med dextransulfat, mucopolysaccharid-polysvovlsyreester, pentosanpoly=sulfater eller ved kemisk eller enzymatisk spaltning af heparin fremstillede kortkædede heparinderivater som cofaktor.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man som høj koncentration anvender 1 - 20 USP/ml og som lav koncentration 0,01 - 0,03 USP heparin pr. ml.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved,
5 at man anvender 2,5 - 25 µg/ml dextransulfat eller heparin-spaltningprodukt.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, 2 eller 3, k e n d e t e g n e t ved, at man anvender 0,01 - 0,1 U/ml thrombin, 0,5 - 1.000 µmol/ml thrombinsubstrat, 0 - 200 mmol/l NaCl, 0 - 50
10 IU/ml aprotinin og 10 - 250 mmol/l stødpude pH 7,5 - 8,5.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at man til opløsningen sætter polyethylenglycol og en kompleks-danner for tunge metaller.
6. Fremgangsmåde ifølge et af de foregående krav, k e n -
15 d e t e g n e t ved, at man som thrombinsubstrat anvender Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.
7. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at man anvender en opløsning, der indeholder 0,012 U/ml thrombin, 6,5 IU aprotinin pr. ml og 1% polyethylenglycol, og som
20 er 0,01 molær med hensyn til EDTA, 0,15 molær med hensyn til NaCl, 0,1 molær med hensyn til stødpude og 0,19 mmolær med hensyn til substrat.
8. Reagens til bestemmelse af antithrombin-BM, k e n d e -
t e g n e t ved, at det indeholder thrombin, et substrat,
25 som thrombin kan spalte, og hvorved der fremkommer en detekterbar rest, stødpude pH 7,5 - 8,5, eventuelt NaCl og/eller aprotinin samt en af cofaktorerne heparin, xylan, λ-karra-geenan, dextransulfat, mucopolysaccharid-polysvovlsyreester, pentosanpolysulfater eller ved kemisk eller enzymatisk spaltning af heparin fremstillet kortkædet heparinderivat.
30

9. Reagens ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder thrombin, heparin, aprotinin, polyethylenglycol, kompleksdanner, NaCl, thrombinsubstrat og stødpude.
- 5 10. Reagens ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder thrombin, dextransulfat, aprotinin, NaCl, stødpude og thrombinsubstrat.
11. Reagens ifølge krav 8 eller 9, k e n d e t e g n e t ved, at thrombinsubstratet består af Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.
- 10 12. Reagens ifølge krav 9 eller 10, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder 0,01 - 0,1 U/ml thrombin, 0,5 - 1.000 μ mol/ml thrombinsubstrat, 0 - 200 mmol/l NaCl, 0 - 50 IU/ml aprotinin og 10 - 250 mmol/l stødpude.

