



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) DD (11) 243 995 A1

4(51) G 01 N 33/86
G 01 N 33/68

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 283 850 1	(22)	06.12.85	(44)	18.03.87
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Bezirks-Institut für Blutspende- und Transfusionswesen, 2758 Schwerin, Wismarsche Straße 298, DD
(72)	Sander, Wolfgang, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem.; Schreiner, Klaus, Dipl.-Chem.; Preßentin, Karin; Wehlan, Helmut, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD

(54) Verfahren zur Bestimmung der aktivierten Gerinnungsfaktor-X-assoziierten Aktivität

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung des aktivierten Blut-Gerinnungsfaktors X (Faktor-Xa-like-activity). Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß die zu untersuchende Probe einem Testsystem auf der Grundlage eines Faktors-VIII-Mangelplasmas zugesetzt und die Gerinnungszeit gemessen wird. Mit Hilfe der Erfindung lassen sich die thrombogenen Eigenschaften von Gerinnungspräparaten des Prothrombinkomplexes einschätzen. Die Erfindung findet auf dem Gebiet der Humanmedizin Verwendung.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Bestimmung der aktivierten Gerinnungsfaktor-X-assoziierten Aktivität, **dadurch gekennzeichnet**, daß einem Testsystem auf der Grundlage eines Faktor-VIII-Mangelplasmas unter Zusatz von Koagulantien die zu untersuchende Probe zugesetzt, die Zeit bis zur Gerinnung gemessen und der Gerinnungszeit anhand einer Eichkurve die gesuchte Gerinnungsfaktor-Xa-like activity zugeordnet wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein Testsystem der Zusammensetzung
Rinderserum zur Faktor-V-Substitution mit einem F-V-Gehalt von etwa 150 %,
Faktor-VIII-Mangelplasma mit einem Restgehalt an F-VIII:C unter 1 %,
Kephalin-Kaolin-Reagens und gepufferte CaCl_2 -Lösung
Verwendung findet, dem die zu untersuchende Probe zugesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur funktionellen Bestimmung des aktivierten Gerinnungsfaktor X, d. h. zur Bestimmung einer Gerinnungsaktivität, die hauptsächlich dem aktivierten Gerinnungsfaktor X zuzuordnen ist (Faktor-Xa-like activity). Die Methode, die in jedem Gerinnungslabor ohne besonderen zusätzlichen Aufwand angewendet werden kann, gestattet die Einschätzung der thrombogenen Eigenschaften von Gerinnungspräparaten des Prothrombinkomplexes. Das Anwendungsgebiet der Erfindung ist die Humanmedizin.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Im Verlauf der Herstellung von Blutkonserven und der Präparation von Blut- und Plasmaderivaten ist in Abhängigkeit von den angewendeten Methoden mit einer partiellen Aktivierung des Gerinnungssystems zu rechnen (Blombäck, M. et al., Vox Sang. **47** [1984] 335–342).

Als Ursachen dafür kommen in Frage:

1. Eine unsachgemäße Venenpunktion kann zur Freisetzung von Gewebsthromboplastin/Faktor VII und damit zur Aktivierung des extrinsic pathway führen (Pflughaupt, B und G. Kurt, Vox Sang. **45** [1983] 224–232; Carlebjörk, G. et al., Vox Sang. **45** [1983] 233–242).
2. Unzureichende Zentrifugationsbedingungen haben eine unvollständige Eliminierung der Thrombozyten und damit von thrombogenen Substanzen zur Folge (Uteg, K. H. und W. Sander, Folia Haematol., Leipzig **97** [1972] 322–331).
3. Der präparationsbedingte Kontakt an unphysiologischen Oberflächen aktiviert den Gerinnungsfaktor XII und damit den intrinsic pathway.

Bei der Therapie mit Prothrombinkomplexpräparaten muß diese thrombogene Nebenwirkung berücksichtigt werden. So wird z. B. vor dem Einsatz dieses Präparates bei allgemeinem Gerinnungsfaktormangel gewarnt (Bucher, U. und L. Lempin, Folia Haematol., Leipzig **109** [1982] 6, 912–920). Der Gerinnungsfaktor X ist neben den Faktoren II, VII und IX Hauptbestandteil der Prothrombinkomplexpräparate und ein Schlüsselenzym im Ablauf der Gerinnungskaskade, weil er den intrinsic- und den extrinsic pathway zusammenführt. Die Kenntnis des aktivierten Anteils an Gerinnungsfaktor X erlaubt eine direkte Einschätzung der abgelaufenen Aktivierungsvorgänge.

Die funktionelle Bestimmung des Gerinnungsfaktors X erfolgt in der Regel im one-stage-Test, wobei ein Inkubationsgemisch von Faktor-X-Mangelplasma und der zu untersuchenden Probe mit Schlangengift-Thromboplastin zur Gerinnung gebracht wird. Das Schlangengift hat die Aufgabe, den vorhandenen Gerinnungsfaktor X vollständig zu aktivieren. Die resultierende Gerinnungszeit ist ein Maß für die Gesamtaktivität, d. h., es ist keine Differenzierung zwischen aktiviertem und nichtaktiviertem Anteil möglich. Üblicherweise wird die Thrombogenizität durch Globalteste, wie zum Beispiel die Nichtaktivierte Partielle Thromboplastinzeit (NAPTT) und ausgewählte Parameter von Thrombelastogrammen (TG_{50}), bestimmt (Prowse, C. V. und D. S. Peeper, Thrombos. Res. **20** [1980] 491–498; Dornheim, G., Folia Haematol., Leipzig **109** [1982] 6, 856–862). Aus der Vielzahl der wirksamen thrombogenen Faktoren ist der Anteil der Aktivität des Gerinnungsfaktors Xa nicht zu separieren.

Der aktivierte Gerinnungsfaktor X besitzt, wie alle anderen Gerinnungsfaktoren mit Ausnahme von V und VIII, eine enzymatische Eigenschaft (Serinprotease), die Prothrombin in Thrombin umwandelt. Statt Prothrombin können synthetische Substrate (S-2222 oder S-2337) eingesetzt werden, von denen eine chromogene Komponente abgespalten wird, die fotometrisch meßbar ist und in direkter Beziehung zur gerinnungsphysiologischen Faktor-Xa-Aktivität steht. Derartige Testsysteme sind nur begrenzt erhältlich und kostenintensiv. Auch bei Verfügbarkeit der chromogenen Substrate zur Bestimmung des Gerinnungsfaktors Xa werden sich funktionelle, immunologische und enzymatische Testergebnisse bezüglich ihrer Aussagekraft gegenseitig ergänzen und nicht ersetzen.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, die Bestimmung der Faktor-Xa-like activity zu ermöglichen, um das thrombogene Potential, besonders in Prothrombinkomplex-Präparaten, einschätzen sowie über in process- und Endkontrollen der Präparation und Präparate Einfluß im Sinne einer Verminderung der aktivierten Gerinnungsfaktoren nehmen zu können.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe die Bestimmung einer Gerinnungsaktivität, die hauptsächlich dem aktivierten Gerinnungsfaktor X zuzuordnen ist, möglich wird. Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß einem Testsystem auf der Grundlage eines Faktor-VIII-Mangelplasmas unter Verwendung von Koagulantien

die zu untersuchende Probe zugesetzt, die Zeit bis zur Gerinnungsbildung gemessen und die gesuchte Gerinnungsfaktor-Xa-like activity der Gerinnungszeit anhand einer Eichkurve zugeordnet wird.

Das Prinzip des one-stage-Tests zur Bestimmung von Einzelfaktoren (II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII) besteht darin, daß zu einem Substratplasma, das alle Gerinnungsfaktoren mit Ausnahme des zu bestimmenden Faktors enthält, die Untersuchungsprobe in geeigneter Verdünnung gegeben wird. Der limitierende Faktor für die Indikatorreaktion, die Gerinnungsbildung durch Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung also, ist durch den in der Untersuchungsprobe enthaltenen und im Substratplasma fehlenden — das heißt, den zu bestimmenden — Gerinnungsfaktor gegeben.

Der Aktivierungsvorgang der Gerinnungsfaktoren ist eine limitierte Proteolyse, bei der das aktive Zentrum freigesetzt wird. Im Falle des Gerinnungsfaktor X erfolgt die Aktivierung von der Seite des intrinsic pathway durch einen Komplex, der aus aktiviertem Gerinnungsfaktor IXa, Calciumionen, Phospholipiden und Gerinnungsfaktor VIII gebildet wird. Die erfinderische Idee besteht darin, daß einem Faktor-VIII-Mangelplasma, wie es für die Bestimmung des Gerinnungsfaktors VIII benutzt wird, die Untersuchungsprobe mit dem aktivierten Gerinnungsfaktor X zugesetzt wird. Als Koagulans wird CaCl_2 verwendet und die Zeit bis zur Gerinnungsbildung gemessen. Die Gerinnungszeit hängt von dem aktivierten Anteil des Gerinnungsfaktors X ab. Da bei Disproportionen zwischen den physiologischen Aktivatoren (Thrombin) und Inhibitoren (Antithrombin III) der Gerinnungskaskade eine Beeinflussung des Testsystems denkbar ist, bezeichnen wir die gemessene Aktivität als Gerinnungsfaktor-Xa-like activity.

Voraussetzung für die Bestimmung des aktivierten Gerinnungsfaktors X, d. h. der Gerinnungsfaktor-Xa-like activity, ist die Entfernung von Heparin aus den zu untersuchenden Proben. Neben zahlreichen anderen vorgeschlagenen Methoden (Mergenthaler, J.-J. et al., Vox Sang. **48** [1985] 8–17) hat sich in Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die von Dornheim und Schön empfohlene Methode zur Heparinentfernung bewährt (Dornheim, G. und R. Schön, Folia Haematol., Leipzig **109** [1982] 870–877). Dabei werden z. B. zu 0,5 ml heparinenthaltener PPSB-Fraktion 0,5 ml DEAE-Cellulose-Suspension (20 ml DEAE-Cellulose/ml in 0,25 mol/l NaCl, 0,05 mol/l TRIS/HCl, pH 7,5) gegeben, 45 sec. intensiv gemischt und 1 Minute bei 20000 U/min zentrifugiert und der klare Überstand als Prüflösung verwendet.

Die erfindungsgemäße Methode bietet folgende Vorteile:

1. Der Gerinnungsfaktor Xa wirkt auf natürliches Substrat im Gegensatz zu den synthetischen chromogenen Substraten, so daß die physiologischen Verhältnisse besser simuliert werden.
2. Die empirisch gefundene Wirksamkeit von aktivierten Prothrombinkomplex-Präparaten bei Hämophilie A (Faktor-VIII-Mangel) findet durch das erfindungsgemäße Testsystem eine gerinnungsphysiologische Erklärung (Hrubiskova, K., Folia Haematol., Leipzig **107** [1980] 4, 672–682).
3. Das erfindungsgemäße Testsystem ist in jedem Gerinnungslabor ohne zusätzliche Geräte und Reagenzien sowie mit normaler methodischer Erfahrung durchzuführen.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Grundlage der Bestimmung der Gerinnungsfaktor-Xa-like activity ist ein Testsystem zur Gerinnungsfaktor-VIII:C-Bestimmung. Kommerzielle Substanzen sind ebenso geeignet wie selbst präparierte. Vorzugsweise findet ein Testbesteck in Anlehnung an STEIN und KIRSEK Verwendung, in dem die Volumenverhältnisse an die Bedingungen des Gerinnungszeitmeßgerätes KZM-W adaptiert wurden (Stein, P. und W. J. Kisek, Dtsch. Ges. wesen **27** [1972] 2056; Fritsche, L. und H. J. Heckemann, Labortechnik **12** [1979] 4–7).

Testsystemzusammensetzung:

- 50 μl Rinderserum zur Faktor-V-Substitution mit einem F-V-Gehalt von etwa 150 %
- 50 μl Faktor-VIII-Mangelplasma mit einem Restgehalt an F-VIII:C unter 1 %
- 100 μl Kephalin-Kaolin-Reagens
- 50 μl die zu untersuchende Probe, z. B. Plasmafraktion PPSB unverdünnt oder in geeigneter Verdünnung, d. h., die resultierende Gerinnungszeit muß zwischen den Endpunkten der Eichkurve liegen. Die Inkubationszeit zwischen 30 und 120 Sekunden ergibt vergleichbare Resultate. Vorzugsweise wird das Testgemisch 60 Sekunden bei 37°C inkubiert
- 100 μl gepufferte CaCl_2 -Lösung (0,025 mol/l, pH 7,35) werden zur Koagulationsauslösung zugesetzt.

Die Gerinnungszeit ist unter Berücksichtigung der Verdünnung der zu untersuchenden Probe mittels einer Eichkurve der Gerinnungsfaktor-Xa-like activity zuzuordnen. Heparinhaltige Untersuchungsproben sind wie beschrieben zu entheparinisieren (Dornheim, G., Folia Haematol., Leipzig **109** [1982] 6, 856–862).

In der nachfolgend aufgeführten Tabelle sind die Ergebnisse der Bestimmung der Faktor-Xa-like activity an 25 Einzelpräparaten der Human-Plasmafraktion PPSB aufgelistet und in Beziehung zur Gesamtaktivität des Gerinnungsfaktors X gesetzt. Die Angabe der Aktivität erfolgt in Einheiten, wobei definitionsgemäß 1 ml mit 100 % Aktivität 1 Einheit entspricht.

Lfd. Nr.	Präparat-Nr.	Faktor X	Xa-like-activity	Pros. Anteil
1	958	154	4,0	2,3 %
2	959	200	8,5	4,3 %
3	960	138	0,0	0,0 %
4	961	138	4,4	3,2 % $\bar{x}$ = 2,84 %
5	962	160	4,0	2,5 %
6	963	118	4,0	3,4 %
7	964	118	5,0	2,2 %
8	1 219	39	2,7	6,9 % $\bar{x}$ = 5,9 %

Tabelle — Fortsetzung

Lfd. Nr.	Präparat-Nr.	Faktor X	Xa-like-activity	Pros. Anteil
9	1 220	68	3,3	4,9 %
10	1 289	133	3,2	2,4 %
11	1 472	200	2,9	1,5 %
12	1 473	154	3,5	2,3 %
13	1 476	174	2,9	1,7 %
14	1 477	182	2,2	1,2 %
15	1 479	190	4,0	2,1 %
16	1 480	114	1,6	1,4 % $\bar{x} = 2,13 \%$
17	1 481	166	2,5	1,5 %
18	1 482	164	3,4	2,1 %
19	1 483	182	4,0	2,2 %
20	1 484	200	5,4	2,7 %
21	1 485	216	10,2	4,7 %
22	599	154	0,0	0,0 %
23	665	182	0,0	0,0 %
24	731	229	3,8	1,7 % $\bar{x} = 0,525 \%$
25	1 085	150	0,6	0,4 %

Die Bestimmung der Gerinnungsfaktor-Xa-like activity ermöglicht es, den Einfluß diskreter Verfahrensschritte und -modifikationen hinsichtlich der Gerinnungsaktivierung zu bewerten, zum Beispiel:

- Die vielfach gefundene Verminderung der Thrombogenizität von Prothrombinkomplex-Präparaten durch Heparinzugabe (Dornheim, G., Folia Haematol., Leipzig **109** [1982] 6, 856–862; Lechler, E. und B. Eggeling: Fibrinogen, Fibrin und Fibrinkleber, F. K. Schattauer Verlag Stuttgart–New York 1980, p. 353) läßt sich durch die erfindungsgemäße Methode quantifizieren.
Die Präparate Nr. 1–21 wurden ohne und die Präparate Nr. 22–25 mit Heparinzusatz hergestellt. Der Anteil der Faktor-Xa-like activity vermindert sich dadurch von durchschnittlich 2,7 % auf 0,5 %. Die Bildung von Mittelwerten täuscht jedoch darüber hinweg, daß im Einzelfall trotz Heparin der Gerinnungsfaktor X aktiviert wird. Damit übereinstimmend ist die verminderte, aber nicht aufgehobene, in-vivo-Thrombogenizität heparinhaltiger Prothrombinkomplex-Präparate im Tierversuch nachgewiesen worden (Hedner, U.: Workshop on inhibitors of factors VIII and IX, Wien 1976, Facultas-Verlag, Wien 1977, p. 127).
- Im Bereich des Blutspende- und Transfusionswesens der DDR wird die Human-Plasmafraktion PPSB entsprechend Gütevorschrift (Gütevorschrift 147/77 Human-Plasmafraktion PPSB, Kennziffer ARp 08/30/07/02 durch Adsorption der Gerinnungsfaktoren II, IX, X und VII an $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ und anschließende Elution hergestellt. Die Adsorption wird durch Mischen/Schütteln des Blutplasmas mit dem Adsorptionsmittel im batch-Verfahren realisiert. Den Präparaten Nr. 11–21 liegt eine Adsorptionszeit von 30 Minuten und den Präparaten Nr. 1–7 von 60 Minuten zugrunde. Mit der erfindungsgemäßen Methode konnte nachgewiesen werden, daß durch die stärkere mechanische Belastung der Anteil der Faktor-Xa-like activity von durchschnittlich 2,13 % auf 2,84 % zunimmt.
- $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ -Chargen, die verminderte Adsorptionseigenschaften aufweisen (Präparate Nr. 8 und 9), lassen sich durch tribomechanische Behandlung aktivieren (Sander, W., K. Schreiner, D. Lehmann und M. Siegert, DD-WP 212 183). Mit der erfindungsgemäßen Methode konnte nachgewiesen werden, daß tribomechanisch aktiviertes Adsorptionsmittel deutlich bessere Adsorptionseigenschaften besitzt, ohne daß damit unter den gegebenen Bedingungen eine zusätzliche Aktivierung des Gerinnungsfaktors X verbunden ist.