



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 86103598.4

[51]Int.Cl⁵

C07K 5/10

[45]授权公告日 1995年2月8日

[24]颁证日 94.11.27

[21]申请号 86103598.4

[22]申请日 86.5.26

[30]优先权

[32]85.5.28 [33]US[31]737,761

[73]专利权人 科特电子公司

地址 美国佛罗里达州33010

[72]发明人 加里·A·米特凯尔

格拉德·E·扎夫

马里利恩·M·索洛萨诺

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商

标事

代理人 唐 跃 穆德俊

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 水溶性咕吨衍生物底物的制备方法及
其应用

[57]摘要

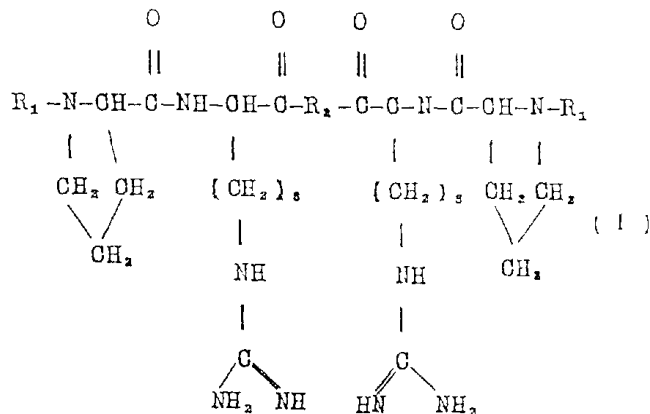
在没有使用有机溶剂添加剂和(或)特殊水增溶剂的情况下,可用水溶性咕吨衍生物底物若丹明110和若道尔,以分光光度和荧光测定法检测胰蛋白酶样酶。这些新的底物表现增加了检测低水平胰蛋白酶样酶-如蛋白水解酶、辅助因子、溶化剂、阻活剂及抑制剂等的敏感度。可用这些底物代替血纤维蛋白原,以监测血液凝固的途径。

1

2

权利要求书

1. 一种选自式(I)化合物



以及其与酸形成的盐的衍生物底物的制备方法, 在式(I)中:

R_1 是选自肌氨酰基、焦谷氨酰基,

R_2 是吡啶-3',6'-二氨基-9'-(2-羧苯基),

该方法包括:

对于式(I)化合物及其与酸形成的盐, 选择式为 $(\text{Cbz-Pro-Arg})_2$ -若丹明 110 的衍生物并用选自肌氨酰基、焦谷氨酰基基团替代其中的基团 Cbz.

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中 R_1 是肌氨酰基.

3. 根据权利要求 1 的方法, 其中 R_1 是焦谷氨酰基.

本发明是关于水溶性衍生物底物, 其合成方法以及这类合成底物在测定单独或以彼此结合形式存在的蛋白酶、抑制剂、辅助因子、活化剂和阻活剂之活性方面的应用.

如 Leytus 等人所报导的 [详见 Biochem. Journal 209: 299-307 (1983) 和 Biochem. Journal 215: 253-260 (1983)], 此前已将合成的若丹明 110 (rhodamine 110) 衍生物底物用于荧光测定蛋白酶活性. Leytus 等人的这种底物与先前报导的底物相比较, 对于测定酶活性具有极好的敏感性. 然而也发现, Leytus 等人的若丹明 110 衍生物底物的水溶性很差, 即 37°C 时溶解度约为 120 微摩尔, 因此必须添加有机溶剂添加剂如二甲基甲酰胺和乙醇, 以促进底物溶解. 但已了解到, 作酶

分析时加有机溶剂会干扰分析程度, 即使使蛋白变性, 降低反应速率以及 (或者) 引起其它反应物或产物的沉淀, 以致不能达到最佳试验效果.

除 Leytus 等人所公开的底物外, Smith 等人 (见美国专利 4, 294, 923) 公开了一种用于荧光或分光光度法测定生物体液中蛋白水解酶的香豆素衍生物底物. Gargiulo 等人 (见美国专利 4, 275, 153 和 4, 336, 186) 公开了用于测定生物学样品中蛋白酶活性的发生荧光的 aminoisophthalate 底物.

本发明涉及用于荧光和分光光度法测定蛋白酶活性的水溶性衍生物底物——下文称之为若丹明 110 和若道尔 (rhodol); 因其在工作浓度有较好的水溶性, 故不必使用如二甲基甲酰胺和乙醇等有机增溶剂, 也就不存在它们在试验过程中产生的干扰作用. 此外, 水溶性若丹明 110 和若道尔衍生物底物用于测定蛋白酶活性水平时, 较之先有技术中的若丹明 110 衍生物底物表现有更大的敏感性. 鉴于这种增加了的敏感性, 所以水溶性若丹明 110 和若道尔衍生物底物可用于分光光度试验方法; 而先有技术的低水溶性若丹明 110 衍生物底物在用较小体积的样品和底物进行分光光度和荧光法测定时, 不能表现足够的敏感度. 本发明的水溶性衍生物底物可用于测定单独或以彼此结合形式存在的蛋白酶、辅助因子、活化剂和阻活剂的活性, 特别是用于测定胰蛋白酶样酶的活性.

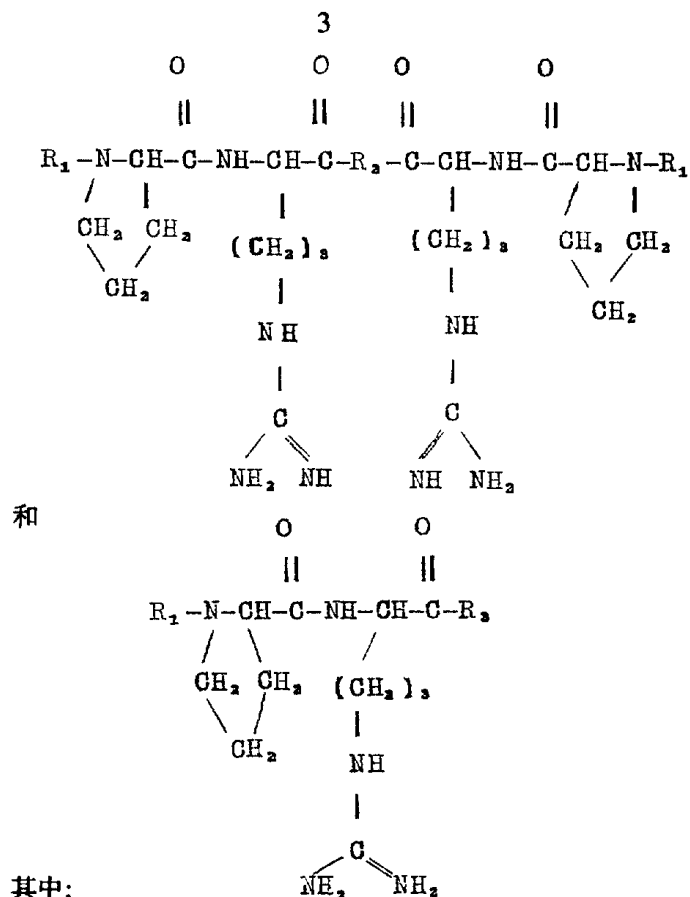
本发明的一个目的是提供一种带有可被酶水解之侧链的水溶性衍生物底物的复合物, 这样, 侧链的水解是与酶活性成正比的.

本发明的另一个目的是提供具有较好水溶性的衍生物底物.

本发明再一个目的是消除在测定蛋白酶、辅助因子、抑制剂、活化剂和阻活剂, 特别是凝血酶形成的分析方法中使用有机溶剂的需要.

本发明还有一个目的, 即提供衍生物, 该衍生物用于分光光度及荧光法测定时有足够的敏感性.

本文所述的合成底物及其水解产物在工作浓度下是水溶性的, 因此可在不使用有机溶剂添加剂和 (或) 特殊的水增溶剂的情况下, 用于分光光度和荧光测定. 这种新的水溶性底物具有下列结构通式, 也包括它们的水溶性盐.



和

其中:

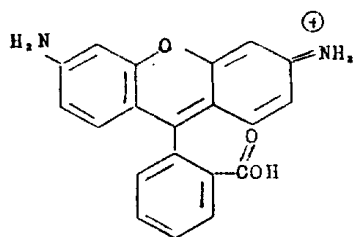
R_1 是增加水溶性的基团, 选自肌氨酰基、焦谷氨酰基和戊二酰基;

R_2 是吡啶-3',6'-二氨基-9'-(2-羧苯基);

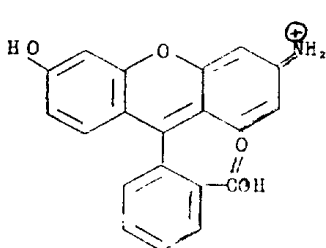
R_3 是吡啶-3'-氨基-6'-羟基-9'-(2-羧苯基)。

若丹明 110 和若道尔的化学结构式如下:

若丹明 110



若道尔



由于蛋白酶对这些化合物的敏感度增加, 使得能够检测以前已知方法所不易测到的低水平的酶、抑制剂、辅助因子、活化剂和阻活剂; 敏感度定义为最小可检测量。经过这些改进, 即可使用本发明的新的水溶性若丹明 110 和若道尔衍生物底物, 通过凝血酶原时间 (PT) 的测定、部分活化的组

织促凝血酶原激酶 (凝血因子 III) 时间 (APTT) 的测定和血栓形成试验 (TT, thrombotest) 来检测凝血酶。

实施例

以下叙述合成水溶性吡啶衍生物底物的方法、分析试验如果及使用这些底物的实施例。下述实施例并不意味着对本发明范围的限定。

除特别指出者外, 所使用的所有氨基酸均为 L 构型。以下实施例中所用缩写符号是:

Arg = 精氨酸

Cbz = 苄氧羰基

DMF = 二甲基甲酰胺

EDAC = 1-乙基-3-(3'-二甲氨基丙基)-碳二亚胺 HCl

Glt = 戊二酰基

HAc = 醋酸

Pro = 脯氨酸

Pyro = 焦谷氨酰基

Sar = 肌氨酰基

在洗脱液和产物的薄层色谱 (TLC) 分析中, 使用预涂布玻璃板, 以硅胶 60, 254 (FM, 试剂公司) 作吸附介质。展开薄层色谱使用的是下列溶剂体系:

S_1 = 2-丁酮: 丙酮: H_2O ; 8:1:1(V/V)

S_2 = 甲醇: 醋酸: H_2O ; 9:0.5:0.5(V/V)

合成底物的合成

水溶性吡啶衍生物底物是通过首选制备结构为 $(\text{H-L-Pro-Arg})_2$ -若丹明 110 的吡啶衍生物底物来合成的。 $(\text{H-L-Pro-Arg})_2$ 若丹明 110 的合成完全按 Leytus 等人介绍的方法进行。

实施例 1

先有技术

步骤 I:

在搅拌下, 将 0.96 克 (2.62 毫摩尔) 若丹明 110 溶于 400 毫升 4℃ 冰浴下冷却的二甲基甲酰胺 (DMF) 与吡啶的混合物 (1:1, V/V) 中, 尔后于其中加入 25.6 克 (133.5 毫摩尔) EDAC。约搅拌 1 分钟后, 迅速加入溶有 11.52 克 (33.41 毫摩尔) Cbz-L-Arg-HCl 的 96 毫升冷 DMF: 吡啶 (1:1, V/V) 溶液。约 24 小时后, 加 1.6 升无水乙醚以分离所得产物, 随后以 10,000g 离心约 10 分钟, 形成一种油状产物。将所得油状产物

5

溶于 50 毫升冷 DMF 中, 并加 1.3 升冷丙酮使发生沉淀。在 10,000g 离心分离油状物 10 分钟。将油状物重新溶于 50 毫升冷 DMF 并加 500 毫升冷的 1.2N HCl, 以 10,000g 离心 10 分钟, 分离出一种红色沉淀物。将此红色沉淀物溶于 50 毫升冷甲醇并加 350 毫升冷乙酸乙酯使之沉淀。以 10,000g 离心 10 分钟收集所得沉淀物, 即 (Cbz-L-Arg)₂-若丹明 110。最后一步重复三次。

产量: 2.08 克 (+79.4%) (Cbz-L-Arg)₂-若丹明 110。

步骤 II:

将 3.4 克 (3.40 毫摩尔) 按步骤 I 制备的 (Cbz-L-Arg)₂-若丹明 110 溶于 75 毫升 32% HBr-HAc 溶液中。所得红色溶液于室温 (RT) 下搅拌约 1 小时。加 800 毫升无水乙醚, 离心分离所得产物。离心步骤再重复三次后, 将所得褐色固体——(H-L-Arg)₂-若丹明 110 真空干燥 16 小时。

产量: 3.4 克 (+100%) (H-L-Arg)₂-若丹明 110。

TLC, S₂: Rf0.09。

步骤 III:

在搅拌下, 将步骤 II 中制备的 2.75 克 (2.79 毫摩尔) (H-L-Arg)₂-若丹明 110 溶于在 4℃ 冰结冷却的 330 毫升 DMF: 吡啶 (1:1, V/V) 溶液内, 然后加入 32 克 (166.9 毫摩尔) EDAC。搅拌约 1 分钟以加速溶解, 随后迅速加入溶于 60 毫升 DMF: 吡啶 (1:1) 的 10.4 克 (41.7 毫摩尔) Cbz-L-脯氨酸的溶液。约 24 小时后, 依步骤 I 的方法分离产物。将所得褐色固体——(Cbz-L-Pro-Arg)₂-若丹明 110 真空干燥 16 小时。

产量: 1.86g (52.0%) (Cbz-L-Pro-Arg)₂-若丹明 110。

TLC, S₂: Rf0.44

步骤 IV:

将 1.80 克 (1.40 毫摩尔) 按步骤 III 制备的 (Cbz-L-Pro-Arg)₂-若丹明 110 溶于 45 毫升 32% HBr-HAc 溶液内, 所得红色溶液在室温 (RT) 下搅拌约 1 小时。按步骤 I 所述的方法, 加无水乙醚离心分离所得产物。将所得褐色固体——

6

(H-L-Pro-Arg)₂-若丹明 110 真空干燥 16 小时。

产量: 1.90 克 (+100%) (H-L-Pro-Arg)₂-若丹明 110。

TLC, S₂: Rf0.03。

实施例 II

制备 (H-Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 的方法

步骤 A:

将按步骤 I-IV 方法制备的 1.90 克 (1.63 毫摩尔) (H-L-Pro-Arg)₂-若丹明 110 溶于 190 毫升在 4℃ 冰浴中冷却的 1:1 的 DMF: 吡啶溶液内, 然后再加入 17.85 克 (93.1 毫摩尔) EDAC。搅拌约 1 分钟以加速溶解, 随后迅速加入 5.20 克 (23.3 毫摩尔) Cbz-肌氨酸在 40 毫升 DMF: 吡啶 (1:1) 中的溶液。约 24 小时后, 按步骤 I 所述的方法分离所得的产物。将所得粉红色固体——(Cbz-Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 真空干燥 24 小时。

产量: 1.1 克 (49.6%) (Cbz-Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110。

步骤 B:

将 1.1 克 (0.78 毫摩尔) 步骤 A 中制备的 (Cbz-Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 溶于 24 毫升 32% HBr-HAc 溶液中, 在室温下搅拌所得深红色溶液约 1 小时。加入 350 毫升无水乙醚, 离心分离所得产物。此步骤再重复三次后, 将所得褐色固体——(H-Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 真空干燥 24 小时。

(H-Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 · 5(1/2) 氢溴酸盐五水合物的产量为 1.00 克 (84.7%)。

C₄₈H₆₄N₁₄O₉ · 5(1/2)HBr · 5H₂O 的元素分析:

计算值, %	实验值, %
C = 38.00	37.84, 38.11
H = 5.24	5.17, 4.81
N = 12.93	12.69, 12.76
Br = 29.03	29.58
TLC, S ₂ : Rf0.01。	

实施例 III

制备 (H-L-Pyro-Pro-Arg)₂-若丹明 110 的方法

步骤 A

把 380 毫克 (0.325 毫摩尔) 按步骤 I-IV 方法制备的 (H-L-Pro-Arg)₂-若丹明 110 溶解于 50 毫升在冰浴 (4℃) 中冷却的 DMF:吡啶 (1:1) 溶液中, 然后于其中加入 3.58 克 (18.62 毫摩尔) EDAC。搅拌约 1 分钟以加速溶解, 随后迅速加入溶于 11 毫升冷 DMF:吡啶 (1:1) 的 1.23 克 (4.66 毫摩尔) Cbz-L-焦谷氨酸的溶液。约 24 小时后, 按步骤 I 中所述分离所得产物。将所得褐色固体——(Cbz-L-Pyro-Pro-Arg)₂-若丹明 110 真空干燥 16 小时。

(Cbz-L-Pyro-Pro-Arg)₂-若丹明 110 的产量为 278 毫克 (57.1%)。

步骤 B

将 78 毫克 (0.0521 毫摩尔) (Cbz-L-Pyro-Pro-Arg)₂-若丹明 110 溶解于 3 毫升 32% 的 HBr-HAc 溶液中, 室温搅拌所得红色溶液约 1 小时。加 75 毫克无水乙醚离心分离所得产物。该离心步骤再重复三次后, 将所得褐色固体——(H-L-Pyro-Pro-Arg)₂-若丹明 110 真空干燥 16 小时。

(H-L-Pyro-Pro-Arg)₂-若丹明 110 · 4(1/2) 氢溴化物 · 5(1/2) 水合物的产量为 57 毫克 (71.7%)。

$C_{52}H_{66}N_{14}O_{11} \cdot 4(1/2)HBr \cdot 5(1/2)H_2O$ 的元素分析:

计算值, %	实验值, %
C = 40.90	40.54, 40.32
H = 5.01	5.08, 5.06
N = 12.85	12.55, 12.73
Br = 23.60	23.56,

实施例 IV

制备 (Glt-Pro-Arg)₂-若丹明 110 的方法

步骤 A

把 110 毫克 (0.094 毫摩尔) 按步骤 I-IV 制备的 (H-L-Pro-Arg)₂-若丹明 110 溶于 12 毫升冰浴 (4℃) 中冷却的 DMF:吡啶 (1:1) 溶液中, 然后加入 171 毫克 (1.5 毫摩尔) 戊二酸酐。约 24 小时后, 按步骤 I 中所述分离所得产物。将所得褐色固体——(Glt-Pro-Arg)₂-若丹明 110 真空干燥 16 小时。

(Glt-Pro-Arg)₂-若丹明 110 的产量为 118 · 3

毫克 (97.5%)。

实施例 V

制备 Cbz-Arg-若道尔的方法

步骤 A

在室温搅拌下, 将 3.5 克 (0.54 毫摩尔) 若丹明 110 溶于 25 毫升浓硫酸中, 然后在约 20 分钟内缓缓加入 700 毫克 (1.45 毫摩尔) 亚硝酸钠和 10 毫升浓硫酸的溶液。约 16 小时后, 将所得混合物倾入 250 克冰水内。把所得暗红色溶液——重氮化合物——加热至 65-70℃ 并保持约 30 分钟, 有氮气放出。不经冷却即过滤所得浅色溶液。冷却后, 过滤所得红褐色絮状沉淀, 用少量水洗, 在 90℃ 真空干燥 16 小时。经 TLC 分析, 该红褐色絮状产物——若道尔半硫酸盐 (含量) 显示为 75%。

若道尔半硫酸盐的产量为 35 克 (96%)。

TLC, Si: R_f 0.70。

步骤 B

将 1.4 克 (3 毫摩尔) 若道尔半硫酸盐溶于 500 毫升冰浴 (4℃) 冷却的 DMF:吡啶 (1:1) 溶液中, 然后加入 8.98 克 (75 毫摩尔) EDAC 的溶液。约搅拌 1 分钟后, 迅速加入溶于 60 毫升 DMF:吡啶 (1:1) 溶液的 6.55 克 (19 毫摩尔) Cbz-L-Arg-HCl 的溶液。约 24 小时后, 按步骤 I 的方法分离所得产物。将所得带红褐色的固体——Cbz-L-Arg-若道尔真空干燥 16 小时。

Cbz-L-Arg-若道尔的产量为 0.2 克 (10%)。

TLC, Si: R_f 0.20。

(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110

与先有技术中 (Gbz-Pro-Arg)₂-若丹明 110 的溶解度比较水溶性若丹明 110 衍生物底物的敏感性提高了一个实例通过下列数据加以说明: 用水溶性底物——(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 和先有技术中的低水溶性底物——(Cbz-Pro-Arg)₂-若丹明 110 测定凝血酶的反应速度。所用的试验条件完全相同, 包括: 温度为 37℃, 体积为 1.0 毫升, 缓冲液为 0.10M Accs (pH 7.0), 含 0.05MKCl。因为肌氨酰基 (Sar) 和苄氧羰基 (Cbz) 有相似的分子量, 故两者的试验浓度均用 100 微克 (μg) / 毫升。需使用 15% 乙醇以促进 (Cbz-Pro-Arg)₂-若丹明 110 的溶解。即使加入 15% 乙醇, Cbz 衍生物底物的溶解度在 37℃ 也只能达到 120 微摩尔。与此相反, 37℃ 时

(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 的溶解度高达 120 毫摩尔, 即其溶解度增加了一千倍。

吸光率改变, 460 毫微米 / 单位凝血酶 / 毫升
先有技术

(Cbz-Pro-Arg)₂ 若丹明 110

80 微摩尔

0.122

本发明

(Bar-Pro-Arg)₂-若丹明 110

80 微摩尔 80 微摩尔

1.700 2.872

比较先有技术底物与本发明底物的上列数据可见, 在摩尔浓度相同时, 本发明的水溶性衍生物底物比先有技术中的低水溶性底物敏感 14 倍以上。使用较高的水溶性底物浓度时, 本发明的底物比先有技术的底物敏感 24 倍以上。

使用水溶性吡啶衍生物底物进行的各种分析新的水溶性吡啶衍生物底物可用于分光光度和荧光检测法测定蛋白水解酶、抑制剂、辅助因子、活化剂和阻活剂的活性。在基于血纤维蛋白凝固的血凝试验中, 该新的水溶性吡啶衍生物底物可代替天然底物——血纤维蛋白原。

为了更充分地了解这一发明, 下面举出几个检测实例。

检测实施例

实施例 I

用(Pyro-Pro-Arg)₂-若丹明 110 对凝血酶进行分光光度分析

通过测定 468 毫微米和 496 毫微米处吸光率的增加, 确定三种不同浓度凝血酶的剂量反应曲线。按下述方法制备凝血酶的工作稀释液: 将纯化的人 α -凝血酶 (Dr. John Fenton, N.Y. state Dept. of Health) 稀释成 pH8.0 的含 0.25M NaCl 的 0.05M HEPES 中的浓度为 1.04 单位 / 毫升、0.52 单位 / 毫升和 0.26 单位 / 毫升的各个稀释液, 并使各稀释液保持在 4℃。将底物 (Pyro-Pro-Arg)₂-若丹明 110 溶解为 pH8.0 的含 0.3MKCl 的 0.20M HEPES 中的溶液, 其浓度为 78 微克 / 毫升。采用光程为 1 厘米的一次性使用的丙烯酸比色杯 (Centaur Sciences Inc.)。用吸管将 1 毫升等份的底物吸入比色杯内, 在一加热装置中加热到 37℃。往比色杯内加入 1 毫升工作凝

血酶稀释液的样品。凝血酶与底物混合后, 用 Hewlett-Packard 8450B 型分光光度计测 468 毫微米和 496 毫微米处的吸光率 (测 30 秒)。在此确定的时间间隔内增加了吸光率为:

凝血酶, 单位 / 毫升	吸光率, 0—30 秒	
	468 毫微米	496 毫微米
0.26	0.0461	0.0462
0.52	0.0912	0.0860
1.04	0.1766	0.1670

在各波长测得的吸光率与凝血酶浓度间存在一
线性关系:

$$\text{相关系数, } \gamma = \frac{468 \text{ 毫微米}}{496 \text{ 毫微米}} = \frac{0.9999}{0.9996}$$

在 468 毫微米和 496 毫微米测得的吸光率之间的关系是: 相关系数, $\gamma = 0.9998$ 。

上述数据证明, 能够在 468 毫微米或 496 毫微米波长处测到吸光读数。

实施例 II

用 (Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 对
凝血因子作荧光分析

用底物 (Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110, 基于活化部分组织促凝血酶原激酶时间 (APTT) 分析, 对凝血因子 VII 和 IX 进行荧光检测。用合成的底物代替存在于人和动物血浆中的天然底物血纤维蛋白原检测凝血酶生成。用正常血浆的测定结果绘出标准校正曲线。该血浆即得自 Curtin Matheson Scientific 公司的 Thromboscreen, TM 用于纠正因子 VII 和 IX 缺乏血浆 (George King Biomedical)。APTT 试剂包含有纯化的大豆磷脂和鞣花酸活化剂 (Dade Diagnostics)。将 125 微克 / 毫升的底物样品溶于含 0.05MKCl 和 5mM CaCl₂ 的 0.10MACES 中, pH7.0。用具有温控吸收池架 (37℃) 的 Turner 430 型分光光度计进行动力学荧光检测。激发和发射波长分别定在 468 毫微米和 525 毫微米。用玻璃试管完成血浆活化, 并用一次性使用的丙烯酸比色杯进行荧光测定。

在试管内加入 100 微升等份的 0.85% 盐水或在盐水中稀释的正常血浆, 然后相继加入 100 微升因子缺乏血浆和 100 微升 APTT 试剂。将试管在加热装置中于 37℃ 保温 2 分钟, 此时向其中加入 100 微升 25mM CaCl₂ 并继续保温 30 秒钟, 将

保温混合物转移到含 2.0 毫升底物溶液（预加温至 37℃）的比色杯内，并测定萤光速率。得到因子Ⅶ和Ⅸ的线性剂量反应曲线（正常的 1% 和 100% 之间的水平）：

相对荧光*

血浆稀释度	因子水平,%正常	因子Ⅶ	因子Ⅸ
—	<1	0.119	0.121
1:250	1	0.121	0.127
1:25	10	0.148	0.154
1:25	100	0.333	0.333

*除了激发和发射波长分别为 350 毫微米时外,在同样测定条件下,0.85 微克硫酸喹宁/毫升 0.1NH₂SO₄ 的相对萤光为 1.0.

实施例Ⅲ

用(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明对

血纤维蛋白溶酶原进行分光光度分析

测定血浆样品中链激酶活化的血纤维蛋白溶酶原,将结果与 Pochron,S.P.等人的标准萤光分析法(Pochron,S.P.etal,Thrombosis Research 13,733—739,1978)相比较。将得自 Hyland Diagnostics 公司的冷融的正常柠檬酸化血浆用于分析标准校正曲线的绘制,将链激酶(Calbiochem-Behring 公司)在 0.02M HEPES 中重新配成 2000 单位/毫升(pH7.5)。将(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 溶解于含 0.05MKCL 的 0.10M ACES (pH7.0) 中,至浓度为 375 微克/毫升。分析过程是:将每份 20 毫升血浆样品及 50 微升 H₂O 加入半微量一次性使用的比色杯(光程 1 厘米, Evergreen Scientific 公司产品)内。在一加热装置中加温至 37℃ 后,向其中加入 500 微升链激酶溶液并混合之,随后于 37℃ 保温 2 分钟零 48 秒。之所以将活化时间定为 2 分 48 秒,是因为它是 COULTER[®]DACOS[®] 化学系统的固定计时增量。在大约 2 分钟时血纤维蛋白溶酶原完全活化,但活化时间亦可长达 15 分钟。以后在 37℃ 加入 500 微升,一等份的底物溶液,混合后,使用 Hewlett-Packard 8450A 型分光光度计于 460 毫微米波长检测其吸光率,测 3 分钟。与对照血浆检测结果比较,链激酶(活化的)血纤维蛋白溶酶原活性以%正常值来表示。12 份血浆样品的结果,读数为 40—140% 正常,此与参比分析结果十分相

近。比较数据的相关系数为 $\gamma=0.990$, 最小二乘方程(the least squaresequation)按 $Y=0.956x+4.08$ 计算。

实施例Ⅳ

用(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 以分光光度

法测定凝血酶原时间

用凝血酶原时间(PT)用于监测血凝的非固有途径。该试验是将组织促凝血酶原激酶加入血浆样品内,导致凝血因子蛋白酶的活化,以最终形成血纤维蛋白凝块。测定血凝块形成速率,该速率与血浆样品中的非固有凝血因子活性直接相关。在这一试验中,可用合成底物(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 代替天然底物-血纤维蛋白原。最后的非固有途径凝血因子-凝血酶是通过合成底物检测的。

底物是在浓度为 40μM, pH 为 7.5 的 0.05MAces 缓冲液中制得的。以每毫升底物 0.05 毫升的比例,将组织促凝血酶原激酶加入含底物的缓冲液中,并将混合物加温至 37℃。在光程为 1 厘米的半微量丙烯酸比色杯(Evergreen Scientific 公司)内加入 25 微升血浆样品。在含有血浆样品的比色杯内加入 0.5 毫升组织促凝血酶原激酶底物混合物,并用 Hewlett-Packard 8450A 型分光光度计测定 496 毫微米处吸光率的改变。对 56 份病人血浆样品——其中包括部分接受了抗凝剂肝素和(或)香豆定(coumadin)的病人的样品——用合成底物进行试验,其结果同血块形成的凝血酶原时间相比较。试验中使用了三种商品组织促凝血酶原激酶试剂:即 General Diagnostics、Ortho Diagnostics 和 Dade Diagnostics 公司的产品。用 Coag-a-Mate[®]2001——光学照相凝血检测系统(General Diagnostics 公司)检测病人样品,测得凝固时间为 9.8 至 40.6 秒。合成底物试验结果与血凝分析值反相关,用三种组织促凝血酶原激酶所得对比数据的相关系数为-0.944、-0.953 和-0.963。

实施例Ⅴ

用(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 以分光光度法测定抗凝血酶Ⅲ-肝素辅助因子

使用水溶性底物(Sar-Pro-Arg)₂-若丹明 110 和 Mitchell 等人的参比萤光底物分析法(Thrombosis Research 12,219—225,1978)检测血浆样品中的抗凝血酶Ⅲ,比较所得结果。向半微量一次性使用的聚苯乙烯比色杯(光程 1 厘米, Ever

green Scientific 公司出品) 内加入 5 微升血浆和 50 微升纯化水。加温到 370℃ 后, 再加入含有 5 单位 / 毫升凝血酶和 10 单位 / 毫升肝素、溶于缓冲盐水的 0.5 毫升一份的溶液。将该混合物于 37℃ 保温 2 分 48 秒。采用 2 分种 48 秒的活化时间是因为它是 COULTER 以 DACOS 系统的固定时间增量。于比色杯内加入 500 微升水溶性底物的溶液, 底物系溶于含 0.05M KCL 的 0.1M ACES (pH7.0) 中, 其浓度为 375 微克 / 毫升 (37℃)。于 460 毫微米波长测定吸光率改变, 测 20 秒种。抗凝血酶 III 水平为正常值的 40—115% 的 26 份血浆样品的测定结果与参比分析值密切相关。比较数据 3, 最小 $\gamma = 0.983$, 最小二乘方程 $y = 1.026x - 2$

亦可按 Dr.P.A.Owren 首先描述的方法 (Lancet III, 754—758, 1959), 通过人所熟知的血栓形成试验 (thrombotest), 用该新的水溶性 ~~吡吨~~ 衍生物底物同时监测非固有的和固有的凝血酶形成途径。血栓形成试验对非固有和固有途径的各因子均很敏感, 而且由这两种途径产生的凝血酶差不多相等。血栓形成试验的试剂包括: 组织促凝血酶原激酶、部分的组织促凝血酶原激酶、吸附了的血浆和血纤维蛋白原。在该试验中, 新的水溶性 ~~吡吨~~ 衍生物底物可代替天然底物——血纤维蛋白原, 以检测已形成的凝血酶的活性。

在各种凝血试验——凝血酶原时间、活化的部分组织促凝血酶原激酶和血栓形成试验中可以使用水溶性若丹明 110 和若道尔衍生物底物, 这一点在上述实施例得到了支持。

虽然本文中给出并详细描述了本发明的特定实施方案和实施例, 但决不是要由此限制本发明的范围。相反地, 本发明通过本说明书和待审批的权利要求, 在不违反本发明之精神实质和范围的前提下, 概括了本发明主题所涉及的所有改动、替代、实施方案、应用和等价内容。