



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **178578**

(13) B

(51) Int Cl<sup>6</sup> C 07 K 1/14

## Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	903261	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	03.11.89, PCT/US89/04867
(22) Inng. dag	20.07.90	(85) Videreføringdag	20.07.90
(24) Løpedag	03.11.89	(30) Prioritet	23.11.88, US, 276083
(41) Alm. tilgj.	20.07.90		
(44) Utlegningsdato	15.01.96		

(71) Patentsøker	Baxter Diagnostics Inc, One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015, US
(72) Oppfinner	Pamela L. H. Hawkins, Miami, FL, US James R. Maynard, Miami, FL, US
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** Fremgangsmåte for ekstraksjon av tromboplastiner samt anvendelse av det ekstraherte tromboplastin

(56) **Anførte publikasjoner** C.A. 104, 84195u  
C.A. 92, 211095x  
C.A. 83, 2485z

(57) **Sammendrag** Protrombintiden (PT) anvendes som en screeningtest for blodkoagulasjonsfaktormangel og for overvåking av oral antikoagulantterapi under anvendelse av coumadin. Tromboplastinreagenser aktiverer det ekstrinsiske koagulasjonsspor og er grunnlaget for protrombintidtesten (PT-testen). Oppfinnelsen beskriver anvendelsen av bariumsulfat og kaotrope midler og ikke-ioniske vaskemidler for ekstraksjon av sensitive tromboplastinreagenser fra vev. Ekstraksjon med natriumtiocyanat alene øker også tromboplastinsensitivitet mye. Oppfinnelsen burde være anvendbar for alle tromboplastiner og vil forbedre deres sensitivitet for alle PT-baserte tester og bestemte analyser.

### Oppfinnelsens område

Oppfinnelsen vedrører en forbedret fremgangsmåte for ekstraksjon av tromboplastiner samt anvendelse av ekstrahert  
5 tromboplastin.

### Oppfinnelsens bakgrunn

Tromboplastinreagenser aktiverer den ekstrinsike koagulasjonsvei og er grunnlaget for protrombintidtesten (PT-testen). PT-testen anvendes til å undersøke med hensyn på  
10 blodkoagulasjonsfaktormangler og for å overvåke oral antikoagulantterapi (f.eks. coumadin). Reagenser for PT-tester omfatter vevtromboplastin, også kalt vevfaktor, og kalsiumioner som aktive bestanddeler fortynnet med passende buffere og stabiliseringsmidler. Tromboplastin danner et kompleks med koagulasjonsfaktor VII, slik at dens proteolytiske aktivitet økes  
15 mye.

Tromboplastin kan utvinnes fra flere forskjellige vev fra forskjellige dyrekilder. Hvert vev har en karakteristisk  
20 aktivitet og sensitivitet overfor koagulasjonszymer (dvs. faktorer); disse egenskapene moduleres av andre bestanddeler i reagenser. Tromboplastinsensitivitet er definert som forlengelsen av levringsstidene til både coumadiniserte plasmaer og plasmaer som mangler levringsfaktorene II, V, VII og X. Sensitivitet overfor coumadinisert plasma fastslås ved å ta forholdet mellom en unormal plasmaprøve og en normal plasmaprøve.  
25

For tiden utvinnes de mest sensitive tromboplastinreagenser fra menneskehjerne og -livmor. Den begrensede tilgjengelighet av disse materialene, deres kostnad og muligheten  
30 for HIV-virusforurensning begrenser deres allmenne godtakelse. Tromboplastin utvunnet fra kaninhjerne, den vanligste kilde, har vanligvis forholdsvis lav sensitivitet sammenlignet med tromboplastiner utvunnet fra menneskevev. Kilden for tromboplastinet, fremgangsmåten for ekstraksjon av tromboplastinet  
35 og reagenssammensetningen er alle viktige parametere ved bestemmelse av reagenssensitivitet. Variasjoner i sammensetningen av PT-reagenser kan også anvendes til å forbedre stabilitet og regulere levringsstider for plasmaprøver fra normale individer.

Historisk sett er tromboplastin blitt ekstrahert fra

vev ved å varme opp vevet i vann eller saltoppløsninger. Tromboplastinreagenser fremstilt av søkeren inneholder tromboplastiner ekstrahert i salt-/tartratoppløsninger (US patentskrift nr. 3.522.148, 25. juli 1970). Disse ekstraktene sentrifugeres for å fjerne store partikler. Supernatanttromboplastinekstraktet inneholder det aktive tromboplastin sammen med natriumkloridet og natriumtartratet fra ekstraksjonsvæsken. I tromboplastin C tilsettes tromboplastinekstraktet til en oppløsning som inneholder kalsiumlaktat, natriumklorid, natriumtartrat, glysin og karboksymetylcellulose. Sluttkonsentrasjonen av ekstraktet er 25 % av det endelige rekondisjonerte volum.

I "Thromboplastin FS" tilsettes tromboplastinekstraktet til en oppløsning som inneholder imidazol, kalsiumlaktat, natriumklorid, natriumtartrat, glysin og karboksymetylcellulose. Ettersom sluttkonsentrasjonen av ekstrakt er 50 % av det endelige rekondisjonerte volum, har "Thromboplastin FS" (TPES), fremstilt av søkeren, en forholdsvis høy konsentrasjon av kaninhjerneekstrakt. Selv om det er mer sensitivt enn andre kaninhjernetromboplastiner, er PT-verdiene i det normale område lengre enn ønsket, turbiditeten er høy og stabiliteten er mindre enn optimal.

Ifølge DE 3.150.594A1 er det utviklet en fremgangsmåte for å gjøre kaninhjernetromboplastin mer sensitivt. Ved denne fremgangsmåten blandes kaninhjernerpulver med like deler cellulosepulver og vaskes med natriumacetatbuffer ved pH 6,5-8 for å fjerne slike forurensninger som hemoglobin. Hjerneresten ekstraheres så med overflateaktive midler, slik som natriumdeoksyholat i nærvær av kalsiumioner. Nøkkelbestanddelen beskrevet i forbindelse med denne fremgangsmåten er kalsiumioner, og om ønsket anvendes et overflateaktivt middel. Anvendelsen av bariumsulfat er omtalt i forbindelse med denne fremgangsmåten, men satt ut av betraktning: "ifølge våre egne erfaringer utfelless tromboplastinet i stor grad sammen med bariumsulfatet". Ved vanlige fremgangsmåter skyldes den relative ufølsomhet av tromboplastiner delvis tilstedeværelsen av koagulasjonsfaktor VII som er sterkt bundet til tromboplastinet. Bariumsulfat er vanlig anvendt som et adsorpsjonsmiddel for å fjerne vitamin K-avhengige koagulantproteiner, slik som

faktorene II, VII, IX og X.

#### Kort oppsummering av oppfinnelsen

Ved foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en  
5 ny fremgangsmåte for ekstraksjon av tromboplastiner som omfat-  
ter:

(a) vev som inneholder tromboplastin bringes i kon-  
takt med en effektiv mengde ekstraksjonsvæske under betingel-  
ser som gir ekstraksjon av tromboplastin, og

10 (b) det ekstraherte tromboplastin skilles fra det  
oppbrukte vev. Fremgangsmåten er kjennetegnet ved at det an-  
vendes en ekstraksjonsvæske som omfatter kaotrope ioner sammen  
med et salt, eller kaotrope ioner sammen med et salt, et ikke-  
ionisk vaskemiddel og bariumsulfat, eller kaotrope ioner sam-  
15 men med et salt og bariumsulfat, idet det anvendes en konsen-  
trasjon av det kaotrope ion som er 5-100 mM. Oppfinnelsen om-  
fatter også anvendelse av ekstrahert tromboplastin fremstilt  
ifølge krav 1, som har omtrent normale protrombintider og for-  
økt sensitivitet til faktormangler og coumadinterapi, i en  
20 protrombintidtest.

Ved foreliggende oppfinnelse anvendes forskjellige  
kombinasjoner av ikke-ioniske vaskemidler, slik som "Triton X-  
100", slike kaotrope ioner som tiocyanat, jodid, guanidin og  
perklorat, og bariumsulfat for å ekstrahere tromboplastin fra  
25 en vevkilde. Ikke-ioniske vaskemidler fremmer i stor grad  
virkningsfullheten ved fjerning av koagulasjonsfaktorene bun-  
det til tromboplastinet. Den her beskrevne fremgangsmåte byr  
på fordelene ved forøkt sensitivitet overfor faktormangler og  
coumadinterapi, mens det opprettholdes en forholdsvis kort  
30 normalområde-PT. En undersøkelse utført av CAP Hematology  
Resource Committee i 1978 avslørte at normalområde-PT var 9-  
15 sekunder for 96 % av de rapporterende laboratorier (Tri-  
plett, D.A., "How the Prothrombin Time Actually is Performed"  
i *Standardization of Coagulation Assays: An Overview*, red. av  
35 D.A. Triplett, College of American Pathologists, Skokie, 1982,  
s. 113-119). Det foretrukne PT-område for normale donorer er  
10-14 sekunder. Reagenser fremstilt ved å bruke fremgangs-  
måtene som her er beskrevet, har forøkt rekondisjonert

stabilitet i forhold til "Thromboplastin FS", bruker mindre hjerneekstrakt og er mindre optisk tette. Foreliggende oppfinnelse tillater sensitivitet overfor faktor VII-mangelfullt plasma ved å bruke ufølsomme tromboplastinreagenser som kan anvendes ved enhver PT; den foretrukne PT-tid for faktor VII-mangelfullt plasma er større enn 60 sekunder. Tromboplastinreagenset ifølge foreliggende oppfinnelse vil ha et forhold mellom den unormale kontroll (COL2) og den normale kontroll (COL1) som er større enn 1,8, forholdet er imidlertid fortrinnsvis i området 1,8-3,0.

Alternativt øker kaotrope ioner, slik som tiocyanat, guanidin eller jodid, brukt alene i ekstraksjonsvæsken sensitivitet mye. Kaotrope ioner er midler som anvendes for å løse opp membraner og enzymkomplekser ved å bryte ikke-kovalente krefter (W. Hanstein, *Destabilization of Membranes with Chaotropic Ions*, Meth. Enzy. XXXI (1974)). Kaotrope ioner har vanligvis en lav ladningstetthet med en stor radius. Vanlig brukte ioner omfatter: tribromacetat, trikloracetat, guanidinium, tiocyanat, jodid, perklorat, dikloracetat, nitrat, bromid, trifluoracetat og kloracetat.

#### Nærmere beskrivelse og beste utførelsesform

Ved denne oppfinnelse ekstraheres vev, slik som aceton-dehydratisert kaninhjernerpulver, med en blanding av bariumsulfat, ikke-ioniske vaskemidler og kaotrope ioner, slik som tiocyanat, jodid, guanidin eller perklorat, for å regulere reagensegenskaper. Oppfinnelsen bør være anvendbar for alle tromboplastiner og vil forbedre sensitiviteten for alle PT-baserte tester og spesifikke analyser.

PT-verdier kan bestemmes ved å anvende automatiserte koagulasjonsanalyseapparater, slik som "MLA Electra 800", mekaniske instrumenter, slik som fibrometere, eller ved hjelp av manuelle teknikker. Det unormale plasma for disse undersøkelser har enten vært en unormal kontroll, slik som "Ci-Trol Level II" (COL2), eller lyofiliserte coumadiniserte plasmaer (LAC) for en antikoagulantkontroll. "Ci-Trol Level I" (COL1) eller en blanding av friskt, normalt, sitrattilsatt plasma (FNP) er blitt anvendt til å bestemme normale PT-verdier. Sen-

sitivitet for faktormangelfullheter fastlegges ved å måle PT til et faktor VII-mangelfullt plasma (CF7). Kaninhjernetromboplastiner som er tilgjengelige i USA ("Thromboplastin C") gir forhold på 1,5 for COL2/COL1 og en 28-30 sekunders PT for faktor VII-mangelfullt plasma på "MLA Electra 800".

### Eksempel I

#### Generell fremgangsmåte anvendt for å fremstille tromboplastiner

For å lage tromboplastinreagenset, ekstraheres kaninhjernerpulver (50 g) i en ekstraksjonsvæske (1000 ml) inneholdende natriumklorid (30-180 mM), et ikke-ionisk vaskemiddel, slik som "Triton X-100" (0,01-0,25 %), og et kaotropt ion, slik som natriumtiocyanat (5-100 mM). Alternativt kan ekstraksjonsvæsken inneholde bare natriumklorid (0-150 mM) og det kaotrope ion (5-100 mM). Bariumsulfatpulver tilsettes ekstraksjonsvæsken ved 0,1-1,0 g/g hjernerpulver. Ekstraksjonen utføres ved 43-47°C i 15 minutter; ekstraksjonsblandingen sentrifugeres så i 10 minutter ved 2500 RPM for å fjerne bariumsulfatet og de store partiklene. Ekstraktet tilsettes en base som inneholder kalsiumioner (7-14 mM), natriumklorid (70-150 mM), buffere og stabiliseringsmidler. Produktet frysetørkes så.

### Eksempel II

#### Effekten av "Triton X-100" og bariumsulfat ved ekstraksjon på tromboplastinsensitivitet

Acetondehydratisert hjernekaninpulver (1 g) ble ekstrahert i 20 ml 0,63 % natriumklorid (NaCl) inneholdende 0,6 g bariumsulfat ( $\text{BaSO}_4$ ) og 0-0,25 % "Triton X-100" i 15 minutter ved 45°C; ekstraksjonsblandingen ble så sentrifugert ved 2500 RPM i 10 minutter for å fjerne bariumsulfatet og store partikler. Ekstraktet ble tilsatt en base ved en sluttkonsentrasjon på 32 % i 30 mM (TAPSO)-buffer, 5 % glysin, 0,6 % polyetylenglykol (PEG) med en molekylvekt på 8000, 13,7 mM kalsiumklorid ( $\text{CaCl}_2$ ), 100 mM NaCl, pH 7,0. Protrombintider (PT) i sekunder ble målt ved å bruke et "MLA Electra 800".

Både forholdet mellom COL2/COL1 og PT for faktor VII-mangelfullt plasma (CF7) øker betydelig etter hvert som

mengden av vaskemiddel økes (tabell I).

Tabell I

Effekt av "Triton X-100" og bariumsulfat ved ekstraksjon på  
5 tromboplastin. Bulk (MLA-800): gjennomsnitt for to gjen-  
takelser

% "Triton X-100"	COL1	COL2	Forhold COL2/COL1	CF7
10 0 % kontroll	11,8	20,6	1,75	95,9
0,05 %	12,1	22,1	1,83	107,4
0,1 %	13,0	25,1	1,93	120,4
0,25 %	14,3	34,4	2,41	193,4

15 Grunnblanding:

30 mM TAPSO, 5 % glysin, 0,6 % PEG, 13,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl,  
32 % ekstrakt, pH 7,0.

20 Hjerne ekstrahert i 0,63 % NaCl og vaskemiddel med  
bariumsulfat ved 0,6 g/g hjerne i 20 ml ekstraksjonsvæske.

Eksempel III

Effekten av natriumtiocyanat (NaSCN) ved ekstraksjon på  
tromboplastinsensitivitet

25 Acetondehydratisert kaninhjernerpulver (1 g) ble ekstra-  
hert i 20 ml 0,63 % natriumklorid (NaCl), bortsett fra der  
hvor det er angitt, inneholdende 0 (kontroll), 10, 50 og  
100 mM NaSCN i 15 minutter ved 45°C; en prøve inneholdende  
30 100 mM NaSCN uten NaCl ble også evaluert. Bariumsulfat ble  
ikke anvendt i dette forsøket. Ekstraksjonsblandingen ble  
sentrifugert som beskrevet i eksempel I. Protrombintider (PT)  
i sekunder ble målt ved å bruke et "MLA Electra 800".

35 Både forholdet mellom COL2/COL1 og PT for faktor VII-  
mangelfullt plasma (CF7) øker betydelig etter hvert som  
mengden av NaSCN økes (tabell II). Natriumtiocyanat alene økte  
tromboplastinsensitivitet.

Tabell II

Effekt av natriumtiocyanat (NaSCN) ved ekstraksjon på trombo-  
plastin. Bulk (MLA-800)

	COL1	COL2	Forhold COL2/COL1	CF7
Kontroll	11,9	21,5	1,81	37,3
10 mM NaSCN	12,5	24,1	1,93	67,4
50 mM NaSCN	13,7	30,9	2,26	159,3
100 mM NaSCN	14,7	35,6	2,42	177,7
100 mM NaSCN-NO NaCl	14,1	31,6	2,24	131,6

Grunnblanding:

30 mM TAPSO, 5 % glysin, 0,6 % PEG, 13,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl,  
32 % ekstrakt, pH 7,0.

#### Eksempel IV

#### Sammenligning av forskjellige sammensetninger av ekstraksjons- væsker og ekstraktprosent på tromboplastinsensitivitet

Kaninhjernepulver ble ekstrahert i ekstraksjonsvæsker  
inneholdende to forskjellige sammensetninger av NaCl, "Triton  
X-100", NaSCN og bariumsulfat. I tabell III inneholdt ekstrakt  
E 130 mM NaCl, 50 mM NaSCN, 0,05 % "Triton X-100" og 0,3 g  
bariumsulfat/g hjernepulver; ekstrakt N inneholdt 50 mM NaCl,  
10 mM NaSCN, 0,02 % "Triton X-100" og 0,4 g bariumsulfat/g  
hjernepulver. Hjernepulveret ble ekstrahert, sentrifugert og  
ekstraktene tilsatt en base til sluttkonsentrasjonene på 32 %  
eller 50 % som beskrevet i eksempel I. Protrombintider (PT) i  
sekunder ble målt ved å anvende et "MLA Electra 800".

Tabell III viser at bestanddelene i ekstraksjonsvæskene  
og mengden av ekstrakt kan variere betydelig, hvorved det fås  
tromboplastiner med forøkt sensitivitet i forhold til kanin-  
hjernetromboplastiner, slik som "Dade Thromboplastin C" (for-  
hold COL2/COL1 = 1,5).

Tabell III

Sammenligning av forskjellige sammensetninger av ekstraksjonsvæsker og ekstraktprosent på tromboplastin. Bulk (MLA-800)

% ekstrakt	COL1	COL2	Forhold COL2/COL1	FNP	LAC	Forhold LAC/FNP	CF7
32 % ekstrakt E	14,6	32,8	2,25	14,2	35,5	2,50	81,1
50 % ekstrakt E	16,9	45,5	2,69	15,8	50,4	3,19	155,1
32 % ekstrakt N	12,8	24,1	1,88	12,4	27,4	2,23	106,9
50 % ekstrakt N	13,9	32,3	2,32	13,4	39,0	2,91	176,6
"Thromboplastin FS"	13,3	24,5	1,84	13,0	31,4	2,42	64,6

Grunnblanding:

30 mM TAPSO, 5 % glysin, 0,6 % PEG, 13,7 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 7,0.

Ekstrakt E:

Hjernepulver ekstrahert i 130 mM NaCl, 50 mM NaSCN, 0,05 % "Triton X-100", 0,3 g bariumsulfat/g hjernepulver.

Ekstrakt N:

Hjernepulver ekstrahert i 50 mM NaCl, 10 mM NaSCN, 0,02 % "Triton X-100", 0,4 g bariumsulfat/g hjernepulver.

#### Eksempel V

Sammenligning av forskjellige preparater av sensitive tromboplastiner

Acetondehydratisert kaninhjernepulver ble ekstrahert i en oppløsning inneholdende 50 mM NaCl, 10 mM NaSCN, 0,02 % "Triton X-100" og 0,4 g bariumsulfat/g hjernepulver. Hjernepulveret ble ekstrahert som beskrevet i eksempel I. Ekstraktene ble tilsatt baser i to forskjellige preparater: preparat D inneholdt 35 % ekstrakt i 40 mM bicinbuffer, 5,25 % glysin, 0,6 % PEG, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 134 mM NaCl, pH 7,1. Preparat T inneholdt 36 % ekstrakt i 80 mM TAPSO, 5,25 % glysin, 0,6 % PEG,

10 mM CaCl<sub>2</sub>, 118 mM NaCl, pH 7,4. Begge preparatene ble lyo-filisert. Etter rekondisjonering ble PT i sekunder målt ved å anvende et "MLA Electra 800".

Tabell IV viser at sammensetningen av preparatet kan varieres betydelig, hvorved det fås tromboplastiner med forøkt sensitivitet og andre egenskaper som er bedre enn "Thromboplastin FS", et forholdsvis sensitivt kaninhjernetromboplastin.

10 Tabell IV

Sammenligning av forskjellige preparater av sensitive tromboplastiner. Bulk (MLA-800)

Preparat	COL1	COL2	Forhold COL2/COL1	FNP	LAC	Forhold LAC/FNP	CF7
D	13,4	31,1	2,32	12,4	33,5	2,70	86,3
T	14,0	35,0	2,50	13,0	33,9	2,61	93,0
"Thromboplastin FS"	14,2	26,7	1,88	13,4	30,5	2,28	58,9

Ekstraktblanding:

Hjernerpulver ekstrahert i 50 mM NaCl, 10 mM NaSCN, 0,02 % "Triton X-100", 0,4 g bariumsulfat/g hjernerpulver.

25 Preparat D:

40 mM bicin, 5,25 % glysin, 0,6 % PEG, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 134 mM NaCl, pH 7,1.

Preparat T:

30 80 mM TAPSO, 5,25 % glysin, 0,6 % PEG, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 118 mM NaCl, pH 7,4.

Eksempel VI

Fremstilling av tromboplastiner med sensitivitet som er typisk for dem som selges i USA

Acetondehydratisert kaninhjernerpulver ble ekstrahert i oppløsning inneholdende 50 mM NaCl, 10 mM NaSCN, 0,02 % "Triton X-100" og 0,4 g bariumsulfat/g hjerner-

pulveret ble ekstrahert som beskrevet i eksempel I. Ekstraktene ble tilsatt baser for tre forskjellige preparater: preparat E inneholdt 10 % ekstrakt i 53 mM TAPSO-buffer, 4,00 % glysin, 0,3 % PEG, 11 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, pH 7,4; preparat F inneholdt 12 % ekstrakt i 50 mM TAPSO-buffer, 4,00 % glysin, 0,3 % PEG, 11 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, pH 7,4; preparat G inneholdt 10 % ekstrakt i 53 mM TAPSO-buffer, 4,00 % glysin, 0,3 % PEG, 11 mM CaCl<sub>2</sub>, 65 mM NaCl, pH 7,4. Preparatene ble lyofilisert. Etter rekondisjonering ble PT i sekunder målt ved å anvende et "MLA Electra 800".

Tabell V viser at ekstraksjonsvæskene som her er beskrevet, kan anvendes til å lage vanlige kaninhjernetromboplastiner som er tilgjengelige i USA og som er like med "Thromboplastin C". Forholdsvis små mengder ekstrakt (10-12 % mot 25 % for "Thromboplastin C") er påkrevd for å lage et tromboplastin med lavere COL2/COL1-forhold og LAC/FNP-forhold. Sensitiviteten til faktor VII økes imidlertid.

Tabell V

Sammenligning av forskjellige preparater av tromboplastiner med sensitivitet som er typisk for dem som selges i USA (MLA-800)

Preparat	COL1	COL2	Forhold COL2/COL1	FNP	LAC	Forhold LAC/FNP	CF7
E	11,8	20,4	1,73	11,6	21,7	1,87	42,1
F	11,7	20,4	1,74	11,3	21,3	1,88	40,6
"Thromboplastin C"	11,9	20,2	1,70	11,5	20,2	1,76	27,7

Ekstraktblanding:

Hjernerpulver ekstrahert i 50 mM NaCl, 10 mM NaSCN, 0,02 % "Triton X-100", 0,4 g bariumsulfat/g hjernerpulver.

Preparat E:

10 % ekstrakt, 53 mM TAPSO, 4,00 % glysin, 0,3 % PEG, 11 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM NaCl, pH 7,4.

**Preparat F:**

12 % ekstrakt, 50 mM TAPSO, 4,00 % glysin, 0,3 % PEG, 11 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM NaCl, pH 7,4.

**5 Preparat G:**

12 % ekstrakt, 50 mM TAPSO, 4,00 % glysin, 0,3 % PEG, 11 mM  $\text{CaCl}_2$ , 65 mM NaCl, pH 7,4.

Varianter eller ekvivalenter ifølge oppfinnelsen

10 Yteevnen og sensitiviteten til et PT-reagens er resultatet av interaksjoner mellom alle bestanddelene i reagenset. Generelt øker endringer i sammensetning som øker sensitiviteten også verdien av den normale PT. Ved foreliggende oppfinnelse avveies bestanddelene i ekstraksjonsvæsken nøye for å få  
15 best normal-PT og sensitivitet. I tillegg virker de enkelte bestanddelene i ekstraksjonsblandingen inn på reagensyteevne på bestemte måter. Ved å variere konsentrasjonene av de forskjellige bestanddelene, endres også egenskapene til det fremstilte ekstrakt; ekstrakter med forskjellige egenskaper kan  
20 derfor fremstilles, avhengig av ekstraksjonsvæskesammensetningen.

Bariumsulfat og hvilket som helst ikke-ionisk vaskemiddel, slik som "Triton X-100", "Brij-35", "Nonidet P40", "FSN" og "Tergitol" øker sensitivitet mye, spesielt til bestemte  
25 koagulasjonsfaktormangler, slik som faktor VII. Kaotrope ioner (tiocyanat, guanidin, jodid, perklorat) alene i ekstraksjonen øker sensitivitet til både coumadiniserte pasientprøver og bestemte faktormangler, slik som faktor VII. For å lage tromboplastinreagenset, ekstraheres vevet i en ekstraksjonsvæske  
30 som inneholder natriumklorid (30-180 mM), det ikke-ioniske vaskemiddel (0,01-0,25 %) og det kaotrope ion, slik som tiocyanat, guanidin, jodid og perklorat (5-100 mM). Bariumsulfatpulver tilsettes ekstraksjonsvæsken ved 0,1-1,0 g/g hjernepulver. Alternativt kan ekstraksjonsvæsken inneholde bare natriumklorid (0-150 mM) og natriumtiocyanat (5-100 mM). Ekstraksjonen utføres ved 43-47°C i 15 minutter; ekstraksjonsblandingen sentrifugeres så i 10 min ved 2500 RPM for å fjerne bariumsulfatet og store partikler. Ekstraktet tilsettes en  
35 base som inneholder kalsiumioner (7-14 mM), natriumklorid (70-

150 mM), buffere og stabiliseringsmidler. Også bufferne og stabiliseringsmidlene kan varieres for å forbedre stabiliteten til produktet.

Ekstraksjonsfremgangsmåten og -bestanddelene kan anvendes med hvilken som helst kilde for vev inneholdende trombo-  
plastin, slik som kaninhjerne og -lunge, bovinhjerne og -lunge, ovinhjerne og -lunge og humanhjerne, -lunge og -placenta.

10

### P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for ekstraksjon av tromboplastiner som omfatter:

15 (a) vev som inneholder tromboplastin bringes i kontakt med en effektiv mengde ekstraksjonsvæske under betingelser som gir ekstraksjon av tromboplastin, og

(b) det ekstraherte tromboplastin skilles fra det oppbrukte vev,

20 k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes en ekstraksjonsvæske som omfatter kaotrope ioner sammen med et salt, eller kaotrope ioner sammen med et salt, et ikke-ionisk vaskemiddel og bariumsulfat, eller kaotrope ioner sammen med et salt og bariumsulfat, idet det anvendes en konsentrasjon av  
25 det kaotrope ion som er 5-100 mM.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes en effektiv mengde av ekstraksjonsvæsken som er ca. 100 ml for hvert  
30 5 g vev.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes en konsentrasjon av det kaotrope ion som er 10-100 mM.

35

4. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav,

k a r a k t e r i s e r t v e d at det ikke-ioniske vaskemiddel anvendes ved 0,01-0,25 %.

5. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, karakterisert ved at det anvendes en konsentrasjon av saltet i området 30-180 mM.
- 5
6. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, karakterisert ved at det anvendes en effektiv mengde bariumsulfat som er 0,1-1,0 g/g vev inneholdende tromboplastin.
- 10
7. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, karakterisert ved at ekstraksjonen utføres ved 43-47°C i omtrent 15 minutter.
- 15
8. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av de forutgående krav, karakterisert ved at det som vev anvendes kaninhjernerpulver.
- 20
9. Anvendelse av ekstrahert tromboplastin fremstilt ifølge krav 1, som har omtrent normale protrombintider og forøkt sensitivitet til faktormangler og coumadinterapi, i en protrombintidtest.
- 25
10. Anvendelse ifølge krav 9, karakterisert ved at den normale protrombintid ligger i området 9-15 sekunder.
- 30
11. Anvendelse ifølge krav 9 eller 10, karakterisert ved at den forøkte sensitivitet for coumadinterapi vist ved COL2/COL1-forhold ligger i området 1,8-3,0.
- 35