

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 163189 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0306/86

(51) Int.Cl.5

C 12 Q 1/56

(22) Indleveringsdag: 21 jan 1986

(41) Alm. tilgængelig: 30 jul 1986

(44) Fremlagt: 03 feb 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 29 jan 1985 DE 3502878

(71) Ansøger: *BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Sandhoferstrasse 112-132; D-W-6800 Mannheim-Waldhof, DE

(72) Opfinder: Knut *Bartl; DE, Helmut *Lill; DE

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde og reagens til bestemmelse af plasmas fibrinolytiske tilstand

(56) Fremdragne publikationer

306-86

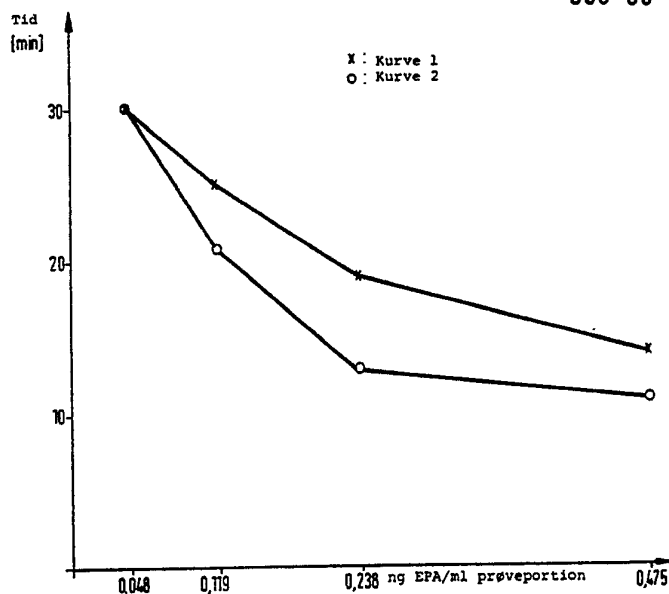
(57) Sammendrag

306-86

Til bestemmelse af plasmas fibrinolytiske tilstand sætter man til en naturlig plasmaprøve

- en til uklarhedsdannelse tilstrækkelig mængde fibrin eller dette tilvejebringes in situ og uklarheden eller de dannede fibrin-spalteprodukter måles, eller
- et farvedannende plasminsubstrat og en til uklarhedsdannelse ikke-tilstrækkelig mængde fibrin, fibrinogen-spalteprodukter eller et enzym, der danner fibrin in situ, og måler den dannede farve.

Bestemmelsen er hurtig og pålidelig.



DK163189 B

5 Fibrinolyse er den modsatte reaktion af blodkoagulering. Ved
blodkoagulering opstår der udfra fibrinogen under indflydelse
af enzymet thrombin fibrinmonomer, som under indflydelse af
kalciumpioner og andre faktorer polymeriserer til et uopløseligt
skelet af fibrin. Det fremkomne fibrinmolekyle bevirker, at
den koagulerede blodmasse stivner. Da denne fibrindannelses-
10 proces stadig forløber i karsystemet, er et modsat rettet system,
det fibrinolytiske system, ligeledes stadig aktivt for at for-
hindre, at der uden særlig anledning sker dannelse af thromber.
Dette fibrinolytiske system fører under indflydelse af plasmi-
nogenaktivator til dannelse af plasmin ud fra plasminogen og
15 plasmin forårsager opløsning af fibrin under dannelse af fibrin-
spalteprodukter. Bestemmelsen af et plasmas fibrinolytiske til-
stand er derfor af stor betydning til vurdering af thrombosefa-
rer.

20 Der kendes allerede prøvemethoder, der måler blods (plasmas)
spontane fibrinolytiske aktivitet eller den fibrinolytiske re-
aktion på stimulanter, der frigør plasminogenaktivator fra kar-
væggen. Det er her nødvendigt at udkoble indvirkningen af plas-
mainhibitorer, hvilket imidlertid i praksis for det meste kun
25 lykkes utilstrækkeligt og samtidigt også betyder en kunstig for-
andring af prøven.

Ved bestemmelsen af euglobulin-lyse-tid går man ud fra Citrat-
plasma. Til dette sættes der eddikesyre og der fracentrifugeres.
30 Bundfaldet opløses i puffer, og der tilsættes thrombin. Der in-
kuberes ved 37°C, og tiden indtil opløsning af den koagulerede
masse måles. Måletiden bliver herved ganske vist væsentligt for-
kortet, men man bestemmer herved en in vitro fibrinolyseaktivi-
tet, der ikke nødvendigvis er korreleret med aktiviteten in vivo.

35 Man har derfor også allerede udviklet metoder, der gennemføres
uden eliminering af plasmasinhibitorer. En sådan metode er f.eks.

bestemmelsen af helblod-lyse-tiden.

5

Således sættes der ved bestemmelsen af helblod-lyse-tiden thrombin til helblod, og den dannede koagulerede masse inkuberes ved 37°C, og tiden indtil dens opløsning måles. Denne tid udgør ved normale værdier ikke under 24 timer. Metoden er derfor tidskrævende, kan ikke automatiseres og egner sig kun til grov vurdering af den fibrinolytiske tilstand. En unormal lav fibrinolytisk aktivitet kan endog slet ikke bestemmes.

10

Der opnås noget kortere tider, når der arbejdes med fortyndet blod, men for øvrigt er de nævnte ulemper der stadig.

15

Den såkaldte fibrinpladeprøve, der arbejder med citratplasma eller gensuspenderet euglobulinbundfald, skulle give nøjagtige resultater. Hovedulempen ligger her ved den lange inkubationstid på 18 timer ved 37°C.

20

Det er således formålet med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe en global fibrinolyseprøve, som undgår ulemperne ved de ovennævnte kendte metoder og navnlig på forholdsvis kort tid giver resultater, der på pålidelig måde genspejler tilstanden in vivo, lader sig automatisere og kan udnyttes fotometrisk.

25

Dette opnås ifølge opfindelsen ved hjælp af en fremgangsmåde til bestemmelse af plasmas fibrinolytiske tilstand, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at man til en naturlig plasmaprøve

30

a) tilsætter en til uklarhedsdannelse tilstrækkelig mængde fibrin eller tilvejebringer dette in situ og måler uklarheden eller de dannede fibrin-spalteprodukter, eller

35

5 b) tilsætter et farvedannende plasminsubstrat og en til uklar-
hedsdannelse ikke tilstrækkelig mængde af fibrin, fibrino-
gen-spalteprodukter eller et enzym, der danner fibrin in
situ og måler den dannede farve.

10 Med uklarhedsmåling forstås her indenfor den foreliggende op-
findelses rammer målingen af uklarhedens formindskelse eller
forøgelse pr. tidsenhed, målingen af tiden indtil opnåelse
af uklarhedsmaksimum eller måling af tiden indtil opnåelse af
en bestemt nedsættelse eller forøgelse af uklarheden, regnet
15 i forhold til uklarhedsmaksimummet. Der kan også anvendes en
kombination af disse målemuligheder. Særligt foretrækkes det
at måle tiden indtil opnåelse af en defineret uklarhedsned-
sættelse eller tiden indtil opnåelse af uklarhedsmaksimum.

20 Farvemålingen kan foregå ved at følge farvedannelsen kinetisk,
idet ekstinktionsændringen pr. tidsenhed fastsættes. Ligeledes
kan man bestemme den efter en i forvejen angivet tid opnåede
ekstinktion eller farvedannelsesreaktionen kan efter en i for-
vejen angivet tid afbrydes, og derefter kan man på et vilkår-
ligt senere tidspunkt måle den dannede farve.

25 Målingen af de dannede fibrin-spalteprodukter kan foregå ved
hjælp af i handelen almindeligt tilgængelige prøvereagenser
eller prøvemethoder. Eksempler er stafylokok-clumping-test
(fremstillet af Boehringer Mannheim GmbH) eller immunologiske
30 metoder f.eks. ved hjælp af antistofbelagte latexpartikler
(fremstillet af Wellcome Corp.).

Afbrydelsen af farvedannelsesreaktionen kan ske ved tilsætning
af egnede inhibitorer, fortrinsvis plasmininhibitorer eller
35 syrer som f.eks. eddikesyre eller citronsyre. Fortrinsvis må-
les tiden indtil opnåelsen af en bestemt ekstinktion.

Den ovenfor definerede fremgangsmåde ifølge opfindelsen giver
5 en bestemmelse af plasmas hyperfibrinolytiske aktivitet. Her-
ved udløser allerede i plasmaen tilstedeværende eller fremkom-
ne plasminogenaktivatorer reaktionen. Denne udførelsesform for
fremgangsmåden ifølge opfindelsen egner sig navnlig til at føl-
ge en fibrinolyseterapi. Man kan dermed fastslå, hvorledes det
10 naturlige plasmas fibrinolytiske tilstand ændrer sig i løbet
af terapien.

Ifølge en yderligere udførelsesform for fremgangsmåden ifølge
opfindelsen tilsættes der yderligere en bestemt mængde plasmi-
15 nogenaktivator, idet der fortrinsvis benyttes terapeutisk an-
vendte koncentrationer. Ved denne udførelsesform for fremgangs-
måden bestemmer man plasmaets mulige reaktivitet i nærværelse
af definerede mængder plasminogenaktivator. Dette er særlig
vigtigt for indledningen af en fibrinolyseterapi. Man kan der-
20 ved fastslå, hvorledes plasmaets fibrinolytiske tilstand ændrer
sig, når der tilsættes de til en fibrinolyseterapi påtænkte
terapeutika, såsom t-PA (EPA), urokinase eller streptokinase.

Ifølge en foretrukket udførelsesform tilvejebringes fibrinet
25 in situ ved tilsætning af thrombin eller et thrombinlignende
enzym, såsom batroxobin eller arvin.

Som fibrinogenspalteprodukter anvendes fortrinsvis sådanne,
der opnås ved behandling af fibrinogen med bromcyan (I.H.Ver-
30 heijen, Thromb. Haemostas 48, 266-269 (1982)). Fortrinsvis an-
vendes en koncentration fra 10 til 150 µg/ml.

Fibrinmonomerer fremstilles ved behandling af fibrinogen med
batroxobin, inaktivering af batroxobin med diisopropylfluor-
35 fosfat, fjernelse og efterfølgende opløsning af fibrinklumper
i 1 til 3 molær urinstofopløsning. Fortrinsvis anvendes kon-
centrationer på 1 til 100 µg/ml fibrinmonomer.

5 Som farvedannende plasminsubstrat kan anvendes ethvert plas-
minsubstrat, hvorfra der under indvirkning af plasmin fra-
spaltes en til farvedannelse egnet gruppe. Som farvedannende
grupper kommer her både sådanne på tale, der kan måles direkte
fotometrisk som f.eks. nitroanilin, dinitroanilin og derivater
deraf, såvel som sådanne forbindelser, der ved reaktion med en
10 yderligere komponent bevirker en farvedannelse. Eksempler her-
på er:

Ved en udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen
under tilsætning af en plasminogenaktivator kan man som plas-
15 minogenaktivator anvende EPA (Extrinsic Plasminogen-Aktivator
t-PA), urokinase eller streptokinase. Et foretrukket kromogent
plasminsubstrat er Tos-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilin.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan gennemføres ved en vil-
20 kårlig temperatur mellem ca. 20 og 40°C.

En yderligere genstand for opfindelsen er et reagens til be-
stemmelse af plasmas fibrinolytiske tilstand, som er egnet til
gennemføring af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Et sådant
25 reagens er ejendommelig ved, at det indeholder plasminogenakti-
vator, thrombin eller et thrombinlignende enzym og puffer.

I stedet for thrombin eller thrombinlignende enzym kan rea-
genset også indeholde fibrinspalteprodukter eller fibrinmomo-
30 mer.

Dersom reagenset ifølge opfindelsen er bestemt til varianten
b) ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, dvs. farvemålingen,
indeholder det yderligere et farvegivende plasminsubstrat.

35 Ifølge en foretrukket udførelsesform indeholder reagenset i-
følge opfindelsen desuden mindst et stof fra gruppen polyethy-

5 lenglokol, ikke-ionisk, overfaldeaktivt middel og okseserum-albumin.

I en første udførelsesform for reagenset ifølge opfindelsen indeholder dette EPA, batroxobin, trispuffer pH 7 til 8, polyethylenglykol og ikke-ionisk overfladeaktivt middel.

10 Til farvemåling indeholder dette reagens hensigtsmæssigt i stedet for batroxobin fibrinogen-spalteprodukter fremstillet ved bromcyanbehandling af fibrinogen eller i stedet fibrinmonomer og desuden Tos-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilin.

15 For de enkelte bestanddele af reagenset ifølge opfindelsen gælder tilsvarende de ovennævnte udførelsesformer i sammenhæng med den nærmere forklaring af fremgangsmåden.

20 De følgende eksempler belyser opfindelsen yderligere i forbindelse med den vedføjede tegning.

På tegningen viser:

25 fig.1 en justeringskurve for en uklarhedsprøve med EPA som plasminogenaktivator.

E k s e m p e l 1

30 Uklarhedsprøve med EPA som plasminogenaktivator

Reagenssammensætning:

Tris/HCL, 0,1 mol/l, pH 7,5
Polyethylenglykol 6000, 2 vægt%
35 overfladeaktivt middel ("Tween"^(R) 80) 0,1 vægt%
okseserumalbumin (RSA), 1 vægt%
batroxobin 0,02 BU/ml
EPA (0,01 - 10 ng/ml prøveportion)

Prøveportion: 50 μ l prøve (plasma)
1000 μ l reagens

5

Reagens og prøve blandes ved 25°C, og uklarheden følges straks med et fotometer ved $\lambda = 334 \text{ nm}$

10

Ekstinktionsændringen registreres ved hjælp af en skriver (papirhastighed 0,1 cm/min).

15

Fremstillingen af en justeringskurve sker enten ved at fastlægge tiden t_1 indtil der nås uklarhedsmaksimum (fig. 1, kurve 1) eller den tid t_2 indtil der - udgående fra uklarhedsmaksimum - opnås en ekstinktionsnedsættelse på 100 mE (fig. 1, kurve 2).

E k s e m p e l 2

20

Uklarhedsprøve med streptokinase eller urokinase som plasminogenaktivator.

25

Reagenssammensætning, prøveportion og prøvegennemførelse svarer til eksempel 1, idet der i stedet for EPA tilsættes streptokinase eller urokinase i forskellige koncentrationer.

Der opnås derved følgende måleværdier:

a) streptokinase

30

koncentration iU/ml prøveportion	0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25
t_1 [min] (jvf. eksempel 1)	55	40	36,5	17,0	15,0	10,5
t_2 [min] (jvf. eksempel 1)	∞	35	27	23	15	14

35

b) urokinase

5	koncentration ng/ml	prøveportion	0	10	50	100	200	300	400
	t_1 [min]		65	50	23,5	16,5	12,0	9,5	8,5
10	t_2 [min]		∞	55	13	7,5	4,0	3,5	3,0

E k s e m p e l 3

Farveprøve med EPA som plasminogenaktivator

Reagenssammensætning:

20	Tris/HCL	0,1 mol/l, pH 7,5
	Polyethylenglykol 6000,	2 vægt%
	"Tween" ^(R)	80, 0,1 vægt%
	RSA,	1 vægt%
	EPA:	0,01 til 10 ng/ml prøveportion
25	BrCN-fragmenter af fibrin,	75 µg/ml
	Plasminsubstrat Tos-Gly-Pro-Lys-pNA,	0,15 mmol/l

Prøveportion: 50 µl prøve (plasma)
1000 µl reagens

30 Reagens og prøve blandes ved 25°C, og farvedannelsen følges med et fotometer ved $\lambda = 405$ nm. Ekstinktionsændringen registreres ved hjælp af en skriver (papirhastighed 0,1 cm/min). Der måles den tid t_3 indtil der gående ud fra grundlinien (re-

35 gensblindværdi) - er opnået en ekstinktionsforøgelse på 100 mE.

Som resultater opnås:

Koncentration EPA				
ng/ml prøveportion	0,048	0,119	0,238	0,475
t ₃ [min]	118	58	36	24

5

P a t e n t k r a v .

10 1. Fremgangsmåde til bestemmelse af plasmas fibrinolytiske tilstand, k e n d e t e g n e t ved, at man til en naturlig plasmaprøve

15 a) tilsætter en til uklarhedsdannelse tilstrækkelig mængde fibrin eller tilvejebringer denne in situ og måler uklarheden eller de dannede fibrin-spalteprodukter, eller

20 b) tilsætter et farvedannende plasminsubstrat og en til uklarhedsdannelse ikke tilstrækkelig mængde fibrin, fibrinogen-spalteprodukter eller et enzym, der danner fibrin in situ, og måler den dannede farve.

25 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man yderligere tilsætter en bestemt mængde plasminogenaktivator.

30 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at man tilvejebringer fibrin in situ ved tilsætning af thrombin eller et thrombinlignende enzym såsom batroxobin eller arvin.

35 4. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, k e n d e t e g n e t ved, at man som plasminogenaktivator tilsætter EPA, urokinase eller streptokinase.

5. Fremgangsmåde ifølge et af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at man som fibrinogen-spalteprodukter anven-

der sådanne, der vindes ved behandling af fibrinogen med bromcyan.

- 5 6. Fremgangsmåde ifølge et af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at man som farvedannende plasminsubstrat anvender Tos-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilin.
- 10 7. Reagens til bestemmelse af plasmas fibrinolytiske tilstand ved fremgangsmåden ifølge krav 1-6, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder plasminogenaktivator, thrombin eller thrombinlignende enzym og puffer.
- 15 8. Reagens til bestemmelse af plasmas fibrinolytiske tilstand ved fremgangsmåden ifølge krav 1-6, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder plasminogenaktivator og fibrinogen-spalteprodukter eller fibrinmonomer.
- 20 9. Reagens ifølge krav 7 eller 8, k e n d e t e g n e t ved, at det yderligere indeholder et farvedannende plasminsubstrat.
10. Reagens ifølge krav 7 - 9, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder polyethylenglykol, et ikke-ionisk overfladeaktivt middel og/eller okseserumalbumin.
- 25 11. Reagens ifølge et af kravene 7 - 10, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder EPA, batroxobin, trispuffer pH 7 til 8, polyethylenglykol og ikke-ionisk overfladeaktivt middel.
- 30 12. Reagens ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder EPA, trispuffer pH 7 til 8, polyethylenglykol, ikke-ionisk overfladeaktivt middel og ved bromcyanbehandling af fibrinogen fremstillede fibrinogen-spalteprodukter eller fibrin-monomer og Tos-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilin.
- 35 13. Anvendelse af thrombin eller thrombinlignende enzym sammen med puffer som reagens til bestemmelse af plasmas fibrinolytiske tilstand.

Fig. 1

