

PATENTSCHRIFT 141 952

Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 5 Absatz 1 des Änderungsgesetzes zum Patentgesetz

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(11)	141 952	(44)	28.05.80	Int. Cl. ³ 3(51)	G 01 N 33/48
(21)	AP G 01 N / 210 876	(22)	07.02.79		
(31)	P 28 12 943.3	(32)	23.03.78	(33)	DE

(71) siehe (73)

(72) Bartl, Knut, Dr.; Lill, Helmut, Dr.; Ziegenhorn, Joachim, Dr., DE

(73) Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, DE

(74) Internationales Patentbüro Berlin, 1020 Berlin, Wallstraße 23/24

(54) Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Heparin

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Heparin im Plasma sowie ein Reagens zur Durchführung des Verfahrens. Das Verfahren wird angewandt in der Medizin, insbesondere in der Chirurgie zur Feststellung der Gerinnungsfähigkeit des Blutes des Patienten. Die biologische Aktivität von Heparin im Plasma wird bestimmt durch Zusatz eines proteolytischen Enzyms und eines chromogenen Substrates des letzteren und Messung des aus dem chromogenen Substrat freigesetzten Farbstoffs. Erfindungsgemäß wird als proteolytisches Enzym Thrombin oder Faktor Xa verwendet und die Bestimmung in Abwesenheit von zugesetztem Antithrombin III durchgeführt. Als chromogenes Substrat wird ein Peptid verwendet mit einem durch Amidbindung gebundenen p-Nitro-anilidrest an der Carboxylgruppe eines Argiminrestes. Bei Verwendung von Thrombin als Substrat wird Bz-Phe-Val-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA oder Tos-Gly-Pro-Arg-pNA verwendet. Bei Verwendung von Faktor Xa als chromogenes Substrat wird Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA verwendet. Zusätzlich wird Aprotinin zugesetzt.

- Figur -



Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung des biologisch aktiven Heparins im Plasma sowie ein Reagens zur Durchführung des Verfahrens.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Bestimmung des Heparins stellt einen wichtigen Parameter für die Verlaufskontrolle der bei Thrombosegefahr häufig durchgeführten Heparintherapie dar. Heparin bildet mit Antithrombin III (AT III) einen Komplex, der die proteolytische Aktivität von Thrombin hemmt. Da Thrombin die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen katalysiert, ist die Thrombinaktivität verantwortlich für die Gerinnung des Blutes oder Plasmas und somit auch für die bei einer Thrombose entstehenden Fibringerinsel. Die Heparintherapie wird häufig bei Vorliegen einer Thrombosegefahr (z. B. vor chirurgischen Eingriffen) angewendet. Eine exakte Einstellung der Heparinkonzentration ist dabei außerordentlich wichtig. Bei zu geringer Dosierung besteht nämlich die Gefahr einer Thrombose bzw. Embolie, was zum Tode führen kann. Zu

- 2 - 210876

22.6.1979

APG01N/210 876

54 947 11

hohe Heparinkonzentrationen führen dagegen zu Verblutungen. Die quantitative Analyse des Heparins gehört daher zu den im Gerinnungslaboratorium häufig auszuführenden Untersuchungen.

Zur Bestimmung des Heparins werden bisher in der Praxis im wesentlichen 2 Methoden angewendet:

1. Bestimmung der Gerinnungs-(Clotting) Aktivität des Blutes oder Plasmas. Die hierauf beruhenden Verfahren sind jedoch unbefriedigend. Insbesondere im niedrigen Konzentrationsbereich ist die Empfindlichkeit zu gering, hohe Konzentrationen jedoch sind infolge Ungerinnbarkeit nicht mehr erfaßbar (vgl. Thromb. Res. 8, 413 (1976)).
2. Neuerdings der Einsatz chromogener Substrate für die Enzyme Faktor Xa oder Thrombin (J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 239 (1977)).

Dieses neuere Verfahren beruht auf folgendem Prinzip:

Die Plasmaprobe, die das zu bestimmende Heparin sowie eine unbekannte, schwankende Menge an Antithrombin III (AT III bzw. Heparin-cofaktor) enthält, wird in Gegenwart von zugesetztem AT III mit Faktor Xa bzw. Thrombin inkubiert. Das zugesetzte AT III soll einerseits die unterschiedlichen Mengen AT III in der Probe durch

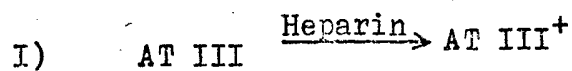
- 3 - 210876

22.6.1979

APG01N/210 876

54 947 11

Schaffung eines Überschusses ausgleichen, andererseits ist es erforderlich, um die Empfindlichkeit des Tests insbesondere im niedrigen Heparin-Konzentrationsbereich ausreichend zu erhöhen. Das AT III kann entweder in Form von Normalplasma, das stets physiologische Mengen AT III enthält, oder in Form von gereinigtem AT III zugegeben werden. Während dieser Inkubation bewirkt das in der Probe enthaltene Heparin auf katalytischem Wege eine Konformationsänderung des AT III, die dessen Aktivierung zur Folge hat. Das aktivierte AT III ist nun in der Lage, einen Teil des in der Inkubationslösung enthaltenen proteolytischen Enzyms Xa bzw. Thrombin spontan durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zu inaktivieren. Das nicht durch Heparin aktivierte AT III gehemmte proteolytische Enzym kann nun aus einem geeigneten chromogenen Substrat, in der Regel einem p-Nitroanilin enthaltenden Peptid, wie Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA bzw. Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, den Farbstoff p-Nitroanilin freisetzen, dessen Extinktion bei 405 nm gemessen werden kann. Die Differenz zwischen der eingesetzten Enzymaktivität ($\Delta E_1/\text{min}$) und der nach der Inkubation gemessenen Restaktivität ($\Delta E_2/\text{min}$) wird über eine Eichkurve zur Heparinkonzentration in der Probe in Beziehung gesetzt. Nachstehende Reaktionsgleichungen erläutern dieses Verfahren:

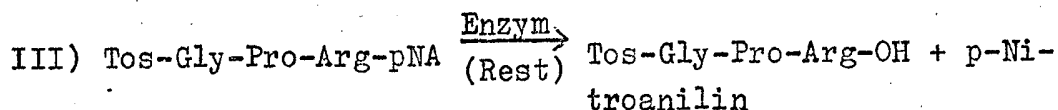
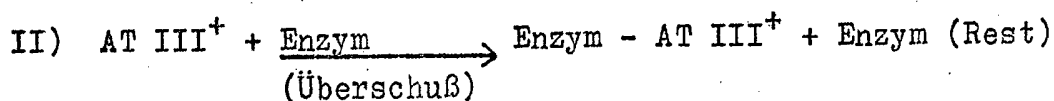


- 4 - 210876

22.6.1979

APG01N/210 876

54 947 11



+ = aktiviert.

Durch Zusatz eines Überschusses von AT III in Form eines Normalplasmas oder als gereinigtes AT III ist die Heparinbestimmung nach diesem Verfahren weitgehend unabhängig vom AT III in der Plasmaprobe. Man bestimmt somit das gesamte in der Probe befindliche Heparin, das über AT III zur Thrombin- bzw. Faktor Xa-Inaktivierung in der Lage ist. Nunmehr wurde jedoch gefunden, daß dieses System die folgenden Nachteile hat: Ein nicht selten auftretender AT-III-Mangel in Patientenplasmen kann aufgrund des zugesetzten AT III nicht erkannt werden. Im extremen, in der Klinik durchaus vorkommenden Fall, daß der Patient praktisch kein AT III mehr besitzt, wäre eine alleinige Heparintherapie wirkungslos. Heparin würde keinerlei biologische Aktivität auf Thrombin mehr ausüben. Der Arzt erhielte somit nach diesem Testprinzip eine verfälschte Aussage über den Gerinnungszustand des Patienten. Folglich muß zusätzlich zur Heparinbestimmung eine AT-III-Bestimmung durchgeführt werden.

- 5 - 210876

22.6.1979

APG01N/210 876

54 947 11

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines einfachen Verfahrens, mit dem mit großer Sicherheit der Gerinnungszustand des Blutes des Patienten festgestellt werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu schaffen, welches die biologische Aktivität des Heparins unmittelbar bestimmt.

Gelöst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Heparin im Plasma durch Zusatz eines proteolytischen Enzyms und eines chromogenen Substrats des letzteren und Messung des aus dem chromogenen Substrat freigesetzten Farbstoffs, wobei als proteolytisches Enzym Thrombin oder Faktor Xa verwendet und die Bestimmung in Abwesenheit von zugesetztem Antithrombin III durchgeführt wird.

Nach den Angaben in der Literatur wird erst durch den Zusatz

von gereinigtem AT III die Empfindlichkeit der Heparinbestimmung so erhöht, daß auch kleine Heparin-mengen (bis 10 U/l) bestimmt werden können.

Überraschenderweise ist es jedoch nach dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, auch ohne AT III-Zusatz im niedrigen Konzentrationsbereich Plasma bei normalem AT III-Gehalt mit ausreichender Empfindlichkeit zu messen. Z. B. sind bei der Testdurchführung bei 37°C 20 USP/l Plasma noch hinreichend genau erfaßbar. Da kein externes AT III dem Test mehr zugesetzt wird, erfaßt man entsprechend dem biologischen Mechanismus der Thrombin-inaktivierung beide Parameter Heparin und AT III. Denn über das in der Probe erhaltene AT III kann das Heparin, das in der Probe bestimmt werden soll, seine biologische Aktivität in Form von Inaktivierung des Thrombins entfalten. Dieses Verfahren erlaubt dem Arzt eine direkte Verlaufskontrolle des Gerinnungszustandes des Blutes des Patienten bei der Heparintherapie.

Unter chromogenen Substraten für das proteolytische Enzym werden generell Substrate verstanden, die unter Einwirkung des Enzyms einen Farbstoff abspalten. Hierbei kann es sich um einen im sichtbaren Bereich des Spektrums bestimmbaren Farbstoff, einen Fluoreszenzfarbstoff oder einen im Ultraviolett-bereich bestimmbaren Farbstoff handeln. Bevorzugt werden als chromogene Substrate Peptide, die an der Carboxygruppe eines Argininrests einen durch Amidbindung gebundenen Farbstoffrest aufweisen. Besonders geeignet ist hierfür der p-Nitroanilidrest sowie von diesem durch Substitution abgeleitete ähnliche Farbstoffe. Es können jedoch auch andere aminogruppenhaltige Farbstoffe an die Carboxylgruppe des Argininrestes gebunden sein.

Bei Verwendung von Thrombin als Substrat werden vorzugsweise Bz-Phe-Val-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA oder Tos-Gly-Pro-Arg-pNA eingesetzt.

Bei Verwendung von Faktor Xa wird als chromogenes Substrat bevorzugt Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA verwendet.

Die Verfahrensbedingungen hinsichtlich pH-Wert, Zeit, Temperatur und dergleichen entsprechen im wesentlichen denen des bekannten Verfahrens. Vorzugsweise wird bei pH 8,0 und mit Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl-Puffer gearbeitet. Andere Puffersysteme, wie z. B. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan/Imidazol- oder Imidazol/HCl-Puffer, sind jedoch ebenfalls verwendbar. Zweckmäßig erfolgt die Bestimmung bei Raumtemperatur. Die Bestimmung ist jedoch auch bei höheren Temperaturen (30 bis 37°C) durchführbar, wobei entsprechend einer höheren Thrombinaktivität geringere Enzymkonzentrationen eingesetzt werden.

Um eine optimale Ionenstärke im Testansatz zu erhalten, werden Salze, vorzugsweise Alkalichloride, wie NaCl oder KCl, zur Pufferlösung zugegeben. Zur Hemmung störender Protease-fremdaktivitäten im Probenplasma wird vorzugsweise Aprotinin eingesetzt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagens zur Bestimmung von Heparin in Plasma, welches im wesentlichen aus

0,01 bis 0,3 Mol/l Puffer, pH 6 bis 9,
0,01 bis 0,25 Mol/l Alkalichlorid,
200 bis 1100 NIH/l Thrombin oder Faktor Xa,
0,05 bis 10 mMol/l chromogenes Substrat,
0 bis 0,01 g/l Aprotinin,
0 bis 0,03 Mol/l EDTA und
0 bis 10 g/l Polyäthylenglykol
besteht.

Das erfindungsgemäße Verfahren und Reagens zeichnet sich dadurch aus, daß für die Testdurchführung eine Komponente weniger als bei den bekannten Verfahren benötigt wird. Folglich gewinnt der manuelle Test an Praktikabilität. Vor allem aber

- 8 - 210876

22.6.1979

APG01N/210 876

54 947 11

ist dieses Verfahren besser zur Adaptation an Analysen-
automaten geeignet. Weiterhin wirkt sich das Weglassen
des AT-III-Zusatzes außerordentlich günstig auf die
Kosten pro Bestimmungsansatz aus. Die Verfügbarkeit
sowohl von Normalplasma als auch von gereinigtem AT III
stellt nämlich einen limitierenden Faktor dar. Als
wesentlicher Vorteil des Verfahrens ist jedoch die
für den Anwender in der Klinik erhöhte Aussagekraft
zu nennen.

Das Verfahren kann kinetisch durchgeführt werden, wobei
die Geschwindigkeit der Reaktionen der Thrombin-Aus-
gangsaktivität und der Thrombin-Restaktivität unmittel-
bar nach Start der Reaktion mit dem Substrat als Meß-
größe dienen. Ferner kann auch das Endwert-Verfahren
angewendet werden, bei dem nach einer bestimmten Meß-
zeit die Reaktion durch pH-Verschiebung mit Säuren,
z. B. mit Essigsäure, abgestoppt wird.

Der Testansatz enthält:

0,045 Mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 8,0,

0,14 Mol/l NaCl,

0,01 Mol/l EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure),

9 g/l Polyäthylenglykol,

0,01 g/l Aprotinin,

300 NIH/l Thrombin,

0,14 mMol/l Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.

- 9 - 210876

22.6.1979

APG01N/210 876

54 947 11

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend durch ein Ausführungsbeispiel näher erläutert.

B e i s p i e l

Das nachstehend beschriebene Beispiel wurde nach dem kinetischen Verfahren unter Verwendung folgender Reagenzien durchgeführt:

Reagens 1:

0,05 Mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 8,0,

0,15 Mol/l NaCl,

- 10 - 210876

22.6.1979

APG01N/210 876

54 947 11

Erfindungsansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität von Heparin im Plasma durch Zusatz eines proteolytischen Enzyms und eines chromogenen Substrats des letzteren und Messung des aus dem chromogenen Substrats freigesetzten Farbstoffs, gekennzeichnet dadurch, daß als proteolytisches Enzym Thrombin oder Faktor Xa verwendet und die Bestimmung in Abwesenheit von zugesetztem Antithrombin III durchgeführt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als chromogenes Substrat ein Peptid verwendet wird, welches an der Carboxylgruppe eines Argininrestes einen p-Nitroanilidrest durch Amidbindung gebunden aufweist.
3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß bei Verwendung von Thrombin als Substrat Bz-Phe-Val-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA oder Tos-Gly-Pro-Arg-pNA verwendet wird.
4. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß bei Verwendung von Faktor Xa als chromogenes Substrat Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA verwendet wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, gekennzeichnet dadurch, daß außerdem Aprotinin zugesetzt wird.

- 11 - 210876

22.6.1979

APG01N/210 876

54 947 11

6. Reagens zur Bestimmung von Heparin im Plasma,
gekennzeichnet dadurch, daß es besteht aus
0,01 bis 0,3 Mol/l Puffer, pH 6 bis 9,
0,01 bis 0,25 Mol/l Alkalischlorid,
200 bis 1100 NIH/l Thrombin oder Faktor Xa,
0,05 bis 10 mMol/l chromogenes Substrat,
0 bis 0,01 g/l Aprotinin,
0 bis 0,03 Mol/l EDTA,
0 bis 10 g/l Polyäthylenglykol.

Hierzu / Seite Zeichnung

210876 -12-

