

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 157939 B

(21) Patentansøgning nr.: 1519/82

(51) Int.Cl.⁵ C 12 Q 1/56

(22) Indleveringsdag: 02 apr 1982

(41) Alm. tilgængelig: 03 okt 1982

(44) Fremlagt: 05 mar 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 02 apr 1981 DE 3113350

(71) Ansøger: *Boehringer Mannheim GmbH; Sandhofer Strasse 112-132; 6800 Mannheim-Waldhof, DE

(72) Opfinder: Helmut *Jering; DE, Udo *Becker; DE, Peter *Roeschlau; DE

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Reagens til optisk bestemmelse af blodkoagulationsforholdet

(56) Fremdragne publikationer

DK freml.skrift nr. 111541

EP off.g.skrift nr. 14039

Andre publikationer. Chemical Abstract, vol 83 1975
abstractnr. 158537d, P.M. Bayer,
Acta Haematol, 1975, 54(3) 165-71
(Ger) Chemical Abstract, vol 77
(1972) abstract nr. 45185v,
Yin-Shan Shum, Poult. Sci. 1972,
51(2), 402-7 (Eng).

(57) Sammendrag:

1519-82

Reagens til optisk bestemmelse af blodkoagulationsforholdet (Quick-test), der indeholder et syntetisk thrombinsubstrat, en puffer og et ikke-proteolytisk virksomt thromboplastin. Et ikke-proteolytisk virksomt thromboplastin kan opnås ved fremstilling af et acetonetørpulver ud fra hjerne, inkubation af en neutral vandig opløsning af acetonetørpulveret ved 25 til 40°C, udvinding af den uopløselige fraktion, behandling af en suspension af denne fraktion i fortyndet saltopløsning med et overfladeaktivt middel under tilstedeværelse af formiat og tørring af den fraskilte opløselige fraktion.

DK 157939 B

Opfindelsen angår et reagens til optisk bestemmelse af blodkoagulationsforholdet (Quick-test) indeholdende thromboplastin, et syntetisk thrombinsubstrat og en puffer.

5 Koagulationsfysiologiske undersøgelser finder i vidt omfang anvendelse på hospitaler, i lægepraksiser og på laboratorier, blandt andet til præoperative undersøgelser, til erkendelse af en blødnings- eller thrombose-risiko, til overvågning af anti-koagulationsterapi hos thrombose-truede patienter og ved kontrol af forløbet af talrige sygdomme, f.eks. svære infektioner, leverfunktionsskader og ondartede sygdomme.

De oftest gennemførte koagulationsprøver er globalprøver, hvor funktionen af flere af de i koagulationsforløbet deltagende komponenter samtidigt bestemmes. Som vigtigste globalprøve er den såkaldte prothrombintidsprøve (Quick-test, A.J. Quick, Am. J. Physiol. 118, 260 (1937)) og den såkaldte aktiverede partielle thromboplastin-tidsprøve (PTT). I det følgende skal ved "Quick-test" forstås bestemmelsen af det exogene koagulations-
20 systems blodkoagulationsforhold. Dette system sættes i gang via frigørelsen af thromboplastin fra beskadiget væv. Quick-testen tilvejebringer oplysninger om funktionstilstanden af komponenterne, der henregnes til det såkaldte exogene koagulationssystem. PTT-prøven giver kendskab til funktionstilstanden
25 af komponenterne, der deltager i det endogene koagulationssystem, som udløses ved kontaktaktivering af Faktor XII. Når forsøgsresultaterne tyder på en patologisk tilstand, kan defekten til at begynde med ikke henføres til nogle bestemte komponenter. Disse må derefter følges af en bestemmelse af enkelte koagulationsfaktorer, hvortil lige så egnede prøvesystemer er kendte.

Ved gennemførelsen af koagulationsfysiologiske prøver er den sædvanlige målestørrelse for det meste koagulationstiden.
35 Derved registreres den tid, som forløber efter tilsætning af reagenset til undersøgelsesvæsken indtil dannelse af et koagulat. Uafhængig af arten af koagulationsfaktorerne, der skal

bestemmes, er de kendte prøver således anlagt, at omdannelsen af fibrinogen til fibrin via enzymet thrombin til slut udløses. Omdannelsen af fibrinogen (opløseligt) til fibrin (uopløseligt) tjener derfor som indikatorreaktion, med undtagelse af, når fibrinogen selv skal bestemmes.

Til måling af koagulationsindtrædelsen kendes talrige metoder. Hyppigst indføres periodisk en lille platinkrog i koagulationsmediet, som ved dannelsen af et koagulat udtrækker en fibrintråd af opløsningen. Dette tidspunkt registreres derpå som koagulationsslutpunktet. Registreringsforløbet kan ske manuelt ved hjælp af et stopur eller elektrisk ved udløsning af en kontakt, når platinkrogen anvendes som elektrode. En automatisering med tanke på almindelige klinisk-kemiske analyser er ikke mulig ifølge dette system, eftersom en kontinuerlig produktion af prøver ikke er mulig, koagulaterne ikke automatisk kan skylles ud, og krogene ikke kan renses tilstrækkeligt mellem analyserne.

En anden mulighed for registrering af koagulationstider udgøres af den ved koagulationen optrædende uklarhed, som fremkaldes ved dannelsen af det uopløselige fibrin. Optisk registrerede koagulometre, som arbejder efter dette princip, er kendte. I praksis begrænses dette princip imidlertid, da mange plasmaer fremviser en høj grad af egenuklarhed, de anvendte reagenser er til dels selv uklare, og koagulationen kan ske så langsomt ved patologisk undersøgelsesmateriale, at intet entydigt signal fremkommer.

Den enkleste mulighed for at undgå uklarhedsproblemer ved anvendelse af chromogene substrater i Quick-testen ville være at arbejde ved større fortynding. Dette er dog ikke uden videre muligt ved den kendte fremgangsmåde, da reaktionstiden samtidigt med fortyndingen stærkt forlænger koagulationsprøven, og den mulige fordel ved automation, nemlig korte måletider, ophæves igen på grund af forlængede reaktionstider.

Fra en bestemt fortynding er det i prøven indeholdte fibrinogen ikke mere tilstrækkeligt til indikatorreaktionen, som består i omdannelsen af fibrinogen til fibrin. 1:10 fortyndet plasma har f.eks. i forhold til ufortyndet plasma i Quick-test en ca. 3 - ca. 5 gange forlænget koagulationstid. Omfanget af forlængelsen af koagulationstiderne ved fortynding blev kvantitativt beskrevet af blandt andet Biggs, Proceedings of the Royal Society (GB) 173, 421-441 (1969) og Girolami, Blut 28, 351-360 (1974).

Særligt stærkt forlængede reaktionstider opnås, når reagenserne ud over prøvefortyndingen yderligere fortyndes (s. Biggs). En reagensfortynding skal dog ligeledes ses som en betingelse for en optisk måling af koagulationsforløbene uden uklarhedsproblemer. De til koagulationsdiagnostikken tilsatte reagenser besidder nemlig en med deres funktion umiddelbar forbunden egenklarhed. De til gennemførelse af Quick-testene anvendte vævsthromboplastiner er mælkeagtige uklare suspensioner af pattedyrsvæv, f.eks. kaninhjerne.

Metoder og reagenser, som er egnede til gennemførelse af globale koagulationsprøver i et fortyndet medium, er allerede beskrevet (jf. Paulsen m.fl. Clinica Chimica Acta 92, 465-468 (1979), Yamada m.fl. Thrombosis Research 15, 351-358 (1979) og EP-OS nr. 0014039). De beror på anvendelsen af et syntetisk chromogent peptidsubstrat til gennemførelse af indikatorreaktionen, der, som omtalt, ikke mere er tilstrækkelig ved fortynding af fibrinogenindholdet i prøven. Det syntetiske chromogene substrat træder derved i stedet for det naturlige substrat fibrinogen. Det optiske signal opstår ved spaltning af substratet ved hjælp af thrombin, som frigør et optisk bestemmeligt fragment.

En ulempe ved fremgangsmåden med anvendelse af et syntetisk substrat og thromboplastin til den optiske Quick-test består deri, at det ikke er muligt at fremskaffe et forudblandet 1-komponent-reagens, som indeholder samtlige til gennemførelse

af prøven nødvendige substanser. Thromboplastin fremviser nemlig en proteolytisk aktivitet, som fører til en spaltning af substratet og forfalsker dermed substratspaltningen ved hjælp af det dannede thrombin. Desuden ville et sådant reagens heller ikke være godt at lagre.

Formålet med opfindelsen er at løse dette problem og at fremskaffe et reagens, som indeholder samtlige til gennemførelsen af prøven nødvendige substanser forudblandet, som er godt at lagre og som giver rigtige resultater.

Ifølge opfindelsen opnås dette ved hjælp af et reagens til optisk bestemmelse af blodkoagulationsforholdet (Quick-test), indeholdende thromboplastin, et syntetisk thrombinsubstrat og en puffer, hvilket reagens er ejendommeligt ved, at det har et indhold af ikke-proteolytisk aktivt thromboplastin, der kan opnås ved fremstilling af et acetonetørpulver fra hjerne, inkubation af en neutral vandig opløsning af acetonetørpulveret ved 25 til 40°C, udvinding af den uopløselige fraktion, behandling af en suspension af denne fraktion i fortyndet saltopløsning med et overfladeaktivt middel under tilstedeværelse af formiat og tørring af den fraskilte opløselige fraktion.

Med "acetonetørpulver" forstås i den foreliggende tekst hjernevæv, som er blevet ekstraheret med acetone og lyofiliseret.

Hver fremstilling af et acetonetørpulver ud fra vævsmaterialet kan ske efter kendte metoder til acetonetørpulverfremstilling. En egnet fremgangsmåde er f.eks. beskrevet i R. Biggs, "Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis", Blackwell Scientific Publication Oxford 1976, side 663.

Acetonetørpulveret suspenderes i en neutral vandig opløsning og inkuberes under omrøring ved den angivne temperatur, hvorved thromboplastin udløses fra acetonetørpulveret. En temperatur mellem 35 og 40°C foretrækkes. Under disse betingelser varer inkubationen omkring en halv time. pH-værdien under

inkubationen bør ligge mellem 6,0 og 8,0, fortrinsvis mellem 6,7 og 7,3. Hensigtsmæssigt holdes den konstant ved hjælp af en egnet puffer. Den uopløselige fraktion lader sig skille fra ved hjælp af centrifugering, f.eks. ved 2.500 G. Den ved centrifugeringen fraseparerede udfældning suspenderes på ny i en fortyndet saltopløsning og behandles fortrinsvis med et overfladeaktivt middel af cholsyregruppen under tilstedeværelse af formiat. Til saltopløsningen foretrækkes kogsalt. Egnede koncentrationer ligger mellem 0,2 og 2, fortrinsvis 0,5 til 1%. Koncentrationen af overfladeaktive midler ligger fortrinsvis mellem 0,01 og 0,2%, især når det foretrukne cholat anvendes. Andre overfladeaktive midler kan dog også anvendes.

Som formiat kommer alkali- og jordalkaliformiater først og fremmest i betragtning. Særligt foretrukket er calciumformiat. Koncentrationen ligger fortrinsvis mellem 0,005 og 0,05 mol/l. Behandlingen foretrækkes ligeledes gennemført i temperaturområdet mellem 25 og 40°C, varigheden stemmer overens med den tilsvarende ved inkubationen af tørpulveret. Til slut centrifugeres, f.eks. ved 2.500 x G, og den opnåede suspension af et ikke mere proteolytisk virksomt thromboplastin frysetørres, eventuelt efter forudgående tilsætning af de andre bestanddele af reagenset ifølge opfindelsen. Reagenset kan dog også sammenblandes af de faste tørrede substanser i de ønskede mængdeforhold.

Som syntetisk thrombinsubstrat kan principielt anvendes ethvert af de kendte syntetiske thrombinsubstrater. Talrige sådanne thrombinsubstrater er almindelige i handelen. Foretrukket er substratet Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (der kan fås fra Boehringer Mannheim GmbH), såvel som det af Kabi AB, Sverige under betegnelsen S-2238 solgte H-D-Phe-Pip-Arg-pNA. Disse substrater frembringer ved den enzymatiske spaltning farvede spaltningsprodukter, der optisk let lader sig kvantitativt bestemme.

Reagenset ifølge opfindelsen indeholder fortrinsvis thromboplastin i en koncentration på 3 til 20 volumen%, særligt fore-

trukket 6 til 10 volumen%, med en aktivitet som beskrevet i eksempel 1, syntetisk thrombinsubstrat i en mængde på 2×10^{-5} til 20×10^{-5} mol/l såvel som en puffer med pH-værdi 7,2 til 8,5. Pufferkoncentrationen ligger fortrinsvis mellem 0,05 og 0,25 mol/l. I princippet er enhver puffer, der er virksom i det angivne pH-område, egnet. Særligt foretrukket er dog trispuffer. De bedste resultater opnås med 0,1 mol/l puffer, pH-værdi 8,1. Den særligt foretrukne substratkoncentration ligger på omkring 5×10^{-5} mol/l.

Reagenset ifølge opfindelsen indeholder desuden fortrinsvis calciumsalt i en koncentration på 2 til 10 mmol/l, ligesom de ovenstående angivelser regnet som den færdige reagensopløsning.

Som calciumsalt egner sig ethvert let vandopløseligt calciumsalt, f.eks. et halogenid eller acetat. Foretrukket er calciumchlorid.

Fortrinsvis indeholder reagenset yderligere 0,5 til 3 vægt% urinstof. Særligt foretrukket er 1,4 til 1,6%.

Et reagens ifølge opfindelsen med den ovenstående sammensætning er ganske vist i form af den brugsfærdige opløsning et fortyndet system, men reaktionsvarigheden, sammenlignet med de kendte prøver i ufortyndede systemer, er kun uvæsentligt forlænget. Bestemmelsen varer ved normalplasma ca. 30 sekunder, ved plasmaer fra personer, som er under thromboseprofylakse ved hjælp af oralt antikoagulationsmiddel, ca. 60 til 120 sekunder. Ved den kendte ufortyndede Quick-tests med de ovenfor beskrevne ulemper ligger de tilsvarende tider for normalplasma på ca. 15 sekunder, ved de nævnte patologiske plasmaer på 30 til 60 sekunder. Heroverfor behøver de kendte prøver, der med hensyn til fortynding er sammenlignelige med reagenset ifølge opfindelsen, omtrent den femdobbelte reaktionstid.

Reagenet ifølge opfindelsen anvendes hensigtsmæssigt således, at tiden indtil opnåelsen af en bestemt absorption ved en

given bølgelængde måles. En kinetisk vurdering er dog også mulig, hvorved en kalibreringskurve hensigtsmæssigt lægges til grund for vurderingen. Den i forhold til kendte optiske Quick-tests på basis af syntetiske substrater væsentligt for-
5 ringede bestemmelsesvarighed skyldes en synergistisk virkning af de uden for det fysiologiske område liggende ionstyrker og pH-værdier, og den under K_M (Michaelis-konstanten) liggende substratkoncentration.

10 De følgende eksempler illustrerer opfindelsen.

Eksempel 1

A) Fremstilling af ikke-proteolytisk thromboplastin:

15

Ud fra en frisk udvundet kaninhjerne fremstilles et tørpulver ved hjælp af en acetonebehandling efter fremgangsmåden i R. Biggs, "Human Blood Coagulation, Haemostatis and Thrombosis" Blackwell Scientific Publications Oxford 1976, S. 663, og
20 tørres til konstant vægt.

2,5 g af ovennævnte pulver suspenderes i 50 ml 0,1 mol/l natriumacetat-puffer, pH 7, og omrøres i 30 minutter ved 37°C. Derpå centrifugeres i 15 minutter ved 2.500 G, og udfældningen
25 omrøres på ny i 30 minutter ved 37°C i 50 ml 0,7% natriumchloridopløsning, som indeholder 0,05% natriumdesoxycholat, og 0,0125 mol/l calciumformiat. Derpå centrifugeres i 15 minutter ved 2.500 G.

30 Denne ovenstående væske indeholder thromboplastin uden proteolytisk aktivitet.

Thromboplastinsuspensionens aktivitet bestemmes ved hjælp af Quick-test, som gennemføres ifølge DIN 58910. Et ifølge DIN
35 58910 fremstillet normalt referenceplasma viser en koagulationstid på 12 ± 2 sekunder.

B) Fremstilling af en reagensblanding til gennemførelse af en optisk Quick-test:

Opløsning 1: 0,1 mol tris/HCl, pH 8,1, indeholdende 2% glycin.

5

Opløsning 2: Vandig opløsning af Tos-Gly-Pro-Arg-pNA-acetat 497 mg/dl.

Opløsning 3: Thromboplastinsuspension fremstillet efter A.

10

10 volumenenheder opløsning 1 blandes med 4 volumenenheder opløsning 3 og 1 volumenenhed opløsning 2 og lyofiliseres i 3 ml aliquotmængder.

15

Eksempel 2

Gennemførelse af en optisk Quick-test.

20

Til gennemførelse af testen opløses 3 ml af lyofilisatet i eksempel 1 B i 30 ml tris/HCl-puffer, pH 8,1, som yderligere indeholder 1,5% urinstof og 6 mmol/l CaCl_2 . Reaktionsblandingen bringes til 37°C. Fotometerindstilling: Måletemperatur 37°C, bølgelængde 405 nm.

25

50 μl prøver (citratplasma, henholdsvis fortyndinger af citratplasma i fysiologisk NaCl) pipetteres over i kuvetter, og reaktionen med 750 μl reaktionsblanding startes. Samtidigt startes en skriver (10 cm/min).

30

Der opnås de i fig. 1 tegnede kurver på den medfølgende tegning, når der efter hinanden anvendes henholdsvis ufortyndet, 1:2, 1:4 og 1:10 forfortyndede plasmaer.

Eksempel 3

35

Ud fra de i eksempel 2 opnåede kurver bestemmes tiden indtil opnåelsen af en 30 mE højere ekstinktion i forhold til ud-

gangsekstinktionen. Disse tider afbildes mod den reciprokke plasmafortynding. Man opnår en lige linie. Den forudgivne ekstinktion på 30 mE kan varieres inden for et bredt område, f.eks. fra 10 til 150 mE. Man opnår altid en ret linie.

5

Eksempel 4 (sammenligning)

Svarende til eksempel 2 prøves 60 plasmaer fra patienter, som er under oral antikoaguleringsbehandling, ufortyndet, og tiden indtil opnåelsen af en 30 mE over udgangsværdien liggende ekstinktion registreres. De samme plasmaer prøves ved hjælp af den sædvanlige Quick-test under anvendelse af et koagulometer efter Schnitker og Gross, og koagulationstiderne registreres. De i begge systemer opnåede data underkastes en lineær regressionsanalyse. Det resulterer i en korrelationskoefficient på $r = 0,96$.

15

Eksempel 5 (sammenligning)

Svarende til eksempel 1 B fremstilles en reagensblanding under anvendelse af et ifølge eksempel 1 A fremstillet ikke-proteolytisk thromboplastin, såvel som et thromboplastin, der er almindeligt i handelen (thromboplastin a, Boehringer Mannheim). Reagensblandingen fortyndes med tris/HCl-puffer, pH 8,1, svarende til eksempel 2 til den færdige reaktionsblanding, og denne lagres ved stuetemperatur (ca. 20°C). Med bestemte tidsintervaller måles egenekstinktionen af reaktionsblandingen ved 405 nm. Resultatet er vist i tabel 2. Man finder ved thromboplastin, der er almindeligt i handelen, en hurtig ekstinktionsforøgelse, der er forårsaget af en spaltning af det tilsatte chromogene peptidsubstrat.

25

30

35

Tabel 2

	Inkubations- tid (dage)	Ekstinktion ved 405 nm thromboplastin, der er almindeligt i handelen	Thromboplastin frem- stillet som i eksem- pel 1
5	0	0,008	0,000
	0,3	0,012	0,003
	1,0	0,028	0,010
	2,0	0,049	0,015
	5,0	0,108	0,030
10	7,0	0,154	0,035

P a t e n t k r a v .

15 1. Reagens til optisk bestemmelse af blodkoagulationsforhol-
det (Quick-test), indeholdende thromboplastin, et syntetisk
thrombinsubstrat og en puffer, k e n d e t e g n e t ved, at
det har et indhold af ikke-proteolytisk virksomt thromboplas-
tin, der kan opnås ved fremstilling af et acetonetørpulver fra
20 hjerne, inkubation af en neutral vandig opløsning af acetone-
tørpulveret ved 25 til 40°C, udvinding af den uopløselige
fraktion, behandling af en suspension af denne fraktion i for-
tyndet saltopløsning med et overfladeaktivt middel under til-
stedeværelse af formiat og tørring af den fraskilte opløselige
25 fraktion.

2. Reagens ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det
indeholder ikke-proteolytisk thromboplastin i en koncentration
på 3 til 20 volumen%, 2×10^{-5} til 20×10^{-5} mol/l syntetisk
30 thrombinsubstrat, 0,05 til 0,25 mol/l puffer, pH 7,2 til 8,5,
og 2 til 10 mmol/l opløseligt calciumsalt.

3. Reagens ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at det
yderligere indeholder 0,5 til 3% urinstof.

35

4. Reagens ifølge krav 2 eller 3, k e n d e t e g n e t
ved, at det indeholder trispuffer.

