



Ausschliessungspatent

Erteilt gemaeß § 5 Absatz 1 des Aenderungsgesetzes
zum Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

202 347

Int.Cl.³

3(51) G 01 N 33/50

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP G 01 N/ 2385 217
(31) P3113350.9

(22) 29.03.82
(32) 02.04.81

(44) 07.09.83
(33) DE

(71) siehe (73)
(72) JERING, HELMUT, DR.; BECKER, UDO, DR.; ROESCHLAU, PETER, DR.; DE;
(73) BOEHRINGER MANNHEIM GMBH, MANNHEIM-WALDHOF, DE
(74) IPB (INTERNATIONALES PATENTBUERO BERLIN) 60499/12/37 1020 BERLIN WALLSTR. 23/24

(54) REAGENS ZUR OPTISCHEN BESTIMMUNG DES BLUTGERINNUNGSVERHALTENS

(57) Die Erfindung betrifft ein Reagens zur optischen Bestimmung des Blutgerinnungsverhaltens des sogenannten exogenen Gerinnungssystems (Quick-Test). Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Reagens, welches sämtliche für die Durchführung des Tests erforderlichen Substanzen vorgemischt enthält, lagerfähig ist und richtige Ergebnisse liefert. Erfindungsgemäß enthält das neue Reagens ein synthetisches Thrombinsubstrat-Puffer und ein nicht proteolytisch wirksames Thromboplastin. Ein nicht proteolytisch wirksames Thromboplastin ist durch Herstellen eines Acetontrockenpulvers aus Hirn, Inkubation einer neutralen wäßrigen Lösung des Acetontrockenpulvers bei 25 bis 40°C, Gewinnung der unlöslichen Fraktion, Behandlung einer Suspension dieser Fraktion in verdünnter Salzlösung mit einem oberflächenaktiven Mittel in Gegenwart von Formiat und Trocknung der abgetrennten löslichen Fraktion erhältlich.

238521 7 ¹
-2-Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Reagens zur optischen Bestimmung des Blutgerinnungsverhaltens des sogenannten exogenen Gerinnungssystems (Quick Test).

Gerinnungsphysiologische Untersuchungen finden in Krankenhäusern, Arztpraxen und Laboratorien in breitem Umfang Anwendung u. a. zur präoperativen Untersuchung, zur Erkennung eines Blutungs- oder Thrombose-Risikos, zur Überwachung der Antikoagulantien-Therapie bei thrombosegefährdeten Patienten und bei der Verlaufskontrolle zahlreicher Erkrankungen z. B. schwere Infektionen, Leberfunktionsschäden und maligne Erkrankungen.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die am häufigsten durchgeführten Gerinnungstests sind Globaltests, bei denen gleichzeitig die Funktion mehrerer der am Gerinnungsvorgang beteiligten Komponenten bestimmt wird. Als wichtigste Global-Test gelten der sog. Prothrombin-Zeittest (Quick-Test, A. J. Quick, Am. J. Physiol. 118, 260 (1937) und der sog. aktivierte partielle Thromboplastin-Zeittest (PTT). Im folgenden wird unter "Quick-Test" die Bestimmung des Blutgerinnungsverhaltens des exogenen Gerinnungssystems verstanden. Dieses System wird durch die Freisetzung von Thromboplastin aus beschädigtem Gewebe initiiert. Der Quick-Test gibt Auskunft über den Funktionszustand der dem sog. exogenen Gerinnungssystem zuzurechnenden Komponenten, der PTT-Test läßt den Funktionszustand der am endogenen Gerinnungssystem beteiligten Komponenten erkennen, welches durch Kontaktaktivierung von Faktor XII ausgelöst wird. Bei pathologischem Ausfall der Tests kann der Defekt zunächst keiner be-

238521 7 - ²3-

stimmten Komponente zugeordnet werden. Dies muß durch eine anschließende Bestimmung von einzelnen Gerinnungsfaktoren erfolgen, wofür ebenfalls geeignete Testsysteme bekannt sind.

Bei der Durchführung gerinnungsphysiologischer Tests ist die übliche Meßgröße zumeist die Gerinnungszeit. Es wird dabei die Zeit registriert, die nach Zugabe des Reagens zur Untersuchungsflüssigkeit bis zur Bildung eines Gerinnsels vergeht. Unabhängig von der Art der zu bestimmenden Gerinnungsfaktoren sind die bekannten Tests so angelegt, daß letztlich die Überführung von Fibrinogen in Fibrin durch das Enzym Thrombin ausgelöst wird. Die Umwandlung von Fibrinogen (löslich) in Fibrin (unlöslich) dient daher als Indikatorreaktion, außer wenn Fibrinogen selbst bestimmt werden soll.

Für die Messung des Gerinnungseintritts sind zahlreiche Methoden bekannt. Am häufigsten wird in den Gerinnungsansatz periodisch ein Platinhäkchen eingeführt, welches bei der Bildung eines Gerinnsels einen Fibrinfaden aus der Lösung herauszieht. Dieser Zeitpunkt wird dann als Gerinnungsendpunkt registriert. Der Registrierungs Vorgang kann manuell mittels Stoppuhr oder elektrisch durch Auslösung eines Kontakts, wenn das Platinhäkchen als Elektrode ausgelegt ist, erfolgen. Eine Automation im Sinne üblicher klinisch-chemischer Analysen ist nach diesem System nicht möglich, da kein kontinuierlicher Durchsatz von Proben möglich ist, die Gerinnsel nicht automatisch ausgespült werden können und die Häkchen zwischen den Analysen nicht ausreichend gereinigt werden können.

Eine andere Möglichkeit zur Registrierung von Gerinnungszeiten stellt die bei der Gerinnselbildung auftretende Trübung dar, die durch die Bildung des unlöslichen Fibrins hervorgerufen wird. Es sind optisch registrierende Koagulometer bekannt, die nach diesem Prinzip arbeiten. In der Praxis sind diesem Prinzip aber Grenzen gesetzt, da viele Plasmen eine hohe Eigentrübung aufweisen, die verwendeten Reagentien z. T. selbst trübe sind und bei pathologischem Untersuchungsmaterial die Gerinnung so langsam erfolgen kann, daß kein eindeutiges Signal entsteht.

Die einfachste Möglichkeit, Trübungsprobleme zu vermeiden, wäre, bei höherer Verdünnung zu arbeiten. Dies ist jedoch bei dem bekannten Verfahren nicht ohne weiteres möglich, da gleichzeitig mit der Verdünnung auch die Reaktionszeit der Gerinnungstests stark verlängert wird und der mögliche Vorteil der Automation durch verlängerte Reaktionszeiten wieder aufgehoben wird. Von einer bestimmten Verdünnung an reicht auch das in der Probe enthaltene Fibrinogen nicht mehr für die Indikatorreaktion, welche in der Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin besteht, aus. 1 : 10 verdünntes Plasma hat z. B. gegenüber unverdünntem Plasma im Quick-Test eine ca. 3-5-fach verlängerte Gerinnungszeit. Das Ausmaß der Verlängerung von Gerinnungszeiten durch Verdünnung wurde quantitativ u. a. von Biggs, Proceedings of the Royal Society (GB) 173, 421 - 441 (1969) und Girolami, Blut 28, 351-360 (1974) beschrieben.

Besonders stark verlängerte Reaktionszeiten werden erhalten, wenn über die Probenverdünnung hinaus noch zusätzlich die Reagentien verdünnt werden (s. Biggs). Eine Reagentien-Verdünnung ist jedoch ebenfalls als Vorbedingung für eine von Trübungsproblemen freie optische Messung von Gerinnungsvorgängen anzusehen. Die in der Gerinnungsdiagnostik eingesetzten Reagentien besitzen nämlich eine mit ihrer Funktion unmittelbar verbundene Eigentrübung. Die für die Durchführung des Quick-Tests verwendeten Gewebsthromboplastine sind milchig trübe Suspensionen aus Säugetiergewebe, z. B. Kaninchenhirn.

Es wurden schon Methoden und Reagentien beschrieben, die für die Durchführung globaler Gerinnungstests in verdünntem Medium geeignet sind. Sie beruhen auf der Verwendung synthetischer chromogener Peptidsubstrate zur Durchführung der Indikatorreaktion, da wie erwähnt, bei Vorverdünnung der Fibrinogengehalt der Probe nicht mehr ausreicht. Die synthetischen chromogenen Substrate treten dabei an die

238521 7 - ⁵/₈ -

Stelle des natürlichen Substrats, Fibrinogen. Das optische Signal entsteht bei der Spaltung des Substrats durch Thrombin, welches ein optisch bestimmbares Fragment freisetzt. (Vergl. Paulsen et al., Clinica Chimica Acta 92, 465 - 468 (1979), Yamada et al., Thrombosis Research 15, 351 - 358 (1979) und EP-OS Nr. O 014 039)

Ein Nachteil des Verfahrens unter Verwendung eines synthetischen Substrats und von Thromboplastin für den optischen Quick-Test besteht darin, daß es nicht möglich ist, ein vorgemischtes 1-Komponenten-Reagens zu beschaffen, welches sämtliche, für die Durchführung des Tests erforderlichen Substanzen enthält. Thromboplastin weist nämlich eine proteolytische Wirksamkeit auf, welche zu einer Spaltung des Substrats führt und damit die Substratspaltung durch das gebildete Thrombin verfälscht. Außerdem würde ein derartiges Reagens auch nicht lagerfähig sein.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Reagens zur optischen Bestimmung des Blutgerinnungsverhaltens, welches sämtliche für die Durchführung des Tests erforderlichen Substanzen vorgemischt enthält, lagerfähig ist und richtige Ergebnisse liefert.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, geeignete Bestandteile für eine Zusammensetzung mit den gewünschten Eigenschaften aufzufinden, die als Reagens zur optischen Bestimmung des Blutgerinnungsverhaltens dienen.

Erfindungsgemäß gelingt dies durch ein Reagens zur optischen Bestimmung des Blutgerinnungsverhaltens (Quick-

238521 7 - ⁶6a -

Test), enthaltend Thromboplastin, ein synthetisches Thrombinsubstrat und Puffer, welches durch einen Gehalt an nicht proteolytisch wirksamem Thromboplastin gekennzeichnet ist.

Ein für das erfindungsgemäße Reagens geeignetes Thromboplastin läßt sich erhalten, indem man aus einem geeigneten Gewebe, vorzugsweise Hirn, ein Acetontrockenpulver herstellt, eine neutrale wäßrige Lösung des Acetontrockenpulvers bei 25 bis 40 °C inkubiert, die dabei gebildete unlösliche Fraktion isoliert, in verdünnter Salzlösung

238521 7 7

suspendiert und mit einem oberflächenaktiven Mittel in Gegenwart von Formiat behandelt und schließlich die von unlöslichen Bestandteilen befreite Lösung trocknet.

Jede Herstellung eines Acetontrockenpulvers aus dem Gewebematerial kann nach für die Acetontrockenpulverherstellung bekannten Methoden erfolgen. Ein geeignetes Verfahren ist beispielsweise R. Biggs, "Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis", Blackwell Scientific Publication Oxford 1976, Seite 663 beschrieben.

Das Acetontrockenpulver wird in einer neutralen wässrigen Lösung suspendiert und unter Rühren bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Bevorzugt wird eine Temperatur zwischen 35 und 40 °C. Unter diesen Bedingungen dauert die Inkubation etwa eine halbe Stunde. Der pH-Wert kann dabei zwischen 6,0 und 8,0, vorzugsweise 6,7 bis 7,3 liegen. Zweckmäßig wird er durch einen geeigneten Puffer konstant gehalten. Die unlösliche Fraktion läßt sich durch Zentrifugieren, beispielsweise bei 2.500 g abtrennen. Der bei der Zentrifugation erhaltene Niederschlag wird erneut in einer verdünnten Salzlösung suspendiert und vorzugsweise mit einem oberflächenaktiven Mittel der Cholsäuregruppe in Gegenwart von Formiat behandelt. Für die Salzlösung wird Kochsalz bevorzugt. Geeignete Konzentrationen liegen zwischen 0,2 und 2, vorzugsweise 0,5 bis 1 %. Die Konzentration an oberflächenaktiven Mitteln liegt vorzugsweise zwischen 0,01 und 0,2 %, insbesondere wenn die bevorzugten Cholate verwendet werden. Es können jedoch auch andere oberflächenaktive Mittel verwendet werden.

Als Formiat kommen die Alkali und Erdalkaliformiate in erster Linie in Betracht. Besonders bevorzugt wird Calciumformiat. Die Konzentration liegt vorzugsweise zwischen

238521 7 - 8 -

0,005 und 0,05 mol/l. Die Behandlung wird bevorzugt ebenfalls im Temperaturbereich zwischen 25 und 40 °C durchgeführt, die Zeitdauer entspricht der der Inkubation des Trockenpulvers. Schließlich wird abzentrifugiert, beispielsweise bei 2.500 x g, und die erhaltene Suspension eines nicht mehr proteolytisch wirksamen Thromboplastins, ggf. nach vorherigem Zusatz der anderen Bestandteile des erfindungsgemäßen Reagens, gefriergetrocknet. Das Reagens kann jedoch auch aus den festen trockenen Substanzen in den gewünschten Mengenverhältnissen zusammengemischt werden.

Als synthetisches Thrombinsubstrat kann prinzipiell jedes der bekannten synthetischen Thrombinsubstrate verwendet werden. Zahlreiche derartige Thrombinsubstrate sind handelsüblich. Bevorzugt wird das Substrat Tos-Gly-Pro-Arg-pNA sowie das unter der Bezeichnung S-2238 vertriebene H-D-Phe-Pip-Arg-pNA. Diese Substrate liefern bei der enzymatischen Spaltung gefärbte Spaltprodukte, die sich leicht optisch quantitativ bestimmen lassen.

Das erfindungsgemäße Reagens enthält Thromboplastin in einer Konzentration von 3 bis 20 Vol-%, vorzugsweise 6 bis 10 Vol-%, mit einer Aktivität wie in Beispiel 1 beschrieben. Synthetisches Thrombinsubstrat in einer Menge von 2×10^{-5} bis 20×10^{-5} mol/l sowie Puffer pH 7,2 bis 8,5. Die Pufferkonzentration liegt vorzugsweise zwischen 0,05 und 0,25 mol/l. Im Prinzip ist jeder im angegebenen pH-Bereich wirksame Puffer geeignet, besonders bevorzugt wird jedoch Trispuffer. Die besten Ergebnisse werden mit 0,1 mol/l Puffer pH 8,1 erhalten. Die besonders bevorzugte Substratkonzentration liegt um 5×10^{-5} mol/l.

Vorzugsweise enthält das erfindungsgemäße Reagenz außerdem Ca-Salz in einer Konzentration von 2 bis 10 mmol/l, wie die obigen Angaben, jeweils bezogen auf fertige Reagenslösung.

238521 7

- 9 -

Als Ca-Salz eignet sich jedes leicht wasserlösliche Ca-Salz, beispielsweise ein Halogenid, Acetat oder dergleichen. Bevorzugt wird Calciumchlorid.

Vorzugsweise enthält das Reagens außerdem noch 0,5 bis 3 Gew.-% Harnstoff. Besonders bevorzugt sind 1,4 bis 1,6 %.

Ein erfindungsgemäßes Reagens in der obigen Zusammensetzung stellt zwar in Form der gebrauchsfertigen Lösung ein verdünntes System dar, die Reaktionsdauer gegenüber den bekannten Tests im unverdünnten System ist jedoch nur unwesentlich verlängert. Die Bestimmung dauert bei Normalplasma etwa 30 sec., bei Plasmen von Personen, die unter Thrombose-Prophylaxe mittels oraler Antikoagulantien stehen, etwa 60 bis 120 sec. Bei den bekannten unverdünnten Quick-Tests mit den oben geschilderten Nachteilen liegen die entsprechenden Zeiten für Normalplasma bei ca. 15 sec., bei den genannten pathologischen Plasmen um 30 bis 60 sec. Dem gegenüber benötigen die bekannten, hinsichtlich der Verdünnung mit dem erfindungsgemäßen Reagens vergleichbaren Tests etwa die fünf-fache Reaktionszeit.

Das erfindungsgemäße Reagens wird zweckmäßig so angewendet, daß die Zeit bis zur Erreichung einer bestimmten Absorption bei gegebener Wellenlänge gemessen wird. Es ist jedoch auch eine kinetische Auswertung möglich, wobei dann zweckmäßig eine Eichkurve der Auswertung zugrunde gelegt wird. Die gegenüber bekannten optischen Quick-Tests auf der Basis synthetischer Substrate wesentlich verringerte Bestimmungsdauer wird auf eine synergistische Wirksamkeit der außerhalb der physiologischen Bereiche liegenden Ionenstärke und pH-Werte und der unter der K_M liegenden Substratkonzentration zurückgeführt.

Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

Beispiel 1

A) Herstellung von nicht proteolytischem Thromboplastin:

Aus frisch gewonnenem Kaninchenhirn wird durch Acetonbehandlung ein Trockenpulver nach dem Verfahren von R. Biggs, "Human Blood Coagulation, Haemostatis and Thrombosis" Blackwell Scientific Publications Oxford 1976, S. 663, hergestellt und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2,5 g obigen Pulvers werden in 50 ml 0,1 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 7, suspendiert und 30 min lang bei 37 °C gerührt. Danach wird 15 min lang bei 2.500 g zentrifugiert und der Niederschlag in 50 ml 0,7 %iger NaCl-Lösung, die 0,05 % Natrium-desoxycholat enthält und 0,0125 mol/l an Calciumformiat ist, erneut 30 min lang bei 37 °C gerührt. Dann wird 15 min lang bei 2.500 g zentrifugiert.

Dieser Überstand enthält Thromboplastin ohne proteolytische Aktivität.

Die Aktivität der Thromboplastinsuspension wird mittels Quick-Test, durchgeführt nach DIN 58910, bestimmt. Ein nach DIN 58910 hergestelltes normales Bezugsplasma weist eine Gerinnungszeit von 12 ± 2 sec. auf.

B) Herstellung einer Reagensmischung zur Durchführung eines optischen Quick-Tests:

Lösung 1: 0,01 mol Tris/HCl, pH 8,1, enthaltend 2 % Glycin

Lösung 2: wäßrige Lösung von Tos-Gly-Pro-Arg-pNA-Acetat 497 mg/dl

Lösung 3: Thromboplastinsuspension nach A hergestellt.

Es werden 10 Volumenteile von Lösung 1 mit 4 Volumenteil Lösung 3 und 1 Volumenteil Lösung 2 gemischt und in 3 ml Aliquoten lyophilisiert.

Beispiel 2

Durchführung eines optischen Quick-Tests

Zur Durchführung des Tests werden 3 ml des Lyophilisats nach Beispiel 1 B in 30 ml Tris/HCl-Puffer, pH 8,1, welcher zusätzlich 1,5 % Harnstoff und 6 mmol/l CaCl_2 enthält, gelöst. Das Reaktionsgemisch wird auf 37 °C gebracht. Photometeransatz: Meßtemperatur 37 °C, Wellenlänge 405 nm.

Es werden je 50 µl Probe (Citratplasma, bzw. Verdünnungen von Citratplasma in physiologischem NaCl) vorgelegt und die Reaktion mit 750 µl Reaktionsgemisch gestartet. Gleichzeitig wird ein Schreiber (10 cm/min) gestartet.

Es werden die in Fig. 1 der beigelegten Zeichnung gezeigten Kurven erhalten, wenn nacheinander unverdünntes bzw. 1:2, 1:4 und 1:10 vorverdünntes Plasma eingesetzt wird.

Beispiel 3

Aus den nach Beispiel 2 erhaltenen Kurvenzügen wird die Zeit bis zum Erreichen einer gegenüber der Anfangsextinktion um 30 mE höheren Extinktionen entnommen. Diese Zeiten werden gegen die reziproken Plasmaverdünnungen aufgetragen. Man erhält eine Gerade. Die vorgegebene Extinktion von 30 mE kann in weiten Bereichen, z. B. von 10 bis 150 mE, variiert werden. Man erhält stets eine Gerade.

Beispiel 4

Entsprechend Beispiel 2 werden 60 Plasmen von Patienten, welche unter oraler Antikoagulantien-Therapie stehen, unverdünnt getestet und die Zeit bis zum Erreichen einer um

30 mE gegenüber dem Ausgangswert liegenden Extinktion registriert. Dieselben Plasmen werden mittels dem herkömmlichen Quick-Test unter Verwendung eines Koagulometers nach Schnitker und Gross getestet und die Gerinnungszeiten registriert. Die in beiden Systemen erhaltenen Daten werden einer linearen Regressionsanalyse unterworfen. Es ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,96$.

Beispiel 5

Entsprechend Beispiel 1 B werden Reagensmischungen unter Verwendung eines nach Beispiel 1 A hergestellten nicht proteolytischen Thromboplastins sowie eines handelsüblichen Thromboplastins (Thromboplastin a, Boehringer Mannheim) hergestellt. Die Reagensmischungen werden mit Tris/HCl-Puffer, pH 8,1 entsprechend Beispiel 2 zum fertigen Reaktionsgemisch verdünnt und dieses bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) gelagert. In bestimmten zeitlichen Abständen wird die Eigenextinktion der Reaktionsgemische bei 405 nm gemessen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2. Man findet bei dem handelsüblichen Thromboplastin einen raschen Extinktionsanstieg, der auf einer Spaltung des beigefügten chromogenen Peptidsubstrats beruht.

Tabelle 2

| Inkubationszeit (Tage) | Extinktion bei 405 nm | |
|------------------------|--------------------------------|---|
| | handelsübliches Thromboplastin | nach Beispiel 1 hergest. Thromboplastin |
| 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 |
| 7,0 | 0,154 | 0,035 |

238521 7

13

Berlin, 5. 8.1982

AP G 01 N / 238 521 / 7

60 499 12

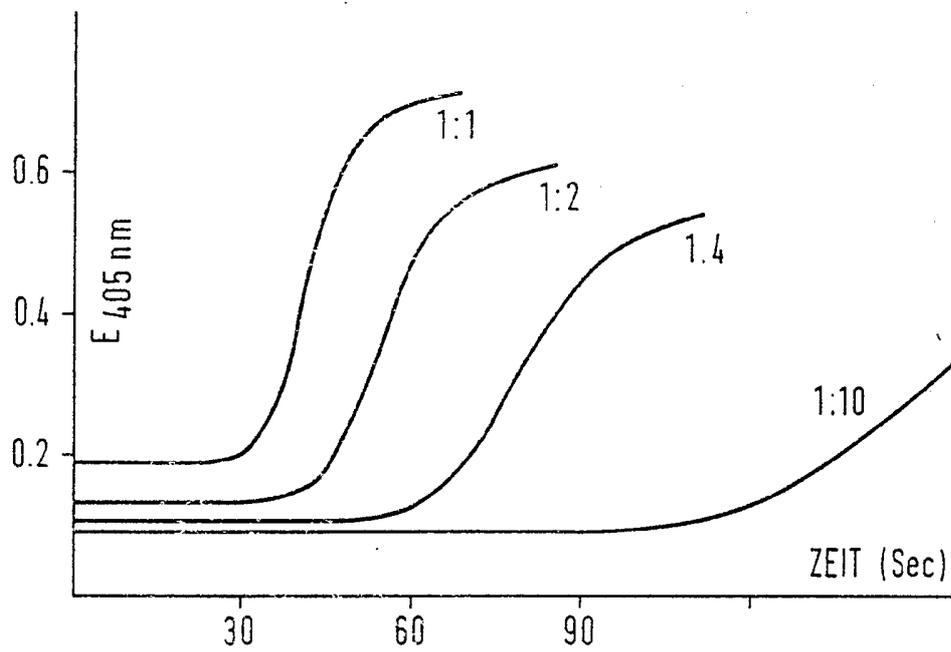
Reagens zur optischen Bestimmung des Blutgerinnungsverhaltens

Erfindungsanspruch

1. Reagens zur optischen Bestimmung des Blutgerinnungsverhaltens (Quick-Test), enthaltend Thromboplastin, ein synthetisches Thrombinsubstrat und Puffer, gekennzeichnet durch einen Gehalt an nicht proteolytisch wirksamem Thromboplastin.
2. Reagens nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß das nicht proteolytisch wirksame Thromboplastin durch Herstellen eines Acetontrockenpulvers aus Hirn, Inkubation einer neutralen wäßrigen Lösung des Acetontrockenpulvers bei 25 bis 40 °C, Gewinnung der unlöslichen Fraktion, Behandlung einer Suspension dieser Fraktion in verdünnter Salzlösung mit einem oberflächenaktiven Mittel in Gegenwart von Formiat und Trocknung der abgetrennten löslichen Fraktion erhältlich ist.
3. Reagens nach Punkt 1 oder 2, gekennzeichnet dadurch, daß es nicht proteolytisches Thromboplastin, in einer Konzentration von 3 bis 20 Vol.-%, 2×10^{-5} bis 20×10^{-5} mol/l synthetisches Trombinsubstrat, 0,05 bis 0,25 mol/l Puffer pH 7,2 bis 8,5 2 bis 10 mmol/l lösliches Ca-Salz enthält.
4. Reagens nach Punkt 3, gekennzeichnet dadurch, daß es zusätzlich 0,5 bis 3 % Harnstoff enthält.
5. Reagens nach Punkt 3 oder 4, gekennzeichnet dadurch, daß es Trispuffer enthält.

Hierzu 1 Seite Zeichnungen

238521 7



23. MRZ. 19