

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149475 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN

(21) Patentansøgning nr.: 0570/79

(51) Int.Cl.⁴: C 12 Q 1/56

(22) Indleveringsdag: 12 feb 1979

(41) Alm. tilgængelig: 24 sep 1979

(44) Fremlagt: 23 jun 1986

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 23 mar 1978 DE 2812943

(71) Ansøger: *BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Mannheim-Waldhof, DE.

(72) Opfinder: Knut *Bartl; DE, Helmut *Lilli; DE, Joachim *Ziegenhorn; DE.

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde og reagens til bestemmelse af
den biologiske aktivitet af heparin i plasma

(57) Sammendrag:

570-79

Det biologisk aktive heparin i plasmaet bestemmes ved proteolyse ved hjælp af thrombin eller faktor Xa i nærværelse af et kromogent substrat, såsom et peptid, der har en p-nitroanilidgruppe i amidbinding, samt måling af det dannede farvestof. Fremgangsmåden gennemføres således uden tilsætning af antithrombin III.

Et reagens til brug ved fremgangsmåden kan f.eks. bestå af

0,01 til 0,3 mol/l puffer, pH 6 til 9,

0,01 til 0,25 mol/l alkalichlorid,

200 til 1100 NIH/1 thrombin eller faktor Xa,

0,05 til 10 mmol/l kromogent substrat,

0 til 0,01 g/l aprotinin,

0 til 0,05 mol/l EDTA,

0 til 10 g/l polyethylenglycol.

DN 149475 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde og et reagens til bestemmelse af den biologiske aktivitet af heparin i plasma.

Bestemmelsen af heparin er en vigtig parameter ved den i tilfælde af thromboserisiko hyppigt gennemførte heparinbehandling.

5 Heparin danner med antithrombin III (AT III) et kompleks, som hæmmer den proteolytiske aktivitet af thrombin. Da thrombin katalyserer dannelsen af fibrin ud fra fibrinogen, er thrombinaktiviteten ansvarlig for koagulationen af blod eller plasma og således også for det ved en thrombose dannede fibrinkoagulat.

10 Heparinbehandlingen benyttes hyppigt ved tilstedeværelse af en thromboserisiko (f.eks. før kirurgisk indgreb). En nøjagtig indstilling af heparinkoncentrationen er derfor overordentlig vigtig. I tilfælde af en mindre dosering er der nemlig risiko for en thrombose eller blodprop, hvilket kan føre til døden.

15 For høje heparinkoncentrationer fører til gengæld til forblødninger. Den kvantitative analyse af heparin hører derfor til de undersøgelser, som hyppigt udføres i koagulationslaboratoriet.

20 Til bestemmelse af heparin anvendes i praksis hovedsagelig to metoder:

1. Bestemmelse af koagulations-(clotting)-aktiviteten i blod eller plasma. De herpå beroende fremgangsmåder er imidlertid utilfredsstillende. Især i det lavere koncentrationsområde er følsomheden for ringe, medens høje koncentrationer som følge af ukoagulerbarhed ikke længere kan registreres (se Thromb. Res. 8, 413 (1976)).

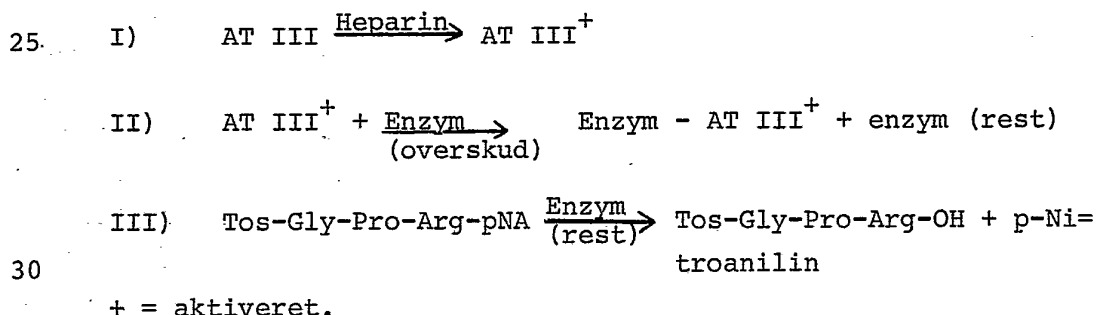
25

2. I den senere tid anvendelsen af kromogene substrater for enzymet faktor Xa eller thrombin (J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 15, 239 (1977)).

30 Denne nyere fremgangsmåde beror på følgende princip:

Plasmaprøven, som indeholder heparinet, der skal bestemmes, samt en ubekendt svingende mængde antithrombin III (AT III eller heparin-cofaktor), inkuberes i nærværelse af tilsat

AT III med faktor Xa eller thrombin. Faktor Xa sammen med faktor Va, calcium og phospholipid, aktiverer prothrombin under dannelse af thrombin. Faktor X er den ikke-aktiverede form af stoffet, medens faktor Xa er den aktiverede form af faktoren. Det tilsatte AT III skal for det første kompensere de forskellige mængder AT III i prøven ved fremskaffelse af et overskud, og for det andet er det nødvendigt med henblik på tilstrækkelig forøgelse af følsomheden af prøven, især i det lavere heparinkoncentrationsområde. AT III kan enten tilsættes i form af normalplasma, som altid indeholder fysiologiske mængder AT III, eller i form af rensat AT III. Under denne inkubation bevirker det i prøven indeholdte heparin ad katalytisk vej en konformationsændring hos AT III, hvilket har aktivering deraf til følge. Det aktiverede AT III er nu i stand til at inaktivere en del af det i inkubationsopløsningen indeholdte proteolytiske enzym Xa eller thrombin spontant gennem dannelse af en kovalent binding. Det ikke af heparinaktiveret AT III hæmmede proteolytiske enzym kan nu fra et egnet kromogent substrat, i reglen et p-nitroanilinholdigt peptid, såsom Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA eller Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, hvor Bz, pNA og Tos står for henholdsvis benzoyl, p-nitroanilid og tosyl, frigøre farvestoffet p-nitroanilin, hvis ekstinktion ved 405 nm kan måles. Forskellen mellem den benyttede enzymaktivitet ($\Delta E_1/\text{min}$) og den efter inkubationen målte restaktivitet ($\Delta E_2/\text{min}$) sættes ved hjælp af en kalibreringskurve i relation til heparinkoncentrationen i prøven. De efterfølgende reaktionsskemaer belyser denne metode:



På grund af tilsætning af et overskud af AT III i form af et normalplasma eller som rensat AT III er heparinbestemmelsen ifølge denne fremgangsmåde i vidt omfang uafhængig af AT III i plasmaprøven. Man bestemmer således det samlede i prøven tilstedeværende heparin, som via AT III er i stand til at in-

aktivere thrombin og faktor Xa. Det har imidlertid nu yderligere vist sig, at dette system har følgende ulemper: En ikke sjældent optrædende AT III-mangel i patientplasma kan på grund af det tilsatte AT III ikke erkendes. I ekstreme, men i klinikken absolut forekommende tilfælde, hvor patienten praktisk taget ikke længere har noget AT III, ville en alenestående heparinbehandling være virkningsløs. Heparin ville ikke udøve nogen som helst biologisk virkning på thrombin. Lægen ville således ifølge dette måleprincip få et forfalsket udsagn om patientens koagulationstilstand. Følgelig skal der foruden heparinbestemmelsen foretages en AT III-bestemmelse.

Opfindelsen tager derfor sigte på at angive en fremgangsmåde, hvormed heparins biologiske aktivitet bestemmes direkte.

Dette opnås ifølge opfindelsen ved hjælp af en fremgangsmåde til bestemmelse af heparins biologiske aktivitet i plasma ved tilsætning af et proteolytisk enzym og et kromogent substrat for enzymet samt måling af det fra det kromogene substrat frigjorte farvestof, og som er ejendommelig ved, at der som proteolytisk enzym anvendes thrombin eller faktor Xa, og at bestemmelsen gennemføres uden tilsætning af antithrombin III.

Ifølge angivelser i litteraturen bliver følsomheden af heparinbestemmelsen som følge af tilsætningen af rensat AT III forøget således, at også små heparinmængder (ned til 10 U/l) kan bestemmes.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er det imidlertid overraskende muligt, også uden AT III-tilsætning, i det lavere koncentrationsområde at måle heparin i plasma ved normalt AT III-indhold med tilstrækkelig følsomhed. Ved prøvegennemførelsen ved 37°C er eksempelvis 20 USP heparin/l plasma endnu tilstrækkelig nøjagtig at registrere. USP står for United Pharmacopeial Convention. Da intet eksternt AT III længere sættes til prøven, registrerer man i overensstemmelse med den biologiske mekanisme ved thrombininaktivering de to parametre heparin og AT III. Via det i prøven indeholdte AT III kan heparinet, som skal be-

stemmes i prøven, ikke desto mindre udfolde sin biologiske aktivitet i form af inaktivering af thrombinet. Denne fremgangsmåde gør det muligt for lægen at foretage en direkte forløbskontrol af koaguleringsstilstanden i patientens blod ved heparinbehandlingen.

- 5 Med kromogene substrater for det proteolytiske enzym skal generelt forstås substrater, som under indvirkning af enzymet fraspalter et farvestof. Herved kan der være tale om et i spektretssynlige område bestemtligt farvestof, et fluorescensfarvestof eller et i det ultraviolette område bestemtligt farvestof. Som kromogene substrater foretrækkes peptider, som
10 til en arginingruppes carboxygruppe har en via amidbinding bundet farvestofgruppe. Særlig egnet hertil er p-nitroanilidgruppen samt af denne ved substitution afledte lignende farvestoffer. Også andre aminogruppeholdige farvestoffer kan i
15 midlertid være bundet til arginingruppens carboxylgruppe.

Ved anvendelse af thrombin som substrat anvendes fortrinsvis Bz-Phe-Val-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA eller Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, hvor Pip står for pipercolyl.

- 20 Ved anvendelse af faktor Xa anvendes som kromogent substrat fortrinsvis Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA.

- Fremgangsmådebetingelserne i henseende til pH-værdi, tid, temperatur og lignende svarer i det væsentlige til sådanne ved den kendte fremgangsmåde, fortrinsvis arbejdes ved pH 8,0 og med tris(hydroxymethyl)-aminomethan/HCl-puffer. Andre puffersystemer, såsom tris(hydroxymethyl)-aminomethan/imidazol- eller
25 imidazol/HCl-puffer, er imidlertid også anvendelige. Bestemmelsen foregår hensigtsmæssigt ved stuetemperatur. Bestemmelsen kan imidlertid også gennemføres ved højere temperaturer (30 til 37°C), hvorved der svarende til en højere thrombinaktivitet anvendes lavere enzymkoncentrationer.
30

Til opnåelse af en optimal ionstyrke i prøvematerialet tilsættes salte, fortrinsvis alkalimetallchlorider, såsom NaCl eller KCl, til pufferopløsningen. Til hæmning af forstyrrende pro-

tease-fremmedaktiviteter i prøveplasmaet anvendes fortrinsvis aprotinin.

Opfindelsen angår endvidere et reagens til bestemmelse af heparin i plasma ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, 5 hvilket reagens består af

0,01 til 0,3 mol/l puffer, pH 6 til 9,
0,01 til 0,25 mol/l alkalimetallchlorid,
200 til 1100 NIH/l thrombin eller faktor Xa
(NIH = National Institute of Health),
10 0,05 til 10 mmol/l kromogent substrat,
0 til 0,01 g/l aprotinin,
0 til 0,03 mol/l ethylendiamintetraeddikesyre, dinatriumsalt, og
0 til 10 g/l polyethylenglycol.

Fremgangsmåden og reagenset ifølge opfindelsen udmærker sig 15 ved, at der til prøvens gennemførelse kræves en komponent mindre end ved den kendte fremgangsmåde. Følgelig frembyder den manuelle prøve større gennemførlighed. Frem for alt er fremgangsmåden imidlertid bedre egnet til anvendelse i analyseautomater. Endvidere indvirker udeladelsen af AT III-tilsætningen overordentlig gunstigt på omkostningerne pr. bestem- 20 melsesmængde. Rådigheden over såvel normal plasma som rensat AT III er nemlig en begrænsende faktor. Som væsentlig fordel ved fremgangsmåden skal imidlertid nævnes den for anvenderen i klinikken forøgede udsagnsværdi, som beror på, at den kombi- 25 nerede effekt af AT III og heparin i plasmaprøven afspejles i måleresultatet.

Fremgangsmåden kan gennemføres kinetisk, hvorved hastigheden af thrombin-udgangsaktivitetens og thrombin-restaktivitetens reaktion tjener som målestørrelser umiddelbart efter begyn- 30 delsen af reaktionen med substratet. Endvidere kan også slutværdi-metoden anvendes, ved hvilken reaktionen efter en bestemt måletid standses ved hjælp af pH-forskydning med syrer, f.eks. med eddikesyre.

Prøvematerialet kan f.eks. indeholde:

- 0,045 mol/l tris/HCl-puffer, pH 8,0,
- 0,14 mol/l NaCl,
- 0,01 mol/l EDTA (ethylendiamintetraeddikesyre),
- 9 g/l polyethylenglycol,
- 5 0,01 g/l aprotinin,
- 300 NIH/l thrombin,
- 0,14 mmol/l Tos-Gly-Pro-Arg-pNA.

Eksempel 1.

10 Det nedenfor beskrevne eksempel blev gennemført ifølge den kinetiske metode under anvendelse af følgende reagenser:

Reagens 1:

- 0,05 mol/l tris/HCl-puffer, pH 8,0,
- 0,15 mol/l NaCl,
- 0,01 mol/l EDTA,
- 15 10 g/l polyethylenglycol,
- 0,01 g/l aprotinin,
- 330 NIH/l thrombin.

Reagens 2:

1,5 mmol/l Tos-Gly-Pro-Arg-pNA

20 Bestemmelsesmængde:

Målestråling: Hg 405 nm; kuvettens lagtykkelse: 1 cm,
Inkubationstemperatur: Stuetemperatur.

25 2,0 ml af reagenset 1 pipetteres i kuvette, 0,02 ml prøve tilsættes og blandes. Der inkuberes i 3 min. ved 25°C, hvorefter 0,2 ml af reagenset 2 iblandes. Ekstinktionen registreres fra 0 til 3 min. ved 25°C.

Pr. målerække bestemmes en blindværdi. Herved anvendes vand i stedet for prøveplasmaet.

Vurdering: Forskellen mellem ekstinktionsændringen fra 0 til 3 min. for blindværdien og ekstinktionsændringen fra 0 til 3 min. for prø-

ven dannes. Denne forskel er et mål for den biologiske aktivitet af heparinet i plasmaet. Ligeledes kan den absolutte ekstinktion efter 3 min. tages i betragtning til vurderingen, således som vist i fig. 1. Denne fig. 1 viser resultaterne for 18 plasmaprøver, som blev tilsat afvejede mængder heparin, så at der fremkom et koncentrationsområde fra 0,05 til 1,0 USP heparin/ml plasma.

Reagenset indeholder ca.:

0,01 til 0,3 mol/l puffer, pH 6 til 9,
10 0,01 til 0,25 mol/l NaCl,
0,001 til 0,03 mol/l EDTA,
200 til 1100 NIH/l thrombin,
≥ 0,05 mmol/l substrat,
0 til 0,01 g/l aprotinin og
15 0 til 10 g/l polyethylenglycol.

Ovennævnte reagenssammensætning angiver koncentrationsområderne for de enkelte bestanddele, inden for hvilke fremgangsmåden kan gennemføres problemløst.

Eksempel 2.

20 Bestemmelsen skete i overensstemmelse med den kinetiske metode under anvendelse af følgende reagenser:

Reagens 1:

0,05 mol/l Tris/HCl, pH 8,0,
0,15 mol/l NaCl,
25 0,01 mol/l EDTA,
10 g/l polyethylenglycol,
0,01 g/l aprotinin.

Reagens 2:

1,0 mmol/l Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA.

Reagens 3:

8 U/ml faktor Xa.

- 5 Bestemmelsesmængde: Hg 405 nm, kuvettens lagtykkelse 1 cm, inkubationstemperatur = stuetemperatur.

500 μ l af reagenset 1, 10 μ l prøve og 100 μ l reagens 3 pipetteres i kuvette og blandes. Der inkuberes i 3 min. ved 25°C, hvorpå 500 μ l reagens 2 iblandes. Ekstinktionen registreres
10 fra 0 til 3 min. ved 25°C.

Pr. målerække bestemmes en blindværdi. Herved anvendes vand i stedet for prøveplasmaet.

Vurdering: Ligesom i eksempel 1 via justeringskurve.

P a t e n t k r a v.

- 15 1. Fremgangsmåde til bestemmelse af den biologiske aktivitet af heparin i plasma ved tilsætning af et proteolytisk enzym og et kromogent substrat for enzymet samt måling af det fra det kromogene substrat frigjorte farvestof, k e n d e t e g n e t ved, at der som proteolytisk enzym anvendes
20 thrombin eller faktor Xa, og at bestemmelsen gennemføres uden tilsætning af antithrombin III.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der som kromogent substrat anvendes et peptid, der til en arginingruppes carboxylgruppe har en via amidbinding bundet p-nitroanilidgruppe.
25

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at der ved anvendelse af thrombin anvendes Bz-Phe-Val-Arg-pNA, H-D-Phe-Pip-Arg-pNA eller Tos-Gly-Pro-Arg-pNA som kromogent substrat.
- 5 4. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at der ved anvendelse af faktor Xa anvendes Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA som kromogent substrat.
5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at der desuden tilsættes aproti=
- 10 nin.
6. Reagens til bestemmelse af heparin i plasma ved fremgangs- måden ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at det består af:
- 0,01 til 0,3 mol/l puffer, pH 6 til 9,
- 15 0,01 til 0,25 mol/l alkalimetachlorid,
- 200 til 1100 NIH/l thrombin eller faktor Xa,
- 0,05 til 10 mmol/l kromogent substrat,
- 0 til 0,01 g/l aprotinin,
- 0 til 0,03 mol/l ethylendiamintetraeddikesyre, dinatriumsalt,
- 20 0 til 10 g/l polyethylenglycol.

Fremdragne publikationer:

E 405 um

