(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 336 T2** 2007.05.16

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 758 401 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 336.5**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/05586**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 918 980.4**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/030770**
(86) PCT-Anmeldetag: **04.05.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **16.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.02.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.12.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **16.05.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***G01N 33/86*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:
238842 **06.05.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Beckman Coulter, Inc., Fullerton, Calif., US

(74) Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

(72) Erfinder:
ZWEIG, E., Stephen, Los Gatos, CA 95032, US;
SHARMA, Sameer, Sunnyvale, CA 94086, US;
MEYER, G., Benjamin, Saratoga, CA 95070, US

(54) Bezeichnung: **TROCKENER PROTHROMBIN-ZEITTEST**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund der Erfindung

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein Prothrombinzeit-Blutkoagulationsuntersuchungen und genauer Trockenreagenz-Prothrombinzeit-Testvorrichtungen und Prothrombinzeit-Testverfahren, die auf der Rehydratisierung von getrocknetem Thromboplastin in Gegenwart von Blut oder Plasma beruhen.

[0002] Blutkoagulationstests können für eine Reihe von Zwecken durchgeführt werden, einschließlich der Bestimmung der Blutungsneigung von Patienten, die einem chirurgischen Eingriff unterzogen werden, und der Überwachung von Patienten, die eine gerinnungshemmende Therapie zur Verhinderung von Blutgerinnseln durchlaufen. Derzeit wird eine Vielfalt von Koagulationstests verwendet. Einer der gebräuchlichsten ist der „Prothrombinzeit" (PT)-Test, der auf der Induktion des extrinsischen Koagulationswegs durch Aktivierung von Koagulationsproteasefaktor VII durch Thromboplastin in einer zu untersuchenden Blutprobe beruht.

[0003] Der extrinsische Koagulationsweg führt zur Bildung von Thrombin, einem proteolytischen Enzym, das die Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin katalysiert. Eine derartige Umwandlung ist eine grundlegende Funktion in dem Gerinnungsmechanismus.

[0004] Bisher waren derartige Blutkoagulationstests eher komplex, wobei eine Durchführung im Allgemeinen auf klinische Labors beschränkt war. Während eine solche zentrale Untersuchung für Chirurgiepatienten angemessen sein kann, ist das regelmäßige Aufsuchen einer Arztpraxis oder Klinik zur Überwachung einer gerinnungshemmenden Therapie weniger annehmbar. Der Bedarf für einen bequemen und praktischen Koagulationsüberwachungstest, der zu Hause durchgeführt werden kann, ist somit offensichtlich.

[0005] Für andere chemische Substanzen wie etwa Cholesterin und Glucose sind erfolgreiche Bluttests für den Hausgebrauch entwickelt worden. Unter den gebräuchlichsten Vorrichtungen für den Hausgebrauch sind Trockenreagenz-Testvorrichtungen, die alle Testbestandteile vorgemischt und konserviert in einer trockenen Form, die für eine langfristige Lagerung geeignet ist, enthalten. Diese Trockenreagenz-Testvorrichtungen beinhalten Teststreifen, kleine Kunststoffkammern und dergleichen.

[0006] Trockenreagenztests weisen typischerweise eine geringere Genauigkeit auf als Flüssigphasentests. Dies ist auf die strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Formaten zurückzuführen. Flüssigphasentests besitzen eine sehr einfache und einheitliche Reaktionszone, die durch die Wände des Behälters geformt ist, worin die Reaktion abläuft. Im Gegensatz dazu besitzen Trockenreagenztests eine komplexe Reaktionszone, die durch die Oberflächen der trockenen Reaktionschemikalien und der Trägermatrix gebildet ist. Typischerweise sind Trockenreagenz-Trägermatrizen poröse Membranen oder Kammern mit kapillaren Spalten, die größere Verhältnisse von Oberfläche zu Volumen aufweisen, als die typischerweise für Flüssigphasentests verwendeten Reaktionsküvetten. Daher besteht bei Testproben, die in einem Trockenreagenztest untersucht werden, eine größere Wahrscheinlichkeit einer variablen Wechselwirkung mit den Testbestandteilen, was zu einer verringerten Genauigkeit führt. Wenn die Genauigkeit des Trockenreagenztests zu gering ist, kann der Test für praktische klinische Anwendungen tatsächlich nutzlos werden.

[0007] Die Genauigkeit eines Tests kann am besten mittels des Koeffizienten der Varianz beschrieben werden, der das Verhältnis zwischen der Streuung der Testergebnisse, die bei der Untersuchung einer großen Anzahl von identischen Proben erhalten werden, geteilt durch den Wert des Gesamttestsignals, wiedergibt. Wenn die Streuung bei den Testwiederholungen im Verhältnis zu dem Gesamttestsignal groß ist, so besitzt der Test eine geringe Genauigkeit. Umgekehrt besitzt der Test eine bessere Genauigkeit, wenn die Streuung der Testergebnisse im Verhältnis zu dem Gesamttestsignal klein ist. Es gibt somit zwei Wege, um die Genauigkeit eines Tests zu verbessern. Der erste besteht darin, die Streuung der Testergebnisse zu verringern, während die Größenordnung des Signals beibehalten wird und der zweite besteht darin, die Größenordnung des Signals zu erhöhen, während die Streuung im Wesentlichen konstant bleibt. Häufig ist das zweite Verfahren, die Erhöhung der Größenordnung des Testsignals, der praktischste Weg, um die Genauigkeit zu verbessern.

[0008] Blut und Plasma enthalten eine Familie der Serinproteasen, welche den Gerinnungsprozess regulieren. Diese Serinproteasen werden als Koagulations-"Faktoren" bezeichnet und typischerweise mit römischen Zahlen benannt (wobei ein Suffix „a" angehängt wird, wenn der Faktor in einem enzymatisch aktiven Zustand vorliegt), und sie wirken in einer genau regulierten Amplifikationskaskade mit, um Blutgerinnsel an den Stellen

zu bilden, an denen Gewebe verletzt wurde. Diese Blutgerinsel dienen dazu, die Blutung an der Verletzungsstelle zu stoppen. Diese bestimmte Art der Blutkoagulation wird als „extrinsischer" Koagulationsweg bezeichnet.

[0009] Normales Gewebe enthält ein membrangebundenes Glykoprotein, das als Gewebefaktor bezeichnet wird, das freigesetzt wird, wenn das Gewebe verletzt wird. Der extrinsische Koagulationsweg beginnt, wenn dieser Gewebefaktor einen Komplex mit Koagulationsfaktor VII und/oder VII (a) bildet. Dieser Gewebefaktor-Faktor VII (a)-Komplex aktiviert wiederum Faktor X, der in Zusammenarbeit mit Cofaktor V die inaktive Prothrombin-Protease in das aktive Enzym Thrombin umwandelt. Thrombin wandelt dann Fibrinogen in Fibrin um, welches das tatsächliche Blutgerinsel bildet. Dieser Vorgang ist ausführlich in „Tissue Factor and Hemostatis, Y. Nemerson, Blatt 71 (1), 1-8, 1988, beschrieben. Die Nomenklatur in diesem Dokument folgt der von Nemerson. Der Prothrombinzeittest stimuliert diesen Koagulationsweg in vitro, wobei ein als Thromboplastin bezeichnetes Gewebeextrakt verwendet wird, um den Koagulationsweg auszulösen.

[0010] In herkömmlichen PT-Tests wurde üblicherweise Thromboplastin eingesetzt, das aus einem wässrigen Extrakt von Aceton-getrocknetem Hirngewebe aufgereinigt wurde. Dieses rohe Extrakt enthält viele Bestandteile. Der aktive Bestandteil von normalem Thromboplastin ist ein wenig definiertes Gemisch von reaktiven molekularen Faktor VII-Komplexen, die jeweils durch Wechselwirkung zwischen „Gewebefaktor"-Proteinen gebildet sind und dem Gemisch von Gehirnlipiden, die nach der Extraktion zurückbleiben. Im Gegensatz dazu, besteht synthetisches rekombinantes Thromboplastin (r-DNA-Thromboplastin) aus einem relativ einfachen, gut definierten Komplex, der aus gereinigtem rekombinanten Gewebefaktor-Protein und einer gereinigten künstlichen Lipidpopulation gebildet ist.

[0011] Es ist bekannt, dass unterschiedliche Thromboplastinpräparationen in Flüssigphasentests die Unterscheidung zwischen Blutproben, die unterschiedliche Prothrombinzeiten aufweisen, verbessern oder verringern können. Solche Thromboplastine mit einer höheren Unterscheidungsgenauigkeit werden als „sensitiver" bezeichnet. Die Flüssigphasensensitivität einer Thromboplastinpräparation wird unter Verwendung des internationalen Sensitivitätsindex oder ISI, eingestuft. Dieser ISI-Wert ist erhältlich, indem die Prothrombinzeit, die bei einer fraglichen Thromboplastincharge beobachtet wird, gegen die bei einer Standardcharge von Thromboplastin beobachteten Prothrombinzeitwerte (die normal so definiert sind, dass sie einen ISI-Wert von 1 aufweisen) auf einer logarithmischen Skala aufgetragen wird. Der ISI-Wert ist die Steigung der resultierenden Kurve, multipliziert mit dem ISI der Thromboplastin-Referenz.

[0012] Die Skala selbst ist etwas ungewohnt. Sensitivere Thromboplastine besitzen geringere ISI-Zahlen, typischerweise etwa 1,0, und weniger sensitive Thromboplastinmengen besitzen höhere ISI-Werte, typischerweise etwa 2–3. Die molekulare Ursache für den Unterschied zwischen mehreren Chargen ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt.

[0013] Bei Prothrombinzeittests ist eine hohe Genauigkeit von äußerster klinischer Bedeutung. Abhängig von der Stärke der Streuung könnte einer Blutprobe mit einem tatsächlichen International Normalisierten Verhältnis (INR) von 2,5 mit einem ungenauen Test ein INR von 2,0 oder 3,0 zugeschrieben werden. Eine solche Ungenauigkeit kann zu unterschiedlichen klinischen Entscheidungen führen. Ein Mediziner könnte entscheiden, die Dosis des Antikoagulationsmittels zu erhöhen, wenn ein INR-Ergebnis von 2,0 erhalten würde, und die Dosierung des Antikoagulationsmittels zu verringern, wenn ein INR-Ergebnis von 3,0 erhalten würde. Beide Entscheidungen hätten eine signifikante Auswirkung auf das Wohlbefinden des Patienten und beide könnten falsch sein, da ein „korrektes" Testergebnis des INR von 2,5 zu der Entscheidung führen könnte, die Dosierung des Antikoagulationsmittels überhaupt nicht anzupassen.

[0014] Aufgrund all dieser klinischen Probleme sind Verfahren zur Verbesserung der Genauigkeit eines Trockenreagenz-Prothrombinzeittests für den Fachbereich von beträchtlicher Bedeutung.

2. Beschreibung des Standes der Technik

[0015] Durch rekombinante DNA-Technologie erzeugte Thromboplastine und Gewebefaktoren sind in den US-Patenten Nr. 5,110,730 und 4,966,852 beschrieben. Verfahren zur Herstellung von Thromboplastinen mit höherer Sensitivität für Flüssigphasentests sind in den US-Patenten Nr. 5,270,451 und 4,416,812 beschrieben. Die Verwendung von rekombinantem Gewebefaktor in Prothrombinzeittests ist beschrieben in Recombinant Tissue Factor as Substitute for Conventional Thromboplastin in the Prothrombin Time Test, A. Tripodi, A. Arbini, V. Chantarangkul und P. Mannucci, Thrombosis and Haemostatis 67 (1) 42-45 (1992). Die Verwendung des International Normalisierten Verhältnisses (INR) zur Berücksichtigung von Unterschieden der Sensitivität zwi-

schen verschiedenen Arten von Thromboplastin ist beschrieben in Calibration of Reference Thromboplastins and Standardization of the Prothrombin Time Ratio, T. Kirkwood, Thromb. Haemostatis 49 (3) 238-244 (1983) und in Requirements for Thromboplastins and Plasma used to Control Oral Anticoagulant Therapy, WHO Expert Committee on Biological Standardization, 33. Bericht, WHO Tech Rep. Ser 1983; 687:81-105. Der Mechanismus, über den Gewebefaktor Faktor VII (a) in der Prothrombinzeit-Gerinnungskaskade aktiviert, wird diskutiert in The Interaction of Human Factor VII (a) with Tissue Factor, S. Kirshnaswamy, The Joural of Biological Chemistry 267 (33) 23696-23706 (1992).

[0016] Trockenreagenz-Prothrombinzeittests unter Verwendung von Teststreifen mit getrocknetem Thromboplastin sind in den parallelen Anmeldungen Seriennummern US 07/874,667 und US 08/003,791 beschrieben.

Zusammenfassung der Erfindung

[0017] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden in einer verbesserten Testvorrichtung und in einem verbesserten Verfahren zur Durchführung von Trockenreagenz-Prothrombinzeittests hoch gereinigte und gut definierte Thromboplastinpräparationen verwendet. Solche Thromboplastinpräparationen werden ausgewählt, um ein hohes Maß an Sensitivität und Spezifität für ihre Aktivierung des Koagulationsfaktors VII (a) in Testproben zu gewährleisten während der Umwandlung von Thromboplastin von einem trockenen Zustand zu einem hydratisierten Zustand. Besonders nützlich und vorteilhaft sind Thromboplastine, die durch künstliche Relipidierung von durch rekombinante DNA-Techniken hergestelltem Gewebefaktor hergestellt sind (nachstehend als „rekombinantes Thromboplastin" bezeichnet).

[0018] Wir haben überraschenderweise herausgefunden, dass Thromboplastinpräparationen mit nahezu identischen Flüssigphasen-ISI-Werten sich in ihren ISI-Werten stark unterscheiden können, wenn sie in Trockenreagenz-Prothrombinzeittests eingesetzt werden. Bei gereinigtem natürlichen Thromboplastin kann dieser Effekt zu Trockenreagenz-Prothrombinzeittests mit geringem medizinischen Nutzen führen. Im Gegensatz dazu haben wir gefunden, dass rekombinantes Thromboplastin sehr viel resistenter gegenüber diesem Effekt ist. Rekombinante Thromboplastine besitzen nahezu dieselbe Sensitivität (ISI-Wert) sowohl in Flüssigphasen- als auch in Trockenreagenztests, und ergeben Trockenreagenz-Prothrombinzeittests mit hervorragenden klinischen Nutzen.

[0019] Die Erklärung für diesen Unterschied scheint sich aus der Biochemie der Thromboplastinreaktion zu ergeben. Es ist bekannt, dass die Aktivität von Gewebefaktor und Thromboplastin durch die Assoziierung des Gewebefaktorproteins mit dessen umgebender Lipidpopulation entscheidend beeinflusst wird. Gewebefaktorprotein in Lösung ist für sich im Wesentlichen inaktiv. Das Protein muss in einer Lipidmatrix angeordnet sein, um aktiv zu sein. Die Lipide und Lipoproteine liegen in einer wässrigen Phase als geordnete Aggregate in Form von Monoschichten, Mizellen und Doppelschichten vor. Diese Aggregate besitzen Strukturen, die entscheidend von der Wechselwirkung zwischen ihren hydrophoben Lipidbestandteilen und der umgebenden wässrigen Matrix abhängen. Eine ausführlichere Erörterung dieses Effekts findet sich auf Seite 219-232 von Kapitel 9: The structure of biological membranes, in Biochemistry, J. David Rawn, 1989, Neil Patterson Publishers, North Carolina.

[0020] In Flüssigphasen-Prothrombinzeittests werden sowohl gereinigtes natürliches als auch rekombinantes Thromboplastin im Gleichgewicht mit der flüssigen Phase vorliegen. Insbesondere die Gewebefaktoranteile und die Lipidfaktoranteile des Thromboplastins befinden sich in einer relativ stabilen Mizellverteilung und wechselwirken mit einer Probe (Faktor VII) auf ziemlich gleichbleibende Art und Weise. Im Gegensatz dazu durchläuft das Thromboplastin in einem Trockenreagenztest zahlreiche tiefgreifende konformative Umwandlungen, während es durch eine Probe rehydratisiert wird. Insbesondere die Lipid- und Proteinbestandteile des Thromboplastins müssen von der Trockenphase, in der ionische Wechselwirkungen dominieren und hydrophobe Effekte nicht vorhanden sind, in eine Flüssigphase übergehen, in der hydrophobe Wechselwirkungen entscheidend sind. Zwischen diesen beiden Phasen werden zahlreiche kurzlebige Übergangszustände gebildet. Diese Übergangszustände besitzen, obwohl sie nur eine kurze Lebensdauer aufweisen, ihre eigenen einzigartigen Eigenschaften. Ein analoger Übergang kann beobachtet werden, wenn Wasser zu einem trockenen Detergenz hinzugefügt wird – die Lösung durchläuft eine intermediäre „trübe" Phase, bevor sich schließlich eine stabile „klaren" Phase bildet.

[0021] Ein entscheidender Unterschied zwischen den Flüssigphasen- und Trockenreagenz-PT-Tests besteht darin, dass der Faktor VII (a) Bestandteil der Koagulationstestprobe in dem Flüssigphasentest nicht den intermediären Thromboplastin-Übergangszuständen ausgesetzt ist und somit nicht durch diese beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu ist der Faktor VII (a) Bestandteil der Koagulationstestprobe in einem Trockenreagenz-Pro-

thrombinzeittest diesen intermediären Zuständen ausgesetzt.

[0022] Ein zweiter Unterschied zwischen herkömmlichen Flüssigphasen- und Trockenreagenz-PT-Tests besteht darin, dass Trockenreagenz-Testvorrichtungen typischerweise ein oder mehrere lösliche Polymere oder Proteinmittel enthalten, die nominal inaktiv sind (Koagulations-"neutral" für einen Prothrombinzeittest) im Hinblick auf die Testchemikalien in einem Flüssigtest, die jedoch für die einwandfreie Funktion des Trockenreagenztests eine Rolle spielen. Solche Mittel können verwendet werden, um die Aufnahme der flüssigen Probe in den Trockenreagenzträger zu modulieren, um die Diffusion der Testbestandteile zu kontrollieren, um die Auflösung der Trockenreagenztestchemikalien zu erleichtern oder um die langfristige Lagerungsstabilität der Trockenreagenztestbestandteile zu verbessern. Solche Mittel können einfache Polymere sein, wie beispielsweise Hydroxypropylcellulose, Gantrez, Polyvinylalkohol, Polyethylenglycol und dergleichen. Proteine wie beispielsweise Rinderserumalbumin und dergleichen werden ebenfalls verwendet. Zucker wie beispielsweise Glucose, Trehalose, Polysaccharide wie beispielsweise Stärke oder Dextran sind ebenfalls für diese Zwecke eingesetzt worden. Detergenzien wie Triton®-100 und dergleichen sind ebenfalls verwendet worden.

[0023] Obwohl sie für eine einwandfreie Funktion eines Trockenreagenztests benötigt werden, können solche Koagulations-"neutralen" Mittel den konformativen Zustand des Thromboplastins während des Rehydratisierungsvorgangs beeinflussen. Insbesondere können solche Mittel die Thromboplastinsensitivität (Fähigkeit mit Koagulationsfaktor VII (a) zu wechselwirken) während des Rehydratisierungsvorgangs beeinträchtigen. Ungünstigerweise erscheinen für gereinigte natürliche Thromboplastine einige der intermediären Übergangszustände, die wenige Sekunden nach der anfänglichen Rehydratisierung auftreten als funktionelles Thromboplastin mit abweichender Sensitivität. Dadurch kann der klinische Nutzen des Trockenreagenztests verringert werden.

[0024] Unerwarteter Weise haben wir jedoch herausgefunden, dass Trockenreagenz-Prothrombinzeittests, in denen rekombinantes Thromboplastin eingesetzt wird, ungewöhlich gut funktionieren. Trockenreagenztests auf Basis von r-DNA-Thromboplastin weisen nicht die charakteristische Veränderung der Sensitivität auf, die typischerweise bei Verwendung von herkömmlichen Thromboplastin erhalten wird. Als Folge davon bieten diese Tests eine verbesserte Unterscheidung zwischen Proben mit unterschiedlicher Prothrombinzeit, ohne Erhöhung der probeninternen Streuung. Dadurch erhöht sich die Genauigkeit des Tests.

[0025] Die verbesserte Funktionsfähigkeit des Prothrombinzeittests unter Verwendung von rekombinanten Thromboplastin scheint in direktem Bezug zu der Reinheit des r-DNA-Reagenz zu stehen. Die komplexe Zusammensetzung von gereinigtem natürlichen Thromboplastin führt zu einer sehr großen Anzahl von intermediären Übergangszuständen, die während der Rehydratisierung auftreten. Im Gegensatz dazu ergibt die relativ einfache und gut definierte Zusammensetzung von rekombinantem Thromboplastin weit weniger intermediäre Übergangszustände während der Rehydratisierung. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit, eine intermediäre Übergangsform von Thromboplastin mit abweichender Sensitivität zu erzeugen, verringert.

[0026] Alternativ kann es so betrachtet werden, dass das Thromboplastin einen Phasenübergang zwischen einem trockenen und einem flüssigen Zustand durchläuft. Ein reineres und homogeneres Ausgangsmaterial (rekombinantes Thromboplastin) wird typischerweise einen viel schärferen und besser definierten Phasenübergang durchlaufen als ein weniger reines oder weniger homogenes Material (herkömmliches Thromboplastin).

[0027] In jedem Fall besteht das überraschende und unvorhersehbare Ergebnis darin, dass dann, wenn trockenes Thromboplastin, das frei von Substanzen ist, die abweichende intermediäre Übergangszustände bei der Rehydratisierung des Thromboplastins hervorrufen, das insbesondere frei von solchen Thromboplastinsubstanzen mit abweichenden Übergangszuständen ist, die in aus Gehirnextrakt aufgereinigtem Thromboplastin vorkommen, in einem Prothrombinzeittest eingesetzt wird, die Testprobe einer viel geringeren Vielfalt von unterschiedlichen intermediären Thromboplastin-Übergangszuständen ausgesetzt werden wird und sich ein schärferer Übergang zwischen dem anfänglichen „inaktiven" dehydratisierten Thromboplastin und dem späteren aktiven vollständig hydratisierten Thromboplastin ergeben wird. Beide Effekte sind vorteilhaft und führen zu Trockenreagenz-Prothrombinzeittests mit besserer Unterscheidung zwischen Proben mit unterschiedlichen Prothrombinzeitwerten. Solche Tests ergeben einen erhöhte Genauigkeit.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0028] Fig. 1 zeigt die Auswirkung von unterschiedlichen Thromboplastinpräparationen auf die Sensitivität eines Flüssigphasen-Prothrombinzeittests. Auf der „X"-Achse sind drei normale Thromboplastine gezeigt, mit

ISI-Sensitivitätsindizes zwischen 1,2 und 3,0. Ebenfalls gezeigt ist ein rekombinantes Thromboplastin mit einem ISI-Sensitivitätsindex von 0,92. Die „Y"-Achse des Graphen zeigt die relative Sensitivität des Tests, ausgedrückt als Differenz in Sekunden zwischen dem Prothrombinzeitwert, der mit einem Level II-Kontrollplasma erhalten wird und dem, der mit einem Level I-Kontrollplasma erhalten wird. Die Sensitivität des r-DNA-Thromboplastins fällt auf die Kurve, die von dem Verhalten von normalem Thromboplastin extrapoliert wurde.

[0029] Fig. 2 zeigt die Auswirkung von unterschiedlichen Thromboplastinpräparationen auf die Sensitivität eines Trockenreagenz-Prothrombinzeittests. Auf der „X"-Achse sind drei normale Thromboplastine gezeigt, mit ISI-Sensitivitätsindizes zwischen 1,2 und 3,0. Ebenfalls gezeigt ist ein rekombinantes Thromboplastin mit einem ISI-Sensitivitätsindex von 0,92. Die „Y"-Achse des Graphen zeigt die relative Sensitivität des Tests, ausgedrückt als Differenz in Sekunden zwischen dem Prothrombinzeitwert, der mit einem Level II-Kontrollplasma erhalten wird und dem, der mit einem Level I-Kontrollplasma erhalten wird. Bemerke, dass die Sensitivität des rekombinanten Thromboplastin von der Kurve, die aus dem Verhalten von normalem Thromboplastin extrapolierte wurde, abweicht.

[0030] Fig. 3 zeigt die Auswirkung unterschiedlicher Thromboplastinpräparationen auf die Sensitivität eines vereinfachten Trockenreagenz-Prothrombinzeittests, der sich aus lyophilisiertem Thromboplastin in einer Reaktionsküvette zusammensetzt. Auf der „X"-Achse sind drei normale Thromboplastine mit ISI-Sensitivitätsindizes zwischen 1,2 und 3,0 gezeigt. Ebenfalls gezeigt ist ein rekombinantes Thromboplastin mit einem ISI-Sensitivitätsindex von 0,92. Die „Y"-Achse des Graphen zeigt die relative Sensitivität des Tests, ausgedrückt als Differenz in Sekunden zwischen dem Prothrombinzeitwert, der mit einem Level II-Kontrollplasma erhalten wird und dem, der mit einem Level I-Kontrollplasma erhalten wird. Bemerke, dass die Sensitivität des rekombinanten Thromboplastins auf der von dem Verhalten von normalem Thromboplastin extrapolierten Kurve bleibt.

[0031] Fig. 4 vergleicht direkt die Auswirkung von unterschiedlichen Thromboplastinpräparationen auf die Sensitivität eines Flüssigphasen-Prothrombinzeittests gegenüber einem Trockenreagenz-Prothrombinzeit-Teststreifen. Auf der „X-Achse" sind die Unterschiede der PT-Zeiten zwischen einer Level I- und Level II-Kontrolle für einen Flüssigphasentest gezeigt, bei Verwendung von drei normalen Thromboplastinen und einem rekombinanten Thromboplastin. Die „Y-Achse" zeigt die Differenz der PT-Zeiten zwischen einer Level I- und einer Level II-Kontrolle für einen Trockenreagenz-Teststreifen unter Verwendung derselben Thromboplastine. Bemerke wiederum, dass die Sensitivität des rekombinanten Thromboplastins von der aus dem Verhalten von normalem Thromboplastin extrapolierten Kurve abweicht.

[0032] Fig. 5 vergleicht direkt die Auswirkung von unterschiedlichen Thromboplastinpräparationen auf die Sensitivität eines Flüssigphasen-Prothrombinzeittests gegenüber einem vereinfachten Trockenreagenz-Prothrombinzeittest. Auf der „X-Achse" sind die Unterschiede der PT-Zeiten zwischen einer Level I- und einer Level II-Kontrolle für einen Flüssigphasentest gezeigt, bei Verwendung von drei normalen Thromboplastinen und einem rekombinanten Thromboplastin. Die „Y-Achse" zeigt den Unterschied der PT-Zeiten zwischen einer Level I- und einer Level II-Kontrolle für den vereinfachten Trockenreagenztest bei Verwendung derselben Thromboplastine. Bemerke wiederum, dass die Sensitivität des rekombinanten Thromboplastins für den vereinfachten Trockenreagenztest auf der von dem Verhalten von normalem Thromboplastin extrapolierten Kurve bleibt.

Beschreibung der speziellen Ausführungsformen

[0033] Die verbesserten Testvorrichtungen der vorliegenden Erfindung umfassen eine trockene synthetische Thromboplastinformulierung, die auf einem Testartikel der für die Auftragung von unverdünntem Blut oder Plasma geeignet ist, immobilisiert ist. Die Testvorrichtung wird üblicherweise außerdem getrocknete koagulationsneutrale Mittel enthalten, die verwendet werden, um die Aufnahme und Verteilung der Probe zu erleichtern und sie kann mit einem Nachweismechanismus augestattet sein, der die zwischen der Auftragung der Probe und dem Auftreten der Koagulation in dem Testartikel verstrichene Zeit bestimmt.

[0034] Das trockene synthetische Thromboplastin ist ausgewählt, um eine hohe Sensitivität und Spezifität für die Prothrombinzeitreaktion zu gewährleisten, während das Thromboplastin mit der Testprobe rehydratisiert wird und insbesondere wird es im Wesentlichen frei von Substanzen sein, die abweichende intermediäre Übergangszustände bei der Rehydratisierung des Thromboplastins hervorrufen, insbesondere ist es frei von solchen Substanzen mit abweichend funktionierenden Thromboplastin-Übergangszuständen, die bei Thromboplastin vorkommen, das aus Gehirnextrakt aufgereinigt ist. Bevorzugt wird das Thromboplastin durch Relipidierung einer reinen Gewebefaktorpräparation hergestellt, unter Verwendung einer Lipidfraktion, welche die Solubilisierung des Gewebefaktor-Lipid-Thromboplastin-Komplexes in wässrigem Medium erleichtert. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform wird das Thromboplastin unter Verwendung von mittels rekombi-

nanter DNA-synthetisiertem humanem Gewebefaktor hergestellt. Ein beispielhaftes trockenes synthetisches Thromboplastin ist relipidierter rekombinanter humaner Gewebefaktor wie beispielsweise Innovin™-Thromboplastin, welches von Baxter Healthcare Corporation, Dade Division, Miami, Florida erhältlich ist.

[0035] Die feste Phase kann eine nicht saugfähige oder saugfähige Struktur sein. Nicht saugfähige Strukturen werden typischerweise undurchlässige Strukturen sein, die gesonderte kapillare Flussbahnen zur Aufnahme der untersuchten Blut- oder Plasmaprobe aufweisen. Das trockene Thromboplastin und gegebenenfalls koagulationsneutrale Mittel werden auf die Wand/Wände der kapillaren Flussbahn beschichtet, so dass das Thromboplastin rehydratisiert wird, wenn die Probe durch Kapillarkraft durch diese gezogen wird.

[0036] Saugfähige Strukturen können aus einem Material zusammengesetzt sein, das Flüssigkeit absorbieren kann und das die für die Durchführung eines gewünschten Tests notwendigen Reagenzien in trockener Form enthalten kann. Eine breite Vielfalt von saugfähigen Matrixmaterialien könnte verwendet werden, einschließlich Papier, Methylcellulose, poröse Polymere und dergleichen. In der bevorzugten Ausführungsform, wenn kleine Proben analysiert werden, wird eine saugfähige Matrix eines poröse Membranstruktur sein, die aus einem hydrophilen (saugfähigen) nicht quellfähigen polymeren Matrixmaterial zusammengesetzt ist, das Porenabmessungen aufweist, die den Eintritt von Blutplasma und Proteinen erlauben, während Blutzellen, insbesondere rote Blutzellen (Erythrozyten) ausgeschlossen sind. Die Membran sollte aus einem einzelnen kontinuierlichen polymeren Material zusammengesetzt sein, welches eine schaumartige Struktur aufweist, die aus einem gewundenen Netzwerk von Kanälen mit Durchmessern in der Größenordnung von Mikrometern (μm) besteht. Das gewundene Netzwerk von Kanälen ist in sofern „dicht gepackt", als das „Hohlraumvolumen", das von dem freien Raum der Kanäle eingenommen wird, einen nennenswerten Prozentsatz des gesamten Membranvolumens ausmacht, typischerweise 10% oder mehr. Da die gesamte chemische Reaktion und die anschließende Signalerzeugung in dem Hohlraumvolumen stattfindet, ist ein großes Hohlraumvolumen für die Erzeugung eines starken Signals wünschenswert. Ein gewundenes Netzwerk von Kanälen ist im Vergleich zu geraden und direkten Poren (wie beispielsweise kurzen direkten Poren, die mit Nukleopor-Membranen erhalten werden) vorteilhaft, da größere durchschnittliche Kanallängen eher eine zunehmende Isolierung zwischen der Zone der Membran, in der die chemische Reaktion abläuft und der überschüssigen Probe, die auf der Oberfläche der Membran zurückbleibt, erzeugt. Dies trägt dazu bei, dass das System weniger empfindlich gegenüber Veränderungen des aufgetragenen Probenvolumens ist.

[0037] Die poröse Membranstruktur wird mit den notwendigen Reagenzien getränkt, um in dem Blutplasma, welches in das Innere der porösen Matrix gelangt, eine Koagulation hervorzurufen und um ein nachweisbares Signal als Anzeichen für die Koagulationsfähigkeit des Bluts zu erzeugen. In der vorliegenden Erfindung ist es besonders entscheidend, dass das polymere Matrixmaterial der porösen Membran im Wesentlichen keine Beeinträchtigung des Koagulationsweges, der ausgelöst wird, mit sich bringt. Insbesondere sollte das polymere Matrixmaterial keine Oberflächeneffekte, Wechselwirkungen oder Artefakte aufweisen, die eine Koagulation hervorrufen könnten oder Bestandteile wie Enzyme des ausgelösten Weges inaktivieren könnten. Die unbeabsichtige Auslösung eines Koagulationsweges könnte zu falsch positiven Bestimmungen führen, während die Enzymdesaktivierung zu falsch negativen Bestimmungen führen könnte. Es ist daher wichtig, dass das polymere Matrixmaterial keine verstärkende oder abschwächende Wirkung auf die in der Membran auftretenden Koagulationsreaktionen aufweist. Kriterien, um zu bestimmen, ob eine Membran für die Verwendung in einer Koagulationsuntersuchung annehmbar sind, werden in der parallelen Anmeldung Seriennummer US 07/874,667 ausführlich beschrieben. Ein besonders bevorzugtes polymeres Matrixmaterial für die Durchführung von Blutkoagulationstests ist ein 0,45 μm asymmetrisches Polysulfonmembranmaterial, das von Filterite-Memtec, 9690 Deeveco Road, Suite 7, Timonium, Maryland 21093, Katalognummer BTS-25, erhältlich ist.

[0038] Die koagulationsneutralen Mittel werden so ausgewählt, dass die Aufnahme der flüssigen Probe in die feste Phase verstärkt wird, während sie keine oder nur eine geringe Auswirkung auf die gemessene Prothrombinzeit zeigen. Geeignete Mittel beinhalten Proteine wie Rinderserumalbumin; Polymere wie Hydroxypropylcellulose, Gantrez, Polyvinylalkohol und Polyethylenglycol; Zucker wie Glucose und Trehalose; Polysaccharide wie Stärke und Dextrane und oberflächenaktive Mittel wie Polyoxyethylenether.

[0039] Die Membran wird weiter zu einem Teststreifen mit einer Deckstruktur verarbeitet, typischerweise in Form von beabstandeten Elektroden, die durch eine Lücke getrennt sind, auf der Probenauftrageseite der Membran und einem transparenten Streifenträger auf der gegenüberliegenden Seite der Membran.

[0040] Bei der Verwendung wird der Streifen in einen Fluoreszenzdetektor gegeben, der eine auf 37 °C erwärmte Streifenhaltestufe aufweist und an den Mittel angebracht sind, zur Überwachung des Widerstandsabfalls über den Elektroden, wenn eine Probe auf die Probenauftrageseite der Membran aufgetragen wird. Der

Fluoreszenzdetektor nimmt dann eine Reihe von Fluoreszenzmessungen der auf der Unterseite der Membran beobachteten Fluoreszenz vor. Ausführlichere Kriterien für die Konstruktion solcher Testvorrichtungen und Detektoren sind ausführlich in der parallelen Anmeldung Seriennummer US 08/003,771 dargelegt.

[0041] Eine Thromboplastinpräparation kann auf die Anwesenheit oder Abwesenheit oder Substanzen mit abweichend funktionierenden intermediären Thromboplastin-Übergangszuständen untersucht werden, durch einen funktionellen Test. Um dies durchzuführen, wird eine Probe des Thromboplastins in einer wässrigen Lösung gelöst und die Aktivität des voll hydratisierten Thromboplastins wird in einem Flüssigphasen-Prothrombinzeittest charakterisiert, unter Verwendung von Faktor VII/VII(a)-haltigen Blut- oder Plasmaproben mit unterschiedlichen extrinsischen Koagulationswegen (Prothrombinzeiten). Anschließend wird eine dehydratisierte Probe der fraglichen Thromboplastinpräparation in einen Trockenreagenz-Prothrombinzeittest eingebracht, der ein oder mehrere zusätzliche koagulationsneutrale Mittel zur Unterstützung der Funktion des Trockenreagenztests enthalten kann. Die Aktivität der dehydratisierten Thromboplastinprobe in dem Trockenreagenztest wird bewertet, indem sie mit Faktor VII/VII(a)-haltigen Blut- oder Plasmaproben mit unterschiedlicher extrinsischer Koagulationswegaktivität rehydratisiert wird. Die Thromboplastinprobe wird so beurteilt, dass sie Substanzen mit abweichend funktionierenden intermediären Thromboplastin-Übergangszuständen aufweist, wenn die Fähigkeit des Trockenreagenztests zur Unterscheidung zwischen Proben mit unterschiedlichen Prothrombinzeiten im Vergleich zu dem Flüssigphasen-Prothrombinzeittest beeinträchtigt ist.

Versuche

[0042] Thrombinsubstrate: Boc-Val-Pro-OH und Tos-Gly-Pro-OH wurden von Bachem Bioscience, Philadelphia, PA bezogen (Boc-Val-Pro-Arg)$_2$-Rhodamin 110 und (Tos-Gly-Pro-Arg)$_2$-Rhodamin 110 wurden durch Konjugation von Boc-Val-Pro-OH bzw. Tos-Gly-Pro-OH an Rhodamin 110 hergestellt, gemäß der Verfahren von Mangel et al. (US-Patente Nr. 4,557,862 und 4,640,893).

[0043] Membranen: Die asymmetrische Polysulfonmembran wurde von Memtec Corporation, Timmonium, MD bezogen.

[0044] Thromboplastin: Dade Thromboplastin C, C plus, IS und Innovin (humanes Thromboplastin, hergestellt aus rekombinanten DNA-Quellen) wurden von Baxter Healthcare Corporation, Miami, Florida bezogen.

[0045] Kontrollplasma: Kommerziell erhältliches Kontrollplasma wurde von Sigma bezogen. Dabei handelte es sich um C-7916 Level I-Koagulationskontrolle (teilweise aktivierte Thromboplastinzeit und Prothrombinzeit innerhalb nomaler Grenzen), C-8916 Level II-Koagulationskontrolle (leicht erhöhte Werte für teilweise aktivierte Thromboplastinzeit und Prothrombinzeit) und Sigma C-9916 Level III-Koagulationskontrolle (stark erhöhte Werte für teilweise aktivierte Thromboplastinzeit und Prothrombinzeit).

[0046] Das verwendete Rinderserumalbumin (BSA) war Sigma A 3294, ein proteasefreies Fraktion V-Pulver.

[0047] Membranpräparation: Wenn nicht anders angegeben, wurden die Reagenzienlösungen oder „Dips" hergestellt aus 0,1 M HEPES pH 7,4, 10 mM $CaCl_2$, 20 mg/ml Sigma proteasefreies Rinderserumalbumin, 50 mg/ml an 87–89%-igem hydrolysiertem Polyvinylalkohol (MW 13.000–23.000, Aldrich Chemical Company), lyophilisiertem Thromboplastin, das so eingestellt ist, um das Äquivalent einer 40%-igen Standardlösung zu erhalten und 2×10^{-4} M des fluoreszierenden Thrombinsubstrats. Um die Auflösung zu unterstützen, wurden die fluoreszierenden Thrombinsubstrate auf Basis von Rhodamin-110 in einer 10X-Stammlösung von 50% Isopropanol vorgelöst. Typische Lösungen wurden hergestellt, indem zunächst die BSA- und PVA-Bestandteile gelöst wurden. Thromboplastin- und Thrombinsubstrat wurden als letztes hinzugefügt, um eine mögliche Beschädigung dieser beiden biologisch aktiven Bestandteile zu minimieren.

[0048] Die Membranen wurden beschichtet, in dem eine Seite der Membran (die größerporige durchlässigere Seite) mit der Reagenziendip-Oberfläche für etwa 5 Sekunden behutsam in Kontakt gebracht wurde. Der Überschuss wurde schonend entfernt und die beschichtete Membran wurde dann unmittelbar in einem mechanischen Heißluftofen bei 50 °C für 15 Minuten luftgetrocknet. Die trockenen Membranen wurden dann in verschlossenen Behältern mit Kieselgel als Trockenmittel bei Raumtemperatur oder bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

[0049] Um eine Verdampfung während der maßbezogenen Untersuchungen zu verhindern, wurden die präparierten Membranen auf 10 Mil (0,254 mm) dickes transparentes Styrol unter Verwendung von 3 M 415 doppelseitigem Klebeband angebracht und mit 1 Mil (0,0254 mm) dicker Aluminiumfolie bedeckt. Die Probe wurde

durch die transparente Styrrolschicht betrachtet.

[0050] Messapparatur: Die Trockenreagenz-Prothrombinzeit-Membranen wurden mit einem Instrument beobachtet, das mit einem 550 nm Filter mit einer Bandbreite von 25 nm ausgestattet war. Die Proben wurden mit einer Wolframlampe, die durch einen 500 nm Filter mit einer Bandbreite von 25 nm filtriert wurde, beleuchtet. Dieses Instrument wies außerdem eine beheizte Reagenzienstufe auf, die die Membran während des Tests bei 37 °C hielt.

[0051] Beide Instrumente verwendeten einen Siemens BPW-34B-Fotodetektor. Die Ausgabe von dem Fotodetektor wurde mittels eines Instrumentenverstärkers amplifiziert, mittels eines 12 Bit Analog-Digital-Umwandlers digitalisiert und auf einem IBM-kompatiblen Personalcomputer aufgezeichnet.

[0052] Referenzinstrument: Prothrombinzeitreferenzwerte wurden unter Verwendung eines MLA Electra 750-Koagulationsmessinstruments erhalten.

[0053] Beispiel 1: Wirkung verschiedener Arten von Thromboplastin auf Flüssig- und Trockenreagenz-Prothrombinzeittests. In diesem Experiment wurden Prothrombinzeittests durchgeführt, wobei drei normale Thromboplastine mit ISI-Einstufungen zwischen 1,2 und 2,9 und ein rekombinantes Thromboplastin mit einer ISI-Einstufung von 0,92 verwendet wurden. Die Thromboplastine wurden in Aliquote eingeteilt, wobei ein Aliquot verwendet wurde, um den Flüssigphasen-Prothrombinzeittest durchzuführen und wobei das zweite Aliquot verwendet wurde, um Trockenreagenz-Prothrombinzeit-Teststreifen herzustellen. Anschließend wurden unter Verwendung dieser Teststreifen Prothrombinzeit-Reaktionen durchgeführt. Die verwendeten Thromboplastine sind in Tabelle 1 gezeigt:

Tabelle 1: In diesen Experimenten verwendete Thromboplastine

	Innovin™ (r-DNA)	Dade IS	Dade C+	Dade C
ISI-Wert	0,92	1,2	2,1	2,9

[0054] Sowohl der Flüssigphasentest als auch der Trockenreagenztest wurden dann mit Sigma Level I-Koagulationskontrolle (nominaler INR von 1,0) und Sigma Level II-Koagulationskontrolle (nominaler INR von etwa 3,0) getestet. Der Flüssigphasentest wurde auf einem MLA Electa 750-Instrument durchgeführt, welches die Gerinnselbildung optisch bestimmt, indem Trübungsveränderungen in einer Teströhrchen-Reaktionsküvette überwacht wurden.

[0055] Der Trockenreagenztest wurde auf einem thermostatisch kontrollierten optischen Fluoreszenzmessgerät durchgeführt, wie in der parallelen Anmeldung Seriennummer US 08/003,771 beschrieben. Andere Experimente (nicht gezeigt) hatten gezeigt, dass die zwischen der anfänglichen Auftragung der Probe und dem Zeitpunkt, an dem die normalisierte Fluoreszenzintensität erstmals 10% des Maximums überstieg (wobei die Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 als 0 definiert ist und die Fluoreszenzintensität bei maximaler Fluoreszenz als 1 definiert ist), verstrichene Zeit, bezeichnet als Zeit$_{10\%Max}$ oder ($T_{10\%}$), Ergebnisse ergab, die im Wesentlichen dem klassischen Flüssigphasen-Prothrombinzeitwert entsprechen. Wenn nicht anders angegeben, beruhen alle Trockenreagenzergebnisse auf diesem $T_{10\%}$-Wert.

[0056] Die Differenzen zwischen den Kontroll-Level II- und -Level I-Prothrombinzeitwerten, die mit den Flüssigphasen- und Trockenreagenz-Prothrombinzeittests erhalten wurden, wurden dann gegen die nominale Flüssigphasen-ISI-Einstufung des Thromboplastinreagenz aufgetragen. Die Flüssigphasenergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt und die Trockenreagenzergebnisse sind in Fig. 2 gezeigt. Wie ersichtlich ist, folgen die Flüssigphasen-Prothrombinzeitergebnisse den klassischen ISI-Sensitivitätsberechnungen. Wenn der ISI von 2,9 auf 0,92 abfällt (sensitiver wird), erfolgt ein kontinuierliche Anstieg der Fähigkeit des Reagenziensystems, zwischen den Level II- und den Level I-Prothrombinzeitwerten zu unterscheiden. Wenn die mit normalem Thromboplastin erhaltene Sensitivitätskurve auf einen ISI-Wert von 0,92 extrapoliert wird, passt das rekombinante Thromboplastin nahezu exakt auf diese Kurve.

[0057] Im Gegensatz dazu sind die Trockenreagenzergebnisse ziemlich unterschiedlich. Im Gegensatz zu den Flüssigphasenergebnissen erfolgt nur ein sehr leichter Anstieg der Sensitivität des Reagenzes, wenn die normalen Thromboplastine zwischen ISI 1,2 und 2,9 variiert werden. Wenn die mit normalem Thromboplastin

erhaltene Sensitivitätskurve auf einen ISI-Wert von 0,92 extrapoliert wird, so zeigt das rekombinante Thromboplastin eine starke Abweichung von dem erwarteten Verhalten. Es ist sehr viel sensitiver als ausgehend von Extrapolierungen von der normalen Thromboplastinaktivität erwartet.

[0058] Beispiel 2: Wirkung verschiedener Arten von Thromboplastin auf einen vereinfachten Trockenreagenztest. Dieses Experiment wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob die Abweichung des Thromboplastin vom idealen Verhalten in dem trockenen Zustand auf Rehydratisierungseffekte zurückzuführen war oder ob es auf Wechselwirkungen zwischen dem trockenen Thromboplastin und den anderen Bestandteilen des Trockenreagenztests zurückzuführen war.

[0059] Zu diesem Zweck wurden Proben von lyophilisiertem Thromboplastin direkt in MLA Electra 750-Reaktionsküvetten gegeben, ohne Rehydratisierung, und ohne, dass sie anderen typischerweise in dem Trockenreagenz-Prothrombinzeittest verwendeten Testchemikalien ausgesetzt waren (Rinderserumalbumin, Polyvinylalkohol etc.). Diese lyophilisierten Thromboplastinpulver wurden direkt mit Kontroll I- und Kontroll II-Plasma rehydratisiert, verdünnt, um dieselbe effektive Konzentration zu erreichen, die normalerweise erhalten würde, wenn das Thromboplastin in seiner normalen flüssigen Form verwendet worden wäre. Die Thromboplastinzeitwerte, die mit Thromboplastin erhalten wurden, das in Gegenwart von Probe rehydratisiert wurde, wurden dann bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Fig. 3** gezeigt.

[0060] Die Ergebnisse zeigen, dass in dem vereinfachten Trockenreagenztest eine kontinuierliche Zunahme der Fähigkeit des Reagenzsystems erfolgte, zwischen Level II- und Level I-Prothrombinzeitwerten zu unterscheiden. Wenn die mit normalem Thromboplastin erhaltene Sensitivitätskurve auf einen ISI-Wert von 0,92 extrapoliert wird, so passt das rekombinante Thromboplastin nahezu exakt auf diese Kurve.

[0061] Die Ergebnisse legen nahe, dass die Wechselwirkungen zwischen normalem Thromboplastin und den anderen normalerweise in den Trockenreagenzstreifen enthaltenen Chemikalien oder der Streifenmatrix selbst zu den relativ schlechten Fähigkeiten von normalem Thromboplastin in diesem Trockenreagenztest beitragen.

[0062] Beispiel 3: Direkter Vergleich zwischen der Kinetik von Trockenreagenztests und Flüssigphasentests, bei Verwendung unterschiedlicher Arten von Thromboplastinen.

[0063] Um zu erkennen, ob die Unterschiede zwischen verschiedenen Arten von Thromboplastin direkt erkennbar sind, wurden die Beispiele 1 und 2 wiederholt, wobei diesmal die Unterschiede der Prothrombinzeit-Kinetik zwischen einem Level I- und einem Level II-Kontrollplasma in einem Flüssigphasentest direkt verglichen wurden mit denselben Unterschieden, die in einem Trockenreagenzteststreifen-Prothrombinzeittest und in demselben vereinfachten Trockenreagenz-Prothrombinzeittest, der in Beispiel 2 verwendet wurde, erhalten werden. Die Ergebnisse, die bei einem direkten Vergleich des Trockenteststreifentests mit einem Flüssigtest erhalten werden, sind in **Fig. 4** gezeigt und die bei dem direkten Vergleich des vereinfachten Trockenreagenztests mit dem Flüssigtest erhaltenen Ergebnisse sind in **Fig. 5** gezeigt.

[0064] Die Ergebnisse bestätigen die anfänglichen Befunde. Wenn bei dem Trockenteststreifentest die mit normalem Thromboplastin erhaltene Sensitivitätskurve auf einen ISI-Wert von 0,92 extrapoliert wird, so zeigt das rekombinante Thromboplastin eine starke Abweichung von dem erwarteten Verhalten. Es ist sehr viel sensitiver als ausgehend von einer Extrapolation der normalen Thromboplastinaktivität erwartet.

[0065] Ebenso passte bei dem vereinfachten Trockenreagenztest bei einer Extrapolation der mit normalem Thromboplastin erhaltenen Sensitivitätskurve auf einen ISI-Wert von 0,92 das rekombinante Thromboplastin nahezu exakt auf dieses Kurve.

[0066] Die Ergebnisse legen wiederum nahe, dass die Wechselwirkungen zwischen normalem Thromboplastin und den anderen Chemikalien, die normalerweise in dem Trockenreagenzstreifen enthalten sind oder der Streifenmatrix selbst zu den relativ schlechten Fähigkeiten des normalen Thromboplastins in diesem Trockenreagenztest beitragen.

[0067] Beispiel 4: Auswirkung von verschiedenen Arten von Thromboplastin auf die Genauigkeit von Trockenreagenz-Prothrombinzeittests. In diesem Experiment wurden Reagenzstreifen hergestellt und mit zehn Replikaten von Sigma Level I- und Level II-Kontrollplasma getestet. Die vorhergesagten INR-Werte, die bei diesen Tests erhalten werden, wurden dann unter Verwendung der Gleichung

$$INR = (Zeit_{10\%max}/Zeit_{ref})^{ISI}$$

berechnet. $Zeit_{10\%max}$ ist die Zeit, die für das Level II-Kontrollplasma benötigt wird, um zunächst eine Fluoreszenzintensität von 10% des Maximalwerts zu entwickeln (was nahezu einer klassischen PT-Zeit in diesem Test entspricht), $Zeit_{ref}$ ist die benötigte Zeit für normales Level I-Kontrollplasma, um eine Fluoreszenzintensität von 10% des Maximalwerts zu entwickeln (entspricht nahezu einer Kontroll-PT-Zeit in diesem Test) und der ISI-Wert wird so ausgewählt, dass die Eigenschaften der bestimmten Charge von Streifen genau auf Referenzplasma mit bekannten INR-Werten kalibriert wird.

[0068] Der Koeffizient der Varianz (CV) der mit den vier Chargen von Streifen erhaltenen INR-Ergebnissen ist nachstehend gezeigt: Dieser wurde unter Verwendung von zehn Replikaten von Kontroll II-Plasma erhalten. Um zu erkennen, ob der Effekt durch Ausreißer verfälscht ist, wurde der stärkste Ausreißer jeder Probe verworfen und die CV's wurden erneut berechnet. Dies ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: CV's von Trockenreagenzien, die mit verschiedenen Arten von Thromboplastin hergestellt sind

	Innovin™	Dade IS	Dade C+	Dade C
Norminaler ISI	0,92	1,2	2,1	2,9
CV: (10 Replikate)	1,83%	4,22%	3,02%	2,92%
CV: (beste 9)	1,39%	2,35%	2,66%	2,23%

[0069] Bemerke, dass der Trockenreagenztest bei Verwendung von rekombinantem Thromboplastin eine signifikant bessere Genauigkeit aufwies als die Trockenreagenztests, die normales Thromboplastin verwendeten, obwohl die Flüssigphasen-ISI-Einstufungen des rekombinanten Thromboplastins nahezu identisch zu der Flüssigphasen-ISI-Einstufung der Dade IS-Formulierung waren.

[0070] Beispiel 5: Auswirkung von verschiedenen Arten von Thromboplastin auf die Genauigkeit, die mit einem Trockenreagenz-Prothrombinzeit-Teststreifen in einer klinischen Studie erhalten wird. In diesem Experiment wurden zwei Chargen von Prothrombinzeit-Teststreifen, wie zuvor beschrieben, hergestellt, wobei entweder Dade Innovin™ rekombinantes Thromboplastin oder Dade C normales Thromboplastin verwendet wurde. Diese Streifen wurden anschließend in einer klinischen Studie mit 25 Patienten eingesetzt. Zwei replizierte Proben von jedem Patienten wurden mit jeder Thromboplastinformulierung untersucht und die Übereinstimmung zwischen den jeweiligen replizierten Proben wurde berechnet. Für das rekombinante Thromboplastinreagenz betrug der R^2-Korrelationskoeffizient zwischen den beiden Replikaten 0,965. Im Gegensatz dazu war der R^2-Korrelationskoeffizient zwischen den beiden Replikaten, die unter Verwendung der normalen Thromboplastinformulierung erhalten wurden, nur 0,663.

Patentansprüche

1. Testvorrichtung zur Durchführung eines Trockenreagenz-Prothrombin Zeittests, wobei die Testvorrichtung umfasst:
eine Festphasenmatrix;
trockenes gereinigtes rekombinantes Thromboplastin, das an oder in der Festphasenmatrix immobilisiert ist, wobei das Thromboplastin frei von Substanzen ist, die in aus Gehirnextrakt gereinigtem Thromboplastin vorkommen, die abweichend funktionierende intermediäre Übergangszustände bei der Rehydratisierung des Thromboplastins mit flüssiger Probe verursachen; und
ein oder mehrere koagulationsneutrale Mittel, welche die Rehydratisierung des Thromboplastins beim Kontakt der Festphasenmatrix mit der flüssigen Probe erleichtern, worin die Festphasenmatrix eine saugfähige oder nicht saugfähige Struktur ist, und worin die saugfähige Struktur eine poröse Membranstruktur ist, die aus einem hydrophilen und nicht quellfähigen polymeren Matrixmaterial mit Porenabmessungen, die den Eintritt von Blutplasma und Proteinen erlauben während Blutzellen ausgeschlossen sind; und worin die nicht saugfähige Struktur eine undurchlässige Struktur ist, die wenigstens eine gesonderte kapillare Flussbahn aufweist.

2. Testvorrichtung nach Anspruch 1, worin das trockene gereinigte rekombinante Thromboplastin relipidierter rekombinanter Gewebefaktor ist.

3. Testvorrichtung nach Anspruch 1, worin die koagulationsneutralen Mittel ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, wasserlöslichen Polymeren, Zuckern, Polysacchariden, Detergenzien und ober-

flächenaktiven Mitteln.

4. Testvorrichtung nach Anspruch 1, worin die Vorrichtung einen Teststreifen umfasst und worin die Festphasenmatrix umfasst:
eine durchlässige Membran mit einer Auftrageseite und einer gegenüberliegenden Indikatorseite, wobei die Membran einen durch Thromboplastin ausgelösten und durch Faktor VII oder VIIa vermittelten Koagulationsablauf nicht beeinflusst;
und worin das eine oder mehrere koagulationsneutrale Mittel in der Membran imprägniert ist/sind und bei Kontakt der Membran mit einer flüssigen Probe die Rehydratisierung des Thromboplastins erleichtert/erleichtern;
und worin das trockene gereinigte rekombinante Thromboplastin in der Membran imprägniert ist; und
ein in der Membran imprägniertes Substrat, das bei Aktivierung durch eine Komponente des Koagulationsablaufs ein nachweisbares Signal erzeugt; wobei Proben, die Koagulationsfaktor VII oder VIIa enthalten auf die Auftrageseite der Membran aufgetragen werden, um auf der Indikatorseite als Folge einer Aktivierung des Substrats durch den Bestandteil des Koagulationsablaufs das nachweisbare Signal zu erzeugen.

5. Teststreifen nach Anspruch 4, wobei die koagulationsneutralen Mittel ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Proteinen, wasserlöslichen Polymeren, Zuckern, Polysacchariden, Detergenzien und oberflächenaktiven Mitteln.

6. Verbessertes Prothrombin-Zeittest-Verfahren, bei dem eine Blut- oder Plasmaprobe auf eine Festphasenmatrix aufgetragen wird, sodass diese mit trockenem gereinigtem Thromboplastin in Kontakt kommt, um eine nachweisbare Reaktion auszulösen, worin die Verbesserung umfasst:
die Bereitstellung eines oder mehrerer koagulationsneutraler Mittel in der Matrix und in Kontakt bringen des trockenen gereinigten Thromboplastins, bei dem es sich um rekombinantes Thromboplastin handelt, das frei von Substanzen ist, die in aus Gehirnextrakt gereinigtem Thromboplastin vorkommen, die abweichend funktionierende Übergangszustände bei der Rehydratisierung des Thromboplastins mit der Probe verursachen, worin die Festphasenmatrix eine saugfähige oder nicht saugfähige Struktur ist, und worin die saugfähige Struktur eine poröse Membranstruktur ist, die aus einem hydrophilen und nicht quellfähigen polymeren Matrixmaterial mit Porenabmessungen, die den Eintritt von Blutplasma und Proteinen erlauben während Blutzellen ausgeschlossen sind, zusammengesetzt ist; und worin die nicht saugfähige Struktur eine undurchlässige Struktur ist, die wenigstens eine gesonderte kapillare Flussbahn aufweist.

7. Verbessertes Prothrombin-Zeittest-Verfahren nach Anspruch 6, worin die koagulationsneutralen Mittel ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus Albuminen, wasserlöslichen Polymeren und oberflächenaktiven Mitteln.

8. Verbessertes Prothrombin-Zeittest-Verfahren nach Anspruch 6, worin die kapillare Flussbahn der Aufnahme einer Blut- oder Plasmaprobe dient.

9. Verbessertes Prothrombin-Zeittest-Verfahren nach Anspruch 6, worin das trockene gereinigte rekombinante Thromboplastin und die koagulationsneutralen Mittel auf einer Wand der kapillaren Flussbahn beschichtet sind, so dass das Thromboplastin rehydratisiert wird, wenn eine Probe mittels Kapillarkraft durch diese gezogen wird.

10. Testvorrichtung nach Anspruch 1, worin das eine oder mehrere koagulationsneutrale Mittel Rinderserumalbumin und Polyvinylalkohol sind.

11. Verbessertes Prothrombin-Zeittest-Verfahren nach Anspruch 6, worin das trockene gereinigte rekombinante Thromboplastin relipidierter rekombinanter Gewebefaktor ist.

12. Verbessertes Prothrombin-Zeittest-Verfahren nach Anspruch 6, wobei das eine oder mehrere koagulationsneutrale Mittel Rinderserumalbumin und Polyvinylalkohol sind.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

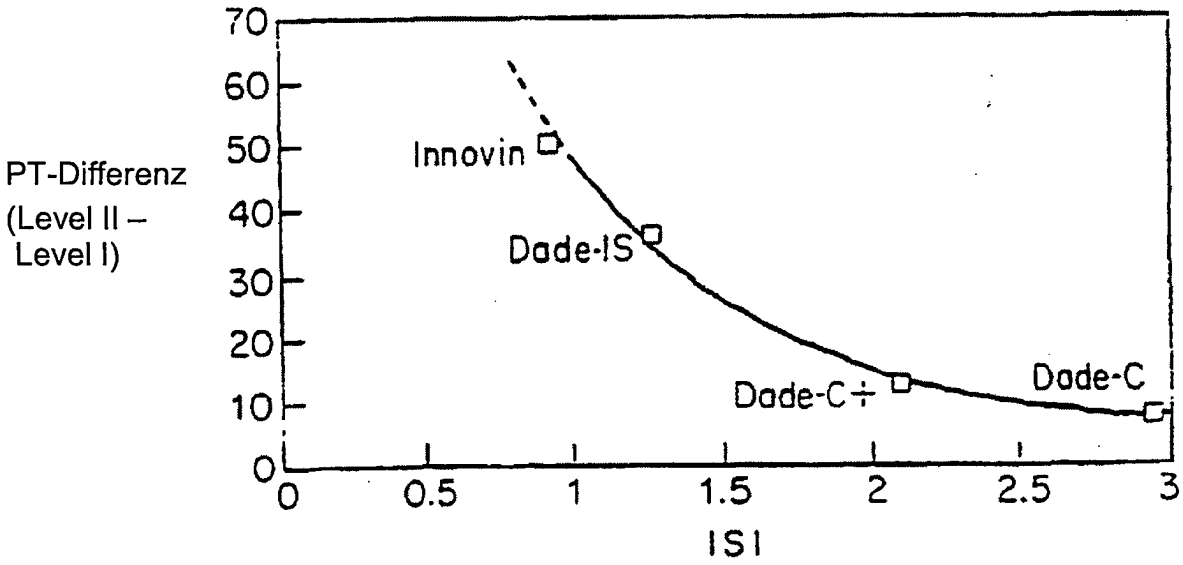


FIG. 1

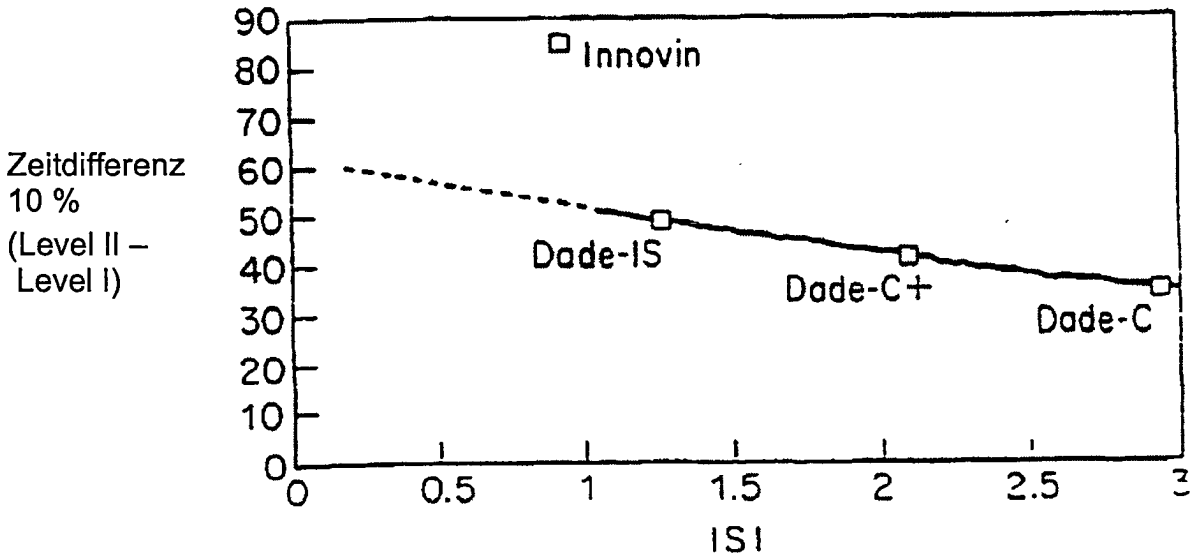


FIG. 2

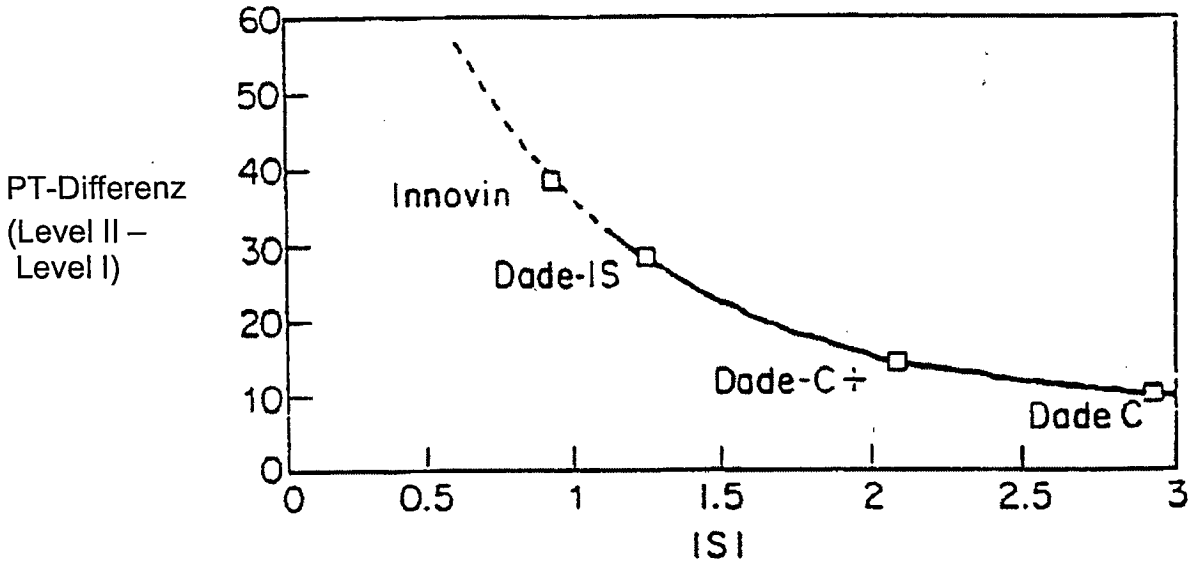

PT-Differenz
(Level II –
Level I)
60
50
40
30
20
10
0
Innovin
Dade-IS
Dade-C÷
Dade C
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
ISI

FIG. 3

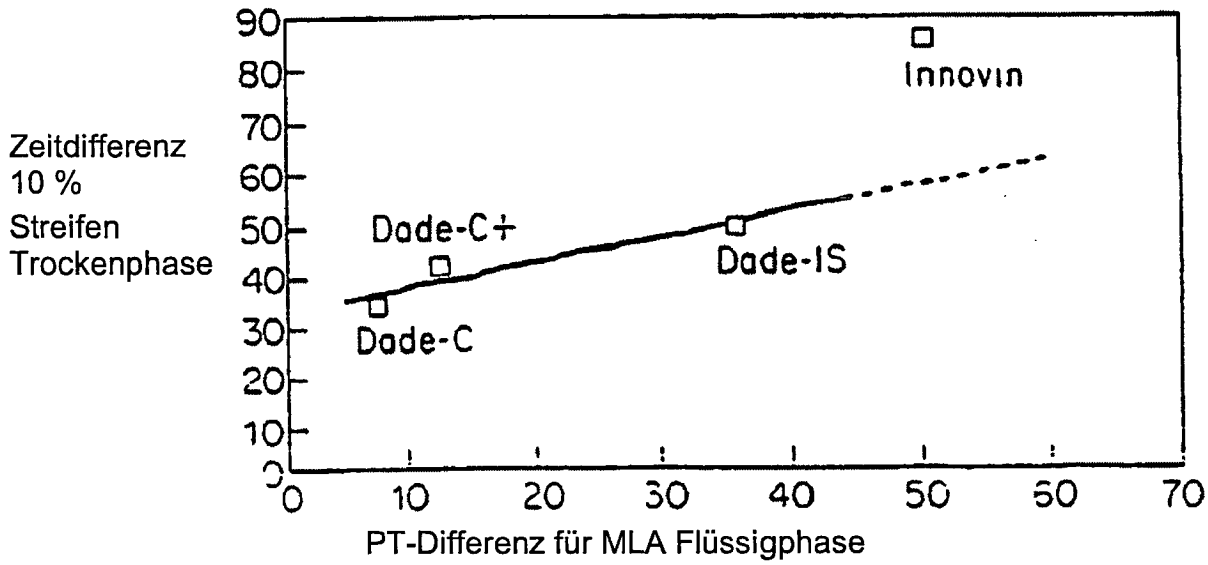

Zeitdifferenz
10 %
Streifen
Trockenphase
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Innovin
Dade-C÷
Dade-IS
Dade-C
0
10
20
30
40
50
60
70
PT-Differenz für MLA Flüssigphase

FIG. 4

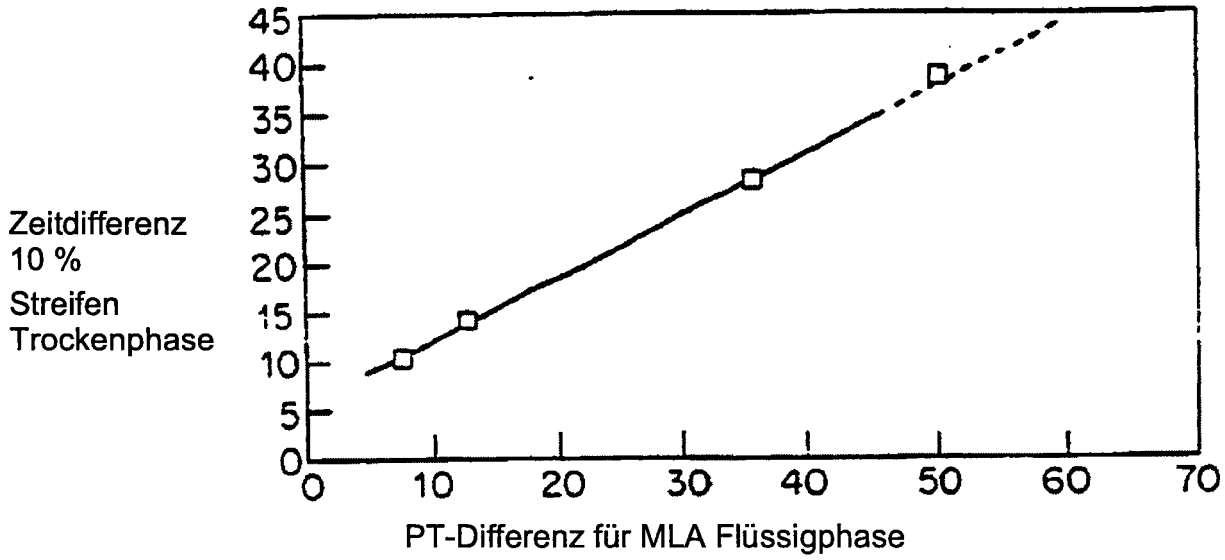

Zeitdifferenz
10 %
Streifen
Trockenphase
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
10
20
30
40
50
60
70
PT-Differenz für MLA Flüssigphase

FIG. 5