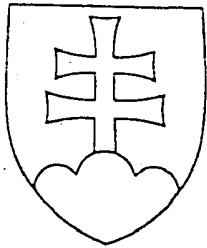


SLOVENSKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA
VYNÁLEZU

(21) 486-93

(13) A3

5(51) A 61 K 37/48

(22) 14.05.93

(32) 15.05.92

(31) A 999/92

(33) AT

(40) 08.12.93

(71) IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT, Wien, AT;

(72) LANG Hartmut Dr., Wien, AT; MORITZ Berta Dr.,
Wien, AT;

(54) Spôsob stanovenia fibrinogénu

(57) Spôsob stanovenia fibrinogénu enzymatickou preme-
nou trombínom, fragmentami protrombínu s trombino-
vou aktivitou alebo zmesami týchto látok a potom
detekciou vzniknutého fibrínu, popr. štiepných
fragmentov fibrinogénu tak, že sa enzymatická pre-
mena fibrinogénu vykonáva pri pH v rozsahu od 4 do
7,3.

Spôsob stanovenia fibrinogénu

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu stanovenia fibrinogénu enzymatickou reakciou s trombínom, protrombínovými fragmentami s "thrombin like activity" alebo zmesami týchto látok a potom detekciou vzniknutého fibrínu napr. štiepných produktov fibrinogénu. Ďalej vynález zahrňuje činidlo pre stanovenie obsahu fibrinogénu v poprípade neriedenej a poprípade tiež heparín obsahujúcej vzorke plazmy.

Doterajší stav techniky

Stanovenie fibrinogénu v plazme má veľký význam v rámci výskumu porúch zrážania. Pre stanovenie fibrinogénu sú známe ako imunologické, taktiež funkčné metódy, ako napr. testy zrážania. Pri testoch zrážania sa určí obsah fibrinogénu meraním času, kedy sa vytvorí zrazenina.

Bežnú metódu stanovenia opísal Clauss (Acta Haemat. 17, 237-246, 1957). Oxalátová plazma sa zriedi v pufre o pH 7,4 a pridá sa koncentrovaný trombínový roztok. Na záver sa stanoví doba až do bodu zrážania. Doba zrážania vzorky plazmy, ktorý reagoval s trombínom je ale úmerná obsahu fibrinogénu len vtedy, keď bol zvolený dostatočne veľký prebytok trombínu k plazme, aby boli prekryté plazmové rušivé faktory. Za rušivý faktor je považovaný antitrombín III (AT III) ktorý predovšetkým spolu s heparínom účinne potlačuje pôsobenie trombínu. Heparín je obvykle antikoagulačné činidlo a používa sa ako prísada pri odbere krvi alebo ako terapeutikum. Obsah heparínu vo vzorke plazmy môže viesť k predĺženým dobám zrážania a tak k nesprávnemu výsledku.

Pôsobenie antitrombínu III v plazme tu bude vďaka vysokej koncentrácii trombínu a vďaka zriedenej plazme a tým vďaka

zníženiu koncentrácie AT III napr. heparínu silne znížená. Ak sa však plazma nebude riediť, je pôsobenie antitrombínu niekoľkokrát silnejšie a doba zrážania sa predlžuje.

Zriedenie plazmy a s tým spojený ďalší stupeň spracovania znamená pri rutinných pokusoch značné zaťaženie. Vedľa vyšších pracovných nákladov a ďalšieho nutného spracovania potenciálne infekčnej plazmy je každé riedenie zásadným zdrojom chýb. Mimo toho musí byť riedenie často prevedené tak, aby zodpovedalo obsahu fibrinogénu, čo sťažuje prácu s automatickými analyzátormi.

Obvykle sa riedenie plazmy vykonáva za použitia veronalového pufru, pretože tento pufr uľahčuje tvorbu merateľných fibrínových zrážanín, čo najmä u plazmy s nízkym obsahom fibrinogénu uľahčuje stanovenie. Veronal je ale súčasne tiež narkotikum s návykovým charakterom, čím je používanie tejto substancie značne sťažené.

Ďalšie pokusy o vyradení rušivého faktoru antitrombínu III napr. Heparínu, zahrňujúceho neutralizáciu popr. odstránenie heparínu. V *Clinical Chemistry* 29, 614-617 (1983) je opísaný spôsob, podľa ktorého sa heparín vo vzorku plazmy neutralizuje prídavkom polybrénu. Plazma sa zriedi v pufré o pH 7,4 a po pridaní trombínu sa prenesie do fotometra. Potom sa nefelometricky stanoví reakčná rýchlosť.

Po pridaní enzýmu hadieho jedu s účinnosťou podobnou trombínu (batroxobin) miesto trombínu, môže byť fibrinogén v plazme stanovený nezávisle na rušivých uvedených faktoroch. Tieto enzýmy hadieho jedu nie sú viacmenej inhibované AT III napr. heparínom.

Použitie proteínov, ktoré nie sú považované za prirodzené zrážajúce enzýmy, ako popr. enzýmy hadích jedov, v spôsobe stanovenia ľudských proteínov je problematické. Reakcie medzi enzýmom zvierata, ktorým nie je cicavec a ľudským proteínom sú

často nešpecifické. V súlade s princípom biochemickej analytiky, porovnať a skúmať len rovnaké s rovnakým, je snaha o to, používať pre stanovenie ľudských proteínov rovnako len enzýmy cicavcov a medzi inými ľudské enzýmy, ako reakčného partnera.

Trombín môže byť vyrobený aktiváciou protrombínu. Ako medzistupne vznikajú behom aktivácie meizotrombín (MT) a meizotrombín (desF1). Dvojreťazcové trombínové medziprodukty ale vykazujú za prítomnosti protrombínu proteázovú aktivitu, ktorá je podobná aktivite trombínu ("thrombin like activity"). Sú teda schopné napríklad štiepiť substráty, ktoré by mohli byť premenené trombínom. "Thrombin like activity" je tiež proteázová aktivita, ktorá umožňuje štiepiť trombínové substráty, ktorých iónové sily, inhibítory, efektory, alosterické vedľajšie pôsobenie atď. nemusí bezpodmienečne byť zhodné s týmito parametrami pre trombín.

Aktivita hovädzieho enzýmu meizotrombínu, meizotrombínu (desF1) a trombínu boli porovnávané v J. of Biol. Chemistry 265, 10693-10701 (1990) pri hodnote pH 7,4. Meizotrombín vykazuje len 2% "fibrinogén clotting activity" Trombínu. Táto znížená aktivita môže však tiež opäť byť 10 až 15 % obsahu MT (desF1) v prípravku MT. Pre MT (desF1) bola nájdená aktivita 14 % trombínu.

Test enzymatickej premeny fibrinogénu na fibrín sa obvykle vykonáva pri hodnote pH v oblasti 7,4 až 8,0. Táto oblasť pH sa obvykle používa pri enzymatických reakciách trombínu, lebo zodpovedá fyziologickému rozsahu pH. Optimálna pH hodnota pre trombínovú aktivitu leží blízko pH 8.

Cieľom vynálezu je nájsť spôsobu stanovenia fibrinogénu pomocou testov zrážania, ktorý by odstránil uvedené nevýhody známych spôsobov a mohol byť najmä vykonávaný tiež vo vzorkách neriedenej plazmy nezávisle na obsahu AT III napr. heparínu.

Podstata vynálezu

Táto úloha je podľa vynálezu riešená spôsobom stanovenia fibrinogénu nezávislým na inhibítoroch trombínu enzymatickou premenou trombínom, protrombínovými fragmentami s "trombin like activity" alebo zmesi týchto látok a potom detekciou vzniknutého fibrínu napr. štiepných produktov fibrinogénu, ktorý sa vyznačuje tým, že sa enzymatická premena fibrinogénu vykonáva pri pH rozsahu 4 až 7,3 a detekcie vzniknutého fibrínu sa vykonáva stanovením doby zrážania, poprípade fibrinogénových štiepných produktov. Potom sa deteguje vzniknutá zrazenina fibrínu. Detekcia sa môže vykonávať fotometrickým alebo turbidimetrickým stanovením doby zrážania. K protrombínovým fragmentom s "trombin like activity" sa počítajú najmä zmesi MT, MT (des F1) alebo týchto látok samotných. Koncentrácia napr. pomery zmesí použitých enzýmov sa volí tak, že je zaručený lineárny vzťah v čo možno najširšom rozsahu obsahu fibrinogénu vo vzorke.

Tiež proteíny vyrobené génovou technikou, ktoré na základe svojej štruktúry vykazujú aktivitu podobnú trombínu a v porovnaní s trombínom vykazujú nepatrnú aktivitu k antitrombínu III, sú vhodné pre spôsob podľa vynálezu.

Ukutočnenie spôsobu stanovenia v uvedenej oblasti pH činí toto tak ďaleko nezávislým na uvedených rušivých faktoroch AT III a heparínu, že stanovenie fibrinogénu môže byť vykonané jednoduchým spôsobom zriedeným a poprípade tiež heparín obsahujúcim vzorku plazmy. Prídavkový stupeň riedenej plazmy môže byť pri spôsobe podľa vynálezu vynechaný, čím sa výsledok testu zlepší vylúčením eventuálneho zdroja chýb.

Vynález spočíva na poznatku, že je možné potlačiť inhibíciu pôsobením AT III/heparínom pri pH 4 až 7,3, pričom cez suboptimálne podmienky je dosiahnutie trombínovej aktivity k enzymatickej premene fibrinogénu. O niečo znížená aktivita trombínu má dokonca tú výhodu, že doby zrážania nie sú príliš krátke a sú ľahko zaznamenateľné.

Pri použití trombínu, protrombínových fragmentov s "trombin like activity" alebo ich zmesí bolo zistené, že trombínová aktivita v uvedenom rozsahu pH, výhodne pri pH 5 až 7 alebo najvýhodnejšie pri pH asi 6, je optimálna pri stanovení fibrinogénu nezávisle v inhibítoroch trombínu.

Enzymatická premena fibrinogénu sa výhodne vykonáva v pufre s molaritou tlmiačich solí v rozsahu 0,02 až 0,5 M, najvýhodnejšie s puftrom 0,1 až 0,25 M. Iónová sila sa poprípade môže zvýšiť prídavkom solí, ako je chlorid sodný. Bolo zistené, že trombit je predovšetkým pri nízkych iónových silách necitlivý voči AT III-inhibícii. Pre vykonanie spôsobu podľa vynálezu je ale tiež použiteľné prostredie s puftrovacou kapacitou v porovnaní s plazmovou vzorkou rovnakou alebo vyššou, aby sa zachovalo určené pH v priebehu spôsobu stanovenia.

Výhodne sa vykonáva stanovenie fibrinogénu z neriedeného a poprípade tiež heparín obsahujúcej vzorky plazmy, v ktorom je tiež prítomný v neutralizovanej forme.

Vynález sa týka tiež činidla pre stanovenie obsahu fibrinogénu v širokom rozsahu nezávislého na inhibítoroch trombínu vzorky poprípade zriedenej a poprípade tiež heparín obsahujúcej plazmy obsahujúcej trombínu, protrombínové fragmenty s trombin like activity" alebo ich zmesi pre enzymatickú premenu fibrinogénu v pufre o pH v rozsahu 4 až 7,3 a potom pre detekciu vzniknutého fibrínu stanovenia doby zrážania, napr. štiepných produktov fibrinogénu. Činidlo slúži k jednoduchému stanoveniu fibrinogénu, bez zdĺhavého riedenia vzoriek plazmy alebo neutralizácie napr. odstraňovania heparínu zo vzoriek plazmy.

Vynález bude bližšie vysvetlený nasledujúcimi príkladmi.

Príklady uskutočnenia vynálezu.

Stanovenie fibrinogénu pri pH 6 a pH 8:

Pre porovnanie sa použijú meizotrombín a trombín pri pH 6 a pH 8 a stanoví sa doba zrážania v závislosti na obsahu fibrinogénu vo vzorkách plazmy. Meizotrombín sa pripraví aktiváciou ľudského protrombínu imobilizovaným ekarínom (fa.Pentapharm) postupom podľa Srockera a Mullera (Thromb.Haemostasis 65 (6) , abstrakt 855 (1991)). Vzorky, obsahujúce plazmu s rôznym obsahom fibrinogénu boli pripravené pre testovanie.

50 /ul vzorky plazmy boli zmiešané s 100/ul pufru (0,2 M Tris HCl-pufr, pH 8 alebo 0,2M fosfátový pufr, pH 6) a 150/ul meizotrombínu (15 NIH-analog j./ml) alebo trombínu (10 NIH j./ml) Trombin Reagent, fa.Immuno) a pri 37°C sa stanoví doba zrážania Schnitger-Gross-Koagulometrom (Fa.Amelung). Stanovenie sa vykonáva ako za neprítomnosti tak za prítomnosti heparínu (1 j./ml).

Z tabuliek je zrejmé, že priebeh kriviek vzťahu pre fibrinogén je pri pH 6 nezávislý na obsahu heparínu vo vzorke. Obsahom heparínu vo vzorke sa však doby zrážania pri pH 8 predĺžia, a to ako pre meizotrombín, taktiež pre trombín ako zrážajúci enzým.

Meizotrombín

obsah fibrinogénu (mg/ml)	pH 8		pH 6	
	bez hep.	s hep.	bez hep.	s hep.
310	8,0	10,6	30,4	30,1
238	11,1	15,1	50,7	49,1
94	26,0	35,5	166,4	157,5
62,5	35,6	250	250	250

Trombín

obsah fibrinogénu (mg/ml)	pH 8		pH 6	
	bez hep.	s hep.	bez hep.	s hep.
373	11,6	200	18,6	17,3
310	16,1	200	24,1	24,1
238	25,6	200	28,4	30,1
100	50,0	200	85,9	89,8

P A T E N T O V E N Á R O K Y

1. Spôsob stanovenia fibrinogénu v širokom rozsahu nezávislý na inhibítoroch trombínu enzymatickou premenou trombínom, protrombínovými fragmentami s "trombin like activity" alebo ich zmesami a potom detekciou vzniknutého fibrínu poprípade štiepných produktov fibrinogénu, vyznačujúci sa tým, že sa enzymatická premena fibrinogénu vykonáva pri pH v rozsahu 4 až 7,3 a detekcia fibrínu sa vykonáva stanovením doby zrážania napr. štiepných produktov fibrinogénu.

2. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že sa enzymatická premena fibrinogénu vykonáva v pufre s molaritou tlmiacich solí v rozsahu od 0,02 do 0,5 M, výhodne 0,1 až 0,25 M, ako i po zvýšení iónovej sily prídavkom solí, ako je NaCl.

3. Spôsob podľa nároku 1, vyznačujúci sa tým, že sa stanovenie fibrinogénu vykonáva zo zriedenej a poprípade tiež heparín obsahujúcej vzorky plazmy.

4. Činidlo pre stanovenie obsahu fibrinogénu široko nezávislého na inhibítoroch trombínu v poprípade nezriedenej a napríklad tiež heparín obsahujúcej vzorke plazmy, obsahujúcej trombín, protrombínové fragmenty s "trombin like activity" alebo ich zmesi pre enzymatickú premenu fibrinogénu a potom pre detekciu vzniknutého fibrínu pomocou doby zrážania napr. štiepných produktov fibrinogénu v pufre o pH v rozpätí 4 až 7,3.