

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET  
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 152313 B



(51) Int.Cl.<sup>4</sup> G 01 N 33/532

(21) Patentansøgning nr.: 1147/78

(22) Indleveringsdag: 14 mar 1978

(41) Alm. tilgængelig: 16 sep 1978

(44) Fremlagt: 15 feb 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 15 mar 1977 GB 10859/77

(71) Ansøger: F. \*HOFFMANN-LA ROCHE & CO. AKTIENGESELLSCHAFT; Grenzacherstrasse 124 - 184; Postfach; CH-4002 Basel, CH

(72) Opfinder: Douglas E. \*Hawley; AU, Peter G. \*Tonkes; AU

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) **Reagens til bestemmelse af et immunologisk aktivt materiale**

(56) Fremdragne publikationer

DE freml. skrift nr. 2518511  
Andre Publikationer. Carrico, R.J. et al, Analytical Biochemistry 72 (1976) s. 271-282.  
Rubinstein, K.E. et al, Biochem and Biophys, Res. Comm. 47 (4) (1972) s. 846-851

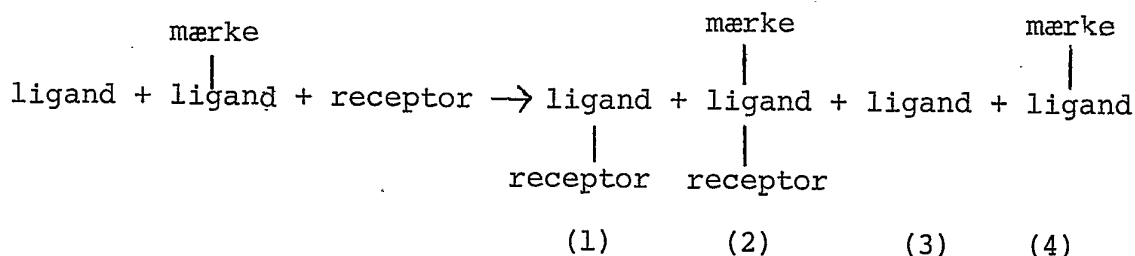
DK 152313 B

Den foreliggende opfindelse angår et reagens til bestemmelse af et immunologisk aktivt materiale, hvilket reagens består af en receptor, som specifikt binder det immunologisk aktive materiale, et enzym, et enzymsubstrat og det immunologisk aktive materiale, der er mærket med en forbindelse, som er i stand til at modificere aktiviteten af enzymet.

Der er i de sidste år udviklet mange analytiske systemer, som bygger på konkurrerende proteinbindingsanalyse (også kaldet mætningsanalyse).

Udtrykkene "mætningsanalyse" og "konkurrerende proteinbindingsanalyse", som er synonyme, dækker analytiske systemer, som anvendes til bestemmelse af immunologisk aktive materialer (ligander). Resultaterne af disse bestemmelser, udført i biologiske væsker, anvendes til medicinske og veterinære diagnoser. Diagnosen er afhængig af, om niveauet af

den bestemte substans er normalt eller patologisk. Det analytiske princip bygger f.eks. på en konkurrence mellem en ligand og en mærket ligand om et fælles specifikt bindemiddel (receptor), som det belyses ved nedenstående ligning:



ligning 1

Den primære reaktion er en kombination af 1 molekyle ligand med 1 molekyle receptor til dannelse af et bimolekylært ligand/receptor-complex (1). En anden reaktion affødes af tilsætningen af mærket ligand, som på lignende måde kombineres med receptoren til dannelse af mærket ligand/receptor-complex (2). I mætningsanalyse er koncentrationerne af receptoren og af den mærkede ligand konstante. Koncentrationen af receptor er begrænset, så at den mærkede ligand er i overskud i forhold til receptoren. Under disse betingelser forårsager tilsætningen af ligand en konkurrence mellem ligand og mærket ligand om binding med receptoren. En forøgelse af ligandkoncentrationen vil derfor formindske mængden af mærket ligand/receptor-complex. Forsøgsprincippet bygger på en bestemmelse af den procentdel af den totale mærkede ligandmængde, som er bundet til receptoren. Denne procentdel er omvendt proportional med den mængde ligand, der sættes til reaktionsblandingen fra den prøve, som skal måles, eller fra den standard, som anvendes under forsøget. Reduktionen af koncentrationen af mærket ligand/receptor-complex eller forøgelsen af koncentrationen af mærket ligand i reaktionsblandingen kan anvendes til at bestemme ligandkoncentrationen.

Følsomheden af mætningsanalyse afhænger af anvendelsen af en receptor, som har en meget høj affinitet til liganden og den mærkede ligand. Desuden afhænger følsomheden også af anvendelsen af et mærke, som kan påvises i meget lav koncentration.

Mætningsanalysens specificitet afhænger af receptorens evne til kun at binde ligand og mærket ligand i en complex blanding af forskellige molekyler.

Mætningsanalyse har været anvendt i en række forskellige teknikker, hvis forskel primært hidrører fra den anvendte type mærke. Sædvanligvis klassificeres disse teknikker ved de brede benævnelser "radioforsøg" eller "ikke-radioforsøg" afhængigt af, om der anvendes et radioaktivt sporstof som mærke.

Radioforsøg er anvendt i større udstrækning end ikke-radioforsøg. Radioforsøg kan yderligere klassificeres som radioimmunoforsøg eller radio-receptorforsøg afhængigt af den type receptor, som anvendes ved forsøget. I radioimmunoforsøg anvendes et antistof, som specifikt binder liganden og den mærkede ligand. Ved radio-receptoranalyse anvendes derimod en anden type biologisk receptor, som på lignende måde specifikt binder liganden og den mærkede ligand.

Ved alle radioforsøgsteknikker er det vigtigt fysisk at adskille den bundne fraktion (1 og 2 i ligning 1) fra den ubundne fraktion (3 og 4 i ligning 1) i reaktionsblandingen. Et indeks for ligandkoncentrationen kan derpå fås ved at tælle disse fraktioner i en radioaktivitetstæller og sammenligne tællingerne for de ukendte prøver med tællinger for hensigtsmæssige standardligandprøver testet ved samme forsøg. Der er beskrevet mange forskellige og afvigende metoder til adskillelse af de bundne og fri fraktioner i radioforsøgsreaktionsblandingen under anvendelse af teknikker som f.eks. gelfiltrering, absorptions- og ionbytterchromatografi, fraktioneret udfældning, fastfase eller elektroforese.

Efter udviklingen af radioforsøgsteknikker i mætningsanalyse er der udviklet metoder, som anvender ikke-radioaktive mærker. Der er demonstreret metoder, som anvender enzymer som mærke. Disse metoder kan have den fordel, at en fysisk adskillelse af de bundne (1 + 2) og fri (3 + 4) fraktioner af mærket ligand ikke er nødvendig ved forsøgsproceduren hvis enzymaktiviteten ændres, når et antistof

binder en ligand, som er mærket med et enzym. Graden i ændringen af enzymets aktivitet er indikation for den mærkede ligands koncentration i den bundne fraktion og giver derfor et indeks for ligandkoncentrationen i reaktionsblandingen.

Den kemiske struktur af ligand-enzym-complexet er yderst svært at bestemme, og dette er hovedulempen ved enzymimmunoforsøg. Dette skyldes uden tvivl den store mængde aminosyresidekæder, som er til stede på enzymoverfladen til complexdannelse med liganden. Dette bevirker store problemer ved reproduktionen af ligand-enzymet ved forskellige præparater af complexet. Den generelle mangel på styring af den complexdannende reaktion resulterer i binding af mange ligandmolekyler til ét enzymmolekyle, selv om det er sandsynligt, at bindingen af kun nogle få af disse ligandmolekyler til antistoffet er involveret i inhiberingen af enzymaktiviteten. Derfor resulterer ikke alle antistof/mærket antigen-interaktioner i en modificering af enzymaktiviteten, og derved reduceres teknikkens følsomhed.

Protein-protein-vekselvirkning mellem forskellige antistofmolekyler og antistof- og enzymmolekyler er en anden følge af mængden af ligandmolekyler på enzymoverfladen. Protein-protein-vekselvirkningen forøges yderligere, hvis liganden også er et polypeptid. Enzymmolekylet inducerer derfor et lokaliseret mikro-område med høj protein-koncentration. I sådanne situationer er det påvist, at der sker proteinudfældning, hvilket forårsager, at én af hovedfordelene ved enzymimmunoforsøg går tabt, idet det bliver nødvendigt at adskille antistofbundne og frie fraktioner.

Der er beskrevet en modifikation af enzymimmunoforsøget, ved hvilket disse problemer delvis løses, idet liganden mærkes med et detektormolekyle, som har lav molekylvægt. I dette forsøg bevirker antistofbindingen af mærket ligand sterisk hindring af binding af detektormolekylet til et andet antistof, som er specifikt for detektormolekylet. Hindringsgraden bestemmes af konkurrence om binding af det fri ligand-detektormolekyle og detektormolekylmærket enzym med detektormolekyle-antistof. Graden af ændringen af enzymaktiviteten,

som bestemmes ved normalt enzymimmuno-forsøg, er indikation for koncentrationen af det fri ligand-detektormolekyle, som ligeledes er indikation for ligandkoncentrationen i reaktionsblandingen. Fordelen ved denne teknik er, at et lille molekyle snarere end et enzym bindes til liganden og derved tillader en bestemmelse af den mærkede ligands kemiske struktur, hvorved mange af de ovenfor beskrevne ulemper ved enzymimmuno-forsøget overvindes. Ved dette system overvindes imidlertid kun ulemperne ved den primære bindingsreaktion, som involverer liganden og den mærkede ligand, og de overføres til detektorsystemet, hvor graden af antistofbundne og antistoffri fraktioner af mærket ligand bestemmes.

Ulemperne ved de hidtil kendte fremgangsmåder overvindes ved den foreliggende opfindelse, ifølge hvilken der anvendes en enzym-modifikator som mærke.

Nærmere bestemt angår den foreliggende opfindelse et reagens af den indledningsvis beskrevne art, hvilket reagens er ejendommeligt ved, at det mærkede immunologiske materiale er et antigen-enzyminhibitor- eller antigen-enzymaktivator-complex.

Udtrykket "immunologisk aktivt materiale" eller "ligand" betegner her ethvert immunologisk aktivt stof eller en del deraf, som kan bestemmes immunologisk, f.eks. under anvendelse af mætningsanalyseteknik. Det væsentlige krav er, at der er en receptor, som specifikt kan binde liganden. Når receptoren er et antistof, er liganden haptentisk eller antigenisk, så at der kan dannes specifikt antistof. En ligand betegnes som en haptent, når den kun udløser antistofdannelse, når den bindes til en forbindelse med antigen-egenskaber. En ligand betegnes alternativt som antigen, når den udløser antistofdannelse uden kemisk modifikation. Ligandens molekylvægt kan variere i et bredt område fra ca. 100 til ca. 1.000.000. Dette molekylvægtsområde er ikke begrænsende for forsøget, forudsat at der findes en receptor, som specifikt kan binde liganden.

Liganden kan have polymer- eller ikke-polymerstruktur. Når liganden har polymerstruktur, har den sædvanligvis biologisk oprindelse og kan klassificeres som en nucleinsyre, et polysaccharid og/eller polypeptid. Når liganden på den anden side er ikke-polymer, har den sædvanligvis en molekylvægt på mindre end 2.000 og kan have en lang række forskellige strukturer, funktionelle egenskaber og fysiologiske egenskaber.

Særligt vigtige ligander, som kan anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, er aminer, aminosyrer, peptider, proteiner, lipoproteiner, glycoproteiner, steroler, steroider, lipoider, nucleinsyrer, mono- og polysaccharider, alkaloider, vitaminer, medikamenter, narkotika, antibiotika, metaboliter, pesticider, toxiner, industrielle forurenende stoffer, aromastoffer, hormoner, enzymer, co-enzymmer, cellulære eller ekstracellulære vævsbestanddele og antistoffer isoleret fra mennesker eller dyr.

Umiddelbart potentielle bestanddele til analyse med det foreliggende system er hepatitis B-overfladeantigen, ferritin, tumorantigener såsom CEA,  $\alpha$ -fetoproteiner, rheumatoidfaktor, C-reaktive proteiner, immunoglobulinklasserne IgG, IgM eller IgA, myoglobin, thyroindhormoner omfattende  $T_3$  og  $T_4$ , insulin, steroidhormoner omfattende testosteron eller estradiol, vanedannende medikamenter, herunder narkotiske analgetika såsom morphin, barbiturater, stimulanter såsom amfetamin, medikamenter til behandling af epilepsi herunder diphenylhydantoin og phenobarbital, cardialglyocyter såsom digoxin, vitaminer såsom vitamin  $B_{12}$  og folinsyre. Endvidere er antistoffer, som er umiddelbart potentielle til analyse med systemet, sådanne, som er forbundet med infektioner ved syfilis, gonorrhoe, brucellosis, rubella og rheumatisme.

Udtrykket "mærket immunologisk aktivt materiale" eller "mærket receptor" betegner her en ligand, en ligandanalogue eller en del deraf eller en receptor, som er mærket med en enzymmodifikator. Ét, mere end ét og sædvanligvis mindre end 100 mærkemolekyler kan bindes til et ligand- eller receptormolekyle. Ligeledes kan ét, mere end ét og sædvanligvis mindre end 5 ligand- eller receptormolekyler bindes til et mærkemolekyle. Bindingen af ekstra mærkemolekyler til et ligand- eller receptormolekyle forøger sædvanligvis forsøgets følsomhed, forudsat at de ekstra mærker ikke påvirker binding.

Binding af et modifikatormolekyle til et ligand- eller receptormolekyle medfører dannelse af intermolekylære bindinger, som i de fleste tilfælde, men ikke nødvendigvis, er af covalent art. Bindingen kan i nogle tilfælde gennemføres i nærværelse af et koblingsmiddel ved indsættelse af en kædegruppe mellem mærket og liganden eller receptoren.

Modifikatormolekylet kan bindes direkte til liganden eller receptormolekylet. Det kan imidlertid være ønskeligt at indsætte kemiske broer af forskellig længde mellem modifikatormolekylet og ligand- eller receptormolekylerne afhængigt af det tilsigtede specifikke forsøg. I nogle tilfælde kan det endog være fordelagtigt at binde modifikatormolekylet og ligand- eller receptormolekylerne separat til samme bærermolekyle, f.eks. et makromolekyle såsom et polypeptid eller et polysaccharid.

Udtrykket "receptor" betegner her enhver substans, som specifikt kan binde ligand og mærket ligand eller en del deraf. Sædvanligvis er den i forsøget anvendte receptor et specifikt antistof for den ligand, som er dannet i blodet hos hvirveldyr efter injektion af en hensigtsmæssigt haptent eller et hensigtsmæssigt antigen. Der kan også anvendes naturligt forekommende receptorer i forsøget. Denne sidstnævnte gruppe omfatter proteiner, nucleinsyrer og cellulære membraner. Sådanne receptorer har været anvendt i radioforsøgsteknikker for thyroxin, insulin, angiotensin og forskellige steroidhormoner.

Når liganden er et antistof, kan receptoren være det antigen, som anvendes til at inducere dette antistof i et værtsdyr. Ved en anden udførelsesform kan receptoren være et antistof mod det antistof, som skal bestemmes.

Det er ikke muligt med sikkerhed at bestemme den receptorvirkningsmåde, som, ved binding af den mærkede ligand, reducerer vekselvirkningen mellem enzym og modifikator. Den mest sandsynlige forklaring er, at enzymets affinitet til modifikatoren reduceres som et resultat af en ændring i størrelse og nettoladning af receptor/ligand-modifikatorcomplexet i sammenligning med værdierne for ligand-modifikator alene.

Udtrykket "modifikator" betegner her en hvilken som helst substans, som er i stand til at vekselvirke med et enzym, så at enzymaktivitetsgraden og -måden modificeres. Denne modifikation kan resultere i en inhibering, aktivering eller ændring i specificitet eller en hvilken som helst anden af enzymets egenskaber, som kan detekte-

res enten direkte eller indirekte ved en ændring i enzymaktiviteten eller i aktivitetsmåden, f.eks. en ændring i reaktionsbetingelserne, f.eks. co-faktorkrav eller pH-værdi-optimum, i kinetiske egenskaber eller i aktiveringsenergi. Modifikatoren kan i størrelse variere fra et lille molekyle til et makromolekyle, og dets vekselvirkning med et enzymmolekyle kan enten være reversibel eller irreversibel afhængig af, om den inter-molekylære binding er ionisk eller covalent.

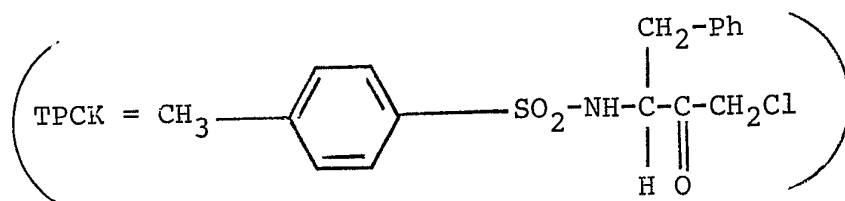
Forsøgets følsomhed er bl.a. afhængig af receptorens affinitet til liganden og modifikatorens evne til at forårsage en ændring i enzymaktivitetsgraden eller -måden. Fortrinsvis opnås ændringen i enzymaktivitetsgraden eller -måden med en minimal modifikatorkoncentration. Jo nærmere denne koncentration ligger til enzymkoncentrationen på molekylar basis, jo større vil forsøgets følsomhed være.

Modifikatoren er fortrinsvis en enzyminhibitor, som, ved vekselvirkning med enzymet, inhiberer dets aktivitet. Inhibitorens virkemåde kan være konkurrerende, ikke-konkurrerende, allosterisk eller en kombination af to eller flere af disse måder. Inhibitoren bør fortrinsvis have en inhiberingskonstant (den inhibitor-koncentration, som er nødvendig til 50%'s inhibering af enzymsystemet) på under  $10^{-3}$  mol/liter, afhængigt af det udførte forsøg. Inhiberingskonstanten ligger særligt foretrukket mellem  $10^{-15}$  og  $10^{-5}$ .

Et hvilket som helst enzym kan anvendes i forsøget, forudsat at der eksisterer en modifikator, som specifikt modificerer enzymaktiviteten på den ovenfor beskrevne måde. Foretrukne enzymer er stabile, let tilgængelige til lav pris og har et højt omsætningstal og et simpelt udførligt forsøgssystem. Omsætningstallet (antal produktmolekyler dannet pr. enzymmolekyle på 1 minut) ligger fortrinsvis over 100 afhængigt af den specifikke test. Mere foretrukket er omsætningstallet så højt som muligt og mindst 200.

Enzymmodifikatorsystemer, som er særligt egnede ved den foreliggende opfindelse, er dihydrofolatreduktase/methotrexat, dihydrofolatreduk-

tase/4-aminopterin, dihydrofolatreduktase/andre specifikke inhibitorer af dette enzym;  $\beta$ -glucoronidase/4-deoxy-5-aminoglucarsyre og derivater deraf; biotin indeholdende enzymer/avidinlignende carboxylase/avidin; chymotrypsin/TPCK



$\gamma$ -cystathionase/propargylglycin; alaninracemase/trifluoralanin; tryptophanase/trifluoralanin; tryptophansynthetase/trifluoralanin;  $\beta$ -cystathionase/trifluoralanin; pyrovat-glutamattransaminase/trifluoralanin; mælkesyreoxidase/2-hydroxy-but-3-yn-syre; monoaminoxidase/N,N-dimethylpropargylamin og diaminoxidase/ $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CCH}_2-\text{NH}_2$ .

Enzymaktivitetsbestemmelsen kan udføres ved direkte eller indirekte at overvåge substratkonsumtionen eller produkt dannelsen ved en egnet pH-værdi og temperatur under anvendelse af et detektorsystem, f.eks. colorimetri, spektrofotometri, fluorospektrofotometri, gaseometri, termometri (varmeproduktion) eller scintillations-tælling.

For at forøge systemets følsomhed er det muligt at anvende bioluminescens og enzymcyklus-teknikker, f.eks. de teknikker, som er beskrevet af J. Lee et al. i Liquid Scintillation Counting: Recent Developments, Stanley P.E. og Scoggins, B.A., Academic Press, New York, side 403 og Lowry O.H. et al. i J. Biol. Chem. 236, side 2746 - 2755.

Ved en særlig udførelsesform af den foreliggende opfindelse kan der anvendes en mærket ligand til bestemmelse af tilstedeværelsen af en ligand i en ukendt prøve ved simultan eller sekventiel tilsætning ved en hensigtsmæssig pH-værdi af den mærkede ligand og den ukendte prøve til et vandigt medium, som indeholder en receptor, som er specifik for liganden og den mærkede ligand. Efter en passende inkubationsperiode bestemmes fordelingen af receptor bundet til ligand og mærket ligand ved tilsætning af enzym og substrater. Den receptor, som er specifik for liganden,

binder også den mærkede ligand, og derved reduceres vekselvirkningen mellem modifikatoren og enzymet, så at modificeringen af enzymaktiviteten formindskes. Tilsætning af ligand i forsøget resulterer i en konkurrence med den mærkede ligand om binding til receptoren, og derved forøges koncentrationen af fri mærket ligand i forsøget. Vekselvirkningen mellem ligand-modifikator og enzym forøges, og enzymaktiviteten påvirkes atter. Modificeringen af enzymaktiviteten er derfor en funktion af ligandkoncentrationen i forsøget og forårsages af ubundet mærket ligand. Derfor er forskellen mellem den resulterende enzymaktivitet og den aktivitet, der fås i fraværelse af ligand, indikativ for ligandkoncentrationen i den ukendte prøve.

En af hovedfordelene ved denne fremgangsmåde er, at adskillelse af bundne og fri fraktioner er unødvendig ved fremgangsmåden. Dette udelukker imidlertid ikke anvendelsen af et sådant separationstrin i forsøget efter inkubering af liganden og mærket ligand med receptoren før enzymaktivitetsbestemmelsen. Adskillelse af fraktioner kan være ønskelig i nogle tilfælde til fjernelse af stoffer i prøven, som kan forstyrre enzymforsøget. Separationen kan udføres under anvendelse af en hvilken som helst af de teknikker, som er beskrevet ved radioimmunoforsøget, herunder gelfiltrering, adsorptions- og ionbytterchromatografi, fraktioneret udfældning, fastfase og elektroforese.

Den foreliggende opfindelse belyses nærmere ved følgende eksempler.

Eksempel 1.

Fremstilling af "amino-digoxin".

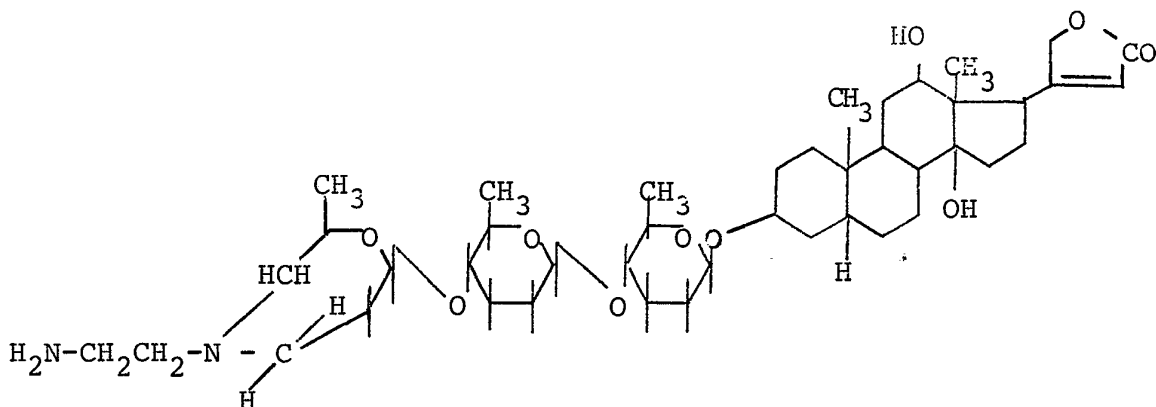
Til en suspension af 156 mg (0,2 millimol) digoxin i 5 ml absolut ethanol sættes under omrøring 10 ml 0,2M natriummetaperiodat. Blandingen bliver homogen efter 10 minutter, og derpå dannes langsomt et bundfald. Efter 2 timer tilsættes 5 ml vand + 5 ml ethanol. Efter yderligere 30 minutter tilsættes 122  $\mu$ l (2,2 millimol) ethylenglycol, og der begynder straks at udfældes et tæt hvidt bundfald. Efter 80 minutters omrøring tilsættes

133,4 ml (2,0 millimol) ethylendiamin, og den resulterende pH-værdi på 11,0 indstilles til 9,5 med 0,1M saltsyre, og reaktionsblandingen lades henstå ved stuetemperatur i 18 timer. pH-Værdien ændres ikke i denne periode.

151,4 mg (4,0 millimol) natriumborhydrid tilsættes derpå, og blandingen omrøres i 3 1/2 time. pH-Værdien indstilles derpå fra 10,5 til 6,5 med 1M myresyre (ca. 3 ml), og tyndtlagschromatografi på denne blanding viste en enkelt stor plet med en  $R_f$ -værdi på 0,15 (siliciumdioxid på aluminium fremkaldt i butanol:eddikesyre:vand (4:1:1)). Digoxin har en  $R_f$ -værdi på 0,7, når det fremkaldes i samme system.

Opløsningsmidlerne afdampes til næsten tørhed på en rotationsfordamper under vakuum med en vandbadtemperatur på 60°C. De sidste få ml vand fjernes ved at tilsætte 95% ethanol (3 x 20 ml) og at gentage inddampningen som ovenfor.

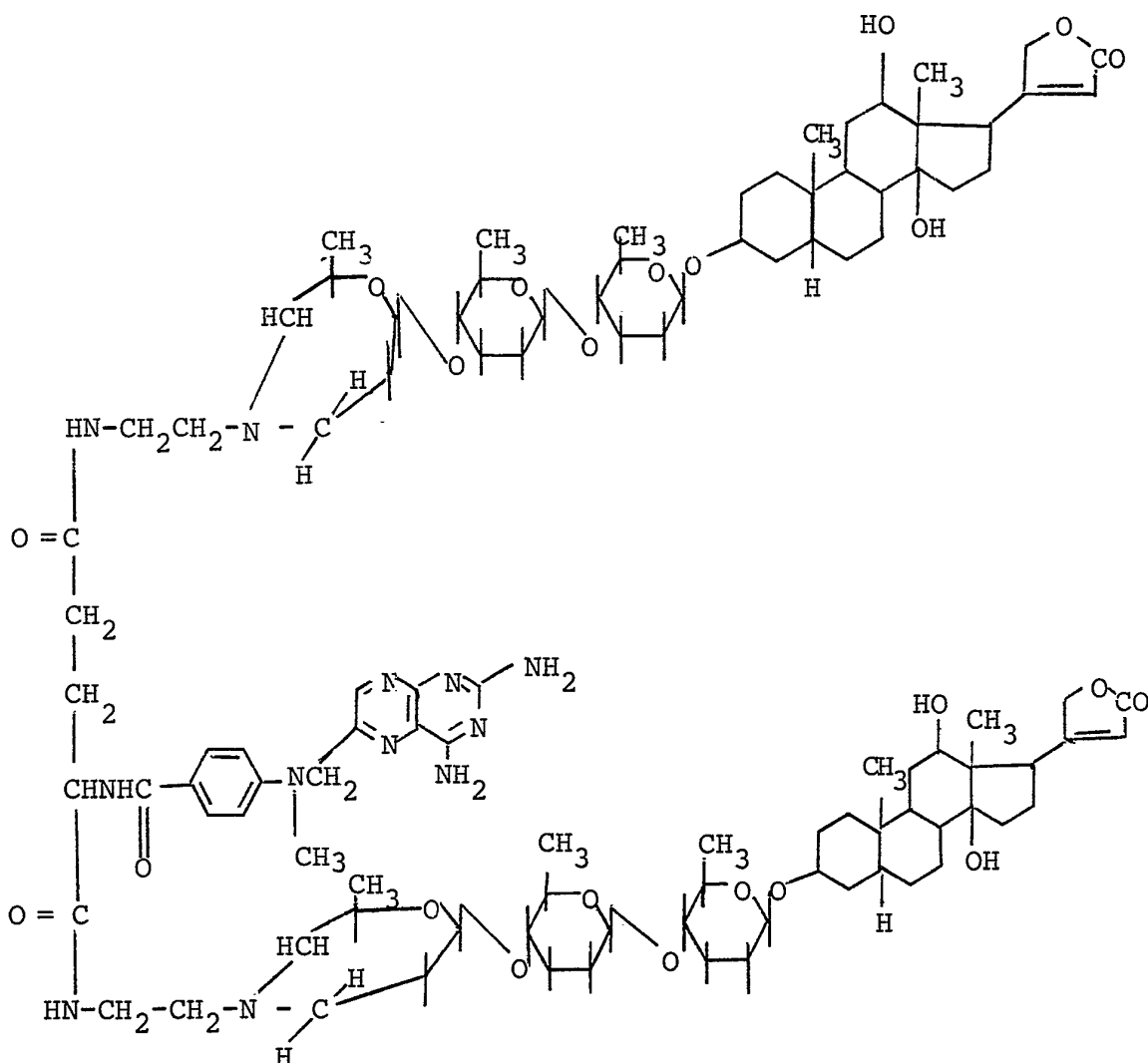
Det resulterende bleggule faste stof ekstraheres tre gange med absolut ethanol, og disse forenede ekstrakter inddampes til ca. 4 ml og centrifugeres til fraskillelse af en lille mængde salt, som kasseres. Den bleggule supernatantopløsning inddampes til tørhed under en strøm af tørt nitrogen, hvorved fås en gul olie, som har samme  $R_f$ -værdi ved tyndtlagschromatografi som den ovenfor beskrevne reaktionsblanding. Det vises, at produktet indeholder en fri aminogruppe ved at omsætte det med Fluram<sup>®</sup> (4-phenylspiro[fluran-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion) til dannelselse af en intensivt fluorescerende forbindelse. Dette produkt har i koncentreret svovlsyre et spektrum, som ligner digoxins med absorptionstoppe ved 385 og 495 nm. Produktet udviser også stærk affinitet til antisera (kanin), som er specifikke for digoxin. Den mest sandsynlige struktur for det isolerede produkt er den nedenstående:



## Eksempel 2.

## Fremstilling af methotrexat-aminodigoxin-konjuat.

11 mg methotrexat opløses i 5 ml vand, og pH-værdien indstilles til 6,5. 10 mg "aminodigoxin" opløses i denne opløsning, og volumenet indstilles til 20 ml med vand. pH-Værdien indstilles atter til 6,5, og til reaktionsblandingen sættes 484 mg N-ethyl-N''-(3-dimethyl-amino)-propylcarbodiimid-hydrochlorid opløst i 5 ml vand. pH-Værdien holdes på 6,2 i 24 timer ved stuetemperatur. Konjugatet renses på en silicagelkolonne under anvendelse af 3%'s ammoniumcitrat som opløsningsmiddel. Fraktioner, som indeholder det ønskede produkt, forenes og vises at have den dobbelte kapacitet til stærkt at binde antisera (kanin), som er specifikke for digoxin, og også til stærkt at inhibere enzymet dihydrofolatreduktase (kyllingelever). Den mest sandsynlige struktur for methotrexat-aminodigoxin-konjugatet er den nedenstående:



## Eksempel 3.

## Enzyminhibitorimmunoforsøg for digoxin.

100  $\mu$ l serum inkuberes ved 30°C i 15 minutter sammen med 100  $\mu$ l anti-digoxin-antistofopløsning, 100  $\mu$ l NADPH-opløsning, 100  $\mu$ l 2-mercaptoethanolopløsning og 500  $\mu$ l natriumphosphatpuffer med pH-værdi 7,5. 100  $\mu$ l methotrexat-digoxin-konjugat fra eksempel 2 (70  $\mu$ g/ml) tilsættes, og blandingen inkuberes i 15 minutter, hvorefter der tilsættes 100  $\mu$ l dihydrofolat-reduktaseopløsning. Det anvendte dihydrofolatreduktasepræparat isoleres fra kyllingelever ved fremgangsmåden ifølge Kaufman, B.T., & Gardiner, R.C., Journal of Biological Chemistry, bind 211, side 1319 (1966). Blandingen inkuberes i yderligere 3 minutter, og enzymaktiviteten bestemmes ved tilsætning af 100  $\mu$ l dihydrofolatopløsning og måling ved 340 nm med et Varian® spektrofotometer med skriver. Resultaterne er anført i tabel I.

Tabel I.

Reaktanter				Enzymaktivitet	
Digoxin (prøvekon- centration)	Antidigoxin- -antistof	Methotrexat- -digoxin-kon- jugat (i for- søg)	Enzym- -for- søgs- kompo- nenter	OD/min	Inhibering i %
0	fraværende	0	til stede	0,150	0
0	fraværende	7 ng	til stede	0,100	33
0	til stede	7 ng	til stede	0,145	3
5 ng/ml	til stede	7 ng	til stede	0,125	16
10 ng/ml	til stede	7 ng	til stede	0,115	23

Reaktanterne tilsættes i den ovenfor anførte rækkefølge.

OD = optisk densitet.

Af ovenstående resultater fremgår det, at nogle få nanogram digoxin i serum kan bestemmes ved det beskrevne system.

#### Eksempel 4.

Fremstilling af methotrexat-humant serumalbumin-konjugat.

45 mg methotrexat opløses i 1,0 ml N,N-dimethylformamid, og der tilsættes 25 mg N-hydroxysuccinimid. 41 mg N,N-dicyclohexylcarbodiimid opløses, og blandingen holdes ved stuetemperatur i 13 timer. Det som biprodukt fremkomne uopløselige urinstof frafiltreres, og 100  $\mu$ l af filtratet sættes til en opløsning, som indeholder 5 mg humant serumalbumin i 800  $\mu$ l 0,1M natriumphosphatpuffer med pH-værdi 7,5 plus 100  $\mu$ l dioxan. Reaktionsblandingen holdes ved stuetemperatur i 30 minutter og hældes derpå på en Sephadex G-25-kolonne, som er ækvilibreret med 0,1M natriumphosphatpuffer med pH-værdi 7,5. Kolonnen elueres med denne puffer, og der fås to elueringstoppe, som indeholder methotrexat, og den første indeholder methotrexat-humant serumalbumin-konjugatet.

#### Eksempel 5.

Enzyminhibitor-immunoforsøg for humant serumalbumin.

100  $\mu$ l fortyndet serum inkuberes ved 30°C i 15 minutter sammen med 100  $\mu$ l antihuman serumalbuminantistofopløsning (kanin), 100  $\mu$ l NADPH-opløsning, 100  $\mu$ l 2-mercaptoethanol-opløsning og 550  $\mu$ l natriumphosphatpuffer med pH-værdi 7,5. Derpå tilsættes 100  $\mu$ l methotrexat-humant serumalbumin-konjugat (8  $\mu$ g/ml), og blandingen inkuberes i 15 minutter, hvorefter der tilsættes 100  $\mu$ l dihydrofolatreduktaseopløsning. Blandingen inkuberes i yderligere 3 minutter, og enzymaktiviteten bestemmes ved tilsætning af 100  $\mu$ l dihydrofolatopløsning og måling ved 340 nm med et Varian® spektrofotometer med skriver. Resultaterne er anført i tabel II.

Reaktanter				Enzymaktivitet	
Humant serumalbumin (prøvekoncentration)	Antihumant serumalbumin-antistof	Methotrexat-humant serumalbumin-konjugat (i forsøg)	Enzym-forsøgs-komponenter	OD/min	Inhibering i %
0	fraværende	0	til stede	0,123	0
0	fraværende	0,8 µg	til stede	0,068	45
0	til stede	0,8 µg	til stede	0,105	16
5 µg/ml	til stede	0,8 µg	til stede	0,092	25
10 µg/ml	til stede	0,8 µg	til stede	0,085	31

Det fremgår af de ovennævnte resultater, at nogle få µg humant serumalbumin kan bestemmes i det beskrevne system.

Eksempel 6.

Syntese af methotrexat-aminoethylmorphin-konjugat.

a) Syntese af  $O^3$ -aminoethylmorphin.

400 mg lithiumaluminiumhydrid suspenderes under nitrogenatmosfære i 10 ml tetrahydrofuran, som er frisk destilleret fra lithiumaluminiumhydrid. I løbet af 5 minutter tilsættes en opløsning af 400 mg morphin og 400 mg chloracetonitril i 4 ml frisk destilleret tetrahydrofuran, hvorefter der tilbagesvales i 1 time. Blandingen lades afkøle, og der tilsættes 0,6 ml vand efterfulgt af 0,6 ml 10 vægtprocent natriumhydroxidopløsning og 2 ml vand. Blandingen filtreres, og saltene vaskes med tetrahydrofuran, tetrahydrofuranfraktionerne kombineres, tørres med magnesiumsulfat under nitrogen og filtreres, og filtratet inddampes, hvorved fås 380 mg  $O^3$ -aminoethylmorphin.

b) Syntese af N-tert.butoxycarbonyl- $\gamma$ -(O<sup>3</sup>-aminoethylmorphin)glutaminsyre- $\alpha$ -benzylester.

En blanding af 50 mg O<sup>3</sup>-aminoethylmorphin (fremstillet som ovenfor), 34 mg N-tert.butoxycarbonyl-glutaminsyre- $\alpha$ -benzylester og 25 mg dicyclohexylcarbodiimid i 5 ml dichlormethan omrøres i 4 timer ved stuetemperatur. Blandingen fortyndes med ethylacetat og vaskes med fortyndet natriumcarbonatopløsning. Ethylacetatopløsningen ekstraheres derpå to gange med 0,1M saltsyre, og de forenede sure ekstrakter behandles med tilstrækkeligt 10 vægtprocents natriumhydroxidopløsning til indstilling af pH-værdien til 8,0. Opløsningen ekstraheres to gange med ethylacetat, og de forenede ethylacetat-ekstrakter vaskes med natriumchloridopløsning, tørres over vandfri natriumsulfat og inddampes, hvorved fås 36 mg af en farveløs olie.

c) Syntese af glutaminsyre- $\gamma$ -(O<sup>3</sup>-amidoethylmorphin)- $\alpha$ -benzylester-trifluoreddikesyresalt.

En opløsning af 36 mg N-tert.butoxycarbonyl-glutaminsyre-morphinderivat (fremstillet som ovenfor) i 3 ml dichlormethan omrøres ved stuetemperatur, og der tilsættes 1 ml trifluoreddikesyre. Blandingen omrøres i 15 minutter og inddampes derpå til tørhed. Som re-manens fås 40 mg af et farveløst glasagtigt materiale.

d) Syntese af methotrexat- $\gamma$ -(O<sup>3</sup>-amidoethylmorphin)- $\alpha$ -benzylester.

En opløsning af 37 mg 4-amino-4-desoxy-N<sup>10</sup>-methylpteroinsyre i 3 ml dimethylsulfoxid behandles under omrøring ved stuetemperatur med 28  $\mu$ l triethylamin og 25  $\mu$ l isobutylchlorformiat, og blandingen omrøres i 30 minutter. Den sættes derpå til en blanding af 75 mg morphinderivat fremstillet som beskrevet under c) og 28  $\mu$ l triethylamin i 2 ml dimethylsulfoxid, og blandingen omrøres ved 60°C i 1 time. Blandingen afkøles, fortyndes med vand og ekstraheres to gange med ethylacetat. De forenede ethylacetat-ekstrakter vaskes med vand og ekstraheres derpå to gange sammen med 0,1M saltsyre. De forenede sure ekstrakter behandles med tilstrækkeligt 10 vægtprocents natriumhydroxidopløsning til at hæve pH-værdien

til 8,0. Blandingen ekstraheres tre gange med ethylacetat, og de forenede ekstrakter vaskes med natriumchloridopløsning, tørres over vandig natriumsulfat og inddampes, hvorved fås 15 mg af en gul olie. Denne renses ved præparativ tyndtlagschromatografi på silicagel (fremkaldelse med chloroform/methanol (4:1)). Den ønskede forbindelse vindes i form af 4 mg gult fast stof.

e) Syntese af methotrexat- $\gamma$ -(O<sup>3</sup>-amidoethylmorphin).

Produktet fremstillet som beskrevet under d), 4 mg, blandes med 5 ml 0,1M natriumhydroxidopløsning, og blandingen omrøres ved stuetemperatur i 8 timer, hvilket resulterer i en klar gul opløsning.

Til denne sættes 5 ml 0,1M saltsyre, og blandingen fortyndes til 25 ml med 0,05M natriumorthophosphatpuffer med pH-værdi 7,4, og der fås en til enzymforsøget egnet opløsning af den ønskede forbindelse.

Eksempel 7.

Enzyminhibitor-immunoforsøg for morphin.

En blanding af 10  $\mu$ l morphinopløsning med passende koncentration, 50  $\mu$ l methotrexat- $\gamma$ -(O<sup>3</sup>-amidoethylmorphin)-opløsning (4 ng/25 ml), 50  $\mu$ l anti-morphin-antistofopløsning, 10  $\mu$ l NADPH-opløsning, 10  $\mu$ l 2-mercaptoethanolopløsning, 50  $\mu$ l kaliumchloridopløsning, 150  $\mu$ l tris-saltsyrepufferopløsning (pH-værdi 7,5) indeholdende EDTA og 10  $\mu$ l dihydrofolatreduktaseopløsning (E. casei) inkuberes i 20 minutter ved 37°C. Blandingens enzymaktivitet bestemmes efter tilsætning af 10  $\mu$ l dihydrofolatopløsning ved at måle ændringen i opløsningens ekstinktion ved 340 nm under anvendelse af et Centrifichem® centrifugal-analyseapparat. Resultaterne er anført i nedenstående tabel III.

Tabel III

Reaktanter				Enzymaktivitet	
Morphin /ug/forsøg	Antimorphin- -antistof	Morphin- -methotrexat-konju- gat	Enzym-for- søgskompo- nenter	OD/min	Inhibering i %
0	fraværende	fraværende	til stede	0,54	0
0	fraværende	$3 \times 10^{-8}$ M	til stede	0,14	76
0	til stede	$3 \times 10^{-8}$ M	til stede	0,41	29
0,04	til stede	$3 \times 10^{-8}$ M	til stede	0,37	36
0,40	til stede	$3 \times 10^{-8}$ M	til stede	0,35	40
4,0	til stede	$3 \times 10^{-8}$ M	til stede	0,31	46
20	til stede	$3 \times 10^{-8}$ M	til stede	0,27	54
40	til stede	$3 \times 10^{-8}$ M	til stede	0,23	60

Af ovenstående tabel fremgår det, at med voksende morphinkoncentration er der en reduktion i dihydrofolatreduktaseaktiviteten. På denne måde kan morphinopløsninger indeholdende fra 4 µg pr. ml til 4 mg pr. ml morphin undersøges, blot der er 10 µl af opløsningen. Dette skal imidlertid ikke indicere, at dette er det krævede område, men snarere blot, at det kan anvendes i praksis.

#### Eksempel 8.

#### Syntese af ferritin-methotrexat-konjugat.

En opløsning af 1,3 mg humant leverferritin i 5 ml 0,05M natriumphosphatpuffer med pH-værdi 8,0 og 1 ml dimethylformamid omrøres ved stuetemperatur, og der tilsættes 100 µl af en opløsning fremstillet ved at behandle 23 mg methotrexat i 2 ml dimethylformamid med 21 µl triethylamin og 15 µl isobutylchlorformiat ved stuetemperatur i 30 minutter. Blandingen omrøres ved

stuetemperatur i 2 timer og dialyseres derpå mod 2 x 2 liter 0,05M natriumorthosphatpuffer (med pH-værdi 7,4, indeholdende 0,1M natriumchlorid og 0,05 vægtprocent natriumazid) i 24 timer. Opløsningen lades derpå løbe gennem en kolonne af Sephadex G-25, som er ækvilibreret med samme puffer, og de ferritinholdige fraktioner forenes og fyldes op til 10 ml med pufferen. Den resulterende opløsning er egnet til anvendelse i et enzymimmunoforsøg til bestemmelse af ferritin.

#### PATENTKRAV

Reagens til bestemmelse af et immunologisk aktivt materiale, hvilket reagens består af en receptor, som specifikt kan binde det immunologisk aktive materiale, et enzym, et enzymsubstrat og det immunologisk aktive materiale, der er mærket med en forbindelse, som er i stand til at modificere aktiviteten af enzymet,

k e n d e t e g n e t ved, at det mærkede immunologiske materiale er et antigen-enzyminhibitor- eller antigen-enzymaktivator-complex.