

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 149969 B



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(21) Patentansøgning nr.: 1891/76
(22) Indleveringsdag: 27 apr 1976
(41) Alm. tilgængelig: 29 okt 1976
(44) Fremlagt: 03 nov 1986
(86) International ansøgning nr.: --
(30) Prioritet: 28 apr 1975 US 572008

(51) Int.Cl.⁴: G 01 N 33/536
// G 01 N 33/535
// G 01 N 33/537

(71) Ansøger: *MILES LABORATORIES INC.; Elkhart, US.

(72) Opfinder: Robert Charles *Boguslaski; US, Robert Joseph *Carrico; US, James Edward *Christner; US.

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) **Specifik coenzymmærkningsbindingsanalyse-
fremgangsmåde og reagensmiddel til anvendelse
ved fremgangsmåden**

DK 149969 B

Den foreliggende opfindelse angår en specifik bindings-analyse-fremgangsmåde til analyse af et væskeformigt medium for en ligand af typen: antigener og hertil svarende antistoffer, haptener og hertil svarende antistoffer samt hormoner, vitaminer, metabolitter og farmakologiske midler samt deres receptorer og bindingssubstanser, hvilken fremgangsmåde omfatter:

- 1) at det væskeformige medium kontaktes med reagensmidler, der omfatter et mærket konjugat, hvorved der dannes en bundet form af det mærkede konjugat og en fri form af det mærkede konjugat, hvorhos forholdet mellem den resulterende bundne form af det mærkede konjugat i relation til den frie form er en funktion af ligandens koncentration i det væskeformige medium; og
- 2) at mængden af mærkningssubstans i den resulterende bundne form eller den resulterende frie form bestemmes.

På grund af risikoen og vanskeligheden ved at håndtere radioaktive materialer er der blevet gjort mange forsøg på at udtænke hensigtsmæssige, specifikke bindingsanalysemetoder, der er lige så

følsomme og hurtige som radioimmunoanalyser, men som benytter sig af andre kendetegn end radioaktivitet som middel til kontrol af bindingsreaktionen. Som det vil blive omtalt nærmere i det følgende, omfatter de materialer, der er blevet anvendt som mærkningsmateriale i stedet for radioaktive atomer eller molekyler, så forskellige materialer som enzymer, fluorescerende molekyler og bakteriofager. De specifikke bindings-analysemetoder, som først vil blive omtalt, er af den "heterogene" type, ved hvilke der gennemføres adskillelse af de bundne og frie faser. En sådan adskillelse er nødvendig for at gennemføre en specifik bindingsanalyse, når det mærkede materiale i den bundne fase ikke kan skelnes fra materialet i den frie fase.

Fra beskrivelsen til US patent nr. 3.654.090, nr. 3.791.932, nr. 3.839.153, nr. 3.850.752 og nr. 3.879.262 og fra the Journal of Immunological Methods 1:247 (1972) og the Journal of Immunology 109:129 (1972) kendes eksempler på heterogene metoder, som er blevet udviklet med anvendelse af et enzym som mærkningsmateriale. Ved hver af de beskrevne metoder kobles der kemisk et enzym til enten den ligand, som skal bestemmes, eller en bindingspartner for denne, og der opbygges et passende heterogent specifikt bindingsreaktionsskema, hvorved mængden af enzymatisk aktivitet, som er knyttet til enten den uopløselige del eller den væskeformige del, efter inkubering med en prøve er en funktion af mængden af ligand i prøven. De med syntesen og karakteriseringen af enzym-konjugaterne forbundne problemer er alvorlige ulemper ved denne metode.

Fra beskrivelsen til GB patent nr. 1.392.403 og FR patent nr. 2.201.299 kendes en heterogen, specifik bindingsanalysemetode, ved hvilken der som mærkningsmateriale anvendes en ikke-aktiv precursor for et spektrofotometrisk aktivt materiale. Efter inkubering af prøven med det specifikke bindingsreaktionssystem adskilles de uopløselige og væskeformige dele, og den mængde mærkningsmateriale, som er til stede i den væskeformige del, og som er en funktion af den mængde ligand, som skal påvises i prøven, bestemmes ved at gennemføre reaktionstrin, hvorved det inaktive mærkningsmateriale omdannes til et chromogent eller fluorometrisk aktivt materiale, som derefter måles på sædvanlig måde.

Andre heterogene specifikke bindingsanalysemetoder, som gør brug af forskellige typer mærkningsmaterialer, er beskrevet i følgende trykskrifter: Report No. PB-224.875 fra the National Technical Information Services (NTIS) under USA's Department of Commerce

(1973) beskriver et ikke-vellykket forsøg på at anvende heminchlorid som mærkningsmateriale i et heterogent analysesystem, der følges ved hjælp af en chemiluminescensreaktion. I Nature 219:186 (1968) beskrives meget detaljeret visse radioimmunoanalysefremgangsmåder og omtales en passant og i meget generelle vendinger den mulige brug af coenzymer og virus'er i stedet for radioisotoper som mærkningsmaterialer. Forfatteren belyser imidlertid ikke, hvorledes en analyse, ved hvilken sådanne alternative mærkningsmaterialer anvendes, skal gennemføres, eller om en sådan analyse er gennemførlig. Der kan endvidere henvises til Principles of Competitive Protein-Binding Assays, ed. Odell and Daughaday (J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1972), som bredt omtaler de forskellige kendte analyseskemaer og de forskellige materialer og midler, der er blevet anvendt som mærkningsmidler i specifikke bindingsanalyser.

Af interesse er den enzymmærkede immunoanalyse, som er beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.817.837. Denne fremgangsmåde er af den "homogene" type, idet den ikke kræver brug af et opdelt specifiktbindende reaktionssystem (dvs. med en uopløselig del og en væskeformig del) og den deraf nødvendiggjorte adskillesprocedure, da den enzymmærkede ligand er af en sådan form, at den enzymatiske aktivitet efter reaktion med ligandens bindingspartner inhiberes. Forholdene mellem bundet, mærket materiale og frit materiale kan således bestemmes ved at kontrollere enzymatiske aktivitetsforandringer. Ikke desto mindre lider denne fremgangsmåde af vanskeligheden ved at fremstille velkarakteriserede enzymmærkede konjugater og med at finde enzymer, som passer til systemets grundudformning.

Skønt mange nye typer specifikke bindingsanalyser er blevet foreslået og undersøgt, forbliver radioimmunoanalysen og de forskellige enzymmærkede immunoanalyser de mest almindeligt anvendte. Begge systemtyper har imidlertid indlysende mangler, radioimmunoanalysen som følge af dens anvendelse af radioaktivt materiale, som er farligt og kræver påpasselig håndtering, og de enzymmærkede immunoanalyser som følge af vanskeligheden ved at fremstille anvendelige enzymmærkede konjugater.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer en yderst bekvem, alsidig og følsom, forbedret specifik bindingsanalysemetode og et sådant middel baseret på brugen af et materiale, som udviser reaktantaktivitet som bestanddel i et forudbestemt kontrolreaktionssystem

som mærkningsmateriale, hvilket materiale heri betegnes som reaktanten. Mærkningsmaterialet ifølge opfindelsen kan anvendes til en ny homogen analyseteknik eller i hvilken som helst af de sædvanlige heterogene analysemetoder.

Den specifikke bindings-analysefremgangsmåde ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at der som mærkningssubstans anvendes et coenzym.

Opfindelsen angår også et reagensmiddel til anvendelse ved den specifikke bindings-analysefremgangsmåde ifølge opfindelsen, hvilket reagensmiddel omfatter:

- 1) et konjugat af en mærkningssubstans og liganden eller en specifik bindingsanalog hertil, og
- 2) en bindingspartner til liganden,

og hvilket reagensmiddel er ejendommeligt ved, at den benyttede mærkningssubstans er et coenzym.

Overvågningsreaktionssystemet er enzymkatalyseret. Sædvanligvis vælges et overvågningsreaktionssystem, som er yderst følsomt over for reaktanten i konjugatet. Særligt foretrukne er cykliske reaktionssystemer, navnlig sådanne, hvori reaktanten er det cirkulerende materiale. Reaktanten i konjugatet er et coenzym og har fortrinsvis en molekylvægt på mindre end 9.000.

I denne sammenhæng defineres ovenstående betegnelser på følgende måde: ligand er det stof eller den gruppe af stoffer, hvis tilstedeværelse eller mængde i et væskeformigt medium skal bestemmes; specifik bindingspartner for liganden er et hvilket som helst stof eller en hvilket som helst gruppe af stoffer, som har en specifik bindingsaktivitet for liganden med udelukkelse af andre stoffer; og specifik bindingsanalog til liganden er et hvilket som helst stof eller en hvilket som helst gruppe af stoffer, som opfører sig stort set på samme måde som liganden med hensyn til bindingsaktiviteten for den specifikke bindingspartner for liganden.

Den nye homogene analyseteknik er delvis baseret på, at reaktionen mellem en ligand og en specifik bindingspartner, hvor reaktanten er koblet til en af disse, ændrer aktiviteten af reaktanten i den forudbestemte reaktion, hvilken reaktion dermed tjener som middel til overvågning af den specifikke bindingsreaktion. I lyset af dette grundlæggende fænomen kan forskellige manipulationssystemer, som indbefatter forskellige analysemidler og -anordninger, anvendes til udførelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. De foretrukne

fundamentale manipulationssystemer er den direkte bindingsteknik og den kompetitive bindingsteknik.

Ved den direkte bindingsteknik bringes et væskeformigt medium, som antages at indeholde den ligand, som skal påvises, i kontakt med et konjugat omfattende reaktanten koblet til en specifik bindingspartner for liganden, og derefter måles en eventuel forandring af reaktantens aktivitet. Ved den kompetitive bindingsteknik bringes det væskeformige medium i berøring med en specifik bindingspartner for liganden og med et konjugat omfattende reaktanten koblet til liganden og/eller en specifik bindingsanalog for denne, og derefter måles en eventuel forandring af reaktantens aktivitet. Ved begge metoder bestemmes aktiviteten af reaktanten ved at bringe det væskeformige medium i kontakt med mindst ét reagens, som med reaktanten udgør den forudbestemte kontrolreaktion. Kvalitativ bestemmelse af liganden i det væskeformige medium indbefatter sammenligning af en egenskab, sædvanligvis hastigheden, for den resulterende reaktion med samme egenskab ved kontrolreaktionen i et væskeformigt medium uden liganden, idet en eventuel forskel er en indikation på en forandring af reaktantens aktivitet. Kvantitativ bestemmelse af liganden i det væskeformige medium indbefatter sammenligning af en egenskab ved den resulterende reaktion med samme egenskab ved kontrolreaktionen i væskeformige medier indeholdende kendte mængder af liganden.

Når det homogene analyseskema følges, gælder generelt, at komponenterne i den specifikke bindingsreaktion, dvs. det væskeformige medium, som antages at indeholde liganden, konjugatet og/eller en specifik bindingspartner for liganden kan kombineres i alle forhold, på alle måder og i en hvilken som helst rækkefølge, forudsat at aktiviteten af reaktanten i konjugatet ændres måleligt, når det væskeformige medium indeholder liganden i en mængde eller koncentration, der er signifikant i relation til analysemetoden. Fortrinsvis er alle bestanddelene i den specifikke bindingsreaktion opløselige i det væskeformige medium.

Når der anvendes en homogen direkte bindingsteknik, er komponenterne i den specifikke bindingsreaktion det væskeformige medium, som antages at indeholde liganden, og en mængde af et konjugat omfattende reaktanten koblet til en specifik bindingspartner for liganden. Aktiviteten af den konjugerede reaktant efter kontakt med det væskeformige medium varierer omvendt med bindingsgraden

mellem liganden i det væskeformige medium og den specifikke bindingspartner i konjugatet. Når mængden af ligand i det væskeformige medium øges, falder således aktiviteten af den konjugerede reaktant.

Når der anvendes en homogen kompetitiv bindingsteknik, er komponenterne i den specifikke bindingsreaktion det væskeformige medium, som antages at indeholde liganden, en mængde af et konjugat omfattende reaktanten koblet til liganden eller en specifik bindingsanalog for liganden og en mængde af en specifik bindingspartner for liganden. Den specifikke bindingspartner kontaktes stort set samtidig med såvel konjugatet som det væskeformige medium. Da en hvilken som helst ligand i det væskeformige medium konkurrerer med liganden eller den specifikke bindingsanalog til denne i konjugatet om binding med den specifikke bindingspartner, varierer aktiviteten af den konjugerede reaktant ved kontakt med det væskeformige medium i samme forhold som bindingsgraden mellem liganden i det væskeformige medium og den specifikke bindingspartner. Når mængden af ligand i det væskeformige medium stiger, stiger således aktiviteten af den konjugerede reaktant.

En variation af den homogene kompetitive bindingsteknik er den homogene fortrængningsbindingsteknik, hvor konjugatet først kontaktes med den specifikke bindingspartner for liganden og derefter med det væskeformige medium. Der forekommer da konkurrence om den specifikke bindingspartner. Ved en sådan fremgangsmåde er den mængde af konjugatet, som bringes i berøring med den specifikke bindingspartner, sædvanligvis den mængde, som omfatter liganden eller analogen for denne i overskud i forhold til den mængde, som er i stand til at danne binding med den tilstedeværende mængde af den specifikke bindingspartner i løbet af den tid, hvor konjugatet og den specifikke bindingspartner er i kontakt med hinanden inden kontakten med det væskeformige medium, som mistænkes for at indeholde liganden. Denne kontaktorden kan opnås på to hensigtsmæssige måder. Ved den ene fremgangsmåde bringes konjugatet i kontakt med den specifikke bindingspartner i et væskeformigt miljø inden kontakt med det væskeformige medium, som formodes at indeholde liganden. Ved den anden fremgangsmåde bringes det væskeformige medium, som formodes at indeholde liganden, i berøring med et kompleks omfattende konjugatet og den specifikke bindingspartner, hvor den specifiktbindende substans i konjugatet og den specifikke bindingspartner er reversibelt bundet til hinanden. Den mængde af konjugatet, der bliver bundet til den specifikke bindingspartner, som ved

den anden fremgangsmåde er på kompleks form, er sædvanligvis større end den mængde, som kan fortrænges af hele mængden af liganden i det væskeformige medium i den tid, hvor den specifikke bindingspartner eller komplekset og mediet er i kontakt med hinanden inden afslutningen af målingen af aktivitetsforandringen for den konjugerede reaktant.

En anden variation af den homogene kompetitive bindingsteknik er den homogene sekventielle mætningsteknik, hvor komponenterne i den specifikke bindingsreaktion er de samme som de, der anvendes ved den kompetitive bindingsteknik, men tilsætningsrækkefølgen eller kombinationen af komponenterne og de deraf anvendte relative mængder er forskellige. Ved en sekventiel mætningsteknik bringes den specifikke bindingspartner for liganden i kontakt med det væskeformige medium, som formodes at indeholde liganden, i et tidsrum inden det væskeformige medium kontaktes med konjugatet. Den mængde af den specifikke bindingspartner, som kontaktes med det væskeformige medium, er sædvanligvis større end den, som er i stand til at danne binding med hele den mængde af ligand, som antages at være til stede i det væskeformige medium i løbet af det tidsrum, hvor den specifikke bindingspartner og det væskeformige medium er i kontakt med hinanden inden det tidspunkt, hvor det væskeformige medium kontaktes med konjugatet. Yderligere er mængden af liganden eller ligandanalogen på konjugeret form sædvanligvis større end den mængde, som er i stand til at danne binding med den resterende ubundne mængde af den specifikke bindingspartner i løbet af det tidsrum, hvor det væskeformige medium og konjugatet er i kontakt med hinanden inden afslutningen af målingen af forandringen af den konjugerede reaktants aktivitet.

Målingen af aktivitetsforandringen for den konjugerede reaktant som led i den forudbestemte kontrolreaktion opnås bekvemt ved at kontakte den specifiktbindende reaktionsblanding med mindst ét stof, som med den konjugerede reaktant danner kontrolreaktionen, og bestemme virkningen af den specifikke bindingsreaktion på en egen-skab ved denne reaktion.

Heterogene analyseskemaer

Brugen af en reaktant som mærkningsstof kan også anvendes i forbindelse med de sædvanlige analysesystemer af heterogen art,

hvor i de bundne og frie faser af den mærkede bestanddel adskilles og mængden af mærkningsstof i den ene eller den anden bestemmes. Reagensudstyret til gennemførelse af en sådan heterogen analyse kan foreligge i mange forskellige former. Sædvanligvis omfatter udstyret tre grundbestanddele, som er (1) den ligand, som skal bestemmes, (2) en specifik bindingspartner for liganden og (3) en mærket bestanddel, som normalt er en mærket form af (a) liganden, (b) en specifik bindingsanalog for liganden eller (c) den specifikke bindingspartner. Deltagerne i bindingsreaktionen forenes samtidig eller ved en række tilsætninger, og i én eller flere passende inkubationsperioder bliver den mærkede bestanddel bundet til tilsvarende konkurrerende bindingspartnere, således at bindingsgraden, dvs. forholdet mellem den mængde mærket bestanddel, som er bundet til en bindingspartner, og den ubundne mængde er en funktion af mængden af tilstedeværende ligand. Nedenfor gives en kort beskrivelse af nogle af de forskellige bindingsreaktioner, som kan anvendes ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Medens mærkningsegenskaberne i det mærkede konjugat, såsom radioaktivitet eller enzymatisk aktivitet, stort set er de samme for de bundne og frie former af konjugatet ved sædvanlige heterogene specifiktbindende analysemetoder, påvirkes aktiviteten af reaktanten som mærkningsstof ved den foreliggende metode i visse tilfælde ved binding af det mærkede konjugat. I en sådan situation udviser overvågningsreaktionen en forholdsvis konstant natur, når liganden er fraværende fra det væskeformige medium eller er til stede i en ubetydelig ringe mængde. Når liganden er til stede i det væskeformige medium, ændres en karakteristisk egenskab ved overvågningsreaktionen som tidligere omtalt i forbindelse med den homogene teknik.

I nedenstående diagrammer anvendes følgende symbolik:

<u>Symbol</u>	<u>Definition</u>
L	Ligand, som skal bestemmes
Ⓛ	Ligand eller specifik bindingsanalog herfor
B	Bindingspartner for liganden
*	Mærkningsstof, dvs. reaktant
└	Uopløselig fase
→	Inkubationsperiode efterfulgt af passende adskillelse

<u>Symbol</u> (fortsat)	<u>Definition</u> (fortsat)
(lim)	Til stede i en mængde mindre end den mængde, som er i stand til at blive bundet til samtlige tilgængelige bindingspladser under de valgte reaktionsbetingelser i løbet af den valgte inkubationstid, dvs. den bestanddel, som de andre bestanddele konkurrerer om at binde.
(exc)	Overskud til stede i en mængde, som er større end den mængde, der er i stand til at blive bundet af samtlige tilgængelige bindingspladser under de valgte reaktionsbetingelser i løbet af den valgte inkubationstid.

1. Heterogene kompetitive bindingsformer

- a) $L + \textcircled{L}^* + B(\text{lim}) \rightarrow$ insolubiliseringssmiddel for B eller $\textcircled{L}^*$.
 Dette er den klassiske kompetitive bindingsmetode. Eksempler på insolubiliseringssmidler er specifikke udfældende antistoffer, specifikke uopløseliggjorte antistoffer, og i de tilfælde hvor B eller $\textcircled{L}^*$ er et proteinmateriale, proteinudfældere såsom ammoniumsulfat, eller i de tilfælde, hvor B eller $\textcircled{L}^*$ er et lille adsorberbart molekyle, dextranbelagt trækul. Beskrivelser af parallelle systemer findes i Biochem. J. 88:137 (1963) og beskrivelsen til US patent nr. 3.839.153.
- b) $L + \textcircled{L}^* + \vdash B(\text{lim}) \rightarrow$
 Denne metode betegnes almindeligvis fastfaseteknikken. Beskrivelser af parallelle radioimmunoanalyse- og enzymimmunoanalysemetoder findes i beskrivelserne til US patenterne nr. 3.505.019; 3.555.143; 3.646.346 og 3.654.090.
- c) $L + B^* + \vdash \textcircled{L}(\text{lim}) \rightarrow$
 Reference: US patent nr. 3.654.090.
- d) $L + \vdash \textcircled{L} + B^*(\text{lim}) \rightarrow$
 Reference : US patent nr. 3.850.752.

2. Heterogene sekventielle mætningsformer

- a) $L + B(exc) \rightarrow + \textcircled{L}^*(exc) \rightarrow +$ insolubileringsmiddel for B eller $\textcircled{L}^*$.

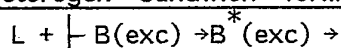
Ved den sekventielle mætningsteknik bindes nogle eller alle bindingspladserne på B, som er tilbage efter den første inkubationsperiode af den mærkede bestanddel.

- b) $L + \text{---}B(exc) \rightarrow + \textcircled{L}^*(exc) \rightarrow$

Beskrivelser af parallelle radioimmunoanalyse- og enzymimmunoanalysemetoder findes i beskrivelsen til US patent nr. 3.730.760 og J. Immunol. 209:129 (1972).

- c) $L + B^*(exc) \rightarrow + \text{---}\textcircled{L}^*(exc) \rightarrow$

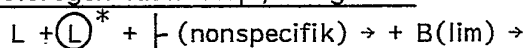
3. Heterogen "Sandwich" form



Ved sandwich-metoden bindes nogle eller alle de ligandmolekyler, som er bundet til de uopløseliggjorte bindingspartnere af den mærkede bestanddel.

Reference: US patent nr. 3.720.760.

4. Heterogen fastfaseopløsningsform



Ved denne teknik bindes liganden og den mærkede bestanddel til en nonspecifik binder, og derefter dissocieres proportionale mængder derfra ved binding med en bindingspartner med en større affinitet for liganden og den mærkede bestanddel. Den mest anvendelige form for denne teknik benytter sig af en søjle af den nonspecifikke binder som beskrevet i beskrivelsen til US patent nr. 3.659.104. En sådan teknik er anvendelig, når liganden bindes til endogene bindingsmaterialer i prøven, som, med mindre de fjernes, generer den kompetitive bindingsreaktion. Efter at de endogene bindingsmaterialer er blevet bundet til den nonspecifikke binder, kan de fjernes ved passende udvaskninger.

For en nærmere omtale af de i sædvanlige heterogene analysesystemer involverede parametre, såsom mere detaljerede beskrivelser af analyseformer og alternative separationsmetoder henvises til Principles of Competitive Protein-Binding Assays, ed. Odell and Daughday (J. B. Lippincott Co., Philadelphia, 1972).

Manipulationsskemaer, som indbefatter andre tilsætningsrækkefølger og andre bindingsreaktionsformer, kan udtænkes til gennemførsel af homogene og heterogene specifikke bindingsanalyser uden at afvige fra den heri beskrevne opfinderiske idé.

Overvågningsreaktionssystemer

De reaktionsbestanddele, som sammen med reaktanten i konjugatet frembringer overvågningsreaktionen, kan bringes i kontakt med (i) den specifikke bindingsreaktionsblanding ved en homogen teknik eller (ii) med enten den fraskilte, bundne eller frie fase ved en heterogen teknik alene eller i en hvilken som helst kombination, inden, samtidig med eller efter initiering af den specifikke bindingsreaktion. Efter initiering af den specifikke bindingsreaktion inkuberes reaktionsblandingen, som kan indbefatte enhver af eller alle de til overvågningsreaktionen nødvendige bestanddele, sædvanligvis i et i forvejen fastlagt tidsrum inden en eventuel ændring af aktiviteten af reaktanten i konjugatet (homogen teknik) vurderes, eller mængden af reaktantaktivitet i de adskilte faser (heterogen teknik) bedømmes. Efter inkubationsperioden tilsættes der til reaktionsblandingen eventuelle komponenter, som er nødvendige for overvågningsreaktionen, og som ikke allerede er til stede i tilstrækkelige mængder i reaktionsblandingen, og overvågningsreaktionen bedømmes som indikation på tilstedeværelsen eller mængden af ligand i det væskeformige medium.

Overvågningsreaktionen kan omfatte et kemiluminescensreaktionssystem, fortrinsvis enzymkatalyseret, i hvilket coenzymmærknings-substansen deltager. Den specifikke binding af den coenzymmærkede reaktant kan bevirke en ændring af lysproduktionshastigheden eller af den totale mængde, den maksimale intensitet eller karakteren af det dannede lys. Eksempler på kemiluminescensreaktionssystemer er angivet i Tabel A, hvori følgende forkortelser er anvendt:

ATP	adenosintriphosphat
AMP	adenosinmonophosphat
NAD	nicotinamidadenindinucleotid
NADH	reduceret nicotinamidadenindinucleotid
FMN	flavinmononucleotid
FMNH ₂	reduceret flavinmononucleotid
Hu	elektromagnetisk stråling, sædvanligvis i det infrarøde, synlige eller ultraviolette område.

Luminescensreaktionssystem		Tabel A	
		Konjugeret reaktant	
A.	ATP + reduceret luciferin $\xrightarrow[\text{(ildflue)}]{\text{luciferase}}$ hv + AMP + oxideret luciferin	ATP eller reduceret luciferin	
B.	FMNH ₂ + langkædet aldehyd + O ₂ $\xrightarrow[\text{hv + FMN + langkædet syre + H}_2\text{O}]{\text{luciferase (P. fisheri)}}$	FMNH ₂ eller langkædet aldehyd	
C.	1) NADH + FMN + H ⁺ $\xrightarrow{\text{NADH dehydrogenase}}$ NAD + FMNH ₂ 2) FMNH ₂ + langkædet aldehyd + O ₂ $\xrightarrow[\text{hv + FMN + langkædet syre + H}_2\text{O}]{\text{luciferase (P. fisheri)}}$	NADH eller FMN	
D.	1) 3', 5'-adenosindiphosphat + reduceret luciferinsulfat $\xrightarrow{\text{sulfat-transferase}}$ adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat + reduceret luciferin 2) reduceret luciferin + O ₂ $\xrightarrow{\text{hv + oxideret luciferin}}$	3',5'-adenosindiphosphat eller reduceret luciferin	
E.	reduceret luminol + H ₂ O ₂ $\xrightarrow{\text{peroxidase*}}$ hv + oxideret luminol + H ₂ O	reduceret luminol	
F.	reduceret pyrogallol + H ₂ O ₂ $\xrightarrow{\text{peroxidase*}}$ hv + oxideret pyrogallol + H ₂ O	reduceret pyrogallol	
G.	reduceret luminol + O ₂ $\xrightarrow{\text{oxygenase}}$ hv + oxideret luminol	reduceret luminol	
H.	reduceret pyrogallol + O ₂ $\xrightarrow{\text{oxygenase}}$ hv + oxideret pyrogallol	reduceret pyrogallol	
I.	isoluminol + H ₂ O ₂ $\xrightarrow{\text{lactoperoxidase}}$ hv + aminophthalat + N ₂	isoluminol	
J.	isoluminol + KO ₂ $\xrightarrow{\text{hv + aminophthalat + N}_2}$	isoluminol	

* eller katalase

Yderligere enkeltheder ved og omtale af luminescensreaktionssystemer, som kan anvendes i forbindelse med den foreliggende fremgangsmåde, kan ses i nedenstående referencer:

J. Biol. Chem. 236:48 (1961)

J. Amer. Chem. Soc. 89:3944 (1967)

Cornier et al., Bioluminescens in Progress, ed. Johnson et al., Princeton University Press (new Jersey, 1966) pp. 363-84.

Kries, P., Purification and Properties of Renilla Luciferase, doktordisputats Unverisity of Georgia (1967).

Am. J. Physiol. 41:454 (1916).

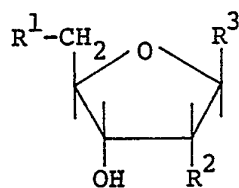
Biol. Bull. 51:89 (1926).

J. Biol. Chem. 243:4714 (1968).

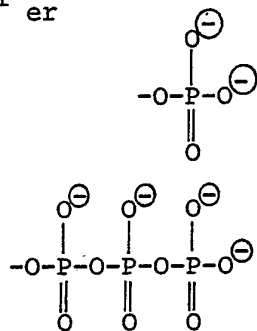
Af ovenstående grunde og af hensyn til alsidighed og tilpasningsevne foretrækkes coenzymer specielt til brug som reaktanten i konjugatet. Et coenzym er et ikke-proteinmolekyle, som fremmer den effektive ydeevne af enzymets katalytiske funktion. Alle kendte coenzymer har en molekylvægt på under 9000, og de foretrukne coenzymer har en molekylvægt på under ca. 5000. Anvendelige coenzymer indbefatter nucleotidcoenzymerne, navnlig de, som indeholder adeningrupper, såsom adenosinphosphaterne (dvs. mono-, di- og triphosphatformerne), nicotinamidadenindinucleotid og dets reducerede former og nicotinamidadenindinucleotidphosphat og dets reducerede former. Andre anvendelige coenzymer indbefatter guanosinphosphater, flavinmononucleotid og dets reducerede former, flavinadenindinucleotid og dets reducerede former, coenzym A og dets thioestre, såsom succinyl-coenzym A, 3',5'-adenosindiphosphat og adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat.

Anvendelige coenzymaktive konjugater omfatter nucleotidcoenzymer med en adeningruppe, hvortil det specifiktbindende stof, dvs. en ligand, en specifik bindingsalanog til en ligand eller en specifik bindingspartner for en ligand kobles via en direkte binding eller en brogruppe som tidligere omtalt. Sådanne coenzymaktive konjugater, som omfatter et adenosinphosphat, nicotinamidadenindinucleotid eller dets reducerede form eller nicotinamidadenindinucleotidphosphat eller dets reduceret form, har følgende almene formel:

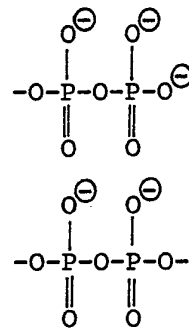
14



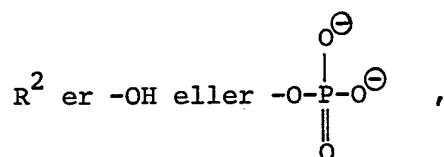
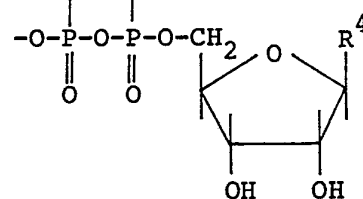
hvor R^1 er



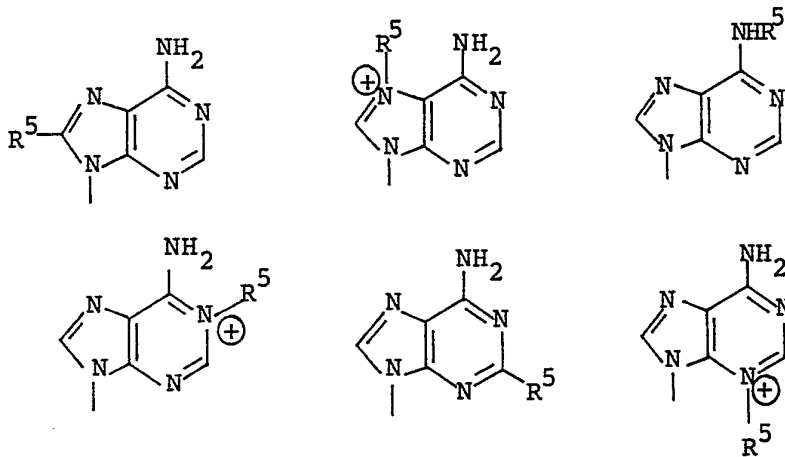
,



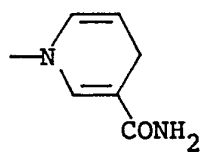
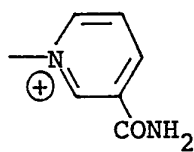
eller



R^3 er

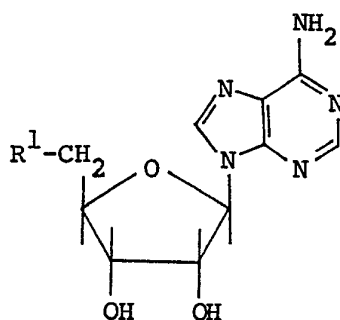


, idet R^4 er

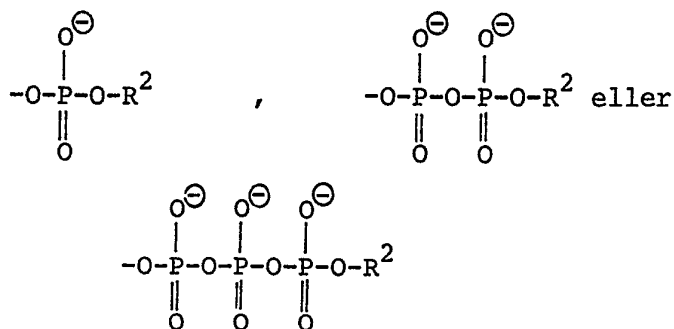


og R^5 er $-Y-Z$, hvor Y er en binding eller en brogruppe, og Z er en ligand, en specifik bindingsanalog for en ligand eller en specifik bindingspartner for en ligand. Ovenstående formel repræsenterer de ioniserede former for det coenzym-aktive konjugat, men de protoniserede former eller syreformerne er lige så anvendelige. Protoniseringsgraden afhænger af omgivelsernes pH-værdi. Saltene af disse konjugater kan også anvendes, hvis det er hensigtsmæssigt.

Ud over de ovenfor nævnte forbindelser indbefatter anvendelige coenzymaktive konjugater adenosinphosphaterne, hvortil det specifikbindende stof er koblet via phosphatdelen. Disse forbindelser har nedenstående almene formel:



hvor R^1 er



og R^2 er $-Y-Z$, hvor Y er en binding eller en brogruppe, og Z er en ligand, en specifik bindingsanalog for en ligand eller en specifik bindingspartner for en ligand. De protoniserede former eller syreformerne og saltformerne kan også anvendes, hvor det er hensigtsmæssigt.

I en udførelsesform for opfindelsen foreligger de komponenter i den specifikke bindingsreaktion, som skal kombineres med det væskeformige medium, der formodes at indeholde liganden, i væskeform eller fast form. I det foretrukne homogene analysesystem befinder komponenterne sig sædvanligvis i opløsning eller på en fast form,

som er i stand til let at opløses i det væskeformige medium. Da det væskeformige medium, som skal undersøges, normalt er af vandig art, er komponenterne sædvanligvis på vandopløselig form, dvs. enten i vandig opløsning eller i en vandopløselige fast form, såsom et pulver eller en harpiks. Analysemetoden kan udføres i en sædvanlig laboratoriebeholder, såsom et reagensglas, idet komponenterne i den specifikke bindingsreaktion og komponenterne i reaktionssystemet tilsættes dertil på fast form eller i væskeform.

Reagensmidlet, der omfatter det coenzymmærkede konjugat, kan forbindes med en bærer. Bæreren kan være en væskerummende beholder, såsom et reagensglas eller en kapsel, der indeholder reagenten i en indre del, f.eks. i form af en væske eller et løst fast stof eller en belægning på en indre overflade af beholderen. Bæreren kan også foreligge i form af en matrix, som er uopløselig og porøs og fortrinsvis absorberende i forhold til det væskeformige medium, som skal bestemmes. Matricen kan foreligge i form af sugende papir, polymerfilm, -membraner, -uld eller -blokke, geler osv. På denne form vil udstyret udgøre et bekvemt middel til kontaktnng af det væskeformige medium, som skal undersøges, ved gennemførelse af den specifikke bindingsreaktion og/eller kontrolreaktionen og til observation af det resulterende respons.

Det væskeformige medium, som skal undersøges, kan være en naturligt forekommende eller kunstigt dannet væske, som formodes at indeholde liganden, men er sædvanligvis en biologisk væske eller en væske hidrørende fra en fortynding eller anden behandling heraf. Biologiske væsker, som kan analyseres ifølge den foreliggende fremgangsmåde, indbefatter serum, plasma, urin og fostervand, cerebral- og spinalvæsker. Andre materialer, såsom fast substans, f.eks. væv, eller gasser kan analyseres ved at bringe dem på væskeform, såsom ved opløsning af det faste stof eller gassen i en væske eller ved ekstraktion af det faste stof.

I modsætning til det enzymbaserede homogene analysesystem kan biologiske væsker, som indeholder stoffer, der har en reaktantaktivitet, som svarer til eller er identisk med det konjugerede mærkningscoenzym, analyseres for liganden uden baggrundsforstyrrelse. Endogen baggrundsreaktantaktivitet kan let elimineres på en række måder. Den biologiske væske kan behandles således, at den endogene reaktantaktivitet selektivt ødelægges. En sådan behandling kan omfatte påvirkning med et klaringsmiddel, som kemisk ødelægger den

endogene aktivitet, efterfulgt af behandling til inaktivering af dette klaringsmiddels destruktive virkning.

For eksempel optræder coenzymnedbrydende enzymer ofte naturligt i biologiske væsker, navnlig hvis coenzymet er NAD, NADP eller ATP. Der findes mange inhibitorer for sådanne coenzymnedbrydende enzymer, f.eks. chelateringsmidler, som virker ved at berøve enzymernes essentielle metalionaktivatorer. For eksempel findes der i normalt serum NAD-nedbrydende enzymer, som har tilstrækkelig enzymatisk aktivitet til at fjerne stort set al endogen NAD-aktivitet fra isoleret serum i løbet af få timer. Disse enzymeres nedbrydende virkning kan effektivt hæmmes ved tilsætning af et chelateringsmiddel, såsom ethylendiamintetraeddikesyre. Eliminering af den nedbrydende aktivitet kan også opnås ved at tilsætte en specifik enzym-inhibitor; f.eks. kan ATP-nedbrydende enzymer inhiberes ved tilsætning af β -metylen-ATP eller α -metylen-ATP.

Opfindelsen vil nu blive illustreret af følgende eksempler:

Eksempel 1

Fremstilling af nicotinamidadenindinucleotid-biotinkonjugat.

A. Nicotinamid-6-(2-aminoethylenamino)purindinucleotid.

2 g Nicotinamidadenindinucleotid (NAD) opløstes i 10 ml vand, og 0,6 ml ethylenimin tilsættes dråbevis, idet pH blev holdt under 7 ved tilsætning af 1 N perchlorsyre. Da ethylenimin-tilsætningen var afsluttet, indstilledes pH på 4,5, og reaktionsblandingen inkuberedes ved 20-25°C. Med 24 timers mellemrum tilsættes 0,6 ml ethylenimin, og pH genindstilledes på 4,5. Efter 96 timer udhældtes opløsningen i 10 rumfang acetone ved -10°C. Den dannede olie opsamledes, vaskedes med ether og opløstes i ca. 50 ml vand i en kolbe.

I den resulterende opløsning indstilledes pH på 7,0-7,5 med 1 N natriumhydroxid, og der tilsættes 1 gram natriumbicarbonat. Nitrogen bobledes gennem opløsningen i fra 4 til 5 minutter, og der tilsættes 1 g natriumhydrogensulfit. Kolben blev lukket tæt og fik lov at henstå ved stuetemperatur i 45 minutter. Opløsningen oxygeneredes derefter i 15 minutter, og et pH på 11,3 indstilledes med natriumhydroxid. Opløsningen opvarmedes til 75°C i 1 time. Reaktionsblandingen afkøledes derefter til stuetemperatur, og der tilsættes 0,6 g tris-(hydroxymethyl)aminomethan efterfulgt af 5 N saltsyre til indstilling af pH på 7,5. Til den fremkomne opløsning tilsættes 1000 internationale

enheder alkohol dehydrogenase og 1 ml acetaldehyd. Den faldende optiske tæthed af reaktionsblandingen fulgtes ved 340 nm, og da der ikke iagttoges noget yderligere fald, indstilledes pH på 3,5. Opløsningen udhældtes i 10 rumfang acetone ved -10°C . Den olie, som dannedes, fraskiltes og vaskedes med ether, hvorefter den opløstes i 10-15 ml vand.

Den fremkomne opløsning indførtes i en 2,5 x 90 cm søjle af Sephadex[®] G-10, der leveres af Pharmacia AB, Uppsala, Sverige, og som var ækvilibreret med vand. Fraktioner med rumfang på 12 ml opsamledes. Bølgelængden for den maksimale optiske absorption i det ultraviolette område og den optiske tæthed ved denne bølgelængde bestemtes for hver fraktion. Den optiske tæthed ved 340 nm bestemtes også for hver fraktion efter reduktion med alkoholdehydrogenase. Fraktionerne, som havde et optisk absorptionsmaksimum ved 264 nm og havde et forhold mellem den optiske tæthed ved 340 nm og den optiske tæthed ved 264 nm på over 0,05, forenedes. Det forenede materiale koncentreredes til fra 15 til 20 ml på en rotationsfordamper og passerede gennem en 2,5 x 28 cm søjle af Dowex[®] 1-X8, som leveres af Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californien, ækvilibreret med vand. Yderligere vand tilsattes til at vaske det forenede materiale gennem søjlen, og der opsamledes 10 ml fraktioner. Fraktionerne, som havde et optisk absorptionsmaksimum ved 264 nm og havde et forhold mellem den optiske tæthed ved 340 nm og tætheden ved 264 nm på over 0,1, forenedes.

Det forenede materiale blev ført gennem en 5 x 45 cm søjle af Dowex[®] 50-X2, som leveres af BioRad Laboratories, Richmond, Californien, ækvilibreret med vand. Yderligere vand tilsattes til at vaske det forenede materiale gennem søjlen, og der opsamledes 20 ml fraktioner. Fraktionerne, som havde et optisk absorptionsmaksimum ved 264 nm og et forhold mellem den optiske tæthed ved 340 nm og den optiske tæthed ved 264 nm på over 0,18, forenedes. Det forenede materiale koncentreredes til fra 4 til 5 ml og rensedes ved elektroforese på følgende måde:

Det koncentrerede materiale påførtes et ark "Whatman 3MM" papir, som leveres af Reeve Angel, Clifton, New Jersey, i en 1-2 cm bred stribe vinkelret på strømretningen. Papiret befugtedes derefter med 0,02 M natriumphosphat ved pH 6,0. Elektroforese gennemførtes ifølge Durrummetoden med hængende papir som beskrevet i Science 121:829 (1955) i 4-7 timer med en potentiel gradient på ca. 8,5

volt/cm. Placeringen af det ønskede pyridinnucleotidderivat bestemtes ved fluorescens udviklet efter sprøjtning af en prøvestrimmel af papiret med 0,5 M natriumcyanid ifølge den i J. Biol. Chem. 191:447 (1951) beskrevne fremgangsmåde. Det areal, som indeholder det ønskede derivat, blev udsåret af papiret og ekstraheret med tre 50 ml rumfang vand. De fremkomne ekstrakter indeholdende nicotinamid-6-(2-aminoethylamino)purindinukleotid forenedes, koncentreredes til fra 3 til 4 ml og opbevarede ved -20°C .

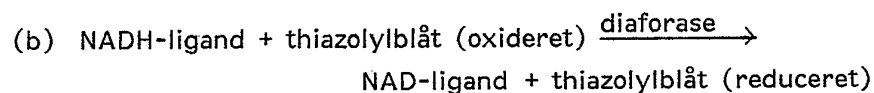
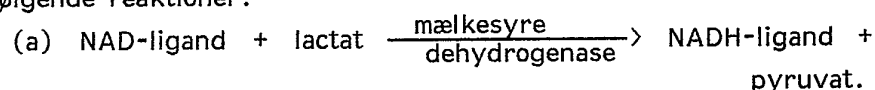
B. Nicotinamidadenindinukleotid-biotinkonjugat.

En 16 mg mængde biotin suspenderedes i 1 ml vand indeholdende 22 mg nicotinamid 6-(2-aminoethylamino)purindinukleotid fremstillet som beskrevet ovenfor under punkt A. Nogle få dråber 0,1 N natriumhydroxid tilsattes til fremme af opløsning af biotinet. En 240 mg mængde 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinethyl)carbodiimidmetho-p-tolulensulfonat tilsattes til den fremkomne opløsning og blev bragt i opløsning ved dråbevis tilsætning af 0,1 N saltsyre. Reaktionsblandingen fik lov at henstå ved stuetemperatur i 5 timer og udhældtes derefter i 10 ml acetone ved -10°C . Den olie, som dannedes, fraskiltes, vaskedes 2 gange med fra 5 til 10 ml ether og opløstes i fra 1 til 2 ml vand. Det fremkomne materiale rensedes ved elektroforese på papir som i eksempel 1. To fluorescerende bånd fremkom efter sprøjtning med natriumcyanid, hvoraf det ene var vandret mod katoden og det andet mod anoden. Det sidste bånd, som indeholdt NAD-biotinkonjugatet, elueredes med vand og opbevarede ved -20°C .

Eksempel 2

Homogen specifik bindingsanalyse; effekt af avidin og biotin på den enzymatiske cykliseringshastighed af NAD og NAD-biotinkonjugater.

Den i dette eksempel anvendte cykliseringsreaktion var baseret på følgende reaktioner:



Otte specifikke bindingsreaktionsblandinger fremstilledes, hver med et samlet rumfang på 0,5 ml og indeholdende 0,12 M N,N-bis-2-hydroxyethylglycinhydrochloridpuffer ved pH 7,8 og hver for sig indeholdende de i tabel 1 angivne koncentrationer og aktiviteter af NAD, NAD-biotinkonjugat fremstillet som i eksempel 1, biotin og avidin, hvilket sidste har affinitet for binding med biotin. Én enhed avidinaktivitet er den mængde avidin, som er i stand til at binde 1 µg biotin. Reaktionsblandingerne inkuberedes ved stuetemperatur i fra 2 til 3 timer. Hver reaktionsblanding kontaktedes med en vandig enzym/substratblanding ved tilsætning af 0,1 ml 1 M lithiumlactat, 0,05 ml 10 mM thiazolylblåt i oxideret form og en tilstrækkelig mængde 0,12 M N,N-bis-2-hydroxyethylglycinhydrochloridpuffer ved pH 7,8 indeholdende 0,38 internationale enheder oksehjertemælkesyredehydrogenase og 1,5 internationale enheder svinehjertediaphorase, således at der opnåedes et totalt reaktionsrumfang på 1 ml. Den relative produktionshastighed for den reducerede form af thiazolylblåt bestemtes derefter i hver af reaktionsblandingerne ved at måle den totale ændring af den optiske tæthed i hver blanding ved 570 nm over en 24 minutters periode inden for den første time efter tilsætning af enzym/substratblandingen. Hele proceduren blev gennemført med dobbeltbestemmelser, og gennemsnitsresultaterne fremgår af tabel 1.

Tabel 1

Reaktion	Koncentration af NAD (nM)	Koncentration af NAD-biotin- konjugat (nM)	Koncentration af biotin (nM)	Avidinaktivitet (enheder)	Gennemsnitlig forøgelse af optisk tæthed (570 nm)
1	-	-	-	-	0,002
2	220	-	-	-	0,103
3	-	360	-	-	0,079
4	-	-	360	-	0,003
5	220	-	-	0,11	0,103
6	-	360	-	0,11	0,025
7	-	360	360	0,11	0,069
8	-	-	-	0,11	0,001

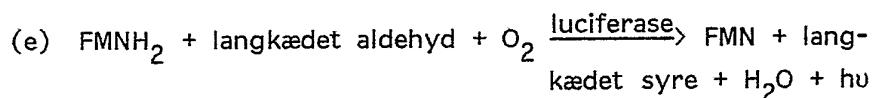
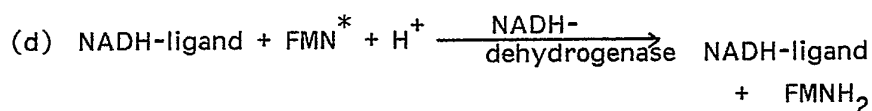
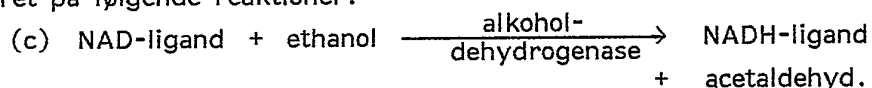
Reaktionerne 1, 4 og 8 var kontrolreaktioner og viser, at der stort set ikke forekom nogen cyklisering i fravær af NAD og NAD-biotinkonjugatet. Resultaterne i reaktionerne 2 og 3 viser, at NAD-biotinkonjugatet har en betydelig coenzymaktivitet i forhold til nativt NAD. Det ses af resultaterne i reaktionerne 3 og 6, at tilstedeværelsen af avidin i reaktionsblandingen hæmmer dannelsen af thiazolylblåt (reduceret form), hvor det tilstedeværende NAD er konjugeret med biotin. Ved at sammenligne resultaterne af reaktionerne 6 og 7 ses det, at tilstedeværelsen af frit biotin reducerer inhiberingsgraden af thiazolylblåtdannelsen (reduceret form) i forhold til koncentrationen af biotin i reaktionsblandingen.

Det påvistes påledes i dette eksempel, at aktiviteten af NAD i NAD-biotinkonjugatet over for det cykliserende reaktionssystem ned-sattes i nærværelse af avidin, og at størrelsen af dette aktivitetsfald reduceredes ved yderligere tilstedeværelse af biotin.

Eksempel 3

Homogen kompetitiv-bioluminescensanalyse; virkning af forskellige biotinniveauer på den dannede maksimale lysintensitet.

Det i dette eksempel anvendte bioluminescensreaktionssystem var baseret på følgende reaktioner:



* flavinmononukleotid.

En lysgenererende opløsning til udførelse af reaktionerne (d) og (e) fremstilledes som følger: En reagensblanding indeholdende 0,13 M fosfatpuffer ved pH 7,0, 0,67 vægtprocent okseserumalbumin, 15,7 μM flavinmononucleotid (FMN) og 13,3 mM natriumacetat blev fremstillet, og denne blanding opbevarede i mørke ved -20°C . En emulsion af 5 μl dodecanal i 5 ml vand fremstilledes den dag, hvor den lysgenererende opløsning skulle anvendes. Frysetørret luciferase

ekstraheret fra *Photobacterium fisheri* (enzym, som leveres af Worthington Biochemical Corp., Freehold, New Jersey) tilsattes til 0,013 M phosphatpuffer ved pH 7,3 til en koncentration på 20 mg/ml. Efter 30 minutter centrifugeredes den resulterende suspension ved 1500 g i 10 minutter, og bundfaldet kasseredes. Den lysgenererende opløsning fremstilledes derefter inden for 5 minutter før brug ved at kombinere 75 µl af reagensblandingen, 5 µl af dodecanalemulsionen og 20 µl af luciferaseopløsningen.

Til detektering af det ved reaktion (e) dannede lys konstrueredes et fotometer bestående af en fotodetektor og en 6 x 50 mm kuvette anbragt inden i en lysintegrerende kugle, således at lys dannet i kuvetten reflekteredes på fotodetektoren. Det af fotodetektoren dannede elektroniske signal førtes til en baneskriver. Den maksimale lysintensitet i den betydning betegnelsen anvendes heri, målt ud fra skriversens spor og blev målt i arbitrære enheder baseret på diagrampapirets inddeling.

Der fremstilledes syv specifiktbindende reaktionsblandinger, hver med et samlet rumfang på 0,2 ml og hver indeholdende 0,1 M tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridpuffer med pH 8,0, 0,6 M ethanol, 0,01 M semicarbazidhydrochlorid, 343 nM NAD-biotin-konjugat fremstillet som i eksempel 1, 0,025 internationale enheder alkoholdehydrogenase og 0,055 enheder avidin. Biotin sættes til seks af de syv reaktionsblandinger, dvs. blandingerne med numrene 2-7 i tabel 2, i de i tabellen angivne koncentrationer.

Reaktionsblandingerne inkuberedes ved stuetemperatur i ca. 30 minutter. Et 10 µl af hver reaktionsblanding indsprøjtedes i en separat kuvette monteret i det ovenfor beskrevne fotometer indeholdende 100 µl af en lysgivende opløsning fremstillet på den ovenfor beskrevne måde og præinkuberet ved 28°C i 2-3 minutter. Der gennemførtes under hele proceduren dobbeltforsøg, og de gennemsnitlige resultater ses i tabel 2.

Tabel 2

<u>Reaktions-</u> <u>blanding</u>	<u>Koncentration af</u> <u>biotin (nM)</u>	<u>Gennemsnitlig</u> <u>maksimal</u> <u>lysintensitet</u>
1	0	36
2	25	44
3	50	57
4	100	79
5	150	90
6	200	97
7	300	104

Det ses således af dette eksempel, at størrelsen af den ved bioluminescensreaktionssystemet dannede maksimale lysintensitet og dermed aktiviteten af NAD i NAD-biotinkonjugatet er en direkte funktion af den tilstedeværende mængde biotin i den specifikke bindingsreaktionsblanding. Den foreliggende opfindelse tilvejebringer derfor et analysemiddel og en analysemetode til kvantitativ bestemmelse af tilstedeværende af liganden biotin i et væskeformigt medium under anvendelse af en kompetitiv bindings-bioluminescensanalyseteknik.

Eksempel 4

Fremstilling af 2,4-dinitrophenyl-ATP konjugat (6-stillingsderivat)
 N^6 -[2-(2,4-Dinitrophenyl)aminoethyl]adenosin-5'-triphosphat.

A. N^6 -(2-aminoethyl)adenosin-5'-monophosphat.

To g (7 millimol 6-chlorpurinribosid (som leveres fra Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) omrørtes med 17 ml triethylphosphat og omsattes med phosphorylchlorid i nærværelse af vand som beskrevet i Chem. Scrip. 19:165-70 (1972). Efter hydrolyse af phosphordichloridatet tilsattes 9,5 ml ethylendiamin (140 mmol) og fik lov at reagere ved stuetemperatur i 3 timer. Reaktionsblandingen fortyndedes til 4 liter med vand, og pH indstilledes til 12 med natriumhydroxid. Opløsningen blev ledt gennem en 5 x 30 cm søjle af Dowex[®] 1 x 8 (som fås fra Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californien) på acetatformen. Derefter vaskedes søjlen med 3 l 0,01 M ammoniumchlorid, og kromatogrammet udvikledes med en lineær gradient frembragt ud fra 3 liter vand og 3 liter 1 M eddikesyre.

En isoleret top af UV-absorberende materiale elueret mellem 1800 ml og 2050 ml af gradienten koncentreredes til ca. 25 ml under

vakuum. Medens denne opløsning henstod ved 7°C natten over, dannedes hvide krystaller, og disse opsamledes og tørredes, hvorved der opnåedes et produktudbytte på 65%. En prøve til analyse omkrystalliseredes fra varmt vand.

Beregnet for $C_{12}H_{19}N_6O_7P \cdot 2H_2O$:	C:33,8;	H: 5,45;	N:19,7
Fundet:	C:34,3;	H: 5,22;	N:19,7

Separate tyndtlagskromatogrammer fremkaldt med to opløsningsmiddelsystemer, hvoraf det første bestod af 4 dele 0,5 M ammoniumacetat og 1 del ethanol, og det andet bestod af 3 dele isosmørsyre og 5 dele 1M ammoniumhydroxid, viste begge én komponent, som udelukkede fluorescens og reagerede med ninhydrin. Forbindelsen i 0,1 N saltsyre havde et absorptionsmaksimum ved 264 nm og den millimolære ekstraktionskoefficient var 17,7, hvilke spektralegenskaber er ejendommelige for N^6 -alkylerede adenosinderivater.

B. N^6 -[2-(2,4-dinitrophenyl)aminoethyl]adenosin-5'-monophosphat.

Der opløstes 250 mg N^6 -[2-(2-aminoethyl)adenosin-5'-monophosphat (0,65 millimol) fra del A i dette eksempel i 20 ml vand ved pH 8. Derefter tilsattes 168 mg natriumbicarbonat efterfulgt af 0,2 ml 1-fluor-2,4-dinitrobenzen (1,58 millimol opløst i 2 ml ethanol). Reaktionsblandingen omrørtes i mørke ved stuetemperatur i 4 timer, og derefter tilsattes yderligere 0,1 ml 1-fluor-2,4-dinitrobenzen i 1 ml ethanol. Efter at reaktionsblandingen var blevet omrørt natten over indstilledes den til pH 2,0 med saltsyre og udhældtes i 200 ml ethanol. Det dannede bundfald blev opløst i 200 ml vand, og denne opløsning indstilledes til pH 8,0 med natriumhydroxid og kromatograferedes på en 2,5 x 30 søjle af "DEAE"-cellulose på bicarbonatform (som leveres fra Reeve Angel, Clifton, New Jersey). Kromatogrammet udvikledes med en lineær gradient frembragt ud fra 1,5 liter vand og 1,5 liter 0,7 M ammoniumbicarbonat. En større top af gult materiale, som absorberede UV-lys, elueredes mellem 1200 og 1500 ml af gradienten. Ammoniumbicarbonat fjernedes ved gentagen inddampning til tørhed, hvorved der opnåedes et udbytte på 40% af det ønskede produkt. Dette produkt vandrede som én gul plet på tyndtlagskromatogrammer udviklet med de samme to opløsningsmidler, som er angivet i del A i dette eksempel, og på epichlorhydrintriethanolamin-

anionbytningspapir udviklet med 0,25 M natriumacetat-eddikesyre-puffer, pH 5,0. I 0,02 N saltsyre havde produktet optiske absorptionsmaksima på 264 nm og 363 nm med millimolære ekstinktionskoefficienter på henholdsvis 21,8 og 14,2.

C. 2,4-Dinitrophenyl-ATP-konjugat.

N^6 -[2-(2,4-dinitrophenyl)aminoethyl]adenosin-5'-monophosphat (fra del B i dette eksempel) (0,3 millimol) omdannedes til pyridiniumsaltet ved kromatografi på en 1,5 x 20 cm søjle af Dowex 50 x 2 på pyridiniumformen (som leveres af Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californien). Det gule udløb koncentreredes til tørhed, og der tilsattes 15 ml dimethylformamid og 0,3 millimol tri-n-butylamin. Denne blanding indampedes til tørhed, og remanensen tørredes yderligere ved gentagen fordampning. Monophosphatmellemproduktet omdannedes derefter til triphosphatformen under anvendelse af den i J. Amer. Chem. Soc. 87: 1785-8 (1965) beskrevne fremgangsmåde. De reaktionsprodukter, som var opløselige i dimethylformamid, sattes til 250 ml vand, som derefter indstilledes til pH 8,0. Denne opløsning førtes gennem en 2,5 x 58 cm søjle af DEAE-cellulose på bicarbonatform og kromatogrammet udvikledes med en linær gradient frembragt ud fra 3 l vand og 3 l 0,5 M ammoniumcarbonat. Den første eluerede top af gult materiale identificeredes som diphosphatderivatet. En anden top af gult materiale, som elueredes mellem 4,15 og 4,4 liter af gradienten, indampedes til tørhed, hvorved der fremkom et udbytte på 20% af det ønskede konjugat, som ved analyse viste sig at indeholde 3,0 fosfatrester pr. riboserest.

Eksempel 5

Fremstilling af 2,4-dinitrophenyl-ATP-konjugat (8-stillingsderivat)

(8-[2-(2,4-Dinitrophenyl)aminoethyl]aminoadenosin-5'-triphosphat.

A. 8-(2-Aminoethyl)aminoadenosin-5'-monophosphat.

En reaktionsblanding bestående af 2,2 millimol 8-bromadenosin-5'-monophosphat fremstillet ved den i Arch. Biochem. Biophys. 163:561-9 (1974) beskrevne fremgangsmåde, 66 millimol ethylendiamin og 25 ml vand opvarmedes i et oliebad ved 140° i 2 timer. Den afkølede blanding indstilledes derefter til pH 11,5 med natriumhydroxid og førtes gennem en 2,5 x 55 cm søjle af Dowex 1 x 8 (200 - 400 mesh, bicarbonatform). Søjlen vaskedes med 300 ml vand

og derefter med en lineær gradient frembragt ud fra 3 liter vand og 3 liter 0,5 M ammoniumbicarbonat. Absorbansen for udløbet ved 254 nm målt, og en betydelig top af absorberet materiale elueredes mellem 4,6 og 5,8 liter af gradienten.

Ammoniumbicarbonat fjernedes ved gentagen fordampning (fem gange, 20-30 ml vand hver gang) til tørhed under vakuum, og den endelige remanens opløstes i 20 ml vand ved tilsætning af ammoniumhydroxid til pH 8,0. Opløsningen filtreredes, pH indstilledes til 5,0 med myresyre og fik lov at henstå ved 5°C i én dag. Krystaller, som dannedes, opsamledes, opløstes ved pH 8,0 og omkrystalliseredes ved pH 5,0 med myresyre og fik lov at henstå ved 5°C i én dag. Krystaller, som dannedes, opsamledes, opløstes ved pH 8,0 og omkrystalliseredes ved pH 5,0. Udbyttet af det ønskede mellemprodukt var 27%. Ved tyndtlagskromatografisk undersøgelse med et opløsningsmiddel bestående af 4 dele 0,5 M ammoniumacetat og 1 del ethanol vandrede produktet som en enkelt ninhydrinpositiv plet som udsukkede fluorescens. Det optiske absorptionsmaximum i 0,02 N saltsyre var 275 nm, og den millimolære ekstinktionskoefficient var 17,5, hvilke spektralegenskaber er ejendommelige for alkylerede 8-aminoadenosinderivater.

Beregnet for $C_{12}H_{20}N_7O_7P \cdot H_2O$:	C: 34,0; H: 5,33; N: 23,2
Fundet:	C: 34,1; H: 5,28; N: 23,9.

B. 8-[2-(2,4-Dinitrophenyl)aminoethyl]aminoadenosin-5'-monophosphat.

8-(2-Aminoethyl)aminoadenosin-5'-monophosphat fra del A i dette eksempel (0,64 millimol) opløstes i 20 ml vand ved tilsætning af natriumhydroxid til pH 8,0. Derefter tilsattes 168 mg natriumbicarbonat efterfulgt af 0,2 ml 1-fluor-4-dinitrobenzen (1,58 millimol opløst i 2 ml ethanol). Reaktionen omrørtes i 18 timer ved stuetemperatur, og derefter tilsattes 0,1 ml 1-fluor-2,4-dinitrobenzen i 1 ml ethanol. Efter omrøring i yderligere 4 indstilledes blandingens pH til 2,0 med saltsyre, og blandingen udhældtes i 200 ml kold acetone (-10°C). Det gule bundfald, som dannedes, opsamledes ved filtrering, opløstes i 200 ml vand og førtes gennem 2,5 x 45 cm søjl af DEAE-cellulose i bicarbonatform. Kromatogrammet udvikledes med en lineær saltgradient frembragt ud fra 2 l vand og 2 l 0,7 M ammoniumcarbonat. En top af gult materiale med et absorptionsmaksimum

ved 275 nm elueredes mellem 2 og 3 liter af gradienten. Ammoniumbicarbonat fjernedes fra dette materiale ved inddampning under vakuum, og udbyttet af det ønskede mellemprodukt var 37%. Optiske absorptionsmaksima målt i 0,02 N saltsyre viste sig ved 275 og 363 nm, og de millimolære ekstinktionskoefficienter var henholdsvis 21,8 og 15,5. Yderligere analyser viste 1,07 fosfatrest pr. riboserest.

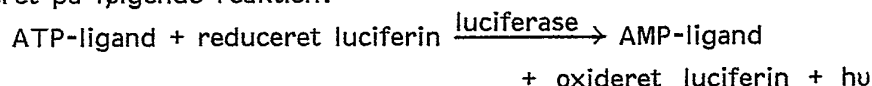
C. 2,4-Dinitrophenyl-ATP-konjugat.

Monophosphatmellemproduktet (0,5 millimol) omdannedes til tri-n-butylammoniumsaltet tilsætning af 0,8 millimol tri-n-butylamin. Blandingen tørredes ved gentagen fordampning fra tør dimethylformamid (fire gange, 10-5 ml hver gang). Slutremanensen opløst i 1 ml dimethylformamid blandedes med 2,0 millimol carbonyldiimidazol, også i 1 ml dimethylformamid, og fik lov at reagere ved stuetemperatur i 4 timer. Det overskydende carbonyldiimidazol blev nedbrudt ved omsætning med 15 µl methanol i 30 minutter. Endelig tilsattes 3 millimol tri-n-butylammoniumpyrophosphat i 4 ml dimethylformamid og fik lov at reagere i 20 timer. Den faste rest, som dannedes, fraskiltes ved centrifugering og vaskedes 2 gange med 5 ml portioner af dimethylformamid. De forenede supernatanter tilsattes til 200 ml vand, som derefter indstilledes til pH 8 og kromatograferedes på en 2,5 x 25 cm søjle af DEAE-cellulose på bicarbonatform. Kromatogrammet udvikledes med en lineær gradient frembragt ud fra 2 liter vand og 2 liter 0,5 M ammoniumbicarbonat. En top af gult materiale med optiske absorptionsmaksima ved 275 og 363 nm elueredes mellem 2,0 og 2,9 liter af gradienten. Ammoniumbicarbonatet fjernedes ved inddampning, hvorved der fremkom et udbytte af det ønskede konjugat på 22%. Analyseresultater viste, at dette produkt indeholdt 3,2 fosfatrester pr. riboserest.

Eksempel 6

Homogen kompetitiv bindings-bioluminescensanalyse for derivater af 2,4-dinitrophenyl; anvendelse af ATP som mærkningsstof.

Det i dette eksempel anvendte bioluminescensreaktionssystem var baseret på følgende reaktion:



A. Analyse med anvendelse af 6-stillingsderivat af ATP.

Der fremstilledes tre specifiktbindende reaktionsblandinger, hver med et samlet rumfang på 100 μ l og hver indeholdende 10 mM tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridpuffer ved pH 7,4, 10 mM ethylendiamintetraeddikesyre, 20 μ l 2,4-dinitrophenyl-antiserum, 512 nM 2,4-dinitrophenyl-ATP-konjugat (6-stillingsderivat, fremstillet ifølge eksempel 6) og 2,4-dinitrophenyl- β -alanin ved de i tabel 3 angivne koncentrationer. Efter inkubering ved 25°C i 2 timer analyseredes 10 μ l prøver af hver reaktionsblanding (med dobbeltbestemmelser) ved indsprøjtning i et rumfang på 0,1 ml af ovenstående lysgenererende opløsning, som i forvejen havde været inkuberet ved 25°C i mindst to minutter og var indeholdt i et reagensglas monteret i et Dupont Model 760 Bioluminescence Photometer (E.I. duPont de Nemours, Willmington, Delaware). Den maksimale lysintensitet aflæstes fra fotometeret. Den gennemsnitlige lysintensitet for hver reaktionsblanding beregnedes ligesom den relative intensitet (100% gange forholdet mellem prøvens gennemsnitlige lysintensitet og lysintensiteten i fravær af antiserum). Resultaterne er anført i tabel 3.

Tabel 3

Reaktions- blanding	Koncentration af 2,4-dinitrophenyl- β -alanin (μ M)	Gennemsnitlig maksimal lysintensitet
1	0	7
2	25	14
3	2500	185

B. Analyse med anvendelse af et 8-stillingsderivat af ATP.

Fire specifiktbindende reaktionsblandinger fremstilledes, hver med et totalt rumfang på 100 μ l og hver indeholdende 20 mM tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridpuffer ved pH 7,4, 10 mM ethylendiamintetraeddikesyre, 20 μ l 2,4-dinitrophenylantiserum, 594 nM 2,4-dinitrophenyl-ATP-konjugat (8-stillingsderivat, fremstillet ifølge eksempel 5) og 2,4-dinitrophenyl- β -alanin ved de i tabel 4 angivne koncentrationer. Efter inkubering ved 25°C i 2 timer gennemførtes dobbeltbestemmelser af 10 μ l prøver af hver reaktionsblanding som i ovenstående del A, og den gennemsnitlige maksimale lysintensitet beregnedes for hver prøve. Resultaterne er anført i tabel 4.

Tabel 4

Reaktions- blanding	Koncentration af 2,4-dinitrophenyl- β -alanin (μ M)	Gennemsnitlig maksimal lysintensitet
1	0	18
2	25	51
3	250	191
4	2500	190

Resultaterne af dette eksempel viser, at mærkningsstoffet, ATP, kan derivatiseres i forskellige stillinger af dets struktur til fremstilling af et brugbart konjugat til brug ved den specifikke bindingsanalysemetode ifølge opfindelsen.

Eksempel 7

Heterogen kompetitiv bioluminescens-bindingsanalyse for biotin; virkning af forskellige biotinindhold på den dannede maksimale lysintensitet.

Det i dette eksempel anvendte bioluminescensreaktionssystem var baseret på de i eksempel 3 viste reaktioner.

A. Fremstilling af en lysgenererende opløsning.

En lysgenererende opløsning fremstillede som i eksempel 3.

B. Fremstilling af uopløseliggjort bindingspartner.

Avidin, som har bindingsaffinitet for biotin, blev uopløseliggjort ved at blive covalent bundet til vanduopløseligt polymert kuglemateriale på følgende måde. En portion Sepharose 4B (som leveres fra Pharmacia AB, Uppsala, Sverige) aktiveredes til binding til avidin under anvendelse af den af March m.fl. i Analytical Biochemistry 60:149 (1974) beskrevne fremgangsmåde. Ca. 4 ml af det aktiverede "Sepharose 4B" suspenderedes i 8 ml 0,1 M citratpuffer med pH 7,0. Til suspensionen sættes 6 mg avidin med en aktivitet på 9,9 enheder/mg i 3 ml vand. Én enhed avidinaktivitet er den mængde avidin, som er i stand til at binde 1 μ g biotin. Den fremkomne reaktionsblanding omrørtes i 6 timer ved 7°C. Det avidinbundne Sepharose 4B filtreredes derefter, vaskedes med 100 ml 0,1M natriumbicarbonatpuffer ved

pH 9,0 og resuspenderedes i 240 ml 0,1 M tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridpuffer med pH 8,0.

C. Kontrolforsøg.

Der fremstilledes ni specifiktbindende reaktionsblandinger, hver med et samlet rumfang på 0,19 ml og hver indeholdende 0,1 M tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridpuffer med pH 8,0, 0,6M ethanol, 0,01 M semicarbazidhydrochlorid, og de i tabel 10 angivne respektive mængder eller koncentrationer af NAD, NAD-biotinkonjugat, avidin-bundet "Sephadex 4B" suspension (fremstillet ifølge del B i dette eksempel) og "Sephadex 4B" suspension (fremstillet ved suspension af 1 ml pakket Sephadex 4B i 60 ml 0,1 M tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridpuffer med pH 8,0). Reaktionsblandingerne rystedes derefter forsigtigt i 15 minutter ved stuetemperatur. Derefter tilsattes 0,22 internationale enheder alkoholdehydrogenase til hver reaktionsblanding til initiering af reduktionsreaktionen. Semicarbazid reagerer med det ved reaktion (c) dannede acetaldehyd under dannelse af en semicarbazon, og dermed drives reaktion (c) i den ønskede retning.

Reaktionsblandingerne omrystedes igen i 15 minutter ved stuetemperatur. En 10 µl prøve af supernatanten fra hver reaktionsblanding indsprøjtedes derpå i en separat kuvette monteret i et Dupont Model 760 Bioluminescence Photometer (E.I. duPont de Nemours, Wilmington, Delaware) indeholdende 100 µl af den tidligere fremstillede lysgenererende opløsning, som var blevet præinkuberet i 2-3 minutter ved 25°C. Resultaterne ses i tabel 5.

Tabel 5

Reaktion	Koncentration af	Koncentration af	Avidinbundet		Sepharse 4B suspension (µl)	Maksimal lysintensitet
	NAD (nM)	NAD-biotinkonju- gat (nM)	Sepharse 4B suspension (µl)			
1	-	-	-	-	-	1,2
2	21	-	-	-	-	159
3	21	-	20	-	-	147
4	-	10	-	-	-	45,9
5	-	21	-	-	-	110
6	-	21	20	-	-	28,5
7	21	-	-	10	-	154
8	-	21	-	10	-	114
9	-	-	20	-	-	1,6

Resultaterne af kontrolreaktionerne 1 og 9 viser, at der i fravær af NAD og NAD-biotinkonjugat dannedes meget lidt lys. Reaktionen 2 og 3 gav resultater, som indikerer, at den lysdannende reaktion forekom efter tilsætning af frit NAD, og at denne reaktion var stort set upåvirket af tilstedeværelsen af avidinbundet Sepharose 4B. Resultaterne af reaktionerne 4, 5 og 6 viser, at NAD-biotinkonjugatet var aktivt i den lysproducerende reaktion, at den dannede maksimale lysintensitet øgedes, jo mere NAD-biotinkonjugat, der var til stede, og at tilstedeværelsen af avidinbundet Sepharose 4B inhiberede lysdannelsen. Sammenligning af resultaterne for reaktionerne 3 og 5 med resultaterne for 7 og 8 viser, at den lysproducerende reaktion ikke påvirkedes af tilstedeværelsen af ikke-modificeret Sepharose 4B.

D. Analysemetode.

Yderligere fem specifiktbindende reaktionsblandinger fremstilledes, hver med et rumfang på 0,19 ml og hver indeholdende 0,1 M tris-(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridpuffer med pH 8,0, 0,6 M ethanol, 0,01 semicarbazid og de i tabel 6 angivne respektive mængder eller koncentrationer af NAD-biotinkonjugat, frit biotin og avidinbundet Sepharose 4B suspension. Hver reaktionsblanding behandledes på samme måde som kontrolreaktionsblandingerne i del C i dette eksempel. Resultaterne er anført i tabel 6.

Tabel 6

Reaktion	Koncentration af NAD-biotinkonju- gat (nM)	Koncentration af biotin (nM)	Avidinbundet Sepharse 4B suspension (µl)	Maksimal lysintensitet
10	21	-	-	79,1
11	21	-	20	17,4
12	21	79	20	43,1
13	21	158	20	59,9
14	21	158	-	79,7

Resultaterne af reaktionerne 11, 12 og 13 viser, at frit biotin og NAD-biotinkonjugat konkurrerer om bindingspladserne på det uopløseliggjorte avidin eftersom den dannede maksimale lysintensitet afhang af den tilstedeværende mængde af frit biotin. Reaktionerne 10 og 14 gav resultater, som indicerer, at den dannede maksimale lysintensitet i fravær af uopløseliggjort avidin var konstant for meget forskellige koncentrationer af frit biotin.

Det påvistes således i dette eksempel, at mængden af NAD-biotinkonjugat i væskefasen var omvendt forbundet med den tilstedeværende mængde fri biotin, og dermed er analysemetoden og -midlet ifølge opfindelsen anvendeligt til bestemmelse af en ligand i en ukendt væskeprøve.

P a t e n t k r a v

1. Specifik bindings-analysefremgangsmåde til analyse af et væskeformigt medium for en ligand af typen: antigener og hertil svarende antistoffer, haptener og hertil svarende antistoffer samt hormoner, vitaminer, metabolitter og farmakologiske midler samt deres receptorer og bindingssubstanser, hvilken fremgangsmåde omfatter:

- 1) at det væskeformige medium kontaktes med reagensmidler, der omfatter et mærket konjugat, hvorved der dannes en bundet form af det mærkede konjugat og en fri form af det mærkede konjugat, hvorhos forholdet mellem den resulterende bundne form af det mærkede konjugat i relation til den frie form er en funktion af ligandens koncentration i det væskeformige medium, og
- 2) at mængden af mærkningssubstans i den resulterende bundne form eller den resulterende frie form bestemmes,

k e n d e t e g n e t ved, at der som mærkningssubstans anvendes et coenzym.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at aktiviteten af det som mærkningssubstans benyttede coenzym i den bundne form er forskellig fra den i den frie form.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at fremgangsmåden er af den homogene type, ved hvilken coenzymaktiviteten i den væskeformige reaktionsblanding måles, uden at den bundne og den frie form af det mærkede konjugat adskilles.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at fremgangsmåden er af den heterogene type, ved hvilken den resulterende bundne og frie form af det mærkede konjugat adskilles, og coenzymaktiviteten måles på en af dem.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at coenzymet er et nucleotid-coenzym.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at coenzymet er et adenosinphosphat, et nicotinamidenindinucleotid eller dets reducerede form, eller et nicotinamidenindinucleotidphosphat eller dets reducerede form.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at coenzymet er adenosintriphosphat.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at coenzymet er flavinadenindinucleotid.

9. Reagensmiddel til anvendelse ved den specifikke bindings-analysefremgangsmåde ifølge krav 1, hvilket reagensmiddel omfatter:

- 1) et konjugat af en mærkningssubstans og liganden eller en specifik bindingsanalog hertil, og
- 2) en bindingspartner til liganden

k e n d e t e g n e t ved, at den benyttede mærkningssubstans er et coenzym.

10. Reagensmiddel ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at coenzymet er et nucleotid-coenzym.

11. Reagensmiddel ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at coenzymet er et adenosinphosphat, et nicotinamidadenindinucleotid eller dets reducerede form, eller et nicotinamidadenindinucleotidphosphat eller dets reducerede form.

12. Reagensmiddel ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at coenzymet er adenosintriphosphat.

13. Reagensmiddel ifølge krav 9, k e n d e t e g n e t ved, at coenzymet er flavinadenindinucleotid.

Fremdragne publikationer:

DE offentliggørelsesskrift nr. 2305775.
Nature 219 (1968), side 186-189.