



(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) **NO**

(11) **172459**

(13) **B**

(51) Int Cl⁵ G 01 N 33/566, 33/543, 33/545, 33/531

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	874937	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	26.11.87	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	26.11.87	(30) Prioritet	09.12.86, US, 939902
(41) Alm. tilgj.	10.06.88		
(44) Utlegningsdato	13.04.93		

(71) Patentsøker Miles Inc, 1127 Myrtle Street, Elkhart, IN 46515, US
(72) Oppfinner Richard D. Johnson, Elkhart, IN, US
H.-Volker Runzheimer, Bergisch-Gladbach, DE
Ronald G. Sommer, Elkhart, IN, US
Kin-Fai Yip, Elkhart, IN, US
(74) Fullmektig Bryns Patentkontor AS, Oslo

(54) **Benevnelse** **Stabil immobilisert haptentreagens for anvendelse i heterogene immunometriske analyser, samt anvendelse derav**

(56) **Anførte publikasjoner** Ingen

(57) **Sammendrag** Immobilisert haptentreagensfor anvendelse i en spesifikk bindingsanalyse for bestemmelsen av en haptent eller bindende analog derav i en flytende prøve og fremgangsmåter for fremstilling og anvendelse av den immobiliserte haptentreagensen er beskrevet. Den immobiliserte haptentreagensen innbefatter en haptent-enhet kovalent bundet i det vesentlige bare til den ytre overflaten av en polyakrylamidgelpartikkel. Den immobiliserte haptentreagensen fremstilles ved å danne en reaksjonsblanding innbefattende haptent-enheten og bærer materialet i et ikke-svellende oppløsningsmiddel hvori gelpartikkelen er i det vesentlige ugjenomtregelig for haptent-enheten og hvori en analytisk ubetydelig mengde av haptent-enheten er ikke-spesifikt bundet til gelpartikkelen. Den immobiliserte haptentreagensen er kjennetegnet ved at den er i det vesentlige stabil i vandige oppløsninger og viser et ubetydelig omfang av lekkasje av haptent-enheten inn i et flytende forsøksmedium.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en stabil, immobilisert haptenreagens for bruk i den spesifikke bindingsanalysebestemmelsen av en hapten eller bindingsanalog derav i en væskeformig testprøve, hvor reagensen omfatter en gelpartikkel som er svellbar i vann og har flere haptendeler bundet dertil. Oppfinnelsen vedrører videre anvendelse av den nevnte reagensen i analyse av hapten, eller en analog derav, i en væskeformig testprøve.

Forskjellige heterogene spesifikke bindingsanalyser har blitt utviklet som generelt innbefatter spesifikke bindende vekselvirkninger mellom analytten som skal detekteres, en spesifikk bindende partner for analytten og en merket reagens, som kan være lik eller forskjellig fra den bindende partneren for analytten. Når slike analyser utføres blir den merkede reagens bundet til den tilsvarende bindende partner slik at det genereres et bundet spesies, eventuelle deler av den merkede reagensen som ikke bindes på denne måten blir de frie spesies, hvori omfanget av binding er en funksjon av mengden analytt tilstede. Der hvor den detekterbare responsen av den merkede reagensen er i det vesentlige uadskillelig fra de bundne spesies og de frie spesies er det nødvendig å fysisk separere slike bundne og frie spesies fra hverandre for effektivt å bestemme mengden analytt tilstede. Når følgelig først de bundne og frie spesies av den merkede reagensen er separert fra hverandre bestemmes mengden av merket tilstede i en hvilken som helst fraksjon derav ved å måle aktiviteten av det spesielle merket av den merkede reagensen og korrelere slik aktivitet med mengden analytt tilstede.

Den fysikalske separasjonen av de bundne spesies fra de frie spesies kan utføres på mange måter. I den heterogene spesifikke bindingsanalysen som er kjent som den immunometriske analysen innbefatter den merkede reagensen en merket form av et anti-analytt antistoff. Ifølge en slik fremgangsmåte oppnås separasjon av den frie merkede reagensen fra den

bundne merkede reagensen ved tilsats av en immobilisert form av analytten som skal bestemmes eller en analog derav som vil binde seg med antistoffet av den frie merkede reagensen. For eksempel beskriver U.S. patent 4,200,436 en immunoanalyse for deteksjon av antigen ved anvendelse av en immobilisert form av antigenet som skal måles for å separere de bundne og frie formene av et merket enverdig antistoff til antigenet. Den immobiliserte formen av antigenet fremstilles ved kjemisk binding eller fysikalsk absorpsjon av antigenet til faste bærere eller bærermaterialer, så som polysakkarider eller plaster, ved fremgangsmåter som er kjente innen teknikken.

Tilsvarende beskriver U.S. patent 4,551,426 en heterogen immunoanalyse for haptenet digoksin ved anvendelse av en immobilisert form av ouabain (en digoksin analog) for å separere de bundne og frie formene av et anti-digoksin merket antistoff. Den immobiliserte formen av ouabain fremstilles ved å kople ouabain, enten direkte eller via en avstandsgiverarm, så som et protein, en polyamino-syre, eller syntetisk linker, til et bærermateriale, så som agaroseperler, dekstranperler, polyakrylamid eller glass, ifølge fremgangsmåter som er kjente innen teknikken.

Slike bærermaterialer resulterer imidlertid, sammen med fremgangsmåtene som anvendes for å koble den ønskede analytten eller analogen derav (ligand) til slike bærermaterialer, i relativt ustabile reagenser, reagenser som viser betydelig frigivelse eller lekkasje av liganden inne i den omgivende væsken når det benyttes i en immunoanalyse som beskrevet ovenfor. Slik instabilitet antas å være resultatet av en instabilitet i bindingen mellom liganden og bæreren, så vel som ikke-spesifikk binding av liganden til bærer materialet. Slik instabilitet av bindingen og ikke-spesifikk binding av ligand resulterer i at en betydelig mengde av liganden langsomt frigis eller lekker inn i det omgivende mediet. Slik lekkasje av liganden inn i forsøksmediet finner hovedsakelig sted som et resultat av at liganden er ikke-spesifikt

bundet til indre eller ytre deler av bærer materialet. Selv om det er uheldig kan ligand som er ikke-spesifikt bundet til den ytre overflaten fjernes ved vasking av bærer materialet med en vandig vaskeoppløsning før anvendelse i en analyseprosedyre. Imidlertid kan ligand som er ikke-spesifikt bundet til indre deler ikke effektivt fjernes og slik internalisert ligand lekker ut fra det indre av bærer materialet og inn i forsøksmediet hvor det kan være i det vesentlige uadskillelig fra analytten fra en forsøksprøve og fritt til å binde seg med den merkede reagensen, hvilket resulterer i en unøyaktig måling av mengden analytt som virkelig er tilstede i prøven.

Syntesen og anvendelsen av bærer materialer, spesielt tverrbundne polymerbærere, som har kjemiske strukturer som er fysiokjemisk kompatible med ryggradstrukturen for et peptid er også beskrevet for anvendelse i peptidsyntese i fast fase. Spesielt har teknikken for kobling av peptider til en polymer (Stahl, et al., J. Amer. Chem. Soc., bind 101 (18) side 5383 (1979)) og kryssbinding av forskjellige polymerer (Varadara-jan, et al., Biopolymers, bind 22, s. 839 (1983)) ved anvendelse av revers-fase suspensjonspolymerisasjon i vandige organiske oppløsningsmiddelblandinger vært anvendt for å oppnå fordelaktige svellingsegenskaper av slike bærer materialer for å tilveiebringe forøkede ytre og indre reaksjonsseter.

Følgelig er det et formål ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en immobilisert haptentreagens som er stabil i vandige oppløsninger og som ikke langsomt frigir eller lekker ut haptent i en omgivende vandig oppløsning.

Et annet formål ved foreliggende oppfinnelse er å gi anvisninger til anvendelse av den omtalte reagensen ved analyser.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en stabil, immobilisert haptentreagens for bruk i den spesifikke bindingsanalysebestemmelsen av en haptent eller bindingsanalog derav i en væskeformig testprøve, hvor reagensen omfatter en
5 gelpartikkel som er svellbar i vann og har flere haptendeler bundet dertil, kjennetegnet ved at reagensen er fremstilt ved trinnene:

(a) omsetning av en haptendel med en polyakrylamidgelpartikkel innbefattende flere ytre og indre kjemisk aktive funksjonelle grupper, hvor reaksjonen utføres i et organisk
10 oppløsningsmiddel som er vesentlig fritt for vann og hvori gelpartikkelen er i det vesentlige ikke-svellet og under slike betingelser at det dannes en kovalent binding mellom haptendelen og nevnte ytre aktive funksjonelle grupper som er vesentlig stabile i vandig oppløsning;

(b) vasking av gelpartikkelen fra trinn (a) med et organisk oppløsningsmiddel som er vesentlig fritt for vann og hvori gelpartikkelen er vesentlig ikke-svellet;

(c) vasking av gelpartikkelen fra trinn (b) med en vandig
20 oppløsning; og

(d) isolering av den immobiliserte haptentreagensen fra trinn (c) innbefattende nevnte gelpartikkel og nevnte haptendeler bundet dertil hvor vesentlig alle nevnte bundne haptendeler er kovalent bundet til de funksjonelle gruppene på den ytre
25 overflaten ved hjelp av en bindingsgruppe som er vesentlig stabil i vandige oppløsninger.

Den immobiliserte haptentreagensen er i det vesentlige stabil i vandig omgivelse for anvendelse i en spesifikk bindingsanalyse, spesielt en immunoanalyse, for bestemmelse av en
30 haptent eller bindende analog derav i en flytende prøve. Den immobiliserte haptentreagensen innbefatter et bærer materiale bestående av en polyakrylamid gelpartikkel og et stort antall haptenenheter bundet dertil. Gelpartikkelen innbefatter et stort antall ytre og indre funksjonelle grupper på
35 de indre og ytre overflatene av gelpartiklene, hvori i det vesentlige alle de bundne haptenenhetene er kovalent bundet

til de funksjonelle gruppene på den ytre overflaten ved hjelp av en forbindende gruppe som er i det vesentlige stabil i vandige oppløsninger, spesielt immunoanalyseforsøksmedier, og en analytisk ubetydelig mengde av haptens enheten forblir ikke-spesifikt bundet til bærer materialet. Følgelig forblir i det vesentlige all haptens enhet kovalent bundet til bærer materialet under utførelsen av en immunoanalyse, og bare en ubetydelig mengde, om noen, av haptens enheten dissosierer eller lekker fra bærer materialet inn i forsøksmediet.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av den ovenfor omtalte reagensen i analyse av haptens, eller en analog derav, i en væskeformig testprøve.

Gelpartikkelen er i det vesentlige usvellbar når den omsettes med haptens enheten i nærvær av det ikke-svellende oppløsningsmiddelet og er følgelig i det vesentlige ugjennomtrengelig for haptens enheten, og den kovalente bindingen derav er i det vesentlige begrenset bare til de funksjonelle gruppene på den ytre overflaten av gelpartikkelen. Eventuelle deler av haptens enheten som blir ikke-spesifikt bundet til den ytre overflaten av gelpartikkelen i trinn (a) fjernes med de ikke-svellende og vandige vaskeoppløsningene fra henholdsvis (b) og (c).

Den immobiliserte haptens reagensen er spesielt nyttig i en heterogen spesifikk bindingsanalyse innbefattende binding mellom en haptens eller bindende analog derav og en merket reagens innbefattende en merket bindende partner for haptens eller analog derav, hvori det er nødvendig å fysikalsk separere eventuelt merket reagens som blir bundet til haptens eller bindende analog derav fra den merkede reagensen som ikke bindes på denne måten. Eventuelle deler av den merkede reagensen som ikke bindes til haptens eller den bindende analogen derav fra forsøksmediet separeres fra den bundne merkede reagensen ved binding til haptens av den immobiliserte haptens reagensen hvori omfanget av binding er en

funksjon av mengden haptent eller bindende analog derav tilstede i en flytende prøve.

Figur 1 er en grafisk fremstilling som illustrerer doseresponsen på digoksin generert i en immunoanalyse ved anvendelse av digitoksingenin som haptent-enheten i en immobilisert haptentreagens ifølge foreliggende oppfinnelse.

Figur 2 er en grafisk fremstilling som illustrerer reaktiviteten av en immobilisert glykopeptidreagens ifølge foreliggende oppfinnelse i en immunoanalyse for bestemmelse av mengden av glykosylert hemoglobin HbA1c i en prøve av fullblod.

Den immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes i konvensjonelle heterogene spesifikke bindingsanalysemetoder, spesielt heterogene enzymimmunoanalyser, innbefattende binding mellom en haptent eller bindende analog derav og en merket reagens innbefattende en merket form av en spesifikk bindende partner for haptenten eller bindende analog derav. Videre kan haptentkomponenten av den immobiliserte haptentreagensen varieres for anvendelse i slike spesifikke bindingsanalyser for deteksjon av enhver haptent eller bindende analog derav for hvilken det finnes en spesifikk bindende partner i biologiske systemer, eller hvor en slik kan syntetiseres. I tilfeller hvor den spesifikke bindende partneren for haptenten eller bindende analog derav er en anti-haptent, så som et antistoff til haptenten eller fragment derav, betegnes en slik bindingsanalysefremgangsmåte som en immunometrisk fremgangsmåte.

Ifølge slike heterogene spesifikke bindingsanalysefremgangsmåter, spesielt den immunometriske fremgangsmåten, er haptenten eller den bindende analogen derav som detekteres generelt kombinert med den merkede reagensen slik at det dannes en reaksjonsblanding hvori den merkede reagensen bindes til haptenten som detekteres. Omfanget av slik binding

bestemmes deretter og relateres med haptenen som bestemmes.

Forholdet mellom mengden av merket reagens bundet til haptenen som detekteres (det vil si bundet spesies) og mengden av merket reagens som ikke er bundet på denne måten (det vil si frie spesies) er en funksjon av mengden av haptentilstede. Idet signalene som genereres av merket av den merkede reagensen fra både bundet og frie spesies derav ikke kan skilles fra hverandre er det nødvendig å fysikalsk separere de frie spesies fra de bundne spesies for å tillate uavhengig bestemmelse av mengden merke tilstede i den ene eller den andre, denne bestemmelsen kan deretter korreleres med mengden haptentilstede.

Den immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse er spesielt nyttig for separasjonen av de frie spesies av et merket anti-haptentantistoff fra de bundne spesies av et slikt anti-haptentantistoff i en spesifikk bindingsanalyse hvori de frie spesies bindes til, og immobiliseres av, den immobiliserte haptentreagensen slik at det nødvendige separasjonstrinnet oppnås. Spesielt omfatter den immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse et bærer materiale i form av en egnet funksjonalisert polyakrylamid-genpartikkel og et stort antall haptentenheter bundet dertil. Gelpartikkelen innbefatter et stort antall ytre og indre funksjonelle grupper, og i det vesentlige alle de bundne haptentenheter er kovalent bundet i det vesentlige bare til de ytre overflategruppene av gelpartikkelen ved hjelp av en forbindende gruppe. Den forbindende gruppen tilveiebringer en kovalent binding som er i det vesentlige stabil i vandige oppløsninger, spesielt i vandige oppløsninger innbefattende det flytende forsøksmediet av en immunoanalyse, hvori haptentenheter forblir kovalent bundet til bærer materialet under utførelsen av en immunoanalyse for effektivt å separere de frie spesies fra de bundne spesies. Det skal understrekes at slik stabilitet i vandige omgivelser forhindrer dissosiering av haptentenheter fra bærer materia-

let, og følgelig, utlekking av haptten-enheten inn i forsøksmediet hvilket resulterer i nedsatt analysefølsomhet og nøyaktighet, hvilket skal beskrives i større detalj nedenfor.

5 Ifølge en foretrukket utførelse er den immobiliserte hapttenreagensen spesielt nyttig i en immunoanalyse for deteksjon av digoksin i en flytende prøve. Den merkede reagensen innbefatter et enzym-merket enverdig antistoff-fragment avledet fra et monoklonalt antistoff mot digoksin, 10 fortrinnsvis Fab' fragmentet av et monoklonalt IgG antistoff til digoksin, generelt ved oppnådd ved fremgangsmåter som er kjente innen teknikken, og merket med et enzym, fortrinnsvis β -D-galaktosidase. Fortrinnsvis er den merkede reagensen elektroforetisk rensset på en elektroforetisk polyakrylamidgel 15 slik at det oppnås et i det vesentlige rent monokonjugatpreparat derav innbefattende en enkelt enverdig antistoff-fragmentkomponent kovalent bundet til en enkelt enzymkomponent ifølge fremgangsmåten beskrevet i U.S. patent 5,047,324.

20 Immunoanalysen for digoksin utføres ved å omsette den merkede reagensen, fortrinnsvis monokonjugatpreparater derav, med en prøve inneholdende digoksin, og deretter tilsette den immobiliserte hapttenreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse innbefattende digoksin eller en analog derav, så som digitoksigenin, 25 kovalent bundet til aminergruppene på den ytre overflaten av et amin av et amin-funksjonalisert polyakrylamidbæreremateriale ved hjelp av en forbindende gruppe, hvilket skal beskrives i større detalj nedenfor. Haptten-enheten av slik immobilisert hapttenreagens kan innbefatte 30 digoksin eller en analog derav, så som digitoksigenin. Digoksin fra den flytende prøven bindes til antistoff-fragmentet av den merkede reagensen slik at det bundne spesies derav dannes, og eventuelt fritt spesies fra den merkede reagensen som ikke bindes til digoksin fra prøven 35 bindes til den immobiliserte hapttenreagensen for immobilisering og etterfølgende separasjon derav fra de bundne spesies, hvorved de bundne spesies forblir i oppløsning og de frie

spesies sedimenterer ut fra oppløsningen. Mengden digoksin i prøven bestemmes deretter ved å måle enzymaktiviteten av de bundne spesies av den merkede reagensen.

5 Ifølge en annen foretrukket utførelse av foreliggende oppfinnelse innbefatter den immobiliserte haptentreagensen en glykosylert peptidsekvens, for eksempel svarende til den glykosylerte N-terminale peptidsekvensen i β -underheten av human hemoglobin (glykopeptid), kovalent bundet til de ytre
10 overflate sulfhydrylgruppene av et polyakrylamid-sulfhydryl avledet bærer materiale, for eksempel som beskrevet i europeisk patent 270,949, som er nyttig i en immunoanalyse for bestemmelse av HbA1c. Den merkede reagensen innbefatter et enverdig antistoff-fragment avledet fra et monoklonalt
15 antistoff som er spesifikt for den glykosylerte N-terminale peptidsekvensen i β -underenheten av humant hemoglobin (se europeisk patentpublikasjon nr. 185,870) merket med β -D-galaktosidase og renset til et monokonjugat preparat derav som beskrevet ovenfor, og mengden HbA1c i den flytende prøven
20 bestemmes ved å måle enzymaktiviteten av de bundne spesies av den merkede reagensen.

Måling av enzymaktiviteten i slike immunoanalyser utføres ved å fjerne en porsjon av supernatant og avsette porsjonen på en
25 reagenspute inkorporert med et kromogent substrat for enzymmerket, så som resorufin- β -D-galaktopyranosid, o-nitrofenol- β -D-galaktopyranosid eller, mer foretrukket, et kromogent akridinon enzymsubstrat for β -D-galaktosidase innbefattende en 7-hydrokso-9H-akridin-1-on kromogen avledet
30 med en β -D-galaktose rest, så som beskrevet i europeisk patent 270,946. Det detekterbare signalet som genereres ved interaksjonen mellom enzymet og det kromogene substratet måles deretter for eksempel med et reflektansfotometer, og korreleres med mengden haptentilstede i den flytende prøven.

35 Det skal understrekes at for å tilveiebringe en meget følsom immunoanalyse for nøyaktig bestemmelse av mengden haptent

tilstede i en flytende prøve bør ikke-spesifikk binding av haptten-enheten til bærer materialet minimaliseres. Slik ikke-spesifikk bundet haptten-enhet vil ellers resultere i dissosiering av haptten-enheten fra bærer materialet og langsom frigivelse eller utlekking derav i det flytende immunoanalyseforsøksmediet som et fritt haptenspesies som konkurrerer med hapttenen fra prøven om binding til den merkede reagensen. Følgelig tilveiebringer merket av den merkede reagensen bundet til slik dissosiert haptten-enhet et bakgrunnsignal som vil interferere med deteksjonen av signalet som tilveiebringes av merket av den merkede reagensen bundet til hapttenen fra prøven, hvilket resulterer i en unøyaktig bestemmelse av hapttenen som detekteres i prøven.

Følgelig er et viktig trekk ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en immobilisert hapttenreagens som er i det vesentlige stabil i vandige oppløsninger og som innbefatter en haptten-enhet kovalent bundet i det vesentlige bare til den ytre overflaten av et egnet bærer materiale i form av funksjonalisert polyakrylamidgelpartikkel, med bare en analytisk ubetydelig mengde, om noe, av haptten-enheten ikke-spesifikk bundet dertil.

Ifølge foreliggende oppfinnelse oppnås kontroll av ikke-spesifikt bundet haptten til akseptable grenser ved å omsette haptten-enheten med et bærer materiale innbefattende en egnet funksjonalisert eller avledet polyakrylamidharpiks i et ikke-svellende oppløsningsmiddel i nærvær av en forbindende gruppe som danner en i det vesentlige stabil, kovalent binding derimellom slik at det tilveiebringes en immobilisert hapttenreagens som er i det vesentlige stabil i vandige oppløsninger. Det ikke-svellende oppløsningsmiddelet begrenser omfanget av kovalent binding i det vesentlige bare til de funksjonelle gruppene på den ytre overflaten av bærer materialet, hvilket skal beskrives i større detalj nedenfor.

(a) Bærermateriale.

Ifølge en foretrukket utførelse av foreliggende oppfinnelse er bærer materialet for den immobiliserte haptentreagensen en aminoetyl-avledet polyakrylamidharpiks, som generelt er
5 svellbar i vandige oppløsninger og som kan fremstilles ved fremgangsmåter som er kjente innen teknikken. Ifølge slike fremgangsmåter fremstilles en polyakrylamidharpiks først ved kopolymerisasjon av akrylamid og N,N'-metylenbisakrylamid [S. Hjerten og R. Mosbach, Anal. Chem., bind 3, s. 109 (1962)],
10 slik at det, under egnede betingelser, dannes tverrbundne polyakrylamidkjeder, etterfulgt av behandling med vannfritt etylen-diamin [J.K. Inman og H.M. Dintzis, Biochemistry, bind. 8, s. 4074 (1969)] slik at det oppnås en aminoetyl-avledet polyakrylamidgel innbefattende et stort antall
15 aminfunksjonelle grupper for anvendelse som bærer materiale for den immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse. I tillegg til avledningen av polyakrylamidet med amin-funksjonelle grupper ved direkte aktivering av polyakrylamidharpiksen som beskrevet ovenfor, kan akrylamid
20 og metylenbisakrylamid kopolymeriseres med for eksempel akrylsyre-estere av N-hydroksysuksinimid eller N-hydroksyftalimid som deretter lett kan omsettes med haptener inneholdende primære aminofunksjoner, så som en aminoheksylgruppe, som erstatter den aktive esteren i harpiksen slik at den
25 immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringes [se J.K. Inman, Methods in Enzymology, bind 34B, s. 30-58 (1974); G.L. Stahl, et al., J. Org. Chem. bind 44, s. 3424 (1979); G.L. Stahl, et al., J. Amer. Chem. Soc., bind 101, s. 5383 (1979)].

30 Den aminoetyl-avlede polyakrylamidgelen er spesielt foretrukket på grunn av dens høye kapasitet for binding eller immobilisering av haptent, så vel som de lave ikke-spesifikke adsorpsjonsegenskapene. Videre er gelen også kommersielt
35 tilgjengelig (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, U.S.A.) og har forskjellige aminoetyl kapasiteter, generelt fra mellom 1.0 til 2.0 milli-ekvivalenter pr. gram av tørr harpiks.

Gelen har også et foretrukket pH område fra pH 2.0 til pH 10.0, og er mottagelig for hydrolyse av amidsidegrupper ved høyere eller lavere pH-verdier.

5 Ifølge en annen utførelse er bærer materialet for den immobiliserte haptentreagensen en ny polyakrylamid-sulfhydrylgel som, som funksjonelle grupper, har et stort antall sulfhydrylgrupper, som beskrevet i større detalj i U.S. patentsøknaden med tittelen "Tverrbundet polyakrylamid-sulfhydrylgel og sulfhydryl-funksjonaliserte derivater derav" 10 (Sak nr. MS-1478), inngitt samtidig med foreliggende søknad. Polyakrylamid-sulfhydrylgelen fremstilles ved fri radikal polymerisasjon av akrylamid, bisakrylamid og N,N'-bisakrylylcystamin og er spesielt nyttig for fremstillingen av en immobilisert glykopeptidreagens for anvendelse i immuno-analysebestemmelsen av den glykosylerte formen av hemoglobin 15 kjent som HbA_{1c}. Det skal også understrekes at polyakrylamid-sulfhydrylgelen er tilsvarende svellbar i vandige oppløsninger. Svellingsegenskapene kan kontrolleres ved forholdet mellom monomerer som anvendes, graden av tverrbinding og den spesielle tverrbindingsgruppen, og de aktive funksjonelle 20 gruppene.

Generelt innbefatter den fysikalske strukturen av polyakrylamid-gelpartiklene tverrbundne polyakrylamid-kjeder som 25 definerer et ytre overflateareal og et indre overflateareal hvori tilgjengeligheten av haptene-enheter og andre reagenser til det indre overflatearealet er begrenset når gelpartikkelen er usvellet som beskrevet tidligere. Det skal understrekes at svellingsegenskapen for gelpartikkelen er resul- 30 tater av det strukturelle nettverket av de tverrbundne polyakrylamidkjedene som resulterer i en generelt porøs natur for gelpartikkelen. Når følgelig gelpartikkelen er usvellet holdes polyakrylamidkjedene tett sammen ved hjelp av tverrbindingsgruppene slik at det oppstår en effektiv porestrø- 35 else som er mindre enn, og ugjennomtrengelig for, haptene-enheter eller andre reagenser slik at gjennomtrengning og

internalisering derav i det indre overflatearealet av
gelpartikkelen forhindres. Partikkelen innbefatter videre et
stort antall av deres respektive kjemisk aktive funksjonelle
grupper ved den ytre og den indre overflaten som er essensi-
5 elle for dannelsen av en stabil, kovalent binding mellom
haptene-enheten og partikkelen ved hjelp av en forbindelses-
gruppe, hvilket skal beskrives i større detalj nedenfor. Det
skal understrekes i tilfeller hvor en kovalent binding ikke
dannes mellom haptene-enheten og en funksjonell gruppe av
10 partikkelen er det sannsynlig at en slik haptene-enhet blir
ikke-spesifikt bundet til partikkelen ved hjelp av ikke-
spesifikke bindende vekselvirkninger, så som ved ioniske og
hydrofobe bindingsvekselvirkninger og lignende. Slik ikke-
spesifikk binding av haptene-enhet til en partikkel resulterer
15 i en høy grad av dissosiering av slik ikke-spesifikk bundet
haptene-enhet fra bærer materialet og etterfølgende utlekking
eller langsom frigivelse derav under forsøksbetingelsene for
immunoanalysen eller andre vandige omgivelser.

20 Selv om en i det vesentlige stabil, kovalent binding kan
dannes mellom haptene-enheten og de funksjonelle gruppene som
beskrevet ovenfor i enten vandige omgivelser eller organiske
omgivelser, er anvendelsen av et ikke-svellende oppløsnings-
middel foretrukket ved foreliggende oppfinnelse for å oppnå
25 det minst mulige omfanget av ikke-spesifikk binding av
haptene-enheten til gelpartikkelen og, nærmere bestemt, i det
vesentlige bare til den ytre overflaten derav. Spesielt
resulterer den høye hydrofilisiteten av partikkelen i uønsket
svelling av gelen og økning av gjennomtrengningen eller
30 internaliseringen av haptene-enheten og andre reagenser i
gelpartikkelen i en vandig oppløsning, mens det forekommer i
det vesentlige ingen oppsvelling eller medfølgende økning i
slik gjennomtrengning eller internalisering i en organisk
oppløsning eller i et oppløsningsmiddel som inneholder lite
35 eller intet vann. Følgelig forhindrer anvendelsen av et
ikke-svellende oppløsningsmiddel vesentlig oppsvelling av
gelpartikkelen, hvilket begrenser den kovalente bindingen av

haptten-enheten i betydelig grad bare til de funksjonelle gruppene på den ytre overflaten av gelpartikkelen ved at gjennomtrengningen eller internaliseringen av haptten-enheten og andre reagenser inn i partikkelen minimaliseres. Slik internalisering ville ellers resultere i uønsket dannelse av kovalente bindinger mellom haptten-enheten og funksjonelle grupper som er tilstede på det indre overflatearealet av gelpartikkelen som beskrevet tidligere. Slik internalisering av haptten-enheten og andre reagenser resulterer også i større sannsynlighet for ikke-spesifikk adsorpsjon av slik internalisert haptten-enhet som ville være vanskelig å fjerne med en vaskeoppløsning, og som senere kunne lekke ut fra gelpartikkelen under utførelsen av en immunoanalyse og derved resultere i nedsatt analysefølsomhet og nøyaktighet.

Følgelig utføres immobiliseringen av haptten-enheten til gelpartikkelen i et ikke-svellende organisk oppløsningsmiddel så som dimetylsulfoksyd, dimetylformamid, aceton, klorerte hydrokarboner, cykliske og acykliske alkyletere og lignende, fortrinnsvis inneholdende lite eller intet vann, hvilket resulterer i i det vesentlige ingen oppsvelling av gelpartikkelen og, følgelig, i det vesentlige ingen derav følgende økning i gjennomtrengeligheten eller internaliseringen av haptten-enheten eller andre reagenser inne i partikkelen. Siden den neglisjerbare økningen i partikkelstørrelse vil resultere i en gelpartikkel som er i det vesentlige ugjennomtrengelig for, og som effektivt utelukker gjennomtrengningen av en haptten-enhet og andre reagenser inne i gelpartikkelen, er eventuell ikke-spesifikk binding av haptten-enheten begrenset i det vesentlige bare til den ytre overflaten av gelpartikkelen. Eventuelle deler av haptten-enheten som blir ikke-spesifikt bundet til den ytre overflaten av gelpartikkelen fjernes effektivt med en ikke-svellende vaskeoppløsning etterfulgt av en egnet bufret rense- eller vaskeoppløsning, så som med en sur saltoppløsning. Etter fjernelse av slik ytre, ikke-spesifikt bundet haptten-enhet innbefatter den resulterende immobiliserte hapttenreagensen i det vesentlige

all haptten-enheten kovalent bundet til den ytre overflaten av gelpartikkelen. Reagensen er følgelig i det vesentlige stabil i vandige oppløsninger som et resultat av den ubetydelige mengden av haptten-enheten som er ikke-spesifikt bundet til bærer materialet. Spesielt skal det understrekes at ifølge foreliggende oppfinnelse vil mindre enn fra 1×10^{-12} mol av haptten-enheten/gram av harpiksen vanligvis mindre enn fra 1×10^{-13} mol av haptten-enheten/gram av harpiksen, fortrinnsvis mindre enn 1×10^{-14} mol av haptten-enheten/gram av harpiksen, dissosiere fra gelpartikkelen etter å ha stått i en vandig væske, så som en buffer oppløsning, f.eks. fosfat-klorid analysebufferen beskrevet i eksempel 5, slik at det potensielt bare kan oppstå en ubetydelig liten lekkasje derav under utførelsen av en immunoanalyse.

(b) Haptten-enhet.

Haptten-enheten av den immobiliserte hapttenreagensen kan være hapttenen som skal bestemmes, eller en analog derav som er i stand til binding til den spesifikke bindende partneren derav av den merkede reagensen, og hvor hapttenen eller den bindende analogen derav kovalent kan bindes til de funksjonelle gruppene på den ytre overflaten av en bærer materialpartikkel. Spesielt kan haptten-enheten av den immobiliserte hapttenreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse velges for bestemmelsen av en hvilken som helst haptten for hvilken det finnes en bindende partner i et biologisk system, eller hvor en slik kan syntetiseres, og innbefatter, men er ikke begrenset til, digoksin, digitoksigenin, digitoksin, digoksigenin, 12-O-actyldigoksigenin, og glykosylerte peptidsekvenser så som den glukosylerte N-terminale peptidsekvensen i beta-underheten av humant hemoglobin, så vel som andre klasser av legemidler, metabolitter, hormoner, vitaminer, toksiner og lignende organiske forbindelser. Haptteniske hormoner innbefatter tyroksin og trijodotyronin. Vitaminer innbefatter vitaminene A, B, f.eks. B₁₂, C, D, E og K, folinsyre og tiamin. Legemidler innbefatter antibiotika så som aminoglykosider, f.eks. gentamicin, tobramycin,

amikacin, sisomicin, kanamycin, og netilmicin, penicillin, tetracyklin, terramycin, klormycetin, og actinomycetin; nukleosider og nukleotider så som adenosin-difosfat (ADP), adenosin-trifosfat (ATP), flavin-mononukleotid (FMN),
5 nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) og dets fosfatderivater (NADP), tymidin, guanosin og adenosin; prostaglandiner; steroider så som østrogener; f.eks. estriol og estradiol, sterogener, androgener og adrenokortiske steroider; og andre, så som fenobarbital, fenytoin, primidon, etosuksimid,
10 karbamazepin, valproat, teofyllin, kaffein, propranolol, prokainamid, kinidin, amitryptilin, kortisol, desipramin, disopyramid, doksepin, doksorubisin, notryptilin, metotreksat, imipramin, lidokain, prokainmid, N-acetylprokainamid, amfetaminer, katekolaminer og antihistaminer.
15 Toksiner innbefatter acetyl T-2-toksin, alfatoksin, kolera-toksin, citrinin, cytochalasiner, stafylokokkisk entertoksin B, HT-2 toksin og lignende.

(c) Forbindende grupper.

20 Den forbindende gruppen for den immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av den aminoetyl-avlede polyakrylamid-gelpartikkelen kan velges fra et antall forbindende grupper som er kjent innen teknikken og som innbefatter bifunksjonelle rester av 1,6-heksametylendiamin, 6-aminoheksanol, 1,12-diamino-4,5-dioksidekan,
25 1,17-diamino-3,6,9,12-15-pentaoksaheptadekan, bovinserumalbumin og 6-aminokaproidsyre.

30 Tilsvarende kan den forbindende gruppen av den immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse ved anvendelse av den nye polyakrylamid-sulfhydrylgelen beskrevet ovenfor også være valgt fra et antall forbindelsesgrupper som er kjent innen teknikken, og som innbefatter bifunksjonelle rester av bismaleimid (1,1'-[metylenedi-4,1-fenyl]-bismaleimid), bismaleimido-heksan og bismaleimido-heksaetylenglykol.
35

Det skal understrekes at viktige overveininger ved valg av en egnet forbindelsesgruppe for å tilveiebringe en stabil, kovalent binding mellom haptten-enheten og gelpartikkelen ved foreliggende oppfinnelse er den korrekte romlige orienteringen og friheten fra sterisk hindring mellom den immobiliserte hapttenreagensen og de frie spesies av den merkede reagensen under bindingsvekselvirkningen dem imellom. Spesielt er det sannsynlig at hapttener som er tett bundet til et fast bærer materiale vekselvirker meget svakt med den spesifikke bindende partneren for den merkede reagensen fordi det aktive setet for et biologisk stoff kan være plassert dypt inne i molekylstrukturen derav, og er derfor utilgjengelig for bindende vekselvirkninger. På den annen side er det, ved binding av slik haptten til et fast bærer materiale ved hjelp av en fleksibel avstandsgiverarm eller forbindende gruppe av egnet lengde, sannsynlig at en betydelig økning i bindingen finner sted. Imidlertid er det demonstrert at vesentlig lengre avstandsgiverarmer vil binde stoffer i en flytende prøve ved hjelp av hydrofobe bindingsvekselvirkninger [P. O'Carra, et al., Biochem. Soc. Trans., bind 1, s. 289-290 (1973)]. Dersom den bindende gruppen følgelig er for kort, kan hapttenen ikke bindes til den spesifikke bindende partneren for denne, og dersom den er for lang blir ikke-spesifikke bindingseffekter uttalte og reduserer selektiviteten av separasjonen av de bundne spesies av en merket reagens fra de frie spesies derav.

Følgelig kan forbindelsesgruppen velges av fagmannen på bakgrunn av de foregående betraktningene slik at de nye trekkene ved foreliggende oppfinnelse ikke påvirkes betydelig i negativ retning. Valg av en egnet forbindelsesgruppe og binding av haptten-enheten på en måte som i det vesentlige forhindrer internalisering tilveiebringer en immobilisert hapttenreagens ifølge foreliggende oppfinnelse som er i det vesentlige stabil i vandige oppløsninger.

Spesielt oppnås dannelsen av en stabil kovalent binding mellom en haptten-enhet og den aminoetyl-avlede polyakrylamid-gelpartikkelen ved at det dannes en amidbinding mellom amingruppene på den ytre overflaten av gelpartikkelen og en N-hydroksysuksinimid-aktivert karboksy-funksjonalisert form av haptten-enheten i flytende reaksjonsomgivelser i form av et ikke-svellende oppløsningsmiddel, så som et organisk oppløsningsmiddel beskrevet tidligere som fortrinnsvis er vannfritt. Spesielt aktiveres haptten-enheten først med p-nitrofenylkloroformat og karboksy-funksjonaliseres deretter med 6-aminokapriodsyre som avstandsgiverarmen eller forbindelsesgruppen. Den karboksy-funksjonaliserte haptten-enheten aktiveres deretter med N-hydroksysuksinimid slik at esteren derav dannes, denne omsettes deretter med den aminoetyl-avlede polyakrylamidgelen i vannfrie reaksjonsomgivelser i form av organisk væske innbefattende dimetylformamid.

Spesielt omsettes esteren av den aktiverte haptten-enheten med gelen i mengder fra mellom 50 μmol av haptten-enheten pr. gram av den tørre harpiksen til 0.0005 μmol av haptten-enheten pr. gram av den tørre harpiksen, fortrinnsvis 0.05 μmol av haptten-enheten pr. tørt gram av harpiksen, hvori konsentrasjonen av haptten-enheten i reaksjonsblandingen er mellom 10 $\text{m}\mu$ og 1 μM , fortrinnsvis 10 μM . En eventuell del av haptten-enheten som er ikke-spesifikt bundet til den ytre overflaten av gelpartikkelen vil fjernes med en organisk vaskeoppløsning som beskrevet ovenfor, etterfulgt av en vandig vaskeoppløsning innbefattende, for eksempel, en 2M NaCl og 0.1M eddiksyreoppløsning (pH 2.3), hvori haptten-enheten kovalent bundet til amingruppene forblir bundet dertil, så vel som under den etterfølgende gjennomføringen av en immunoanalyse ved anvendelse av slik immobilisert hapttenreagens.

I tilfellet med den immobiliserte glykopeptidreagensen ved foreliggende oppfinnelse oppnås dannelsen av en stabil kovalent binding mellom den glykosylerte N-terminale peptidsekvensen i beta-underheten av humant hemoglobin (det vil si

glykopeptid) og den nye polyakrylamid-sulfhydrylgelen ved at det dannes en sulfidbinding mellom sulfhydrylgruppene på den ytre overflaten av gelpartikkelen og en aktivert form av glykopeptidet. Spesielt aktiveres glykopeptidet først ved
5 hjelp av en bismaleimidforbindelse, så som 1,1'-[metylen-4,1-fenylene]bismaleimid, bismaleimido-heksan eller bismaleimido-heksaetylenglykol som den forbindende gruppen. Det aktiverte glykopeptidet omsettes deretter med polyakrylamid-sulfhydrylgelen, som på forhånd er redusert med f.eks. ditiotreitol, i
10 det ikke-svellende oppløsningsmiddelet for å generere de sulfhydryl-funksjonelle gruppene.

Reagenssystem.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre et reagenssystem innbefattende alle de grunnleggende elementene som er
15 påkrevet for å gjennomføre en ønsket immunoanalysefremgangsmåte. Reagenssystemet foreligger i en kommersielt forpakket form, som en sammensetning eller blanding hvor kompatibiliteten av reagensene tillater dette, i en forsøksinnretningskonfigurasjon, eller vanligvis som et forsøkssett, det vil si
20 en forpakket kombinasjon av en eller flere beholdere, innretninger eller lignende som inneholder de nødvendige reagensene, og vanligvis innbefattende trykte instruksjoner for gjennomføringen av immunoanalyser.

25 Spesielt vil reagenssystemet minst innbefatte (1) den immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse og (2) en merket reagens, fortrinnsvis et i det vesentlige rent monokjugatpreparat derav som beskrevet ovenfor, innbefattende en merket form av en spesifikk bindende partner for haptenen, fortrinnsvis et enverdig antistoff-fragment
30 avledet fra et monoklonalt antistoff til haptenen som skal bestemmes, merket med et enzym. Fortrinnsvis innbefatter reagenssystemet også indikatoranordninger, så som et forsøksbånd innbefattende en reagenspute inkorporert med en indikator for den merkede reagensen, fortrinnsvis et kromogent akridinonenzymsubstrat som beskrevet ovenfor hvor merket av
35

den merkede reagensen er et enzym, som genererer et detekterbart signal som kan måles og korreleres med mengden haptentilstede.

5 Oppfinnelsen skal nedenfor beskrives ved hjelp av de følgende eksemplene:

Eksempel 1

Syntese og rensing av digitoksigenin.

10 En oppløsning av 765 mg (1 mmol) digitoksin (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, U.S.A.; kvalitetnr. JMO2624ML) og 40 ml av en 1:1 (volum/volum) blanding av etanol og 0.1 N HCl ble omrørt ved 80°C i 60 minutter og deretter avkjølt til romtemperatur. Oppløsningsmiddelet ble avdampet under
15 redusert trykk til et volum på ca. 10 ml oppløsningsmiddel som inneholdt et fast, hvitt bunnfall, og blandingen ble ekstrahert med tre volumer på 20 ml kloroform. Ekstraktene ble kombinert og vasket med 20 ml vann, tørket med magnesiumsulfat, og oppløsningsmiddelet ble inndampet under redusert
20 trykk slik at det ble oppnådd et hvitt, fast materiale.

Det hvite, faste materialet ble oppløst i 4 ml av en 1:1 (volum/volum) blanding av kloroform og etanol, og deretter påført på en flammekromatografikolonne (2.5 cm x 60 cm)
25 inneholdende 40 g silikagel (200-400 mesh) og eluert med en 1:1 (volum/volum) blanding av heksan og etylacetat. Fraksjonene som ble eluert fra kolonnen ble samlet og analysert ved tynnskikt-kromatografi [9:1 (volum/volum) kloroform/metanol], og fraksjonene inneholdende digitoksigeninproduktet ble
30 bestemt med en p-anisaldehyd sprayreagens (900 ml 95% etylalkohol, 50 ml p-anisaldehyd, 50 ml konsentrert svovelsyre og 50 ml eddiksyre) ved å observere en blåfarging ved oppvarming som indikerte nærværet av det ønskede digitoksigeninproduktet. Produktfraksjonene ble kombinert og
35 oppløsningsmiddelet ble avdampet under redusert trykk slik at det ble oppnådd et hvitt, fast materiale som deretter ble rekrystallisert fra en 1:1 (volum/volum) blanding av etanol

og vann slik at det ble oppnådd 300 mg digitoksigenin i form av skinnende hvite krystaller.

Eksempel 2

5 Syntese av 3-digitoksigeninyl-p-nitrofenylkarbonat.

Aktivert digitoksigenin ble fremstilt ved å danne en reaksjonsoppløsning av 749 mg (2 mmol) digitoksigenin (fremstilt ifølge eksempel 1) oppløst i 20 ml vannfritt pyridin inneholdende 61 mg (0.5 mmol) 4-dimetylamino-pyridin som ble omrørt med 524 mg (2.6 mmol) p-nitrofenylkloroformat under argon ved romtemperatur i 5 timer, og tilsetning av ytterligere 60 mg (0.3 mmol) p-nitrofenylkloroformat som ble omrørt under de samme betingelsene i 15 timer. Oppløsningsmiddelet ble avdampet under redusert trykk. Resten ble suspendert i 4 ml kloroform, og suspensjonen ble påført på en flammekromatografikolonne (3 cm x 60 cm) inneholdende 100 g silikagel (230-400 mesh) og eluert med en 1:1 (volum/volum) blanding av heksan og etylacetat. Fraksjonene som ble eluert fra kolonnen ble samlet og analysert ved hjelp av tynn-skikt-kromatografi [9:1 (volum/volum) kloroform/metanol], og fraksjonene inneholdende 3-digitoksigeninyl-p-nitrofenylkarbonat ble bestemt med p-anisaldehyd sprayreagens ved å observere en blåfarging ved oppvarming som indikerte nærværet av det ønskede produktet. Produktfraksjonene ble samlet og oppløsningsmiddelet ble inndampet under redusert trykk slik at det ble oppnådd et fast produkt som deretter ble rekrystallisert fra en blanding av heksan og kloroform slik at det ble oppnådd 279 mg av 3-digitoksigeninyl-p-nitrofenylkarbonat i form av bleke, gule krystaller.

Eksempel 3

30 Syntese av 3-O-(5-karboksy-pentan-1-karbamoyl)digitoksigenin.

Aktivert digitoksigenin ble karboksy-funksjonalisert ved at det ble dannet en reaksjonsoppløsning av 1.08 g (2 mmol) 3-digitoksigeninyl-p-nitrofenylkarbonat (fremstilt ifølge eksempel 2) oppløst i 50 ml vannfri pyridin som ble omrørt ved romtemperatur mens en oppløsning av 315 mg (2.4 mmol) 6-

aminokaprionsyre og 337 μ l (2.4 mmol) trietylamin i 10 ml av en 1:1 (volum/volum) blanding av pyridin og vann langsomt ble tilsatt i løpet av et tidsrom på 5 minutter. Reaksjonsblandingen ble deretter omrørt ved romtemperatur i 21 timer, og oppløsningsmidlene ble avdampet under redusert trykk. Resten ble deretter oppløst i 25 ml vannfritt toluen, og oppløsningsmiddelet ble indampet under redusert trykk.

Resten ble oppløst i 5 ml av en 200:10:1 (volum/volum) blanding av metylenklorid, metanol og eddiksyre og deretter påført på en flammekromatografikolonne (5 cm x 60 cm) inneholdende 200 g silikagel (230-400 mesh) og eluert med en 200:10:1 blanding av metylenklorid, metanol og eddiksyre. Fraksjonene som ble eluert fra kolonnen ble samlet og analysert ved hjelp av tynnskiktkromatografi [200:10:1 (volum/volum) metylenklorid, metanol og eddiksyre] og fraksjonene inneholdende 3-O-(5-karboksy-pentan-1-karbamoyl)-digitoksigenin ble bestemt med p-anisaldehyd sprayreagens ved å observere en blåfarging ved oppvarming som indikerte nærvær av det ønskede produktet. Produktfraksjonene ble samlet og oppløsningsmidlene ble avdampet under redusert trykk slik at det ble oppnådd et klart oljeprodukt som deretter ble krystallisert med 10 ml vannfri etyleter slik at det ble oppnådd et hvitt, fast produkt som ble samlet ved filtrering og tørket under høyvakuum ved 40°C i 1 time slik at det ble oppnådd 568 mg av 3-O-(5-karboksy-pentan-1-karbamoyl)-digitoksigenin i form av et hvitt, fast stoff.

Eksempel 4

Aktivering av 3-O-(5-karboksy-pentan-1-karbamoyl)-digitoksigenin med N-hydroksysuksinimid.

Esteren av karboksy-funksjonalisert digitoksigenin ble fremstilt ved å danne en reaksjonsoppløsning av 64 mg (117 μ mol) av 3-O-(5-karboksy-pentan-1-karbamoyl)-digitoksigenin (fremstilt ifølge eksempel 3) oppløst i 2 ml vannfritt N,N-dimetylformamid (DMF) som ble omrørt under argon ved romtemperatur og 28 μ l (200 μ mol) trietylamin, 15 mg (130 μ mol) N-

hydroksysuksinimid og 27 mg (130 μmol) av N,N-dicykloheksyl-karbodiimid ble tilsatt. Etter 24 timer ble dicykloheksyl-ureaen som ble utfelt fjernet ved filtrering, og filtratet inneholdende N-hydroksysuksinimidesteren av 3-O-(5-karboksy-

5 pentan-1-karbamoyl)digitoksigenin ble fortynnet til 11.111 ml med DMF. Typisk forløper denne reaksjonen ikke fullstendig.

Eksempel 5

Syntese av N-hydroksysuksinimidester av 3-O-(5-karboksy-

10 pentan-1-karbamoyl)digitoksigenin kovalent bundet til aminoetyl "BIO-GEL P-2" harpiks.

En immobilisert haptenreagens ifølge foreliggende oppfinnelse innbefattende digitoksigenin kovalent bundet til de ytre amingruppene av en aminoetyl-avledet polyakrylamid gelpartikkel ble fremstilt ved først å danne en suspensjon av 2 g

15 aminoetyl "BIO-GEL P-2" harpiks (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA; Kvalitetnr. 28945, 1.39 milliekvivalent aminfunksjonelle grupper/gram tørr harpiks) i 10 ml DMF som ble inkubert ved romtemperatur i 48 timer. En porsjon på 10

20 ml av supernatanten fra den aminoetyl-avlede "BIO-GEL P-2" harpiksen i DMF-oppløsningen ble fjernet og erstattet med 10 ml av det aktiverte digitoksigeninet i DMF fremstilt ifølge eksempel 4 slik at det ble dannet en reaksjonsoppløsning innbefattende 50 μmol aktivert digitoksigenin pr. gram av den

25 tørre harpiksen, og dette ble forsiktig blandet på en rotasjonsblander (omrystet) ved romtemperatur i 48 timer.

Tilsvarende ble fremgangsmåten beskrevet ovenfor fulgt for fremstilling av reaksjonsoppløsninger innbefattende 5 μmol ,

30 0.5 μmol , og 0.05 μmol av aktivert digitoksigenin pr. gram tørr harpiks ved å fjerne 1.0 ml, 0.1 ml og 0.01 ml av supernatanten av tilsvarende preparert "BIO-GEL P-2" harpiks i DMF, og erstatte de fjernede volumene med 1.0 ml, 0.1 ml, og 0.01 ml av det aktiverte digitoksigeninet i DMF oppløsning

35 fremstilt ifølge eksempel 4.

De fire prøvene av den immobiliserte haptentreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse innbefattende digitoksigenin kovalent knyttet til den aminoetyl-avlede "BIO-GEL P-2" harpiksen fremstilt som beskrevet ovenfor ble samlet ved filtrering og vasket med ti 10 milliliters volumer av DMF, og deretter med fem 10 milliliters volumer av en bufret vaskeoppløsning (i det følgende betegnet som "vaskebuffer") innbefattende 2M NaCl og 0.1 M eddiksyre (pH 2.3). De vaskede reagensprøvene ble helt i kolonner og ytterligere vasket med 14 sjiktvolumer av vaskebufferen. En porsjon på 2-3 ml fra hver av de vaskede reagensoppløsningene ble helt i små kolonner og vasket med 50 ml vann etterfulgt av 50 ml av en analysebuffer (pH 7.4) inneholdende 0.05 M natriumfosfat, 0.05 M natriumklorid, 0.001 M magnesiumklorid, 100 µg/ml bovinserumalbumin, og 0.02% natriumacid (i det følgende betegnet som "analysebuffer"), og endelig resuspendert i en tilstrekkelig mengde av analysebufferen til å gi en suspensjon som hadde et volum som var dobbelt så stort som volumet av den sedimenterte harpiksen (det vil si 50%). De gjenværende 7-8 ml av de vaskede harpiksprøvene ble deretter vasket med 60 ml vann og lyofilisert fra en 50% kritisk mengde.

Eksempel 6

Eksperimentelle resultater.

De immobiliserte digitoksigeninreagensharpiksene fremstilt ifølge eksempel 5 ble sammenlignet med digitoksigenin kontrollharpikser fremstilt på tilsvarende måte med karboksyfunksjonalisert digitoksigenin som ikke var aktivert med N-hydroksysuksinimid (NOS), for å demonstrere omfanget av kovalent binding og ikke-spesifikk binding i den immobiliserte digitoksigenin-reagensen når den ble fremstilt som ved foreliggende oppfinnelse. Slike kontroller ble anvendt fordi dannelsen av NOS-esteren av digitoksigenin ikke forløper til 100% og følgelig er ikke-aktivert digitoksigenin fremdeles tilstede og kan bindes ikke-spesifikt til harpiksen.

a. Evaluering av kovalent binding av digitoksigenin til harpiks.

Kontrollharpiksene ble fremstilt ved først å fjerne 10.0 ml, 1.0 ml og 0.01 ml supernatant fra de respektive suspensjonene av 2 gram aminoetyl-avledet "BIO-GEL P-2" harpiks i 10 ml DMF ifølge eksempel 5, og erstatte de respektive volumene med oppløsninger av ikke-aktivert karboksy-funksjonalisert digitoksigenin fremstilt ifølge eksempel 3. Den samme fremgangsmåten som i eksempel 5 ble deretter benyttet for å fremstille de respektive kontrollharpiksene innbefattende digitoksigenin ikke-spesifikt bundet til aminoetyl-avledet "BIO-GEL P-2" harpiks. De fire immobiliserte digitoksigenin reagensharpiksene fremstilt ifølge eksempel 5, og de fire digitoksigenin-kontrollharpiksene fremstilt ifølge foreliggende eksempel, ble deretter vurdert i en heterogen immunoanalyse ved anvendelse av en 1.0 nM oppløsning av enverdig antistoff-fragment (Fab') av et monoklonalt antistoff (se for eksempel Porter, Biochem. J., bind 73, s. 119 [1959] og Nisonoff, Methos Med. Res., bind 10, s. 132 [1964]) til digoksin merket med β -galaktosidase (se for eksempel Ishikawa, J. Biochem., bind 96, s. 659 [1984]; Kato et al., J. Immunol, bind 116, s. 1554 [juni 1976]; og Yoshitake et al., Euro. J. Biochem., bind 101, s. 395 [1977] i analysebuffer-oppløsningen (pH 7.4) fra eksempel 5 som den merkede reagensen, sammen med en normal human serumprøve (analyse I) og en normal human serumprøve inneholdende 300 ng/ml digoksin (analyse II) som kontrollprøver, ifølge følgende immunoanalysefremgangsmåter.

(i) Analyse I.

(1) En første reaksjonsblanding innbefattende 200 μ l av den merkede reagensen og 30 μ l av den normale humane serumprøven ble inkubert i 5 minutter ved romtemperatur;

(2) en andre reaksjonsblanding innbefattende 100 μ l fra den første reaksjonsblandingen fra trinn (1) av foreliggende analyse og 100 μ l harpiks (oppnådd fra harpiksblandingen med

50% av et sedimentert harpiksvolum (det vil si 50% krit.) ble rotert (30 opm) i 10 minutter ved romtemperatur; og (3) harpiksen fra (2) av foreliggende analyse fikk sedimentere i 1 minutt, og en porsjon på 30 µl av supernatanten ble påført på en reagenspute inkorporert med resorufin-β-D-galaktopyranosid (Hoffman et al., *Analytica Chimica Acta*, bind 163, s. 67 [1984]) for å bestemme enzymaktiviteten av β-D-galaktosidasen av den merkede reagensen.

(ii) Analyse II.

(1) En første reaksjonsblanding innbefattende 200 µl av den merkede reagensen og 30 µl av den normale humane serumprøven inneholdende 300 ng av digoksin/ml ble inkubert i 5 minutter ved romtemperatur;

(2) en andre reaksjonsblanding innbefattende 100 µl fra den første reaksjonsblanding fra trinn (1) av foreliggende analyse og 100 µl av harpiks (50% krit.) ble rotert (30 opm) i 10 minutter ved romtemperatur; og

(3) harpiksen fra trinn (2) av foreliggende analyse fikk sedimentere i 1 minutt, og en porsjon på 30 µl av supernatanten ble påført på en reagenspute inkorporert med resorufin-β-D-galaktopyranosid.

Hastigheten for fargedannelsen som oppsto ved interaksjonen mellom β-D-galaktosidasen og resorufin-β-D-galaktopyranosidet ble målt ved 560 nM mellom 60 og 80 sekunder etter prøvepåføringen på reagensputen, for å bestemme β-D-galaktosidaseaktiviteten av den merkede reagensen fra supernatanten, det vil si de bundne spesies. Reaktivitetsmålingene (tabell 1) ble utført på et "Seralyzer" reflektansfotometer (Miles Laboratories, Inc., Elkhart, IN, USA) koblet til en HP-85 datamaskin (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, USA) via et flerports grensesnitt, hvorved omfanget av binding av konjugatet til harpikspartikkelen ble bestemt ved å beregne omfanget av bakgrunnssignalet (% bakgrunn) ifølge følgende ligning:

$$\% \text{ BAKGRUNN} = \frac{\text{REAKTIVITET AV ANALYSE I}}{\text{REAKTIVITET AV ANALYSE II}} \times 100,$$

resultatene er sammenfattet i tabell 1. Det skal understrekes at en lav verdi for % bakgrunn indikerer god binding av konjugatet ved harpiksen, hvilket bare kan finne sted i fravær av utlekkbart, ikke-spesifikt adsorbent haptent.

Tabell 1

Digitoksigenin konsentrasjon ($\mu\text{mol/gram}$ tørrvekt)	Reagenspute reaktivitet $\times 10^3$		% bakgrunn
	Analyse I	Analyse II	
<u>Harpikser ifølge oppfinnelsen</u>			
50.0	1.32	10.3	12.7
5.0	1.91	10.9	17.5
0.5	0.99	10.5	9.4
0.05	1.17	10.2	11.4
<u>Kontrollharpikser</u>			
50.0	4.98	10.3	48.3
5.0	8.01	10.5	76.4
0.5	10.1	11.2	89.4
0.05	11.1	11.5	96.4

Tilsvarende ble den lyofiliserte harpiksen undersøkt ved følgende analysefremgangsmåter:

(i) Analyse III.

(1) En første reaksjonsblanding innbefattende 375 μl av den merkede reagensen og 30 μl av den normale humane serumprøven ble inkubert i 10 minutter ved romtemperatur;

(2) en andre reaksjonsblanding innbefattende 200 μl av den første reaksjonsblandingen fra trinn (1) av foreliggende analyse og 10 mg lyofilisert harpiks ble rottert i 5 minutter ved romtemperatur; og

(3) harpiksen fra trinn (2) av foreliggende analyse fikk sedimentere i 1 minutt, og en porsjon på 30 µl av supernatanten ble påført på en reagenspute inkorporert med resorufin-β-D-galaktopyranosid (Hoffman et al., Analytica Chimica Acta, bind 163, s. 67 [1984]) for å bestemme enzymaktiviteten av β-D-galaktosidasen av den merkede reagensen.

(ii) Analyse IV.

(1) En første reaksjonsblanding innbefattende 375 µl av den merkede reagensen og 30 µl av den normale humane serumprøven inneholdende 300 ng av digoksin/ml ble inkubert i 10 minutter ved romtemperatur;

(2) en andre reaksjonsblanding innbefattende 200 µl fra den første reaksjonsblandingen i trinn (1) av foreliggende analyse og 10 mg lyofilisert harpiks ble rotert i 5 minutter ved romtemperatur; og

(3) harpiksen fra trinn (2) av foreliggende analyse fikk sedimentere i 1 minutt, og en porsjon på 30 µl av supernatanten ble påført på en reagenspute inkorporert med resorufin-β-D-galaktopyranosid.

Hastigheten for fargedannelse som oppsto fra interaksjonen mellom β-D-galaktosidasen og resorufin-β-D-galaktosidasen ble målt som beskrevet ovenfor. Omfanget av bindingen av konjugat til harpikspartikkelen ble bestemt ved å beregne omfanget av bakgrunnssignal (% bakgrunn) ifølge følgende ligning:

$$\% \text{ BAKGRUNN} = \frac{\text{REAKTIVITET AV ANALYSE III}}{\text{REAKTIVITET AV ANALYSE IV}} \times 100,$$

resultatene er sammenfattet i tabell 2.

Tabell 2

UNDERSØKELSE AV DIGOKSIN-ANALYSEBAKGRUNNENE MED LYOFILISERT
AMINOETYL-AVLEDET "BIOGEL P-2": DIGITOKSIGENIN

<u>Digitoksigennivå µmol/gram tørrstoff</u>	<u>Reaktivitet x 10³</u>		<u>% Bakgrunn</u>
	<u>Analyse III</u>	<u>Analyse IV</u>	
<u>Harpikser ifølge oppfinnelsen</u>			
50	4.49	11.9	37.9
5	6.40	12.5	51.1
0.5	2.13	12.6	17.0
0.05	2.14	12.4	17.2
<u>Kontrollharpikser</u>			
50	8.86	12.7	69.6
5	12.1	12.9	94.0
0.5	12.4	12.7	97.8
0.05	13.0	12.7	102.4

Den betydelige forskjellen i bakgrunnssignal mellom den immobiliserte digitoksinreagensharpiksen ifølge foreliggende oppfinnelse og kontrollharpiksen indikerer at digitoksigenin-
5 enheten var sterkt bundet til harpiksen ved en stabil, kovalent binding. Evnen av kontrollharpiksene som er behandlet med den frie karboksylsyreformen av haptenen til å binde noe av konjugatet indikerer at det foreligger en sterkt ikke-spesifikk absorpsjon av forbindelsen til harpiksen. Ettersom konsentrasjonen av den frie syreformen reduseres
10 avtar også slik ikke-spesifikk absorpsjon. Det er ved slike lave haptenkonsentrasjoner at den immobiliserte haptentreagensharpiksen ifølge foreliggende oppfinnelse som virker optimalt i den lyofiliserte formen kan oppnås (tabell 2).

15 b. Vurdering av stabiliteten av immobilisert digitoksigeninreagens.

Utlekkingen av digitoksigenin fra den immobiliserte digitoksinreagensen fremstilt som ved foreliggende oppfinnelse ble vurdert ved følgende analyse ved anvendelse av prøver på
20 170 µl analysebuffer (lav reaktivitetskontroll), 150 nM digoksin i analysebuffer (høy reaktivitetskontroll), eller 170 µl av supernatantene fra 50 µmol/gram tørrvekt av harpiksen, 5 µmol/gram tørrvekt av harpiksen, 0.5 µmol/gram tørrvekt av harpiksen og 0.05 µmol/gram tørrvekt av harpiksen
25 som var lagret i analysebufrene i 1 uke ved 4°C (etter lagring ble harpiksene først resuspendert å tillatt å sedimentere før supernatanten ble fjernet):

(i) En første reaksjonsblanding innbefattende 30 µl av
30 normalt humant serum og 30 µl av en 6.7 nM oppløsning av konjugatet ble blandet med en av de tidligere nevnte prøvene og inkubert i 5 minutter ved romtemperatur;

(ii) en andre reaksjonsblanding innbefattende 100 µl av den
35 første reaksjonsblandingen og 100 µl av en 50% kritisk konsentrasjon av en nyvasket "Sephadex G10-BSA"-ouabainharpiks som beskrevet ovenfor (fra duPont "Digoxin Assay Reagent

piks som beskrevet ovenfor (fra duPont "Digoxin Assay Reagent Kit", Katalog nr. 705797901, E.I. DuPont de Nemours and Company, Inc., Wilmington, USA) ble rotert omhyggelig (30 opm) i 20 minutter ved romtemperatur; og

(iii) harpiksen fra trinn (ii) fikk sedimentere i 1 minutt, og en porsjon på 30 µl av supernatanten ble påført på en reagenspute inkorporert med resorufin-β-D-galaktopyranosid, og hastigheten for fargedannelse ble målt på et "Seralyzer" reflektansfotometer som beskrevet ovenfor. Omfanget av interferens i forhold til konjugatbinding ved digitoksigenin som ble vasket inn i analysemediet ble bestemt ved hjelp av følgende beregninger:

$$\% \text{ BAKGRUNN} = \frac{\text{REAKTIVITET AV PRØVE}}{\text{REAKTIVITET AV HØY REAKTIVITETSKONTROLL}} \times 100,$$

hvor

$$\% \text{ ØKNING I BAKGRUNN} = \% \text{ BAKGRUNN AV PRØVE} - \% \text{ BAKGRUNN AV LAV REAKTIVITETSKONTROLL},$$

resultatene er sammenfattet i tabell 3.

Tabell 3

	<u>Prøve</u>	<u>Reaktivitet</u>	<u>% bakgrunn</u>	<u>Økning i % bakgrunn</u>
5	Høy reaktivitets- kontroll	0.0116	NA	NA
	Lav reaktivitets- kontroll	0.0018	15.6	NA
10	Supernatant av 50 µmol/g	0.0054	46.8	31.2
	Supernatant av 5 µmol/g	0.0058	50.1	34.5
	Supernatant av 0.5 µmol/g	0.0026	22.3	6.7
15	Supernatant av 0.05 µmol/g	0.0020	17.7	2.1

Resultatene indikerer at utvasking av digitoksigenin, det vil si ikke-spesifikt adsorbent, fra de fremstilte harpiksene ved konsentrasjoner på 0.5 og 0.05 µmol digitoksigenin/gram harpiks spesielt ved 0.05 µmol digitoksigenin/gram harpiks var minimalisert. Den minimale mengden utvasking, spesielt ved 0.5 µmol/gram og 0.05 µmol/gram demonstrerer klart, som det fremgår av resultatene ovenfor, at harpiksene fremstilt som ved foreliggende oppfinnelse, det vil si i et vannfritt organisk oppløsningsmiddel med en reaksjonsblandingfortynning som beskrevet ovenfor, har en i det vesentlige stabil kovalent binding mellom digitoksigeninet og harpiksen, og viser en minimal mengde løst eller ikke-spesifikt bundet digitoksigenin hvori mengden digitoksigenin som utvaskes reduseres i betydelig grad ved slike høyere fortynninger.

c. Doserrespons på digoksin.

0.05 µmol digitoksigenin/gram av harpiksen fremstilt som ved foreliggende oppfinnelse ble vasket med en bufferoppløsning (2 M NaCl og 0.1 M eddiksyre, pH 2.3), etterfulgt av vann, og deretter tørket ved lyofilisering. Den lyofiliserte harpik-

sen ble deretter anvendt i en immunoanalyse for bestemmelse av digoksin fra en flytende prøve ved anvendelse av et i det vesentlige rent monokonjugatpreparat innbefattende et enkelt enverdig antistofffragment (Fab') avledet fra et monoklonalt antistoff mot digoksin kovalent koblet til en enkelt β -D-galaktosidasekomponent som merket reagens. Monokonjugatet ble oppnådd fra en konjugat-reaksjonsblanding innbefattende enverdige og flerverdige konjugater, frie β -D-galaktosidasekomponenter og frie Fab' komponenter, som var elektroforetisk renset på en elektroforetisk polyakrylamidgel som beskrevet i U.S. patentsøknaden med tittelen "Substantially Pure Enzyme-Antibody Monoconjugate Preparation" (sak nr. MS-1477), inngitt samtidig med foreliggende søknad. Immunoanalysen anvendte også, som det kromogene enzymsubstratet, et akridinon- β -D-galaktopyranosid innbefattende et 7-hydroksey-9,9-dimetyl-9H-akridin-2-on avledet ved 7-posisjonen med en β -D-galaktose-rest som beskrevet i europeisk patent 270,946 på følgende måte:

(i) En reaksjonsblanding innbefattende 875 μ l av en 0.30 nM oppløsning av den monokonjugat-merkede reagensen og 35 μ l av en serumprøve inneholdende digoksin ble inkubert ved romtemperatur i 6 minutter;

(ii) en reaksjonsblanding innbefattende 780 μ l av reaksjonsblandingen fra trinn (i) og 30 mg lyofilisert 0.05 μ mol digitoksigenin/gram harpiks ble omrørt i 4 minutter, og harpiksen ble separert fra oppløsningen ved hjelp av et porøst plastfilter; og

(iii) en porsjon på 30 μ l ble fjernet fra filtratet av reaksjonsblandingen fra trinn (ii) og påført på et reagensbånd inkorporert med akridinon- β -D-galaktopyranosid.

Omfanget av fargedannelse som oppsto ved interaksjonen mellom β -D-galaktosidasen og akridinon- β -D-galaktopyranosid ble målt ved 630 nm mellom 60 til 80 sekunder etter prøvopåføring på reagensputen, for å bestemme β -D-galaktosidaseaktiviteten av den monokonjugat-merkede reagensen fra filtratet, det vil si

de bundne spesies (tabell 4). Den resulterende doseresponsen til digoksin basert på data vist i tabell 4 er gjengitt i figur 1.

5 Tabell 4

Doserespons på digoksin

	<u>Digoksinkonsentrasjon</u> ng/ml	<u>Reaktivitet x 10³</u>
10	0	1.01
	0.6	1.71
	1.2	2.31
	2.4	3.59
	3.6	4.79
15	5.0	6.28

Eksempel 7

20 Syntese av tverrbundne polyakrylamid-sulfhydryl kopolymer gelpartikler.

Under argon ble akrylamid (40%), bisakrylamid (10%) og N,N'-bisakrylylcystamin (3.4%) blandet med 30 ml vann. Temperaturen av blandingen ble øket til 45-50°C for oppløse alt det faste stoffet. Etter at 100 µl N,N,N',N'-tetrametyletylendi-

25 amin var tilsatt ble blandingen avkjølt til 40°C og 25 mg ammoniumpersulfat ble tilsatt og oppløsningen fikk polymerisere i form av en bulkpolymer i et isbad. Etter 3 timer ble bulkpolymeren fjernet fra beholderen som et transparent fast materiale, og blandet med vann og homogenisert i en mekanisk

30 blander slik at det ble oppnådd en gelsuspensjonen. Gelsuspensjonen ble først siktet på en 85 mesh sikt (USC betegnelse) slik at det ble oppnådd gelpartikler med diametere mindre enn 150 µm, som deretter ble siktet på en 400 mesh sikt slik at det ble oppnådd partikler med diameter 38 µm-

35 150 µm. De resulterende 38 µm - 150 µm partiklene ble vasket godt med vann, og gelen filtrert og vasket med etanol og endelig tørket ved avsugning og vakuum.

Eksempel 8

Syntese av immobilisert glykopeptidreagens.

5 En immobilisert haptenreagens innbefattende et glykopeptid kovalent bundet til de ytre sulfhydryl-funksjonelle gruppene av polyakrylamidgelen fremstilt ifølge eksempel 7 ble fremstilt på følgende måte:

10 (a) 2.0 g av den tverrbundne polyakrylamidsulfhydryl-kopolymergelen fremstilt ifølge eksempel 7 ble først vasket (4 x 5 ml) med dimetylformamid (DMF), fikk renne av seg og ble blandet med 400 mg ditiotreitol (DTT) og 0.5 ml DMF. Blandingen ble omrørt og virvlet periodisk ved romtemperatur. Etter 1 time fikk væsken renne av og gelen ble holdt 15 under argon og vasket med argon-renset DMF inntil intet DTT kunne detekteres i vaskevannet.

20 (b) I en separat beholder ble en 800 µl oppløsning av et glykopeptid (den glykosylerte N-terminale peptidsekvensen i beta-underheten av hemoglobin som beskrevet i europeisk patentpublikasjon nr. 185,870) ved en konsentrasjon på 1.0 mg/100 µl vann blandet med en oppløsning av 200 µl bis-maleimido-heksaetylglykol (1.0 mg i 100 µl DMF) og 600 µl DMF. Etter 10 minutter ved romtemperatur ble oppløsningen 25 tilsatt til den aktiverte gelen fra trinn (a) av foreliggende eksempel. Gelblandingen ble omrørt og virvlet periodisk i 2 timer. Gelen fikk dryppe av seg og ble vasket med DMF (8 x 2 ml), en oppløsning av 2M NaCl og 0.1N eddiksyre (6 x 5 ml), vann (150 ml) og etanol (4 x 10 ml). Gelen ble deretter 30 tørket ved avsugning og under vakuüm slik at det ble oppnådd 2.0 g av den immobiliserte glykopeptidreagensen ifølge foreliggende oppfinnelse innbefattende glykopeptidet kovalent bundet i det vesentlige bare til de ytre sulfhydryl-funksjonelle gruppene av den tverrbundne kopolymer gelpartik- 35 kelen.

Eksempel 9

Reaktivitetsanalyse for immobilisert glykopeptidreagens.

Den immobiliserte glykopeptid-reagensen (harpiks) fremstilt ifølge eksempel 8 ble vurdert for å bestemme nivået av ubundet merke (bakgrunn) ved anvendelse av et monokonjugatpreparat av et enverdig antistoff-fragment (Fab') merket med β -D-galaktosidase, som en merket reagens. Det enverdige antistoff-fragmentet var avledet fra et monoklonalt antistoff spesifikt for den glykosylerte N-terminale peptidsekvensen (8 aminosyrer) i beta-underheten av humant hemoglobin (se europeisk patentpublikasjon nr. 185,870) ved fremgangsmåtene beskrevet av Porter og Nisonoff, supra, og merket med β -D-galaktosidase ved fremgangsmåtene beskrevet av Ishikawa, Kata et al., og Yoshitake et al., supra. Det enverdige antistoff-fragmentet β -D-galaktosidasekonjugat ble elektroforetisk rensset på en polyakrylamidgel slik at det ble oppnådd et i det vesentlige rent monokonjugatpreparat innbefattende en enkelt Fab' komponent og en enkelt β -D-galaktosidase komponent, som beskrevet i U.S. patent 5,047,324 beskrevet ovenfor.

(a) Til en oppløsning av 250 μ l av den monokonjugat-merkede reagensen ble det tilsatt 30 μ l buffer (pH 7.4, 0.05M natriumfosfat, 0.05 natriumklorid, 1 mM magnesiumklorid, 100 μ g/ml bovinserumalbumin, og 0.02 % natriumazid);

(b) En porsjon på 270 μ l av oppløsningen fra trinn (a) ifølge foreliggende eksempel ble blandet med 10-20 mg av den immobiliserte glykopeptidreagensen (harpiks) og suspensjonen ble rotert omhyggelig i 30 minutter ved romtemperatur; og

(c) harpiksen ble fjernet ved filtrering og en porsjon på 30 μ l av filtratet ble påført på en reagenspute inkorporert med resorufin- β -D-galaktopyranosid.

Reaktivitetsmålingene ble utført med "Seralyzer" reflektansfotometeret beskrevet ovenfor, og forholdet mellom reaktivi-

172459

37

tetene målt på denne måten og reaktiviteten av den merkede reagensen uten behandling av harpiksen ble angitt som $\%$ bakgrunn (se tabell 5).

5

10

15

20

25

30

35

<u>Tabell 5</u>	<u>Immobilisert glykopeptid reagensprøve nummer</u>	<u>Bismaleimido</u>	<u>Glykopeptid-konsentrasjon</u>	<u>Reaktivitet</u>	<u>% bakgrunn</u>
I	PEG-6	1 mg/g	0.01802	48	
II	PEG-6	1 mg/g	0.01992	62	
III	PEG-6	1 mg/g	0.01655	59-64	
IV	PEG-6	2 mg/g	0.02349	52.7	
V	PEG-6	4 mg/g	0.01909	29.1	
VI	PEG-6	6 mg/g	0.05032	76.7	
VII	metylen- difenylen	2 mg/g	0.04202	89	
VIII*	PEG-6	2 mg/g	0.06560	100	
IX**	PEG-6	1 mg/g	0.05713	121	

* Trinnvis tilsats av bismaleimido og glykopeptid

** Ikke aktivert av DTT

Eksempel 10

Immunoanalyse for bestemmelsen av HbA1c.

(a) 30 μ l av varierende konsentrasjoner av denaturert blod, det vil si HbA1c (fig. 2), ble tilsatt til 250 μ l oppløsninger av den merkede reagensen (eksempel 9) og blandingene fikk stå i 10 minutter ved romtemperatur;

(b) En porsjon på 270 μ l fra hver blanding ble blandet med 15 mg av den immobiliserte glykopeptidreagensen (eksempel 8) og rotert omhyggelig i 10 minutter ved romtemperatur;

(c) Harpiksen ble fjernet ved filtrering og 30 μ l av filtratet ble påført på en reagenspute inkorporert med resorufin- β -D-galaktopyranosid.

Reaktivitetsmålingene ble utført med et "Seralyzer" reflektansfotometer som beskrevet ovenfor og reaktivitetene ble funnet å være direkte proporsjonale med konsentrasjonene av HbA1c tilstede i fullblod (se figur 2).

P a t e n t k r a v

5 1.

Stabil, immobilisert haptenreagens for bruk i den spesifikke bindingsanalysebestemmelsen av en hapten eller bindingsanalog derav i en væskeformig testprøve, hvor reagensen omfatter en gelpartikkel som er svellbar i vann og har flere haptendeler bundet dertil, k a r a k t e r i s e r t v e d at reagensen er fremstilt ved trinnene:

(a) omsetning av en haptendel med en polyakrylamidgelpartikkel innbefattende flere ytre og indre kjemisk aktive funksjonelle grupper, hvor reaksjonen utføres i et organisk oppløsningsmiddel som er vesentlig fritt for vann og hvori gelpartikkelen er i det vesentlige ikke-svellet og under slike betingelser at det dannes en kovalent binding mellom haptendelen og nevnte ytre aktive funksjonelle grupper som er vesentlig stabile i vandig oppløsning;

(b) vasking av gelpartikkelen fra trinn (a) med et organisk oppløsningsmiddel som er vesentlig fritt for vann og hvori gelpartikkelen er vesentlig ikke-svellet;

(c) vasking av gelpartikkelen fra trinn (b) med en vandig oppløsning; og

(d) isolering av den immobiliserte haptenreagensen fra trinn (c) innbefattende nevnte gelpartikkel og nevnte haptendeler bundet dertil hvor vesentlig alle nevnte bundne haptendeler er kovalent bundet til de funksjonelle gruppene på den ytre overflaten ved hjelp av en bindingsgruppe som er vesentlig stabil i vandige oppløsninger.

2.

Stabil, immobilisert haptenreagens ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at de ikke-svellende organiske oppløsningsmidlene er valgt fra dimetylformamid, dimetylsulfoksyd, aceton, klorerte hydrokarboner og cykliske og acykliske alkyletere.

3.

5 Stabil, immobilisert haptentreagens ifølge krav 1, karakterisert ved at haptendelen er valgt fra gruppen bestående av digoksin, digitoksigenin, digitoksin, digoksigenin, 12-O-acetyldigoksigenin, og at bindingsgruppen er valgt fra gruppen bestående av bifunksjonelle rester av 1,6-heksametylendiamin, 6-aminoheksanol, 10 1,12-diamino-4,9-dioksadodekan, 1,17-diamino-3,6,9,12,15-pentaoksaheptadekan, 6-aminokaproinsyre og bovinserumalbumin.

4.

15 Stabil, immobilisert haptentreagens ifølge krav 3, karakterisert ved at bindingsgruppen er en bifunksjonell rest av 6-aminokaproinsyre og at haptendelen er digitoksigenin.

5.

20 Stabil, immobilisert haptentreagens ifølge krav 1, karakterisert ved at haptendelen er en glykosylert peptidsekvens og at bindingsgruppen er valgt fra bifunksjonelle rester av 1,1'-[metylendi-4,1-fenylen]bismaleimid, bismaleimido-heksan og bismaleimido-heksaetylen- 25 glykol.

6.

30 Stabil, immobilisert haptentreagens ifølge krav 5, karakterisert ved at den glykosylerte peptidsekvensen tilsvarer den glykosylerte N-terminale peptidsekvensen i beta-underenheten av humant hemoglobin, og at bindingsgruppen er bismaleimido-heksaetylen glykol.

7.

35 Anvendelse av reagensen ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6 i analyse av haptent, eller en analog derav, i en væskeformig testprøve.

172459

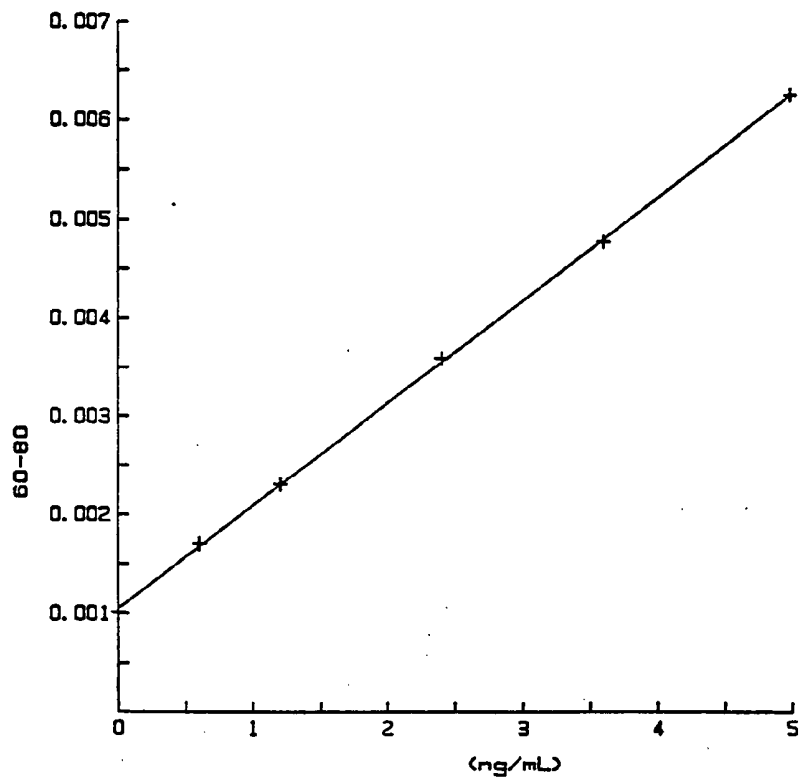


FIG.1

172459

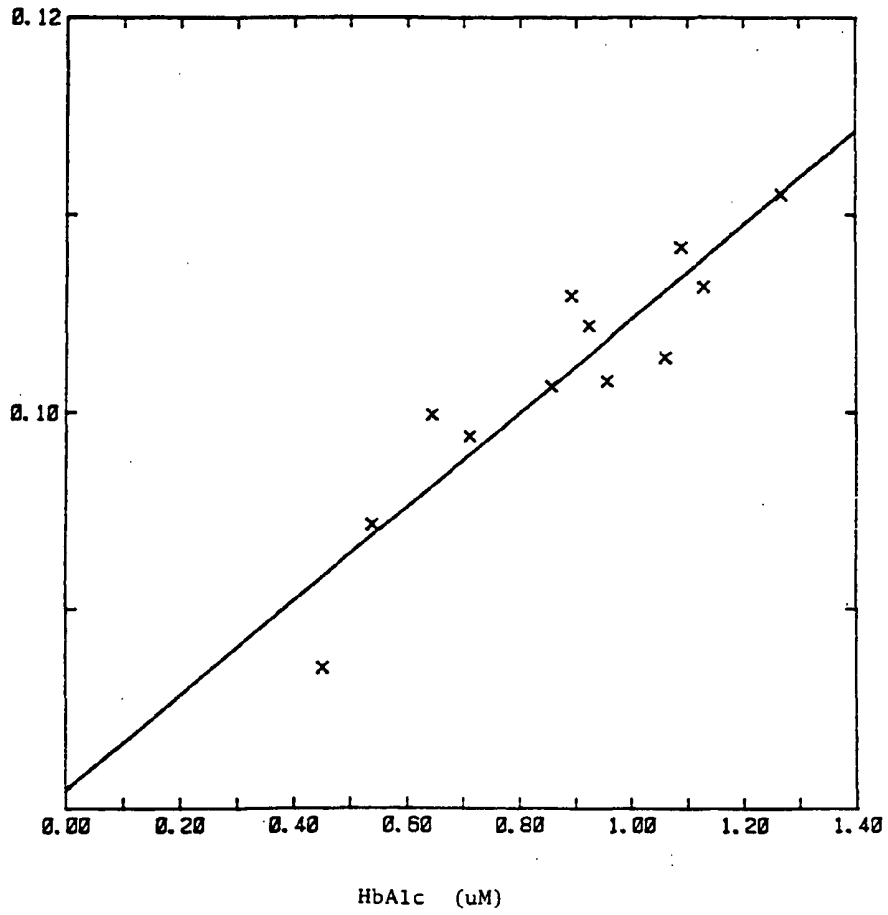


FIG.2