



**NORGE**

(19) [NO]

STYRET FOR DET  
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) **UTLEGNINGSSKRIFT** (11) Nr. 162120

(51) Int. cl.<sup>4</sup> C 12 Q 1/44

(21) Patentsøknad nr. **831566**

(22) Inngivelsesdag 03.05.83

(24) Løpedag 03.05.83

(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(71)(73) Søker/Patenthaver **MILES INC.,**  
1127 Myrtle Street,  
Elkhart, IN 46514,  
USA.

(86) Internasjonal søknad nr. -

(86) Internasjonal inngivelsesdag -

(85) Videreføringsdag -

(41) Alment tilgjengelig fra 18.11.83

(44) Utlegningsdag 31.07.89

(72) Oppfinner **A. CHRISTOPHER SKJOLD, Elkhart, IN,**  
**LONNIE R. STOVER, Elkhart, IN,**  
**ROBERT W. TRIMMER, Elkhart, IN,**  
**USA.**

(74) Fullmektig Siv.ing. Lars Brevig,  
Bryns Patentkontor A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 17.05.82, US, nr. 378895.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **PREPARAT, PRØVEINNRETNING OG FREMGANGS-  
MÅTE FOR PÅVISNING AV ESTERASEAKTIVITET  
I EN VÆSKEPRØVE.**

(57) Sammendrag  
Preparat, prøveinnretning og fremgangs-  
måte for bestemmelse av nærvær av leukocytter,  
esterase og/eller esteraseaktivitet i en prøve.  
Preparatet omfatter en ester som når  
den spaltes ved hjelp av esterolytisk aktivitet,  
gir en påvisbar respons, slik som fargedannelse.  
I tillegg omfatter preparatet forbindelsen 3-ki-  
nuklidinol. Innretningen fremstilles ved å blande  
en bærergrunnmasse, slik som papir, med preparatet.  
Fremgangsmåten omfatter å bringe en prøve i kontakt  
med innretningen og observere en påvisbar respons.

(56) Anførte publikasjoner Europeisk (EP) patentsøknad, publ. nr. 0012957

Foreliggende oppfinnelse angår preparat, prøve-  
innretning og fremgangsmåte for påvisning av esterase-  
aktivitet i en væskeprøve. Herved kan det foretas semi-  
kvantitativ prøving som er hurtig, og som unnværer behovet  
5 for mikroskopisk undersøkelse eller fremgangsmåter i labora-  
torium med flytende kjemikalier.

Nærværet av et unormalt nivå av leukocytter i en  
pasients urin kan være et tegn på slike patologiske tilstand-  
er som nyre- eller urogenitalveisinfeksjon eller andre for-  
styrrelser. Følgelig kan nøyaktig informasjon om leukocytter  
10 i urinen være et uvurderlig redskap for legen ved diagnose  
og behandling av slike patologiske tilstander. Tradisjonelt  
har man innen legevitenskapen stolt på visuelle påvisnings-  
teknikker for å telle leukocyttpopulasjonen i urinsediment  
15 eller ikke-sentrifugert urin, en fremgangsmåte som krever  
kostbart utstyr slik som en sentrifuge og mikroskop, såvel som  
en hel del av den praktiserende legens tid. Videre lider de  
tradisjonelle teknikkene av den unøyaktighet at bare uskadde  
celler bestemmes. Leukocytter som opptrer i urinveissystemet  
20 er gjenstand for betingelser som kan fremme utstrakt celle-  
lyse. F.eks. er det kjent at i urin med unormalt høy pH,  
kan den halve levetiden for leukocytter være så lav som 60  
minutter. Ettersom lyserte celler unnslipper påvisning i visu-  
elle undersøkelsesteknikker, kan dette resultere i feilaktig  
25 lave bestemmelse og uriktige negative resultater.

Av de to teknikkene med mikroskopisk leukocytta-  
lyse, urinsediment og ikke-sentrifugert, homogenisert urin,  
er den førstnevnte klart den mest ønskelige. Selv om pålite-  
lige resultater kan fremkomme med den sistnevnte, anvendes  
30 observasjon av urinsedimentet i et overveldende flertall av til-  
fellene. Den krever at urinprøven sentrifugeres og at sedi-  
mentet isoleres og gjøres til gjenstand for mikroskopisk in-  
speksjon. Vedkommende som utfører analysen, teller så antal-  
let leukocytter som kommer tilsyne i området som betraktes.  
35 Denne oppgaven kompliseres imidlertid ytterligere ved nær-  
været av andre urinbestanddeler i sedimentet slik som epitel-  
celler og saltpartikler. Det varierende innhold av sediment-  
bestanddeler parret med andre kompliserende faktorer inkludert

ikke-homogenitet i prøven og varierende optisk kraft i mikroskoputstyret, kan føre til store feil i den endelige bestemmelsen.

Det er følgelig åpenbart at en hurtig, lettvint fremgangsmåte for leukocyttbestemmelse, en som ville eliminere behovet for tidkrevende teknikker såvel som kostbart utstyr, og som ville gi nøyaktige resultater enten cellene var uskadet eller var blitt lysert, virkelig ville fremme teknikkens stand med et stort sprang. Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et slikt fremskritt. Den er basert ikke på evnen til å se leukocyttter, men på den enzymatiske aktivitet som de oppviser, og er derfor ikke gjenstand for de unøyaktighetene som ble beskrevet ovenfor.

Blant den tidligere kjente teknikk finnes der en rekke litteraturhenvisninger som åpenbarer bruken av visse estere som, når de spaltes ved hjelp av enzymatisk aktivitet, gir dannelsen av farge eller andre påvisbare elementer. GB-PS nr. 1.128.371 åpenbarer således bruken av indoksy- og tioindoksy-lestere som nyttige kromogener ved påvisning av hydrolytiske enzymer i kroppsvæsker. Enzymene spalter esteren til fritt indoksy som deretter oksyderes til det dimere produktet indigo, et lett observerbart blått fargestoff. Slik aktivitet menes å skyldes, blant andre enzymer, cholinesterase. Dette patentet angir også at i tillegg til indoksyldelen av estersubstratet, velges syreradikalet med spesielt hensyn til enzymet som skal påvises. F.eks. fastslås det at syreradikalet kan være acetat, alurat eller stearat for påvisning av esterase eller lipase. For å påvise enzymer slik som fosfatase eller sulfatase, kan acylradikalet være uorganisk. Det britiske patentet kan følgelig anses for å angi bruken av kromogene estere som substrater for å påvise esterolytiske enzymer, idet slike estere omfatter indoksy eller tioindoksy som alkoholrester i esteren, og idet det er knyttet en gruppe til acylresten for at den skal være tjenlig for det bestemte enzymet som skal bestemmes.

Virkningen av nøye acylradikalutvelgelse er ingen steder mer klart eksemplifisert enn i to litteraturhenvisning-

er som viser esterasespesifisitet for estere hvor acylradikalet omfatter en N-beskyttet aminosyre eller peptid. Janoff et al., Proc. Soc. Exper. Biol. Med 136:1045-1049 (1971) angir således at alaninestere er spesifikke substrater for esterase  
5 erholdt fra menneskeleukocytter. Denne litteraturhenvisningen angir entydig at et ekstrakt av menneskeleukocytgranuler hydrolyserte n-acetyl-l-alanyl-l-alanyl-l-alanylmetyler. Videre ble på samme måte l-alanin-p-nitrofenolester hydrolysert til den gule p-nitrofenol-fargeformen.

10 På samme måte angir Sweetman et al., Jour. Hist. Soc., 22:327-339 bruken av l-naftyl-N-acetyl-DL-alanin og l-naftylbutyrat for å påvise nærværet av esterase samt l-naftyl-N-acetyl-l-alanyl-l-alanyl-l-alanin.

15 US-PS nr. 4.278.763, bevilget til Boehringer Mannheim GmbH, kombinerer disse angivelsene ved å komme frem til indoksy- eller tioindoksylestrene av aminosyrer eller peptider som nok et annet eksempel på et tradisjonelt kolorogent substrat for leukocytisk esteraseaktivitet. På samme måte som Janoff- og Sweetman-henvisningene, angir Boehringerpatentet ekviv-  
20 lensen av proteaser og esterase i deres esterolytiske tilbøyeligheter.

Andre angivelser innen teknikkens stand med hensyn til leukocytbestemmelse omfatter den peroksydative aktiviteten av granulære leukocytter (US-PS nr. 3.087.794). En  
25 slik anvendelse kan imidlertid ikke skille mellom leukocytter og hemoglobin, og man kan ikke si hvorvidt en positiv prøve er tegnet på hvite eller røde blodceller.

Endelig er der i handelen tilgjengelig et produkt kjent som "Cyturtest" som utnytter N-tosylalaninindoksyester  
30 nevnt ovenfor. Dette produktet omfatter en filterpapiirpute impregnert med indoksylestere av aminosyren. Puten er montert på en plaststrimmel. Når den dyppes ned i en leukocyttholdig urinprøve, fremkommer det en farge på filterpapiirputen som skyldes dannelsen av indigo. Denne prøven lider imidler-  
35 tid av den ulempen å ha en anseelig lang ventetid (ca. 15 minutter) før prøveresultatene kan fastsettes.

Selv om bruken av kromogene esterasesubstrater er

162120

4

vel etablert i teknikkens stand, og til tross for at tilstedeværelsen av esteraseaffinitet mot indoksyllalaninat og -peptidat, foreligger det følgelig ingen virkelig hurtig prøve for leukocytter i urin. Det er mot løsningen av dette problemet at den foreliggende oppfinnelse er rettet.

Basert på en planlagt innsats med forskning og utvikling ble det oppdaget at en bestemt, lettvint prøve for nærvær av leukocytter i urin kunne fås med en prøvetid på bare 3-4 minutter og mindre, slik at man overvant en alvorlig ulempe ved teknikkens stand.

I korte trekk omfatter den foreliggende oppfinnelse et preparat, en prøveinnretning og en fremgangsmåte for å bestemme esteraseaktivitet i en prøve.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer et preparat, en prøveinnretning og en fremgangsmåte for påvisning av esteraseaktivitet i en væskeprøve. Preparatet er kjennetegnet ved at det omfatter en i og for seg kjent kromogen ester med formel:



hvor R er en indoksy- eller tioindoksyrest som gir en påvisbar respons når esteren spaltes ved hjelp av en esterase eller esteraselignende esterolytisk reaksjon, og hvor R' er en aminosyre eller peptidrest som har en nitrogenbeskyttelsesgruppe, og ved at preparatet inneholder 3-kinuklidinol og eventuelt en alkohol med 1-20 karbonatomer.

Innretningen omfatter en bærende grunnmasse hvori preparatet er innesluttet. Fremgangsmåten omfatter å bringe innretningen i kontakt med en væskeprøve og observere enhver påvisbar respons i bærermassen.

Slik det her brukes skal uttrykkene "esteraseaktivitet", "kromogen ester", "påvisbar respons" og "esterase- eller esteraselignende reaksjon" samt "esterolytisk reaksjon" ha de følgende betydninger: "Esteraseaktivitet" skal bety den egenskap ved en prøve at prøven oppfører seg som enzymet esterase. Nærværet av esteraseaktivitet i en prøve viser seg følgelig ved å være i stand til å spalte et kromogent estersubstrat, definert nedenunder, og på en slik måte som

definert nedenunder.

"Kromogen ester" skal bety en ester med den her definerte strukturen hvor ett av produktene fra esterolytisk spalting, nemlig alkoholresten fra en slik spalting, er i-  
5 stand til å gi en påvisbar response enten i seg selv eller gjennom ytterligere reaksjon.

Med uttrykket "påvisbar respons" menes en endring i eller tilsynekomst av en fysisk parameter som kan oppfattes av mennesker eller ved instrumentell observasjon. Den  
10 påvisbare respons kan følgelig være tilsynekomsten av, eller endringen i, synlig farge i bærergrunnmassen i den her åpenbarte prøveinnretningen, eller i en oppløsning hvor preparatet er oppløst eller suspendert. Responsen kan også være en endring i mengden lys absorbert eller reflektert av bærer-  
15 grunnmassen. F.eks. kan bærergrunnmassen analyseres ved å bruke et reflektometer eller et spektrofotometer. Det reflekterte eller absorberte lyset som måles, kan være innenfor et vidt område av bølgelengder, fra infrarødt til ultrafiolett. Alternativt kan den påvisbare responsen være i  
20 form av tilsynekomsten av kjemiluminiscens. Avhengig av valget av R i den kromogene esteren, dvs. alkoholresten, vil det ses at en lang rekke påvisbare responser er mulige ved den foreliggende oppfinnelse, og arten og graden av respons er svært bred i omfang.

25 Slik det her brukes skal uttrykkene "esterasereaksjon", "esteraselignende reaksjon" og "esterolytisk reaksjon" gjelde for en hvilken som helst reaksjon hvorved spaltingen av en kromogen ester til dens alkohol- og acylbestanddeler katalyseres, enten slik katalyse skyldes nærværet av en ester-  
30 ase eller den kan tilskrives en annen prøvebestanddel som oppviser esteraseaktivitet.

Den kromogene esteren i preparatet er kjennetegnet ved to generelle kriterier: en alkoholrest R som gir en påvisbar respons når esteren forsåpes eller spaltes esteroly-  
35 tisk, og en acylrest R som omfatter en aminosyre- eller peptidrest, hvor aminogruppen er substituert med en nitrogenbeskyttende gruppe. Typisk for R er slike kromogener som indoksy (3-hydroksyindol) og tioindoksyl samt deres derivater,

like så vel som p-nitrofenol og p( $\beta$ -nitrovinyl)-fenol. Substituerte og usubstituerte indoksy- og tioindoksyrester er beskrevet i GB-PS nr. 1.128.371 og US-PS nr. 4.278.763.

I EP-patentsøknad 0012957 er det beskrevet er  
5 diagnostisk middel til påvisning av proteolytiske enzymer. Middelet er en kromogen indoksy- og/eller tioindoksyaminosyreester og/eller peptidester. Denne kromogene esteren er av samme type som den som benyttes i foreliggende preparat.

Acyl delen i esteren, dvs. aminosyre- eller peptid-  
10 resten, er også ment å vært vidt definert. Følgelig omfatter aminosyreresten én av  $\alpha$ -aminosyrene i L- eller D-form. Særlig foretrukket er L-alanin, men foretrukne utførelsesformer omfatter også glycin, valin, leucin, isoleucin, fenylalanin og tyrosin. Eventuelle frie hydroksylgrupper acyleres fortrinnsvis.  
15

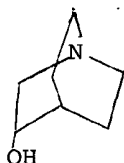
Dersom R' er et peptid, foreskriver foreliggende oppfinnelse de med ca. 1 - 5 aminosyrebestanddeler. Foretrukket er di- og tripeptider av de ovenfor nevnte aminosyrene.

20 De N-beskyttende grupper som vanligvis anvendes i peptidkjemien, samt andre, er her innlemmet under uttrykket "nitrogenbeskyttende gruppe". Slike grupper som acyl, oksykarbonyl, tiokarbonyl, sulfonyl, sulfenyl, vinyl, cykloheksenyl, fosforyl eller karbonyl er omfattet.

25 Følgelig omfatter preparatet ifølge oppfinnelsen en kromogenester og 3-kinuklidinol. Det er funnet at innlemming av sistnevnte forbindelse dramatisk minsker reaksjonstiden for spalting av en kromogen ester med en prøve som har esteraseaktivitet. Ved å innlemme 3-kinuklidinol i preparatet reduseres avlesningstiden flere ganger; fra 15 minutter uten  
30 forbindelsen til 2 - 3 minutter og mindre når den tilstede sammen med den kromogene esteren.

3-kinuklidinol har det formelle navnet 1-azabicyklo-[2.2.2]-oktan-3-ol og har strukturen

35



Den foreligger i optisk aktive isomere former som hver har særskilte fysiske egenskaper. dl-formen kan utkrystalliseres fra aceton eller benzen hvorved man får krystaller som smelter ved 225 - 277°C, og som sublimerer ved 120°C og 20 mm Hg. 5 l-isomerene danner prizmer som smelter ved 200 - 222°C. Forbindelsen er blitt brukt som sådan eller i form av ett av dens derivater som et hypotensivt legemiddel. Se "Merck Index", 9. utgave, side 1052, punkt nr. 7905, Merck & Co., Inc., Rahway, N.J. (1976). Det har også blitt rapportert som 10 nyttig ved spalting av  $\beta$ -ketoestere. Se "Aldrich Catalog Handbook", side 826, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI (1981-1982).

Selv om de respektive mengder av kromogen ester og 3-kinuklidinol som er tilstede i preparatet, ikke anses 15 for å være kritiske, er det funnet ønskelig at det er tilstede i et molarforhold mellom ester og 3-kinuklidinol i området fra 1:5 til 100. Det er funnet særlig nyttig å bruke et preparat hvor molarforholdet er 1:30 til 75.

I tillegg til de ovenfor nevnte bestanddelene kan 20 preparatet som nevnt også inneholde en alkohol med 1-20 karbonatomer. Foretrukket er en alkohol med 8 - 12 karbonatomer. Eksempler på slike alkoholer som kan innlemmes i preparatet, og som er funnet særlig foretrukket, er en hvilken som helst av isomerene av dekanol, særlig n-dekanol.

25 Prøveinnretningen ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en bærergrunnmasse hvor preparatet er innlemmet og som derved tilveiebringer et redskap for hurtige, pålitelige beregninger av nærværet av leukocytter eller andre kilder for esteraseaktivitet i prøven. Den bærende grunnmassen er vanligvis, men ikke nødvendigvis, et porøst stoff slik som filterpapir. Andre former for bærergrunnmasse-materialer som 30 er anerkjent innen teknikken, er filt, porøse keramiske strimler og vevde eller sammenflettede glassfibre (US-PS nr. 3.846.247). Bruken av trevirke, tøy, svampmateriale og leireholdige stoffer (US-PS nr. 3.552.928) er også foreslått. Alle 35 slike bærermaterialer er mulige å bruke ved foreliggende oppfinnelse, likeså vel som andre materialer er det. Det er

funnet at filterpapir er særlig egnet.

Ved en foretrukket utførelsesform fuktes filterpapir med en oppløsning eller suspensjon av oppløsning av 3-kinuklidinol i vandig buffer (pH ca. 8,5) eller annet egnet  
5 hjelpemiddel som lett lar seg påvise ved hjelp av rutineeksperimenter i laboratoriet, og tørkes deretter. Det tørkede filterpapiret inkorporeres deretter med en oppløsning av den kromogene esteren. Vanligvis er esteroppløsningen i et organisk oppløsningsmiddel, slik som aceton. Andre opp-  
10 løsningsmidler som det kan være bekvemt å bruke, omfatter metanol, etanol, N,N-dimetylformamid og dimetylsulfoksyd. Etter impregnering med esteroppløsningen, tørkes filterpapiret hvorved man får en prøveinnretning som er følsom for nærværet av leukocytter eller andre kilder for esteraseaktivitet.

15 Den tørkede, reagensbærende grunnmassen kan festes på et underlagsmateriale om ønsket. En foretrukket utførelsesform av prøveinnretningen omfatter således en bærergrunnmasse av filterpapir hvori preparatet beskrevet ovenfor er innlemmet, idet grunnmassen er knyttet til én side av et  
20 forlenget stykke transparent polystyrenfilm. Grunnmassen er festet til én ende av filmen ved hjelp av hvilke som helst egnede midler, slik som dobbeltsidig tape ("Double Stick" tilgjengelig fra 3M Company), og den andre enden av polystyrenfilmen tjener som et håndtak. Ved bruk holdes en  
25 slik innretning i den frie enden av underlagsmaterialet av polystyrenfilm og grunnmasseenden dyppes ned i prøven (f.eks. urin) og fjernes hurtig. Eventuell fargedannelse eller annen påvisbar respons observeres etter en på forhånd bestemt tid og sammenlignes med en referansestandard som svarer til  
30 responser mot kjente konsentrasjoner av leukocytter eller annen analytt med esteraseaktivitet. Det er funnet at en inkubasjonstid på ca. 1 - 3 minutter er tilstrekkelig for å fargeutvikling oppstå i det reagensholdige filterpapiret.

#### Eksempler

35 De ovenfor nevnte og andre utførelsesformer av foreliggende oppfinnelse kan lettere illustreres under henvisning til de følgende eksempler.

Eksempel I - Kontrollprøveinnretning

- Et eksperiment ble utført for å fremstille en prøveinnretning som kan brukes ved bestemmelse av nærværet av leukocytter i en væskeprøve. Grovt sett omfattet innretningen et filterpapirkvadrat (ca. 0,2 cm lang side) som var blitt impregnert med en kromogen ester, indoksyl-N-tosylalaninat og n-dekanol. Et stykke filterpapir ble i rekkefølge senket ned i hver av to dyppeinnretninger med tørking etter hver nedsenking. Det resulterende tørkede reagensholdige papiret ble kuttet i 0,5 cm store kvadrater hvorav ett ble festet til enden av en avlang polystyrenstrimmel som målte ca. 10 x 0,5 cm. Adhesjon mellom papiret og plasten ble oppnådd gjennom bruken av dobbeltsidig tape kjent "Double Stick", tilgjengelig fra 3M Company.
- Den første dyppeoppløsningen omfattet en boratbufferoppløsning hvortil det var tilsatt en anionisk detergent "Bio Terge AS-40") og kaliumbromat. Boratbufferen (pH = 8,6) ble fremstilt ved å tilsette 4,5 ml av en 0,2 M borsyreoppløsning til 5,5 ml av en 0,05 M boraksoppløsning, alt i destillert vann. Til denne oppløsningen ble det tilsatt et tilstrekkelig volum med "Bio-Terge AS-40" hvorved man fikk en 0,2 ml/dl oppløsning. Den resulterende oppløsningen ble gjort 10 mM i kaliumbromat.

Et stykke "Eaton and Dikeman 205"-filterpapir ble en kort stund senket ned i den første dyppeoppløsning og tørket i en luftovn ved 100°C i 20 minutter.

En annen dyppeoppløsning omfatter en acetoneoppløsning av polyvinylpyrrolidon, n-dekanol, kinin.HCl og 3-(N-tosyl-L-alanyloksy)-indol. De resulterende konsentrasjonene av oppløste stoffer var som følger:

1 ml/dl polyvinylpyrrolidon i metanol ("Luviskol")

2 ml/dl n-dekanol

10 mM kininhydroklorid

2 mM 3-(N-tosyl-L-alanyloksy)-indol.

162120

10

Det tørkede filterpapiret fra den første dyppeopløsningen ble senket ned i den andre dyppeopløsningen og tørket i en luftovn ved 60°C i 5 minutter. Et 0,5 cm kvadrat med tørket papir ble montert på en polystyrenstrimmel slik som beskrevet ovenfor.

For å prøve evnen hos prøveinnretningen til å måle nærværet av leukocytter, ble en oppløsning av tillaget urin som inneholder en kjent konsentrasjon leukocytter fremstilt og frosset for senere bruk til å bedømme prøvestrimmelen. En del av denne tillagde urinen ble tint opp og inneholdt en leukocyttkonsentrasjon på 3,3 leukocytter pr. mikroliter (µl). En av innretningene ble dyppet ned i den for et øyeblikk, fjernet og henlagt for inkubering. Etter 14 minutter var det utviklet tilstrekkelig med farge i strimmelen til å muliggjøre en bestemmelse av en positiv prøve.

#### Eksempel II - Virkning av 3-kinuklidinol

Et eksperiment ble utformet for å prøve virkningene av forbindelsen 3-kinuklidinol på ytelsen til en lignende strimmel som den som ble fremstilt i eksempel I. Følgelig ble fremgangsmåten ifølge eksempel I fulgt med unntak av at den første dyppeopløsning ble gjort 50 mM i 3-kinuklidinol og 10 mM i kaliumferrocyanid (istedenfor bromat). Tørking av filterpapiret etter den første nedsenking skjedde ved 80°C i 25 minutter. Videre inneholdt den andre dyppeopløsningen 0,2 ml/dl n-dekanol, 1,5 ml/dl polyvinylpyrrolidon og 1,5 mM 3-(N-tosyl-L-alanyloksy)indol.

For å bedømme ytelsen til den kinuklidinolholdige prøveinnretningen, ble oppløsningen av tillaget urin benyttet i eksempel I anvendt. Følgelig ble prøveinnretningen dyppet ned i urinopløsningen og henlagt for inkubering. Etter 4 minutter var tilstrekkelig farge utviklet i reagensstrimmelen til å indikere et positivt resultat for nærvær av leukocytter i den tilagde urinprøven.

#### Eksempel III - En foretrukket utførelsesform

Et eksperiment ble utformet for ytterligere å forbedre resultatene ifølge eksempel II. Følgelig ble fremgangsmåten ifølge eksempel I fulgt, med unntak slik som angiy

nedenunder, ved fremstilling av en prøveinnretning.

Den første dyppeopløsningen omfattet en pyrofosfatbuffer ved pH = 8,6. Denne ble fremstilt ved å blande opp en oppløsning av 0,2 M natriumpyrofosfat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ ) i 5 destillert vann og ved å tilsette tilstrekkelig med krystaller av meta-fosforsyre ( $(\text{HPO}_3)_n$ ) langsomt inntil den resulterende oppløsning var ved pH = 8,6. Til denne oppløsning ble det tilsatt et tilstrekkelig volum med "Bio Terge AS-40"<sup>®</sup> til å bevirke en 0,2 ml/dl-oppløsning. Deretter ble opp- 10 løsningen gjort 10 mM i kaliumferrocyanid og 50 mM i 3-kinuklidinol.

Et stykke "Eaton and Dikeman"<sup>®</sup>-filterpapir ble senket ned i den første dyppeopløsning, fjernet og tørket ved 80°C i 35 minutter.

15 En annen dyppeopløsning ble fremstilt i aceton. Den inneholdt 0,2 ml/dl n-dekanol, 2,0 ml/dl polyvinylpyrrolidon i metanol ("Luviskol"<sup>®</sup>) og 1 mM 3-(N-tosyl-L-alanyl-oksyl)-indol.

Det tørkede filterpapiret fra den første dyppeopløsningen ble senket ned i den andre dyppeopløsningen, 20 fjernet og tørket ved 60°C i 7 minutter. Et 0,5 cm kvadrat av den resulterende bærergrunnmasse ble montert på en polystyrenstrimmel slik som i eksempel I til en prøveinnretning.

Innretningen ble prøvd ved å bruke tre tillagede 25 urinprøver, som hver hadde en spesifikk gravitet på 1,010 og var fremstilt til hhv. 0, 8,3 og 25 polymorfonukleære leukocytt (PMN/ $\mu\text{l}$ ). Disse oppløsningene ble betegnet som hhv. "negativ", "spor" og "positiv". Prøveinnretningene ble observert av 6 personer som hadde erfaring i å tolke prøveinn- 30 retninger for dypping og avlesning. For å sikre objektivitet hos observatøren, var de tillagede urinprøvene ikke merket. Hver observatør dyppet en prøveinnretning i en urinprøve for et øyeblikk, fjernet den og observerte den etter inkubasjonsperioder på 1, 2 og 3 minutter.

35 Det ble fremstilt et fargekart for bruk i undersøkelsen, dvs. for å sammenligne med farger utviklet i prøveinnretningen som var blitt fremstilt på forhånd svarende hhv. til

162120

12

negativ, spor (8,3 PMN/ $\mu$ l) og positiv (25 PMN/ $\mu$ l). Således ble tre av de her fremstilte innretningene dyppet, én i hver av tre urinprøver som var negativ, spor og positiv med hensyn til leukocytter, henlagt for inkubering i 2 minutter og fargene registrert. Deretter ble det fremstilt fargeklosser svarende til fargen utviklet etter 2 minutter i prøveinnretningene.

Hver fargekloss ble tildelt et tilfeldig nummer: 10 = negativ, 20 = spor og 30 = positiv. De 6 personene som deltok i blindprøven ble bedt om å avlese hver strimmel ved 1, 2 og 3 minutters intervaller etter neddypping og fjerning fra en bestemt tillaget urinprøve. Hver person fastsatte så en nummerverdi på fargeutviklingen ved hvert tidsintervall og for hver urinprøve. Resultatene er som følger:

15

| Tid<br>(minutter) | Leukocyttkonsentrasjoner |           |              |
|-------------------|--------------------------|-----------|--------------|
|                   | Negativ (10)             | Spor (20) | Positiv (30) |
| 1                 | 10,0                     | 13,8      | 22,3         |
| 2                 | 10,0                     | 19,6      | 29,6         |
| 3                 | 10,1                     | 23,8      | 31,0         |

20

Dataene viser fargedifferensiering mellom forskjellige leukocyttkonsentrasjoner ved 1 minutt, med utmerket differensiering ved 2 minutter.

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Preparat for bestemmelse av nærvær av esterase-aktivitet i en væskeprøve, k a r a k t e r i s e r t  
v e d at preparatet omfatter en i og for seg kjent  
kromogen ester med formel:



hvor R er en indoksyl- eller tioindoksylrest som gir en påvisbar respons når esteren spaltes ved hjelp av en esterase eller esteraselignende esterolytisk reaksjon, og hvor R' er en aminosyre eller peptidrest som har en nitrogenbeskyttelsesgruppe, og at preparatet inneholder 3-kinuklidinol og eventuelt en alkohol med 1-20 karbonatomer.

2. Preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at R betyr indoksyl.

3. Preparat ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at R betyr tioindoksyl.

4. Preparat ifølge et av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at R' betyr en aminosyrerest.

5. Preparat ifølge et av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at R' er en peptidrest.

6. Preparat ifølge et av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at R' er N-tosylalaninat.

7. Preparat ifølge krav 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at den kromogene ester er en indoksyl-N-tosylalaninat.

8. Preparat ifølge et av kravene 1-3, k a r a k t e r i s e r t v e d at preparatet omfatter n-dekanol.

162120

14

9.           Prøveinnretning for bestemmelse av nærvær av  
esteraseaktivitet i en væskeprøve,   k a r a k t e r i -  
s e r t   v e d   at innretningen omfatter en bærer-  
grunnmasse inkorporert med preparatet ifølge et av kravene  
5   1-8.

10.           Fremgangsmåte for bestemmelse av nærvær av esterase-  
aktivitet i en væskeprøve,   k a r a k t e r i s e r t  
v e d   at fremgangsmåten omfatter trinnene ved å bringe  
10   prøven i kontakt med prøveinnretningen ifølge krav 9 og  
iaktta påvisbar respons fra bærermatrixen.

15

20

25

30

35