



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **318023**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl⁷

C 12 Q 1/26 , C 07 D 277/82

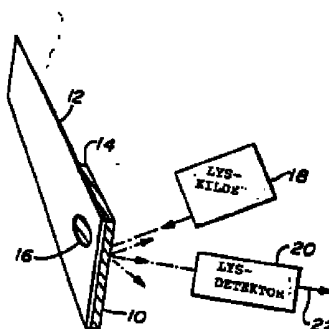
Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19971012	(86)	Innt.inng.dag og søknadsnr	1995.09.07 PCT/US95/12091
(22)	Inng.dag	1997.03.05	(85)	Videreføringsdag	1997.03.05
(24)	Løpedag	1995.09.07	(30)	Prioritet	1994.09.08, US, 302575
(41)	Alm.tilgj	1997.04.25			
(45)	Meddelt:	2005.01.24			
(71)	Søker	LifeScan Inc , 1000 Gibraltar Drive, MS 3 D, CA95035-6312 MILPITAS, US			
(72)	Oppfinner	Yeung Siu Yu, 3258 Pasco Robles, Pleasanton, CA 95035, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 765 Sentrum, 0106 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Forsøksanordning inneholdende et reagenssystem for bestemmelse av nærvær eller mengde analytt i en prøve			
(56)	Anførte publikasjoner	EP A 0248312			
(57)	Sammendrag				

Det er beskrevet en fargeparforbindelse for bruk i en forsøksanordning inneholdende et reagenssystem for å detektere nærværet eller mengden av en analytt i en prøve.

Reagenssystemet innbefatter et eller flere enzymer, som i nærvær av analytten, danner et oksidasjonsmiddel i mengder som er indikative på mengden av analytt i prøven. Den valgte forbindelsen er meta[3-metyl 2-benzotiazolinon hydrazon]N-sulfonyl benzensulfonat mononatrium.



Foreliggende oppfinnelse angår en forsøksanordning inneholdende et reagenssystem for bestemmelse av nærvær eller mengde analytt i en prøve. Reagenssystemet innbefatter enzymer for å danne et oksydasjonsmiddel i mengder som er indikative for mengdene analytt i prøven, og et fargepar som danner en kromofor ved oksydasjon med oksydasjonsmiddelet.

Kvantifisering av kjemiske og biokjemiske komponenter i fargede vanndige fluider, spesielt fargede biologiske fluider så som helblod og urin og biologiske fluiderivater så som serum og plasma, har fått en stadig økende betydning. Viktige anvendelsesområder er innen medisinsk diagnose og behandling og ved kvantifisering av eksponering til terapeutiske legemidler, intoksikanter, skadelige kjemikalier og lignende. I visse tilfeller er mengdene av materialer som skal bestemmes enten så små - i størrelsesorden ett milligram eller mindre pr. desiliter - eller så vanskelig å bestemme nøyaktig at apparatet som anvendes er komplisert og kan kun anvendes av faglært laboratoriepersonell. I dette tilfellet, er resultatene ofte ikke tilgjengelige før etter noen timer eller døgn etter prøvetakingen. I andre tilfeller er det ofte viktig at legoperatører kan utføre testen rutinemessig raskt og reproduserbart utenfor en laboratorieoppstilling med rask eller umiddelbar informasjonsvisning.

En vanlig medisinsk test er måling av blodglukosenivåer hos diabetikere. Nåværende teknikk medfører at diabetespasientene må måle sitt blodglukosenivå fra to til syv ganger pr. dag, avhengig av typen og alvorligheten i deres spesielle tilfelle. Basert på det observerte mønsteret av målte glukosenivåer, kan pasienten og legen sammen gjøre justeringer av diett, trening og insulininntak for bedre å kunne håndtere lidelsen. Denne informasjonen bør helt klart være tilgjengelig for pasienten umiddelbart.

Det er kjent mange blodglukosetestmetoder og testartikler, men alle disse har forskjellige begrensninger. En stor forbedring er beskrevet og vist i US-PS 4.935.346, 5.049.487, 5.059.394 og 5.179.005 til R. Phillips et al. og overdratt til samme søker som foreliggende søknad.

Frengangsmåten beskrevet i disse patentene medfører å ta en reflektansavlesning fra en overflate til en inert porøs matriks impregnert med en reagens som vil samvirke med analytten og danne et lysabsorberende reaksjonsprodukt når fluidet som skal analyseres påføres en annen overflate og migrerer gjennom matriksen til overflaten som avleses. Reagensen innbefatter glukoseoksydase, et enzym som forbruker glukose i prøven og danner hydrogenperoksid, som i nærvær av et annet enzym, pepperrotperoksydase

oksyderer et fargepar innbefattende 3-metyl-2-benzotiazolinon hydrazon hydroklorid (MBTH) og 3-dimetylaminbenzosyre (DMAB) og gir en blå farge. Det utføres deretter reflektansmålinger ved to separate bølgelengder. Konsentrasjonen av glukose i blodet blir bestemt basert på intensiteten til fargestoffet ved hjelp av et LED-spektro-fotometer.

5

Videre beskriver kjent teknikk EP A 0 248 312, en testanordning med enzym og fargedanner der forbindelsen er 2-hydrazono-4,6-dinitro-benzthiazoloner.

I vår patentsøknad U.S.S.N. 245.940, inngitt 19. mai, 1994, er det beskrevet et fargepar bestående av 3-metyl-2-benzotiazolinon hydrazon i fri form eller i syreform (MBTH) og 8-anilino-1-naftalensulfonat, i syre- eller saltform (ANS) som anvendes i stedet for MBTH-DMAB fargeparet som beskrevet over. MBTH-ANS fargeparet er mindre løslige ved oksidasjon og gir derved et mer stabilt endepunkt, med minimal fargesvekkelse, sammenlignet med det oksiderte MBTH-DMAB fargeparet.

15

Selv om disse tidligere systemene effektivt har vært brukt for å fremstille anvendelige testanordninger for bestemmelse av nærværet eller mengden av glukose, er flere ulemper notert. Testanordningene som benytter slike fargepar, er utformet både for hjemmebruk og for profesjonelt bruk og blir så sådann solgt av produsenter og distributører med det for øyet at brukeren vil anvende dem over en betydelig tidsperiode, slik at de selvfølgelig må være effektive i hele denne tidsperioden. Dette behovet for en betydelig lagringstid har medført vanskeligheter med fremstilling av produkter som anvender MBTH som en av komponentene i et fargepar.

For det første er det funnet at stabiliteten til MBTH avtar med økende temperatur og alkalinitet. Den syrefrie formen av MBTH er meget utsatt for å sublimere bort. I et forsøk på å motvirke dette, er en foretrukket form syrehidratet av MBTH for eksempel 3-metyl-2-benzotiazolinon hydrazon hydroklorid. Dette hydratat er dessverre i seg selv ustabilt ved økende temperatur og disosierer lett i syrefri MBTH og HCl ved oppvarming. I tillegg til å ha lav stabilitet ved høy pH, vil effektiviteten av MBTH til oksidativt å reagere med sin koblingspartner sterkt avta med økende alkalinitet, slik at ved høy pH vil det dannes liten eller ingen farge fra fargeparet.

I lys av disse forhold, må MBTH i praksis brukes i store overskudd og ved lav pH for å minimalisere effektene av ustabilitet og ineffektivitet. Ideelt ville en pH på mindre enn 2.0 være foretrukket i lys av lav sublimasjon og høy effektivitet for forbindelsen. For systemene som behandles her, kan det imidlertid ikke anvendes en slik ideell lav pH.

35

Som beskrevet ovenfor, er reagenssystemene som anvendes avhengig av enzymer for å virke på substratanalytten og danne oksidasjonsreagenser i mengder som er indikative for mengdene av analytt som er tilstede i prøven som undersøkes. Den lave pH-en som ville være ideell med hensyn til MBTH reagensen, er fullstendig upassende for enzymer så som for eksempel glukoseoksidase og pepperrotperoksidase. Ved slik lav pH vil mange av de kommersielt tilgjengelige enzymene ha liten eller ingen aktivitet. Man har derfor vært tvunget til å anvende en moderat pH, f.eks. 4, og et stort overskudd av reagenser for å sikre testanordningenes effektivitet gjennom hele den nødvendige lagringstid.

I henhold til læren ved foreliggende oppfinnelse, er det tilveiebragt en meget stabil komponent til et fargepar i en testanordning innbefattende enzymer. Komponenten, i motsetning til de som ble brukt i kjente anordninger, er istand til effektiv oksidativ kobling med en lang rekke koblingspartnere ved relativt høy pH hvilket er kompatibelt med høy enzyeffektivitet.

Foreliggende oppfinnelse angår således en forsøksanordning inneholdende et reagenssystem for bestemmelse av nærværet eller mengden av en analytt i en prøve, hvor reagenssystemet innbefatter enzymer for å danne et oksydasjonsmiddel i mengder som er indikative for mengdene av analytt i prøven, der reagenssystemet innbefatter et fargepar som danner en kromofor ved oksydasjon med oksydasjonsmidlet, kjennetegnet ved at fargeparet omfatter meta[3-metyl 2-benzotiazolinon hydrazon]N-sulfonyl benzensulfonat mononatrium.

Figur 1 viser en perspektivskisse av en utførelsesform av en testanordning inneholdende en reaksjonspute, til hvilken væskeprøven som skal analyseres påføres.

Figur 2 viser en perspektivskisse av en andre utførelsesform av anvendelsen av forsøksanordningen i figur 1.

Som beskrevet over, innbefatter oppfinnelsen en forsøksanordning inneholdende et reagenssystem for bestemmelse av nærværet eller mengden av en analytt i en væskeprøve. I figur 1 i en foretrukket utførelsesform av denne oppfinnelsen innbefatter testanordningen en porøs matris 10, hvori det er innbefattet et kjemisk reagenssystem og som er festet til en bærer 12. Gjennom bæreren er det tilveiebragt en åpning 16

hvorved en væskeprøve kan påføres en prøvemottaksflate 17 til matriksen 10. Det kjemiske systemet er tilveiebragt for å reagere med enhver analytt som er tilstede i væskeprøven og resulterer i at testoverflaten 19 til matriksen manifesterer lysreflektanseegenskaper som indikerer mengden av analytt som er tilstede i væskeprøven. Testoverflaten kan avlese med det nakne øyet, men avleses fortrinnsvis ved bruk av en spektraofotometeranordning. Elementene i en slik anordning er vist skjematisk i figur 1 og innbefatter en lyskilde 18, så som en lysemitterende diode, for å rette lys med fortrinnsvis jevn bølgelengde på testoverflaten 19. Det er i tillegg tilveiebragt en lysdetektor 20 for å detektere reflektert lys fra overflaten 19 og danne et signal 22 som indikerer mengden av detektert lys, hvilket signal for eksempel kan behandles av en mikroprosessor i avlesningsapparatet for å beregne mengden av analytt i prøven.

Slike systemer som beskrevet ovenfor er kjent og beskrevet i US-PS 4.935.346, 5.049.487, 5.059.394 og 5.179.005. Slike systemer medfører at disse testanordningene også vil bli innført i et avlesningsapparat og deretter vil prøven, for eksempel blod, bli påført den prøvemottakende overflaten 17. Figur 2 representerer et alternativ til dette, hvor blodet først påføres den prøvemottakende overflaten 17 og deretter blir testoverflaten 19 presentert for apparatet for avlesning. I alle andre henseender er de nummererte elementene i figur 2 identiske til de i figur 1.

Reflektanseegenskapene til testoverflaten varierer med analyttmengden i prøven ved operasjon av en serie kjemiske reaksjoner mellom analytten i væskeprøven og de kjemiske reagensene som er tilstede i den porøse matriksen. Spesielt innbefatter matriksen ett eller flere enzymer, som sammen med analyttbestanddelen, resulterer i dannelsen av hydrogenperoksid eller andre sterke oksidasjonsmidler. Et fargepar er innbefattet i matriksen, det vil si to forbindelser som er istand til å oksideres og danne en kromofor som absorberer lys ved spesifikke bølgelengder i forhold til mengden av kromofor som er tilstede. Oksidasjonsmidlet dannet ved den enzymkatalyserte reaksjonen, reagerer deretter med fargestoffprøven og danner kromoforen.

Valget av enzymer, det resulterende oksidasjonsmidlet og valget av fargestoffpar varierer sterkt innen området og er for en stor del en funksjon av hvilken analytt som skal bestemmes. For eksempel med bestemmelse av kolesterol i en blodprøve, kan det anvendes et oksidaseenzym, så som kolesteroloksidase. På tilsvarende måte kan etanol eller etanolbestemmelser anvende alkoholoksidase; formaldehydbestemmelser kan anvende aldehydoksidase; eller glyserol-3-fosfatbestemmelser kan anvende glyserofosfatoksidase. Hydrogenperoksidproduktet fra disse enzymkatalyserte reaksjonene kan

videre modifiseres med en etterfølgende enzymkatalysert reaksjon, for å danne et aktivt oksidasjonsmiddel for reaksjon med fargestoffparet for å danne kromoforen. For eksempel kan reaksjonen av hydrogenperoksid for å danne et aktivt oksidasjonsmiddel katalyseres av enzymet pepperrotperoksidase.

5

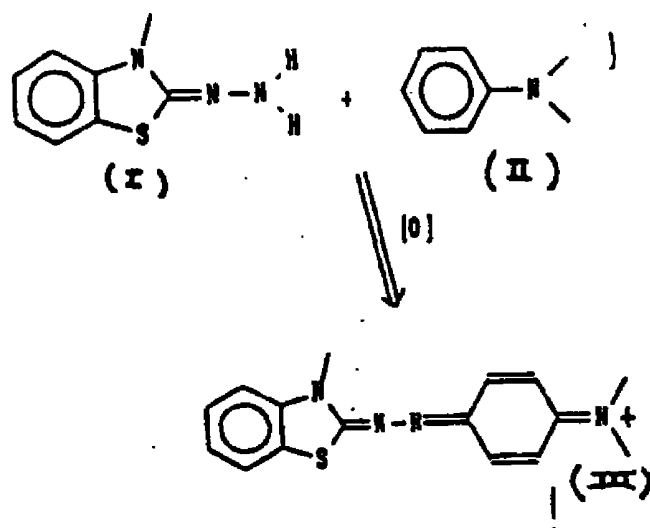
Det er innforstått at læren i henhold til oppfinnelsen har en stor anvendelse, men for den etterfølgende diskusjonen vil analytten bli eksemplifisert av glukose i en væskeprøve av helblod. Det foretrukne kjemiske systemet vil bli eksemplifisert av enzymet glukose-
 10 oksidase som virker på glukosesubstratet og danner hydrogenperoksid. Hydrogenperoksid vil i sin tur omdannes til aktivt oksidasjonsmiddel ved reaksjonen med et annet enzym, pepperrotperoksidase.

Hittil har fargestoffet som i sterk grad har blitt brukt i diagnostiske undersøkelser av glukose av den ovenfor beskrevne type, vært kombinasjonen av 3-metyl-2-benzotiazolinonhydrazon, hydrokloridhydrat (MBTH hydrokloridhydrat) (formel I) sammen med
 15 dimetylaminoenzen (formel II). Disse forbindelsene gjennomgår følgende oksidasjons-reaksjon og danner en blåfarget kromofor (formel III):

20

25

30



35

[O] = hydrogenperoksid/pepperrotperoksidase

Som beskrevet over, har dette systemet en rekke ulemper. MBTH, selv i hydroklorid-hydrat form, er relativt ustabil under påvirkning av varme og alkalinitet. Videre er reaksjonen over mest effektiv under sterkt sure betingelser, for eksempel pH på 2 eller mindre. Ved disse betingelsene har dessverre enzymene som anvendes i testanordningene, for eksempel glukoseoksidase og pepperrotperoksidase, liten eller ingen aktivitet. Kommersiell praksis har derfor tvunget frem at for å oppnå et relativt stabilt system, oppnås en optimal pH, for eksempel ca. 4, og det brukes store mengder av både enzymene og fargeparene for å oppveie den reduserte aktiviteten til enzymene og den reduserte effektiviteten ved oksidasjon av koblingsreaksjonen.

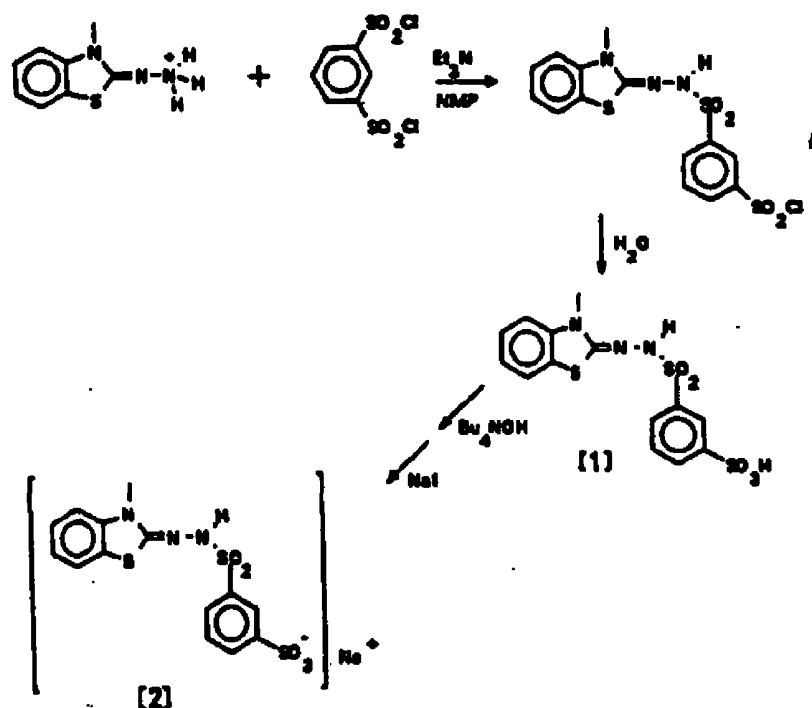
I henhold til foreliggende oppfinnelse, er det nå funnet at det kan tilveiebringes en modifisert form av MBTH som løser stabilitetsproblemet som hittil har vært tilstedeværende, og videre har en effektiv reaktivitet i et miljø som bidrar til aktiviteten til enzymene som anvendes i forsøksanordningene innbefattet her, for eksempel ved pH-verdier i området fra ca. 4 til ca. 7. Dette foretrukne derivat som er meta[3-metyl 2-benzotiazolinon hydrazon]N-sulfonyl benzensulfonat mononatrium, er videre funnet å være meget reaktivt med de ønskede koblingspartnere, de aromatiske aminer i foreliggende oppfinnelse.

MBTH derivatet i henhold til oppfinnelsen kan gjennomgå en oksidativ reaksjon med et stort område av fargeparpartnere, så som aromatiske aminer, fenoler og substituerte fenoler. Videre kan disse reaksjonene skje effektivt ved romtemperatur og ved pH som kan variere fra 4 til 11. I den foretrukne formen av derivatet i henhold til foreliggende oppfinnelse, er oksidasjonsreaksjonen optimal fra pH verdier fra ca. 4 til ca. 7, og er derved spesielt anvendelig i forbindelse med aminfargepartnere av interesse i diagnostisk kjemi, så som 3-dimetylaminobenzosyre og 8-anilino-1-naftalensulfonater.

I motsetning til MBTH, enten i syrefri eller i syrehydrat form, er dette derivatet bemerkelsesverdig stabilt, selv ved oppvarming ved 100°C for så mye som 16 timer. Videre, ved betingelsene til oksidasjonsreaksjonen, er de perokside katalyserende enzymer, så som pepperrotperoksidase, spesielt effektive ved å snu oksidasjonskoblingsreaksjonen.

Eksempel 1 - Syntese av MBTH derivatet

Syntese av meta [3-metyl 2-benzotiazolinonhydrazon] N-sulfonyl benzensulfonat mononatrium, [2]

Synteseskjema**Materialie**

3-metyl 2-benzotiazolinon hydroklorid (MBTH.HCl), NaI, tetrabutylammonium-
 30 hydroksid, metylenklorid og n-metyl-2-pyrrolidon ble innkjøpt fra Aldrich Company,
 Milwaukee i Wisconsin og brukt uten rensing. Trietylamin ble tilveiebragt fra Baker
 Chemicals og distribuert av Baxter Company of Phillipsburg, New Jersey. 1, 3
 disulfonylkloridbenzen ble tilveiebragt fra Fluka Chemicals i Ronkonkoma, New York
 eller Lancaster Chemicals i Windham, New Hampshire.

Syntese av [1]

En 4 grams prøve av MBTH.HCl ble fylt i en 150 ml Erlenmeyerkolbe forsynt med en magnetisk rørstav, og 50 ml n-metyl-2-pyrrolidon og 5 ml trietylamin ble tilsatt. Kolben var lukket med et gummiseptum og plassert på en varmeplate med magnetisk røring.

- 5 Blandingen ble oppvarmet til 60 - 70°C under kraftig omrøring i 0.5 timer, som ga en gul oppslemming. Kolben ble deretter plassert i isbad for avkjøling.

- En 5 g prøve av 1,3 disulfonylkloridbenzen ble tilsatt til en 250 ml Erlenmeyerkolbe, forsynt med en magnetisk rørestav. Kolben ble senket ned i isbad og 20 ml n-metyl-2-pyrrolidon ble tilsatt. Blandingen ble rørt inntil alt faststoff var oppløst (ca. 15 minutter). Den MBTH frie baseoppslemmingen, som ble fremstilt tidligere, ble dekantert inn i løsningen. Den resulterende lysgule blandingen fikk reagere ved en isbadtemperatur i 1.5 timer. Etter denne tiden, ble reaksjonen stanset med 10 ml 2N HCl, og ble rørt ytterligere 30 min. ved romtemperatur. 50 mg 12 mesh Norti (aktivert karbonpellets) ble tilsatt i løsningen, og ga en lys gul løsning etter 10 minutters røring. Denne ble deretter filtrert gjennom en fritte med fin grad ved hjelp av en aspirator. Det ble dannet en gul til lys brun glatt løsning. 300 ml 2N HCl ble tilsatt den røtte gule løsningen, og resulterte i utfelling av et offwhite pulver. Det faste stoffet ble oppsamlet ved hjelp av vakuumsfiltrering og produktet ble vasket tre ganger med 25 ml ionebyttet vann. Ved tørking ved 110°C i vakuum i 2 timer ble det beholdt 5.6 g off-white produkt. Produktet ble analysert med ¹H NMR og HPLC og ble funnet å være 97% rent.

- Forbindelsen [1] er ikke meget løslig i de fleste vanlige løsningsmidler eller vann. Den er imidlertid løslig i basiske løsninger og polare løsningsmidler, så som DMSO, NMP og DMF.

Syntese av [2]

- En 2.0 g prøve av råstoffet [1] ble oppløst i 50 ml metylenklorid. 4 ml 1M tetrabutylammoniumhydroksid ble tilsatt sakte, i løpet av 2 minutter, til den omrørte suspensjonen, og ga en lys gul løsning. Løsningen ble deretter vasket med 10 ml ionebyttet vann og tørket over vannfritt natriumsulfat. Sulfatet ble fjernet via gravitasjonsfiltrering, og den resulterende blandingen ble inndampet til tørrhet med en rotavapor. Det ble oppsamlet en tykk, gul olje. Oljen ble tatt opp med 125 ml aceton og 10 ml 20% NaI i aceton ble tilsatt i løpet av 5 minutter. Det kom til syne en hvit utfelling. Blandingen fikk reagere i ytterligere 20 minutter og bunnfallet ble oppsamlet via vakuumsfiltrering med en fritte med fin-grad. Resulterende offwhite faste stoffer ble

vasket tre ganger med 20 ml aceton. Ved tørking ved 110°C i 45 min., ble det erholdt 1.3 g (65%) av det ønskede produktet.

Forbindelsen [2] er meget løslig i vann og i en vann-alkoholblanding. Det faste stoffet er stabilt i luft og lys, men løsningen av denne dekomponerer sakte til en lysgul, uklar blanding når den utsettes for lys i lang tid.

EKSEMPEL 2

Fremstilling av en testanordning

- 10 En remse av polymermembran (reaksjonsmatriks) dyppes i den vandige løsningen i tabell 1 inntil metning. Den fjernes fra løsningen og overskuddsreagens klemmes av med en glasstang. Remsen henges deretter i sirkulerende luft ved 56°C i 5-10 minutter for tørking, hvorefter remsen fjernes og dyppes i den organiske løsningen beskrevet i tabell 1 inntil metning. Den tørkes igjen som i det tidligere trinnet. Den resulterende
- 15 remsen har en ønsket form for testing.

Tabell 1 - Formulering av reagenser

Vandig løsning (justert pH til 4.25 med NaOH)		Organisk løsning	
Vann	20 ml	Vann	3 ml
Sitronsyre	420 mg	Denaturert alkohol	7 ml
Etylen diamin tetra- eddisyre (EDTA)	16.7 mg	Meta[3-metyl 2- benzotiazolinon hydrazon] N-sulfonyl benzen- sulfonat mono- natrium [2]	10- 60 mg
Gantrez S95 (fra GAF, New York, New York)	90 mg	ANS	10-100 mg
Krotein SPA (fra Croda Co., New York, New York)	250 mg		
Glukoseoksidase	20,500 enheter		
Pepperrotperoksidase	16,200 enheter		

EKSEMPEL 3 - Bestemmelse av glukose

En glukoseholdig blodprøve påføres på overflaten av den reagensimpregnerte remsen.

Prøven absorberes umiddelbart i matrisen og det kommer til syne en blå farge.

- 5 Intensiteten til fargen øker med tiden og er proporsjonal med konsentrasjonen av analytten. Basert på fargeintensiteten, bestemmes glukosekonsentrasjonen ved sammenligning med en standardkalibreringskurve. På samme måte danner en vandig løsning av hydrogenperoksid (organiske peroksider, ferri og kinon) også den ønskede blåfargen på den reagensimpregnerte remsen. Konsentrasjonen av analytten kan bestemmes på
- 10 samme måte som over.

P a t e n t k r a v

1.

Forsøksanordning inneholdende et reagenssystem for bestemmelse av nærværet eller
 5 mengden av en analytt i en prøve, hvor reagenssystemet innbefatter enzymer for å danne
 et oksydasjonsmiddel i mengder som er indikative for mengdene av analytt i prøven, der
 reagenssystemet innbefatter et fargepar som danner en kromofor ved oksydasjon med
 oksydasjonsmidlet, k a r a k t e r i s e r t v e d at fargeparet omfatter:
 meta[3-metyl 2-benzotiazolinon hydrazon]N-sulfonyl benzensulfonat mononatrium.

10

2.

Forsøksanordning i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at enzymene er valgt fra gruppen bestående av glukoseoksidase, kolesterol-
 oksidase, alkoholoksidase, urikase, aldehydoksidase og glyserifosfatoksidase.

15

3.

Forsøksanordning i henhold til krav 2, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at enzymene videre innbefatter peroksidase eller uorganisk kompleks med
 peroksidaselignende egenskaper.

20

4.

Forsøksanordning i henhold til krav 2, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at enzymene innbefatter glukoseoksidase og pepperrotperoksydase.

25

5.

Forsøksanordning i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at fargeparet videre innbefatter 3-dimetylaminobenzosyre.

6.

30 Forsøksanordning i henhold til krav 1, k a r a k t e r i s e r t
 v e d at fargeparet videre innbefatter 8-anilino-1-naftalensulfonat.

