(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 84106

(51) Kv.lk.5 - Int.cl.5

G 01N 33/53

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 861568

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 14.04.86

(24) Alkupäivä - Löpdag 14.04.86

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 23.10.86

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 28.06.91

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

22.04.85 US 726255 P

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(71) Hakija - Sökande

1. **F. Hoffmann-La Roche AG**, CH-4002 Basel, Switzerland, (CH)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Farrenkopf, Bruce C.**, 84 Clinton Avenue, Clifton, N.J. 07011, USA, (US)
2. **Kaufman, Richard A.**, 744 Joralemon Street, Belleville, N.J. 07109, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: **Oy Kolster Ab**

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä kokonaisdigoksiinitasojen määrittämiseksi
Förfarande för bestämning av totaldigoxinhalterna

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 3205506 (G 01N 33/54), DE A 3230527 (G 01N 33/60), EP A 108403 (C 07D 311/82)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää kokonaisdigoksiinitason määrittämiseksi biologisissa nesteissä, sekä tässä menetelmässä käytettävää reagenssipakkausta. Menetelmä käsittää digoksiini-proteiini-kompleksin hajottamisen käsittelemällä mainitun nesteen näytettä tehokkaalla määrällä tyydytettyä tai tyydyttämätöntä rasvahappoa, alkanolia, kinidiinia tai α-tokoferolia, jolloin digoksiini vapautuu seerumin proteiineista, käsitelty näyteliuos ajetaan sentrifugi-ultrasuodattimen läpi, jolloin digoksiinia sisältävä näyteliuos selektiivisesti kulkeutuu mainitun suodattimen läpi, mutta mainitut seerumin proteiinit jäävät suodattimeen ja digoksiinin konsentraatio määritetään mainitusta näyteliuoksesta fluoresenssipolarisaatiomenetelmällä. Reagenssipakkaus käsittää pullon kutakin seuraavista reagensseista, joiden määrät ovat sellaiset, että ne mahdollistavat useampien määritysten tekemisen:

(1) antidigoksiinivasta-ainereagenssiliuos
(2) tunnistajareagenssiliuos ja
(3) digoksiinia vapauttavan aineen liuos.

Uppfinningen avser ett förfarande för bestämning av den totala digoxinhalten i biologiska vätskor, samt vid förfarandet användbar reagensförpackning. Förfarandet omfattar sönderdelning av digoxin-proteinkomplexet genom behandling av ett prov av nämnda vätska med en effektiv mängd mättad eller omättad fettsyra, alkanol, kinidin eller α-tocoferol, varvid digoxinet frigöres från serumprotein, den behandlade lösningen ledes genom ett centrifugultrafilter, varvid den digoxinhaltiga provlösningen selektivt går genom filtret, men de nämnda serumproteinerna kvarhålles i filtret, och digoxininhalten i den nämnda provlösningen bestämmes genom fluorescenspolarisationsmetoden. Reagensförpackningen omfattar en flaska med var och en av nedanstående reagenser i en mängd som är tillräcklig för utförande av flera bestämningar:

(1) en reagenslösning av antidigoxinantikropp,

(2) en lösning med identifierande reagens och

(3) en lösning av ett digoxinfrigörande medel.

Menetelmä kokonaisdigoksiinitasojen määrittämiseksi.

Jotta määritysmenetelmä, jossa analysoitavan aineen konsentraatio luetaan standardikäyrältä, olisi tarkka, täytyy standardien ja potilasnäytteiden käyttäytyä samalla tavoin määrityksessä. Ehkä eräs kriittisimmistä tekijöistä standardien ja potilasnäytteiden välillä on, että analysoitavan standardin saannon täytyy olla samanlainen kuin analysoitavan näytteen saanto, tai muussa tapauksessa saadaan tulokseksi vääriä arvoja. Tämä on totuus erityisesti silloin, kun mitataan potilasnäytteistä analysoitavan aineen kokonaismäärä.

Seerumissa olevien analyyttien fluoresenssipolarisaatiomäärityksissä on tämän menetelmän ei-toivottuna ominaisuutena korkea seerumin taustafluoresenssi. Tämä tulee erityisen ongelmalliseksi mitattaessa tutkittavien aineiden matalia tasoja, kuten esimerkiksi digoksiinin. Tässä tapauksessa määritys ei ole mahdollinen käytettäessä suoraan seerumia fluoreseiinilla leimatun digoksiinin tunnistajan kanssa, koska seerumin taustafluoresenssi ylittää suuresti fluoreseiinilla leimatun digoksiinin tunnistajan lähettämän fluoresenssisignaalin.

Jotta vältyttäisiin seerumin korkeasta taustafluoresenssistä, on tavanomaisesti tehty proteiinivapaita suodoksia käyttäen perkloorihappoa tai trikloorietikkahappoa. Vaikka menetelmät ovat tehokkaita, kun valmistetaan proteiinivapaita suodoksia, joiden taustafluorerenssi on suhteellisen pieni, on niissä muita haittoja. Digoksiinin tapauksessa saadaan huono saanto suodoksesta, ja lisäksi saantoon vaikuttaa näytteen proteiinikonsentraatio. Katso esimerkiksi Porter et al., Clin. Chem. 30 (1984) 1826 - 1829.

Ultrasuodatuksen käyttö proteiinivapaiden suodosten valmistamiseen on alalla tunnettu. Tässä menetelmässä proteiini jakautuu valikoidusti näytevolyymiosan fraktioon

(jäännös), kun taas vapaa ligandi kulkee pääasiallisesti esteettä liuoksen mukana kalvon läpi ultrasuodokseen. Tällaisen ultrasuodoksen suorittamiseen on saatavissa kaupallisia järjestelmiä. Eräs tällainen menetelmä on Centrifree ^{TM}-mikropartitiomenetelmä, jota myy Amicon yhtymä, Danvers, Massachusetts. Tämä on periaatteessa sisäänrakennettu suodatinlaite, jossa on suodatinmembraani, jonka huokoskoko on sellainen, että 99,9 % seerumin proteiinista ei mene kalvon läpi sentrifugaalisuodatuksessa. Suodattimien mukana seuraavassa mainoskirjallisuudessa ehdotetaan, että suodattimia tulisi käyttää "vapaiden" seerumissa olevien analysoitavien aineiden, erityisesti lääkeaineiden, erottamiseen proteiinin sidotusta osasta. Näinollen, erottavan aineen puuttuessa, joka vapauttaisi proteiiniin sidotun lääkkeen, ainostaan seerumissa oleva vapaa lääkeaine pääsee suodattimen läpi ja voidaan mitata jollain määritysmenetelmällä.

Alan kirjallisuuden mukaan noin 20 - 30 % seerumin digoksiinista on sitoutuneena seerumin proteiineihin. Katso Pribor et al., Drug Monitoring and Pharmokinetik Data, Pathotex Publishers, Park Forrest South, 111, s. 5 (1980). Näin ollen, jos ^{3}H-digoksiinia lisättäisiin humaaniseerumiin, noin 70 - 80 % leimasta olisi odotettavissa saannoksi suodoksessa. Käyttäen 10 normaalia humaaniseerumінäytettä, joihin lisättäisiin ^{3}H-digoksiinia, jonka jälkeen seerumit sentrifugaalisuodatettiin ultrasuodattimen läpi; havaittiin, että 15 - 25 % seerumin digoksiinista ei ollut löydettävissä suodoksesta ja oli oletettavasti proteiiniin sitoutuneena.

Kyseessä oleva keksintö koskee menetelmää seerumin kokonaisdigoksiinin määrittämiseksi. Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä vaatimuksessa 1 esitetään. Keksinnön kohteena on myös kokonaisdigoksiinitasojen määritykseen käyttökelpoinen kitti, jolle on tunnusomaista se, mitä vaatimuksessa 7 esitetään. Keksinnön

mukaisessa menetelmässä käytetään sentrifugaaliultrasuodatuksen ja seerumin proteiineihin sidotun digoksiinin erottavien aineiden yhdistelmää. On havaittu lukuisan joukon yhdisteitä joko yksin tai yhdistelmänä erottavan proteiiniin sidotun digoksiinin seerumin proteiineista. Esimerkkejä tällaisista erottavista aineista ovat kinidiini, E-vitamiini (α-tokoferoli), alemmat alkanolit ja C_3-C_{26}-rasvahapot, suositeltavampia ovat pitkäketjuiset tyydytetyt ja tyydyttämättömät rasvahapot. Tehokkaiden konsentraatioiden havaittiin olevan noin 2 - 50 mg 500 µl:aa seerumia kohti rasvahapoilla sekä α-tokoferolilla, 50 - 500 µg 500 µl:ssa seerumia kinidiinillä ja 3 - 100 mg alemmilla (tyydytetty ja tyydyttämätön) alkanoleilla (C_2-C_7), kuten esimerkiksi isopropyylialkoholilla.

Tulokset, jotka saatiin kokeista, jotka käsittivät ^{3}H-digoksiini lisäyksen normaalihumaaniseerumiin, jota seurasi erottavan aineen lisäys ja sentrifugaalisuodatus, on esitetty alla olevassa taulukossa 1.

Taulukko 1

Erottava aine	mg lisätty/500 µl seerumia	^{3}H-digoksiinin saanto suodoksissa (%)
1. H_2O	10	81
2. Arakidonihappo	10	104
3. Linoleenihappo	10	96
4. E-vitamiini	20	91
5. Kinidiini	(200 µg)	87
6. Linolihappo	10	103
7. Öljyhappo	10	91
8. Isopropanoli	25	93
9. Linoleenihappo (16 mg) ja isopropanoli (9 mg)	25	98

Esimerkki

Erottavan aineen ja sentrifugaalisuodatuksen käyttöä on havainnollistettu esimerkillä käyttäen digoksiinin fluoresenssipolarisaatiomääritystä COBAS BIO -laitteella.

Reagenssit:

1. Vasta-ainereagenssi - 0,2 moolia TRIS (hydroksimetyyli)aminometaania/litra, pH 8,0 sisältäen kaniinin antidigoksiiniseerumia, 0,01 % naudan gammaglobuliinia, 0,1 % natriumatsidia ja pinta-aktiivista ainetta.

2. Tunnistajareagenssi - 0,05 moolia TRIS (hydroksimetyyli)aminometaania/litra, pH 8,0, sisältäen 0,01 % naudan gammaglobuliinia, 0,1 % natriumatsidia ja pinta-aktiivista ainetta.

3. Digoksiinia erottava aine - 67 % (t/t)linoleenihappoa isopropanolissa.

Näitä reagensseja voidaan valmistaa kittinä, joka käsittää kutakin reagenssia pullon, jossa on sopiva määrä reagenssia useampia kokeita varten. Kitti saattaa sisältää myös valinnaisesti yhden tai useamman mikropartitioultrasuodattimen.

Määritys tehdään seuraavalla tavalla:

a) 500 µl näytettä (seerumia, plasmaa, sylkeä tai virtsaa) laitetaan Amicon Centrifree mikropartitiosuodattimeen (anisotrooppinen, hydrofiilinen YMT -ultrasuodatuskalvo).

b) 25 µl digoksiinia erottavaa ainetta lisätään ja suodattimen sisältöä sekoitetaan Vortex-sekoittimella tai muutoin sekoittamalla.

c) Suodattimen pohjalle asennetaan talteenottoastia, jonka jälkeen yhdistelmä suositellaan laitettavaksi sentrifugiroottoriin, jossa on määrätty kulma (35° - 45°) ja sentrifugoidaan 2000 x g 20 minuuttia.

d) Sentrifugoinnin jälkeen suodatin ja talteenottoastia siirretään sentrifugista ja digoksiinikonsentraatio mitataan fluoresenssipolarisaattiomenetelmällä ultrasuodoksesta, joka sisältää digoksiinin.

Esimerkki typpillisestä kalibrointikäyrästä esitetään kuvassa 1.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä kokonaisdigoksiinitasojen määrittämiseksi biologisesta nestenäytteestä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää digoksiini-proteiini-kompleksin hajottamisen käsittelemällä mainittua näyteliuosta tehokkaalla määrällä erottavaa ainetta, joka on valittu yhdestä tai useammasta aineesta ryhmästä, johon kuuluvat tyydytetyt tai tyydyttämättömät C_3-C_{26} -rasvahapot, C_{2-7}-alemmat alkanolit, kinidiini ja α-tokoferoli siten, että aineet vapauttavat sidotun digoksiinin seerumin proteiineista, käsitelty näyteliuos ajetaan sentrifugiultrasuodattimen läpi siten, että digoksiinia sisältävä näyteliuos selektiivisesti kulkeutuu mainitun suodattimen läpi, joka pidättää mainitut seerumin proteiinit, ja digoksiinin konsentraatio määritetään mainitusta näyteliuoksesta fluoresenssipolarisaatiomenetelmällä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että erottava aine on linoleenihappo.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että erottava aine on arakidonihappo.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että erottava aine on linolihappo.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että erottava aine on isopropyylialkoholi.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että erottava aine on isopropyylialkoholin ja linoleenihapon seos.

7. Kitti, joka on käyttökelpoinen kokonaisdigoksiinitasojen määrittämiseen biologisesta nestenäytteestä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää pullon kutakin seuraavista reagensseista, joiden määrät ovat sellaiset,

että ne mahdollistavat useampien määritysten tekemisen:

(1) antidigoksiinivasta-ainereagenssiliuos

(2) tunnistajareagenssiliuos ja

(3) digoksiinia erottavan aineen liuos, joka aine on valittu yhdestä tai useammasta aineesta ryhmästä, johon kuuluvat tyydytetyt tai tyydyttymättömät C_3-C_{26}-rasvahapot, C_{2-7}-alemmat alkanolit, kinidiini ja α-tokoferoni.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen kitti, t u n n e t t u siitä, että antidigoksiinivasta-aineena on kaniinin antidigoksiiniseerumi.

9. Patenttivaatimuksen 7 mukainen kitti, t u n n e t t u siitä, että digoksiinia erottavana aineena on linoleenihapon seos isopropanolissa.

10. Patenttivaatimuksen 7 mukainen kitti, t u n n e t t u siitä, että tunnistajaliuoksena on fluoreseiinidigoksiinikonjugaatti.

11. Patenttivaatimuksen 7 mukainen kitti, t u n n e t t u siitä, että

(1) mainittuna antidigoksiinivasta-aineena on kaniinin antidigoksiiniseerumi;

(2) mainittu digoksiinia erottava aine on valittu ryhmästä, johon kuuluvat linoleenihappo, arakidonihappo ja linolihappo;

(3) digoksiinin tunnistajareagenssiliuoksena on fluoreseiinidigoksiinikonjugaatti.

Patentkrav

1. Förfarande för bestämning av totaldigoxinhalterna i ett biologiskt vätskeprov, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar sönderdelning av digoxin-proteinkomplexet genom att behandla nämnda provlösning med en effektiv mängd av ett dissociationsmedel, som valts bland ett eller flere ämnen ur gruppen som består av mättade eller omättade C_3-C_{26} -fettsyror, C_2-C_7- lägre alkanoler, kinidin och α-tokoferol så, att medlen frigör det bundna digoxinet från serumproteiner, den behandlade provlösningen förs genom ett centrifugalt ultrafilter så, att provlösningen som innehåller digoxin selektivt går igenom nämnda filter, vilket håller kvar serumproteinerna, och digoxinkoncentrationen i nämnda vätskeprov bestäms med ett fluorescenspolarisationsförfarande.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att dissociationsmedlet är linolensyra.

3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att dissociationsmedlet är arakidonsyra.

4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att dissociationsmedlet är linolsyra.

5. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att dissociationsmedlet är isopropylalkohol.

6. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att dissociationsmedlet är en blandning av isopropylalkohol och linolensyra.

7. Kit som är användbart vid bestämning av totaldigoxinhalterna i ett biologiskt vätskeprov, k ä n n e t e c k n a t därav, att det omfattar en flaska var av följande reagens i mängder som gör det möjligt att utföra flere bestämningar:

(1) en reagenslösning av antidigoxin-antikroppar;

(2) en lösning med identifikationsreagens; och

(3) en lösning av ett digoxindissocierande medel, som valts bland ett eller flere ämnen ur gruppen som består av mättade eller omättade C_3-C_{26} -fettsyror, C_2-C_7- lägre alkanoler, kinidin och α-tokoferol.

8. Kit enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att antidigoxin-antikropparna är kanin antidigoxinserum.

9. Kit enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att det digoxindissocierande medlet är en blandning av linolensyra i isopropanol.

10. Kit enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att identifikationslösningen är ett fluorescein-digoxinkonjugat.

11. Kit enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att

(1) nämnda antidigoxin-antikroppar är kanin antidigoxinserum;

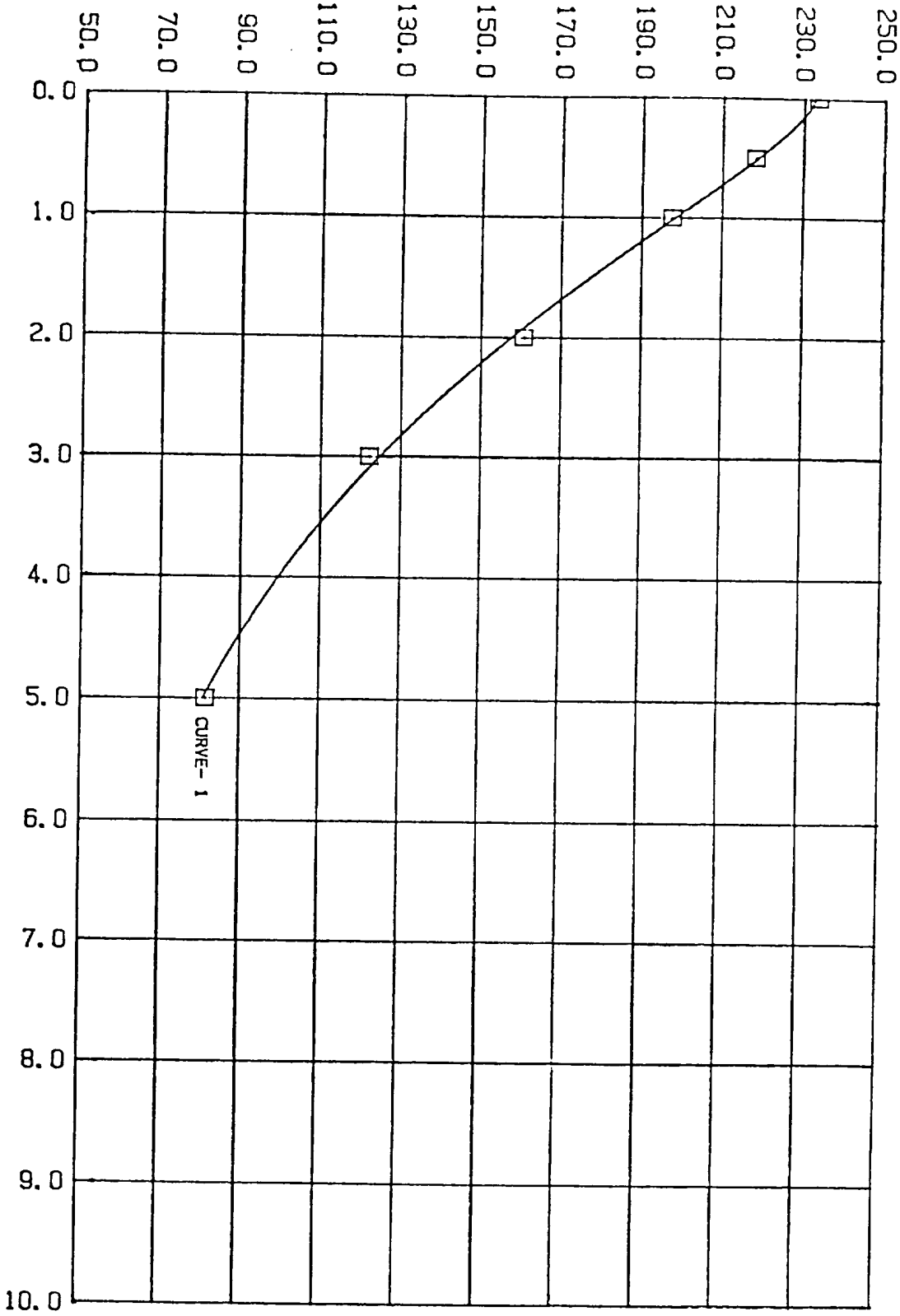
(2) nämnda digoxindissocierande medel har valts bland gruppen som består av linolensyra, arakidonsyra och linolsyra; och

(3) lösningen med identifikationsreagens är ett fluorescein-digoxinkonjugat.

Kuvio 1

EP

84106



NG/ML

MÄÄRITYS: DIGOKSIININ KALIBROINTI

Päivämäärä: 03/20/85