

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 158534 B

(21) Patentansøgning nr.: 4886/82

(51) Int.Cl.⁵

G 01 N 33/78

(22) Indleveringsdag: 03 nov 1982

G 01 N 33/53

(41) Alm. tilgængelig: 05 maj 1983

(44) Fremlagt: 28 maj 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 04 nov 1981 US 318027 03 sep 1982 US 414934

(71) Ansøger: *MILES Inc.; 1127 Myrtle Street; Elkhart; Indiana 46514, US

(72) Opfinder: David C. *Atkinson; US, Robert J. *Carrico; US, David L. *Morris; US

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) **Homogen kompetitiv bindings-immunoanalysemetode til bestemmelse af en iodothyronin i en prøve af uekstraheret serum eller plasma med et TBP-blokerende middel samt reagensmiddel til anvendelse ved metoden**

(56) Fremdragne publikationer

EP off. g. skrift nr. 51213

GB pat. nr. 1308327

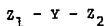
US pat. nr. 3911096, 4046870

Andre publikationer. Clinica Chimica Acta bind 112 (1981)
side 77-83

(57) Sammendrag:

4886-82

Ved en immunoanalysemetode til bestemmelse af en iodothyronin i en biologisk væske under anvendelse af et blokerende middel for bindingen af iodothyroninen til thyroxin-bindende protein i den biologiske væske anvendes der som blokerende middel en forbindelse med formlen



hvor Y er O, NH, S, CH₂ eller C=O, og Z₁ og Z₂ betyder phenyl-grupper, af hvilke mindst én er substitueret med én eller flere substituenten udvalgt fra gruppen bestående af halogen, alkyl og alkoxy, idet Z₂ er substitueret med en substituent indeholdende en carboxyl- eller sulfonsyregruppe.

Et reagensmiddel til bestemmelse af en iodothyronin i en blodprøve indeholdende et blokerende middel som ovenfor defineret.

Et testsæt til homogen kompetitiv bindings-immunoanalysebestemmelse af en iodothyronin i en prøve af serum eller plasma

omfatter et antistof til iodothyroninen, et mærket iodothyronin-konjugat, der har en detekterbar egenskab, som ændres ved binding med antistoffet, samt et blokerende middel som ovenfor defineret.

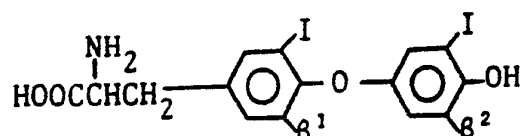
Et testmateriale til homogen immunoanalysebestemmelse af en iodothyronin i en blodprøve omfatter et reagensmiddel som ovenfor defineret og en fast bærer inkorporeret dermed.

DK 158534 B

Den foreliggende opfindelse angår en homogen kompetitiv bindings-immunoanalysemetode til bestemmelse af en iodothyronin i en prøve af u ekstraheret serum eller plasma, ved hvilken der dannes en reaktionsblanding ved kombination af prøven med reagenser indeholdende et antistof for iodothyroninen, et mærket iodothyronin-konjugat og et TBP (thyroxin-bindende protein)-blokerende middel, og ved hvilken et spektrofotometrisk respons, fortrinsvis en fluorescens-emission eller en absorbansændring forårsaget af en analysereaktion, frembringes i reaktionsblandingen ved en bølglængde større end 300 nm, der er relateret til koncentrationen af iodothyroninen i prøven.

Opfindelsen angår også et reagensmiddel til anvendelse ved den omhandlede bestemmelse samt anvendelsen af bestemte TBP-blokerende midler ved analysemetoden.

Iodothyroninerne har den almene formel:



i hvilken β^1 og β^2 hver for sig betyder hydrogen eller iod. De vigtigste iodothyroniner af klinisk interesse er 3,5,3',-5'-tetraiodothyronin (thyroxin eller T-4), hvor både β^1 og β^2 er iod, 3,5,3'-triiodothyronin (T-3 eller blot "triiodothyronin"), hvor β^1 er iod, og β^2 er hydrogen, 3,3',5'-triiodothyronin ("omvendt" T-3), hvor β^1 er hydrogen, og β^2 er iod, samt 3,3'-diiodothyronin, hvor β^1 og β^2 begge er hydrogen. Den kvantitative bestemmelse af koncentrationen af de forskellige iodothyroniner, især hormonerne T-4 og T-3, i blod er af væsentlig betydning ved diagnosen af thyroide lidelser.

I blodet er næsten alle de cirkulerende iodothyroniner kompleksbundet med forskellige bærerproteiner, der omfatter albumin, thyroxin-bindende præalbumin og thyroxin-bindende globulin (TBG), og sådanne bærerproteiner betegnes her gene-

risk som thyroxin-bindende protein (TBP). Til måling af koncentrationen af den totale mængde af et iodothyronin i en blodprøve, f.eks. serum eller plasma, skal de TBP-bundne former være dissocieret i en analytisk signifikant grad, og
5 den resulterende totale frie iodothyronin bestemmes. Dissociationen af iodothyroniner fra TBP, især TBG, blev oprindeligt udført ved en ekstraktionsproces, jfr. US-patentskrift nr. 3.414.383. Ved den i øjeblikket tilgængelige teknik kan iodothyroniner bestemmes ved immunoanalyse i u ekstraherede
10 prøver ved anvendelse af forbindelser, der empirisk har vist sig at blokere og bevirke dissociation af TBP-bindingen. Ved gangse kompetitive bindings-iodothyronin-immunoanalyser kombineres en forsøgsprøve med reagenser, der omfatter et antistof til den iodothyronin, der skal bestemmes, en mærket
15 form, f.eks. radioaktivt mærket, af sådan iodothyronin samt ét eller flere THP-blokerende midler. Iodothyroninen i prøven kompleksbundet til TBP dissocieres derfra og konkurrerer med mærket iodothyronin om binding til antistoffet. Den mængde af mærket iodothyronin, der bliver antistof-bundet, sammen-
20 lignet med den mængde, der forbliver ubundet til antistof, afhænger af den totale koncentration af iodothyroninen i prøven og kan måles på en række forskellige måder, afhængigt af den bestemte immunoanalyseteknik, som anvendes.

Forskellige forbindelser er blevet fundet at være
25 nyttige TBP-blokerende midler, herunder tetrachlorthyronin (Mitsuma et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 33, 365 (1971)), diphenylhydantoin (Lieblich og Utiger, J. Clin. Invest., 50, 60a (1971)), salicylat (Larsen, Metab., 20, 976 (1971)) og de forskellige materialer, der er beskrevet
30 af Holander (US patentskrift nr. 3.928.553) og Chopra (US patentskrift nr. 3.911.096), især 8-anilino-1-naphthalensulfonsyre (ANS). Strukturerne for og de generelle egenskaber af de kendte TBP-blokerende midler varierer over et yderst bredt område. De egenskaber, der er kritiske med hensyn til
35 operabiliteten som et TBP-blokerende middel ved immunoanalyser, dvs. evnen til i tilstrækkelig grad at bevirke dis-

sociation af iodthyroniner fra TBP ved koncentrationsniveauer, der er utilstrækkelige til at forårsage signifikant inhibering af antistof-bindingsreaktionen, betragtes generelt som uforudsigelige på basis af rent strukturelle sammenligninger, omend nogle teorier vedrørende TBG-blokering er blevet fremsat (Brown og Metheany, J. Pharm. Sci., 63, 1214 (1974)).

Fenclofenac (2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenyleddikesyre) er en diphenylether, der har antirheumatisk aktivitet, og som er blevet rapporteret at interferere med thyroidfunktionstests (Lancet, 1, 267 (Feb. 2, 1980), Lancet 1, 432 (Feb. 23, 1980), Lancet, 1, 487 (Mar. 1, 1980), Capper et al., Clin. Chim. Acta, 112, 77 (1981) og Kurtz et al., Clin. Endocrinol., 15, 117 (1981)). Efterfølgende forskere har rejst spørgsmålet om, hvorvidt fenclofenac ville være egnet som et TBG-blokerende middel ved thyroidfunktion-radioimmunoanalyser (Ratcliffe et al., Clin. Endocrinol., 13, 569 (1980)). Capper et al., jfr. ovenfor, har også studeret virkningen af diclofenac (2-(2,6-dichlorphenylamino)-phenyleddikesyre).

I EP offentliggørelsesskrift nr. 51.213 er der beskrevet et testmateriale til udførelse af homogene immunoanalyser. Materialet omfatter en bærermatrix, hvor der er inkorporeret antistof og mærket konjugat, hvilket udgør et homogent immunoanalysesystem. Der kan udføres iodthyronin-immunoanalyser med et sådant materiale, men da der ikke benyttes noget TBP-blokerende middel, kan de fordelagtige resultater, der opnås ifølge den foreliggende opfindelse, og som fremgår nærmere af det følgende, ikke opnås med det kendte testmateriale.

I GB patentskrift nr. 1.308.327 er fremstillingen af bl.a. fenclofenac og beslægtede derivater samt disses anvendelse som lægemidler beskrevet.

I US patentskrift nr. 3.911.096 beskrives anvendelsen af en række forskellige forbindelser som TBP-blokerende midler ved immunoanalyser til måling af mængden af iodothyroniner i blodprøver, jfr. den allerede ovenfor givne omtale

af bl.a. dette patentskrift; ifølge patentskriftet anvendes der ikke noget mærket iodothyronin-konjugat.

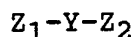
I US patentskrift nr. 4.406.870 beskrives udførelsen af en immunobestemmelse af iodothyroniner, ved hvilken én
5 måling udføres på en prøve, hvortil der er sat et TBP-blokerende middel, og en anden måling udføres på en prøve uden tilsat blokerende middel.

I Clin. Chim. Acta, 112, 77-83 (1981) (Capper et al.), jfr. ovenfor, er det angivet, at fenclofenac og beslægtede
10 forbindelser inhiberer bindingen af thyroxin til serumproteiner.

Det har nu ifølge opfindelsen vist sig, at visse phenyleddikesyrer og dermed beslægtede forbindelser og salte deraf er særligt fordelagtige TBP-blokerende midler til an-
15 vendelse ved iodothyronin-immunoanalyser af den allerede angivne art.

Bindings-immunoanalysemetoden ifølge opfindelsen er således ejendommelig ved, at der som det TBP-blokerende middel anvendes en forbindelse med den almene formel

20



i hvilken Y betyder O, NH, S, CH₂ eller C=O, og Z₁ og Z₂ betyder phenylgrupper, af hvilke mindst én er substitueret med én eller flere substituenten udvalgt blandt halogen, lavere alkyl og lavere alkoxy, idet Z₂ er substitueret med
25 en carboxyalkyl eller en sulfoalkylgruppe, eller et salt deraf.

Blokeringsmiddelforbindelsen indføres i immunoanalyse-reaktionsblandingen ved en koncentration, der er tilstrækkelig til frigivelse og blokering af bindingen af en analytisk signifikant procentdel af TBP-kompleksbundet iodothyronin, fortrinsvis mere end 50% og sædvanligvis mere end 70%, men utilstrækkelig til at interferere signifikant med bindingen af antistof med iodothyronin. Skønt de nøjagtige koncentrationer af blokeringsmidlet, der ønskes til en bestemt iodothyronin-immunoanalyse, vil variere alt efter den
35 iodothyronin, der bestemmes, og den anvendte immunoanalyse-

teknik, samt efter andre faktorer, anvendes forbindelsen normalt i koncentrationer i reaktionsblandingen på mellem ca. 0,1 millimolær (mM) og ca. 5 mM, især når den involverede iodothyronin er thyroxin. Blokeringsmidlerne, der anvendes
5 ifølge opfindelsen, sættes til analysereaktionsblandingen i form af syren eller en analytisk acceptabel saltform deraf, f.eks. natrium-, kalium-, lithium- eller ammoniumsalte.

Visse uventede egenskaber ved de her omhandlede blokeringsmidler, især fenclofenac, bevirker, at disse forbindelser er særlig fordelagtige til anvendelse som TBP-blokerende midler ved homogene kompetitive bindingsimmunoanalyser, hvor et spektrofotometrisk respons, f.eks. en fluorescensemission eller lysabsorption, frembringes i analysereaktionsblandingen ved en bølgelængde større end ca. 300 nanometer
15 (nm) og sædvanligvis mindre end 700 nm, hvilket respons er en funktion af koncentrationen af iodothyroninen i forsøgsprøven. De omhandlede blokeringsmidler har vist sig at have praktisk taget ingen absorption ved bølgelængder større end 300 nm. Når således det spektrofotometriske respons er en
20 fluorescensemission eller initieres, omend ikke endeligt udtrykkes, som en fluorescensemission, iagttages der ingen undertrykkelse af en sådan emission, når der anvendes de omhandlede forbindelser som det TBP-blokerende middel, medens der ved anvendelse af midler ifølge den kendte teknik, især
25 ANS, kan forekomme signifikant undertrykkelse, der resulterer i uønskelige eller uacceptable analyseresultatkarakteristika, f.eks. nedsat sensitivitet, reproducerbarhed og/eller nøjagtighed.

Ydermere vil specielt fenclofenac ikke udvise nogen
30 væsentlig inhiberende virkning på den katalytiske aktivitet af mange enzymer ved koncentrationer, i hvilke forbindelsen er et effektivt TBP-blokerende middel. Forbindelsen er således yderligere fordelagtig som et TBP-blokerende middel ved homogene kompetitive bindingsimmunoanalyser, hvor den
35 anvendte mærkning er en deltager i en enzymatisk reaktion, f.eks. et enzymsubstrat, en enzyminhibitor, en prosthetisk

gruppe af et enzym, et coenzym eller et enzym i sig selv, eller et fragment deraf. Til den kendte teknik hørende TBP-blokerende midler, især ANS, kan bevirke signifikant inhibering af enzymreaktioner, hvilket igen resulterer i for-

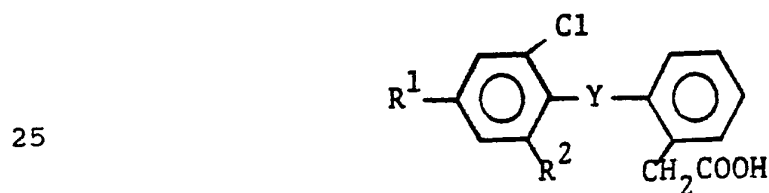
5 mindsket analyseeffektivitet.

De her omhandlede phenyleddikesyrer og dermed beslægtede forbindelser og salte deraf finder således en ny anvendelse som TBP-blokerende midler ved homogene kompetitive bindingsimmunoanalyser i almindelighed, og forbindelserne er

10 særligt fordelagtige, når de anvendes ved spektrofotometriske homogene immunoanalyser, især de, i tilfælde af fenclofenac, hvor den anvendte mærkning er en deltager i en enzym-katalyseret reaktion. Med den foreliggende opfindelse tilvejebringes der også reagensmidler til udøvelse af de omhandlede, nye

15 immunoanalyser, især i form af testsæt, således som disse almindeligt anvendes i kliniske laboratorier. Det her omhandlede reagensmiddel er af den i krav 7's indledning angivne art, og det er ejendommeligt ved det, der er angivet i dette kravs kendetegnende del.

20 Som TBP-blokerende middel anvendes der ifølge opfindelsen fortrinsvis en forbindelse med formlen



i hvilken Y er O eller NH, og én af substituenterne R¹ og R² er chlor, og den anden er hydrogen, eller et salt deraf, idet

30 disse forbindelser har vist sig at have uventet fordelagtige egenskaber som TBP-blokerende midler. Fenclofenac (Y = O og R¹ = Cl) har vist sig at være særlig fordelagtig i denne sammenhæng ved homogene iodothyronin-immunoanalyser. En anden forbindelse af interesse er diclofenac (Y = NH og R² = Cl).

35 Det vil imidlertid være åbenbart for enhver med almindeligt kendskab til den teknik, der her er tale om, at der kan fore-

tages forskellige modifikationer ved den grundlæggende diphenyl-struktur i den angivne formel, uden at der derved går uden for opfindelsens rammer. Analoge, der besidder de her omhandlede fordelagtige TBP-blokeringsmiddel-egenskaber, skal betragtes som ækvivalenter med hensyn til nærværende opfindelses beskyttelsesområde. Som et ikke-begrænsende eksempel kan det nævnes, at oxygen- eller iminoforbindelses-funktionen kan erstattes med et egnet analogt led, herunder sådanne forbindelsesled som f.eks. thio, metylen og keto.

10 Endvidere kan dichlor-substituenterne erstattes med enkelte eller multiple substituenters på hver af phenylringene, idet sådanne substituenters f.eks. kan udvælges blandt halogen, især chlor, brom og iod, alkyl, sædvanligvis lavere alkyl (C_{1-4}), f.eks. methyl og ethyl, og alkoxy, sædvanligvis lavere alkoxy, f.eks. methoxy og ethoxy. Acetat-substituenten

15 kan også være repræsentativ for en række syregrupper, f.eks. carboxylsyrer og sulfonsyrer og deres alkylhomologe, især de lavere alkansyre-homologe, og sådanne grupper kan være bundet til en phenylring i enten meta- eller para-stilling udover ortho-stillingen i den viste formel, se også US patentskrift nr. 3.766.263.

Den foreliggende opfindelse kan anvendes i forbindelse med homogene kompetitive iodothyronin-immunoanalyser i almindelighed. En immunoanalyse skal i den givne sammenhæng betyde

25 enhver analyse baseret på antigen-antistof-interaktioner, og antistof skal forstås som helt, konventionelt antistof eller monoklont antistof, f.eks. af typerne IgG, IgM eller IgA, eller et effektivt fragment deraf, f.eks. Fab, F(ab') etc. fragmenter af IgG. Den type immunoanalyse, ved hvilken opfindelsen anvendes, er som nævnt den kompetitive bindings-immunoanalyse. Ved en sådan immunoanalyse til bestemmelse af en iodothyronin kombineres en forsøgsprøve af u ekstraheret serum eller plasma med et antistof til den iodothyronin, der bestemmes, en mærket form af iodothyronin samt et blokerings-

30 middel for TBP-binding. Den andel af mærket iodothyronin, der bliver bundet til antistoffet i konkurrence med ethvert

iodothyronin i prøven, sammenlignet med den andel, der forbliver ubundet, står i relation til koncentrationen af iodothyroninen i prøven.

Ved homogene immunoanalyser ifølge den foreliggende opfindelse udtrykker den antistof-bundne form af den mærkede iodothyronin en egenskab, der er forskellig fra den ubundne form, og det adskillelsestrin, der kræves ved heterogene analyser, kan således undgås. Der kendes i teknikken et bredt udvalg af homogene immunoanalyse-metoder. Især foretrækkes de metoder, hvor den mærkning, der konjugeres kemisk med iodothyroninen, er et enzym eller et enzymfragment, f.eks. en prosthetisk gruppe, eller er en deltager i en enzym-katalyseret reaktion, f.eks. et substrat, et coenzym, en inhibitor eller en aktivator.

Den foreliggende opfindelse er især anvendelig i forbindelse med homogene kompetitive bindings-immunoanalyser, hvor et spektrofotometrisk respons frembringes i analysereaktionsblandingen ved en bølgelængde større end ca. 300 nm og sædvanligvis mindre end 700 nm, hvilket respons er indikativt for iodothyronin-koncentrationen i forsøgsprøven. De omhandlede blokerende midler har vist sig at have praktisk taget ingen absorption ved sådanne bølgelængder. Ved spektrofotometrisk respons menes der et optisk detekterbart signal, der almindeligvis måles ved en udvalgt bølgelængde eller -længder. Eksempler på sådanne signaler er lysemissioner, f.eks. kemoluminiscens, herunder bioluminiscens, og fluorescens, samt lysabsorptioner eller -reflektioner, f.eks. farveændringer eller -dannelser, og målelige absorbans- eller reflektansændringer i det synlige spektrum. I det følgende angives der eksempler på sådanne analysetyper:

1. Fluorescens-undertrykkelse eller -forøgelse

Det mærkede konjugat i dette system er i dets mærkningsdel sammensat af et fluorescerende stof, hvis fluorescens undertrykkes eller forøges i nogen målelig grad, når det mærkede iodothyronin-konjugat bindes af antistof. Den

fluorescerende mærkning måles almindeligvis direkte, idet dens fluorescens er det detekterbare signalt. Analysesystemer af denne type er beskrevet i US patentskrifterne nr. 4.160.016 og nr. 3.940.475, i GB patentskrift nr. 1.583.869 og i J. Clin. Path, 30, 526 (1973).

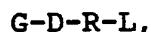
2. Fluorescens-polarisation

Mærkningen i dette system er også et fluorescerende stof, men det påvirkede karakteristikum er imidlertid polarisation af fluorescens på grund af binding af det mærkede konjugat med antistof. Analysesystemer af denne type er beskrevet i J. Exp. Med., 122, 1029 (1975).

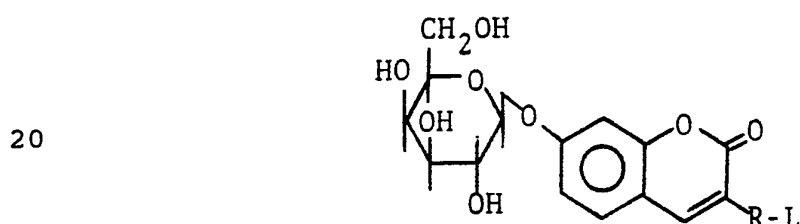
3. Enzymsubstrat-mærkningsteknik

I dette system er mærkningen valgt således, at det mærkede konjugat er et substrat for et enzym, og at enzymets evne til at virke på det substrat-mærkede konjugat påvirkes, enten i en positiv eller negativ forstand, ved binding af det mærkede konjugat med antistof. Indvirkning af enzymet på det substrat-mærkede konjugat frembringer et produkt, der kan skelnes ved hjælp af et eller andet træk, sædvanligvis en kemisk eller fysisk egenskab, f.eks. kemisk reaktivitet ved en indikatorreaktion eller f.eks. en fotometrisk egenskab såsom fluorescens eller lysabsorption (farve). Analysesystemer af denne type er beskrevet på almen måde i GB patentskrift nr. 1.552.607, samt i Anal. Chem., 48, 1933 (1976), Anal. Biochem., 77, 55 (1977) og i Clin. Chem., 23, 1402 (1977). Ved sådanne metoder under anvendelse af enzym-substrat-mærkninger vil det mærkede konjugat, f.eks. et substrat-analyt-konjugat, have den egenskab, at der kan indvirkes på det med et enzym ved spaltning eller modifikation til dannelsen af et produkt, der har en detekterbar egenskab, som bevirker, at det kan skelnes fra konjugatet. Eksempelvis kan konjugatet være ikke-fluorescerende under analysebetingelser, men der kan dannes et fluorescerende produkt ved reaktion med enzym.

Forskellige fluorogene substrat-mærkede konjugater ligger lige for til anvendelse ved sådanne metoder. Eksempelvis kan det mærkede konjugat have formlen

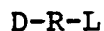


- 5 hvor G er en spaltelig gruppe såsom phosphat, carboxylat eller glycon, D er en fluorogen farvestofdel, der efter fjernelse af G giver et fluorescerende produkt, og D kan f.eks. være umbelliferon, fluorescein, rhodamin eller derivater deraf, R er en forbindende gruppe, og L er bindingskomponenten, sædvanligvis analytten, f.eks. en iodothyronin, eller et derivat deraf. Enzymatisk spaltning, f.eks. med phosphatase, carboxylase eller glycosidase, af det mærkede konjugat påvirkes ved binding, f.eks. med antistof, til L-
- 10 delen af konjugatet, jfr. US patentskrift nr. 4.279.992.
- 15 Ved en særlig foretrukken substrat-mærknings-analysemetode anvendes der et mærket konjugat af typen:



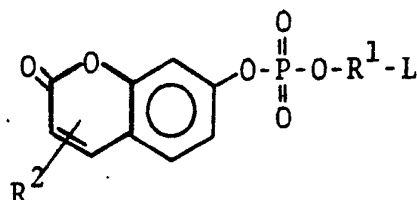
- i hvilken R er en forbindende gruppe, og L er bindingskomponenten, f.eks. analytten eller en dermed analog, hvorved
- 25 enzymet β -galactosidase's evne til at spalte konjugatet til dannelse af et produkt, der er skelneligt ved dets fluorescens, inhiberes ved binding af konjugatet med antistof.

- Andre nyttige substrat-mærkede konjugater er konjugaterne med formlen
- 30



- hvor R er en enzym-spaltelig forbindende gruppe, f.eks. phosphat, carboxylat eller lignende, L er bindingskomponenten som ovenfor, og D er en fluorogen farvestofdel som ovenfor,
- 35 der ved spaltning af R frigør en fluorescerende indikator.

Ved en særlig foretrukken teknik anvendes der et mærket konjugat af typen:



hvor R^1 er en binding eller kæde, der forbinder den mærkede
 10 komponent L til den spaltelige phosphatgruppe, og R^2 er
 hydrogen eller en substituentgruppe såsom lavere alkyl,
 f.eks. methyl eller ethyl, N-alkylamido eller N-(hydroxy-
 -substitueret lavere alkyl)-amido, f.eks. $-\text{CONH}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$,
 hvor $n = 2-6$, jfr. US patentskrift nr. 4.273.715. Umbel-
 15 liferon-resten kan bære andre eller yderligere substituer,
 se Anal. Chem., 40, 803 (1968). Spaltning med phosphodiester-
 rase påvirkes ved binding af antistof til L-delen af kon-
 jugatet.

20 4. Energioverførsel

I dette system er mærkningen den ene del af et ener-
 giooverførings-donor-acceptor-par, og antistoffet konjugeres
 med den anden del af dette par. Når det mærkede konjugat
 således bindes med antistof, ændres energiudtrykket for
 25 donorkomponenten i parret ved overføring til acceptorkom-
 ponenten. Sædvanligvis er donoren et fluorescerende stof,
 og acceptoren er et undertrykkende middel derfor, hvilket
 middel samtidig eventuelt også kan være et fluorescerende
 stof. I en sådan udførelsesform er det detekterbare signal
 30 fluorescens, men andre detekteringssystemer er også mulige.
 Sådanne analysesystemer er beskrevet i US patentskrifterne
 nr. 3.996.345, nr. 4.174.384 og nr. 4.199.559 samt i GB
 patentskrift nr. 2.018.424.

5. Kemisk exciteret fluorescens

I dette system er mærkningen atter et fluorescerende stof, men evnen for den fluorescerende mærkning til at blive kemisk exciteret til en energitilstand, ved hvilken den fluorescerer, påvirkes ved binding af det mærkede konjugat med antistof. Kemisk excitation af mærkningen opnås almindeligvis ved udsættelse af den fluorescerende mærkning for en in situ dannet forbindelse med høj energi. Analysesystemer af denne type er beskrevet i US patentskrift nr. 4.238.195.

6. Sterisk hindring med dobbelt antistof

Et andet analysesystem er det dobbelt antistof-immunoanalysesystem, der er beskrevet i US patentskrifterne nr. 3.935.074 og nr. 3.998.943. Det mærkede konjugat omfatter to epitoper, af hvilke den ene deltager i den immunologiske reaktion med liganden og anti-ligand antistof, og af hvilke den anden kan bindes med et andet antistof, men med den restriktion, at de to antistoffer er hindrede i samtidig binding til det mærkede konjugat. Den anden epitop kan være et fluorescerende stof, hvis fluorescens undertrykkes af den anden antistof-binding, eller den kan deltage i en støttende kompetitiv bindingsreaktion med en mærket form af den anden epitop til binding til det andet antistof. Forskellige detekteringssystemer er mulige i et sådant system som beskrevet i de ovennævnte patentskrifter. Beslægtede analysesystemer er beskrevet i US patentskrifterne nr. 4.130.462 og nr. 4.161.515 samt i GB patentskrift nr. 1.560.852.

7. Anvendelse af mærkning med prosthetisk gruppe

I dette system er mærkningen en prosthetisk gruppe af et enzym, og evnen for et katalytisk inaktivt apoenzym til kombination med den prosthetiske gruppe-mærkning til dannelselse af et aktivt enzym (holoenzym) påvirkes ved binding af det mærkede konjugat med antistof. Resulterende holoenzymaktivitet kan måles med konventionelle detekteringssystemer til opnåelse af et endeligt detekterbart signal.

Analysesystemer af denne type er beskrevet i US patentskrift nr. 4.238.565. Ved en særlig foretrukken prosthetisk gruppe-mærknings-analysemetode anvendes der flavin-adenin-dinucleotid (FAD) som mærkning og apoglucoseoxidase som apoenzymet. Resulterende glucoseoxidase-aktivitet kan måles ved hjælp af et kolorimetrisk detekteringssystem indeholdende glucose, peroxidase og et indikatorsystem, der frembringer en farveændring som respons på hydrogenperoxid. Fluorometrisk detektering af hydrogenperoxid er også mulig under anvendelse af et egnet fluorogent substrat.

8. Anvendelse af coenzym-mærkning

Det mærkede konjugat i dette system er i dets mærkningsdel sammensat af en coenzym-aktiv funktionalitet, og evnen for en sådan coenzym-mærkning til at deltage i en enzymatisk reaktion påvirkes ved binding af det mærkede konjugat med antistof. Hastigheden af den resulterende enzymatiske reaktion kan måles med konventionelle detekterings-systemer til opnåelse af et endeligt detekterbart signal. Analysesystemer af denne type er beskrevet i GB patentskrift nr. 1.552.607, og i Anal. Biochem., 72, 271 (1976), i Anal. Biochem., 72, 283 (1976) og i Anal. Biochem., 76, 95 (1976).

9. Anvendelse af enzym-modulator-mærkning

Det mærkede konjugat i dette system er i dets mærkningsdel sammensat af en enzym-modulerende funktionalitet såsom en enzyminhibitor eller -stimulator, og evnen for en sådan modulator-mærkning til modulering af aktiviteten af et enzym påvirkes af bindingen af det mærkede konjugat med antistof. Hastigheden for den resulterende enzymatiske reaktion kan måles med konventionelle detekteringssystemer til opnåelse af et endeligt detekterbart signal. Analysesystemer af denne type er beskrevet i US patentskrifterne nr. 4.134.792 og nr. 4.273.866. Særlig foretrukken er anvendelsen af methotrexat som mærkning med dihydrofolat-reduktase som det modulerede enzym.

10. Anvendelse af enzym-mærkning

I dette system er mærkningen et enzym, og aktiviteten af enzym-mærkningen påvirkes ved binding af det mærkede konjugat med antistof. Resulterende enzymaktivitet kan måles med konventionelle detekteringssystemer til opnåelse af et endeligt detekterbart signal, f.eks. absorption eller fluorescens. Analysesystemer af denne type er beskrevet i US patentskrifterne nr. 3.817.837 og nr. 4.043.872.

Andre homogene kompetitive bindings-immunoanalysemetoder kan anvendes, uden at der derved går uden for nærværende opfindelses rammer.

Eftersom især fenclofenac også vil have en uvæsentlig inhiberende virkning på den katalytiske aktivitet af mange enzymer ved koncentrationer, i hvilke forbindelsen er effektiv som et TBP-blokerende middel, er den foreliggende opfindelse yderligere fordelagtig ved homogene immunoanalyser involverende enzymatiske reaktioner. Sådanne analyser omfatter de ovenfor beskrevne anvendelser af enzymsubstrat-mærkning, prosthetisk gruppe-mærkning, coenzym-mærkning, enzym-modulator-mærkning og enzym-mærkning. Med uvæsentlig inhiberende virkning på enzymatisk aktivitet menes der, at hastigheden for katalyse ikke nedsættes mere end ca. 70%, sædvanligvis mindre end 50% og fortrinsvis mindre end 30%.

Den biologiske væske, der skal testes, kan være en vilkårlig væske, i hvilken den eller de iodothyroniner, der er af interesse, uønsket kan associeres med bindingsproteiner. Ifølge opfindelsen er den biologiske væske uekstraheret serum eller plasma.

Reagensmidlerne ifølge den foreliggende opfindelse omfatter alle de essentielle kemiske bestanddele, der kræves til udførelse af en ønsket iodothyronin-immunoanalysemetode som omfattet af opfindelsen. Reagensmidlerne er til stede i en kommercielt pakket form som en komposition eller en blanding, såfremt reagensernes kompatibilitet tillader det, i en testmaterialekonfiguration eller i form af et testsæt,

dvs. en pakket kombination af én eller flere beholdere, der indeholder de fornødne reagenser. Inkluderet i reagensmidlerne er de reagenser, der er egnede til det ønskede bindingsreaktionssystem, og som omfatter en af de her omhandlede forbindelser, f.eks. fenclofenac, som et TBP-blokerende middel. Sådanne bindingsreaktions-reagenser omfatter almindeligvis ud over det blokerende middel et mærket iodothyronin-konjugat, antistof til den iodothyronin, der skal bestemmes, og eventuelt andre TBP-blokerende midler, såfremt dette ønskes. Reagensmidlerne kan naturligvis omfatte andre materialer, der er kendte i teknikken, og som kan være ønskelige set fra et kommercielt eller fra et anvendelsesmæssigt synspunkt, f.eks. puffere, fortyndingsmidler eller standarder. Især foretrækkes et testsæt til den homogene kompetitive bindings-immunoanalyse ifølge opfindelsen indeholdende (a) et antistof til den iodothyronin, der skal bestemmes, (b) et mærket iodothyronin-konjugat, der har en detekterbar egenskab, som ændres ved binding med antistoffet, og (c) en forbindelse ifølge opfindelsen som et TBP-blokerende middel. Den specifikke mærkning, der anvendes, vil afhænge af den teknik, der benyttes, jfr. ovenfor. Der foretrækkes også et testmateriale indeholdende en reagenskomposition indeholdende et iodothyronin-antistof, et mærket iodothyronin-konjugat, der har en detekterbar egenskab, som ændres ved binding med antistoffet, og en forbindelse ifølge opfindelsen som et TBP-blokerende middel, samt et fast bæremateriale, der er inkorporeret i reagenskompositionen. De forskellige former for et sådant testmateriale er beskrevet i den europæiske patentansøgning, der er publiceret under nr. 51213, hvortil der henvises.

Opfindelsen skal illustreres nærmere i de følgende eksempler, der ikke skal opfattes som begrænsende.

EksemplerEksempel 1Dissociation af thyroxin fra humant serum med fenclofenac og diclofenac

5 En mængde på oa. 3 ml humant serum får lov at ækvilibrere med radioaktivt mærket thyroxin (^{125}I -thyroxin fra Amersham-Searle, Arlington Heights, Illinois, USA) i ca. 8 timer.

Derpå kombineres 100 microliter (μl) aliquoter af
 10 dette serum med 300 μl aliquoter af 0,1 M natriumphosphatpuffer, pH = 6,5, indeholdende forskellige koncentrationer af fenclofenac (GB patentskrift nr. 1.308.327, eksempel 6). Derefter sættes 180 μl aliquoter af hver af disse blandinger til 2 ml kolonner af Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, New Jersey, USA) ækvilibreret med 0,1 M
 15 natriumphosphatpuffer med pH = 6,5. Radioaktiviteten på kolonnerne måles, og kolonnerne vaskes med 5 ml af pufferen. Radioaktiviteten af hver kolonne måles igen, og resultaterne, der er vist i tabel I, anvendes som mål for thyroxin, der er
 20 dissocieret fra serumproteiner.

Tabel I

25	Fenclofenac (mM)	Procent thyroxin dissocieret
	0	19
	0,25	50
	0,50	72
30	1,0	79
	2,0	98
	5,0	100

Der udføres et andet forsøg til sammenligning af dissociationsegenskaberne for fenclofenac og diclofenac. Med radioaktivt iod mærket thyroxin (^{125}I -thyroxin fra Amersham-Searle, Arlington Heights, Il, USA) ækvilibreres med 5 ml normalt humant serum i 48 timer ved 4°C . Aliquoter af dette serum sættes til 300 μl af 0,1 M natriumphosphat, pH = 7,0, indeholdende forskellige koncentrationer af fenclofenac eller diclofenac (se eksempel 11) til opnåelse af de slutkoncentrationer, der er angivet i tabel IA. Efter 5 minutters inkubation ved stuetemperatur sættes en 165 μl aliquot til en Sephadex[®]-kolonne fra et Seralute[®]-thyroxin-analyse-sæt (Miles Laboratories, Inc., Ames Division, Elkhart, IN, USA), der er blevet ækvilibreret med 0,1 M natriumphosphat, pH = 7,0. Den totale radioaktivitet, der tilføres kolonnerne, måles, og det udissocierede materiale vaskes gennem kolonnen med 3 ml puffer. Der foretages tællinger i kolonnerne til bestemmelse af den procentdel af thyroxin, der er dissocieret fra serumproteinerne.

20

Tabel IA

	Koncentration af dissocierings- middel (mM)	Procent dissocieret (Fenclofenac)	Procent dissocieret (Diclofenac)
25	0	9	9
	0,25	40	48
	0,50	61	61
	1,00	71	73
	2,00	75	77
30	4,00	79	80
	8,00	81	82

0,25 mM fenclofenac i en iodothyronin-immunoanalyse-aktionsblanding kan således forventes at frigøre og blokere bindingen af ca. 40-50% af den protein-bundne iodothyronin, og 0,50 mM kan forventes at blokere ca. 60-70%. Det andet

35

forsøg viser, at begge dissocieringsmidler er lige effektive til dissociering af iodothyronin fra serumproteiner ved en immunoanalysereaktion.

5

Eksempel 2

Virkning af fenclofenac på bindingen af thyroxin med antistof

En række antistof-bindingsreaktioner bringes til udførelse i 0,1 M natriumphosphatpuffer, pH = 6,5, til opnåelse af slutrumfang på 0,6 ml indeholdende forskellige koncentrationer af fenclofenac. Hver reaktionsblanding indeholder ^{125}I -thyroxin, 20 μl normalt kanin-immunoglobulin og 2 μl antistof til thyroxin. Blandingerne inkuberes ved stuetemperatur i ca. 3 timer, hvorpå der tilsættes 400 μl 50%'s (vægt/rumfang) polyethylenglycol. De fældede proteiner opsamles ved centrifugering, og radioaktiviteten i hver fældning måles. Resultaterne fremgår af tabel II som procent af radioaktiviteten i fældningen uden fenclofenac.

20

Tabel II

	Fenclofenac (mM)	Procent ^{125}I -thvroxin i fældning
	0	100
25	0,2	97
	0,5	80
	1,0	69
	2,5	61
	5,0	43

30

De angivne data viser, at koncentrationer af fenclofenac under ca. 5 mM inhiberer antistof-bindingsreaktionen kun ca. 50%, og at koncentrationer under ca. 2,5 mM kun inhiberer ca. 60%. På basis af disse data og de i eksempel 1 angivne data vil foretrukne fenclofenac-koncentrationer i en thyroxin-immunoanalyse-reaktionsblanding ligge i området fra 0,25 til 1,0 mM.

35

Eksempel 3Radioimmunoanalyse for thyroxin

En radioimmunoanalyse for thyroxin i serum udføres under anvendelse af fenclofenac som det TBP-blokerende middel. Serum-standarder i 100 μ l aliquoter indeholdende kendte koncentrationer af thyroxin kombineres med 290 μ l 0,1 M natriumphosphatpuffer, pH = 6,5, en mængde fenclofenac, der giver en koncentration på 0,67 mM i den endelige analyseblanding, 2 μ l kanin-antistof til thyroxin og en fikseret mængde ^{125}I -thyroxin (ca. 34.000 tællinger pr. minut pr. 100 μ l i det endelige rumfang). Efter inkubering ved stuetemperatur i 2 timer tilsættes der 400 μ l 50%'s (vægt/rumfang) polyethylenglycol, og de fremkomne fældninger opsamles ved centrifugering. Derefter måles radioaktiviteten af hver fældning. Resultaterne er vist i tabel III (μ g/dl betegner mikrogram pr. deciliter).

Tabel III

	Thyroxin (μ g/dl)	Tællinger pr. minut i fældning
	0	23.700
	1,0	21.800
25	2,5	17.300
	5,0	14.400
	10,0	10.000
	20,0	7.500

Disse data viser, at når thyroxin-niveauet i serumprøven forøges, formindskes mængden af mærket thyroxin bundet til antistof. Det er således påvist, at fenclofenac kan anvendes effektivt ved kompetitive bindings-immunoanalyser for iodothyroninen thyroxin i serum.

Eksempel 4Optiske absorptionsspektre for fenclofenac og diclofenac

Der fremstilles en 50 mM opløsning af fenclofenac i
5 fortyndet natriumhydroxidopløsning, og denne iagttages ikke
at have nogen synlig farve. Det optiske absorptionsspektrum
for en 0,5 mM opløsning i 0,1 M natriumphosphatpuffer, pH =
6,5, undersøges og udviser ingen signifikant absorption over
300 nanometer (nm). Fenclofenac kan således ikke have nogen
10 signifikant virkning på spektrofotometriske signaler fremkommet over denne bølgelængde.

I modsætning hertil har det konventionelt anvendte
blokerende middel ANS en signifikant absorption over 300
nm. En 50 μ M opløsning af ANS i 0,1 M phosphatpuffer, pH =
15 7,0, viser et bredt absorptionsbånd fra 300 til 400 nm med
en top på 0,5 ved ca. 350 nm. ANS giver således signifikant
absorption ved meget lave koncentrationer, nemlig koncentrationer,
der ligger langt under de, ved hvilke ANS normalt
anvendes som et blokerende middel (omkring 1 mM).

20 Ved et andet forsøg fremstilles der opløsninger af
fenclofenac og diclofenac ved opløsning af disse i 0,1 M
natriumhydroxidopløsning, og spektrene optages under anvendelse
af et Bausch & Lomb Spectronic 2000 dobbeltstråle-scannings-spektrofotometer.

Tabel IIIA

	<u>Fenclofenac *</u>	<u>Diclofenac *</u>
$\lambda_{\max}$	275	275
5	269	
NaOH		
	$2,06 \times 10^3$	$11,8 \times 10^3$
$\epsilon_{\max}$	$2,05 \times 10^3$	
$\lambda_{\min}$	257	248
10 NaOH	$1,52 \times 10^3$	$6,4 \times 10^3$
$\epsilon_{\min}$		
* Bølgelængde i nanometer (nm) og extinktionskoefficient i $M^{-1} \times cm^{-1}$.		

15 Omend begge forbindelser har et absorptionsspektrum nær ved UV-området, har ingen af dem en absorptions over 320 nm. Ingen af forbindelserne vil bidrage med nogen interferens med spektrofotometrisk frembragte signaler over denne bølgelængde.

20

Eksempel 5Virkning af fenclofenac på aktiveringen af apoglucoseoxidase med FAD-mærkede konjugater

Der udføres en række apoenzym-reaktiveringsmålinger

25 under anvendelse af forskellige koncentrationer af fenclofenac. Analyserne udføres ved 37°C, og de endelige reagenskoncentrationer i 0,1 M fosfatpuffer med pH = 7,0 er 1,0 nanomolær (nM) FAD-mærket konjugat (et FAD-theophyllin-konjugat som beskrevet i US patentskrift nr. 4.238.565), 50

30 nM apoglucoseoxidase (US patentskrift nr. 4.268.631), 2,5 μ l/ml anti(glucoseoxidase)-antiserum, 2 mM natriumdichlorhydroxybenzensulfonat (DHSA), 0,2 mM 4-amino-antipyrin, 0,1 M glucose, 20 μ g/ml peroxidase og 0,1% (vægt/rumfang) okserumalbumin. Apoenzymet og anti(glucoseoxidase) for-inkuberes, hvorpå reaktionen påbegyndes ved indblanding af de

35 øvrige reagenser. Reaktionsblandingen inkuberes i 5 minutter, hvopå absorbansen ved 520 nm aflæses. Resultaterne i tabel

IV relaterer fenclofenac-koncentration til dannelse af aktiv glucoseoxidase.

Tabel IV

5	Fenclofenac (mM)	Procent apoglucose- -oxidase-aktivitet
	0	100
	0,5	81
10	1,0	66
	1,5	61
	2,0	54
	2,5	47

- 15 Disse data viser, at fenclofenac-koncentrationer under 2,5 mM tillader rekombinationen af apoglucoseoxidase og FAD-mærkede konjugater at foregå med en hastighed, der er tilstrækkelig til anvendelse af en immunoanalyse med en prosthetisk gruppe-mærkning (US patentskrift nr. 4.238.565).
- 20 Til sammenligning udføres der en række apoenzym-reaktiveringsemålinger med forskellige koncentrationer af det konventionelt anvendte blokeringsmiddel ANS. Der fremstilles følgende reagenser:

- 25 Reagens A 0,105 M kaliumphosphatpuffer, pH = 7,0
 0,105 M glucose
 2,2 mM DHSA
 21 µg/ml peroxidase
 1,1% (w/v) okseserumalbumin
- 30 5,26 nM FAD-mærket konjugat, jfr. ovenfor.
- Reagens B 4 µM apoglucoseoxidase, jfr. ovenfor
 30% (w/v) glycerol
 50 mM phosphatpuffer, pH = 7,0
- 35 8 mM 4-aminoantipyrin.

ANS opløses direkte i særskilte aliquoter af reagens A i de i tabel V angivne koncentrationer. Apoenzym-aktivitet bestemmes ved anbringelse af 50 μ l af reagens B i en kuvette og påbegyndelse af reaktionen ved tilsætning af 1,90 ml af reagens A. Analysereaktionsblandingerne inkuberes i 10 minutter ved stuetemperatur, og absorbanserne ved 520 nm aflæses. Resultaterne fremgår af tabel V.

Tabel V

	ANS (mM)	Procent apoglucose- -oxidase-aktivitet
10	0	100
	0,1	64
15	0,2	46
	0,5	13
	1,0	0

Disse data viser, at ANS-koncentrationer over ca. 1,0 mM totalt inhiberer rekombinationsreaktionen. Eftersom ANS-koncentrationer omkring denne koncentration kræves til blokeringsmiddelformål, kan ANS ikke anvendes ved immunoanalysen.

Ved et andet forsøg undersøges virkningen af fenclofenac på aktiveringen af apoglucoseoxidase med et FAD-iodothyronin (T-4)-konjugat. Aktiveringen af apoglucoseoxidase udføres med forskellige koncentrationer af fenclofenac og gennemføres ved 37°C. Til to sæt analyser indeholdende 96 mM natriumphosphat, pH = 7,0, 95 mM glucose, 1,0 mM natriumdichlorhydroxybenzensulfonat (DHSA), 19 μ g/ml peroxidase og forskellige koncentrationer af natrium-fenclofenac sættes der apoglucoseoxidase, 4-amino-antipyrin og anti(glucoseoxidase) i slutkoncentrationer på henholdsvis 100 nM, 100 μ M og 5 μ l/ml, eller 2,1 nM slutkoncentration af et FAD-thyroxin-konjugat. Efter for-inkubering af analysemedierne i 5 minutter ved 37°C sættes FAD-thyroxin-konjugatet eller apoglucoseoxidase-reagenset til det ønskede analysesæt. Absor-

bansen ved 520 nm aflæses efter en inkubering på 330 sekunder. De fremkomne data angives som en procent af den absorbans, der aflæses, når der ingen fenclofenac er til stede.

5		<u>Tabel IVA</u>	
	Fenclofenac (mM)	Begyndt med apoenzym-tilsætning	Begyndt med konjugat-tilsætning
	0	100	100
10	0,16	100	97
	0,31	98	92
	0,63	97	94
	1,25	93	95
	2,5	90	85
15	5,0	78	74
	10,0	53	54

Det kolorimetriske respons formindskes med kun 8-10% ved ca. 2 mM fenclofenac, når der anvendes et FAD-thyroxin-
 20 -konjugat til at aktivere apoglucoseoxidasen under de betingelser, der anvendes til en virkelig iodothyronin-immunoanalyse.

Eksempel 6

25 Undersøgelse af fluorescens-undertrykkelse med fenclofenac

Der udføres fluorescensmålinger i 50 mM bicipuffer (N,N-bis-(2-hydroxyethyl)-glycin, Calbiochem-Behring, La Jolla, California, USA), pH = 8,3, under anvendelse af et
 30 Aminco Bowman fluorometer (American Instruments, Silver Springs, Maryland, USA), idet excitation fastlægges ved 400 nm og emission ved 450 nm, hvilket er fluorescensbetingelserne for den β -galactosyl-umbelliferon-enzymsubstratmærkede fluorescens-immunoanalyse (SLFIA), der er beskrevet i US patentskrift nr. 4.279.992. Under disse betingelser
 35 udviser 10 mM fenclofenac ikke nogen fluorescens.

Der udføres undertrykkelses-undersøgelser ved måling af fluorescensen af en 1,3 μ M opløsning af 2-(7-hydroxy-3-carboxamidocoumarin)-ethanol (US patentskrift nr. 4.273.715) i nærværelse af forskellige niveauer af fenclofenac. Forholdene mellem iagttaget fluorescens (F) og fluorescens i fraværelse af fenclofenac (Fo) versus fenclofenac-koncentration beregnes og fremgår af tabel VI.

Tabel VI

10	Fenclofenac (mM)	F/Fo
	0	1,00
	0,2	1,00
15	1,0	1,01
	2,0	1,00
	5,0	1,00
	10,0	1,02

Disse data viser, at fenclofenac praktisk taget ikke udviser nogen undertrykkelse af det umbelliferon-fluorescerende middel, der anvendes ved SLFIA-teknikken, og derfor er velegnet til anvendelse som et TBP-blokerende middel ved en sådan homogen immunoanalyse-teknik (US patentskrift nr. 4.279.992).

Eksempel 7Virkning af fenclofenac på aktiviteten af enzymet dihydrofolat-reduktase

Der fremstilles analyseblandinger, der skal indeholde forskellige koncentrationer af fenclofenac, samt, i et 1 ml slutrumfang ved 37°C, 0,3 mM thiazoylblåt, 0,115 M dihydrofolat, 0,5 mM NADPH og 0,012 enheder pr. ml af dihydrofolat-reduktase. Absorbansen for hver reaktionsblanding aflæses ved 560 nm over en 10 minutters inkubationsperiode ved 37°C. Resultaterne er angivet i tabel VII.

Tabel VII

	Fenclofenac (mM)	Absorbansændring, i løbet af 10 minutter
5	0	0,360
	0,1	0,359
	0,2	0,365
	0,5	0,355
	1,0	0,332
10	2,5	0,273
	5,0	0,118

Disse data viser, at fenclofenac ikke bevirker væsentlig inhibering af enzymaktivitet ved koncentrationer under 1,0 mM, der er effektive til dissociering af thyroxin fra serumproteiner og således er velegnet til anvendelse som et TBP-blokerende middel ved enzymmodulator-mærket homogen immunoanalyse (US patentskrift nr. 4.134.792).

20

Eksempel 8Enzyminhibitor-mærket immunoanalyse for thyroxin

En enzyminhibitor-mærket immunoanalyse (US patentskrift nr. 4.134.792) for thyroxin i serum udføres under anvendelse af fenclofenac som det TBP-blokerende middel.

Serum-standarder i 40 μ l aliquoter indeholdende kendte koncentrationer af thyroxin kombineres med 0,2 ml af et antistof-reagens hestående af 21 μ l kanin-antiserum til thyroxin i 1 ml 0,1 M natriumphosphatpuffer, pH = 6,5, indeholdende 0,3 M kaliumchlorid, 0,05% natriumazid og 0,5 mM fenclofenac.

Efter en inkubation på 30 sekunder sættes der til hver blanding 0,2 ml af et konjugat-reagens bestående af 0,63 mg/ml NADPH (0,65 mM), 0,0175 μ M af et methotrexat-thyroxin-konjugat (fremstillet som beskrevet i en samtidig hermed indleveret US patentansøgning med benævnelsen "Methotrexate-Labeled Iodothyronine Conjugates" (Docket No. MS-1210)) i 10 mM natriumcarbonatpuffer, pH = 9,5. Efter yderligere 30 sekunders inkubation sættes der til hver blanding 0,2 ml

af et enzymreagens bestående af dihydrofolat-reduktase ved en koncentration på 27,5 nM methotrexat-bindingssteder i 0,1 M tris-HCl-puffer (tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochloridsalt, Calbiochem-Behring, La Jolla, California, USA), pH = 8,5, indeholdende 0,5% (vægt/rumfang) gelatine og 0,005% (vægt/rumfang) chlorhexidin (Sigma Chemical, St. Louis, Missouri, USA). Efter yderligere 5 minutters inkubation sættes der til hver blanding 50 μ l af 2,5 mM dihydrofolat i 0,1 M tris-HCl, pH = 8,5. 45 sekunder senere aflæses absorbanse for hver opløsning ved 340 nm over et tidsrum på 1 minut. Resultaterne fremgår af tabel VIII.

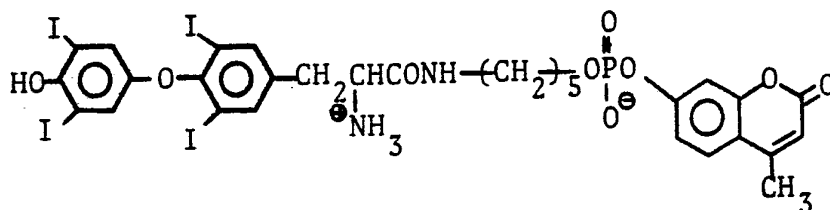
Tabel VIII

	Thyroxin (μ g/dl)	Absorbanæændring pr. minut
15	0	0,1682
	1,0	0,1659
	2,5	0,1648
20	10,0	0,1571
	20,0	0,1498

Det ses således, at når thyroxin-niveauet i serumprøven forøges, forøges omfanget af enåyminhivering med inhibitor-thyroxin-konjugatet. Fenclofenac interfererer ikke væsentligt med hverken det spektrofotometriske respons ved 340 nm eller med den enzymatiske reaktion.

Eksempel 9Enzymsubstrat-mærket immunoanalyse for thyroxin

A. Syntese af mærket konjugat - 5-(thyroxinamido)-pentyl, 4-methyl-umbelliferon, hydrogenphosphat.



En opløsning af 8,73 g (10 mmol) N-trifluoracetyl-L-thyroxin, 1,133 g (11 mol) 5-amino-1-pentanol og 2,7 g (20 mmol) 1-hydroxybenzotriazol i 125 ml tørt dimethylformamid (DMF) afkøles til -5°C under omrøring under argon. Hertil sættes der 2,28 g (11 mmol) dicyclohexylcarbodiimid. Kølebadet fjernes, og reaktionsblandingen får lov at komme op på stuetemperatur, og den omrøres i 3 timer. Opløsningsmidlet fjernes i vakuum. Remanensen optages i 250 ml ethylacetat, filtreres og vaskes med 150 ml mættet vandig natriumbicarbonatopløsning og 5% vandig citronsyreopløsning. Denne remanens renses ved præparativ væskechromatografi i en silicagelkolonne ved eluering med methylenchlorid og acetone i rumfangsforholdet 5:1. Herved fås der 6,5 g (67% udbytte) af N-(5-hydroxypentyl)-amidet af N-trifluoracetylthyroxin i form af et hvidt, fast stof med smp. $202-203^{\circ}\text{C}$.

Analyse, beregnet for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{I}_4\text{N}_2\text{O}_5$:

C = 27,58%, H = 2,21%, N = 2,92%

fundet: C = 27,89%, H = 2,18%, N = 3,36%.

N-(5-hydroxypentyl)-amidet (5,75 g eller 6 mmol) og 2,01 g (6 mmol) af pyridinsaltet af 4-methyl-umbelliferon-monophosphat suspenderes i 75 ml tørt DMF. Blandingen koncentrerer til ca. 25 ml's rumfang på en rotationsfordamper tilsluttet en vakuumpumpe. Yderligere 20 ml tørt DMF tilsættes, efterfulgt af 30 ml tør pyridin. Der tilsættes derpå 2,48 g (12 mmol) fast dicyclohexylcarbodiimid, og reaktions-

blandingen omrøres under argon ved stuetemperatur i 24 timer. Opløsningsmiddel fjernes under vakuum, og remanensen omrøres med 300 ml 0,1 M vandig triethylammoniumbicarbonatopløsning i 1 time. Den hvide fældning skilles fra ved filtrering, og
5 den omrøres derpå i 30 minutter i 300 ml ether og filtreres. Herved efterlades der 8 g af det ønskede produkt forurenet med dicyclohexylurinstof. Denne remanens (1,6 g) optages i methanol (noget uopløseligt materiale fjernes ved filtrering) og chromatograferes på Sephadex LH-20 (60 cm x 5 cm), idet
10 der elueres med methanol. Strømningshastigheden er 0,5 ml pr. minut, og der opsamles fraktioner på 10 ml.

Fraktionerne nr. 69-76 slås sammen og inddampes, hvorved der i form af et hvidt, glasagtigt fast stof fås 390 mg 5-(N-(trifluoracetamido)-thyroxinamido)-pentyl, 4-
15 -methyl-hydrogenphosphat, triethylammoniumsalt.

Analyse, beregnet for $C_{38}H_{43}F_3I_4PN_3O_{10}$:

C = 35,18%, H = 3,34%, N = 3,24%

fundet: C = 37,01%, H = 3,63%, N = 3,36%.

En portion på 200 mg af den N-trifluoracetamido-beskyttede phosphodiester opløses i 50% vandig methanol, pH =
20 12, i 3 timer. Reaktionen undertrykkes med 0,5 ml eddikesyre, og der koncentreres derpå til tørhed under vakuum. Remanensen optages i methanol indeholdende en lille mængde ammoniumhydroxid, der tilsættes 2,5 g silicagel, og opløsningsmidlet
25 fjernes. Den imprægnerede adsorbent anbringes på toppen af en kolonne af 25 g silicagel i en blanding af chloroform, methanol og koncentreret ammoniumhydroxidopløsning i rumfangsforholdet 10:5:1. Kolonnen elueres med dette opløsningsmiddel, og der opsamles fraktioner på 9 ml.

30 Fraktionerne nr. 10-21 slås sammen og inddampes, hvorved der fås 100 mg 5-(thyroxinamid)-pentyl, 4-methyl-umbelliferon, hydrogenphosphat, i form af et hvidt, mikrokrySTALLINSK fast stof med smp. 191-192°C (bliver mørkere fra 188°C).

Analyse, beregnet for $C_{30}H_{29}I_4PH_2O_9 \cdot H_2O$:

C = 32,22%, H = 2,79%, N = 2,50%

fundet: C = 32,37%, H = 2,71%, N = 2,46%.

5 B. Analysemetode.

Der tilvejebringes de følgende reagenser:

- Reagens A 50 mM bicinpuffer med 0,1% natriumaaid, pH = 8,5.
- Reagens B 60 mM fenclofenac i 0,5 N natriumhydroxid.
- 10 Reagens C Thyroxin-standarder med koncentrationer på 0,2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 og 20 $\mu\text{g/dl}$, fremstillet ved at sætte thyroxin (Sigma) til thyroxin-frit serum.
- Reagens D Antistof/enzym-reagens indeholdende 50 μl antiserum pr. ml og 0,12 enheder pr. ml af phosphodiesterase (Sigma, Type VII) i bicin-puffer.
- 15 Reagens E 1,24 μM af det mærkede konjugat (afsnit A ovenfor) i 5 mM formiat, 0,1% natriumazidpuffer, pH = 3,5.
- 20

Analyseforskriften involverer tilsætning af 75 μl af reagens B og 0,5 ml af reagens A til en kuvette, efterfulgt af 75 μl af et egnet reagens C og yderligere 0,5 ml af reagens A, samt til slut 75 μl af reagens D og en tredje portion

25 på 0,5 ml af reagens A. Efter 1 times inkubation ved stuetemperatur påbegyndes analysereaktionen ved tilsætning af 75 μl af reagens E og 0,5 ml af reagens A til kuvetten. Fluorescensen (excitation = 360 nm, emission = 450 nm) måles 20 minutter efter tilsætning af reagens E.

30

C. Resultater.

Analysen gennemføres for hvert reagens C, og der opnås de i tabel IX viste resultater.

Tabel IX

	Thyroxin ($\mu\text{g/dl}$)	Fluorescens- enheder
5	0	24,9
	2	25,5
	4	26,4
	6	27,2
	8	26,7
10	10	27,1
	12	30,0
	16	30,1
	20	30,8

- 15 Når thyroxin-koncentrationen forøges, forøges også fluorescens-emissionen, og der tilvejebringes således en analysemetode for thyroxin.

Eksempel 10

- 20 Anvendelse af fenclofenac eller diclofenac i et apoenzymreaktiverings-immunoanalyzesystem for serum-thyroxin

Standardkurver for serum-thyroxin frembringes under anvendelse af en halvautomatisk analyseforskrift i et Gilford Clinical Chemistry Analyzer System 203-S (Gilford Instrument Laboratories, Oberlin, OH, USA). Pufferen indeholdende 96 mM natriumphosphat, pH = 7,0, 2,1 mM dichlorhydroxybenzensulfonat (DHSA), 21 $\mu\text{g/ml}$ peroxidase, 105 mM glucose og 2 mM natrium-fenclofenac eller natrium-diclofenac forvarmes til 37°C, inden der sættes 0,8 ml til reaktionsbægeret sammen med 0,05 ml af 200 $\mu\text{l/ml}$ thyroxin-standarder i T4, T3-fri humant serum (AMF Biological and Diagnostic Products, Sequin, Tx, USA), 100 $\mu\text{l/ml}$ anti(glucoseoxidase)-antiserum, 15 $\mu\text{l/ml}$ anti(thyroxin)-antiserum og 0,03 M natriumphosphat, pH = 7,0. FAD-thyroxin-konjugatet (40 nM i 0,1 M natriumphosphat, pH = 7,0, 0,01% Triton X-100) som en 0,05 ml aliquot sættes til reaktionsbægeret og får lov at ækvilibrere

i 30 sekunder. Reaktionen initieres ved tilsætning af 0,10 ml 1,0 μ M apoglucoseoxidase, 2 mM 4-amino-antipyrin, 12% glycerol og 80 mM natriumphosphat, pH = 7,0. Absorbansen ved 520 nm måles efter en inkubationstid på 8 minutter.

5

Tabel X

	Thyroxin- standard (μ g/l)	Absorbans (med fenclofenac)	Absorbans (med diclofenac)
10	0	0,797	0,619
	25	0,823	0,620
	75	0,893	0,647
	125	0,965	0,678
15	200	1,078	0,719

Med fenclofenac eller diclofenac som det iodothyronin-dissocierende middel kan der iagttages en korrelation mellem ahsorbans-aflæsningen og koncentrationen af thyroxin i serum under anvendelse af et homogent apoenzym-reaktiverings-immunoanalyzesystem.

20

Eksempel 11Virkning af pH på dissociationen af iodothyronin fra serumproteiner

25

Under anvendelse af den kolonne-metode, der er beskrevet i forbindelse med den anden undersøgelse i eksempel 1, varieres pH-værdien af den 0,1 M natriumphosphat, og koncentrationen af dissociationsmidlet holdes konstant ved 2,0 mM. Kolonnerne ækvilibreres med puffer indeholdende det dissocierende middel ved den givne pH-værdi, og 165 μ l af det serum, der anvendes, fortyndet i puffer ved den givne pH-værdi (som beskrevet ovenfor) tilføres kolonnen. De totale tælleverdier måles, hvorpå kolonnerne vaskes med puffer ved den givne pH-værdi. De tælleverdier, der tilbagebliver på kolonnen, repræsenterer procentmængden af dissocieret iodothyronin.

30
35

Tabel XI

	pH	Procent dissocieret med fenclofenac	Procent dissocieret med diclofenac
5			
	6,0	84	86
	6,5	84	86
	7,0	86	86
	7,5	85	85
10	8,0	83	85

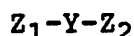
Dissociationen af iodothyronin fra serumproteiner med fenclofenac eller diclofenac er uafhængig af den pH-værdi (i området fra 6,0 til 8,0), ved hvilken inkuberingen af immunoanalysen udføres.

Eksempel 12Fremstilling af diclofenac

Under anvendelse af den metode, der er beskrevet i japansk patentpublikation nr. 80-79.352 (Chem. Abs., 94, 121132u), behandles 2-iodbenzoesyre med thionylchlorid og dimethylamin til dannelse af N,N-dimethyl-2-iodphenylacetamid. Ved omsætning efter opvarmning med 2,6-dichloranilin i nærværelse af kaliumcarbonat under anvendelse af den metode, der er beskrevet i japansk patentpublikation nr. 80-87.748 (Chem. Abs., 94, 30378q), fås der N,N-dimethyl-o-(2,6-dichlorphenylamino)-phenylacetamid. Ved hydrolyse med 15% kaliumhydroxid (britisk patentansøgning nr. 2.027.028) fås der diclofenac (o-(2,6-di-chlorphenylamino)-phenyldikesyre).

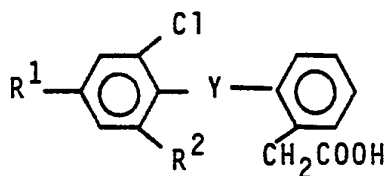
P a t e n t k r a v .

1. Homogen kompetitiv bindings-immunoanalysemetode til bestemmelse af en iodothyronin i en prøve af uekstraheret serum eller plasma, ved hvilken der dannes en reaktionsblanding ved kombination af prøven med reagenser indeholdende et antistof for iodothyroninen, et mærket iodothyronin-konjugat og et TBP-blokerende middel, og ved hvilken et spektrofotometrisk respons, fortrinsvis en fluorescenseemission eller en absorptionsændring forårsaget af en analysereaktion, frembringes i reaktionsblandingen ved en bølgelængde større end 300 nm, der er relateret til koncentrationen af iodothyroninen i prøven, k e n d e t e g n e t ved, at der som det TBP-blokerende middel anvendes en forbindelse med den almene formel



i hvilken Y betyder O, NH, S, CH₂ eller C=O, og Z₁ og Z₂ betyder phenylgrupper, af hvilke mindst én er substitueret med én eller flere substituenten udvalgt blandt halogen, lavere alkyl og lavere alkoxy, idet Z₂ er substitueret med en carboxyalkyl- eller en sulfoalkylgruppe, eller et salt deraf.

2. Immunoanalysemetode ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der som det blokerende middel anvendes en forbindelse med formlen



i hvilken Y er O eller NH, og én af substituenterne R¹ og R² er chlor, og den anden er hydrogen, eller et salt deraf.

3. Metode ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der som det blokerende middel anvendes 2-(2,4-dichlorphenoxy)-phenyleddikesyre eller et salt deraf.

5 4. Metode ifølge ethvert af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at det mærkede konjugat indeholder en deltager i en enzymatisk reaktion, der frembringer et detekterbart produkt, som tilvejebringer det spektrofotometriske respons.

10

5. Metode ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at det mærkede iodothyronin-konjugat indeholder et fluorogent enzymsubstrat, der frigører et fluorescerende produkt ved interaktion med et enzym, idet enzymets evne til at frigøre
15 det fluorescerende produkt ændres ved binding af antistoffet til det mærkede konjugat.

6. Metode ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at det mærkede iodothyronin-konjugat omfatter en enzym-prostethisk gruppe, der kombineres med et apoenzym til dannelse
20 af et aktivt enzym, hvis aktivitet måles ved dets evne til at katalysere en reaktion, der frembringer et produkt med en karakteristisk fluorescens eller absorbans ved den nævnte bølgelængde større end ca. 300 nm, idet det mærkede konjugat
25 fortrinsvis indeholder flavin-adenin-dinucleotid, som kombineres med apoglucoseoxidase til dannelse af aktiv glucoseoxidase, idet apoenzymets evne til kombination med den prosthetiske gruppe i det mærkede konjugat ændres ved binding af antistoffet til det mærkede konjugat.

30

7. Reagensmiddel til homogen immunoanalysebestemmelse af en iodothyronin i en prøve af u ekstraheret serum eller plasma, omfattende et antistof for iodothyroninen, et mærket iodothyronin-konjugat, der som en detekterbar egenskab har
35 evnen til at frembringe et spektrofotometrisk respons, fortrinsvis en fluorescensemission eller en absorbansændring

forårsaget af en enzymatisk reaktion, ved en bølgelængde større end ca. 300 nm, idet denne detekterbare egenskab ændres, når konjugatet bindes til antistoffet, samt et TBP-blokerende middel, k e n d e t e g n e t ved, at det TBP-
5 -blokerede middel er en forbindelse som defineret i ethvert af kravene 1-3.

8. Reagensmiddel ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t ved, at det mærkede iodothyronin-konjugat er som
10 defineret i ethvert af kravene 4-6.

9. Reagensmiddel ifølge krav 7 eller 8 i form af et testmateriale indeholdende reagenserne ifølge krav 7 eller 8 og en fast bærer, hvori reagenserne er inkorporeret, eller
15 i form af et testsæt.

10. Anvendelse af en forbindelse som defineret i ethvert af kravene 1-3 som et TBP-blokerende middel ved en homogen kompetitiv bindings-immunanalysemetode.