(19) DANMARK

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **164466 B**

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: **1718/86**

(51) Int.Cl.5 **G 01 N 33/94**

(22) Indleveringsdag: **15 apr 1986**

(41) Alm. tilgængelig: **23 okt 1986**

(44) Fremlagt: **29 jun 1992**

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: **22 apr 1985 US 726255**

(71) Ansøger: ***F. Hoffmann-La Roche AG; Grenzacherstrasse 124 - 184; 4002 Basel, CH**

(72) Opfinder: **Bruce C. *Farrenkopf; US, Richard A. *Kaufman; US**

(74) Fuldmægtig: **Plougmann & Vingtoft A/S**

(54) Fremgangsmåde og reagenssæt til bestemmelse af digoxinindhold i en biologisk prøve

(56) Fremdragne publikationer

---

(57) Sammendrag:

1718-86

Fremgangsmåde til bestemmelse af *totalt serumdigoxin* under anvendelse af en kombination af centrifugalultrafiltrering og dissocieringsmidler, der anvendes for at dissociere det til serumproteinerne bundne digoxin. En række forbindelser har vist sig at være virksomme enten alene eller i kombination til at dissociere proteinbundet digoxin fra serumproteinerne. Eksempler på sådanne effektive dissocieringsmidler omfatter quindin, Vitamin E (α-tocopherol), lavere alkanoler og C_{3-26}-fedtsyrer, især langkædede mættede og umættede fedtsyrer.

DK 164466 B

For at en analyse, hvor koncentrationen af analyten aflæses på en standardkurve, skal være præcis, må standarderne og patientprøverne opføre sig identisk under analysen. En af de mest kritiske faktorer mellem standarderne og patientprøverne er måske, at udvindingen af analyten fra standarderne må være identisk med udvindingen af analyten fra patientprøverne, idet der ellers vil fremkomme fejlagtige værdier. Dette er specielt relevant, hvis den totale mængde af analyt i patientprøven måles.

Ved fluorescenspolarisationsassays af analyter i serum er et af de uønskede kendetegn ved denne metode serummets høje fluorescensbaggrund. Dette bliver især besværligt, når der måles lave niveauer af analyter såsom digoxin. I dette tilfælde er analysen ikke gennemførlig under direkte anvendelse af serum direkte med en fluoresceinmærket digoxintracer eftersom serumbaggrundsfluorescensen langt overstiger det fluorescenssignal, der udsendes af den fluoresceinmærkede digoxintracer.

Med henblik på at overvinde den høje baggrundsfluorescens fra serummet er proteinfrie filtrater typisk blevet fremstillet under anvendelse af perchlorsyre eller trichloreddikesyre. Selv om metoderne er effektive til at fremstille et proteinfrit filtrat, der er relativt fri for baggrundsfluorescens, lider de af andre ulemper. I tilfældet digoxin fås der en relativt dårlig udvinding i supernatanten, og endvidere er udvindingen afhængig af prøvens proteinkoncentration. Jfr. fx Porter et al., *Clin. Chem. 30*, s. 1826-1829 (1984).

Anvendelse af ultrafiltrering til fremstilling af proteinfrie filtrater er også kendt inden for teknikken. I et sådant system bliver protein selektivt holdt tilbage i en fraktion af prøvevolumenet (retentatet), medens fri ligand i det væsentlige uhindret passerer gennem membranen sammen med solvent over i ultrafiltratet. Systemer til udførelse af sådan ultrafiltrering er kommercielt tilgængelige. Et sådant system er Centrifree™ mikrodelingssystemet, der forhandles af Amicon Corporation, Danvers, Massachusetts. Dette system er i grunden en selvstændig filterindretning med en filtermembran med en sådan porøsitet, at ca. 99,9% af proteinerne i serum forhindres i at passere gennem ved centrifugalfiltrering. Den med filtrene følgende

reklamelitteratur antyder, at de skal anvendes til at separere "frie" serumanalyter, især lægemidler, fra den proteinbundne fraktion. I fraværelse af et dissocieringsmiddel til at frigøre lægemiddel, der er bundet til protein, vil således kun det frie lægemiddel i serum tillades at passere gennem filteret og således måles ved en analyse.

Rapporter i litteraturen antyder, at ca. 20-30% digoxin i serum er bundet til serumproteiner. Jfr. Pribor et al., *Drug Monitoring and Pharmokinetic Data*, Pathotex Publishers, Park Forrest South, Ill., s. 57 (1980). Hvis ^{3}H-digoxin således blev sat til humant serum, ville ca. 70-80% af mærkningen kunne forventes at blive genvundet i filtratet. Ved anvendelse af 10 normale humane serumprøver, til hvilke der var sat ^{3}H-digoxin, efterfulgt af centrifugalfiltrering gennem ultrafiltrene, blev det fundet, at 15-25% af digoxinet i disse sera ikke kunne udvindes i filtratet og således formodentlig var proteinbundet.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til måling af *totalt serumdigoxin* under anvendelse af en kombination af centrifugalultrafiltrering og dissocieringsmidler, der anvendes til at dissociere det til serumproteinerne bundne digoxin. En række forbindelser har vist sig at være virksomme enten alene eller i kombination til at dissociere proteinbundet digoxin fra serumproteinerne. Eksemplerne på sådanne virksomme dissocieringsmidler omfatter quindin, Vitamin E (α-tocopherol), lavere alkanoler og C_{3-26}-fedtsyrer, især langkædede mættede og umættede fedtsyrer. Virksomme koncentrationsområder blev fundet at være ca. 2-50 mg pr. 500 μl serum for fedtsyrerne og α-tocopherol, 50-500 μg pr. 500 μl serum for quindin, og 3-100 mg for en lavere (mættet eller umættet) alkanol (C_{2-7}) såsom isopropylalkohol.

Resultater opnået ved eksperimenter omfattende tilsætning af ^{3}H-digoxin til normalt humant serum efterfulgt af tilsætning af et dossocieringsmiddel og centrifugalfiltrering er opsummeret nedenfor i tabel I.

Tabel I

	Dissocieringsmiddel	mg tilsat/500 µl serum	% ^{3}H-digoxin-udvinding i filtrater
1.	H_2O	10	81
2.	Arachidonsyre	10	104
3.	Linolensyre	10	96
4.	Vitamin E	20	91
5.	Quinidin	(200 µg)	87
6.	Linolensyre	10	103
7.	Oliesyre	10	91
8.	Isopropanol	25	93
9.	Linolensyre (16 mg) og Isopropanol (9 mg)	25	98

EKSEMPEL

Anvendelse af et dissocieringsmiddel og centrifugalultrafiltrering eksemplificeres under anvendelse af et fluorescenspolarisationsassay for digoxin på COBAS BIO.

Reagenser:

1) Antistofreagens - 0,2 mol tris(hydroxymethyl)aminomethan/l, pH 8,0, indeholdende kanin-antidigoxin-serum, 0,01% bovint gammaglobulin, 0,1% natriumazid og overfladeaktivt middel.

2) Tracerreagens - 0,05 mol tris(hydroxymethyl)aminomethan/l, pH 8,0, indeholdende 0,01% bovint gammaglobulin, 0,1% natriumazid og overfladeaktivt middel.

3) Digoxindissocieringsmiddel - 67% (volumen/volumen) linolensyre i isopropanol.

Disse reagenser kan tilvejebringes i form af et reagenssæt med en flaske af hver reagens, der giver tilstrækkelige reagensmængder til adskillige analyser. Sættet kan eventuelt indeholde ét eller flere mikrodelingsultrafiltre.

Analysen udføres på følgende måde:

a) 500 µl prøve (serum, plasma, spyt, urin) sættes til et Amicon Centrifree™ mikrodelingssystemfilter (en anisotropisk, hydrofil YMT-ultrafiltreringsmembran).

b) 25 µl af digoxindissocieringsmidlet sættes til, og indholdet af filteret hvirvelblandes eller mixes.

c) Efter anbringelse af en opsamlingskop i bunden af filteret anbringes delene fortrinsvis i en centrifuge med fastvinklet rotor (35°-45°) og centrifugeres ved 2000 x g i 20 minutter.

d) Efter centrifugering fjernes filteret og opsamlingskoppen fra centrifugen, og ultrafiltratet, der indeholder digoxinet, analyseres ved et fluorescenspolarisationsassay for at måle digoxinkoncentrationen.

Et eksempel på en typisk kalibreringskurve er vist i fig. 1.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af totale digoxinniveauer i en biologisk væskeprøve,
k e n d e t e g n e t ved, at digoxin-protein-complexet sprænges ved at behandle prøveopløsningen med en effektiv mængde af et dissocieringsmiddel valgt blandt ét eller flere medlemmer af klassen bestående af en C_{3-26}-mættet eller umættet fedtsyre, en C_{2-7}-lavere alkanol, quinidin og α-tocopherol for at frigøre det bundne digoxin fra serumprotein, den behandlede prøveopløsning passeres gennem et centrifugalultrafilter for selektivt at passere digoxinholdig prøveop-

løsning gennem filteret og tilbageholde serumproteinerne, og digoxinindholdet i prøveopløsningen bestemmes ved en fluorescenspolarisationsmetode.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at dissocieringsmidlet er linolensyre.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at dissocieringsmidlet er arachidonsyre.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at dissocieringsmidlet er linolsyre.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at dissocieringsmidlet er isopropylalkohol.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at dissocieringsmidlet er en blanding af isopropylalkohol og linolensyre.

7. Reagenssæt til bestemmelse af totale digoxinniveauer i en biologisk væskeprøve,
k e n d e t e g n e t ved, at det omfatter en flaske af hver af følgende reagenser i mængder, der er tilstrækkelige til at udføre flere analyser:

(1) anti-digoxin-antistofreagensopløsning;
(2) tracerreagensopløsning; og
(3) digoxindissocieringsmiddelopløsning.

8. Reagenssæt ifølge krav 6,
k e n d e t e g n e t ved, at anti-digoxin-antistoffet er kanin-anti-digoxinserum.

9. Reagenssæt ifølge krav 6,
k e n d e t e g n e t ved, at digoxindissocieringsmidlet er en blanding af linolensyre i isopropanol.

10. Reagenssæt ifølge krav 6,
k e n d e t e g n e t ved, at traceropløsningen er et fluorescein-digoxin-konjugat.

11. Reagenssæt ifølge krav 6,
k e n d e t e g n e t ved, at

(1) anti-digoxin-antistoffet er kanin-anti-digoxinserum;
(2) digoxindissocieringsmidlet er valgt fra klassen bestående af linolensyre, arachidonsyre og linolsyre; og
(3) digoxintracerreagensopløsningen er et fluoresceindigoxin-konjugat.

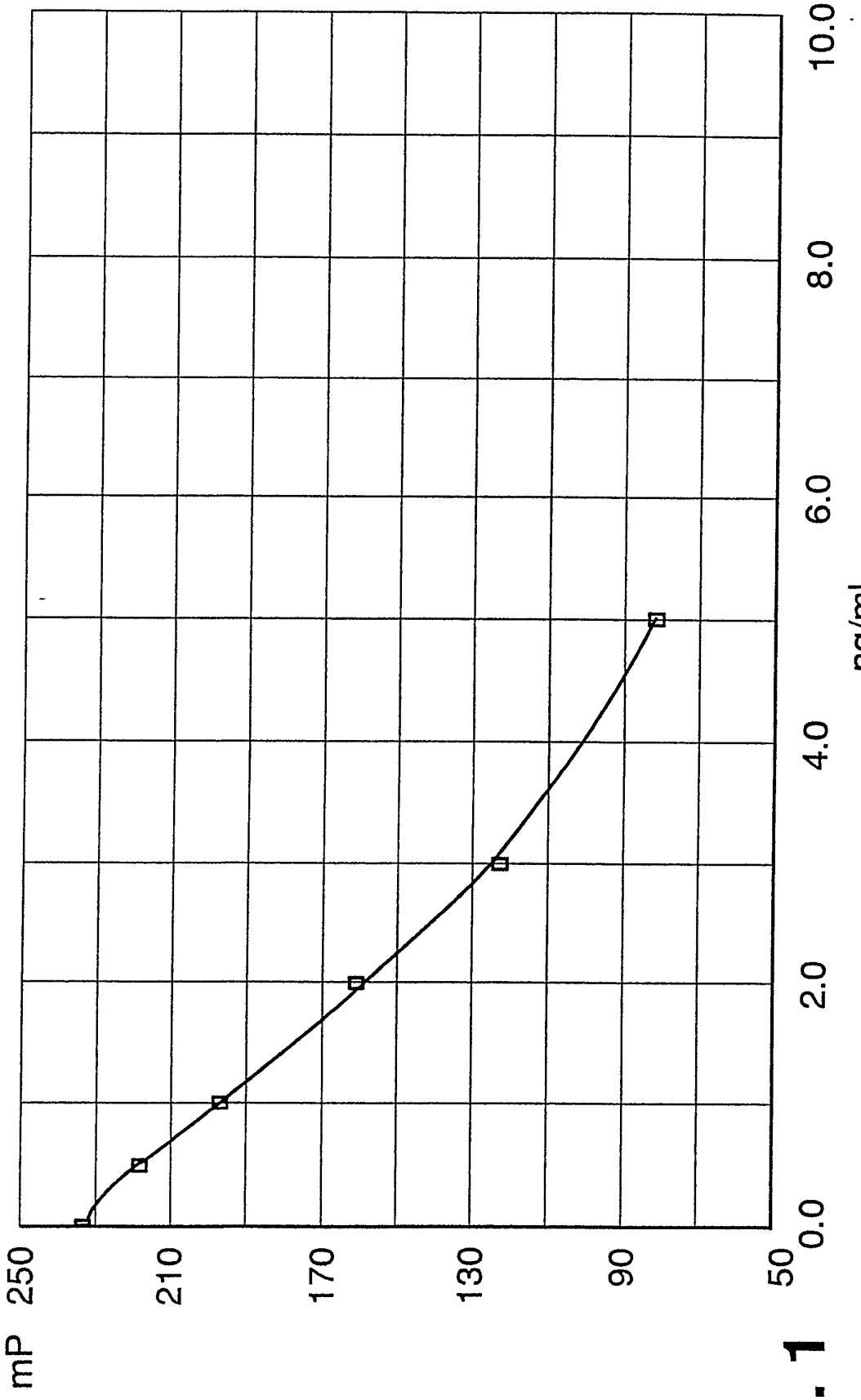


Fig. 1