

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 930975 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **930975**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
G01N 33/72

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **04.03.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **04.03.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **06.09.1993**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(32) (33) (31) Etuokeus - Prioritet - Priority

05.03.1992 DE 4206932

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Boehringer Mannheim GmbH, Sandhofer Strasse 112-132, 68305 Mannheim, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Karl, Johann, BRD, SAKSA, (DE)

2 •Kerscher, Lorenz, BRD, SAKSA, (DE)

3 •Schneider, Erich, BRD, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Immunologinen menetelmä hemoglobiinijohdannaisen määrittämiseen

Immunologiskt förfarande för bestämning av ett hemoglobinderivat

Immunologinen menetelmä hemoglobiini johdannaisen määrittämiseen - Immunologiskt förfarande för bestämning av ett hemoglobinderivat

5

Keksintö koskee menetelmää määrätyn hemoglobiini johdannaisen pitoisuuden määrittämiseen verinäytteessä. Erityisesti keksintö koskee menetelmää hemoglobiini johdannaisten, kuten glykosyloidun hemoglobiinin pitoisuuden määrittämiseen, jotka johdannaisten vaativat erillistä kokonaishemoglobiinipitoisuuden määrittämistä ja hemoglobiini johdannaisen määrittämistä veren derivatisoidun hemoglobiinin osuuden määrittämiseksi.

Verensokerin korkeudesta riippuen sitoutuu pieni osa punasolujen vastaanottamasta glukoosista ei-entsymaattisella reaktiolla globiinin β -ketjun N-terminaaliseen valiinitähtäseen. Reaktio stabiiliksi glykosyloiduksi hemoglobiini johdannaiseksi HbA_{1c} (ketoamiinimuoto) etenee kahdessa vaiheessa. Ensin glukoosi sitoutuu nopeassa reversiibelissä liittymisessä hemoglobiiniin, jolloin muodostuu labiili glykosyloitu hemoglobiini johdannainen (Schiffin emäs). Irreversiibelillä, hitaalla toisiintuminensreaktiolla (Amadoritoisiintuminen) muodostuu stabiili muoto. HbA_{1c} :n osuus kokonaishemoglobiinissa on aineenvaihdunnaltaan terveillä 3 - 6 %. Diabetespotilailla HbA_{1c} :n osuus voi verenglukoosikonsentraation korkeuteen verrannollisesti kuluneiden 4 - 12 viikon aikana arvoihin 12 %:iin asti, satunnaisesti jopa 20 %:iin. HbA_{1c} :n suhteellisen osuuden määrittäminen kokonaishemoglobiinipitoisuudesta on käytettävissä erityisesti integraalilaisena parametrina verensokerin säätämisen edistymisen kontrollina.

Glykosyloidun hemoglobiinin määrittämiseen on kuvattu erilaisia menetelmiä. Tavanomaiset menetelmät perustuvat tekniikoihin kuten elektroforeesi, isoelektrinen fokusointi ja kolorimetriset määrittäykset, samoin kuin ioninvaihto- ja affiniteettikromatografia. Sen jälkeen, kun oli kuvattu

spesifisten polyklonaalisten vasta-aineiden (US-patenttijulkaisu 4247533) ja monoklonaalisten vasta-aineiden (EP-patenttijulkaisut A0316306, A0201187) valmistus, kehitettiin joukko erilaisia immunologisia menetelmiä HbA_{1c}:n osoittamiseksi.

EP-patenttijulkaisussa A0185870 kuvataan immunologinen menetelmä proteiinien, mm. HbA_{1c}:n määrittämiseen. Hyödynnettiin monoklonaalisia vasta-aineita, jotka tunnistavat spesifisesti lineaarisia peptidiepitoppeja. Epitopin vapauttamiseen määrätään denaturointi, mm. kaotrooppisilla reagensseilla. Lämpötiloissa alle 37 °C tämä denaturointivaihe vaatii yhdestä useaan tuntiin, lämpötiloissa yli 50 °C yhden minuutin. Näytteen kokonaishemoglobiinipitoisuutta ei suoriteta samanaikaisesti.

EP-patenttijulkaisussa A0201187 kuvataan menetelmä HbA_{1c}:n määrittämiseksi, jossa menetelmässä käytetään HbA_{1c}:n vastaisia monoklonaalisia vasta-aineita, jotka saatiin immunisoimalla natiivilla humaan-HbA_{1c}:llä. Määrittäminen suoritetaan lämpötiloissa 4 - 37 °C, jolloin kukin inkubointivaihe voi kestää jopa 72 tuntia. Kokonaishemoglobiini- ja HbA_{1c}-pitoisuuden määrittäminen samassa näytteessä ei kuvata.

EP-patenttijulkaisussa A0315864 kuvataan menetelmä HbA_{1c}:n suhteellisen pitoisuuden määrittämiseen verinäytteessä. Hemoglobiini denaturoidaan tiosyanaatilla, ja muutetaan lisähapetusreagenssilla, edullisesti rauta(III)syanidilla methemoglobiiniksi. Näin käsitelystä verinäytteestä voidaan määrittää niin kokonaishemoglobiinipitoisuus kuin myös HbA_{1c}-pitoisuus.

Litiumsuolojen, edullisesti litiumtiosyanaatin käyttö punasolujen liuottamiseen ja hemoglobiinijohdannaisien denaturointiin kuvataan EP-A-patenttijulkaisussa 0407860. HbA_{1c}-pitoisuus voidaan määrittää immunologisesti. Kokonaishemoglobiinin määrittämiseksi on lisäksi käytettävä hapetus-

reagenssia, edullisesti rauta(III)syanidia, joka muuttaa hemoglobiinin methemoglobiiniksi.

Eräs molempien viimeksi mainittujen menetelmien haitta on,
 5 että muuttamisessa hemoglobiinista syaani-methemoglobiiniksi on käytettävä syanidia. Syanidin korvaaminen natriumlauryylisulfaatilla (SLS) kokonaishemoglobiinin määrittämisessä kuvataan julkaisussa Clin. Biochem. 15 (1982) 83-88. Tässä ei kuitenkaan mainita mitenkään, että SLS on erityisen sopi-
 10 va näytteen esikäsittelyyn hemoglobiinijohdannaisen, erityisesti HbA_{1c}:n immunologiseen määrittämiseen.

Myös EP-patenttijulkaisussa A0184787 kuvataan syaniditon reagenssi kokonaishemoglobiinin määrittämiseen verinäytteestä.
 15 Reagenssi on ionista pinta-aktiivista ainetta, jonka pH on vähintään 11,3, edullisesti yli 13,7. Hemoglobiinijohdannaisen immunologista määrittämistä ei mainita. Hyvin korkea pH-arvo olisi glykosyloidun hemoglobiinijohdannaisen immunologisessa määrittämisessä haitaksi, koska voimakkaasti alkalisessa voi tapahtua sokeriosan lohkeaminen hemoglobiinista.
 20 Käytetyn vasta-aineen entsyymikerkinän tapauksessa entsyymireaktio voisi estyä, koska useimmin hyödynnettyjen entsyymien pH-optimi on pH-arvossa 6 - 8. Korkea pH-arvo voi estää myös immunologisen reaktion.

25 Tämän vuoksi oli edelleen tarvetta immunologiseen määrittämenetelmään hemoglobiinijohdannaisen määrittämiseksi verestä, jolloin hemolyysi voidaan suorittaa alhaisissa lämpötiloissa - kuten esimerkiksi huoneenlämpötilassa, näytteen
 30 esikäsittely ei tarvitse pitkää inkubointiaikaa, ja vältetään ympäristölle haitallisten reagenssien, kuten syanidin käyttö. Lisäksi pitäisi olla mahdollista kokonaishemoglobiinin samanaikainen määrittäminen samasta hemolysaatista, jotta voitaisiin määrittää hemoglobiinijohdannaisen osuus veren
 35 kokonaishemoglobiinipitoisuudesta ilman muuta hemolyytilisäystä. Tämän keksinnön tehtävänä oli antaa käyttöön tällainen immunologinen määrittämenetelmä veren hemoglo-

biini johdannaisen määrittämiseen.

Tehtävä ratkaistaan patenttivaatimuksissa lähemmin luonnehditun keksinnön avulla. Oleellisesti tämä tehtävä ratkaistaan immunologisella määrittämenetelmällä verinäytteen hemoglobiini johdannaisen pitoisuuden määrittämiseen, jolle menetelmälle on tunnusomaista, että näyte käsitellään hemolyysireagenssilla, joka sisältää ionista detergenttiä pH-arvossa 5 - 9,5, ja hemoglobiini johdannainen määritetään immunologisesti hemolysoidusta verinäytteestä.

Keksinnön edelleen eräänä kohteena on menetelmä hemoglobiini johdannaisen ja kokonaishemoglobiinin pitoisuuden määrittämiseen verinäytteestä, joka menetelmä perustuu siihen, että verinäyte käsitellään hemolyysireagenssilla, joka sisältää ionista detergenttiä pH-arvossa 5,0 - 9,5, hemolysoidusta näytteestä määritetään fotometrisesti kokonaishemoglobiini pitoisuus, ja hemoglobiini johdannainen määritetään hemolysoidusta näytteestä immunologisesti.

Keksinnön edelleen eräänä kohteena on hemolyysireagenssi, joka sisältää ionista detergenttiä pH-arvossa 5 - 9,5, sen käyttö verinäytteen esikäsittelyyn hemoglobiini johdannaisen immunologiseen määrittämiseen, ja haluttaessa kokonaishemoglobiini pitoisuuden määrittämiseen, samoin kuin testipakkaus, joka sisältää hemolyysireagenssia.

Verinäytteen sisältämät verisolut liukenevat hemolyysireagenssin vaikutuksesta, ja hemoglobiini muuttuu spesifiseksi hemoglobiini kromoforiksi. Muodostuvaa hemoglobiini kromoforia voidaan käyttää tunnusomaisen absorptionsa johdosta kokonaishemoglobiini pitoisuuden määrittämiseen ja immunologisen reaktion johdosta hemoglobiini johdannaisen spesifisen epitopin määrittämiseen. Immunologisinä määrittämenetelminä voidaan eriaatteessa käyttää kaikkia käyttökelpoisia menetelmiä, kuten esimerkiksi kerrostustestejä (Sandwichtests), IEMA-testejä, saostus- tai agglutinointitestejä, samoin kuin

FPIA- ja CEDIA-periaatteen mukaisia testejä. Niin märkä-
kuin myös kuivatestit ovat mahdollisia.

Hemolyysireagenssissa voidaan käyttää ionisina detergentteinä anionisia detergenttejä, edullisesti natriumdodekyylisulfaattia (SDS), natriumdioktyylisulfosukkinaattia (DONS), kationisia detergenttejä, edullisesti tetradekyylitrimetyyliammoniumbromidia (TTAB) tai setyyli(trimetyyli)ammoniumbromidia (CTAB) tai kaksois-ionisia detergenttejä, edullisesti Zwittergent 3-14:ää. Hemolyysireagenssiä lisätään verinäytteeseen määrä, joka riittää punasolujen liuottamiseen, hemoglobiinin muuttamiseen spesifiseksi hemoglobiinikromoforiksi ja hemoglobiinijohdannaisen epitoopin vapauttamiseen. Hemolyysireagenssia lisätään verinäytteeseen suhteessa 1:10 - 1:400 niin, että ionisen detergentin konsentraatio tulokseksi saatavassa seoksessa on 0,01 - 5 paino-%, edullisesti 0,5 - 1,5 paino-%. Hemolyysireagenssin pH-arvo on alueella heikosti happamasta heikosti alkaliseen. Edullisesti pH-arvo on välillä 5,0 - 9,5, erityisen edullisesti 7,4. pH-arvon säätämiseen hemolyysireagenssissa voidaan käyttää kaikkia käytökelpoisia puskureita. Edullisesti hyödynnetään HEPES-, MES-, TRIS- tai fosfaattipuskuria.

Hemolyysireagenssi voi sisältää muita reagensseja, jotka voivat esimerkiksi auttaa immunologisen reaktion häiriöiden estoa, hemoglobiinin hapettumista, sameudenpoistoa, stabilointia tai säilytystä. Muutamat detergentit, mm. SDS, voivat häiritä immunologisia reaktioita. Harvoissa tapauksissa esiintyy hemolyysireagenssin lisäyksen jälkeen samentumia ja flokkulointia, jotka johtuvat erilaisista syistä. Esimerkiksi SDS on alhaisissa lämpötiloissa niukkaliukoista. Yllättävällä tavalla on osoittautunut, että nämä häiriöt voidaan välttää lisäämällä ei-ionista detergenttiä, edullisia ovat polyoksietyleenieetterit, kuten Brij 35 ja 58 tai Triton X100, samoin kuin polyoksietyleeniestarit, kuten Myrj 52 ja 59 tai Tween 20. Normaalisti ei-ionista detergenttiä lisätään hemolyysireagenssiin sellainen määrä, että näytteeseen

lisäämiseen jälkeen konsentraatio on tulokseksi saadussa reaktiossa 0,01 - 5 paino-%, edullisesti 0,1 - 0,5 paino-%.

Hemolyysireagenssiin voi sisältyä edelleen käyttökelpoista hapetusreagenssia rauta(III)syanidia, esimerkiksi heksasyaaniferraattia(III). Yhdessä kationisten detergenttien kanssa voi kuitenkin esiintyä saostumia. Lisäksi voi ferrisyanidia käytettäessä olla tarpeen valolta suojaaminen. Yllättävällä tavalla on osoittautunut, että lisättäessä säilöntäaineita, joiden vaikutusmekanismi perustuu hapettavaan hyökkäykseen tioliryhmiin, kuten esimerkiksi metyyli-isotiatsolonia tai Bronidox® K:ta, ferrisyanidilisäys voidaan jättää kokonaan pois. Yhdessä kationisten detergenttien kanssa nämä säilöntäaineet johtavat ruskeanvihreään hemoglobiinikromoforiin, jonka absorptiomaksimi on 570 nm. Tämän erityinen etu on, että ensiksisin näitä säilöntäaineita lisäämällä saavutetaan niin hemoglobiinin muuttuminen spesifiseksi hemoglobiinikromoforiksi, kuin myös hemolyysireagenssin hyvä säilyvyys, ja toiseksi hemolyysin loppupiste värinmuutoksella punaisesta ruskeanvihreään on hyvin tunnistettavissa. Säilöntäaineita käytetään hemolyysireagenssissa konsentraatiossa 0,005 - 0,2 paino-%, edullisesti 0,01 - 0,02 paino-%.

Hemolyysi, hemoglobiinin muuttaminen spesifiseksi hemoglobiinikromoforiksi samoin kuin näytteen esikäsittely hemoglobiinijohdannaisien osoittamiseksi hemolyysireagenssilla ovat täydelliset alhaisissa lämpötiloissa, edullisesti 4 - 37 °C:ssa ja erityisen edullisesti huoneenlämpötilassa (20 °C) 1 - 10 min kuluttua. Useimmissa tapauksissa riittää 2-min inkubointi täydelliseen näytteen esikäsittelyyn.

Näin esikäsitelty verinäyte laimennetaan seuraavaksi reaktiopuskurilla suhteessa 1:10 - 1:100. Puskureina voidaan käyttää kaikkia käyttökelpoisia puskureita, jotka eivät häiritse immunologista reaktiota. Edullisesti käytetään MES- tai HEPES-puskuria konsentraatioissa 10 - 200 mmol/l. Reaktionspuskurin pH-arvo on 5,0 - 8,0. Mikäli immunologinen

määrittäminen sisältää entsyymireaktion, niin reaktionspuskurilla on edullisesti pH-arvo, joka vastaa entsyymireaktion pH-optimia. Reaktiopuskuri voi lisäksi jo sisältää hemoglobiinijohdannaisen osoitukseen tarvittavat reagenssit, ennen
 5 kaikkea spesifisen sidospartnerin, edullisesti hyvin spesifisiä poly- tai monoklonaalisia vasta-aineita.

Tässä on myös yllättävällä tavalla osoittautunut, että lisä-detergentin, edullisesti ei-ionisten detergenttien, kuten
 10 Brij:n tai Myrj:n lisääminen on edullista, optimaalisten olosuhteiden aikaansaamiseksi niin näytteen esikäsittelyyn hemoglobiinijohdannaisen, kuten glykosyloidun hemoglobiinin osoittamiseksi, kuin myös immunologiselle reaktiolle, ja häiriöiden välttämiseksi. Detergenttiä lisätään reaktiopus-
 15 kuriin määrä, joka on tulokseksi saadussa seoksessa konsentraatio 0,01 - 5 paino-%, edullisesti 0,5 paino-%.

Mikäli samasta näytteestä on hemoglobiinijohdannaisen määrittä-
 20 tyksen ohella saatava selville kokonaishemoglobiinipitoisuus, niin reaktiopuskurin lisäämisen jälkeen mitataan edullisesti kokonaishemoglobiinipitoisuuden selviulles saamiseksi absorptio aallonpituuksilla 400 - 650 nm, edullisesti 500 - 650 ja erityisen edullisesti 546 tai 570 nm:llä. Märkätestin tapauksessa määritetään fotometrisesti ekstinktio kyvetissä tällä aallonpituudella, kuivatestin tapauksessa absorptio voidaan määrittää heijastusfotometrisesti, kun tulokseksi saatu seos on lisätty testikantajalle.

Tällainen testikantaja kokonaishemoglobiinipitoisuuden määrittä-
 30 ritykseen voidaan konstruoida hyvin yksinkertaisesti, koska sen ei tarvitse sisältää mitään kemikaaleja. Imukykyinen kuitumatto, joka on sijoitettu läpinäkyvälle kantajakalvolle, riittää yksikertaisiin vaatimuksiin. Testsuikaleen parempaa käsittelyä ja arviointia varten voi sisältyä vielä
 35 muita kantajakerroksia, esimerkiksi kuljetuskuitumatto tai annostelukuitumatto.

Kokonaishemoglobiinipitoisuus ja hemoglobiinijohdannaisen pitoisuus voidaan myös määrittää näytteen eri osista hemolyysireagenssin lisäyksen jälkeen. Tässä tapauksessa osasta näytteen ja hemolyysireagenssin seoksesta, tarvittaessa
 5 vastaavan laimentamisen jälkeen, määritetään kokonaishemoglobiinipitoisuus fotometrisesti. Seoksen toiseen osaan lisätään reaktiopuskuria, ja seuraavaksi määritetään hemoglobiinijohdannainen immunologisesti.

10 Hemoglobiinijohdannaisen kuten HbA_{1c} :n määrittämiseen soveltuvat periaatteessa kaikki käyttökelpoiset immunologiset menetelmät. Kuten edellä kuvattiin, voidaan hemoglobiinijohdannaisia, edullisesti HbA_{1c} :tä vastaan valmistaa poly- ja monoklonaalisia vasta-aineita, jotka sitovat spesifisesti
 15 hemoglobiinijohdannaisen tunnusomaiset epitoopit (US-patenttijulkaisu 4247533, EP-patenttijulkaisut A0316306 ja A0201187).

Immunologisen määrittämisen muunnelmassa merkitsemisen tyyppin
 20 samoin kuin mittaussignaalin havaitsemisen menetelmän kohdalla ovat kyseessä tekniikan tason tunnetut menetelmät. Sopivia ovat esimerkiksi kerrostustestit (Sandwichtests) entsyymimerkkauksella (ELISA), IEMA-testisuoritukset, RIA-, saostus- ja agglutinointitestit samoin kuin homogeeniset
 25 immunomäärittäykset kuten CEDIA®-, EMIT- tai FPIA-tekniikka.

Märkätestissä hemoglobiinijohdannaisen immunologinen määrittäminen tapahtuu edullisesti TINIA-periaatteella, koska tällöin ei tarvita mitään erotusvaihetta. Näyte sekoitetaan analyyt-
 30 tispesifisen vasta-aineen ja polyhapteenin kanssa agglutinointiaineina. Polyhapteeni koostuu kantajamateriaalista, esimerkiksi albumiinista, dekstraanista tai IgG:stä, jolle on liitetty useampia epitooppeja, jolle spesifiset vasta-aineet voivat sitoutua. Koska vasta-aineiden saostus voi
 35 tapahtua vain polyhapteenilla, tapahtuu näytteen analyysin pienenevällä pitoisuudella lisääntyvä sameus, joka voidaan määrittää nefelometrisesti tai turbidimetrisesti.

Edullisesti hemoglobiini johdannaiselle spesifinen vasta-aine sisältyy jo reaktiopuskuriin. Reaktiopuskurin lisäämisen jälkeen voidaan tulokseksi saadusta seoksesta määrittää ensin kokonaishemoglobiinipitoisuus fotometrisesti. Saostus-

5 reaktio käynnistetään lisäämällä liuosta, joka sisältää polyhapteenin. Lyhyen inkubointiajan jälkeen, jolloin 5 min on useimmiten riittävä, tulokseksi saatava sameus voidaan mitata sopivalla aallonpituudella, edullisesti aallonpituuksilla 340 - 600 nm, erityisen edullisesti 340 nm:lla, ja

10 määrittää tästä hemoglobiini johdannaisen konsentraatio. Koska kokonaishemoglobiinin mittausta tapahtuu aallonpituuksilla 500 - 650 nm, edullisesti 546 tai 570 nm:llä, molemmat mittaukset eivät häiritse toisiaan ja voidaan suorittaa yhdessä kyvetissä samassa reaktioliuoksessa peräjälkeen.

15

Polyhapteeniliuoksen, ts. polyhapteenin tai glykosyloidun proteiinin tai peptidin nestemäisen galeenisen muodon valmistuksessa on osoittautunut, ettei tämä ole stabiilia tavallisesti käytetyssä fosfaattipuskurissa pH-arvossa 7,0 -

20 7,5, ja johtaa pitemmässä säilytyksessä glykoproteiinin hajoamiseen. Tällaiset glykosyloitujen proteiinien epästabiilisuudet fosfaattipuskurissa tunnetaan esimerkiksi julkaisusta Ahmed et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 4889-4894. Käyttämällä MES-puskuria konsentraatiossa 5 - 200 mmol/l,

25 edullisesti 20 - 50 mmol/l ja pH-arvoa 5,0 - 8,0, edullisesti välillä 6,0 - 6,5 ja samanaikaista EDTA:n tai samanarvoisen kompleksinmuodostajan lisäystä edullisessa konsentraatiossa 1 - 50 mmol/l, erityisen edullisesti 0,1 - 20 mmol/l, saavutettiin peptidien, proteiinien ja polyhapteenien stabi-

30 lointi. Naudan seerumialbumiinin (RSA) lisääminen edullisessa konsentraatiossa 0,1 - 2 %, erityisen edullisesti 1 %, aikaansai edelleen positiivisen vaikutuksen polyhapteeniliuoksen stabiilisuudelle. Tätä polyhapteeniliuosta voidaan varastoida yli 12 kuukautta 4 °C:ssa havaitsematta merkittäviä

35 polyhapteenin tai glykosyloitujen proteiinien tai peptidien epästabiilisuuksia. 3 viikon rasituskuormituksessa 35 °C:ssa esiintyi vain 15 - 20-% signaalin pienemisiä alkuperäiseen

ekstinkti signaaliin verrattuna.

- Kuivatestinä hemoglobiinijohdannaisen immunologinen määrittäminen tapahtuu edullisesti IEMA-testiperiaatteella. Reaktiopuskurin hemolysoituun verinäytteeseen lisäämisen jälkeen lisätään spesifinen entsyymillä merkitty vasta-aine. Eräässä edullisessa suoritustavassa vasta-aine sisältyy jo reaktiopuskuriin. Lyhyen inkuboinnin jälkeen seos lisätään testikantajalle. Epitooppimatriisille, ts. testikantajavyöhykkeellä, jolle on kiinnitetty useita epitooppeja, joille spesifiset vasta-aineet voivat sitoutua, siepataan vapaat entsyymillä merkityt vasta-aineet. Toisella vyöhykkeellä, osoitusvyöhykkeellä, määritetään reflektofotometrisesti hemoglobiinijohdannaisen ja vasta-aineen kompleksi saattamalla reagoimaan sopivan entsyymisubstraatin kanssa. Substraatti voi sisältyä osoitusvyöhykkeeseen tai joutua siihen saattamalla osoitusvyöhykkeen kontaktiin muun vyöhykkeen kanssa, joka sisältää substraatin.
- 20 Tarkoituksenmukaisesti keksinnön mukaiselle menetelmälle välttämättömät reagenssit saatetaan myytäväksi testipakkauksen muodossa, joka sisältää vähintään kahdessa toisistaan erotetussa pakkauksessa hemolyysireagenssin ohella muut reagenssit liuotetussa tai lyofilisoidussa muodossa tai myös
- 25 testikantajalle levitettynä.

Tätä keksintöä valaistaan seuraavilla esimerkeillä:

Esimerkki 1

- 30 Kokonaishemoglobiinin ja HbA_{1c}:n samanaikainen määrittäminen märetestissä

Kokeet suoritettiin Hitachi 717-laitteessa yhtiöstä Boehringer Mannheim GmbH. Kokonaishemoglobiinipitoisuus mitattiin fotometrisesti aallonpituudella 546 nm. HbA_{1c}:n immunologinen määrittäminen tapahtui TINIA-testiperiaatteella turbidimetrisellä mittauksella 340 nm:llä. Kaikki määrittäykset ja inkuboinnit suoritettiin lämpötilassa 37 °C.

Käytettiin seuraavia liuoksia:

Hemolyysireagenssi:

- | | | | |
|---|------|----|------------------------------------|
| | 20 | mM | NaPO ₄ -puskuria pH 7,0 |
| 5 | 1,0 | % | SDS |
| | 0,1 | % | natriumatsidi |
| | 0,02 | % | kaliumheksasyaaniferraatti(III) |
| | 0,5 | % | Brij 35 |

10 Reaktiopuskuri:

- | | | | |
|----|-----|-------|---|
| | 20 | mM | MES-puskuri pH 6,0 |
| | 150 | mM | natriumkloridi |
| | 3,0 | % | PEG 6000 |
| | 0,5 | % | Brij 35 |
| 15 | 0,1 | % | naudanseerumialbumiini |
| | 0,1 | % | natriumatsidi |
| | 10 | mM | EDTA |
| | 6 | mg/ml | PAK <HbA _{1c} > S-IgG (DE) (polyklonaalinen lammas-
vasta-aine HbA _{1c} :tä vastaan) tai |
| 20 | 100 | µg/ml | MAK <HbA _{1c} > M-IgG (DE) (monoklonaalinen hiiri-
vasta-aine HbA _{1c} :tä vastaan) |

Polyhapteeniliuos:

- | | | | |
|----|-----|-------|--|
| | 20 | mM | MES-puskuri pH 6,0 |
| 25 | 150 | mM | natriumkloridi |
| | 6,0 | % | PEG 6000 |
| | 0,5 | % | Brij 35 |
| | 0,1 | % | naudanseerumialbumiini |
| | 25 | mg/ml | polyhapteeni HbA _{1c} -β-1-4(cys, MHS)-RSA 18:1 |

30

Verikokeeseen lisättiin hemolyysireagenssia suhteessa 1:100 ja inkuboitiin 2 min ajan 25 °C:ssa. 5 µl:aan hemolysoitua näytettä lisättiin 250 µl reaktiopuskuria. 4 min kuluttua mitattiin 546 nm:llä kokonaishemoglobiinin absorptio (E1).

- 35 Minuuttia myöhemmin mitattiin absorptio 340 nm:llä (E2), ja seuraavaksi pipetoitiin mukaan 50 µl polyhapteeniliuosta ja inkuboitiin 5 min. Tämän jälkeen mitataan sameus 340 nm:llä

(E3).

- HbA_{1c}-arvon määrittämiseksi yksikössä g/dl esitetään ekstinktioerotus $\Delta E = E3 - k \cdot E2$ HbA_{1c}-konsentraation funktiona ja määritetään graafisesti.

$$k = \text{tilavuuskorjaustekijä} = \frac{\text{tilavuus}_{\text{näyte}} + \text{tilavuus}_{\text{reaktiopuskuri}}}{\text{kokonaistilavuus}}$$

- 10 Kokonaishemoglobiinikonsentraatio lasketaan vakiotekijästä K kertomalla E1:llä (K = hemoglobiinikromoforin molaarinen ekstinktiokerroin x laimennustekijä). Kalibroijana toimi EDTA-kokoveri, jolla oli tunnettu hemoglobiini- ja HbA_{1c}-pitoisuus. EDTA-kokoveri laimennettiin kalibrointikäyrän
15 valmistamiseksi hemolyysireagenssilla eri vahvuuksiin.

- Kalibrointikäyrät esitetään graafisesti kuvioissa 1 ja 2. Kuviossa 1 esitetään kokonaishemoglobiinikonsentraatio E1:n funktiona. Siitä ilmenee lineaarinen suhde. Laskettaessa
20 voidaan siten kertoa vakiotekijällä K. Kuviossa 2 esitetään ekstinktioerotus $\Delta E = E3 - k \cdot E2$ HbA_{1c}-pitoisuuden funktiona.

- Muissa kokeissa pipetoitiin ensin hemolysoituun verinäytteen seen polyhapteeniliuos, ja 5-min inkuboinnin jälkeen käynnistettiin saostusreaktio lisäämällä reaktiopuskuria, joka
25 sisälsi spesifisen vasta-aineen. Tämä pipetointijärjestys johti HbA_{1c}-määrityksessä (Kuvio 3) selvästi pienempään herkkyYTEEN verrattuna edellä mainittuun pipetointijärjestykseen, jossa lisättiin ensin vasta-aine ja sen jälkeen
30 polyhapteeni.

Esimerkki 2

Kokonaishemoglobiinin ja HbA_{1c}:n määritykseen tarkoitetut testisuikaleet

- 35 30 μ l kokoverta sekoitettiin 300 μ l:n kanssa hemolyysireagenssia, ja inkuboitiin 10 min 20 °C:ssa. Hemolyysireagenssi koostui 0,18-% SDS-liuoksesta, joka oli puskuroitu pH-arvoon

7.

Kokonaishemoglobiinin määrittämiseksi levitettiin 32 μ l hemolysoitua verinäytettä testisuikaleelle. Testisuikaleen rakenne esitetään graafisesti kuviossa 4. Se koostuu pelkästään käsittelemättömästä lasikuituisesta annostelukuitumatosta 1, käsittelemättömästä lasikuitukuljetuskuitumatosta 2, käsittelemättömästä polyesterikudoksesta 3 ja läpinäkyvästä polykarbonaattikalvosta 4. Testisuikale ei sisällä mitään lisäkemikaaleja. Tällä kokeensuorituksella verinäytteen kokonaishemoglobiinipitoisuus voidaan mitata hyvin tarkasti aallonpituudella 576 nm.

Tulokseksi saatiin vaihtelukertoimet (VK) alle 2,5 % (Taulukko 1).

Taulukko 1

Kokonaishemoglobiinimääritys

20

VK laskettiin kulloinkin 10 yksittäisestä määrityksestä.

Hb-konsentraatio [g/dl]	VK [%]
14,1	1,0
17,5	2,5
13,7	1,9
14,7	1,8

30

HbA_{1c}-konsentraation määrittämiseksi lisättiin kulloinkin 32 μ l:aan hemolysoitua näytettä 1200 μ l reaktiopuskuria, ja inkuboitiin 10 min. Reaktiopuskurissa on 100 mM Hepes, pH 7,4, 100 mM NaCl ja 0,1 % Brij 35 MAK-entsyymi-konjugaatin kanssa. 32 μ l seosta levitetään testisuikaleelle, joka esitetään graafisesti kuviossa 5. Vapaa vasta-aine/entsyymi-konjugaatti vangitaan epitooppimatriisille 11. Tätä seuraa-

35

valla vyöhykkeellä, kuljetuskuitumatolla 12, määritetään reflektiofotometrisesti HbA_{1c}/vasta-aine/entsyymi-kompleksi saattamalla substraatin reagoimaan sen jälkeen kun substraattikuitumatto 13, joka sisältää substraatin, on saatettu 5 kontaktiin kuljetuskuitumaton 12 kanssa (taulukko 2).

Taulukko 2

HbA_{1c}-konsentraation määrittäminen testisuikaleen avulla

10

VK saatiin kulloinkin selville 10 yksittäisestä mittauksesta.

15	HbA _{1c} -konsentraatio	VK
	[g/d]	[%]
	0,8	6,8
	1,1	5,4
	1,4	6,0

20

Esimerkki 3

Erilaisten ionisten detergenttien vaikutus HbA_{1c}-määrittämiseen

Kokeet suoritettiin esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Hemo- 25 lyysireagenssin koostumus oli seuraavanlainen:

20	mM	NaPO ₄ -puskuri pH 7,2
0,1	%	natriumatsidi
0,02	%	kaliumheksasyaaniferraatti(III)
30	0,5	% Brij 35

Taulukossa 3 ilmoitettuja ionisia detergenttejä sisältyi kulloinkin taulukossa ilmoitettu konsentraatio.

35 TTAB:n ja CTAB:n tapauksessa ei hemolyysireagenssiin sisältynyt lainkaan kaliumheksasyaaniferraattia(III), koska tämä saostuu näillä detergenteilla.

Reaktiopuskurin ja polyhapteeniliuoksen koostumus vastaa esimerkkiä 1.

- Verinäytteenä käytettiin standardia, jonka HbA_{1c}-pitoisuus oli 3,2 g/dl. Kaikki testatut ioniset detergentit aikaansai-
vat solujen liukenemisen ja epitoopin vapautumisen. Sopivim-
maksi osoittautui anioninen detergentti SDS, samoin kuin
kationiset detergentit TTAB ja CTAB.

10 Taulukko 3

HbA_{1c}-määritys

- Erilaisten ionisten detergenttien vaikutus hemolyysireagens-
sissa.

Absorptio mitattiin 340 nm:llä.

	Deter- gentti	Konsentraa- tio hemo- lyysireaa- genssissa	E1 [0g/dl HbA _{1c}]	E2 [3,2g/dl HbA _{1c}]	ΔE = E1-E2
20	SDS	0,5 %	337 mE	73 mE	264 mE
	SDS	1,0 %	338 mE	80 mE	258 mE
25	Zwitter- gent 3-14	0,5 %	341 mE	172 mE	169 mE
	Zwitter- gent 3-14	1,0 %	343 mE	139 mE	204 mE
30	TTAB	1,0 %	377 mE	149 mE	228 mE
	CTAB	1,0 %	374 mE	137 mE	237 mE
35	Kontrolli eli ioni- nen deter- gentti	--	340 mE	275 mE	65 mE

40 Esimerkki 4

HbA_{1c}-määrityksen dynaamisen mittausalueen riippuvuus Brij 35-konsentraatiosta

Kokeet suoritettiin kuten esimerkissä 3. Hemolyysireagens-
sissa käytettiin vakio 1 % SDS:ää. Brij 35-konsentraatiota

reaktiopuskurissa vaihdeltiin taulukossa 4 esitetyllä alueella. Näytteenä toimi esimerkissä 3 mainittu HbA_{1c}-standardi.

- 5 Mittausalue laajeni kontrollin 47 mE:stä jo lisäyksellä 0,1 % Brij 35 arvoon 233 mE. Brij 35:n edullinen konsentraatio oli 0,1 - 1,0 %.

Taulukko 4

- 10 Reaktiopuskurin erilaisten Brij-konsentraatioiden vaikutus HbA_{1c}-määritykseen

Absorptio mitattiin 340 nm:llä.

15	Konsentraatio Brij 35 reaktiopuskurissa	E1 [0g/dl HbA _{1c}]	E2 [3,2g/dl HbA _{1c}]	ΔE=E1-E2
	-	240 mE	193 mE	47 mE
	0,1 %	266 mE	33 mE	233 mE
	0,25 %	274 mE	40 mE	234 mE
20	0,5 %	302 mE	57 mE	245 mE
	1,0 %	351 mE	99 mE	252 mE
	2,0 %	385 mE	242 mE	143 mE

Esimerkki 5

- 25 Erilaisten reaktiopuskurissa olevien detergenttien vaikutus HbA_{1c}-määritykseen

Kokeet suoritettiin esimerkille 4 analogisesti. Reaktiopuskurissa käytettiin taulukossa 5 esitettyjä detergentejä.

Dynaaminen mittausalue laajeni eniten lisättäessä Brij

- 30 35:ttä, 56:ttä ja 58:aa, samoin kuin Myrj 52:ta ja 59:ää.

Mutta myös muilla ei-ionisilla detergenteillä kuten Tritonilla, samoin kuin kaksois-ionisilla detergenteillä kuten Zwittergent 3-14:llä nähtiin kontrolliin verrattuna selvä positiivinen vaikutus.

Taulukko 5

Reaktiopuskurissa olevien detergenttien vaikutus

5	Deter- gentti	Konsentraa- tio reakti- opuskuri- ssa	E1 [0g/dl HbA _{1c}]	E2 [3,2g/dl HbA _{1c}]	$\Delta E = E1-E2$
	Kontrolli	-	240 mE	193 mE	47 mE
10	Brij 35	0,5 %	302 mE	57 mE	245 mE
	Brij 56	0,5 %	302 mE	57 mE	245 mE
	Brij 58	0,5 %	303 mE	51 mE	252 mE
15	Triton x 114	0,2 %	523 mE	275 mE	248 mE
	Triton x 100	0,5 %	298 mE	202 mE	96 mE
20	Tween 80	0,25 %	277 mE	143 mE	134 mE
	Tween 60	0,25 %	266 mE	75 mE	191 mE
25	Tween 40	0,25 %	276 mE	86 mE	189 mE
	Tween 20	0,1 %	266 mE	131 mE	135 mE
30	Zwitter- gent 3-14	0,1 %	308 mE	155 mE	153 mE
	Myrj 52	0,5 %	308 mE	40 mE	268 mE
	Myrj 59	0,5 %	317 mE	31 mE	286 mE
35					

Esimerkki 6

Kokonaishemoglobiinin ja HbA_{1c}:n samanaikainen määrittäminen spesifisellä ruskeanvihreällä hemoglobiinikromoforilla

Kokeet suoritettiin Hitachi 717-laitteella yhtiöstä Boehringer Mannheim GmbH. Kokonaishemoglobiinipitoisuus mitattiin fotometrisesti aallonpituudella 570 nm. HbA_{1c}:n immunologinen määrittäminen tapahtui TINIA-testiperiaatteella turbidimetrisellä mittauksella 340 nm:llä. Kaikki määrittäykset ja inkuboinnit suoritettiin lämpötilassa 37 °C.

Käytettiin seuraavia liuoksia:

Hemolyysireagenssi:

	20	mM	NaPO ₄ -puskuri pH 7,4
	1,0	%	tetradekyyli- <i>trimetyyliammoniumbromidi</i> (TTAB)
	0,01	%	metyyli- <i>isotiatsoloni</i>
	0,02	%	Bronidox® K
5	0,5	%	Brij 35
	10	mM	EDTA

Reaktiopuskuri:

	20	mM	MES-puskuri pH 6,0
10	150	mM	natriumkloridi
	3,0	%	PEG 6000
	0,5	%	Brij 35
	0,01	%	metyyli- <i>isotiatsoloni</i>
	0,02	%	Bronidox® K
15	1,2	mg/ml	PAK <HbA _{1c} > S-IgG (DE) (polyklonaalinen lammasvasta-aine HbA _{1c} :tä vastaan)

Polyhapteeniliuos:

	20	mM	MES-puskuri pH 6,0
20	150	mM	natriumkloridi
	6,0	%	PEG 6000
	0,5	%	Brij 35
	20	µg/ml	polyhapteeni

- 25 Vesinäytteeseen lisättiin hemolyysireagenssia suhteessa 1:100 ja inkuboitiin 2 min 25 °C:ssa. 10 µl:aan hemolysoitua näytettä lisättiin 250 µl reaktiopuskuria. 4 min kuluttua mitattiin kokonaishemoglobiinin absorptio 570 nm:llä (E1). Minuuttia myöhemmin mitattiin absorptio 340 nm:llä, (E2) ja
- 30 seuraavaksi pipetoitiin mukaan 50 µl polyhapteeniliuosta ja inkuboitiin 5 min ajan. Tämän jälkeen sameus mitattiin 340 nm:llä (E3).

- HbA_{1c}-arvon määrittämiseksi yksikössä g/dl esitetään eks-
- 35 tinktioerotus $\Delta E = E3 - k \cdot E2$ HbA_{1c}-konsentraation funktiona ja määritetään graafisesti.

$$k = \text{tilavuuskorjaustekijä} = \frac{\text{tilavuus}_{\text{näyte}} + \text{tilavuus}_{\text{reaktiopuskuri}}}{\text{kokonaistilavuus}}$$

- 5 Kokonaishemoglobiinikonsentraatio lasketaan vakiotekijästä K kertomalla E1:llä (K = hemoglobiinikromoforin molaarinen ekstinktiokerroin x laimennustekijä). Tunnusomainen absorptiospektri esitetään kuviossa 6. Kalibroijana toimi EDTA-kokoveri, jossa oli tunnettu hemoglobiini- ja HbA_{1c}-pitoisuus.
- 10 EDTA-kokoveri laimennettiin kalibrointikäyrän valmistamiseksi hemolyysireagenssilla eri vahvuuksiin.

- Kalibrointikäyrät esitetään graafisesti kuvioissa 7 ja 8. Kuviossa 7 esitetään kokonaishemoglobiinikonsentraatio E1:n funktiona. Tulokseksi saadaan lineaarinen suhde. Laskettaessa voidaan siten kertoa vakiotekijällä K. Kuviossa 8 esitetään ekstinktioerotus $\Delta E = E3 - k \cdot E2$ HbA_{1c}-pitoisuuden funktiona.
- 15

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä verinäytteessä olevan hemoglobiinijohdannaisen pitoisuuden määrittämiseen, t u n n e t t u siitä, että

- 5 (a) verinäyte käsitellään hemolyysireagenssilla, joka sisältää ionista detergenttiä pH-arvossa 5 - 9,5, ja

(b) hemolysoidusta verinäytteestä määritetään hemoglobiinijohdannainen immunologisesti.

10

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että verinäytettä käsitellään hemolyysireagenssilla lämpötiloissa 4 - 37 °C jopa 10 min ajan.

- 15 3. Toisen patenttivaatimuksista 1 ja 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hemolyysireagenssi sisältää lisäksi ei-ionista detergenttiä.

20 4. Yhden patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hemolysoituun näytteeseen lisätään reaktiopuskuria, joka sisältää ei-ionista tai kaksois-ionista detergenttiä, ja määritetään hemoglobiinijohdannainen tulokseksi saadusta seoksesta immunologisesti.

- 25 5. Yhden patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hemoglobiinijohdannainen on HbA_{1c}.

30 6. Menetelmä hemoglobiinijohdannaisen ja kokonaishemoglobiinin pitoisuuden määrittämiseen verinäytteestä, t u n n e t t u siitä, että

(a) verinäyte käsitellään hemolyysireagenssilla, joka sisältää ionista detergenttiä pH-arvossa 5,0 - 9,5,

35

(b) määritetään kokonaishemoglobiinipitoisuus hemolysoidusta näytteestä, ja

(c) määritetään hemoglobiini johdannainen hemolysoidusta näytteestä immunologisesti.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t -
5 t u siitä, että kokonaishemoglobiinipitoisuus määritetään mittaamalla spesifisen hemoglobiinikromoforin tunnusomaisen absorption.

8. Toisen patenttivaatimuksista 6 ja 7 mukainen menetelmä,
10 t u n n e t t u siitä, että hemolyysireagenssi sisältää lisäksi ei-ionista detergenttiä.

9. Yhden patenttivaatimuksista 6 - 8 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että hemolysoituun näytteeseen lisä-
15 tään reaktiopuskuria, joka sisältää ei-ionista tai kaksois-ionista detergenttiä, ja kokonaishemoglobiini ja hemoglobiini johdannainen määritetään tulokseksi saadusta seoksesta.

10. Hemolyysireagenssi, t u n n e t t u siitä, että se si-
20 sältää ionista detergenttiä pH-arvossa 5 - 9,5.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen hemolyysireagenssi,
t u n n e t t u siitä, että se sisältää ei-ionista deter-
genttiä.

25

12. Toisen patenttivaatimuksista 10 tai 11 mukainen hemo-
lyysireagenssi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sopivaa hapetusreagenssia tai säilöntäainetta, jonka vaikutus perustuu hapettavaan hyökkäykseen tioliryhmiin.

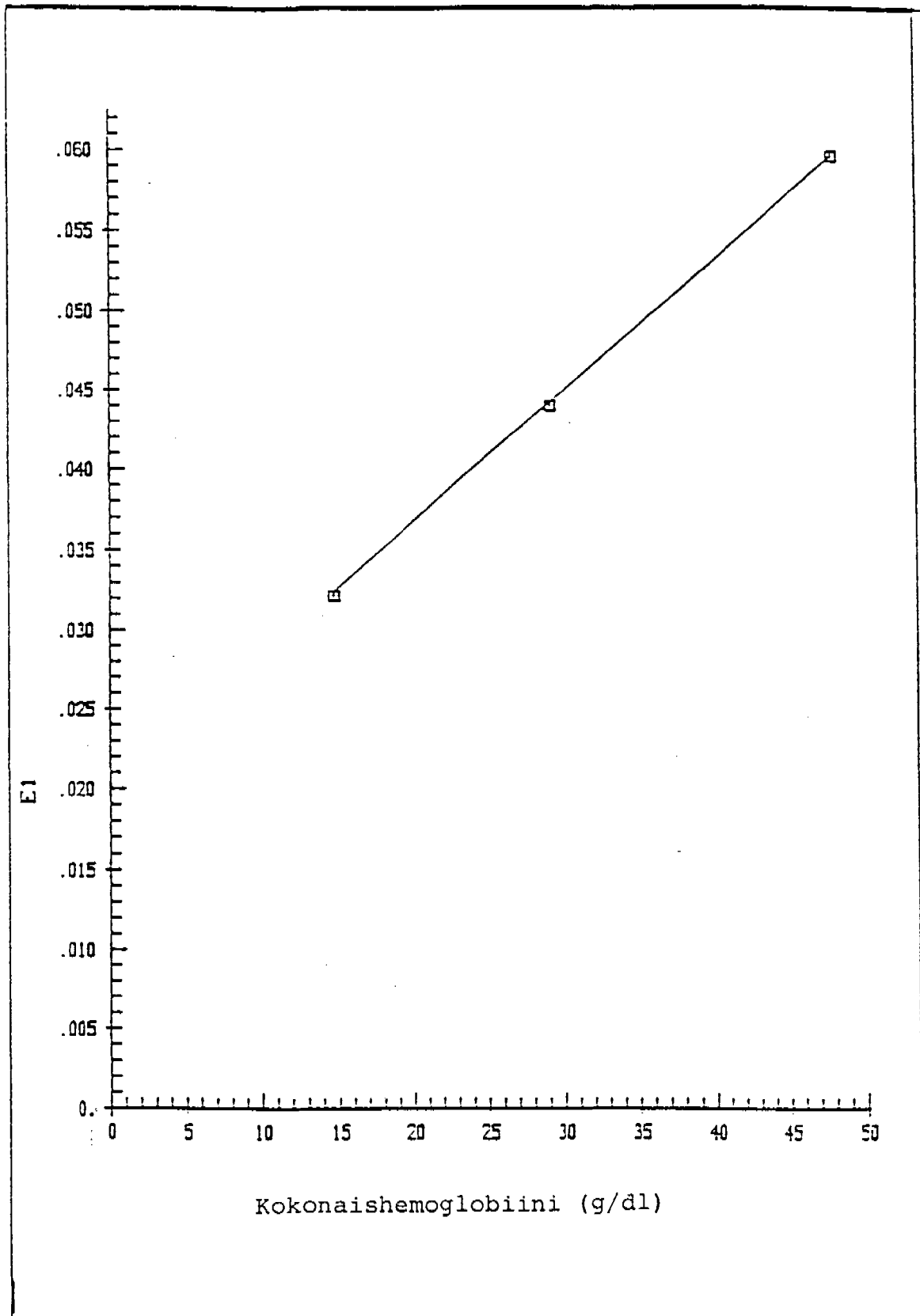
30

13. Yhden patenttivaatimuksista 10 - 12 mukaisen hemolyysi-
reagenssin käyttö hemoglobiini johdannaisen immunologisessa
määrityksessä tai hemoglobiini johdannaisen ja kokonaishemo-
globiinipitoisuuden samanaikaisessa määrityksessä näyttees-
35 tä.

14. Testipakkaus hemoglobiinijohdannaisen immunologiseen määrittämiseen, t u n n e t t u siitä, että se koostuu vähintään kahdesta toisistaan erotetusta pakkauksesta, joista toinen sisältää yhden patenttivaatiumuksista 10 - 12 mukaisia hemolyysireagenssia ja toinen sisältää muuta reagenssiseosta, joka sisältää hemoglobiinijohdannaisen immunologiseen määrittämiseen välttämättömät reagenssit.
15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen testipakkaus, t u n n e t t u siitä, että immunologiseen määrittämiseen välttämättömät reagenssit on levitetty testikantajalle.
16. Glykosyloidun proteiinin, peptidin tai polyhapteenin liuoksen stabilointi, t u n n e t t u siitä, että puskurina käytetään MES-puskuria, pH 5,0 - 8,0, ja liuos sisältää EDTA:ta.
17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen liuoksen stabilointi, t u n n e t t u siitä, että lisätään naudanseerumialbumiinia.

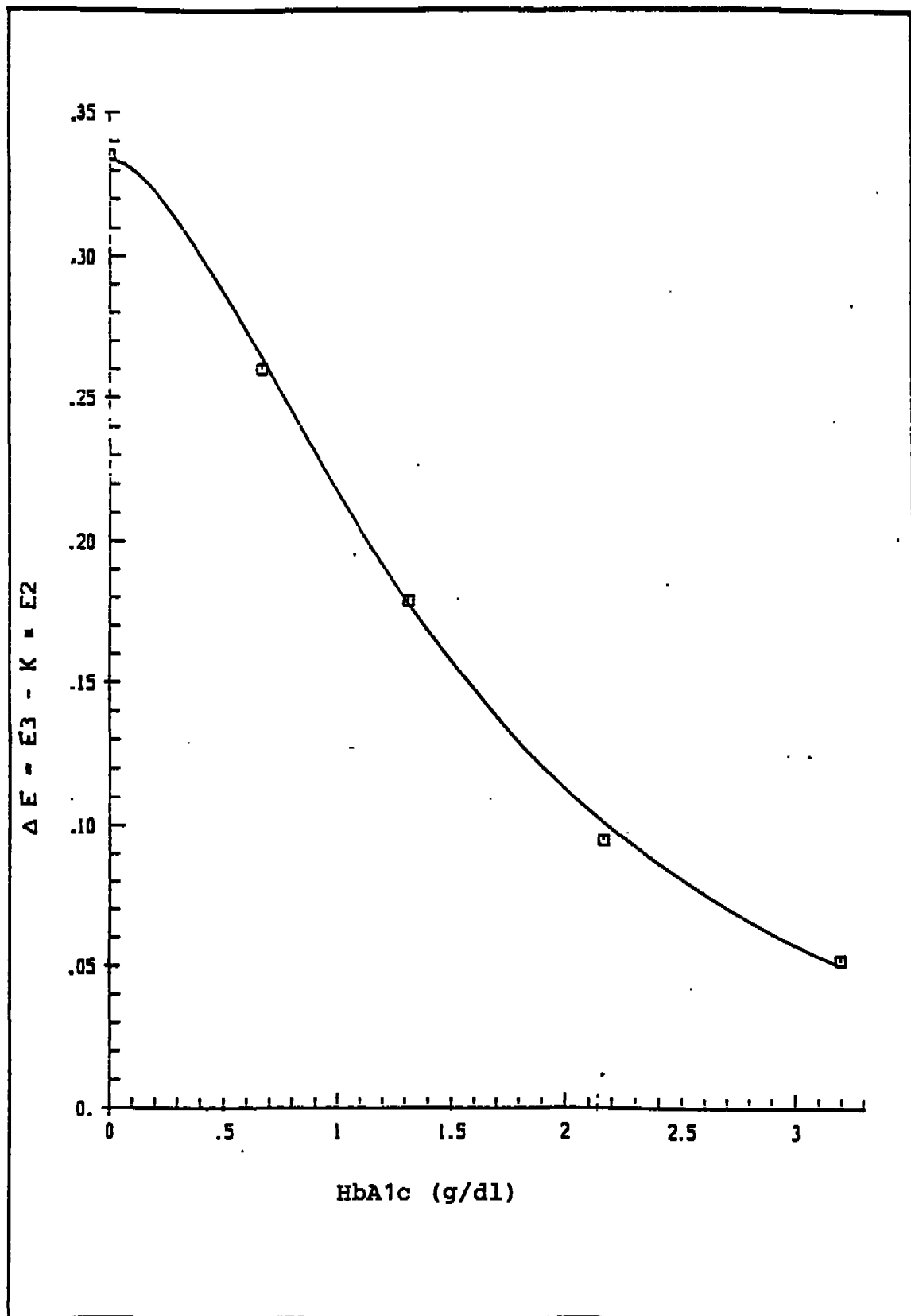
KUVIO 1

Kalibrointikäyrä: Kokonais-Hb-määritys



KUVIO 2

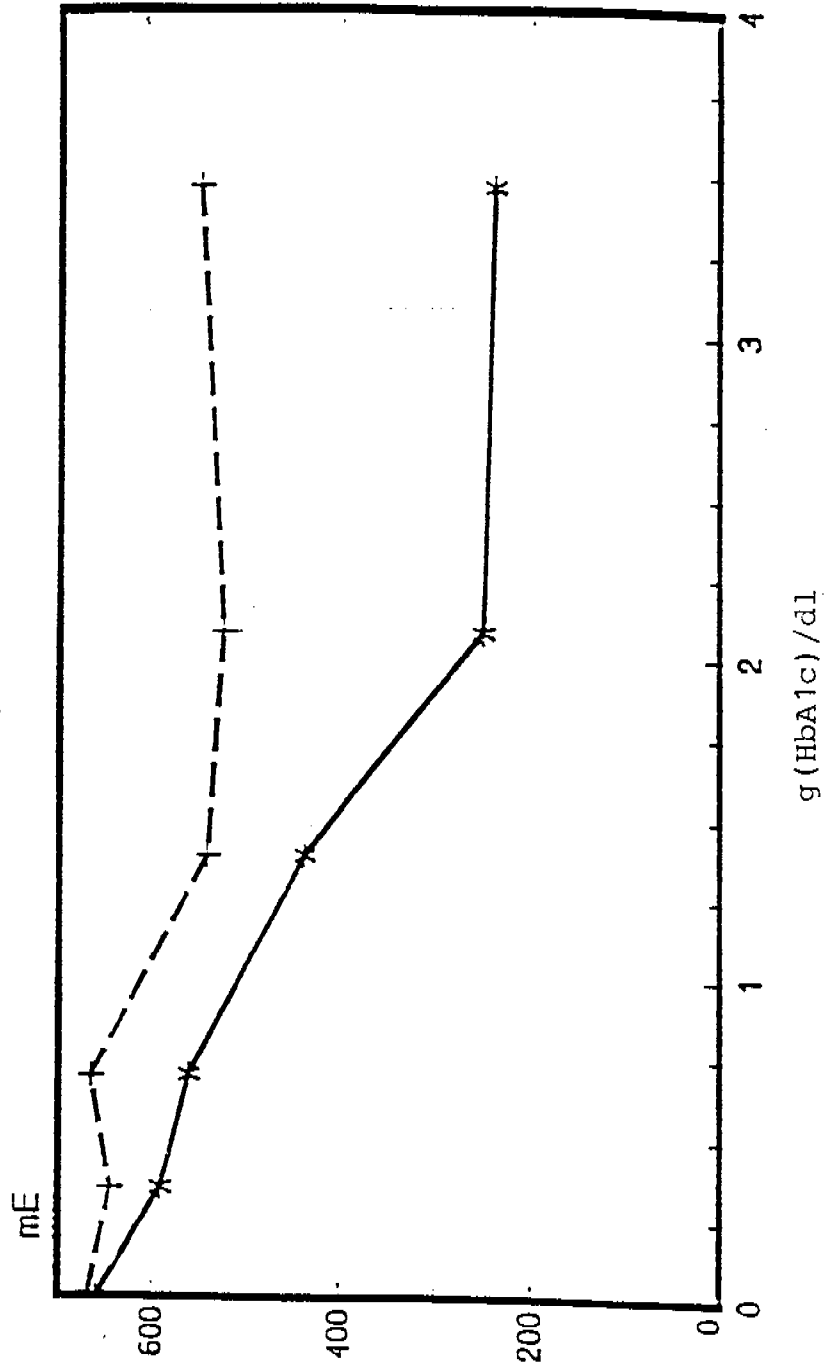
HbA1c-määrityksen kalibrointikäyrä



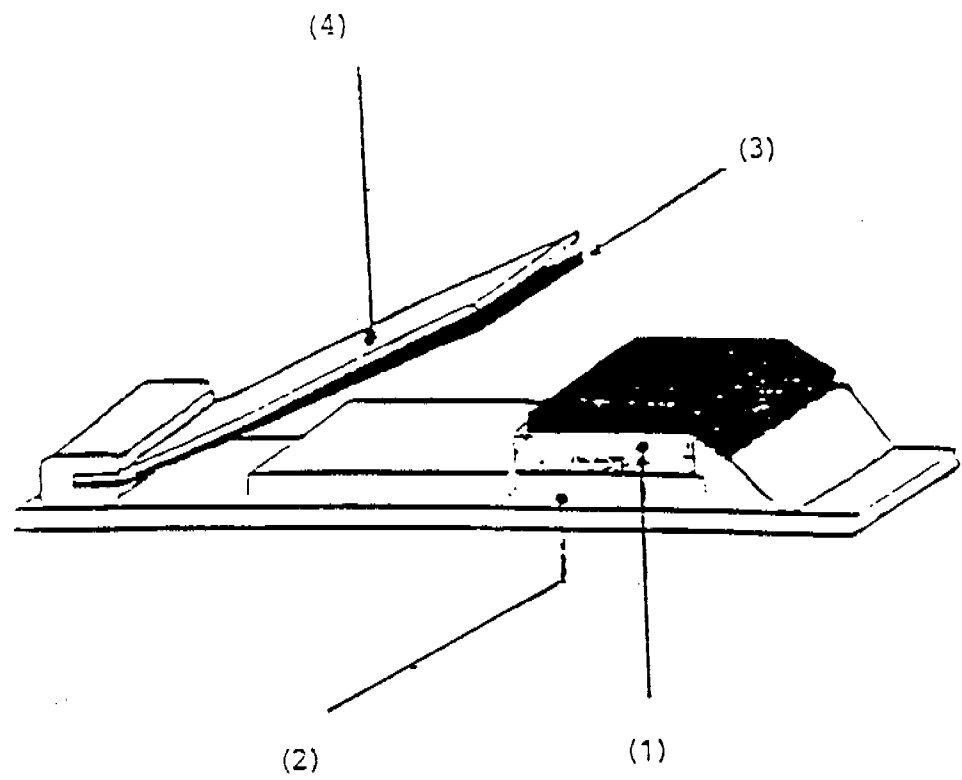
HbA1c:n IMMUNOLOGINEN MÄÄRITYS

Mittaus Hitach:lla

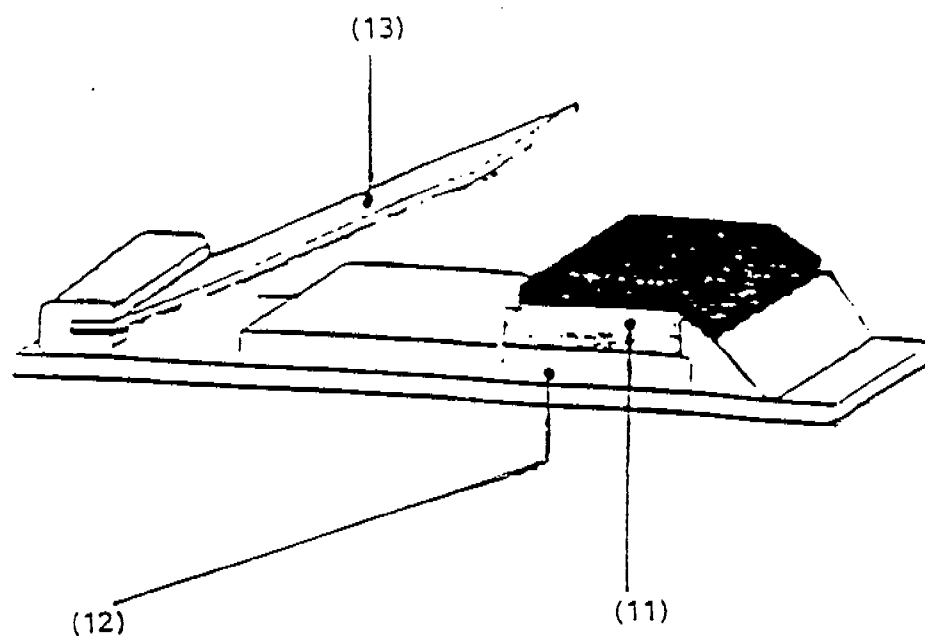
Testimääritys 1: R1: MAK Testimääritys 2: R1: PH
R2: PH R2: MAK



KUVIO 4

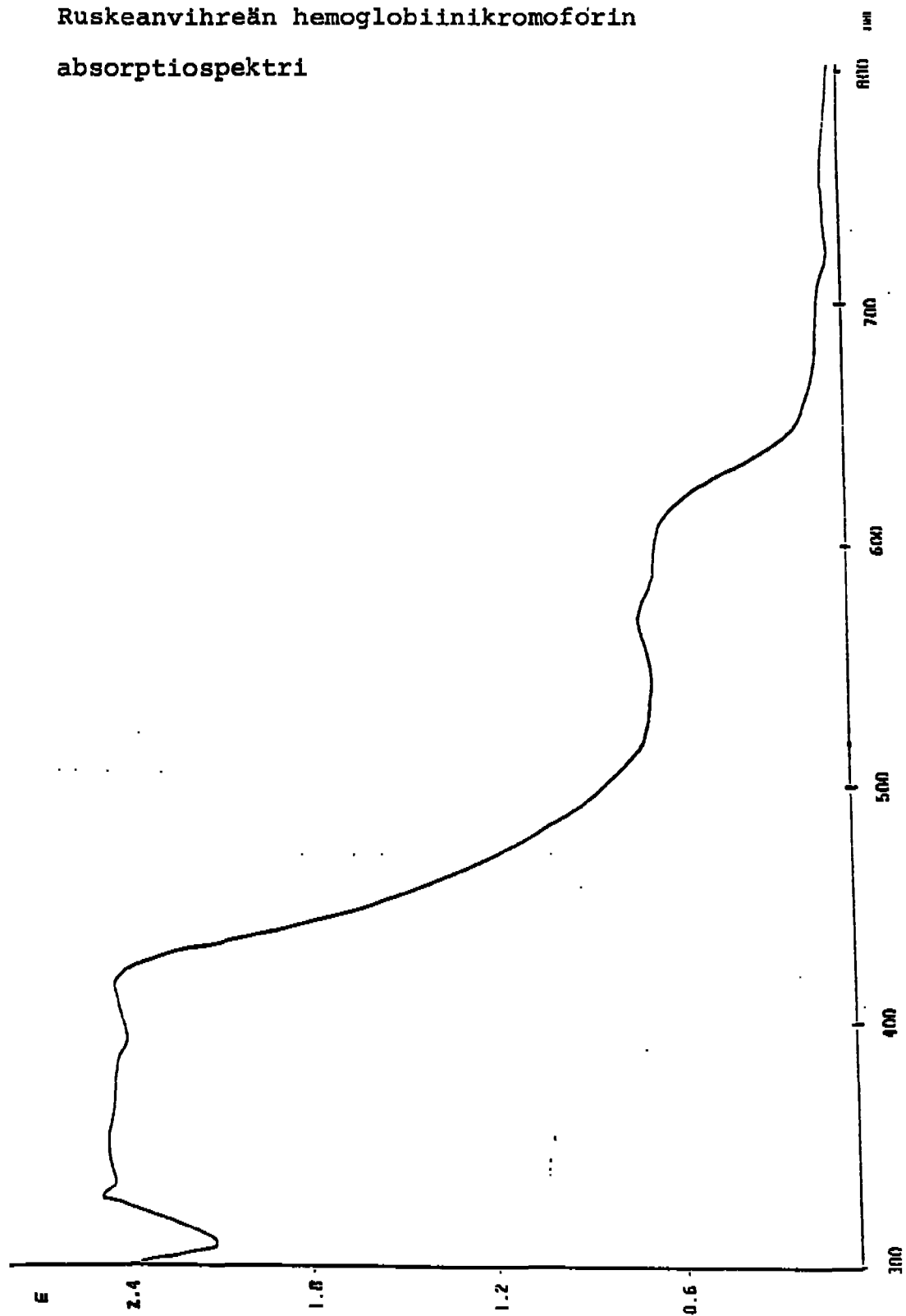


KUVIO 5



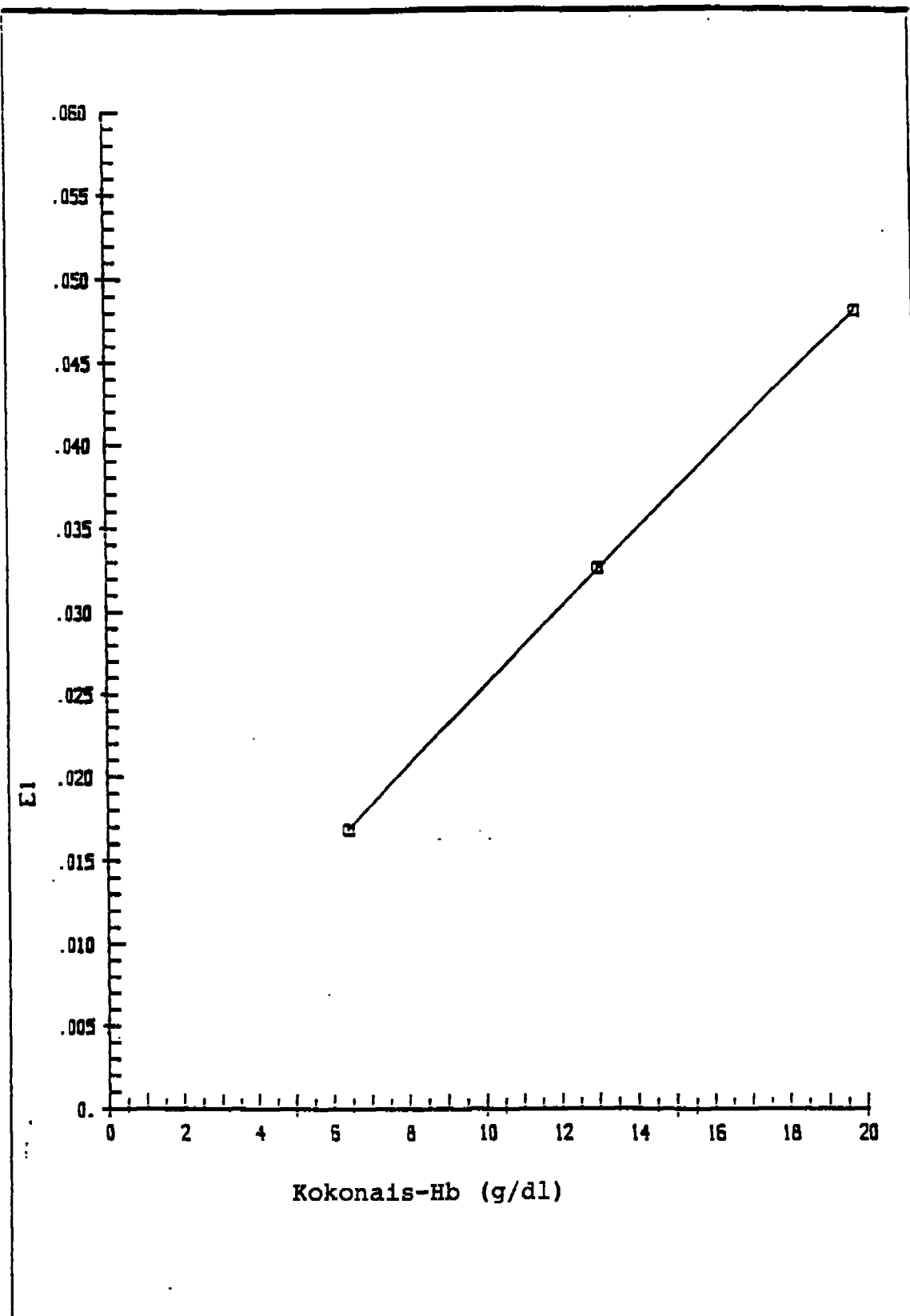
KUVIO 6

Ruskeanvihreän hemoglobiinikromoförin
absorptiospektri



KUVIO 7

Ruskeanvihreän hemoglobiinikromoforin
kokonais-Hb-kalibrointikäyrä



KUVIO 8

Ruskeanvihreän hemoglobiinigromoforin
HbA1c-kalibrointikäyrä

