



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 12 312 T2** 2004.02.12

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 928 421 B1**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/78**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 12 312.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/10545**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 922 490.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/055874**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **10.12.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.07.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **19.03.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.02.2004**

(30) Unionspriorität:

868528 04.06.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, ES, FR, IT

(73) Patentinhaber:

Dade Behring Inc., Deerfield, Ill., US

(72) Erfinder:

DIETZEN, Jerome, Dennis, Germantown, US

(74) Vertreter:

**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner et col.,
50667 Köln**

(54) Bezeichnung: **STANDARDLÖSUNG ZUR BESTIMMUNG DER THYROIDFUNKTION**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf Standardlösungen, die Protein, Puffer, Stabilisatoren und Analyten enthalten, welche auf spezielle Niveaus für die Eichung chemischer Analysegeräte eingestellt sind. Insbesondere bezieht sich diese Erfindung auf eine stabilisierte Standardlösung zur Eichung klinischer Assays, die für die Bewertung der Schilddrüsenfunktion geeignet sind, einschließlich Gesamtthyroxin, ungebundenem Thyroxin, Gesamttriiodthyronin, ungebundenem Triiodthyronin und Thyreotropin.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Die Schilddrüse ist eine endokrine Drüse, die sich innerhalb des Halses befindet und die Thyroxin (T4) und auch kleine Mengen Triiodthyronin (T3) durch Einbau von anorganischem Iodid in Tyrosinreste von Thyroglobulin synthetisiert. T4 ist das hauptsächlich zirkulierende Schilddrüsenhormon, aber seine Wirkungen werden erst nach intrazellulärer Umwandlung in T3 vermittelt. T4 und T3 zirkulieren im Blut vorwiegend gebunden (> 99%) an die Serumproteine thyroxinbindendes Globulin (TBG), thyroxinbindendes Prealbumin (TBPA) und Albumin. Einige physiologische Wirkungen von Schilddrüsenhormon sind die Stimulation des Stoffwechsels, der Herzfrequenz, der Proteinsynthese und des Kohlenhydratstoffwechsels in Zielgeweben. Das ungebundene (freie) Hormon ist vermutlich die physiologisch aktive Form, während die proteingebundene Fraktion als Reservoir für verfügbares Hormon dient. Dies kompliziert die Bestimmung des Schilddrüsenstatus, da Änderungen in den Mengen der bindenden Proteine zu einem erhöhten Gesamt-T4-Gehalt im Serum führen können, ohne die Menge des freien Hormons zu beeinflussen (z. B. während der Schwangerschaft).

[0003] Die Herstellung von T4 wird normalerweise durch einen Regelkreis reguliert, der den Hypothalamus und die Hypophyse einschließt. Als Reaktion auf einen Mangel an zirkulierendem T4 stimuliert der Hypothalamus die Schilddrüse zur Herstellung von TSH. TSH wiederum stimuliert die Herstellung von T4 durch die Schilddrüse. Wenn die Mengen des zirkulierenden T4 ausreichend sind, bestimmt der Hypothalamus, dass die TSH-Herstellung und somit die T4-Herstellung abnehmen. Eine Unterbrechung des Regelkreises in der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse führt zu unspezifischen Symptomen, die mit Hilfe von Labortests diagnostiziert und effektiv behandelt werden können. Primäre Schilddrüsenunterfunktion tritt infolge einer Zerstörung der Schilddrüse selbst auf und führt zu einer reduzierten Verfügbarkeit von T4 in den Geweben. Fehlende TSH-Herstellung durch die Hypophyse führt ebenfalls zu einer Schilddrüsenunterfunktion. Primäre Schilddrüsenüberfunktion (eine Überversor-

gung der Gewebe mit T4) tritt infolge einer übermäßigen Aktivität der Drüse auf. Eine Überproduktion von TSH führt ebenfalls zu einer Schilddrüsenüberfunktion. Diagnostische Tests helfen beim Nachweis einer Schilddrüsenkrankheit, bei der Bestimmung ihres Mechanismus und bei der Verfolgung ihrer Behandlung.

[0004] Aus der obigen Diskussion geht hervor, dass ein volles Verständnis der Schilddrüsenfunktion genaue Bewertungen der Mengen an T3, T4 und TSH erfordert. Bei der Ausführung von Immunoassayverfahren zur Bestimmung von Konzentrationen dieser Schilddrüsenanalyten besteht eine übliche Praxis darin, eine Familie von kontrollierten Zubereitungs-lösungen, im folgenden Standard- oder Eichlösungen genannt, zu verwenden, von denen jede genau vorbestimmte Mengen oder Konzentrationen an T4, freiem T4, T3, freiem T3 und TSH enthält. Im Allgemeinen werden Konzentrationen eingesetzt, die wesentlich niedriger bzw. höher sind als normal. Da die Immunoassayverfahren normalerweise zur Analyse von Serumproben gestaltet sind, werden die Eichlösungen vorzugsweise unter Verwendung einer Matrix zubereitet, die mit Serum identisch oder bioaktiv dazu äquivalent sind. Humanes Serum wird typischerweise als Ausgangsmaterial für Eichlösungen verwendet, doch ist bekannt, dass die zur Entfernung von endogenem Thyroxin verwendeten Techniken Verfahrensartefakte und große Schwankungen von Charge zu Charge verursachen, so dass es schwierig ist, diese Lösungen reproduzierbar herzustellen. Ein weiterer Nachteil von Eichlösungen, die humanes Serum enthalten, besteht darin, dass sie nicht längere Zeit gelagert werden können, da Serum viele labile Komponenten enthält, die die Stabilität des Produkts negativ beeinflussen. Aus diesem Grund werden Eichmaterialien häufig im trockenen Zustand (lyophilisiert) bereitgestellt, doch führt eine ungenaue Rehydratisierung dieser Materialien häufig zu ungenauen Eichmaßen.

[0005] Flüssige Eichlösungen vermeiden die Möglichkeit der ungenauen Rehydratisierung von lyophilisierten Eichmaterialien. Es ist also kommerziell vorteilhaft, flüssigstabile Materialien bereitzustellen, die keine Vorbereitung durch den Endverbraucher erfordern. Flüssige Eichlösungen müssen jedoch Stabilisatoren und Konservierungsstoffe enthalten, die so wirken, dass sie die Lebensdauer erhöhen und vor Kontaminanten schützen. Solche Reagentien sind in der Industrie bekannt. Es ist jedoch bekannt, dass die Anforderungen an den Zubereitungschemiker für die Herstellung einer Kombination von Matrix, Analyt und Konservierungsstoff, die mit dem Analysesystem kompatibel sind, die gewünschten Konzentrationen aller gewünschten Analyten enthalten können und gleichzeitig die Stabilität aufrechterhalten können, sehr restriktiv sind. Folglich können in der Praxis bis zu fünf verschiedene Eichlösungen erforderlich sein, um Eichvorschriften für T3, freies T3, T4, freies T4 und TSH zu ermöglichen. Dies verursacht uner-

wünschte Produktionskosten für den Hersteller sowie erhöhte Inventar- und Handhabungskosten für das klinische Labor.

[0006] Das US-Patent Nr. 5,342,788 offenbart eine serumfreie Standardlösung, die TBG, Albumin und Puffer enthält. Wenn T4 oder T3 zu dieser Lösung gegeben wird, bildet sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem Hormon, das demjenigen ähnelt, das man in Humanserum beobachtet. Die Stabilität der synthetischen Standardlösung war größer als bei einer Lösung auf der Basis von Humanserum, und weiterhin lieferte Rinder-TBG eine größere Stabilität als TBG, das aus Humanserum stammt.

[0007] EP 337 467 offenbart Standardlösungen, die thyroxinbindendes Globulin als thyroxinbindendes Protein sowie in einer Pufferlösung gelöstes Thyroxin oder Triiodthyronin zur Verwendung bei der Eichung von Assays zur Bestimmung von Thyroxin oder Triiodthyronin enthalten. Vorzugsweise enthalten die Standardlösungen Albumin als weiteres schilddrüsenhormonbindendes Protein, das die Stabilität der Lösungen verbessert. EP 337 457 stellt jedoch keine Standardlösung bereit, die sowohl Thyroxin als auch Triiodthyronin in einer einzigen Lösung enthält und die sowohl bei der Bestimmung von Thyroxin als auch von Triiodthyronin zur Eichung verwendet werden könnte.

[0008] In US 4,157,895 wird offenbart, dass Rinderserumalbumin Bestandteil einer Lösung sein kann, die die Zusammensetzung von humanem Blut simuliert und die in einem Immunoassay verwendet wird, der auf die Bestimmung von Thyroxin gerichtet ist. Es wurde auch gezeigt, dass Rinderserumalbumin ein geeigneter Bestandteil von Standards ist, die bei radioimmunologischen Verfahren verwendet werden, welche zur Bestimmung des Gesamtserumthyroxins dienen (I. Ilyes et al., *Izotopentechnik*, 5. 118–126 (1979)). Es ist weiterhin bekannt, dass Humanserumalbumin für die interne Standardisierung von Isotopenverdünnungs-Gaschromatographie-Massenspektrometrie als Verfahren zur Bestimmung von Thyroxin in Serum geeignet ist (L.M. Thienpont et al., *Biol. Mass Spectrom.*, S. 475–482 (1994)).

[0009] In US 4,225,576 wird ein Verfahren für die gleichzeitige Bestimmung von Triiodthyronin und Thyroxin in Serum oder Plasma offenbart, das aber auf der Markierung von Triiodthyronin und Thyroxin mit demselben Radioisotop beruht. Daher hat dieses Verfahren den Nachteil, dass Radioisotope eingesetzt werden. Ein Immunoassay für die gleichzeitige Bestimmung von Triiodthyronin und Thyroxin auf der Basis einer Markierung mit zwei getrennten Enzymen ist auch bekannt von C. Blake et al., *Clinical Chemistry*, 5. 1469–1473 (1982).

[0010] Ein noch verbleibender Mangel in der Industrie betrifft die Zugabe von mehreren die Schilddrüse betreffenden Analyten innerhalb einer einzigen flüssigen Eichlösung zur Verwendung bei der Bestimmung der Schilddrüsenfunktion, um die Flexibilität bei der Verwendung zu erhöhen sowie die Produktions- und

Inventaranforderungen zu reduzieren. Die Erfahrung hat jedoch gezeigt, dass man erwarten würde, dass die einfache Zugabe mehrerer Analyten plus verschiedener Antimikrobenmittel innerhalb einer einzigen Eichlösung die analytische Messung der anderen Analyten in einer Probe stört oder sogar die Stabilität eines anderen Analyten in der Lösung beeinträchtigt. Dementsprechend war es ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine einzige stabilisierte Eichlösung bereitzustellen, die bekannte Mengen an T3, T4, freiem T4, freiem T3 und TSH enthält, so dass die Vorteile einer Eichlösung mit mehreren Analyten über einen längeren Zeitraum hinweg realisiert werden können.

Kurzbeschreibung der Erfindung

[0011] Die vorliegende Erfindung beruht auf dem Ergebnis, dass ein physiologisches Gleichgewicht von gebundenen und freien Schilddrüsenhormonen in einer einzigen flüssigen Standard- oder Eichlösung, die nur Albumin in einem Bereich von 40 g/l bis 80 g/l als bindendes Protein enthält, ohne die erwartete Erfordernis der Mitverwendung von TBG gebildet werden kann. Folglich kann eine Eichlösung gleichzeitig mit spezifischen Mengen an Triiodthyronin (T3) in Kombination mit spezifischen Mengen an Thyroxin (T4) zubereitet werden, welche die Konzentrationen an freiem T3 bzw. freiem T4 bestimmen. In einer alternativen Ausführungsform dieser Erfindung wird auch gereinigtes TSH zu dieser Schilddrüsenhormon-Eichlösung gegeben, obwohl TSH nicht in einem solchen Gleichgewicht zwischen gebundener und freier Form zirkuliert, so dass eine Assay-Eichvorschrift für mehrere Analyten unter Verwendung der einzigen Eichlösung erreicht werden kann. Unerwarteterweise hat die Anwesenheit jedes der Analyten keine nachteilige Wirkung auf die Verwendbarkeit der Eichlösung bei der Messung der anderen Analyten oder auf die Stabilität der Lösung als Ganzes. Außerdem wird ein längerer Zeitraum der Verwendung oder Stabilität der Eichlösung erreicht, indem man eine Kombination von Antimikrobenmitteln mitverwendet, von denen gezeigt wurde, dass sie gegen Bakterien und Pilze aktiv sind, und die die Verwendbarkeit der Eichlösung nicht beeinträchtigen.

[0012] Kurzbeschreibung der Figuren

[0013] **Fig. 1** ist eine Eichkurve für einen heterogenen Sandwich-Immunoassay für TSH unter Verwendung einer Eichlösung gemäß dieser Erfindung.

[0014] **Fig. 2** vergleicht die Ergebnisse eines TSH-Assays unter Verwendung einer gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellten Eichlösung mit Ergebnissen, die unter Verwendung eines bekannten kommerziellen Systems erhalten wurden.

[0015] **Fig. 3** ist eine Eichkurve für einen kompetitiven Naptin-Immunoassay für freies T4 unter Verwendung einer Eichlösung gemäß dieser Erfindung.

[0016] **Fig. 4** vergleicht die Ergebnisse eines Assays für freies T4 unter Verwendung einer gemäß der

vorliegenden Erfindung hergestellten Eichlösung mit Ergebnissen, die unter Verwendung eines bekannten kommerziellen Systems erhalten wurden.

[0017] **Fig. 5** zeigt eine Eichkurve für einen Assay für freies Triiodthyronin unter Verwendung einer Eichlösung gemäß dieser Erfindung.

[0018] **Fig. 6** zeigt eine Eichkurve für einen Gesamttriiodthyronin-Assay unter Verwendung einer Eichlösung gemäß dieser Erfindung.

[0019] **Fig. 7** zeigt eine Eichkurve für einen Gesamt-L-Thyroxin-Assay unter Verwendung einer Eichlösung gemäß dieser Erfindung.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0020] Verschiedene Verfahren sind bekannt, um T4, T3, freies T4, freies T3 und TSH zu bestimmen. Verfahren auf der Basis von Immunoassays sind für einen klinischen Routineaufbau besonders gut geeignet, da es für die Durchführung dieser Verfahren automatisierte Plattformen gibt. Die Eichung dieser automatisierten Plattformen beinhaltet die Definition einer mathematischen Beziehung zwischen der Konzentration des interessierenden Analyten und dem erzeugten Nachweissignal. Diese Beziehungen sind bei Immunoassays gewöhnlich nicht linear, so dass ein System mehrere Standardlösungen erfordert, um die Signal-Analyt-Beziehung zu definieren.

[0021] In der vorliegenden Beschreibung und gemäß der Erfindung wird eine Standardlösung oder Eichlösung mit verlängerter Stabilität bereitgestellt, die gleichzeitig in Verfahren zur Bestimmung mehrerer die Schilddrüse betreffender Analyten verwendet werden kann und die in einfacher Weise aus leicht erhältlichen Ausgangsstoffen hergestellt werden kann. Die Eichlösung gemäß der vorliegenden Erfindung enthält nur Serumalbumin als Proteinkomponente. Das Protein dient als annehmbares Bindungsreservoir sowohl für T4 als auch für T3 und als annehmbares stabilisierendes Milieu für TSH. Vorzugsweise wird Albumin aus Rinderserum als Albumin verwendet, obwohl auch andere Albuminquellen annehmbar sind. Serumalbumin ist in einem Bereich zwischen 40 g/l und 80 g/l geeignet, was der physiologischen Proteinkonzentration des Serums entspricht. Ebenso wird NaCl zur Nachbildung der ionischen Umgebung in Serum in einem Bereich zwischen 100 und 200 mmol/l Lösung hinzugefügt. Die Menge des NaCl kann in Abhängigkeit von der Empfindlichkeit des analytischen Systems gegenüber der Ionenstärke variieren. Wenn das analytische System gegenüber der Ionenstärke unempfindlich ist, ist die Zugabe von NaCl möglicherweise nicht erforderlich. Ebenso können zur Verstärkung der Pufferkapazität der Eichlösung Puffer erforderlich sein, die den pH-Wert in einem Bereich zwischen 6,0 und 8,0 halten. Ein Beispiel für einen solchen Puffer ist HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]). Wenn das analytische System gegenüber dem pH-Wert unempfindlich ist, kann die Proteinkomponente der Ma-

trix die gesamte erforderliche Pufferkapazität liefern. [0022] Anschließend an die Zugabe von Protein, Salz und Puffer werden Mittel, die gegen kontaminierende Mikroben aktiv sind, in die Eichlösung aufgenommen, um eine gewünschte Menge der Stabilisierung zu erreichen. Diese Mittel können aus einer beliebigen Zahl von Verbindungen bestehen, die gegen Bakterien und Pilze effektiv sind, in dem analytischen System inert sind und unreaktiv gegenüber Komponenten der Matrix der Eichlösung und den darin enthaltenen spezifischen Analyten sind. In einer beispielhaften Ausführungsform wird Polymyxin B in einer Konzentration von 0,02 g/l zusammen mit Natriumpyrithion in einer Konzentration von 0,2 g/l hinzugefügt. Bei diesen Konzentrationen ist Polymyxin B hauptsächlich gegen Bakterien aktiv, und Natriumpyrithion ist in erster Linie gegen Pilze aktiv. Es ist auch nützlich, ein Breitband-Antimikrobenmittel hinzuzufügen, um die Wirkungen der anderen zu verstärken. Als Beispiel können 0,1 g/l Polyhexamethylenbiguanid hinzugefügt werden. Diese besondere Kombination von Mitteln hat sich als sehr effektiv erwiesen, um eine sterile Umgebung für die Eichlösung der vorliegenden Erfindung für einen längeren Zeitraum von sechs Monaten oder mehr, wie es im folgenden diskutiert wird, bereitzustellen.

[0023] Anschließend an die Herstellung der Grundmatrix werden die interessierenden spezifischen Analyten hinzugefügt. Thyroxin wird vorzugsweise in einem Bereich zwischen 0 und 500 µg/l hinzugefügt, ein Bereich, der die physiologisch relevanten Konzentrationen abdeckt, die man in Humanserum findet. Beispielhafte Lösungen werden mit einem Thyroxingehalt von 0, 17, 50, 100 und 400 µg/l (Mikrogramm pro Deziliter) hergestellt. In Gegenwart von 60 g/l Rinderserumalbumin geben diese Lösungen freie Thyroxinkonzentrationen von ungefähr 0, 7, 20, 40 bzw. 160 ng/l (Nanogramm pro Liter) vor. Messungen von freiem T4 sind in der diagnostischen Industrie schlecht standardisiert, so dass T4-Ergebnisse bei einer gegebenen T4-Konzentration in Abhängigkeit von den Analyseinstrumenten stark variieren können.

[0024] Triiodthyronin wird vorzugsweise in einem Bereich zwischen 0 und 12 µg/l Lösung verwendet, da diese Konzentrationen den physiologisch relevanten Bereich der Triiodthyronin-Konzentrationen, die man in Humanserum findet, abdecken. Beispielhafte Lösungen werden mit einem Triiodthyroningehalt von 0, 1,0, 2,0, 4,0 und 9,0 µg/l hergestellt. In Gegenwart von 60 g/l Rinderserumalbumin geben solche Lösungen einen Gehalt an freiem Triiodthyronin von ungefähr 0, 5, 11, 25 bzw. 45 ng/l vor. Ebenso sind Messungen von freiem T3 in der diagnostischen Industrie schlecht standardisiert, und derselbe Grad der Variation, den man in Analysen von freiem T4 beobachtet, kann auch bei Analysen von freiem T3 bei irgendeiner gegebenen T3-Konzentration in Abhängigkeit von den Analyseinstrumenten vorkommen.

[0025] Thyroxin und Triiodthyronin haben unabhän-

gig von der Spezies dieselbe Struktur, so dass die Quelle dieser Verbindungen variieren kann und auch synthetisches Material umfasst. TSH variiert jedoch je nach der Tierspezies. Für die Humandiagnose ist also TSH, das vom Menschen stammt oder aus der humanen Gensequenz synthetisiert wurde, erforderlich. TSH zirkuliert nicht in einem Gleichgewicht von gebundener und freier Form. Die zugegebene Menge wird normalerweise ohne die Zugabe von Mitteln, die Moleküle aus Bindungsproteinen freisetzen, vollständig zurückgewonnen. TSH wird zu einer beispielhaften Lösung in Mengen von 0, 1, 4, 20 und 55 mIE/l hinzugefügt (Bioaktivitätseinheiten, definiert durch Standardmaterial der World Health Organization). Die hinzugefügten Mengen aller Analyten werden durch die relevanten physiologischen Bereiche und die Anforderungen an die Definition einer Signalreaktion als Funktion der Konzentration für das spezielle analytische System diktiert.

[0026] Je nach den speziellen Bedürfnissen kann jede Kombination von Mengen von T4, freiem T4, T3, freiem T3 und TSH zubereitet werden. Die einzigen Einschränkungen sind die gegenseitige Abhängigkeit der Gesamthormonmengen und der Mengen an freiem Hormon. Diese können nicht unabhängig voneinander eingestellt werden.

[0027] Diese Erfindung wird besser durch Bezugnahme auf das folgende Beispiel verstanden, das hier zu Veranschaulichungszwecken mit aufgenommen wurde und nicht als einschränkend anzusehen ist. Zubereitungstechniken, wie das Handhaben, Abwiegen und Mischen von Flüssigkeiten, erfolgen unter Verwendung von Standardlaborgeräten (z. B. Pipetten, Waagen und Magnetrührer) und Techniken, die in der Industrie bekannt sind.

Eichlösung

1. Herstellung einer Matrix, die gegen mikrobielle Kontamination konserviert ist.

a) Salz/Puffer-Lösung: 135 g NaCl, 89,3 g HEPES und 97,5 g Na-HEPES werden in 15 l Wasser gelöst. Die zu lösenden Stoffe und das Lösungsmittel werden mit einem Magnetrührgerät gemischt, bis die zu lösenden Stoffe vollständig aufgelöst sind. 60 Minuten Mischen bei 25°C ist ausreichend. Dieses Puffergemisch bewirkt, dass der pH-Wert der Lösung innerhalb eines Bereichs von 7,0 bis 8,0, vorzugsweise auf 7,5, gehalten wird.

b) Zugabe von antimikrobiellen Mitteln: 3 g Natriumpyrithion, 0,3 g Polymyxin B und 1,5 g Polyhexamethylenbiguanid werden nacheinander zu der Salz/Puffer-Lösung gegeben und durch 60 Minuten Rühren bei 25°C aufgelöst.

c) Zugabe von Protein: Zu der konservierten Salz/Puffer-Lösung werden 900 g Rinderserumalbumin gegeben und durch 60 Minuten Mischen bei 25°C aufgelöst.

d) Nach der Auflösung des Albumins wird die Matrix durch Filtration durch ein Filter von 0,2 µm sterilisiert.

Diese Lösung wird im folgenden als "konservierte Matrix" bezeichnet.

2. Zugabe von Analyt zu der konservierten Matrix unter Bildung einer Multianalyten-Eichlösung auf 5 Niveaus.

a) Niveau 1 besteht nur aus konservierter Matrix und enthält keine der Analytsubstanzen.

b) Vier andere Lösungen, die als "Eichlösungen" bekannt sind (Niveaus 2–5) werden so zubereitet, dass sie Analyt in speziellen Konzentrationen von niedrigen Konzentrationen (Niveau 2) bis zu hohen Konzentrationen (Niveau 5) enthalten.

c) Eine T4-Stammlösung von 50 mg/l wird durch Auflösen von T4-Natriumsalz in 0,05 N NaOH hergestellt. Die Stammkonzentration wird unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten von T4 bei 325 nm bestätigt. Verdünnungen dieser Stammlösung auf 5 mg/l und 15 mg/l werden in einer Rinderalbuminlösung von 0,2 g/l hergestellt und als "Arbeitsverdünnungen" bezeichnet. Diese Arbeitsverdünnungen werden so hergestellt, dass sie eine genaue Abgabe bis zu einem speziellen Niveau der Eichlösung erlauben und werden mit dem 100- bis 200fachen der gewünschten Endkonzentration zubereitet, um große Verdünnungen der Eichlösung bei ihrer Zugabe zu vermeiden. Die Arbeitsverdünnungen werden zu angegebenen Mengen der konservierten Matrix gegeben, so dass man bei den Niveaus 4 und 5 Endkonzentrationen von 100 bzw. 400 µg/l T4 erreicht. Die Niveaus 2 und 3 werden durch Verdünnung von Niveau 4 mit geeigneten Mengen der konservierten Matrix hergestellt, so dass man Konzentrationen von 17 µg/l bzw. 50 µg/l erhält. Die Niveaus 2–5 werden 60 Minuten lang bei 25°C gemischt. Diese Mengen an T4 bilden in der Matrix ein Gleichgewicht zwischen dem gebundenen und dem ungebundenen Zustand, was zu vorhersagbaren Konzentrationen von ungebundenem (freiem) T4 von ungefähr 7, 20, 40 bzw. 160 ng/l in den Niveaus 2, 3, 4 bzw. 5 führt.

d) Eine Stammlösung von gereinigtem Human-TSH wird hergestellt, indem man lyophilisiertes TSH in kalter (2–8°C) Kochsalzlösung von 9 g/l auflöst. Arbeitsverdünnungen, die 100, 400, 2000 bzw. 4400 mIE/l TSH enthalten, werden in der konservierten Matrix hergestellt. Die Niveaus 2, 3, 4 und 5 werden so zubereitet, dass sie 1,0, 4,0, 20,0 bzw. 55,0 mIE/l TSH enthalten, wobei man die geeignete Arbeitsverdünnung verwendet. Die Niveaus 2–5, die jetzt T4 und TSH enthalten, werden 60 Minuten lang bei 25°C gründlich gemischt.

e) Ebenso wird eine Stammlösung von 50 mg/l T3 (Natriumsalz) in 0,05 N NaOH hergestellt, und ihre Konzentration wird unter Verwendung des bekannten Extinktionskoeffizienten von T3 bei 325 nm bestätigt. Arbeitsverdünnungen werden in einer Rinderalbuminlösung von 2 g/l, die 200, 400, 800, 1800 µg/l T3 enthält, hergestellt und verwendet, um die Niveaus 2, 3, 4 und 5 zuzubereiten, die 1,0, 2,0, 4,0 bzw. 9,0 µg/l enthalten. Die Niveaus 2–5, die jetzt Thyroxin, TSH

und T3 enthalten, werden 60 Minuten lang bei 25°C gemischt. Diese Mengen an T3 bilden in der Matrix ein Gleichgewicht, was Konzentrationen von ungebundenem (freiem) T3 von ungefähr 0, 5, 11, 25 bzw. 45 ng/l in den Niveaus 2, 3, 4 bzw. 5 ergibt.

g) Keine Änderung in den Analytkonzentrationen (TSH, Gesamt-T4, freies T4, Gesamt-T3 und freies T3) werden über einen Zeitraum von bis zu 5 Tagen nach dem Zubereitungsstadium beobachtet. Die Mischzeiten werden so gestaltet, dass ein homogenes Produkt gewährleistet ist. Längere oder kürzere Mischzeiten und viele Arten des Mischens sind zulässig.

[0028] Große Glycoprotein hormone wie TSH werden gewöhnlich durch die zweiseitige "Sandwich"-Immunoassaytechnik gemessen. **Fig. 1** zeigt eine Eichkurve für einen heterogenen Sandwich-Immunoassay für TSH unter Verwendung der Eichlösung gemäß dieser Erfindung auf einem Dimension® RxL Clinical Chemistry System, das von Dade International Inc. (Newark, DE) erhältlich ist. **Fig. 2** zeigt die Genauigkeit der Eichlösung in **Fig. 1**. Aliquote aus 86 Patientenserum wurden auf dem Dimension® RxL Clinical Chemistry System, das mit einer Standardlösung gemäß dieser Erfindung geeicht war, gemessen und mit einem kommerziellen AxSYM®-Analysesystem verglichen, das mit Material und nach Anweisungen geeicht wurde, die von seinem Hersteller, den Abbott Laboratories (Abbott Park, IL), zur Verfügung gestellt wurden. Die Daten zeigen eine Übereinstimmung zwischen den beiden Systemen.

[0029] Moleküle geringerer Größe und Konzentration, wie freies T4, Gesamt-T3 und freies T3, werden häufig durch kompetitive Hapten-Immunoassays bestimmt, und das Signal, das aus einem solchen Assay resultiert, ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Moleküls. **Fig. 3** zeigt Eichkurven für einen kompetitiven Hapten-Immunoassay für freies T4 unter Verwendung derselben Eichlösung von **Fig. 1** gemäß dieser Erfindung, wobei ebenfalls das Dimension® RxL Clinical Chemistry System verwendet wurde. **Fig. 4** zeigt die Genauigkeit der Eichlösung in **Fig. 2**. Aliquote aus 138 Patientenserum wurden auf dem Dimension® RxL Clinical Chemistry System, das mit einer Standardlösung gemäß dieser Erfindung geeicht war, gemessen und mit einem kommerziellen IMx®-Analysesystem verglichen, das mit Material und nach Anweisungen geeicht wurde, die von seinem Hersteller, den Abbott Laboratories, zur Verfügung gestellt wurden. Die Daten zeigen eine Übereinstimmung zwischen den beiden Systemen.

[0030] Assays für freies T3 werden in ähnlicher Weise durchgeführt. **Fig. 5** zeigt eine Eichkurve für freies T3, die unter Verwendung einer Standardlösung, die gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde, auf einem kommerziellen IMx®-System angefertigt wurde. Ein Assay für Gesamt-T3 kann ähnlich wie Assays für das freie Hormon unter Verwendung eines Mittels, das T3 aus Proteinbindungsstellen freisetzt,

durchgeführt werden. **Fig. 6** zeigt eine Eichkurve für Gesamt-T3 unter Verwendung eines kompetitiven Hapten-Immunoassays auf dem kommerziellen IMx®-Analysesystem.

[0031] Im Unterschied zu TSH, freiem T4, freiem T3 und Gesamt-T3 sind die Konzentrationen an Gesamt-T4 in Humanserum groß genug, um durch Immunoassaytechniken bestimmt zu werden, die keinen Schritt zum Konzentrieren des interessierenden Moleküls erfordern. Ein Beispiel für eine Gesamt-T4-Eichkurve auf dem kommerziellen Dimension®-Analysesystem, die unter Verwendung einer Eichlösung gemäß der vorliegenden Erfindung hergestellt wurde, ist in **Fig. 7** gezeigt.

[0032] Wie in der Tabelle unten gezeigt ist, hat sich bei allen obigen Eichlösungen gezeigt, dass sie sechs Monate oder länger stabil sind, wenn sie bei 2–8°C aufbewahrt werden. Eine Änderung des Analytenwerts von 5% oder mehr gilt normalerweise als unannehmbar für die kommerzielle Anwendung der Eichlösungen. Die Stabilität der Analyten in der Eichlösung wurde durch Messung dieser Analyten mit verschiedenen kommerziellen Analysesystemen bestimmt. Proben der Eichsubstanz, die bei 2–8°C aufbewahrt wurden, wurden parallel mit Proben gemessen, die durch Einfrieren bei -70°C stabilisiert wurden. Die Ausbeute des Materials ist gezeigt als die bestimmte Menge des spezifischen Analyten in dem bei 2–8°C gelagerten Material, dividiert durch die bestimmte Menge des spezifischen Analyten in dem gefrorenen Material, als Prozentwert ausgedrückt. Für alle Niveaus und Analyten wird bei 2–8°C praktisch keine Änderung in der Analytenkonzentration festgestellt.

Tabelle

Analyt	% des Analyten, zurückgewonnen nach 6 Monaten Lagerung bei 2–8°C im Vergleich zu einer Lagerung bei -20°C
Gesamtthyroxin	99,5%
freies Thyroxin	100,8%
Gesamttriiodthyronin	100,4%
freies Triiodthyronin	100,4%
Thyreotropin	99,8%

Patentansprüche

1. Standardlösung, die für die Bestimmung der Schilddrüsenfunktion geeignet ist und Serumalbumin in einem Bereich von 40 g/l bis 80 g/l in Kombination mit bekannten Mengen Gesamtthyroxin, ungebundenem (freiem) Thyroxin, Gesamttriiodthyronin und ungebundenem (freiem) Triiodthyronin umfasst.

2. Lösung gemäß Anspruch 1, wobei die bekannte Menge des Thyroxins bis zu 500 µg/l beträgt.

3. Lösung gemäß Anspruch 1, wobei die bekannte Menge des ungebundenen (freien) Thyroxins bis zu 160 ng/l beträgt.

4. Lösung gemäß Anspruch 1, wobei die bekannte Menge des Triiodthyronins bis zu 10 µg/l beträgt.

5. Lösung gemäß Anspruch 1, wobei die bekannte Menge des ungebundenen (freien) Triiodthyronins bis zu 50 ng/l beträgt.

6. Lösung gemäß Anspruch 1, die weiterhin eine bekannte Menge Thyreotropin umfasst.

7. Lösung gemäß Anspruch 6, wobei die bekannte Menge des Thyreotropins bis zu 100 mIE/l beträgt.

8. Lösung gemäß Anspruch 1, wobei die Standardlösung ausreichend Puffer enthält, um den pH-Wert im Bereich zwischen 6 und 8 zu halten.

9. Lösung gemäß Anspruch 1, wobei die Standardlösung Puffer im Bereich zwischen 0 und 200 mmol/l enthält.

10. Lösung gemäß Anspruch 1, wobei die Standardlösung NaCl im Bereich zwischen 0 und 200 mmol/l enthält.

11. Lösung gemäß Anspruch 1, die weiterhin eine Kombination von antimikrobiellen Mitteln umfasst, die eine Stabilisierung der Standardlösung bewirken.

12. Lösung gemäß Anspruch 11, wobei es sich bei den antimikrobiellen Mitteln um Na-Pyrithion, Polymyxin B und Polyhexamethylenbiguanid handelt.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG 1

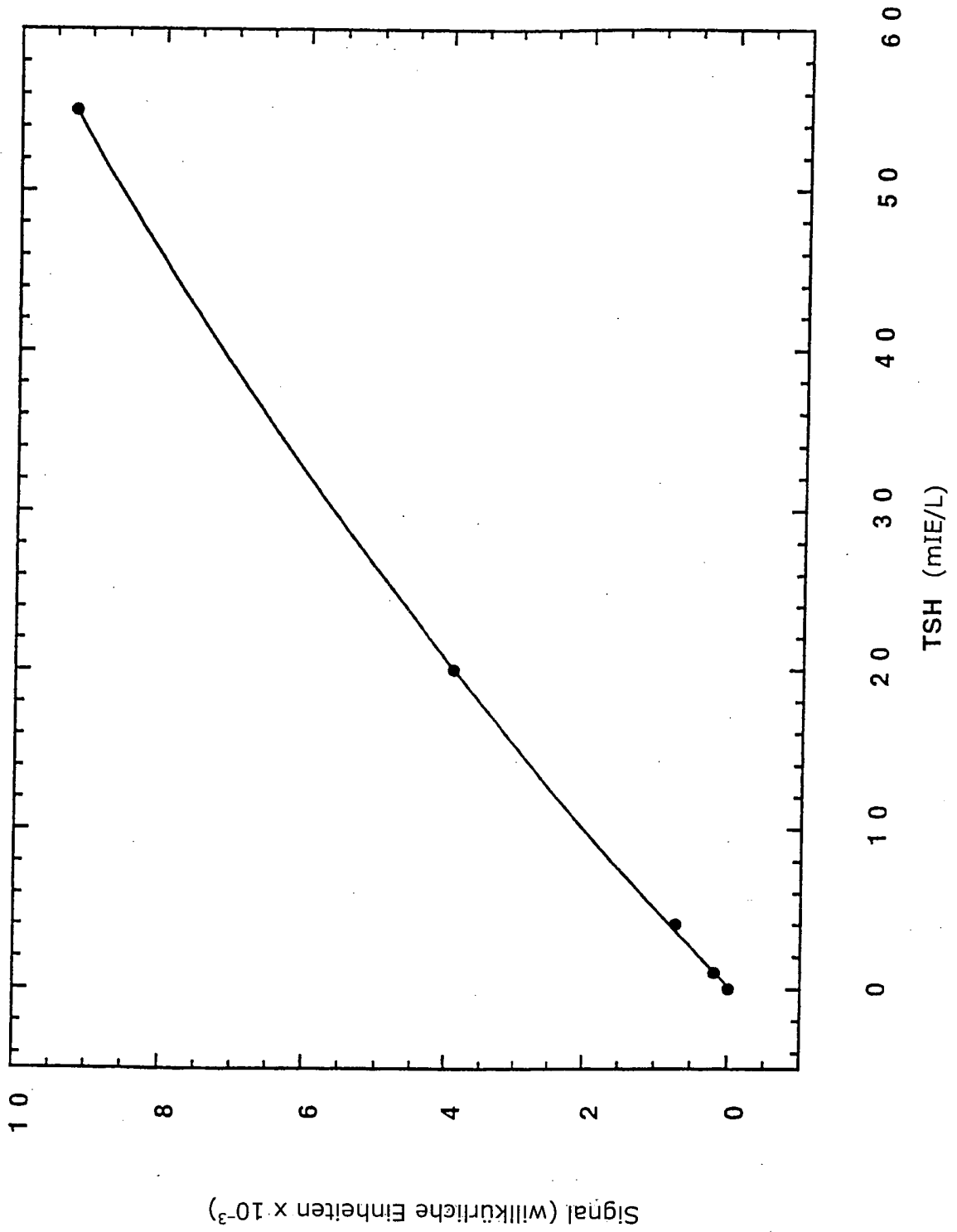


FIG 2

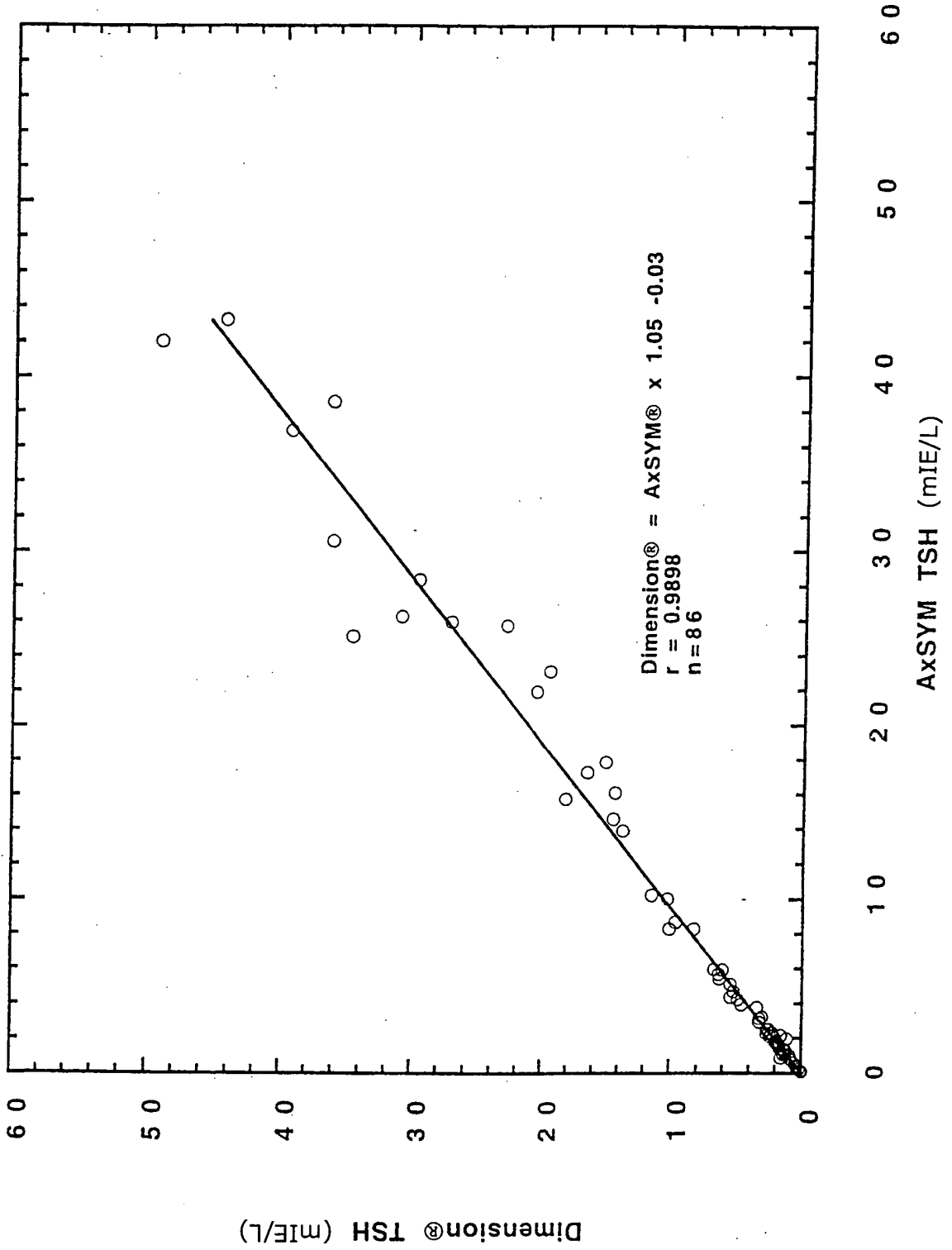


FIG 3

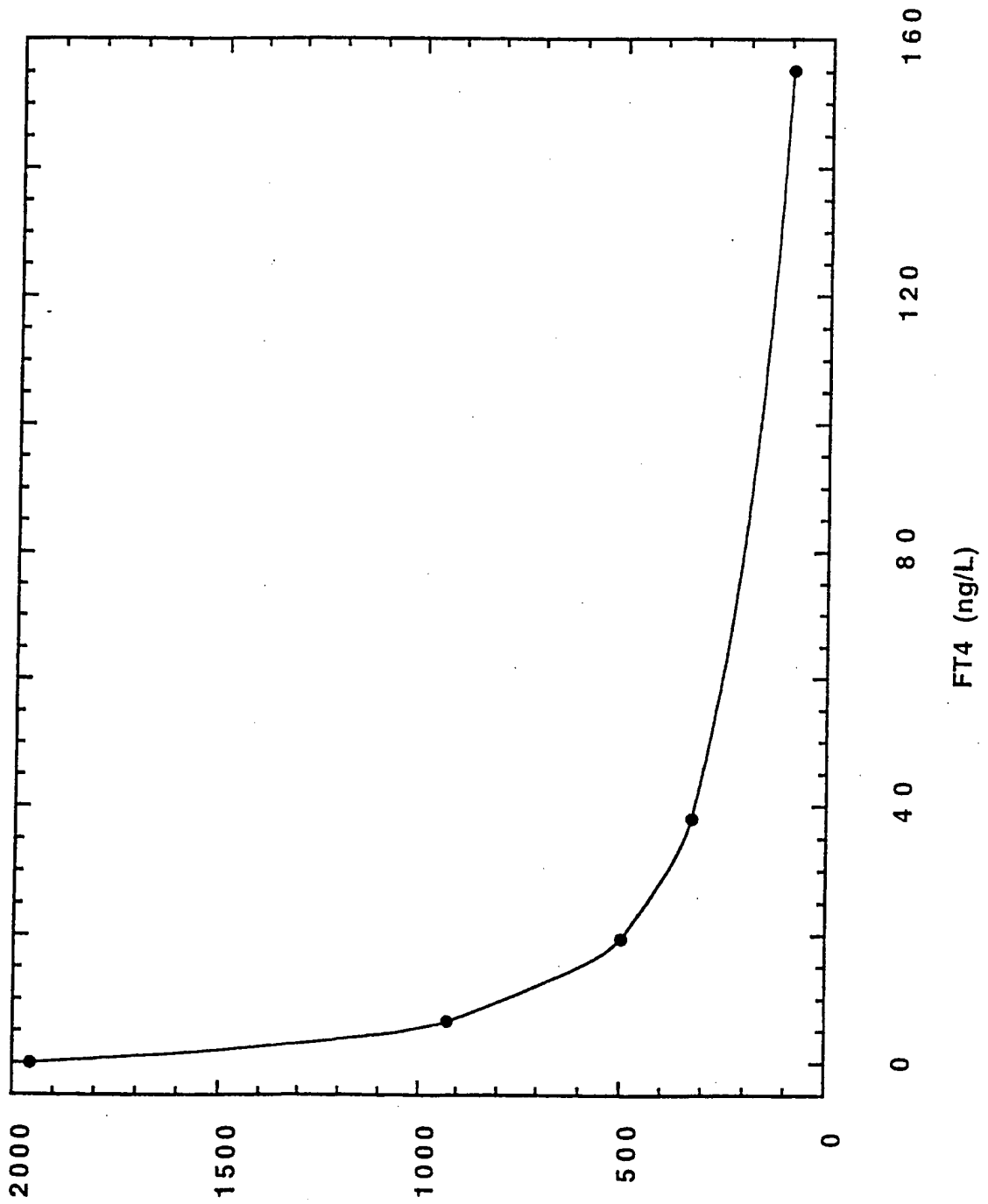


FIG 4

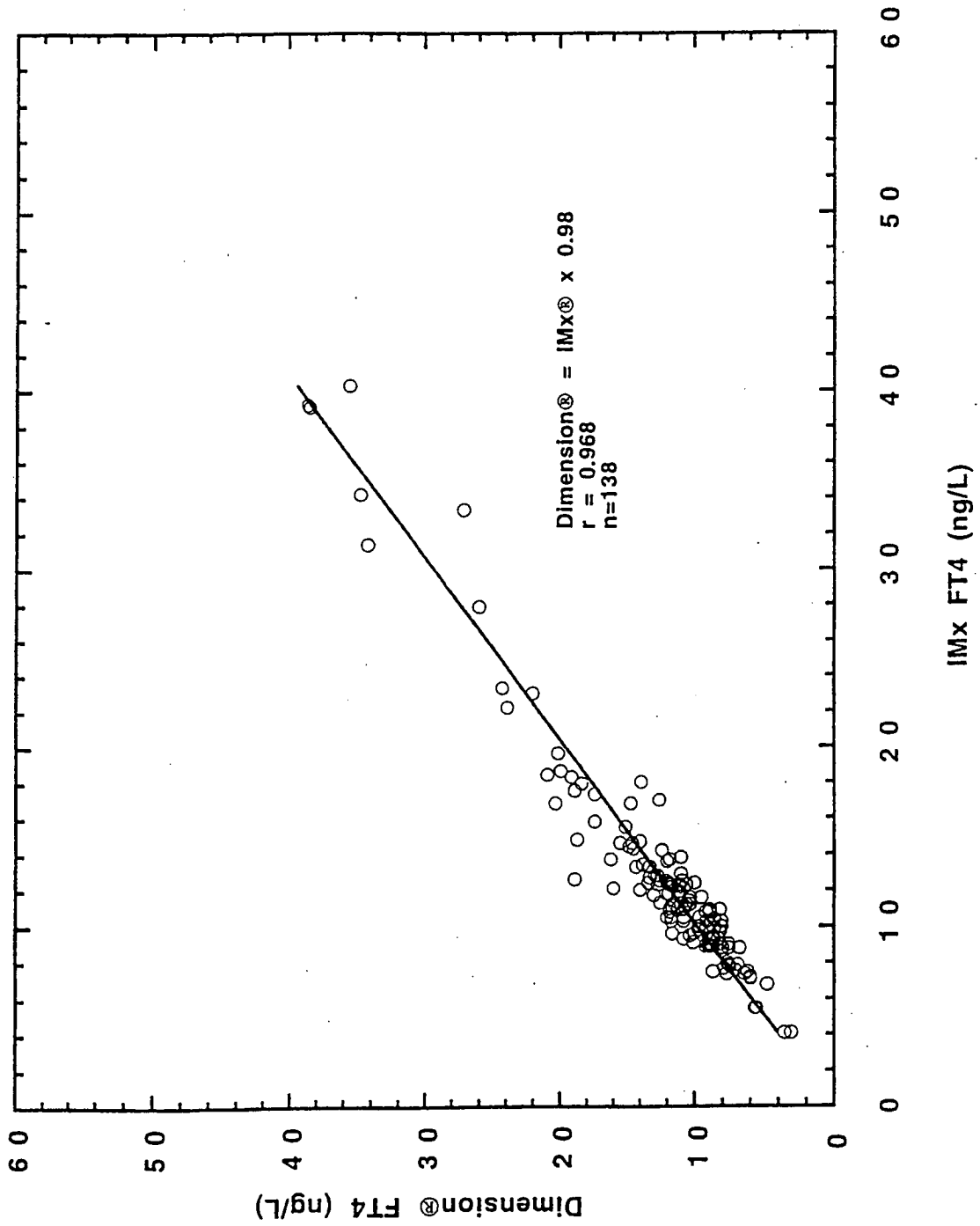


FIG 5

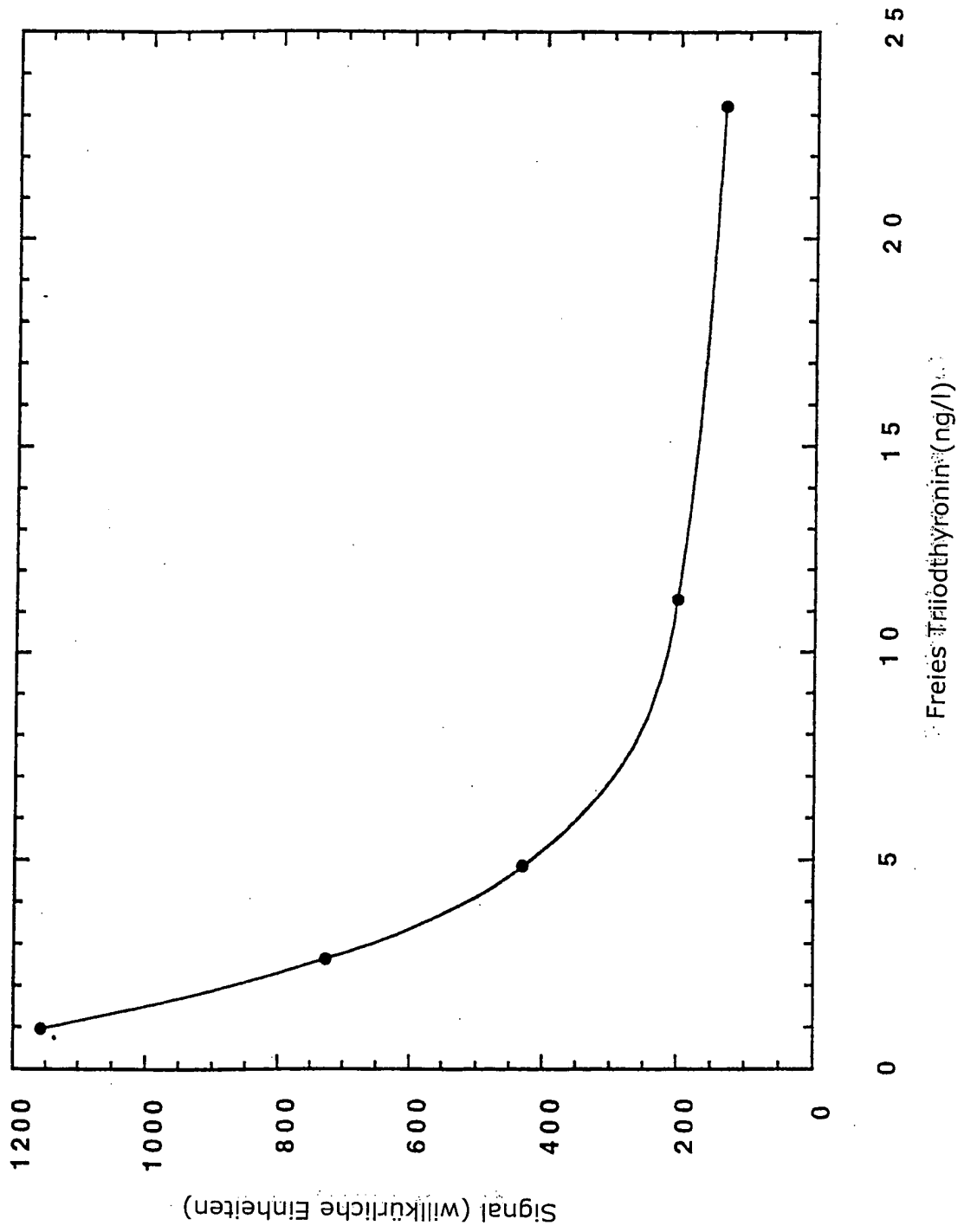


FIG 6

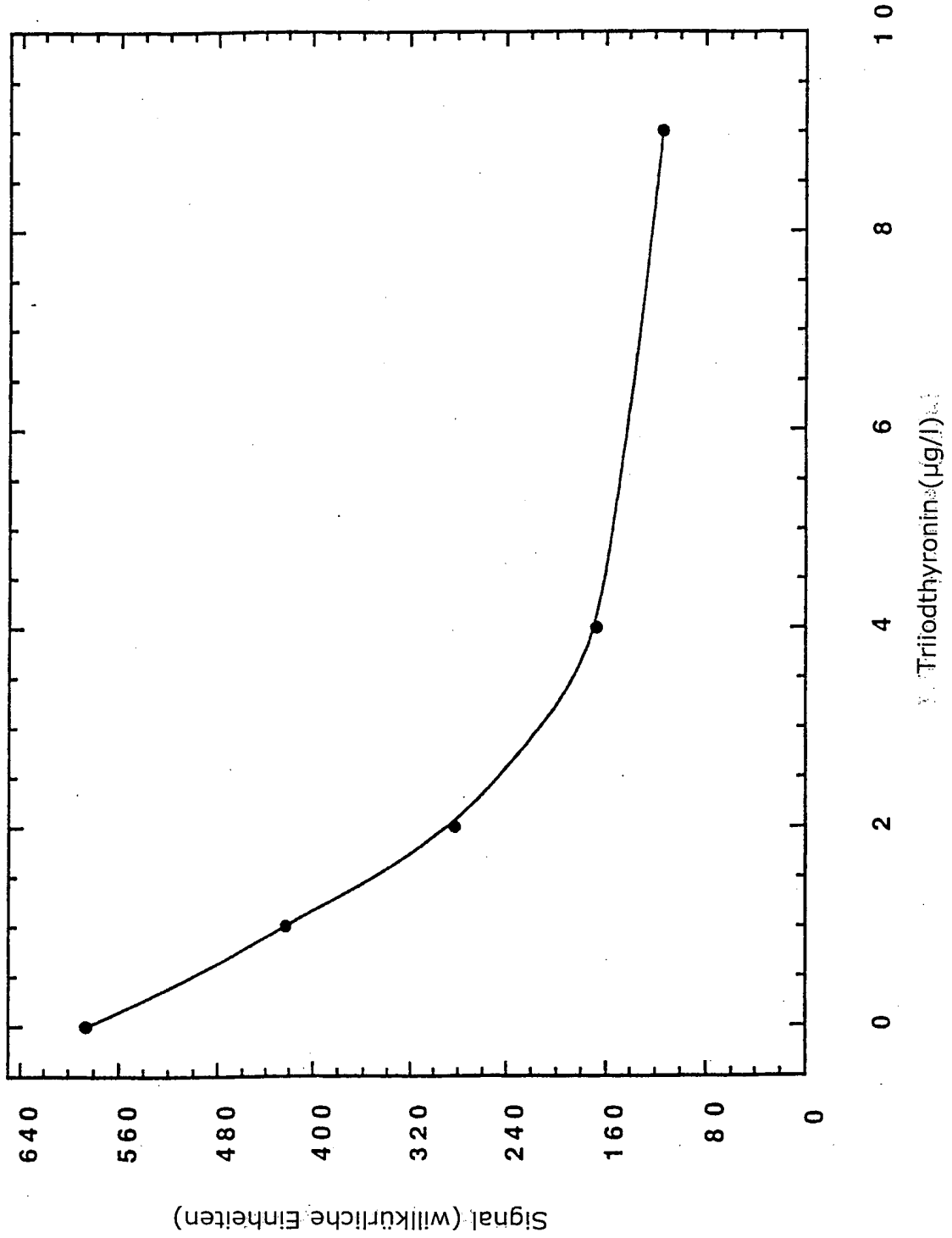


FIG 7

