



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 693 32 764 T2 2004.02.05**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 681 697 B1**

(51) Int Cl.7: **G01N 33/96**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **693 32 764.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US93/11823**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 904 820.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/014058**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.12.1993**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **23.06.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.11.1995**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **12.03.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.02.2004**

(30) Unionspriorität:

990433 15.12.1992 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

ROCHE Diagnostics Corp., Indianapolis, Ind., US

(72) Erfinder:

RAPKIN, Myron, Indianapolis, US; TABB, David, Greenfield, US; DIEBOLD, Eric, Indianapolis, US

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **HYDROXYLAMIN ENTHALTENDES KONTROLLREAGENZ**

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] Die Erfindung betrifft Kontrollreagenzien. Insbesondere betrifft sie Kontrollreagenzien, die derart formuliert sind, dass die Stabilität der darin enthaltenen Analyten verbessert wird, ohne die Nützlichkeit der Zusammensetzung zu beeinträchtigen.

Hintergrund und Stand der Technik

[0002] Die Arbeit in der klinischen Analytik erfordert, dass die untersuchende Person eine vorgegebene Probe dahingehend auswertet, ob ein bestimmter zu untersuchender Analyt vorliegt und, falls ja, in welcher Menge. Derartige Information ist extrem wertvoll für die Diagnose und Behandlung von Patienten. Die oben erwähnten Analysen werden immer häufiger mit Hilfe automatisierter Verfahren durchgeführt. Diese Verfahren sind verschiedenartig, dabei wird jedoch allgemein eine Probe hergestellt, die dann in einen automatisierten Analyseapparat eingeführt wird. Der Analyseapparat ist so aufgebaut, dass er verschiedene Reaktionen, die dazu ausgelegt sind, den oder die zu untersuchenden Analyten zu messen und einen bestimmten Wert oder ein bestimmtes „Signal“, der oder das mit diesen Reaktionen assoziiert ist, zu bestimmen. Hoch entwickelte automatisierte Systeme wandeln diese Messung in einen Wert um, der das Vorliegen oder die Konzentration des Analyten angibt, wodurch die untersuchende Person eine genaue Bestimmung des bestimmten zu untersuchenden Analyten erhält.

[0003] Die oben beschriebenen analytischen Systeme erfordern genauso wie jedes zu klinischen Zwecken eingesetzte Analysesystem die Verwendung einer Kontrolle. Solche Kontrollen erlauben es der untersuchenden Person, die Genauigkeit des verwendeten Systems zu überprüfen. Bei der klinischen Diagnose, wo einige Analyten nur in verschwindend kleinen Mengen vorliegen und wo winzige Veränderungen des Spiegels für einen Unterschied zwischen einem normalen und einem pathologischen Zustand stehen, wird ein zufriedenstellendes Kontrollreagens zum wesentlichen und entscheidenden Teil des analytischen Systems.

[0004] Kontrollreagenzien sollten dem Probenotyp, für den sie als Kontrolle dienen, so ähnlich wie möglich sein. Biologische Flüssigkeiten wie Blut und Serum sind beispielsweise komplexe Zusammensetzungen, es gibt jedoch viele Beispiele für Formulierungen, die so ausgelegt sind, dass sie biologischen Flüssigkeiten so nah wie möglich kommen und als Kontrollen dafür dienen. Ein flüchtiger Auszug aus der Patentliteratur aus diesem Gebiet umfasst beispielsweise die US-Patente Nr. 4,678,754 (Hoskins); 4,643,976 (Hoskins); 4,529,704 (Tremner et al.); 4,438,702 (Engler et al.); 4,405,718 (Rapkin et al.); 4,372,874 (Modrovich); 4,301,028 (Barth et al.);

4,276,376 (Hundt et al.); 4,260,579 (Barton et al.); 4,230,601 (Hell); 4,199,471 (Louderback et al.); 4,193,7666 (Dounora et al.); 4,127,502 (Li Mutti et al.); 4,126,575 (Louderback); 4,123,384 (Hundt et al.); 4,121,905 (Maurukas); 4,054,488 (Marbach); 4,078,892 (Steinbrink, Jr); 3,973,913 (Louderback); 3,920,580 (Mast); 3,920,400 (Scheibe et al.); 3,859,047 (Klein); 3,466,249 (Anderson); 3,852,415 (Vandervoorde); 3,274,062 (Lou); 3,260,648 (Fox) und die WO92/07088. Die in diesen Patenten verfolgten Ansätze sind unterschiedlich. Viele davon lehren Kontrollreagenzien, die zur Bestimmung eines oder einer Familie weniger verwandter Analyten geeignet sind. Andere sind allgemeiner und beziehen sich allgemein auf Verbesserungen in dem Gebiet. Die vorliegende Erfindung gehört zu der letzteren Gruppe.

[0005] Wie oben erwähnt, wurden Vorstöße auf dem Gebiet gemacht, um Kontrollreagenzien zu formulieren, die dem Materialtyp, für den sie als Kontrollen dienen sollen, so nah wie möglich sind. Folglich basieren Kontrollreagenzien häufig auf Blut, Plasma oder Serum, sei es vom Menschen oder vom Säugetier (z. B. vom Rind).

[0006] Kontrollreagenzien von dem oben beschriebenen Typ haben bestimmte Nachteile, die jedem Material, das auf einem natürlichen Produkt beruht, innewohnen. Aus diesem und weiteren Gründen wurden auf dem Gebiet auch serumfreie Kontrollreagenzien berücksichtigt und verwendet. Allgemein müssen diese auf Wasser basierenden Kontrollreagenzien wesentlich modifiziert werden, so dass sie einer biologischen Probe so nah wie möglich kommen. Ein Beispiel einer solchen Modifikation ist das Einfügen eines polymeren Viskositätsmittels, um die rheologischen Eigenschaften des Reagens so nah wie möglich an die biologische Probe anzupassen.

[0007] Ein Hauptproblem bei allen Kontrollreagenzien ist die Neigung des gesuchten Analyten in situ chemisch zu reagieren, wobei falsche Ergebnisse entstehen, wenn die Kontrolle tatsächlich verbraucht wird. Ein Beispiel einer solchen chemischen Reaktion ist die einfache Oxidation. Oxidierte Analyten oder Analyten, die auf andere Weise vor der Verwendung des Kontrollsystems reagieren, führen zu Verschiebungen der Signalbildung und weg von den wahren Kontrollwerten. Allgemein erzeugen diese Kontrollen ein größeres Signal als die entsprechende Menge des in der Probe zu untersuchenden Analyten.

[0008] Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass man Kontrollreagenzien herstellen kann, bei denen das oben angedeutete Problem vermieden wird, ohne dass dabei die Chemie des stabilisierten Systems gestört wird. Die unten näher ausgeführte Erfindung umfasst das Einbringen wenigstens einen Hydroxylamins in ein Kontrollreagens auf Flüssigkeitsbasis, welches auch eine bekannte Menge wenigstens eines Analyten enthält. Das erhaltene Material, hiernach als stabilisiertes Kontrollreagens bezeichnet, eignet sich in der gleichen Weise wie jedes Kontrollreagens.

Kurzbeschreibung der Figuren

- [0009] **Fig. 1** zeigt eine Korrelationskurve zwischen einem auf Rinderserum basierenden Kontrollreagens und Kapillarblut.
- [0010] **Fig. 2** zeigt eine Korrelationskurve, bei der das Kontrollreagens auf Plasma basiert.
- [0011] **Fig. 3** zeigt die Korrelation zwischen Blut und einem synthetischen, serumfreien Kontrollreagens.
- [0012] **Fig. 4** zeigt eine Korrelation, bei der eine serumfreie Kontrolle Stress ausgesetzt wird.
- [0013] **Fig. 5** zeigt auch die Korrelation nach Stress.
- [0014] **Fig. 6** zeigt auch eine Korrelation nach Stress.

Ausführliche Beschreibung bevorzugter Ausführungsformen

[0015] In den nachfolgenden Beispielen wurde das Material SERASUB™ verwendet. SERASUB™ ist ein gewerblich erhältlicher synthetischer Serumersatz; die Zusammensetzung davon ist jedoch Eigentum des Herstellers und den Erfindern nicht bekannt; daher wird sie hier nicht beschrieben. Weitere Informationen und Beispiele mit verschiedenen Medien sind angegeben, es versteht sich jedoch, dass SERASUB das bevorzugte, jedoch nicht zwingende Medium ist. Die unter Verwenden von SERASUB bereitgestellten Beispiele erfüllen die Erfordernisse der bevorzugten Ausführungsform.

Beispiel 1

- [0016] Ein Glucose-Kontrollreagens wurde mit Hilfe von „gestripptem“ Rinderserum hergestellt. Aus diesem Material wurde das Cholesterin entfernt und es enthielt eine vorbestimmte Glucosemenge.
- [0017] Das Kontrollmaterial wurde mit 100 mg/dl N-t-Butyl-hydroxylamin HCl zusammengebracht, um ein Kontrollreagens herzustellen. Dieses Material wurde dann gegen Proben aus Kapillarblut getestet, die so eingestellt worden waren, dass sie eine bekannte Menge Glucose enthielten. Sowohl die Kontrollen als auch die Blutproben wurden in dem gleichen Analyseapparat getestet, wobei ein Indikatorsystem verwendet wurde, welches das wohlbekanntes Hexokinase-Assaysystem zur Messung von Glucose verwendet.
- [0018] Eine Korrelationskurve wird als **Fig. 1** gezeigt. Sie zeigt, dass sich das hier beschriebene Kontrollreagens unter den beschriebenen Bedingungen sehr ähnlich wie Kapillarblut verhält, was dafür spricht, dass das Material als Kontrollreagens geeignet ist.

Beispiel 2

[0019] Ein auf Plasma basierendes Kontrollreagens wurde verwendet, dessen Formulierung wie folgt war:

pH-Wert (1 %-ige Lösung in 0,15 M NaCl)	
pH	7,6
Absorption	
Absorption bei 710 nm	0,0
Absorption bei 570 nm	0,2
Protein	
Protein	15,0%
Elektrolytanalyse	
Natrium	67,0 mEq/l
Kalium	0,6 mEq/l
Chlorid	11,0 mEq/l
Ergebnisse einer Probe, verdünnt auf 7,3 % Protein in 0,9 % (0,15 M) Kochsalzlösung:	
Cholesterin bei 7,5 % Protein	
Cholesterin	111,0 mg/dl
Eisen bei 7,0 % Protein	
Eisen	102,0 µg/dl
A/G-Verhältnis	1,2
Glucose	2,0 mg/dl
BUN	0,0 mg/dl
Kreatinin	0,0 mg/dl
Harnsäure	0,0 mg/dl
Albumin	4,0 s/dl
Globulin	3,3 s/dl
Calcium	0,9 mg/dl
Anorganisches Phosphat	0,1 mg/dl
Triglyceride	2,0 mg/dl
Alkalische Phosphatase	0,0 u/l
SGOT	0,0 u/l
SGPT	4,0 u/l
LDH	17,0 u/l
Gesamtbilirubin	0,1 mg/dl

[0020] Dieses Material wurde dann mit N,N-Dimethylhydroxylamin HCl (10 mg/dl) vereint und wieder wie in Beispiel 1 gegen Blutproben getestet. **Fig. 2** stellt die mit diesem Material gewonnene Korrelationskurve dar und zeigt, dass die Plasmakontrolle sehr ähnlich zu Kapillarblut war.

Beispiel 3

[0021] Ein Kontrollreagens wurde hergestellt, indem man 47,5 g SERASUB, 2,5 g MES/CAPS (im Verhältnis von 8 %: 92 %) und 0,015 g N-(tert-Butyl)-hydroxylamin-hydrochlorid (Endkonzentration: 30 mg/dl) mischte. Diese Formulierung wurde gegen Kapillarblut getestet und die Ergebnisse sind in **Fig. 3** gezeigt. Wieder gab es eine gute Korrelation zwischen Blut und der Kontrolle.

Beispiel 4

[0022] Um die Stabilität des Kontrollreagens aus Beispiel 3 zu testen, wurde eine ähnliche Formulierung hergestellt. Insbesondere wurden 190 g SERASUB, 10 g 1 M MES/CAPS und 0,24 g N-(tert-butyl)-hydroxylamin-hydrochlorid zusammengefügt und

belastet, indem man das Gemisch drei Tage einer Temperatur von 55°C aussetzte. Das belastete Reagens wurde gegen Kapillarblut getestet und **Fig. 4** zeigt die Ergebnisse. Diese zeigen, dass das Kontrollreagens trotz der Temperaturbelastung gebrauchsfähig blieb.

Beispiel 5

[0023] Die Stabilitätsgrenzen der Kontrollreagenzien wurden getestet, indem man die oben beschriebene Formulierung einer Belastung von 9 bis 10 Tagen bei 55°C aussetzte. **Fig. 5** zeigt, dass die Korrelation erst nach dieser starken Belastung abzuweichen begann.

Beispiel 6

[0024] Ein ähnlicher Test wurde durchgeführt, bei dem das Reagens belastet wurde, indem man es 9 Tage gegenüber Raumtemperatur aussetzte. **Fig. 6** zeigt, dass die Belastung nicht zu signifikanten Problemen mit der Korrelation führte.

[0025] Die vorstehenden Beispiele zeigen, dass man Kontrollreagenzien herstellen kann, die einen Träger, eine bekannte Menge eines zu untersuchenden Analyten sowie ein Additiv, nämlich Hydroxylamin, enthalten. Der Begriff „ein Hydroxylamin“, wie hier verwendet, steht für alle Verbindungen, die eine Hydroxylamingruppe enthalten. Als solche kann die Klasse Verbindungen als RNHOH beschrieben werden, worin R wie gewünscht substituiert sein kann. Ist „R“ beispielsweise Wasserstoff, ist die Verbindung Hydroxylamin. Andere von der Erfindung umfasste Verbindungen umfassen N-(tert-Butyl)-hydroxylamin, O-tert-Butyl-hydroxylamin, O-Benzylhydroxylamin, N,O-Dimethylhydroxylamin, N,N-Dimethylhydroxylamin und N,N-Diethylhydroxylamin. Auch von dieser Benennung umfasst sind Hydroxylaminsalze, wobei saure Additionssalze, wie die HCl- und H₂SO₄-Salze, bevorzugt sind.

[0026] Die Wahl des Trägers wird dem Fachmann überlassen. Wie oben in der Diskussion angedeutet wurde, können Kontrollreagenzien beispielsweise auf Plasma, Serum, Blut, Wasser oder anderen flüssigen Materialien beruhen. Wird eine biologische Probe als Träger verwendet (z. B. Plasma), wird Material von humanem Ursprung bevorzugt, obwohl andere Materialien aus Säugetieren, wie Rinderplasma oder -serum verwendet werden können. Die Kontrollreagenzien müssen jedoch nicht in löslicher Form hergestellt werden, da es beispielsweise möglich ist, Suspensionen oder Emulsionen durch Zugabe von Materialien zu anderen, oben aufgeführten Komponenten herzustellen. Polymere und Copolymere können mit den weiteren oben aufgeführten Inhaltsstoffen vereint werden, um solche Suspensionen oder Emulsionen zu erzeugen. Auch möglich sind Flüssigkeitsfreie Formulierungen der Kontrollreagenzien, wie Lyophilisate, Pulver, Tabletten usw. Das Kontroll-

reagens kann, falls gewünscht, auch in einen Testträger oder eine andere Form eines analytischen Apparats eingebracht sein. Zusätzliche Inhaltsstoffe können, wie gewünscht, auch zu dem Kontrollreagens zugegeben werden. Diese können Konservierungsmittel, Biozide, Viskositätsmittel, wie Polystyrolsulfonat, Puffer, Farbstoffe usw. sein. Weitere Additive können auch mit den Wirkstoffen kombiniert werden, wie im Stand der Technik zu den Kontrollreagenzien dargestellt. Diese sind dem Fachmann wohl bekannt. [0027] ...trihydroxybenzoesäure) und die Familie der Tocopherol-Moleküle, d. h. Vitamin E und seine Derivate...Die Wahl des Trägers wird dem Fachmann überlassen. Wie oben in der Diskussion angedeutet wurde, können Kontrollreagenzien beispielsweise auf Plasma, Serum, Blut, Wasser oder anderen flüssigen Materialien beruhen. Wird eine biologische Probe als Träger verwendet (z. B. Plasma), wird Material von humanem Ursprung bevorzugt, obwohl andere Materialien aus Säugetieren, wie Rinderplasma oder -serum verwendet werden können. Die Kontrollreagenzien müssen jedoch nicht in löslicher Form hergestellt werden, da es beispielsweise möglich ist, Suspensionen oder Emulsionen durch Zugabe von Materialien zu anderen, oben aufgeführten Komponenten herzustellen. Polymere und Copolymere können mit den weiteren oben aufgeführten Inhaltsstoffen vereint werden, um solche Suspensionen oder Emulsionen zu erzeugen. Auch möglich sind Flüssigkeitsfreie Formulierungen der Kontrollreagenzien, wie Lyophilisate, Pulver, Tabletten usw. Das Kontrollreagens kann, falls gewünscht, auch in einen Testträger oder eine andere Form eines analytischen Apparats eingebracht sein. Zusätzliche Inhaltsstoffe können, wie gewünscht, auch zu dem Kontrollreagens zugegeben werden. Diese können Konservierungsmittel, Biozide, Viskositätsmittel, wie Polystyrolsulfonat, Puffer, Farbstoffe usw. sein. Weitere Additive können auch mit den Wirkstoffen kombiniert werden, wie im Stand der Technik zu den Kontrollreagenzien dargestellt. Diese sind dem Fachmann wohl bekannt. [0028] Es versteht sich, dass die Beschreibung und Beispiele die Erfindung erläutern, diese jedoch nicht einschränken und, dass andere Ausführungsformen innerhalb des Umfangs der Erfindung dem Fachmann auf dem Gebiet nahe liegen.

Patentansprüche

1. Kontrollreagens für die Bestimmung eines Analyts, ausgewählt aus der Gruppe aus Glucose und Cholesterin, im wesentlichen bestehend aus (i) einer bekannten Menge Glucose oder Cholesterin; (ii) einem Additiv, welches eine Verbindung ist, die eine Hydroxylamingruppe enthält; und (iii) einem fluiden Trägermaterial.

2. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin die eine Hydroxylamingruppe enthaltende Verbindung ausgewählt ist aus der Gruppe aus Hydroxylamin,

N-tertButylhydroxylamin, O-tertButylhydroxylamin, O-Benzylhydroxylamin, N,O-Dimethylhydroxylamin, N,N-Dimethylhydroxylamin, N,N-Diethylhydroxylamin und saure Salze davon.

3. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin der Analyt Glucose ist.

4. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin der Analyt Cholesterin ist.

5. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin das fluide Trägermaterial Serum ist.

6. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin das fluide Trägermaterial Plasma ist.

7. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin das fluide Trägermaterial Wasser ist.

8. Kontrollreagens nach Anspruch 2, worin die eine Hydroxylamingruppe enthaltende Verbindung N-tertButylhydroxylamin ist.

9. Kontrollreagens nach Anspruch 2, worin die eine Hydroxylamingruppe enthaltende Verbindung N,N-Dimethylhydroxylamin ist.

10. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin das Kontrollreagens auch ein Viskositätsmittel enthält.

11. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin das Kontrollreagens auch ein Konservierungsmittel enthält.

12. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin das Kontrollreagens auch ein Biozid enthält.

13. Kontrollreagens nach Anspruch 1, worin das Kontrollreagens auch ein Puffer enthält.

14. Kontrollreagens nach Anspruch 1 in Form einer Emulsion.

15. Lyophilisiertes Kontrollreagens für die Bestimmung eines Analyts, ausgewählt aus der Gruppe aus Glucose und Cholesterin, im wesentlichen bestehend aus

(i) einer bekannten Menge Glucose oder Cholesterin;
(ii) einem Additiv, welches eine Verbindung ist, die eine Hydroxylamingruppe enthält.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

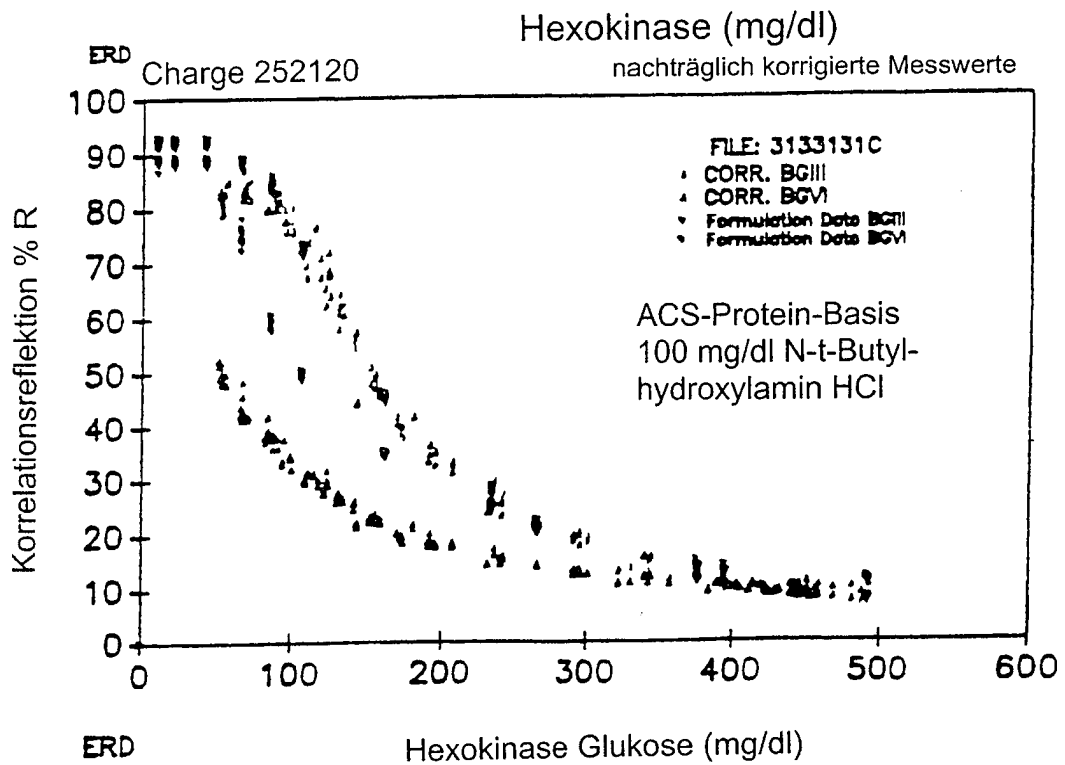


FIG. 2

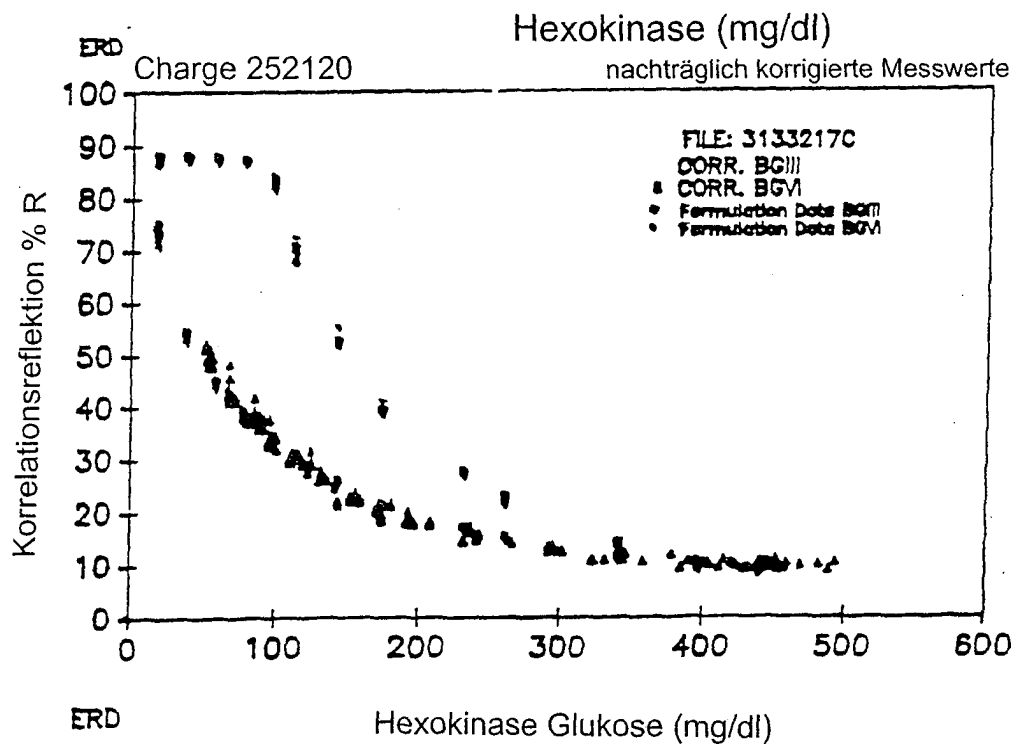


FIG. 3

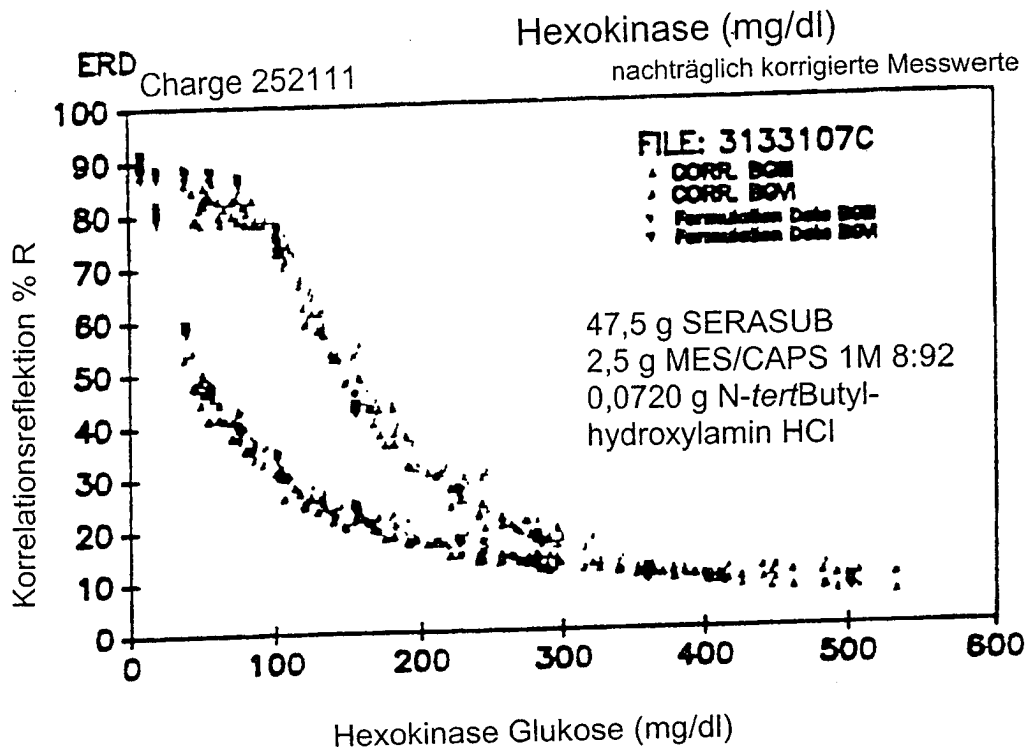


FIG. 4

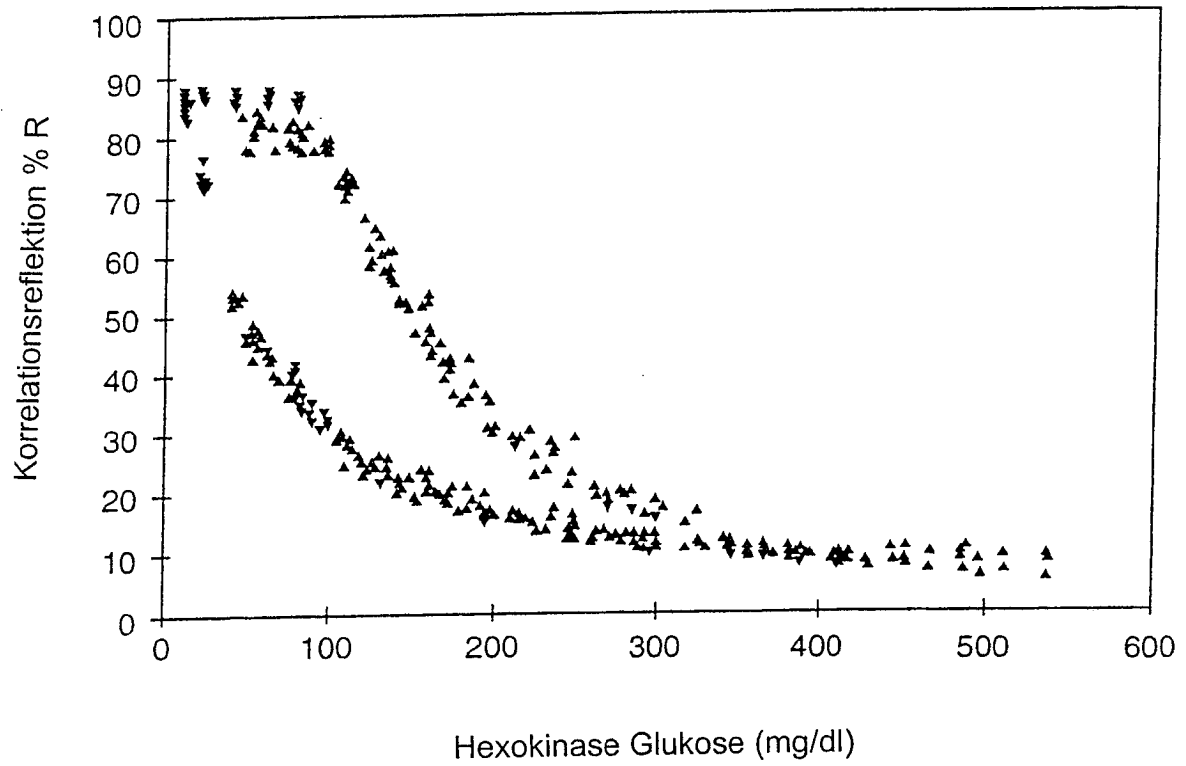


FIG. 5

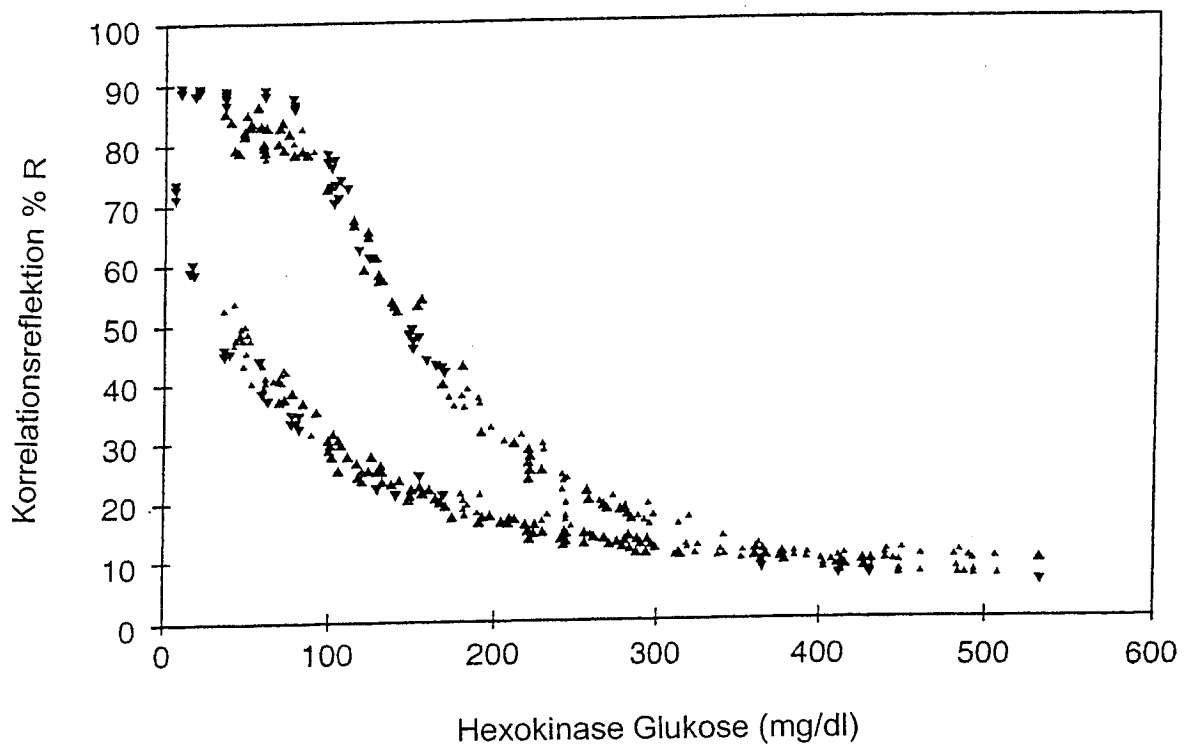


FIG. 6

