

Berichte aus der Pharmazie

Kerstin Gräfe

**Entwicklung und Validierung eines
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
für das nichtsteroidale Antirheumatikum
S-Ibuprofen**

Shaker Verlag
Aachen 1998

1 EINLEITUNG	1
1.1 Chiralität	1
1.2 Enzymimmunoassays	4
1.2.1 Heterogen-kompetitiver direkter ELISA mit Festphasen-gebundenem Antikörper	8
1.2.2 Heterogen-kompetitiver indirekter ELISA mit Festphasen-gebundenem Antigen	10
1.2.3 Heterogen-nichtkompetitiver Sandwichassay	12
1.3 Ibuprofen	13
1.3.1 Chemie	13
1.3.2 Pharmakokinetische Eigenschaften	14
1.3.3 Pharmakodynamische Eigenschaften	17
1.3.4 Analytik	18
2 PROBLEMSTELLUNG	21
3 SYNTHESE KOPPLUNGSFÄHIGER (S)-IBUPROFEN-DERIVATE	25
3.1 Synthese von (S)-Ibuprofensuccinimidester	25
3.2 Verknüpfung über einen Spacer (4-Aminobuttersäure)	27
3.3 Reinheit der Syntheseprodukte	29
3.4 Überprüfung der Enantiomerenreinheit	30
3.4.1 Chirale stationäre Phasen	30
4 SYNTHESE UND CHARAKTERISIERUNG VON HAPTEN-PROTEIN-KONJUGATEN	35
4.1 Rinderserumalbumin	38
4.2 Synthese und Charakterisierung der BSA-Hapten-Konjugate	39
4.2.1 Synthese der BSA-Hapten-Konjugate	39
4.2.2 Charakterisierung der BSA-Hapten-Konjugate	40
4.2.2.1 Überprüfung der kovalenten Protein/Hapten Bindung	41
4.3 Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄ -OH, Trihydrochlorid	44
4.3.1 Synthese des Lipoprotein-Hapten-Konjugates	45
4.3.2 Charakterisierung des Lipoprotein-Hapten-Konjugates	46

5 IMMUNISIERUNG UND GEWINNUNG DER ANTISERA	49
5.1 Primäre und sekundäre Immunantwort	49
5.2 BSA-Hapten-Konjugate	51
5.2.1 Immunisierung mit konventionellen BSA-Hapten-Konjugaten	51
5.2.2 Immunisierungsschema der konventionellen BSA-Hapten-Konjugate	51
5.2.3 Gewinnung der Antisera	55
5.3 Lipoprotein-Hapten-Konjugat	59
5.3.1 Immunisierung mit dem Lipoprotein-Hapten-Konjugat	59
5.3.2 Immunisierungsschema des Lipoprotein-Hapten-Konjugates	60
6 TESTAUFBAU	65
6.1 Indirekter ELISA	65
6.1.1 <i>Beschichten der Kavitäten mit dem Hapten-Träger-Konjugat</i>	65
6.1.1.1 Vergleich der Trägermaterialien (BSA, Poly-L-Lysin)	67
6.1.1.2 Auswahl des Puffers für die Beschichtung der Kavitäten	68
6.1.2 Blockieren freier Bindungsstellen an den Kavitäten	69
6.1.2.1 Test auf Vollständigkeit der Blockade freier Bindungsstellen	70
6.1.2.2 Test auf Kreuzreaktivität mit den Blockierungsreagenzien	71
6.1.2.3 Optimierung der Blockierungsreagenz-Konzentration	74
6.1.2.3.1 Magermilchkonzentration	74
6.1.2.3.2 BSA-Konzentration	76
6.1.3 Waschschrte	77
6.1.4 Reaktion mit Analyt und Antiserum	78
6.1.5 Zugabe des enzym-markierten Immunglobulins	79
6.1.6 Zugabe der Enzym-Substrate	80
6.1.7 Absorptionsmessung	81
7 SCREENING DER ANTISERA	85
7.1 Screening A (Antisera gegen BSA-Hapten-Konjugate)	87
7.2 Screening B (Antisera gegen Lipoprotein-Hapten-Konjugat)	98
7.3 Screening C (Empfindlichkeit gegenüber (S)-Ibuprofen)	100

7.4 Beurteilung der zur Immunisierung eingesetzten Konjugate	
IK1, IK2 IK 3 und IK Lipo	104
7.4.1 BSA-Hapten-Konjugate	104
7.4.2 Lipoprotein-Hapten-Konjugat	105
8 TESTVALIDIERUNG	107
8.1 Dynatech MR 5000	107
8.1.1 Linearität innerhalb einer Platte	108
8.1.2 Wiederholpräzision innerhalb einer 8er Reihe	109
8.1.3 Wiederholpräzision bei 10facher Messung einer Platte	110
8.2 Kinetik der POD-Substrat-Reaktion	111
8.3 Auswertungsmethoden	112
8.3.1 Nichtlineare hyperbolische Regression	115
8.3.2 Logistische 4-Parameter-Anpassung	115
8.4 Meßbereich	116
8.4.1 Gesamtfehler	116
8.4.2 Bestimmungsgrenze	117
8.5 Richtigkeit (Wiederfindung)	119
8.6 Präzision	121
8.6.1 Vergleichspräzision (interassay precision)	121
8.6.2 Wiederholpräzision (intraassay precision)	122
8.7 Matrixeffekte	123
8.7.1 Richtigkeit	123
8.7.2 Wiederholpräzision	124
8.8 Beurteilung des entwickelten ELISA für (S)-Ibuprofen	125
9 CHARAKTERISIERUNG DES IMMUNGLOBULINS ASIIIγ BZW. AS LIPOγ	127
9.1 Charakterisierung von ASIIIγ	127
9.1.1 Kreuzreaktivität von ASIII γ	127
9.1.2 Kreuzreaktivität von ASIII γ bezüglich des chiralen Zentrums	134
9.2 Kreuzreaktivität von AS Lipoγ	141

10 EXPERIMENTELLER TEIL	147
10.1 Chromatographische Methoden	147
10.1.1 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	147
10.1.2 Dünnschichtchromatographie (DC)	148
10.1.3 Säulenchromatographie (SC)	149
10.2 Spektroskopische Methoden	150
10.2.1 Kernresonanzspektroskopie	150
10.2.2 Massenspektrometrie	150
10.2.3 Infrarotspektroskopie	150
10.2.4 UV/VIS-Spektroskopie	150
10.3 Dialyse	151
10.3.1 Schlauchdialyse	151
10.3.2 Tangentialflußdialyse	151
10.4 Gefriertrocknung	152
10.5 Wasseraufbereitung	152
10.6 Filtration	153
10.7 Weitere Geräte	153
10.8 Reagenzien	153
10.9 Puffer	155
10.10 Potentiometrie	157
10.10.1 pH-Wert-Bestimmung	157
10.11 Synthesen	158
10.11.1 2-(4-Isobutylphenyl)propionsäure-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ester	158
10.11.2 4-[2-(4-Isobutylphenyl)propionylamino]buttersäure	161
10.11.2.1 Darstellung von (S)-Ibuprofensäurechlorid	161
10.11.2.2 Darstellung von (S)-Ibuprofen-4-aminobuttersäure mittels modifizierter Schotten-Baumann Reaktion [114]	161
10.11.3 4-[2-(4-Isobutylphenyl)propionylamino]buttersäure- (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)ester	165
10.11.4 Synthese von Ibufenac	168

10.12 Synthese und Charakterisierung der Protein-Hapten-Konjugate	169
10.12.1 Herstellung der BSA-(S)-Ibuprofen-Konjugate	169
10.12.2 Bestimmung der Anbindungsrate mittels HPLC	170
10.12.3 Behandlung der Konjugate mit chaotropen Substanzen	171
10.12.4 Kovalente Verknüpfung von (S)-Ibuprofensuccinimidester mit Pam ₃ Cys-Ser-Lys ₄ -OH x 3 HCL	173
10.13 Immunchemische Methoden	174
10.13.1 Immunelektrophorese nach Grabar und Williams (in der Modifikation nach Scheidegger)	174
10.13.1.1 Elektrophorese	175
10.13.1.2 Immunpräzipitation	175
10.13.1.3 Waschen und Färben	176
10.14 Testaufbau	177
10.14.1 Materialien	177
10.14.2 Mikrotiterplatten-Lese- und Auswertungssystem	177
10.14.3 Mikrotiterplattenwisher	177
10.14.4 Synthese des Poly-L-Lysin-(S)-Ibuprofen Konjugates	178
10.14.4.1 Herstellung der Poly-L-Lysin-Hapten-Konjugat-Verdünnungen	178
10.14.5 Durchführungsschema für den indirekten ELISA	179
10.15 Screening der Antisera	180
10.15.1 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Antisera	180
10.15.2 Verdünnung der Antisera	183
10.15.2.1 Verdünnung der Antisera der BSA-Hapten-Konjugate	183
10.15.2.2 Verdünnung der Antisera der Lipoprotein-Hapten-Konjugate	184
10.15.3 Screening C	186
10.16 Testvalidierung	191
10.16.1 Herstellung der Rivanol-Standardlösungen	191
10.16.2 Herstellung der (S)-Ibuprofen-Standards	191
10.16.3 Herstellung der (S)-Ibuprofen-Standards zur Bestimmung der Kreuzreaktivität von AS Lipoy	193
10.16.4 Kreuzreaktivität	194
10.16.5 Herstellung der Stammlösungen zur Bestimmung der Kreuzreaktivität von AS Lipoy	199

11 ANHANG: MEBWERTE - TESTVALIDIERUNG	203
11.1 Dynatech MR 5000	203
11.1.1 Linearität innerhalb einer Platte	203
11.1.2 Wiederholpräzision bei 10facher Messung einer Platte	203
11.2 Kinetik der POD-Substrat-Reaktion	204
11.3 Meßbereich	205
11.3.1 Gesamtfehler und Bestimmungsgrenze	205
11.4 Richtigkeit, Präzision, Matrixeffekte	206
12 ZUSAMMENFASSUNG	215
13 LITERATURVERZEICHNIS	219
14 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	237