



F 1000098863B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT 98863  
C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 25 08 1997

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

G 01N 33/553

(21) Patentihakemus - Patentansökning	895366
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	10.11.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	10.11.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	15.05.90
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.05.97
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
	14.11.88 NL 8802783 P

(71) Hakija - Sökande

1. Akzo N.V., Velperweg 76, 6824 BM Arnhem, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Brouwer, Wilfridus Maria, Vianenstraat 19, 6882 NT Velp, Netherlands, (NL)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Vesipitoinen suspensio diagnostisia kokeita varten ja menetelmä sen valmistamiseksi sekä diagnostisia menetelmiä ja niissä käytettäviä reagensseja ja testipakkauksia  
Vattenhaltig suspension för diagnostiska tester och förfarande för framställning därav och diagnostiska tester samt med dessa användbara reagens och testförpackningar

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 156537 (H 01F 1/37), GB A 2017125 (C 08G 6/00), US A 4454234 (B 23B 5/16)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee vesipitoista suspensiota diagnostisiin tai immunodiagnostisiin testeihin, joka suspensio sisältää ei-polymeriä, joita jokaista erikseen ympäröi funktionaalisia ryhmiä sisältävä hydrofiilinen kopolymeeri, sekä menetelmää tämän suspension valmistamiseksi.

Keksintö koskee myös tätä suspensiota sisältävää reagenssia sekä menetelmää spesifisesti sitoutuvan aineen tai immunokemiallisesti aktiivisen komponentin toteamiseksi testinäytteestä tämän reagenssin avulla ja testipakkauksia käytettäväksi mainituissa toteamismenetelmissä.

Uppfinningen avser en vattensuspension för diagnostiska eller immunodiagnostiska prov, varvid den omfattar icke-polymera kärnor som individuellt omges av en hydrofilisk sampolymer, vilken innehåller funktionella grupper, och ett förfarande för framställning av denna suspension.

Uppfinningen avser även en reagens, vilken innehåller denna suspension, samt ett förfarande för detektion av en specifik bindningssubstans eller en immunokemiskt aktiv komponent i en provvätska medelst reagensen, samt en testförpackning, vilken kan användas vid tillämpningen av dessa förfaranden.

Vesipitoinen suspensio diagnostisia kokeita varten ja menetelmä sen valmistamiseksi sekä diagnostisia menetelmiä ja niissä käytettäviä reagensseja ja testipakkauksia

5           Keksintö koskee vesipitoista suspensiota diagnostisia tai immunodiagnostisia testejä varten, joka suspensio sisältää ei-polymeerisiä ytimiä, joita ympäröi funktionaalaisia ryhmiä sisältävä hydrofiilinen kopolymeeri, sekä myös menetelmää tämän suspension valmistamiseksi.

10           Keksintö koskee myös menetelmää spesifisesti sitoutuvan aineen tai immunokemiallisesti aktiivisen komponentin toteamiseksi testinesteestä sekä reagenssia ja testipakkausta käytettäväksi mainittuja toteamismenetelmiä käytettäessä.

15           Yllä mainittu suspensio ja menetelmä suspension valmistamiseksi tunnetaan US-patenttijulkaisusta 4 157 323. Tässä kuvattujen suspensioiden partikkelit ovat mikropalloja, jotka muodostuvat kopolymeeristä, jolla hienojakoinen metalli tai metallioksidi on päällystetty, kuten kuviossa 1 on esitetty.

20           Immunodiagnostisissa kokeissa käytetään usein hyväksi leimaan kytkettyjä proteiineja. Leimana käytetään kolloidisia partikkeleita, joihin proteiini adsorboidaan fysikaalisesti. Tähän liittyviä huonoja puolia ovat muun  
25           muassa koemateriaalin valmistuksen huono toistettavuus ja proteiinin vuotaminen. Jälkimmäinen seikka tarkoittaa sitä, ettei aktiivinen proteiini ole kiinnittynyt stabiililla tavalla partikkeleihin, mistä on seurauksena se, että testin herkkyys laskee säilytyksen aikana.

30           Sellaisten leimojen, joihin proteiini voidaan sitoa kovalenttisesti, kuten US-patenttijulkaisussa 4 157 323 on kuvattu, käyttö voi olla ratkaisu tämäntyppisiin ongelmiin. Tässä tapauksessa ei-polymeeriset partikkelit muodostavat varsinaisen leiman. Leimalla ymmärretään kompo-

nenttia, joka voidaan todeta spesifisen ominaisuuden (värin, radioaktiivisuuden ja vastaavan) ansiosta.

Yllä mainitun patenttijulkaisun suspensiolla on useita huonoja puolia. Ensiksikin tämän suspension kiinteä aine sisältää enintään 50 paino-% ei-polymeerisiä ytimiä. Tämä merkitsee testin herkkyyden ja sovellutusmahdollisuuksien lukumäärän vähenemistä verrattuna leimoihin, joissa proteiini on suoraan sitoutunut ytimiin. Toiseksi, kultasoolia agglutinaatiotestitarkoituksiin ei voida käyttää tässä suspensiossa. Kultapartikkelit muodostavat kuitenkin erittäin sopivan leiman sen ominaisuuden ansiosta, että stabiilin kultasoolin väri on punainen ja väri muuttuu siniseksi höytelöitymisen tapahtuessa (partikkeleiden agglomeroituaessa testeissä todettavan proteiinin vaikutuksesta). Kun kultaytimiä käytetään US-patenttijulkaisun 4 157 323 mukaisessa suspensiossa, suspendoituneiden partikkeleiden väri on sininen tai punainen, mutta tämä väri ei voi muuttua höytelöityessä.

Kun partikkelit ovat sinisiä, kultaytimet ovat pakautuneet niin lähekkäin, että agglomeroitumista voidaan jo katsoa tapahtuvan jokaisessa partikkelissa; katso kuvio 2.

Kun partikkelit ovat punaisia, kopolymeeri erottaa ytimet toisistaan, ja ne jäävät sellaiseksi jopa polymeeripallojen agglomeroituaessa, mistä on seurauksena se, ettei väri muutu (katso kuvio 3).

Tässä suspensiolla on lisäksi huonoja puolia käytettäessä väriainesooleja ytimenä. EP-julkaisusta 0 032 270 tunnetaan, että väriainesoolien lopullisessa toteamisessa värin voimakkuutta voidaan lisätä antamalla soolipartikkeleiden liueta orgaaniseen liuottimeen. US-patenttijulkaisun 4 157 323 mukaisessa tapauksessa, jossa väriainepartikkelit ovat paksun polymeerikuoren ympäröimiä, tämä ei ole enää mahdollista.

Keksinnön mukaisen suspension kiinteät aineosat sisältävät vähintään 50 paino-% ei-polymeerisiä ytimiä ja tämä suspensio sallii värin muuttumisen agglomeroitua kultaytimiä käytettäessä. Lisäksi ytimiä ympäröivä polymeeri on tarpeeksi ohut mahdollistaakseen, turpoamalla, 5 väriaineytimien liukenemisen orgaaniseen liuottimeen.

Keksinnössä yllä mainitun tyyppisessä, tunnetussa suspensiossa ei-polymeeriset ytimet ovat kukin erikseen oman kopolymeerikuorensa ympäröimiä. Tämä on valaistu esi- 10 merkillä kuviossa 4.

Rakenteeltaan tämäntyyppisissä partikkeleissa yhdistyvät polymeeripinnan hyvät puolet ytimen ominaisuuksiin suhteessa, joka on mahdollisimman edullinen. Ei-polymeristen ydinten määrä riippuu ydintyyppistä ja polymeerikuoren paksuudesta. Kullan ollessa kyseessä se saattaa 15 olla yli 90 %. Kuoren paksuus voi vaihdella välillä noin 3 - 70 nm mm. koeolosuhteista riippuen.

Ei-polymeerisiä ytimiä ovat esimerkiksi metalli-, metallioksidi- tai metalliyhdisteytimet, jolloin metalli 20 ei ole magneettisesti herkkä, muista epäorgaanisista yhdisteistä, kuten piidioksidista, orgaanisista väriaineista tai orgaanisista pigmenteistä ja synteettisten, eläin-, kasvi- tai mineraaliöljyemulsiopisaroista muodostuvat ytimet. Ei-polymeeriset ytimet, jotka voidaan parhaiten todeta 25 silmiinpistävän ominaisuutensa ansiosta, ovat edullisia. Tällaisia ovat kulta jo mainitun agglomeroitua tapahtuvan värimuutoksensa ansiosta ja hematitti ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) punainen-ruskea-värinsä ansiosta.

Kun kolorimetrisissä testeissä käytetään väriaineita, on mahdollista valitsemalla oikein väriaine saada korkeampia moolisia absorptioita ja siten korkeampi herkkyys 30 kuin metallisooleilla. Lisäksi, kuten yllä on mainittu, väriä voidaan voimistaa jälkepäin.

Funktionaalisia ryhmiä sisältävillä kopolymeereillä 35 tarkoitetaan kopolymeerejä, jotka sisältävät sellaisia

ryhmiä kuin OH, NH<sub>2</sub>, COOH, CHO, SH ja NN<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>, joihin proteiinit voivat sitoutua suoraan tai kemiallisen käsittelyn jälkeen kovalenttisesti.

5 Keksintö koskee myös menetelmää yllä kuvatun keksinnön mukaisen suspension valmistamiseksi. US-patenttijulkaisun 4 157 323 mukaisella tunnetulla menetelmällä suspensiot valmistetaan kopolymeroimalla in situ veteen liuotettu monomeerinseos ei-polymeeripartikkeleiden läsnäollessa, jolloin monomeeriseos sisältää seuraavanlaisia monomeereja:

10 etyleenisesti tyydyttymätön monomeeri, joka hydrolysoimatta tai hydrolyysin jälkeen sisältää ainakin yhden kovalenttisesti sitovan funktionaalisen ryhmän,  
hydrofobinen monomeeri ja  
15 liittävä monomeeri.

Tällä menetelmällä ei-polymeeriset partikkelit dispergoidaan monomeeriliuokseen. Sen seikan lisäksi, että muodostuneilla partikkeleilla on edellä mainittuja huonoja puolia, menetelmällä on myös useita haittoja. Niinpä havaitaan muodostuvan myös puhtaita polymeeripalloja ilman ydintä. Nämä ovat ei-haluttuja sivutuotteita, jotka on poistettava. Lisäksi havaitaan, ettei partikkeleiden agglomeroitumista voida välttää. Tämä estetään lisäämällä stabiloivaa ainetta, esimerkiksi ionitonta pinta-aktiivista ainetta. Proteiinien leimoissa tämäntyyppinen aine yleensä häiritsee proteiinien sitoutumista ja konformaatiota. Käytettäessä tämäntyyppisellä menetelmällä valmistettuja partikkeleita immunodiagnostisiin testeihin erikseen lisätyt pinta-aktiiviset aineet täytyy poistaa. Tämä  
20  
25  
30 onnistuu kuitenkin usein vain osittain.

Keksinnön mukaisella menetelmällä tavoitteena on antaa käyttöön ei-polymeeripartikkeleita omissa erillisissä kopolymerikuorissaan, jolloin on mahdollista välttää pinta-aktiivisten aineiden käyttö, eikä puhtaita kopolymeripalloja muodostu.  
35

Keksinnön mukaiselle menetelmälle on ominaista, että lähtöaineena käytetään magneettisesti epäherkkien, ei-polymeeristen partikkeleiden pysyvää, kolloidista dispersiota ja että tähän lisätään monomeeriseos, joka valitaan siten, että syntyvän kopolymerin varaus on merkiltään identtinen alkuperäisen dispersion varauksen kanssa.

Elektroforeettinen liikkuvuus määrää aiotun varauksen merkin. Alan ammattimiehet tuntevat tämän käsitteen, eikä sitä tarvitse selittää tässä yksityiskohtaisemmin.

Kun alkuperäisen dispersion tai emulsion ja kuoripolymerin varausten merkit eivät ole identtisiä, kuoren muodostuessa dispersio koaguloituu, jollei käytetä pinta-aktiivisia aineita. Merkiltään identtiset varaukset saadaan käyttämällä polymeroinnin aikana käynnistäjää, joka saa aikaan varattuja jäännösryhmiä, joilla on oikeanmerkinen varaus, ja/tai käyttämällä varattuja monomeereja, joilla on tuonmerkkinen varaus.

Alkuperäinen dispersio voidaan stabiloida peptisoimalla ionit ja myös adsorboimalla heikosti pinta-aktiivisia aineita. Tässä vaiheessa käytetyt heikosti adsorboituvat pinta-aktiiviset aineet voidaan hyvin poistaa mikro-suodattamalla, eivätkä ne estä suspension käyttöä immuudiagnostisissa testeissä.

Etyleenisesti tyydyttymättömät monomeerit, joissa on vähintään yksi kovalenttisesti sitoutuva funktionaalinen ryhmä, voidaan valita monomeereista, jotka sisältävät OH-, NH<sub>2</sub>-, COOH-, CHO-, SH- tai NN<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>-ryhmän. Näistä esimerkkejä ovat etyleeni-imiini, 2,3-dihydroksipropyylimetakrylaatti, maleiinihappo, akryyliamidi, metylooliakryyliamidi, (met)akryylihappo, aldonihappo, allyyliamidit, kuten arabinonallyyliamidi, glukonallyyliamidi, α-glukoheptonallyyliamidi, laktobionallyyliamidi, natriumvinyylisulfonaatti, metallilyylisulfonaatti, dimetyyliaminoetyylimetakrylaatti, vinyylipyridiinisuolet, polyetyleeniglykolin

(met)akryylihapoesterit ja vinyylipyridiini matalassa pH:ssa.

On myös mahdollista käyttää monomeereja, jotka hydrolyysin jälkeen sisältävät kovalenttisesti sitoutuvan funktionaalisen ryhmän. Näistä esimerkkejä ovat:

5 vinyyliasettaatti (hydrolyysituote: vinyylialkoholi)  
N-vinyyli-tert.butyylikarbamaatti (hydrolyysituote: vinyyliamiini),

glysidyyylimetakrylaatti (hydrolyysituote: 2,3-dihydroksipropyylimetakrylaatti),

10 dietyylimaleaatti (hydrolyysituote: maleiinihappo)

Hydrofobiset monomeerit voidaan valita monomeereista, joiden liukoisuus veteen on vähintään 35 g/l 20 °C:ssa. Esimerkkejä näistä ovat styreeni, butadieeni, butyyliakrylaatti, vinylideenikloridi, vinyylidikloridi, eteeni, metyyylimetakrylaatti, etyyliakrylaatti, vinyyliesterit, 15 dietyylimaleaatti, glysidyyylimetakrylaatti ja 2,3-epitiopropyylimetakrylaatti.

Edullisimpia hydrofobisia monomeereja ovat kuitenkin sellaiset monomeerit, jotka sisältävät hydrolysoituvan 20 ryhmän, jolloin polymeeriin muodostuu hydrofiilinen yksikkö. Esimerkkejä näistä ovat samat, yllä kuvatut hydrolysoituvat monomeerit.

Esimerkkejä liittävästä monomeereista ovat N,N-metyleenibisakryyliamidi, etyleeniglykolidimetakrylaatti, 25 diallyyliftalaatti, pentaerytritolitriakrylaatti ja N,N-diallyyliviinihapon diamidi. Kun hydrofiiliseksi ja hydrofobiseksi monomeeriksi valitaan monomeerit, kuten glysidyyylimetakrylaatti ja metyloliakryyliamidi, jotka ovat jo liitettäviä, erillisen liittävän monomeerin lisäys on tarpeetonta. Liittävää ainetta ei tarvita myöskään, kun polymeeri on tarpeeksi liukenematon polymerointiväliaineeseen. Näin on styreeni- ja akryyliamidikopolymeerin tapauksessa.

30 Suhde, jossa monomeerit valitaan, riippuu valittavista monomeereista.

On oleellista, että muodostuneella kuoripolymeerilla on stabiloivia ominaisuuksia. Tämä voidaan osoittaa sallimalla monomeerin polymeroitua, kun ydinpartikkeleita ei ole läsnä ja kun myöskään pinta-aktiivisia aineita ei  
5 ehkä ole läsnä. Tällöin sopivista monomeeriseoksista muodostuu kopolymeeri, joka muodostaa pysyvän lateksin, jonka partikkelikoko on 50 - 300 nm.

Reagenssi tai immunokemiallinen reagenssi kuuluu myös keksintöön. Termi reagenssi tarkoittaa, että hydrofiilinen kopolymeeri, joka ympäröi ei-polymeeristä ydintä,  
10 on varustettu reagoivalla aineella.

Reagoivat aineet, joita voidaan käyttää, ovat aineita, joiden kanssa joko reseptori tai ligandi reseptori-ligandi-yhdistelmissä voi reagoida. Tällaisissa reseptori-ligandi-yhdistelmissä reseptorilla ja ligandilla on suora  
15 tai epäsuora affiniteetti toisiaan kohtaan. Sopivia reseptori-ligandi-yhdistelmiä ovat esimerkiksi avidiini-biotiini tai DNA-DNA- tai DNA-RNA-hybridit. Sitten mainittua reagenssia voidaan käyttää menetelmässä testinesteessä olevan spesifisesti sitoutuvan aineen toteamiseksi, jolla  
20 aineella on sitoutumisaffiniteetti reagenssissa olevaa reagoivaa ainetta kohtaan.

Termi immunokemiallinen reagenssi tarkoittaa, että hydrofiilinen kopolymeeri, joka ympäröi ei-polymeeristä ydintä, on varustettu immunokemiallisesti aktiivisella  
25 aineella (reagoivana aineena). Vasta-ainetta, antigeenia tai hapteneita voidaan käyttää immunokemiallisesti aktiivisena aineena.

Sitten tätä immunokemiallista reagenssia voidaan käyttää menetelmässä testinesteessä olevien immunokemiallisten komponenttien toteamiseksi. Immunokemiallinen reaktio, jonka tulisi tapahtua toteamismenetelmää käytettäessä, on edullisesti kaksikerrosreaktio, agglutinaatioreaktio, kompetitiivinen reaktio tai inhibitioreaktio.  
30

Esimerkiksi antigeenin osoittamiseksi testinesteestä, antigeenia vastaan muodostettu vasta-aine voidaan si-  
toa sopivaan kantajaan, jonka jälkeen testineste saatetaan  
kosketukseen kantajan kanssa ja testinesteessä olevan an-  
5 tigeenin ja vasta-aineen välille muodostuneiden immuuni-  
kompleksien läsnäolo todetaan lisäämällä kantajaan sopivaa  
keksinnön mukaista immunokemiallista reagenssia sen jäl-  
keen, kun immuunikompleksi on muodostunut.

10 Kantajia, joita voidaan käyttää, ovat mikrotesti-  
kuopan, putken tai kapillaarin sisäseinä, kalvo, suodatin,  
testiliuska tai partikkelin, kuten esimerkiksi lateksipar-  
tikkelin, erytrosyytin, väriainesoolin, metallisoolin tai  
soolipartikkelina käytetyn metalliyhdisteen pinta.

15 Keksinnön mukaisen testipakkauksen täytyy sisältää  
oleellisena komponenttina mainittu reagenssi tai immunoke-  
miallinen reagenssi.

Keksintöä valaistaan alla seuraavien sitä rajoitta-  
mattomien esimerkkien ja siihen kuuluvien kuvioiden 1 - 4  
avulla.

20 Kuvio 1 esittää tekniikan tason mukaisen suspension  
partikkeleita. Tässä erilaiset ydinpartikkelit on ympäröi-  
ty partikkelia kohti.

25 Kuvio 2 esittää tekniikan tason mukaisen suspension  
partikkeleita, jossa ytimet on ympäröity lähekkäin toisi-  
aan.

Kuvio 3 esittää tekniikan tason mukaisen suspension  
partikkeleita, joissa kopolymeeri erottaa ytimet toisis-  
taan.

30 Kuvio 4 esittää keksinnön mukaisen suspension par-  
tikkeleita. Tässä tapauksessa jokaisella ytimellä on oma  
kopolymeerikuorensa.

#### **Esimerkki 1**

##### **Kultapartikkeleiden päällystys polymeerikuorella**

35 Siemenkultasooli, jonka partikkelikoko on noin  
20 nm, valmistetaan Frens'in menetelmällä [Nature, Physi-

cal Sci. 241 (1973) 20]. Kultasoolin kiinteiden aineiden pitoisuus on 0,006 paino-%. 80 ml tätä soolia lämmitetään 70-°C:iseksi kaksoisseinäisessä, termostaatilla kontrolloidussa reaktioastiassa sekoitusnopeudella 200 kierrosta minuutissa. Sitten 0,1 g kaliumpersulfaattia ja 0,06 g natriumbikarbonaattia 5 ml:aan tislattua vettä liuotettuna lisätään kultasooliin ja sen jälkeen lisätään 7 ml seuraavaa monomeeriliuosta:

- 2 g metyylimetakrylaatti
- 1 g natriumvinyylisulfonaatti
- 1 g N-metyleenibisakryyliamidi
- 50 ml tislattu vesi
- 50 ml metanoli

Seosta sekoitetaan 70 °C:ssa 18 tuntia, minkä jälkeen se jäähdytetään huoneen lämpötilaan. Sentrifugointikokeet osoittavat, ettei erillisiä polymeeripartikkeleita ole muodostunut. Näkyvän valon absorptiospektrit osoittavat, ettei partikkeliryhmiä esiinny ja että polymeerikuori on muodostunut. Dynaamisen valon sirontakokeet ja transmissioelektronimikroskopia osoittavat, että kuoren paksuus on 77 nm.

### **Esimerkki 2**

#### **Monomeeriseos, joka sisältää hydrolysoituvaa, hydrofobista monomeeria**

##### **2.1 Kultaparikkeleiden päällystys ohuella polymeerikuorella**

Siemensoolin valmistus

Kultasooli valmistetaan pelkistämällä tetrakloori-auriinihappoliuos natriumsitraalilla Frens'in [Nature, Physical Sci. 241 (1973) 20] kuvaaman menetelmän mukaisesti. Kiinteiden aineiden pitoisuus on 0,032 paino-% kultaa. Keskimääräinen partikkelikoko on 55 nm. Näin valmistettu sooli on kolloidisesti pysyvä pinta-aktiivisia aineita lisäämättä.

## Päällystysmenetelmä

800 ml siemensoolia siirretään termostaatilla kontrolloituun yhden litran reaktioastiaan ja lämmitetään 70°C:iseksi hitaasti sekoittaen (200 kierrosta minuutissa, pohjasekoittaja). Sitten 10 ml liuosta, joka sisältää 0,32 g kaliumpersulfaattia ja 0,2 g natriumbikarbonaattia 50 ml:ssa tislattua, deionisoitua vettä, lisätään tipotain kultasooliin. Tämän jälkeen 25 ml liuosta, jolla on seuraavassa esitetty koostumus, lisätään tipotain sekoi-  
tettuun, lämpimään kultasooliin yhden tunnin kuluessa.

Syötetty monomeerikoostumus:

0,75 g glysidyylimetakrylaatti  
0,38 g natriumvinyylisulfonaatti  
0,38 g N-metyleenibisakryyliamidi  
50 ml tislattu vesi  
50 ml metanoli

Samana ajanjakson kuluessa lisätään jäljelle jäänyt osa käynnistys/puskuriliuosta. Kun monomeerit ja käynnistin on lisätty, seosta sekoitetaan vielä 15 tuntia 70°C:ssa. Kun sama koe suoritetaan käyttäen kultasoolin tilalla samaa tilavuutta vettä, muodostuu stabiili lateksi, jonka partikkelikoko on noin 100 nm.

Päällystetyn kultasoolin ominaisuudet

200 ml valmistettua soolia puhdistetaan mikrosuodattamalla käyttäen 6 000 ml tislattua vettä. Transmissioelektronimikroskooppiset ja kvasielastinen valonsironta -analyysit osoittavat, että jokainen yksittäinen kultapartikkeli on päällystetty 11 nm paksulla polymeerikuorella. Muodostuu alle 5 % polymeeripartikkeleita, joissa ei ole kultaydintä. Jokainen päällystetty partikkeli sisältää yhden ainoan kultaytimen.

Puhdistettu, mikrosuodatettu sooli pysyy kolloidisesti pysyvänä 0,2 mol/l natriumkloridin vesiliuoksessa jopa 60 tunnin kuluttua. Päinvastoin lähtösiemensooli höyrytelöityy 0,04 mol/l:n natriumkloridipitoisuudella.

Päällystetyn soolin väri on oleellisesti identtinen siemensoolin värin kanssa. Maksimiabsorptio tapahtuu aallonpituuksilla 539 ja 533 nm. Höytelöityessä esim. natriumkloridin vaikutuksesta todetaan luonteenomainen värin vaihtuminen punainen-vaaleanpunaisesta siniseksi ja lopuksi harmaa-värittömäksi sekä siemensoolille että päällystetyille soolille.

2.2 Immunoglobuliini G:n (anti-humaanikoriogonadotropiini, a-hCG) kemiallinen, kovalenttinen sitominen polymeerillä päällystettyyn kultasooliin

Aldehydiryhmiä vienti

100 ml kapseloitua, mikrosuodatettua kultasoolia esimerkistä 2.1 sekoitetaan 8,7 ml:aan 0,5 mol/l natriumperjodaattiliuosta pH:ssa 4,6.

15 Päällystettyä, mikrosuodatettua kultasoolia, joka on sekoitettu 8,7 ml:aan tislattua vettä, pidetään tyhjäkokeena.

20 Näitä seoksia pidetään 75 minuuttia huoneen lämpötilassa. Sitten hapettuminen pysäytetään lisäämällä 304 ml etyleeniglykolia, jonka jälkeen seoksia sekoitetaan vielä 60 minuuttia. Sitten soolit mikrosuodatetaan käyttäen 20-kertaista tilavuutta tislattua vettä.

a-hCG 293A:n kemiallinen sitoutuminen aldehydiryhmä sisältävään päällystettyyn kultasooliin

25 100 ml aldehydi-funktionaalisia ryhmiä sisältävää kultasoolia sekoitetaan 5 ml:aan puskuroitua a-hCG-liuosta (boraattipuskuri, pH 9<sup>a</sup>). Vertailun vuoksi kontrolli (tyhjäkoe) käsitellään samalla tavalla.

30 Seoksia inkuboidaan huoneen lämpötilassa 18 tuntia, minkä jälkeen ne suodatetaan karkean nailonsuodattimen läpi.

Sitten soolit pestään kahdesti Tris-puskurilla, pH 8<sup>b</sup>), sentrifugoimalla sooleja 60 minuuttia kiihtyvyydellä 700 g.

Sedimentit suspendoidaan uudelleen Tris-puskuriin. Päälystetyt kultasoolit, jotka on käsitelty tällä tavalla, testataan niiden immunologisen aktiivisuuden suhteen käyttäen Predictor-tikkua (Chefaro International). Tähän tarkoitukseen 0,3 ml konjugaattia (optinen tiheys 8,33) sekoitetaan 0,2 ml:aan virtsaa, joka sisältää 0,50 ja 1 000 kansainvälistä yksikköä (I.U.) hCG:tä litraa kohti, vastaavasti. Monoklonaalilla a-hCG:llä (147B) päälystetty tikku viedään kultasooli/virtaseokseen, ja tikkua inkuboidaan 30 minuuttia huoneen lämpötilassa. Sitten tikku pestään vedellä ja väri luetaan. Tulokset on annettu alla olevassa taulukossa I.

**Taulukko I**

15

	<b>hCG:n pitoisuus I.U./l</b>	<b>Kontrollisooli</b>	<b>Aldehydisooli</b>
20	0	-	-
	50	-	+
	1 000	-	+

25

- tarkoittaa, ettei tikussa näy väriä

+ tarkoittaa, että tikussa näkyy punainen-vaalean-punainen väri

<sup>a)</sup> boraattipuskurin koostumus:

30

liuos A: 0,2 mol/l boorihappo + 0,2 mol/l kaliumkloridi

liuos B: 0,2 mol/l natriumkarbonaatti

Liuoksen A pH saatetaan arvoon pH 9 lisäämällä liuosta B.

35

Puskuroitu a-hCG-liuos: 1 tilavuusosa a-hCG:tä (9,9 mg/ml) ja 8,4 tilavuusosaa 0,2 mol/l boraattipuskuria.

<sup>b)</sup> Tris-puskurin koostumus:

0,25 mol/l Tris(2-amino-2-(hydroksimetyyli)-1,3-propaanidioli)

0,25 mol/l natriumkloridi

5 1,29 g naudan seerumin albumiinia litrassa

0,025 g tiomersaalia litrassa

Liuoksen pH saatetaan arvoon pH 8 lisäämällä väkevää kloorivetyhappoa.

10 2.3 Paksun polymeerikuoren valmistaminen yksittäisten kultapartikkeleiden ympärille

Kultapartikkeleiden päällystykseen valitaan esimerkiksi 2.1 menetelmä lukuunottamatta syötetyn monomeerin koostumusta.

Syötetty monomeerikoostumus:

15 1,70 g glysidyyylimetakrylaatti

0,85 g natriumvinyylisulfonaatti

0,85 g N-metyleenibisakryyliamidi

50 ml tislattu vesi

50 ml metanoli

20 200 ml näin saatua soolia mikro-suodatetaan käyttäen 6 000 ml tislattua vettä ja karakterisoidaan. Käyttäen transmissioelektronimikroskopiaa polymeerikuoren paksuudeksi arvioidaan runsaat 25 nm; kvasielastisella valonsirronnalla saadaan kuoren paksuudeksi 40 nm, mikä osoittaa polymeerikuoren turpoavan vedessä. Suurin osa (>95 %) partikkeleista muodostuu yhdestä ainoasta polymeerikuoren ympäröimästä kultatimestä.

30 Päällystetty, mikro-suodatettu kultasooli ei höytelöidy 0,4 mol/l natriumkloridiliuoksessa edes 60 tunnin kuluttua. Höytelöitymistä tapahtuu huomattavasti korkeammissa natriumkloridipitoisuuksissa, mutta värinmuodostusta, mikä on luonteenomaista päällystämättömien kultasoolien höytelöitymiselle, ei enää tapahdu. Sen sijaan toodetaan punainen-vaaleanpunaisia höytelöitä. Jos siemenkultasooli korvataan vastaavalla tilavuudella vettä, monomee-

35

rien polymeroituminen johtaa pysyvään lateksiin, jonka partikkelikoko on runsaat 120 nm.

### Esimerkki 3

#### **Väriainesoolin päällystys**

##### 5 3.1 Siemensoolin valmistus

50 g Palanil light red -väriä (disperssi väriaineliete, BASF n:o 7 764 060) sekoitetaan 1 000 ml:aan tislattua vettä 45 minuutin aikana huoneen lämpötilassa. Tämä väriainesooli puhdistetaan pesemällä kuusi kertaa peräkkäin tislattulla vedellä. Ensimmäiset viisi pesuvaihetta suoritetään sentrifugoimalla kiihtyvyydellä 2 000 g 30 minuutin ajan ja dispergoimalla uudelleen tislattuun veteen. Viimeinen sentrifugointivaihe suoritetaan kiihtyvyydellä 125 g 60 minuutin ajan. Tämä puhdistusprosessi poistaa tehokkaasti ylimääräisen pinta-aktiivisen aineen. Lisäksi tapahtuu jonkin verran fraktioitumista. Raakasoolin pintajännitys on 43,5 dyne/cm, puhdistetun soolin pintajännitys on 71,1 dyne/ml molemmat mitattuna kiinteiden aineiden pitoisuudella 4,8 g väriainetta litrassa.

##### 20 3.2 Päällystys

125 ml laimeaa, pestyä väriainesoolia (0,145 %) lämmitetään 70-°C:iseksi ja sekoitetaan (200 kierrosta minuutissa) reaktioastiassa. Sitten lisätään 12,5 ml liuosta, joka sisältää 0,10 g natriumbikarbonaattia ja 0,10 g kaliumpersulfaattia vedessä. Tämän jälkeen lisätään 12,5 ml monomeeriliuosta, jolla on seuraavassa esitetty koostumus, peristalttista pumppua käyttäen yhden tunnin kuluessa.

Syötetty monomeeri:

30 2 g glysidyyylimetakrylaatti  
1 g natriumvinyylisulfonaatti  
0,5 g N-metyleenibisakryyliamidi  
50 ml tislattu vesi  
50 ml metanoli

Soolikoostumus jäädytetään 16 tunnin kuluttua ja 100 ml puhdistetaan mikrosuodattamalla käyttäen 2 500 ml tislattua vettä. Päälystetyn soolin halkaisija on 86 nm suurempi kuin alkuperäisen soolin, joka on 316 nm. Sooli-  
5 koostumuksen sentrifugointi 52-%:isessa (w/w) glukoosive-  
siliuoksessa, jonka tiheys on 1,23 g/ml, johtaa putken  
pohjalle sedimentoituneisiin punaisiin partikkeleihin.  
Supernatanttinesteen pinnalla ei havaita erillisiä poly-  
meeripartikkeleita. Erillisiä partikkeleita ei todeta  
10 myöskään "sedimentation field flow fractination" -kokeis-  
sa.

Pinnan modifioinnin vaikutus proteiinien adsorp-  
tioon on huomattava. Kaksi neljän millilitran putkea täy-  
tetään yhdellä millilitralla päälystämätöntä, puhdistet-  
15 ttua soolia ja yhdellä millilitralla päälystettyä, puhdis-  
tettua väriainesoolia, vastaavasti. Kumpikin putki sisäl-  
tää 0,054 g väriainetta. 1,75 ml fosfaattipuskuria<sup>1</sup>, pH  
7,4, ja sitten 0,76 ml liuosta, joka sisältää 2,67 mg/ml  
naudan seerumin albumiinia (R-tyyppi, Organon Teknika),  
20 lisätään näihin putkiin.

Putkia ravistellaan huoneen lämpötilassa kaksi tun-  
tia, minkä jälkeen ne sentrifugoidaan. Supernatanttines-  
teen naudan seerumin albumiini -pitoisuus määritetään  
HPSEC:llä (korkeapainegeelisuodatus). 0,28 mg/m<sup>2</sup> proteiinia  
25 on adsorboitunut päälystämättömään, puhdistettuun soo-  
liin; päälystetyssä soolissa ei todeta adsorboitunutta  
proteiinia.

---

<sup>1</sup> Fosfaattipuskurin koostumus:  
30 Liuos A: 9,0772 g kaliumdivetyfosfaattia yhdessä  
litrassa vettä,  
Liuos B: 11,8586 g dinatriumvetyfosfaattia yhdessä  
litrassa vettä. Sekoita 5 osaa liuosta A 24 osaan  
liuosta B.

3.3 Immunoglobuliini G:n (anti-humaanikoriogona-  
dotropiini, a-hCG) kemiallinen, kovalenttinen si-  
toutuminen polymeerillä päällystettyyn väriainesoo-  
liin

5 3.3.1 Aldehydiryhmiä sisältävien väriainesoolien valmistus

Kapseloitu, mikrosuodatettu väriainesooli esimerkiksi 3.2 ja muita näytteitä, joiden polymeerikerroksen paksuus on erilainen, varustetaan aldehydiryhmillä esimerkiksi 2.2 kuvatulla tavalla.

10 3.3.2 a-hCG 293A:n kemiallinen sitoutuminen päällystettyyn, aldehydiryhmä sisältävään väriainesooliin

a-hCG:n kytkentä aldehydi -funktionaalisia ryhmiä sisältäviin sooleihin suoritetaan esimerkissä 2.2 kuvatulla tavalla.

15 3.4 Immunologinen määrittäminen

Näin valmistettujen (a-hCG)-väriainesoolikonjugaattien immunologinen aktiivisuus testataan a-hCG:n kaksikerros-immunologisella määrittämenetelmällä, kuten esimerkiksi 2.2 on kuvattu, inkuboimalla a-hCG:llä (147B) päällystettyä upotustikkua (Predictor stick, Chefaro International) huoneen lämpötilassa seoksessa, jossa on hCG:tä sisältävää virtsaa ja konjugaattia ( $A_{28}^{1.0} = 8,3$ ). Sitten tikku huuhdotaan vedellä ja väri luetaan. Tulokset on annettu taulukossa II.

25

**Taulukko II**

Väriainesooli-(a-hCG)-konjugaatit testattuina upotustikkukaksikerros -immunologisella määrittymenelmällä (Predictor stick, Chefaro International)

	hCG:n ACI-126* pitoisuus	Inkubointi- ACI-127* aika	ACI-113*	ACI-124*	ACI-125*
5	0	0,5	-	-	-
10	-	-	-	-	-
15	200	0,5	+/-	+/-	-
	-	-	-	-	-
	1 000	0,5	+	+	+/-
20	-	-	-	-	-
	10 000	0,5	+	+	+
	+/-	+/-			
25	0	1,0	-	-	-
	-	-	-	-	-
	200	1,0	+/-	+/-	+/-
	-	-	-	-	-
	1 000	1,0	+	+	+
30	+/-	-	-	-	-
	10 000	1,0	+	+	+
	+	+			
35	0	2,0	-	-	-
	-	-	-	-	-
	200	2,0	+/-	+	+/-
	-	-	-	-	-
	1 000	2,0	+	+	+
40	+/-	+/-			
	10 000	2,0	+	+	+
	+	+			

45 \*konjugaatti perustui polymeerillä päällystettyihin väriainesooleihin, joiden päällystyskerroksen paksuus vaihteli seuraavasti (mitattu dynamisella valonsironnalla/QELS):

ACI-113 : 86 nm    ACI-124: 88 nm    ACI-125 : 58 nm  
ACI-126 : 30 nm    ACI-127 : 35 nm

50

+ valkoisessa tikussa punainen-vaaleanpunainen väri  
- valkoisessa tikussa ei näy väriä

**Esimerkki 4****Kultapartikkeleiden päällystys kuoripolymeerin liu-  
koisuusrajan yläpuolella**

800 ml siemenkultasoolia (0,032 paino-%; katso esi-  
5 merkistä 1 tämän siemensoolin valmistus) lämmitetään 70-  
°C:iseksi termostaatilla kontrolloidussa reaktioastiassa,  
jossa on palautusjäähdytin ja sekoittaja. 10 ml liuosta,  
joka sisältää 0,32 g kaliumpersulfaattia ja 0,32 g nat-  
riumkarbonaattia 50 ml:ssa tislattua vettä, lisätään ti-  
10 pottain, ja 10 ml monomeeriliuosta, jonka koostumus on  
esitetty seuraavassa, lisätään tipottain yhden tunnin ku-  
luessa.

Syötetty monomeeriliuos:

12 g vinyyliasettaatti  
15 4 g dietyylimaleaatti  
3 g dietyyliviinihapon diamidi  
50 ml vesi  
50 ml metanoli

Jäljelle jäänyt käynnistin/puskuriliuos lisätään  
20 monomeerien lisäyksen aikana. 24 tunnin kuluttua monomee-  
rien lisäyksestä reaktioastia jäähdytetään huoneen lämpö-  
tilaan, ja sooli puhdistetaan mikrosuodattamalla käyttäen  
25-kertaista tilavuutta vettä suhteessa alkuperäiseen soo-  
lin tilavuuteen. Polymeerikuoria ei voida todeta partikke-  
25 leiden ympärillä, ja kolloidinen stabiilius on aivan yhtä  
alhainen kuin "päällystämättömällä" siemensoolilla. Poly-  
meroinnin toistaminen käyttäen vettä siemensoolin sijasta  
ei tuota liukenematonta polymeeriä: liuos pysyy kirkkaana.  
Jos polymerointiprosessi kuitenkin suoritetaan lisäämällä  
30 ei 10 ml vaan 80 ml yllä olevaa monomeeriliuosta tunnin  
kuluessa, saadaan ilman siemensoolia lateksi, jonka par-  
tikkelikoko on 152 nm. Kultapartikkeleiden läsnäollessa  
muodostuu kultapartikkeleiden ympärille polymeerikuori,  
jonka paksuus on 27 nm. Kolloidinen stabiilius on myös  
35 selvästi suurempi kuin siemensoolilla.

**Esimerkki 5****Kultapartikkeleiden päällystys päällystysmonomeerin liukoisuusrajan alapuolella**

100 ml 0,032 paino-%:ista siemensoolia (katso valmistus esimerkistä 1) lämmitetään 70-°C:iseksi typpikuvun alla. 5 ml liuosta, joka sisältää 0,1 g kaliumpersulfaattia ja 0,1 g natriumbikarbonaattia, lisätään tipottain tähän sooliin. Tämän jälkeen lisätään 2,2 ml monomeeriliuosta, jonka koostumus on esitetty seuraavassa, peristalttisen pumpun avulla.

Monomeerin syöttökoostumus:

5 g styreeni

1 g akryyliamidi

80 ml metanoli

Kun seosta on sekoitettu ja lämmitetty 70 °C:ssa 24 tunnin ajan, reaktioastia jäähdytetään huoneen lämpötilaan. Kultasooli mikrosuodatetaan käyttäen 25-kertaista tilavuutta vettä. Puhdistettu sooli kestää 0,10 mol/l natriumkloridia seisottuaan 24 tuntia. Toisen sukupolven polymeeripartikkeleita ei ole muodostunut. Näissä olosuhteissa styreenimonomeeri liukenee täydellisesti reaktio-seokseen.

Kun tämä polymerointi suoritetaan ilman kultasoolia käyttäen vettä sen tilalla, muodostuu kolloidinen, pysyvä lateksi, jonka partikkelikoko on 120 nm.

Jos kuitenkin käytetään korkeampaa syöttömonomeeripitoisuutta lisäämällä 3,4 ml seuraavaa koostumusta:

10 g styreeni

2 g akryyliamidi

80 ml metanoli

syntyy uusi polymeeripartikkelisukupolvi. Tässä korkeamassa monomeeripitoisuudessa styreenimonomeeri ei enää liukene seokseen. Lisäksi näin käsitellyt kultapartikkelit kestävät suolaa huonosti ja puhdistuksen jälkeen sooli höytelöityy jo 0,04 mol/l NaCl:lla, mikä on sama pitoisuus

kuin lähtösoolille (siemensooli). Voidaan tehdä se johtopäätös, ettei tässä tapauksessa partikkeleiden päällystystä polymeerilla tapahdu. Päinvastoin kuin kultapartikkelit, vasta muodostetut polymeeripartikkelit kestävät suurempia natriumkloridipitoisuuksia kuin 0,1 mol/l.

5

**Esimerkki 6**

**Vertailuesimerkki, joka on analoginen US-patenttijulkaisun 4 157 323 esimerkin 3 kanssa**

1,8 g hydroksietyylimetakrylaattia, 0,3 g N-metyleenibisakryyliamidia, 0,6 g akryyliamidia ja 0,3 g metakryylihappoa liuotetaan 90 ml:aan deionisoitua (Milli-Q) vettä kaksoisseinäisessä reaktioastiassa.

10

Liuos lämmitetään 70-C:iseksi, ja sitä sekoitetaan kierrosnopeudella 200 kierrosta minuutissa. Sitten lisätään 0,1 g kaliumpersulfaattia ja 0,1 g natriumbikarbonaattia liuotettuna 10 ml:aan vettä.

15

Noin 3 - 5 minuutin kuluttua muodostuu suuria, valkoisia höytelöitä. Tämä osoittaa ei-kolloidisen polymeerin muodostumista.

20

**Vertailuesimerkki, joka on analoginen US-patenttijulkaisun 4 157 323 esimerkin 11 kanssa**

0,64 g hydroksietyylimetakrylaattia, 0,70 g metyyylimetakrylaattia, 0,64 g metakryylihappoa ja 0,224 g etyleeniglykolidimetakrylaattia liuotetaan 90 ml:aan deionisoitua (Milli-Q) vettä kaksoisseinäisessä reaktioastiassa.

25

Reaktiolämpötilaksi valitaan huoneen lämpötila. 0,08 g kaliumpersulfaattia ja 0,04 g natriumbisulfiittia liuotettuna 10 ml:aan vettä lisätään seokseen.

30

15 minuutin kuluttua todetaan pysymätön lateksi (höytelöitynyt polymeeri).

## Patenttivaatimukset

1. Diagnostisiin testeihin tarkoitettu vesipitoinen suspensio, joka sisältää ei-polymeeriytimiä, joita ympäröi funktionaalisia ryhmiä sisältävä, hydrofiilinen kopolymeri, t u n n e t t u siitä, että ei-polymeeriytimet eivät ole magneettisesti herkkiä ja ovat kukin erikseen oman kopolymerikuorensa ympäröimiä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen vesipitoinen suspensio immunodiagnostisiin testeihin.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen vesipitoinen suspensio, t u n n e t t u siitä, että ydin on metalli, metallioksidi tai metalliyhdiste, jolloin metalli ei ole magneettisesti herkkä, epäorgaaninen yhdiste, orgaaninen väriaine, orgaaninen pigmentti tai synteettisen, eläin-, kasvi- tai mineraaliöljyemulsion pisara.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen vesipitoinen suspensio, t u n n e t t u siitä, että ydin on kultasooli tai väriainesooli.

5. Menetelmä vesipitoisen suspension valmistamiseksi diagnostisiin tai immunodiagnostisiin testeihin in situ -kopolymeroimalla veteen liuotettu monomeeriseos ei-polymeripartikkeleiden läsnä ollessa, jolloin monomeeriseos sisältää seuraavantyyppisiä monomeereja:

etyleenisesti tyydyttymättömän monomeerin, joka hydrolysoimatta tai hydrolyysin jälkeen sisältää ainakin yhden kovalenttisesti sitovan funktionaalisen ryhmän, hydrofobisen monomeerin ja

liittävän monomeerin, t u n n e t t u siitä, että suspensio valmistetaan käyttäen lähtöaineena magneettisesti epäherkkien ei-polymeripartikkeleiden pysyvää, kolloidista dispersiota ja lisätään tähän monomeeriseos, joka on valittu siten, että muodostuvan kopolymerin varaus on identtinen alkuperäisen dispersion varauksen kanssa.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty hydrofobinen monomeeri on monomeeri, joka sisältää ryhmiä, jotka voidaan hydrolysoida hydrofiilliseksi ryhmiksi, ja että polymeroinnin jälkeen nämä hydrolysoituvat ryhmät hydrolysoidaan.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monomeeriseos sisältää:  
2 - 98 paino-% glysidyylietakrylaattia,  
0 - 96 paino-% natriumvinyylisulfonaattia ja  
10 2 - 40 paino-% N,N-metyleenibisakryyliamidia.

8. Diagnostisiin testeihin tarkoitettu reagenssi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää magneettisesti epäherkkiä ei-polymeriytimiä, joita kutakin ympäröi hydrofiillistä kopolymeria oleva oma kuori, jolloin kopolymeri on varustettu reagoivalla aineella.

9. Immunokemiallinen reagenssi t u n n e t t u siitä, että se sisältää magneettisesti epäherkkiä ei-polymeriytimiä, joita kutakin ympäröi hydrofiillistä kopolymeria oleva oma kuori, jolloin kopolymeri on varustettu immunokemiallisesti aktiivisella aineella.

10. Menetelmä spesifisesti sitoutuvan aineen toteamiseksi testinesteestä, t u n n e t t u siitä, että käytetään vähintään yhtä patenttivaatimuksen 8 mukaista reagenssia, jolloin mainitulla spesifisesti sitoutuvalla aineella on sitoutumisaffiniteettia reagenssissa olevaa reagoivaa ainetta kohtaan.

11. Menetelmä immunokemiallisesti aktiivisen komponentin toteamiseksi testinesteestä, t u n n e t t u siitä, että käytetään vähintään yhtä patenttivaatimuksen 9 mukaista immunokemiallista reagenssia, jolloin mainitulla immunokemiallisesti aktiivisella komponentilla on sitoutumisaffiniteettia immunokemiallisessa reagenssissa olevaa immunokemiallisesti aktiivista ainetta kohtaan.

12. Testipakkaus käytettäväksi diagnostisessa testissä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään yhden patenttivaatimuksen 8 mukaisen reagenssin.

5 13. Testipakkaus käytettäväksi immunologisessa määrittämissä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vähintään yhden patenttivaatimuksen 9 mukaisen immunokemiallisen reagenssin.

## Patentkrav

1. Vattenhaltig suspension för diagnostiska test innehållande icke-polymera kärnor, som omsluts av en hydrofil sampolymer som innehåller funktionella grupper, k ä n n e t e c k n a d av att de icke-polymera kärnorna inte är magnetiskt känsliga och var och en av dem omsluts av sitt eget sampolymerkal.

2. Vattenhaltig suspension enligt patentkrav 1 för immunodiagnostiska test.

3. Vattenhaltig suspension enligt patentkrav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d av att kärnan är av en metall, en metalloxid eller en metallförening, varvid metallen inte är magnetiskt känslig, en oorganisk förening, ett organiskt färgämne, ett organiskt pigment eller en droppe av en syntetisk, djur-, växt- eller mineraloljееmulSION.

4. Vattenhaltig suspension enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a d av att kärnan är en guldsol eller en färgämnessol.

5. Förfarande för framställning av en vattenhaltig suspension för diagnostiska eller immunodiagnostiska test genom in situ-sampolymerisering av en i vatten upplöst monomerblandning i närvaro av icke-polymera partiklar, varvid monomerblandningen innehåller monomerer av följande typer:

en etylent omättad monomer, som utan hydrolys eller efter hydrolys innehåller åtminstone en kovalent bindande funktionell grupp,

en hydrofob monomer och

en bindande monomer, k ä n n e t e c k n a t av att suspensionen framställs under användning av en stabil, kolloid dispersion av icke-polymera partiklar, som inte är magnetiskt känsliga, som utgångsämne och monomerblandningen tillsätts däri, varvid monomerblandningen är så vald

att den uppkommande sampolymerens laddning är identisk med den ursprungliga dispersionens laddning.

5 6. Förfarande enligt patentkrav 5, k ä n n e -  
t e c k n a t av att den använda hydrofoba monomeren är  
en monomer som innehåller grupper som kan hydrolyseras  
till hydrofila grupper, och att dessa hydrolyserbara grup-  
per hydrolyseras efter polymeriseringen.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e -  
t e c k n a t av att monomerblandningen innehåller:

- 10 2 - 98 vikt-% glycidylmetakrylat,  
0 - 96 vikt% natriumvinylsulfonat och  
2 - 40 vikt-% N,N-metylenbisakrylamid.

8. Reagens för diagnostiska test,  
15 k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller magnetiskt  
okänsliga icke-polymera kärnor, vilka vardera omsluts av  
ett eget skal av en hydrofil sampolymer, varvid sampolyme-  
ren är försedd med ett reagerande ämne.

9. Immunokemisk reagens, k ä n n e t e c k n a d  
20 av att den innehåller magnetiskt okänsliga icke-polymera  
kärnor, vilka vardera omsluts av ett eget skal av en hyd-  
rofil sampolymer, varvid sampolymeren är försedd med ett  
immunokemiskt aktivt ämne.

10. Förfarande för detektering av ett specifikt sig  
bindande ämne i en testvätska, k ä n n e t e c k n a t  
25 av att åtminstone en reagens enligt patentkrav 8 används,  
varvid nämnda specifikt sig bindande ämne har bindings-  
affinitet för det reagerande ämnet i reagensen.

11. Förfarande för detektering av en immunokemiskt  
aktiv komponent i en testvätska, k ä n n e t e c k n a t  
30 av att åtminstone en immunokemisk reagens enligt patent-  
krav 9 används, varvid nämnda immunokemiskt aktiva kom-  
ponent har bindingsaffinitet för det immunokemiskt aktiva  
ämnet i reagensen.

12. Testförpackning för användning vid ett diagnostiskt test, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller åtminstone en reagens enligt patentkrav 8.

5 13. Testförpackning för användning vid ett immunologiskt bestämningsförfarande, k ä n n e t e c k n a d av att den innehåller åtminstone en immunokemisk reagens enligt patentkrav 9.

fig.1

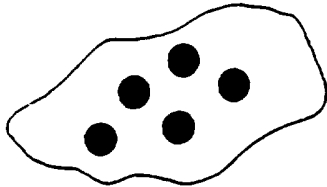
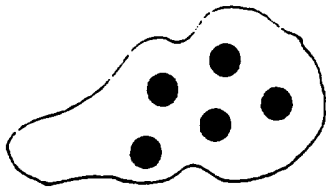


fig.2

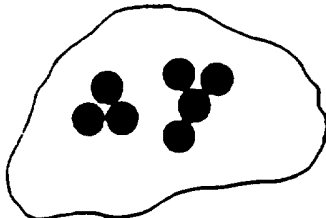
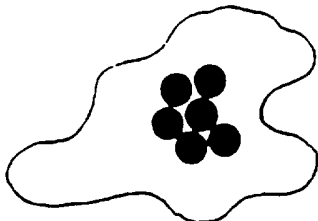


fig.3

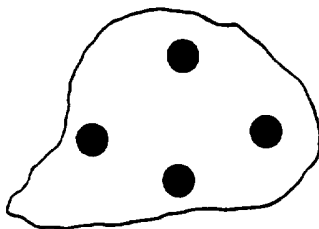
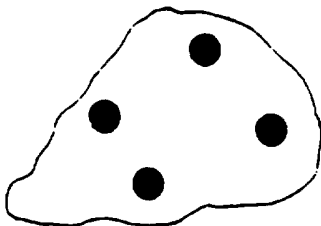


fig.4

