



FI000102417B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 102417 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 30.11.1998

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

G 01N 33/532, 33/553, 33/58

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 915727

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 04.12.1991

(24) Alkupaivä - Löpdag 04.12.1991

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 06.06.1992

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

05.12.1990 US 622462 P

(73) Haltija - Innehavare

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

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Shigekawa, Brian Layne, 1502 Cumberland Road, Chapel Hill, NC 27514, USA, (US)

2. Hsieh, Yung-Ao, 309 Wyatts Pond Lane, Cary, NC 27513, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Kultasoolimikrohiukkasia, menetelmiä niiden valmistamiseksi ja käyttämiseksi ja niitä sisältäviä diagnosointipakkauksia
Guldsolmikropartiklar förfaranden för framställning och användning av dessa och dessa innehållande diagnostiska förpackningar

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 7654 (G 01N 33/58), US A 4879220 (G 01N 33/53)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee kultasoolia, joka on päällystetty alkaanitiroleilla ja alkaanitioli-johdannaisilla sellaisten ryhmien muodostamiseksi soolin pinnalle, jotka ovat käytettävissä sitoutuvien komponenttien, kuten vasta-aineiden, antigeenien tai ligandien, liittämiseen kultasooliin. Kultasooliin lisäksi sidottujen di- ja tritio-liyhdisteiden käyttö helpottaa myös vasta-aineiden, antigeenien tai ligandien adsorptiota sooliin. Keksintö koskee myös päällystysmenetelmää ja testipakkauksia, jotka sisältävät päällystettyjä sooleja.

Uppfinningen avser en guldsol, vilken är överdragen med alkanetioler och alkanetiolderivat för bildande av sådana grupper på solytan, vilka är användbara för kopplande av bindande komponenter, såsom antikroppar, antigener eller ligander till guldsolen. Di- och tri-tiol-föreningar, vilka är bundna till guldsolen förenklar även adsorptionen av antikroppar, antigener eller ligander till solen. Uppfinningen avser även ett överdragningsförfarande och testförpackningar, vilka innehåller överdragna soler.

Kultasoolimikrohiukkasia, menetelmiä niiden valmistamiseksi ja käyttämiseksi ja niitä sisältäviä diagnosointipakkauksia

Tämä keksintö koskee kultasoolia, joka on päällystetty alkaanitiroleilla ja alkaanitiolijohdannaisilla sellaisten ryhmien muodostamiseksi soolin pinnalle, jotka ovat käytettävissä sitoutuvien komponenttien, kuten vasta-aineiden, antigeenien tai ligandien, sitomiseen tai kytkemiseen kultasooliin. Lisäksi kultasooliin sidottujen di- ja tri-
10 tiolilyhdisteiden käyttö helpottaa näiden sitoutuvien komponenttien passiivista adsorptiota. Tämä keksintö koskee myös kultasoolia, joka on päällystetty tioloiduilla sitoutuvilla komponenteilla antigeenit, vasta-aineet ja kanta-
15 jamolekyylit mukaan luettuina, jotka voidaan liittää yhteen relevanttien ligandien kanssa. Keksinnön piiriin kuuluu myös menetelmä kultasoolien päällystämiseksi sellaisilla tiolilyhdisteillä, menetelmät sitoutuvan komponentin liittämiseksi kultasoolimikrohiukkasiin sekä testipakkaukset, jotka sisältävät sellaisia päällystettyjä kultasooleja.

Testausmenetelmiä erilaisten sairauksien diagnosoinniseksi ovat koko ajan paranemassa. Immunologiset menetelmät kuuluvat nykyisin herkimpiin menetelmiin antigeenien ja vasta-aineiden läsnäolon toteamiseksi näytteistä. Nämä määritykset ovat immuunidiagnostiikan alan ammattimiehille
20 tuttuja. Immunologinen määrittäminen koostuu yleensä testistä, jossa käytetään monoklonaalista tai polyklonaalista vastaainetta näytteessä esiintyvän antigeenin sitomiseen ja toinen vasta-aine, joka sisältää merkkiainetta, kuten fluoresoivaa yhdistettä tai entsyymiä, reagoi immuunikemiallisesti antigeeni-vasta-ainekompleksin kanssa. Tuloksena oleva vasta-aine-antigeeni-vasta-ainekompleksi detektoidaan. Muunnelmat tästä perustestistä ovat yleisiä, esimerkkeinä
30 vain yhden reaktiivisen vasta-aineen käyttö testissä, kompetitiiviseen inhibitioon perustuva menetelmä ja hiukkasten käyttö merkkiaineina, jotka mahdollistavat agg-
35

lutinaatioreaktion tulkitsemisen. Yksi muunnos on vielä sellaisella antigeenilla tai vasta-aineella päällystettyjen mikrohiukkasten käyttö, joka muodostettuaan kompleksin analysoitavan aineen ja toisen, sopivalla tavalla leimatun sitoutumiskumppanin kanssa antaa positiivisen reaktion.

5 Mikroskooppisia kultasoolihiukkasia käytetään määrittymen menetelmässä, joka tunnetaan soolihiukkasimuunimäärityksenä (SPIA). Tässä määrittäksessä sopivalla sitoutumiskumppanilla, joko vasta-aineella tai antigeenilla, päällystettyä kultasoolia sisältävä liuos pannaan reagoimaan näytteen kanssa sen sitomiseksi sitoutumiskumppaniin. Tässä prosessissa muodostuu komplekseja, jotka voidaan detektoida, tavallisesti värinmuutoksensa perusteella.

10 Päällystämättömät kultasoolihiukkaset ja muut kolloidit agglomeroituvat joutuessaan alttiiksi pienille suolapitoisuuksille ja saostuvat nopeasti liuoksesta. Siksi kultasoolin päällystämällä sopivalla sitoutumiskumppanilla on kaksi tarkoitusta. Ensimmäinen on saada aikaan asianmukainen immunologinen sitomisaktiivisuus ja toinen on suojata agglomeroitumiselta, joka pakostakin tapahtuisi immunologisten reaktioiden optimointiin tarkoitetuissa puskureissa. Koska kaikki proteenit tai polymeerit eivät suojaa kultasoolia täydellisesti suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta, toteutetaan tavallisesti uusi päällystysvaihe sellaisella proteenilla tai polymeerillä, jonka tiedetään kykenevän suojaamaan kultasoolin täydellisesti suolan aiheuttamalta agglomeroitumiselta. Sellainen uudelleenpäällystysvaihe on tunnettu käytäntö vasta-aineiden ja antigeenien adsorboinnissa muovisubstraatteihin, ja sen on osoitettu parantavan päällystetyn materiaalin stabiili-

15
20
25
30

35 Uudelleenpäällystys vähentää myös kultasoolin epäspesifistä vuorovaikutusta näytteen aineosien kanssa. Tämä epäspesifinen vuorovaikutus on huomattava ongelma silloin, kun diagnostisissa määrittäksissä käytetään vasta-aineella

päälystettyjä lateksihiukkasia, ja todennäköisesti monissa, ellei peräti kaikissa, immuunimäärityksissä - niiden muodosta riippumatta - havaittavan epäspesifisen seerumi-häirinnän ilmenemismuoto. Joissakin tapauksissa on sallit-
5 tua vaihtaa uudelleenpäälystysproteiini tai -polymeeri häirinnän minimoimiseksi määrätyissä systeemeissä. Voidaan käyttää soolin väliaineeseen lisättäviä lisäaineita, kuten guanidiinihydrokloridia tai ureaa. Silloin tällöin "epä-
spesifinen" häirintä voidaan paikallistaa seerumin hetero-
10 fiilinen aktiivisuudesta aiheutuvaksi ja poistaa lisäämäl- lä eläimen kokoseerumia.

Vakava puute toivotun sitoutumiskumppanin passiivi-
sessa adsorptiossa kultakolloidiin on ollut se, että sel-
lainen suora päälystys usein tulokseton. Kolloideihin ta-
15 pahtuvan polymeerien passiivisen adsorption fysikokemial- liset mekanismit tunnetaan yleensäkin huonosti. Vasta-ai-
neiden adsorptiosta kultasooliin saattaa olla tuloksena päälystetty sooli, joka on suojattu huonosti suolan ai-
heuttamalta agglomeraatiolta ja jota ei voida suojata li-
20 sää uudella päälystyksellä. Tuloksena voi olla myös pääl- lystetty sooli, jonka immunologinen aktiivisuus on heikko,
otaksuttavasti adsorboituneen vasta-aineen väärän orien-
toitumisen vuoksi, tai itse soolin agglomeroituminen vas-
ta-aineen aiheuttamana. Lisäksi haluttu vasta-aine ei ehkä
25 yksinkertaisesti sitoudu sooliin. Lopputuloksena näistä ongelmista on, että harvoja muissa diagnosointimuodoissa käyttökelpoisia biologisia reagensseja voidaan käyttää diagnostiikkalaatua olevien kultakolloidireagenssien val-
mistuksessa.

30 Alalla tarvitaan menetelmä sitoutumiskumppaneiden, proteiinien, hiilihydraattien tai ligandien sitomiseksi kultasooliin niin, että voidaan välttää passiivisen ad-
sorption ominaispiirteisiin liittyvät epävarmuudet tai välttämättömyys valmistaa sitoutumiskumppanin ja "hyvänä
35 päälysteenä" toimivan kantajan välinen konjugaatti pas-

siivista adsorptiota varten. Sellainen sooli olisi varsinkin huomattavasti käyttökelpoisempi, jos se vastustaisi suolan aiheuttamaa agglomeroitumista jo ilman päällystetyn sitoutumiskumppanin läsnäoloa. Kyky muuntaa soolin fysiko-

5 kokemiallisia pintaominaisuuksia tekisi samalla mahdolliseksi minimoida joskus epämääräiset näyte-soolivuorovaikutukset, jotka ovat vastuussa epäspesifisestä häirinnästä immuunikemiallisissa diagnostisissa määrityksissä ja taustaongelmista immunosytokemiallisissa määrityksissä.

10 Kaivataan myös mahdollisuutta helpottaa biologisten polymeerien passiivista adsorptiota kultasooleihin. Vasta-aineiden ja polymeerien tiolointi pystyy parantamaan niiden kykyä sitoutua kultasooleihin, kuten kasvanut resistenssi suolan aiheuttamaa agglomeraatiota kohtaan osoittaa. Sellainen kyky saattaa osoittautua hyödylliseksi vasta-

15 aineille, jotka sitoutuvat hyvin kultasooliin mutta menettävät niin tehdessään huomattavasti aktiivisuuttaan, samoin vasta-aineille, jotka eivät yksinkertaisesti sitoudu kultasooliin muuntamattomassa tilassa. Vaihtoehtoinen menetelmä soolin pinnan fysikokemiallisten ominaisuuksien muuttamiseksi, jotta vasta-aineen sitoutuminen helpottuu, on soolin päällystäminen di- tai tritiolihydrideillä. Sellainen välipäällystys voi muuttaa merkittävästi vasta-

20 aineiden passiivisia adsorptio-ominaisuuksia.

25 Tämä keksintö tarjoaa menetelmän kultasoolin mikrohiukkasten päällystämiseksi alkaanitioleilla, alkaanitio-lijohdannaisilla tai di- tai tritiolihydrideillä. Menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 14 esitetään. Alkaanitioleilla tai niiden johdannaisilla

30 päällystetyt kultasoolit ovat resistenttejä suolan aiheuttamalle agglomeraatiolle ja sisältävät polymeerin tai li-gandin sitomiseen kovalenttisesti soveltuvia kemiallisia ryhmiä. Saavutetaan määrätty hydrofobisuus-hydrofiilisyytasapaino ja soolin epäspesifiset vuorovaikutukset proteiinien kanssa saadaan yleensä minimoiduiksi. Varsinkin

35

kaukana n-alkaanitioliryhmästä sijaitsevat kemialliset ryhmät, kuten metyyli-, hydroksyyli-, karboksyyli-, amino-, sulfhydryyli- tai karbonyyliryhmät, ovat alttiina liuottimelle ja toimivat kovalenttisen sitoutumisen tapahtumapaikkoina ja voivat olla kohtia, joissa vallitsee hydrofobisuus-hydrofiilisyytasapaino.

Kultasoolin päällystys di- ja tritioliyhdisteillä, joilla on pieni moolimassa, ei suojaa soolia suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta mutta muuttaa päällystetyn soolin pinnan fysikokemiallista luonnetta ja helpottaa vasta-ainemolekyylien passiivista adsorptiota.

Tämän keksinnön piiriin kuuluu myös päällystetyn kultasoolin mikrohiukkaset, joille on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksessa 1 esitetään. Keksintö koskee myös päällystettyjä kultasoolihiukkasia, jotka ovat lisäksi sitoutuneet sitoutuviin komponentteihin, kuten vasta-aineisiin tai antigeneihin, sekä diagnostisia pakkauksia, jotka sisältävät mainittuja kultasoolihiukkasia.

Lisäksi keksintö koskee vielä päällystettyjä kultasoolieja, joihin sitoutuvat komponentit ovat liittyneet adsorptiolla, ja edelleen kuvataan päällystämätöntä kultasoolia, jossa adsorptiota on helpotettu tioloimalla sitoutuva komponentti.

Keksintö koskee myös menetelmiä sitoutuvan komponentin liittämiseksi kultasoolimikrohiukkasiin, joille menetelmille on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksissa 17 - 21 esitetään. Lisäksi keksintö koskee mikrohiukkasia ja puskuriliuosta sisältävää diagnosointipakkausta käytettäväksi immuunimäärityksissä.

Kuvio 1 havainnollistaa sitä suhteellista resistenssiä suolan aiheuttamaa kultasoolin agglomeraatiota vastaan, joka saadaan aikaan päällystämällä kultasooli anti-gp160-vasta-aineella (GC-143), erilaisilla pitoisuuksilla ja pH-arvoilla.

Kuvio 2 havainnollistaa sitä suhteellista resistenssiä suolan aiheuttamaa kultasoolin agglomeraatiota vastaan, joka saadaan aikaan päällystämällä TTC:llä päällystetty kultasooli anti-gp160-vasta-aineella (GC-143),
5 erilaisilla pitoisuuksilla ja pH-arvoilla.

Kuvio 3 havainnollistaa GC-143:n kykyä aiheuttaa kultasoolin spontaani agglomeraatio lisätyn suolan puuttuessa, erilaisilla pitoisuuksilla ja pH-arvoilla.

Kuvio 4 havainnollistaa GC-143:n kykyä aiheuttaa
10 TTC:llä päällystetyn kultasoolin spontaani agglomeraatio lisätyn suolan puuttuessa, erilaisilla pitoisuuksilla ja pH-arvoilla.

Kuvio 5 esittää kultasooliin adsorboituneen GC-143:n immunologista aktiivisuutta ja spesifisyyttä SPIA-määrityksessä.
15

Kuvio 6 esittää TTC:llä päällystettyyn kultasooliin adsorboituneen GC-143:n immunologista aktiivisuutta ja spesifisyyttä SPIA-määrityksessä.

Kuvio 7 havainnollistaa kultasooliin adsorboituneen, derivatisoimattoman, monoklonaalisen anti-HIV p24-vasta-aineen kykyä suojata soolia suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta.
20

Kuvio 8 havainnollistaa kultasooliin adsorboituneen, tioloidun, monoklonaalisen anti-HIV p24-vasta-aineen kykyä suojata soolia suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta.
25

Tämän keksinnön perustana on menetelmä kultasoolista koostuvien mikrohiukkasten päällystämiseksi kemiallisten kytkentäryhmien muodostamiseksi helpottamaan muiden ryhmien edelleen liittämistä. Keksinnön mukaiset mikrohiukkaset määritellään yleisesti kolloidiseksi kultasooliksi, joka vaihtelee kooltaan noin 20 nm:stä 200 nm:iin tai ylikin. Mikrohiukkasten edullinen koko on noin 60 - 80 nm. Edullisin koko on noin 65 - 75 nm. Jotkut käytettävistä
35 päällystyskemikaaleista, kuten alkaanitiolit ja nii-

den johdannaiset sekä niiden seokset, myös suojaavat kultasoolia suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta ja voivat synnyttää soolin pinnalle määrätyn hydrofobisuus-hydrofiilisyystasapainon, niin että pinnan epäspesifiset vuorovai-
5 kutukset ulkoisten proteiinien kanssa minimoituvat.

Kultasoolia valmistetaan kloorikulta(III)hapon hydroksyyliamiinivälitteisellä pelkistyksellä vedessä kultasiemenhiukkasten pinnalle. Tätä menetelmää on kuvattu kirjallisuudessa (J. Turkevich et al., Discussions of the
10 Faraday Society 1951, nro 11, 55 - 74). Yleensä kloorikulta(III)happotrihydraatti, joka on liuotettu veteen, lisätään deionisoituun veteen, johon lisätään sitten hydroksyyliamiinihydrokloridia. Lisätään kultasiemenhiukkaset ja sekoitetaan seosta. Lisätään pieni määrä asetonia ja se-
15 koitetaan seosta. Lisätään K_2CO_3 :a, kunnes pH saavuttaa arvon 7,0. Kultasooli saavuttaa läpimitaltaan noin 20 - 150 nm:n koon lisäystä kultahiukkasmäärästä ja käytettävästä kloorikulta(II)happomäärästä riippuen ja on nyt valmis päällystettäväksi alkaanitioleilla tai alkaanitiolijohdannaisilla.
20

Alkaanitiolit, niiden johdannaiset sekä di- ja tritoliyhdisteet ovat edullisia yhdisteitä käytettäväksi kultasoolihiukkasten päällystämiseen ja kemiallisten ryhmien tai kytkentäryhmien aikaansaamiseen polymeerien tai
25 ligandien sitomiseksi kovalenttisesti kultasooliin tai hydrofobisuus-hydrofiilisyystasapainon muuttamiseksi. Vielä edullisempia ovat n-alkaanitiolit ja edullisimpia alkaanitiolit, joiden kaava on $CH_3(CH_2)_nSH$, jossa n on 9 - 23. Alkaanitiolien johdannaiset vastaavat yleensä kaavaa
30 $RCH_2(CH_2)_nSH$, jossa R on OH, COOH, CHO, SH tai NH_2 ja n on 9 - 23. Di- ja tritoliyhdisteet ovat yleensä yhdisteitä, joilla on pieni moolimassa. Jotkut niistä tunnetaan raskasmetallien kanssa kelaatteja muodostavina aineina. Kaksi esimerkkiä niistä ovat 2,3-dimerkaptomeripihkahappo ja
35 tritiosyuanuurihappo.

Soolin päällystämiseksi n-alkaanitiolilla valmistetaan tuore alkoholiliuos, edullisesti metanoliliuos, joka sisältää 0,10 mol alkaanitiolia/litra ja 1 % Tween^R 20:tä (yhtiön ICI America rekisteröity tavaramerkki, polyoksietyleenisorbitaanimonolauraattia). Noin 1 ml tätä liuosta lisätään noin 100 ml:aan valmistettua kultasoolia ja seosta sekoitetaan. Tulokseksi saatavan seoksen annetaan laskeutua huoneenlämpötilassa noin 2 tuntia. Pienemmillä pitoisuuksilla päällystysyhdistettä saadaan kultasooli päällystetyksi tehokkaasti, mutta edullisin päällystysaika täytyy löytää kussakin tapauksessa kokeellisesti.

Sooliseos pestiin noin 1 mM 3-(N-morfolinyyli)-2-hydroksipropaanisulfonihappopuskurilla (MOPSO, pH 7) sentrifugoimalla kiihtyvyydellä 2 000 G noin 15 minuutin ajan huoneen lämpötilassa, ja sitä voidaan säilyttää 4 °C:ssa käyttöön saakka.

Edellä oleva kuvaus on esimerkki kultasoolin päällystämisestä n-alkaanitioliyhdisteellä. Tätä päällystysmenettelyä muunnetaan n-alkaanitiolien ja n-alkaanitiolijohdannaisten seosten liittämiseksi, jotka sisältävät ligandien tai polymeeristen yhdisteiden kemialliseen konjugointiin soveltuvia kytkentäryhmiä. Esimerkiksi hydroksi-n-alkaanitiolin sisällyttäminen päällystysseokseen lisää soolin pinnan hydrofiilisyyttä ja vähentää soolin epäspesifistä vuorovaikutusta seerumiproteiinien kanssa. Karboksi-n-alkaanitiolin sisällyttäminen 10 %:n osuutena tioliyhdisteiden kokonaisuudesta riittää tuottamaan tulokseksi soolin, jolla on haluttu konjugaatioryhmien tiheys. Näissä seoksissa esiintyvien n-alkaanitiolien hiiliketjun pituus voi olla 2 - 4 hiiliatomia pienempi kuin n-alkaanitiolijohdannaisten hiiliketjun pituus konjugaatioryhmien saattamiseksi paremmin esille, jotta makromolekyylien reagointiin soolin pinnan kanssa liittyvä steerinen este pienenee.

Päälystysliuos, joka sisältää n-alkaanitiolia, n-alkaanitiolijohdannaista tai niiden seosta, valmistetaan yleensä alkoholiin, edullisesti metanoliin, joka sisältää 1 % Tween^R 20:tä. Kaikkien tioliyhdisteiden yhteen laskettu pitoisuus ei ole yleensä suurempi kuin 0,10 mol/l. Joissakin tapauksissa edullisin pH päälystyksessä käytettäville tioliyhdisteille ei ole 7. Esimerkiksi tritiosyanuurihapolla päälystettyjen soolien tapauksessa soolin pH säädetään arvoon 6 ennen tioliyhdisteen lisääystä parhaan mahdollisen resistenssin suolan aiheuttamaa agglomeraatiota vastaan saavuttamiseksi asianomaisella tioliyhdisteseoksella.

Soolien annetaan yleensä kehittää itselleen päälystettä tiioseoksen läsnä ollessa 2 tunnin ajan, mutta edullisin inkubointiaika kussakin tapauksessa määritetään kokeellisesti. Se toteutetaan testaamalla soolien resistenssi suolan aiheuttamaa agglomeraatiota vastaan pituudeltaan vaihtelevien inkubointijaksojen jälkeen spektrofotometrillä määrittäytystä käyttäen. Kultasooleilla on karakteristinen violetti väri, joka on äärimmäisen herkkä soolihiukkasten läpimitan muutokselle. Jos tapahtuu soolihiukkasten agglomeroitumista, soolin tehollinen "koko" kasvaa voimakkaasti ja karakteristinen absorptiohuippu siirtyy aallonpituudelta 540 nm, joka on violetti, suuremmille aallonpituuksille ja soolin muuttuu väriltään siniseksi tai värittömäksi.

Käytännössä 1 ml:n erä soolia laitetaan lasiputkeen. Soolierään lisätään sekoittaen 100 μ l 10-%:ista NaCl:a. Seoksen annetaan laskeutua ympäristön lämpötilassa 10 minuuttia ja sen absorbanssia aallonpituudella 540 nm verrataan samanlaiseen soolierään, johon on lisätty 100 μ l vettä. Koe-erän, joka säilyttää vähintään 90 % vertailuerän absorbanssista, katsotaan olevan resistenssi suolan aiheuttamalle agglomeraatiolle.

Testatut yhdisteet on esitetty alla olevassa taulukossa 1.

Taulukko 1

		Suhteellinen suojausaste suolan aiheuttamaa agglomeraatiota* vastaan
5	Yhdiste(et)	
	n-heksadekaanioli	97 %
	n-dodekaanioli	93 %
10	n-heksadekaani	25 %
	1-heksadekaanihappo	26 %
	12-merkaptto-1-dodekaanihappo	46 %
	11-merkaptto-1-undekanoli	- ¹
	2,3-dimerkaptto-meripihkahappo	41 %
15	2,5-dimerkaptto-1,3,4-tiadiatsoli	94 % ²
	3-amino-5-merkaptto-1,2,4-triatsoli	<30 %
	tritiosyanuurihappo	<30 %
	n-dodekaanioli ja 12-merkapttododekaanihapon seos	
20	(1:1) ³	74 %
	(4:2)	76 %
	(9:1)	90 %
	n-dekaaniolin, II-merkaptto-1-undekanolin ja 12-merkapttododekaanihapon seos	
25	(8:1:1)	100 %
	(6:3:1)	83 %

* Ilmaistuna prosentuaalisena optisena tiheytenä aallonpituudella 540 nm suhteessa vertailusoolierään, johon ei ollut lisätty suolaa.

¹ Sooli agglomeroitui spontaanisti päällystysyhdisteen läsnä ollessa.

² Vaikka sooli oli suojattu suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta, sentrifugoimalla talteen keräämisen jälkeen sooli ei enää ollut suolasuojattu.

³ Käytettyjen yhdisteiden moolisuhteet päällystysseoksissa.

Tehokkaimmiksi yhdisteiksi kultasoolin päällystyksessä ja suojaamisessa suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta havaittiin n-alkaanitiolit. n-alkaanitiolijohdannaiset, kuten 12-merkaptto-1-dodekaanihappo, olivat yksinään tehottomia resistenssin aikaansaannissa suolan aiheuttamaa agglomeraatiota vastaan, mutta soolien päällystys n-alkaanitioleilla ja niiden johdannaisilla antoi täydellisen suojan suolan aiheuttamaa agglomeraatiota vastaan ja myötävaikutti muihin edellä käsiteltyihin ominaisuuksiin.

Päällystetty kultasooli, joka sisältää kemiallisesti konjugoitavissa olevia ryhmiä, sidotaan sitten sitoutuviin komponentteihin, kuten proteiineihin, hiilihydraatteihin, vasta-aineisiin, antigeeneihin, polymeereihin, monomeereihin tai ligandeihin, soveltamalla karbodi-imidikemiaa tunnetuin menetelmin. Sitoutuviin ryhmiin kuuluvat kaikki sellaiset ryhmät, jotka kykenevät adsorboitumaan tai sitoutumaan kovalenttisesti päällystettyyn sooliin. Joissakin tapauksessa karbodi-imidikemiaa käytetään yhdistävän molekyylin, kuten 6-aminokapronihapon, liittämiseen sooliin ennen sitoutumiskumppanin epäsuoraa liittämistä, jotta vähennetään steerisiä esteitä sitoutumiskumppanissa ja helpotetaan sen tunnistamista komplementaarisen sitoutumiskumppanin toimesta ja erottamista siitä. Sitoutumiskumppanin tai yhdistävän molekyylin liittämiseksi päällystettyyn sooliin viimeksi mainittua inkuboidaan 2 tuntia ympäristön lämpötilassa liitettävän aineen, 1-etyyli-3-(3-dimetyyliaminopropyli)karbodi-imidihydrokloridin(EDC) ja N-hydroksisulfosukkiini-imidin (SNHS) läsnä ollessa 10 - 25 mM puskurissa pH:ssa 7,0. Joissakin tapauksissa liittämisen reaktion aikana lisätään EDC-eriä toinen toisensa jälkeen vesiväliaineessa tapahtuvan tämän yhdisteen hydrolysoitumisen kompensoimiseksi.

Sopivan liittämismenetelmän valinnan määräävät päällystetyssä soolissa esiintyvä kemiallinen ryhmä sekä

kulloiseenkin yhdistävään molekyyliin liitettävän komponentin tyyppi. Esimerkiksi sooliin sitoutuneiden alkaantiolijohdannaisten tai liitettyjen yhdistävien molekyylien aminoryhmät voitaisiin yhdistää polymeereihin homo- tai heterobifunktionaalisia N-hydroksisukkiini-imidiesterisilloitusaineita käyttäen. Vastaavasti sooliin sitoutuneiden alkaantiolijohdannaisten tai yhdistävien molekyylien sulfhydryyliryhmät voitaisiin yhdistää polymeereihin homo- tai heterobifunktionaalisia maleimidisilloitusaineita käyttäen. Mahdollisten liittämismenettelyjen valikoima on hyvin samanlainen - ellei identtinen - kuin diagnostisten immuunikonjugaattien valmistuksessa nykyisin käytettävien kemiallisten menettelyjen valikoima. Asianmukaisen sitoutumiskumppanin liittämiseen sooliin tarvitaan klassisia silloitusreagensseja, jotka soveltuvat yhteen soolissa esiintyvien ryhmien kanssa, alkaantiolijohdannaisia tai kemiallisia silloitusaineita.

Immuni määritykset, joissa käytetään soolihiukkasiimmuni määritysmenetelmää (SPIA), tehdään US-patenttijulkaisussa 4 313 734 (J. leuvering) kuvatulla tavalla. Lyhyesti kuvattuna sitoutuvalla komponentilla päällystettyä kultasoolia inkuboidaan vastakkaista sitoutumiskumppania sisältävän testinäytteen ollessa läsnä. Jos näytteessä on mukana vastakkaista sitoutumiskumppania, seurauksena on päällystetyn soolin silloittuminen ja yksittäisten kultasoolihiukkasten absorbanssi absorptiomaksimin kohdalla pienenee jyrkästi. Polymeeristen yhdisteiden adsorptiota kultasooliin voidaan helpottaa tioloimalla sitoutumiskumppani.

Sekä polyklonaalisia että monoklonaalisia vastaaineita tioloitiin reaktiolla N-sukkiini-imidyli-S-asetyyli tioasetaatin (SATA) kanssa. Tulokseksi olleista suojaetuista sulfhydryyliryhmistä poistettiin suojaus antamalla proteiinien reagoida hydroksyyliamiinihydrokloridin kanssa. Tämä on tunnettu kemiallinen menettelytapa sulf-

hydryyliryhmien muodostamiseksi proteiiniin. Tioloidut proteiinit adsorboitiin sitten kultasooleihin pH:issa 6, 7, 8 ja 9 proteiinipitoisuuksien vaihdellessa 5 µg:sta/ml 100 µg:aan/ml. Resistenssiaste suolan aiheuttamaa agglomeraatiota vastaan määritettiin edellä kuvatulla tavalla. Vasta-aineiden tiolointi tällä menetelmällä paransi huomattavasti niiden kykyä suojata kultasoolia suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta suhteessa tioloimattomiin vasta-aineisiin, kuten kuvioista 7 ja 8 ilmenee ja kuten esimerkissä 12 on esitetty.

Vaihtoehtoinen menetelmä vasta-aineiden adsorption kultasooliin helpottamiseksi on välipäällysteen sisällyttäminen kultasoolin ja sitoutumiskumppanin väliin soolin pinnan fysikokemiallisten ominaisuuksien muuttamiseksi niin, että vasta-aineiden adsorptio kasvaa. Kyseiseen tarkoitukseen käytetään di- ja tritioleja. Yksi esimerkki sellaisesta yhdisteestä on tritiosyanuurihappo (TTC). Kultasooli päällystettiin TTC:llä samanlaisella menetelmällä kuin se, jota kuvattiin edellä n-alkaanitioliyhdisteiden yhteydessä, mutta käyttäen erilaisia TTC:n ja Tween^R 20:n pitoisuuksia. Nämä pitoisuudet määritettiin kokeellisesti. Vasta-aineen kyky suojata pestyä soolia suolan aiheuttamalta agglomeraatiota määritettiin sen jälkeen, kun vastaainetta ja päällystettyä soolia oli inkuboitu edellisessä kappaleessa mainittuja erilaisia pH-arvoja ja proteiinipitoisuuksia käyttäen.

Tämän keksinnön mukaiset päällystetyt mikrohiukkaset voidaan sitoa kovalenttisesti antigeeneihin tai vasta-aineisiin ja myydä testipakkauksissa immuunidiagnostiikassa käytettäväksi. Antigeeni tai vasta-aine on detektoitavan vastakkaisen sitoutumiskumppanin suhteen spesifinen, ja pakkauksen muita komponentteja voivat olla laimennusaineet, puskurit, leimausreagenssit ja laboratoriovälineet, jotka ovat myös kulloinkin suoritettavalle testille spesifisiä.

Seuraavat esimerkit esitetään keksinnön selittämissä yksityiskohtaisemmin mutta ei rajoittamiseksi. Muunnelmat keksinnöstä ovat ammattimiehille itsestään selviä ja ne katsotaan myös osaksi tätä keksintöä.

5 **Esimerkki 1**

Kultasoolin valmistus

Lopullisen kultasoolin valmistuksessa käytettävän siemensoolin valmistamiseksi lisättiin 10 ml 1-%:ista $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$:a 900 ml:aan vettä ja ne sekoitettiin hyvin. Seokseen lisättiin 10 ml 1-%:ista natriumsitraattia ja seos sekoitettiin hyvin. Voimakkaasti sekoittaen lisättiin 10 ml 0,075-%:ista natriumboorihydridiä (valmistettu liuottamalla natriumboorihydridi natriumsitraattiliuokseen) ja seos sekoitettiin hyvin. Seos suodatettiin huokoskooltaan 0,022 μm olevan suodattimen läpi ja varastoitiin 15 4 °C:n lämpötilaan. Soolia pitäisi kypsyttää vähintään 24 tuntia ennen käyttöä.

Lopullisen soolin valmistamiseksi 8 ml 2-%:ista $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$:a (vedessä) lisättiin 900 ml:aan vettä. Keskeytyksettä sekoittaen lisättiin 4 ml vastavalmistettua 20 5-%:ista hydroksyyliamiinihydrokloridia (vedessä). Välittömästi sen jälkeen lisättiin 22,33 μl siemensoolia ja seosta sekoitettiin voimakkaasti 30 minuuttia. Lisättiin 1 μl asetonia kutakin millilitraa kohden syntyneitä soolia ja sekoitusta jatkettiin 10 minuuttia. Lisättiin 25 0,2 M K_2CO_3 :a, kunnes saavutettiin haluttu pH.

Lisätyn siemensoolin sopiva määrä määräsi seuraava yhteys: Halutun soolikoon edellyttämä tilavuusmäärä siemensoolia = kooltaan tietynlaisen soolin edellyttämä tilavuusmäärä kerrottuna tietystä määrästä siemensoolia saatavan soolin läpimitan ja halutun hiukkasläpimitan suhteen kuutiojuurella.

Esimerkki 2**Kultasoolin päällystys n-alkaanitiolilla**

Valmistettiin kultasooli esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Valmistettiin tuore metanoliliuos, joka sisälsi
5 0,1 mol 1-dodekaanitiolia/litra ja 1 % Tween^R 20:tä. Kuta-
kin 100 ml:aa kohden päällystettävää kultasoolia lisättiin
kultasooliin pisaroittain ja samalla sekoittaen 1 ml tio-
lin metanoliliuosta. Seoksen annettiin laskeutua ympäris-
tön lämpötilassa 2 tuntia silloin tällöin pyörittäen.
10 Päällystetty kultasooli otettiin talteen sentrifugoimalla
ympäristön lämpötilassa kiihtyvyydellä 2 000 G 15 minuut-
tia ja suspendoitiin sen jälkeen 1 mM MOPSO:hon (pH 7,0).
Tämä sentrifugointi ja uudelleensuspendointi toistettiin
kolmesti. Tulokseksi saatu sooli suspendoitiin uudelleen
15 samaan puskuriin ja sitä säilytettiin 4 °C:ssa ennen käyt-
töä.

Esimerkki 3**n-alkaanitiolin ja n-alkaanitiolijohdannaisen seok-
sella päällystetty kultasooli**

20 Valmistettiin kultasooli esimerkissä 1 kuvatulla
tavalla. Valmistettiin tuore metanoliliuos, joka sisälsi
0,09 mol 1-dodekaanitiolia/litra, 0,01 mol 12-merkapto-1-
dodekaanihappoa/litra ja 1 % Tween^R 20:tä. Kutakin
100 ml:aa kohden päällystettävää kultasoolia lisättiin
25 kultasooliin pisaroittain ja samalla sekoittaen 1 ml tio-
liseoksen metanoliliuosta. Seoksen annettiin laskeutua
ympäristön lämpötilassa 2 tuntia silloin tällöin pyörittä-
en. Päällystetty kultasooli otettiin talteen samalla ta-
valla kuin edellisessä esimerkissä.

30 Esimerkki 4**Kultasoolin päällystys n-alkaanitiolijohdannaisella
ja sen seurauksena oleva suojan puuttuminen suolan
aiheuttamaa agglomeraatiota vastaan**

35 Valmistettiin kultasooli esimerkissä 1 kuvatulla
tavalla ja sen pH säädettiin K₂CO₃:lla arvoon 7. Valmistet-

tiin tuore metanoliliuos, joka sisälsi 0,10 mol 12-merkapto-1-dodekaanihappoa/litra ja 1 % Tween^R 20:tä. Kutakin 100 ml:aa kohden päällystettävää kultasoolia lisättiin kultasooliin pisaroittain ja samalla sekoittaen 1 ml tiolin metanoliliuosta. Seoksen annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa 2 tuntia silloin tällöin pyörittäen. Kahteen 1 ml:n rinnakkaiserään päällystettyä soolia lisättiin 100 µl joko vettä tai 10-%:ista NaCl:a. Erää, johon lisättiin vettä, pidettiin vertailunäytteenä. Erä, johon lisättiin 10-%:ista NaCl:a, oli menettänyt 54 % optisesta tiheydestään 10 minuutin kuluttua. Tämä tulkitaan osoitukseksi siitä, että päällystys 12-merkapto-1-dodekaanihapolla ei suojannut kultasoolia suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta.

15 **Esimerkki 5**

n-alkaanitiolin ja n-alkaanitiolijohdannaisten seoksella päällystetyn kultasoolin valmistus

Valmistettiin kultasooli esimerkissä 1 kuvatulla tavalla ja sen pH säädettiin K₂CO₃:lla arvoon 7. Valmistettiin tuore metanoliliuos, joka sisälsi 0,004 mol n-dekaanitiolia/litra, 0,0005 mol 11-merkapto-1-undekaanolia/litra, 0,0005 mol 12-merkapto-1-dodekaanihappoa/litra, 0,08 mol NaCl:a/litra ja 1 % Tween^R 20:tä. Kutakin 100 ml:aa kohden päällystettävää kultasoolia lisättiin pisaroittain ja samalla sekoittaen 1 ml tiolia ja tiolijohdannaista sisältävää liuosta ja seoksen annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa yön yli. Määritettiin päällystetyn soolin suojaus suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta samalla tavalla kuin esimerkissä 4.

30 Päällystetyn soolin optinen tiheys aallonpituudella 540 nm säilyi 100-%:isesti 10-%:isen NaCl:n lisäyksen jälkeen. Tämän uskotaan osoittavan, että päällystetty sooli on suojattu täydellisesti suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta.

Esimerkki 6**Naudan seerumialbumiinin (BSA) konjugointi päällystettyyn kultasooliin**

4 ml esimerkissä 3 kuvattua päällystettyä soolia, jonka optinen tiheys aallonpituudella 540 nm oli 25,0, sekoitettiin 4,3 ml:aan 10 mM MOPSO:ta (pH 7,0). Tähän seokseen lisättiin perätysten 0,2 ml BSA:ta (25 mg/ml), 1,0 ml 30 nM SNHS:ää ja 0,5 ml 0,1 M EDC:tä. BSA, SNHS ja EDS oli sekoitettu 10 mM MOPSO:hon (pH 7,0). Reaktioseosta ravistettiin ympäristön lämpötilassa 2 tuntia. Reaktio tu-
kahdutettiin ravistamalla sitä vielä 1 tunnin sen jälkeen, kun seokseen oli lisätty 1 ml liuosta, joka sisälsi 1,0 mmol etanoliamiinia/ml (pH säädetty HCl:lla arvoon 7,0) 10 mM MOPSO:ssa (pH 7,0). Reaktioseokseen lisättiin yhtä suuri tilavuusmäärä 10 mM MOPSO:ta (pH 7,0), joka sisälsi NaCl:a (0,15 mmol/ml), Tween^R 20:tä (0,5 %) ja kaseiinia (1,0 mg/ml), ja seoksen annettiin laskeutua 1 tun-
ti. Tämä suojaus- tai uudelleenpäällystysvaihe suojaa kul-
tasoolin pinnan reagoimattomia, paljaita alueita epäspesi-
fiseltä vuorovaikutukselta biopolymeerien kanssa. Päällystetty sooli, johon oli konjugoitu BSA:ta, otettiin talteen sentrifugoimalla sitä kiihtyvyydellä 2 000 G ympäristön lämpötilassa 15 minuuttia ja suspendoimalla se sitten uu-
delleen samaan puskuriin. Tämä sentrifugointi ja pesu toistettiin kolmesti. Sooli sentrifugoitiin edellä kuva-
tulla tavalla ja suspendoitiin uudelleen 10 mM MOPSO:hon (pH 7,0). Tämä vaihe toistettiin kahdesti. Päällystettyä soolia, johon oli konjugoitu BSA:ta, säilytettiin 4 °C:ssa ennen käyttöä.

Esimerkki 7**SPIA kultasoolilla, johon oli konjugoitu BSA:ta**

Esimerkissä 5 saatu kultasooli, johon oli konjugoi-
tu BSA:ta, laimennettiin 0,1 M MOPSO:hon (pH 7,0), joka sisälsi NaCl:a (0,15 mmol/ml) ja polyetyleeniglykoli 8
000:ta (1,0 %), jolloin saavutettiin optinen tiheys 1,0

aallonpituudella 540 nm. Polyklonaalinen anti-BSA-vasta-
aine ja normaali kanin immuuniglobuliini (IgG) laimennet-
tiin 10 mM MOPSO:lla (pH 7,0) väkevyyteen 12 µl/ml. Eril-
lisiin 1 ml:n eriin BSA-soolikonjugaattia lisättiin se-
5 koittaen 100 µl laimennettua anti-BSA-vasta-ainetta, nor-
maalia kanin IgG:tä tai 10 mM MOPSO-puskuria. Seokset
siirrettiin kyvetteihin ja seurattiin niiden optisia ti-
heyksiä aallonpituudella 540 nm ajan funktiona, ja ne on
esitetty taulukossa 2.

10 Taulukossa 2 esitetyt tulokset osoittavat, että
soolin pinnalla on immunologisesti tunnistettavissa olevaa
BSA:ta ja että optisen tiheyden pieneneminen ei aiheudu
kanin seerumin epäspesifisestä vuorovaikutuksesta soolin
kanssa.

15 **Esimerkki 8**

**SPIA negatiivisena vertailunäytteenä toimivalla
kultasoolilla, johon oli konjugoitu BSA:ta**

15 Negatiivisena vertailunäytteenä toimiva kultasooli,
johon oli konjugoitu BSA:ta, valmistettiin täsmälleen
20 edellä esitetyn esimerkin 5 mukaisella tavalla, paitsi
että konjugointireaktioon ei lisätty EDC:tä. Sen sijasta
lisättiin sama tilavuusmäärä 10 mM MOPSO-puskuria (pH
7,0). Tämän soolin tarkoituksena oli osoittaa SPIA-määri-
tyksissä, että havaittu BSA-aktiivisuus oli luonteeltaan
25 kovalenttista. Taulukoissa 2 ja 3 esitettyjen tulosten
vertailu osoittaa, että vaikka huomattava osa näillä soo-
leilla esiintyvistä BSA-aktiivisuuksista voi olla passiivi-
sesti adsorboitunut, yhtä huomattava osa on sitoutunut
kovalenttisesti.

Taulukko 2

	Näyte	Päällystetty sooli, johon on konjugoitu BSA:ta. Optisen tiheyden piene- minen aallonpituudella 540 nm 60 minuutissa
5	Anti-BSA	0,401
	Kanin IgG	0,029
	Puskuri	0,031

10

Taulukko 3

	Näyte	Päällystetty sooli, johon on konjugoitu BSA:ta. Optisen tiheyden piene- minen aallonpituudella 540 nm 60 minuutissa
15	Anti-BSA	0,238
	Kanin IgG	0,063
	Puskuri	0,050

20

Esimerkki 9**Vasta-aineen päällysteominaisuuksien paraneminen
TTC:llä päällystetyllä kultasoolilla**

Valmistettiin kultasooli esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, paitsi että sen pH säädettiin K_2CO_3 :lla arvoon 6,0. Valmistettiin tuore kylläinen TTC-liuos metanoliin. Lisättiin liuosta, joka sisälsi 10 % Tween^R 20:tä, kunnes Tween^R 20:n loppupitoisuus oli 2,5 %. 4 ml tätä liuosta lisättiin sekoittaen 200 ml:aan edellä mainittua soolia, ja seoksen annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa 2 tuntia silloin tällöin pyörittäen. Päällystetty sooli kerättiin talteen samalla tavalla kuin esimerkissä 2. Erilliset erät päällystettyä soolia laimennettiin optiseen tiheyteen 2,0 ja niiden pH säädettiin samalla arvoihin 6, 7, 8 ja 9 10 mM 2-(N-morfolinyyli)etaanisulfonihapolla (MES), 10 mM MOPSO:lla, 10 mM N-(2-hydroksietyyli)piperatsiini-N-(3-propaanisulsulfonihapolla (EPPS) ja 10 mM 2-(N-sykloheksyyliamino)etaanisulfonihapolla (CHES), tässä

35

järjestyksessä. Rinnakkaisesti valmistettiin kultasooli esimerkin 1 mukaisesti eri erien pH:t säädettiin K_2CO_3 :lla arvoihin 6, 7, 8 ja 9. Puhdistettu polyklonaalinen ihmisen anti-HIV-vasta-aine laimennettiin kullakin edellä mainitulla puskurilla pitoisuuksiin 1,0, 0,5, 0,25, 0,10 ja 0,05 mg/ml. Rinnakkaisiin 1,0 ml:n eriin kutakin edellä saatua ja kutakin eri pH-arvoa vastaavaa soolia lisättiin sekoittaen 100 μ l pH:ltaan vastaavaa vasta-aineliuosta. Seosten annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa 30 minuuttia. Kuhunkin sooliseokseen lisättiin sekoittaen 100 μ l 10-%:ista NaCl:a. Vielä 10 minuuttia myöhemmin mitattiin kunkin seoksen optinen tiheys aallonpituudella 540 nm, ja ne on esitetty kuvioissa 1 - 4.

Vasta-aineen adsorptiosta TTC:llä päällystettyyn sooliin oli seurauksena, että se pH-alue, jolla suojaus suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta ilmeni, oli suurempi. Suojaus suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta tapahtui pienemmillä vasta-ainepitoisuuksilla TTC:llä päällystetyllä soolilla. Vasta-aine sai ilman NaCl:n lisäystä aikaan päällystämättömän soolin spontaanin agglomeraation. Vasta-aineen aiheuttama spontaani agglomeraatio on paljon heikommin erottuva TTC:llä päällystetyllä soolilla.

Yhdistettyinä nämä havainnot osoittavat, että tämän vasta-aineen adsorptio TTC:llä päällystettyyn kultasooliin on suurempaa kuin päällystämättömään sooliin.

Esimerkki 10

TTC:llä päällystettyyn kultasooliin adsorboituneen vasta-aineen SPIA-aktiivisuuden parannus

Valmistettiin 100 ml kultasoolia samalla tavalla kuin esimerkissä 1 ja sen pH säädettiin arvoon 9,0. Lisättiin sekoittaen 2,5 ml liuosta, joka sisälsi ihmisen anti-HIV-vasta-ainetta (GC-143) (2 mg/ml) 10 mM CHES:ssä (pH 9,0), ja seoksen annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa noin 2 tuntia silloin tällöin pyörittäen. Seokseen lisättiin sekoittaen 5 ml liuosta, joka sisälsi 1 mg ras-

vatonta kuivamaitoa/ml, ja seoksen annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa vielä 1 tunnin ajan. Päälylystettyä soolia sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 2 000 G 15 minuuttia ympäristön lämpötilassa, ja se suspendoitiin uudelleen 5 10 mM CHES:ään (pH 9,0), joka sisälsi BSA:ta (0,5 %), manitolia (300 mmol/l) ja natriumatsidia (0,01 %). Sentrifugointi- ja uudelleensuspendointivaihe toistettiin kolmesti. Sooli suspendoitiin lopuksi uudelleen samaan puskuriin ja sitä säilytettiin 4 °C:ssa ennen käyttöä. Esimerkissä 9 kuvatulla tavalla valmistettu TTC:llä päälylystetty sooli laimennettiin 10 mM CHES:llä (pH 9,0), jolloin saatiin 60 ml soolia, jonka optinen tiheys oli 2,0, joka oli suurin piirtein sama kuin esimerkissä 1 valmistetun kulta-soolin optinen tiheys. Lisättiin sekoittaen 6 ml liuosta, 15 joka sisälsi 0,5 mg ihmisen anti-HIV-vasta-ainetta/ml 10 mM CHES:ssä (pH 9,0), ja seoksen annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa 1 tunnin ajan ja sen jälkeen 4 °C:ssa yön yli. Lisättiin sekoittaen 6 ml liuosta, joka sisälsi 1 mg rasvatonta kuivamaitoa/ml, ja seoksen annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa 1 tunnin ajan. Päälylystetty sooli kerättiin talteen samalla tavalla kuin edellä ja sitä säilytettiin samoin.

Yhtä suuret erät kutakin soolia laimennettiin 0,1 M MOPSO:lla (pH 7,0), joka sisälsi NaCl:a (0,15 mmol/ml), 25 PEG 8000:ta (1 %) ja BSA:ta (0,25 %), optiseen tiheyteen 2,0 (540 nm). Rinnakkaisiin eriin kutakin laimennettua lisättiin (a) 100 µl puskuria, (b) 100 µl HIV gp160 -vasta-ainetta (10 µg/ml) tai (c) 100 µl HIV gp160 -vasta-aineen (5 µg/ml) ja ihmisen anti-HIV-vasta-aineen (5 µg/ml) seosta, joita oli esi-inkuboitu ympäristön lämpötilassa 90 30 minuuttia, kuten kuvioissa 5 ja 6 on esitetty.

Nähdään, että GC-143-TTC-päälylystetty sooli on immunologisesti aktiivisempi kuin sen päälylystämätön vastine ja että sen käyttö SPIA-määrityksessä johtaa herkempään 35 määritykseen. GC-143-TTC-päälylystetty sooli on siis myös

toiminnallisien kriteerein arvioituna parempi kuin sen
päälylystämätön vastine.

Esimerkki 11

5 **Monoklonaalisen anti-HIV p24-vasta-aineen tiolointi
N-sukkiini-imidyyl-S-asetyyliitioasettaattia (SATA)
käyttäen**

1 ml:aanliuosta, joka sisälsi 1,46 mg monoklonaalista anti-HIV p24-vasta-ainetta/ml 50 mM NaPO₄:ssa ja 1 mM etyleenidiamiinitetraetikkahapossa (EDTA) (pH 7,5), sekoitettiin 0,02 ml liuosta, joka sisälsi 5 mg SATA:ta/ml dimetyylisulfoksidissa (DMSO) ja niiden annettiin reagoida ympäristön lämpötilassa 2 tuntia. Reagoanut vasta-aine erotettiin reaktiokomponenteista geelisuodatuksella, joka tehtiin laskemalla se suolanpoistopylvään läpi samassa puskurissa. 0,25 mg reagoanutta, geelisuodatettua vasta-ainetta laimennettiin samalla puskurilla 1 ml:n tilavuuteen, ja siihen lisättiin sekoittaen 100 µl liuosta, joka sisälsi NaPO₄:a (0,05 mmol/ml), EDTAa (25 µmol/ml) ja NH₂OH·HCl:a (0,5 mmol/ml) ja jonka pH oli 7,5. Reaktioseoksen annettiin laskeutua ympäristön lämpötilassa 1,5 tuntia. Vasta-aine, josta oli poistettu suojaus, geelisuodatettiin suolanpoistopylvään läpi alkuperäisessä puskurissa reagoimattomien reagenssien poistamiseksi.

Esimerkki 12

25 **Tioloidun monoklonaalisen anti-HIV p24-vasta-aineen
päälylysteominaisuuksien parannus**

Valmistettiin kultasooli esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, paitsi että eri soolierien pH:t säädettiin K₂CO₃:lla arvoihin 6, 7, 8 ja 9. Rinnakkaisesti säädettiin derivatisoimatonta ja derivatisoitua monoklonaalista anti-HIV p24-vasta-ainetta (ks. esimerkki 11) sisältävien eri erien väkevyys arvoihin 250, 200, 150, 100 ja 50 µg/ml. Kussakin tapauksessa määritettiin derivatisoidun ja derivatisoimattoman vasta-aineen suhteellinen kyky suojata kultasoolia suolan aiheuttamalta agglomeraatiolta täsmäl-

leen samalla tavalla kuin esimerkissä 9 (ks. kuviot 7 ja 8).

5 Kuvioista 7 ja 8 ilmenee, että tämän monoklonaalisen vasta-aineen tiolointi johti parempiin pääallysteominaisuuksiin käytettäessä arviointiperusteina (a) sitä seikkaa, että derivatisoitu vasta-aine ei aiheuttanut soolin spontaania agglomeraatiota, (b) vasta-aineen antaman suojan soolin agglomeraatiota vastaan pienempää riippuvuutta pH:sta ja (c) sitä, että tarvitaan pienempiä suhteellisia määriä derivatisoitua vasta-ainetta suojan aikaansaamiseksi suolan aiheuttamaa agglomeraatiota vastaan
10 suolan ollessa läsnä kuin sellaisen soolin tapauksessa, jolla on derivatisoimatonta vasta-ainetta.

Patenttivaatimukset

1. Mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että ne koostuvat kultasoolista, joka on päällystetty ainakin yhdellä yhdisteellä, joka on alkaanitioli, alkaanitiolijohdannainen tai di- tai tritioliyhdiste.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että mainittuna yhdisteenä on ainakin yksi alkaanitioli.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että mainittu yhdiste on ainakin yhden alkaanitiolin ja ainakin yhden alkaanitiolijohdannaisen seos.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että mainittu alkaanitioli on n-alkaanitioli, jonka kaava on $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$, jossa n on kokonaisluku 9 - 23.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että mainittu alkaanitiolijohdannainen vastaa kaavaa $\text{RCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{SH}$, jossa R on OH, COOH, CHO, SH tai NH_2 ja n on 9 - 23.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että mainittu yhdiste on ditioliyhdiste.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että mainittu yhdiste on tritioliyhdiste.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että mainitun kultasoolin läpimitä on noin 10 - 150 nm.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että ne ovat resistenttejä suolan aiheuttamalle agglomeraatiolle, minkä vuoksi korkeintaan 10 % mainitun soolin suspension optisesta tiheydestä aallonpituudella 540 nm on hävinnyt 10 minuutin kuluttua, kun läsnä on 1,0 % NaCl:a.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että ne ovat sitoutuneet kovalenttisesti sitoutuvaan komponenttiin.

5 11. Patenttivaatimuksen 10 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että sitoutuva komponentti on proteiini, hiilihydraatti, antigeeni, vasta-aine, ligandi, polymeeri tai monomeeri.

10 12. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että ne sisältävät lisäksi silta-yhdistettä, joka on sitoutunut mainittuun yhdisteeseen ja johon on sitoutunut kovalenttisesti sitoutuva komponentti.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukaiset mikrohiukkaset, t u n n e t u t siitä, että sitoutuva komponentti adsorboituu lisäksi passiivisesti.

15 14. Menetelmä kultasoolimikrohiukkasten päällystämiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(a) kultasoolimikrohiukkasiin sekoitetaan alkoholi-liuosta, joka sisältää ainakin yhtä yhdistettä, joka on alkaanitioli, alkaanitiolijohdannainen tai di- tai tritio-
20 liyhdiste, jolloin syntyy päällystettyjä kultasoolimikrohiukkasia,

(b) päällystetty kultasooli sentrifugoidaan ja

(c) päällystetty kultasooli suspendoidaan uudelleen puskuriin.

25 15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä kultasoolimikrohiukkasten päällystämiseksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu alkoholiliuos sisältää lisäksi pinta-aktiivista ainetta.

30 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä kultasoolimikrohiukkasten päällystämiseksi, t u n n e t t u siitä, että mainittu yhdiste on alkaanitiolin ja alkaani-
tiolijohdannaisten seos.

17. Menetelmä sitoutuvan komponentin liittämiseksi kultasoolimikrohiukkasiin, t u n n e t t u siitä, että

(a) mainittu kultasooli päällystetään patenttivaatimuksen 14 mukaisesti päällystetyn kultasoolin aikaansaamiseksi,

5 (b) päällystettyä kultasoolia ja sitoutuvaa komponenttia inkuboidaan sitoutuvan komponentin liittämiseksi mainittuun päällystettyyn sooliin,

(c) vaiheessa (b) saadussa päällystetyssä kultasoolissa esiintyvät epäspesifiset asemat suojataan,

10 (d) vaiheessa (c) saatu päällystetty kultasooli sentrifugoidaan ja

(e) vaiheessa (d) saatu päällystetty kultasooli suspendoidaan uudelleen puskuriin.

18. Menetelmä sitoutuvan komponentin liittämiseksi kultasoolimikrohiukkasiin, t u n n e t t u siitä, että

15 (a) kultasooli päällystetään patenttivaatimuksen 15 mukaisella menetelmällä,

(b) kultasoolin, sopivien kemiallisten silloitusaineiden ja sitoutuvan komponentin seosta inkuboidaan sitoutuvan komponentin liittämiseksi päällystettyyn kultasooliin,

20 (c) reaktiot mainitussa seoksessa tukahdutetaan,

(d) vaiheessa (b) saadussa päällystetyssä kultasoolissa esiintyvät epäspesifiset asemat suojataan,

25 (e) vaiheessa (d) saatu päällystetty kultasooli sentrifugoidaan ja

(f) suspendoidaan uudelleen puskuriin.

19. Menetelmä sitoutuvan komponentin liittämiseksi kultasoolimikrohiukkasiin, t u n n e t t u siitä, että

30 (a) kultasoolimikrohiukkaset päällystetään patenttivaatimuksen 16 mukaisella menetelmällä,

(b) päällystetyn kultasoolin, sopivien kemiallisten silloitusaineiden ja sitoutuvan komponentin seosta inkuboidaan sitoutuvan komponentin liittämiseksi päällystettyyn kultasooliin,

35 (c) reaktiot mainitussa seoksessa tukahdutetaan,

:

(d) vaiheessa (b) saadussa päällystetyssä kultasoolissa esiintyvät epäspesifiset asemat suojataan,

(e) vaiheessa (d) saatu päällystetty kultasooli sentrifugoidaan ja

5 (f) suspendoidaan uudelleen puskuriin.

20. Menetelmä sitoutuvan komponentin liittämiseksi kultasoolimikrohiukkasiin, t u n n e t t u siitä, että

(a) kultasoolimikrohiukkaset päällystetään patenttivaatimuksen 15 mukaisella menetelmällä,

10 (b) päällystettyä kultasoolia inkuboidaan sitoutuvan komponentin kanssa,

(c) vaiheessa (b) saadussa päällystetyssä kultasoolissa esiintyvät epäspesifiset asemat suojataan,

15 (d) vaiheessa (c) saatu päällystetty kultasooli sentrifugoidaan ja

(e) vaiheessa (d) saatu kultasooli suspendoidaan uudelleen puskuriin.

21. Menetelmä sitoutuvan komponentin liittämiseksi kultasoolimikrohiukkasiin, t u n n e t t u siitä, että

20 (a) mainittua sitoutuvaa komponenttia muunnetaan kemiallisella tiolaatiolla,

(b) vaiheessa (a) saatua tioloitua sitoutuvaa komponenttia inkuboidaan kultasoolimikrohiukkasten kanssa,

25 (c) vaiheessa (b) saadussa kultasoolissa esiintyvät epäspesifiset asemat suojataan,

(d) vaiheessa (c) saatu kultasooli sentrifugoidaan ja

(e) vaiheessa (d) saatu kultasooli suspendoidaan uudelleen puskuriin.

30 22. Diagnosointipakkaus käytettäväksi immuunimäärityksissä, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 1 mukaisia mikrohiukkasia ja puskuriliuosta.

Patentkrav

1. Mikropartiklar, k ä n n e t e c k n a d e av, att de består av guldsol, som är överdragen med åtminstone en förening, som är alkantiol, alkantiolderivat eller en di- eller tritioolförening.

2. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att den nämnda föreningen är åtminstone en alkantiol.

3. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att nämnda förening är en blandning mellan åtminstone en alkantiol och åtminstone ett alkantiolderivat.

4. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att nämnda alkantiol är n-alkantiol med formeln $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$, där n är ett heltal 9 - 23.

5. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att nämnda alkantiolderivat har formeln $\text{RCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{SH}$, där R är OH, COOH, CHO, SH eller NH_2 och n är 9 - 23.

6. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att nämnda förening är en ditiolförening.

7. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att nämnda förening är en tritioolförening.

8. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att diametern hos nämnda guldsol är ca 10 - 150 nm.

9. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att de är resistenta mot saltinducerad agglomeration, varvid högst 10 % av den optiska tätheten vid våglängden 540 nm hos nämnda solsuspension försvunnit efter 10 minuter i närvaro av 1,0 % NaCl.

10. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att de är kovalent bundna vid en bindande komponent.

11. Mikropartiklar enligt patentkrav 10, k ä n n e t e c k n a d e av, att den bindande komponenten hör till gruppen proteiner, kolhydrater, antigen, antikroppar, ligander, polymerer eller monomerer.

5 12. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att de ytterligare innehåller en brobildande förening, som är bunden vid nämnda förening och till vilken den bindande komponenten är kovalent bunden.

10 13. Mikropartiklar enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a d e av, att den bindande komponenten dessutom adsorberas passivt.

14. Förfarande för överdragning av guldsolmikropartiklar, k ä n n e t e c k n a t av, att

15 (a) guldsolmikropartiklarna blandas med en alkohollösning, som innehåller åtminstone en förening, som är alkantiol, ett derivat av alkantiol eller en di- eller tritioolförening, varvid överdragna guldsolmikropartiklar uppstår,

(b) den överdragna guldsolen centrifugeras och

20 (c) den överdragna guldsolen suspenderas på nytt i buffert.

15 15. Förfarande enligt patentkrav 14 för överdragning av guldsolmikropartiklar, k ä n n e t e c k n a t av, att nämnda alkohollösning ytterligare innehåller ett ytaktivt ämne.

16. Förfarande enligt patentkrav 15 för överdragning av guldsolmikropartiklar, k ä n n e t e c k n a t av, att nämnda förening är en blandning av alkantiol och ett alkantiolderivat.

30 17. Förfarande för att fästa en bindande komponent vid guldsol-mikropartiklar, k ä n n e t e c k n a t av, att

(a) nämnda guldsol överdrages enligt patentkrav 14 för att erhålla en överdragen guldsol,

35 (b) den överdragna guldsolen och den bindande komponenten inkuberas för att fästa den bindande komponenten vid den överdragna solen,

(c) ospecifika ställen i den överdragna guldsolen som erhållits i steg (b) blockeras,

(d) den i steg (c) erhållna överdragna guldsolen centrifugeras och

5 (e) den i steg (d) erhållna överdragna guldsolen suspenderas på nytt i buffert.

18. Förfarande för att fästa en bindande komponent vid guldsol-mikropartiklar, k ä n n e t e c k n a t av, att

10 (a) guldsolen överdrages enligt förfarandet enligt patentkrav 15,

(b) blandningen av guldsolen, lämpliga kemiska förnättningsmedel och den bindande komponenten inkuberas för att fästa den bindande komponenten vid den överdragna guldsolen,

15 (c) reaktionerna i nämnda blandning kvävs,

(d) ospecifika ställen i den överdragna guldsolen som erhållits i steg (b) blockeras,

(e) den i steg (d) erhållna överdragna guldsolen centrifugeras och

20 (f) suspenderas på nytt i buffert.

19. Förfarande för att fästa en bindande komponent vid guldsolmikropartiklar, k ä n n e t e c k n a t av, att

25 (a) guldsolmikropartiklar överdrages enligt förfarandet enligt patentkrav 16,

(b) blandningen av den överdragna guldsolen, lämpliga kemiska förnättningsmedel och den bindande komponenten inkuberas för att fästa den bindande komponenten vid den överdragna guldsolen,

30 (c) reaktionerna i nämnda blandning kvävs,

(d) ospecifika ställen i den överdragna guldsolen som erhållits i steg (b) blockeras,

(e) den i steg (d) erhållna överdragna guldsolen centrifugeras och

35 (f) suspenderas på nytt i buffert.

20. Förfarande för att fästa en bindande komponent vid guldsolmikropartiklar, k ä n n e t e c k n a t av, att

5 (a) guldsolmikropartiklar överdrages enligt förfarandet enligt patentkrav 15,

(b) den övergragna guldsolen inkuberas tillsammans med den bindande komponenten,

(c) ospecifika ställen i den överdragna guldsolen som erhållits i steg (b) blockeras,

10 (d) den i steg (c) erhållna överdragna guldsolen centrifugeras och

(e) den i steg (d) erhållna guldsolen suspenderas på nytt i buffert.

15 21. Förfarande för att fästa en bindande komponent vid guldsolmikropartiklar, k ä n n e t e c k n a t av, att

(a) nämnda bindande komponent modifieras medelst kemisk tiolering,

20 (b) den i steg (a) erhållna tiolerade bindande komponenten inkuberas med guldsolmikropartiklarna,

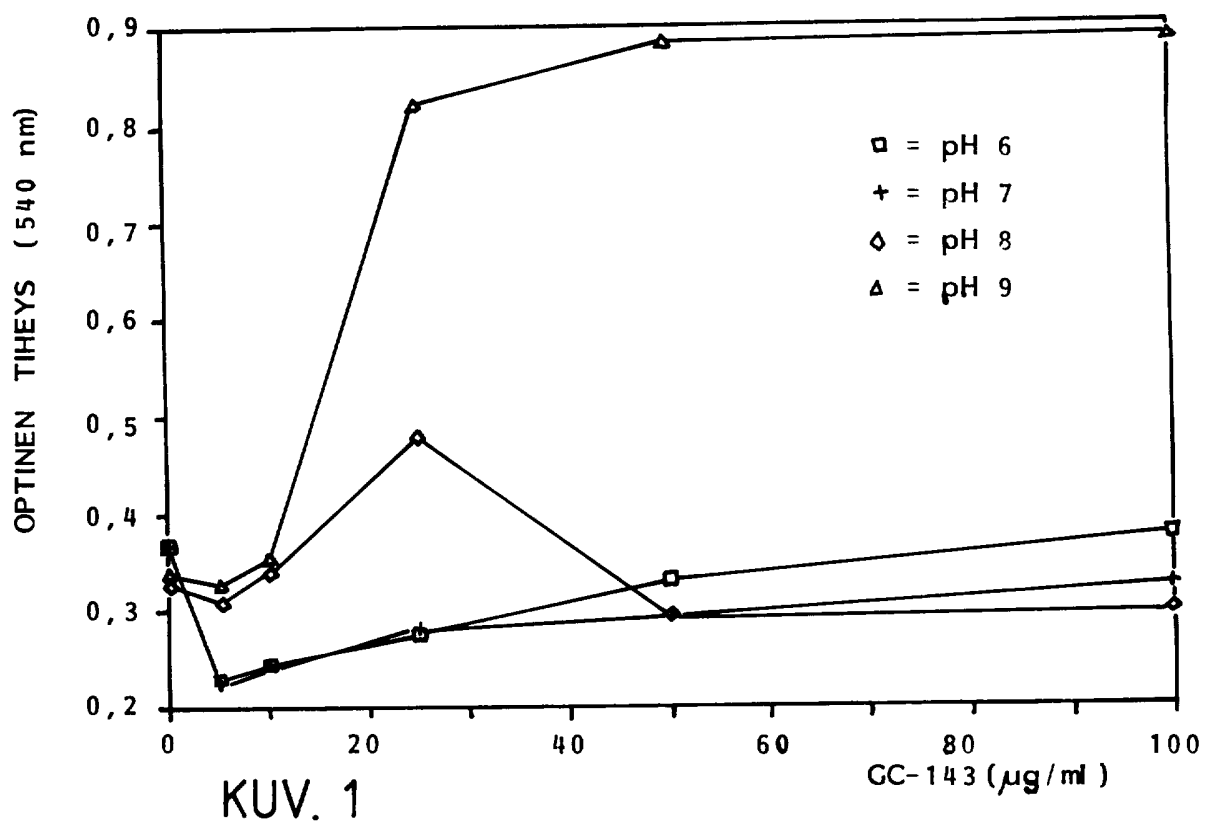
(c) ospecifika ställen i den i steg (b) erhållna guldsolen blockeras,

(d) den i steg (c) erhållna guldsolen centrifugeras och

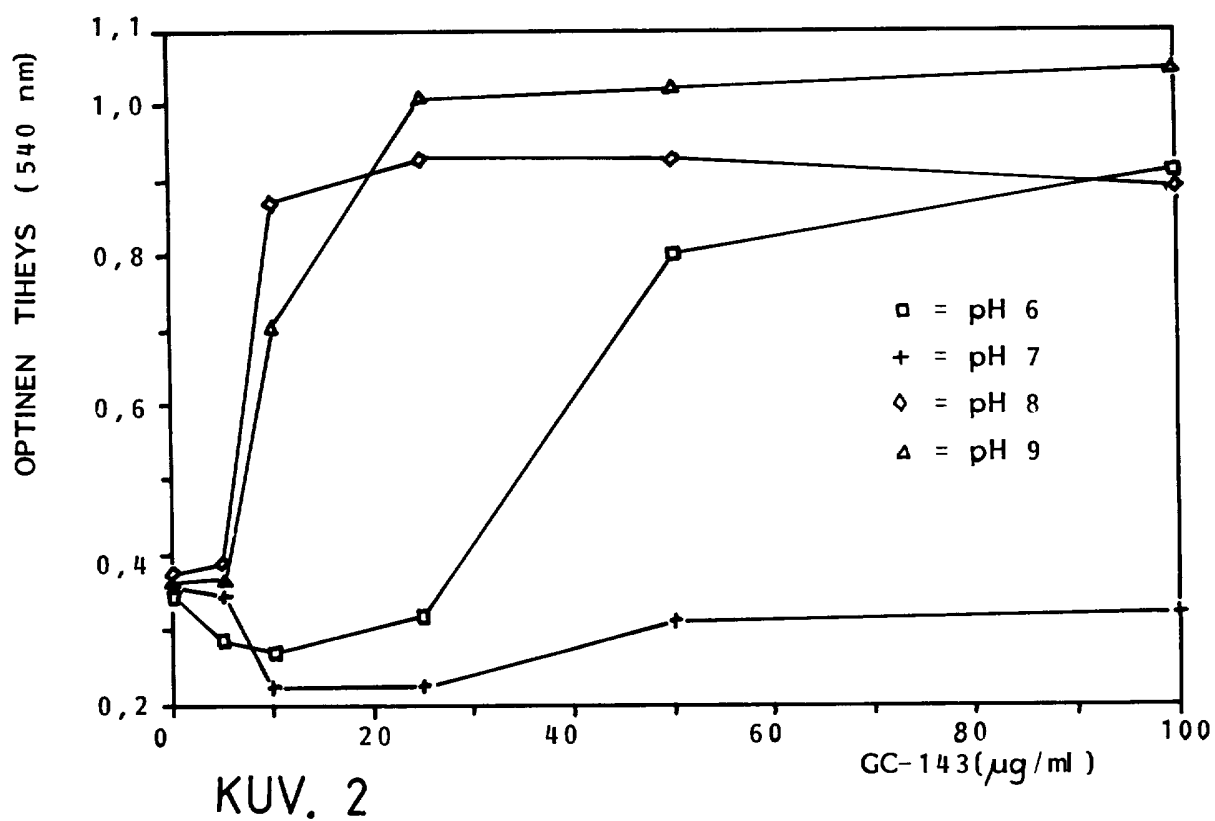
25 (e) den i steg (d) erhållna guldsolen suspenderas på nytt i buffert.

30 22. Diagnostisk förpackning att användas vid immunbestämningar, k ä n n e t e c k n a d av, att den innehåller mikropartiklar enligt patentkrav 1 och buffertlösning.

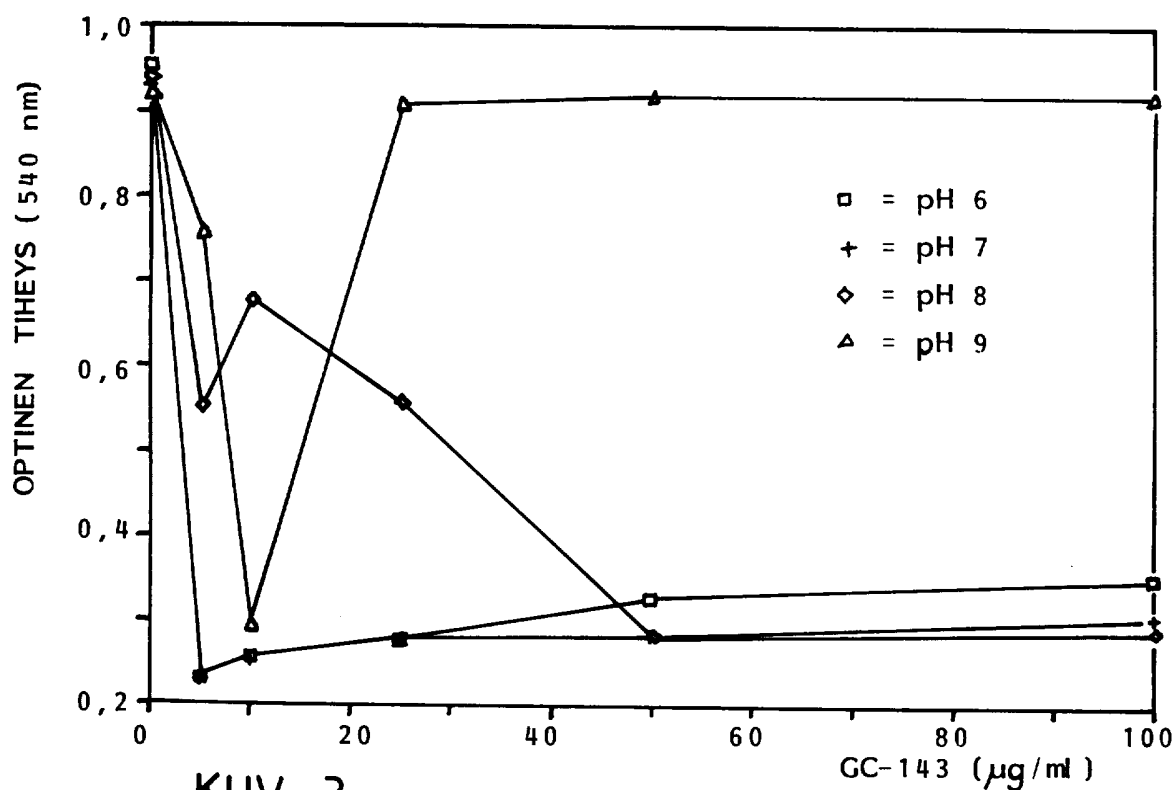
GC-143-ADSORPTIOSOOLI VETTA LISATTAESSÄ



GC-143-TTC-ADSORPTIOSOOLI SUOLAA LISATTAESSÄ

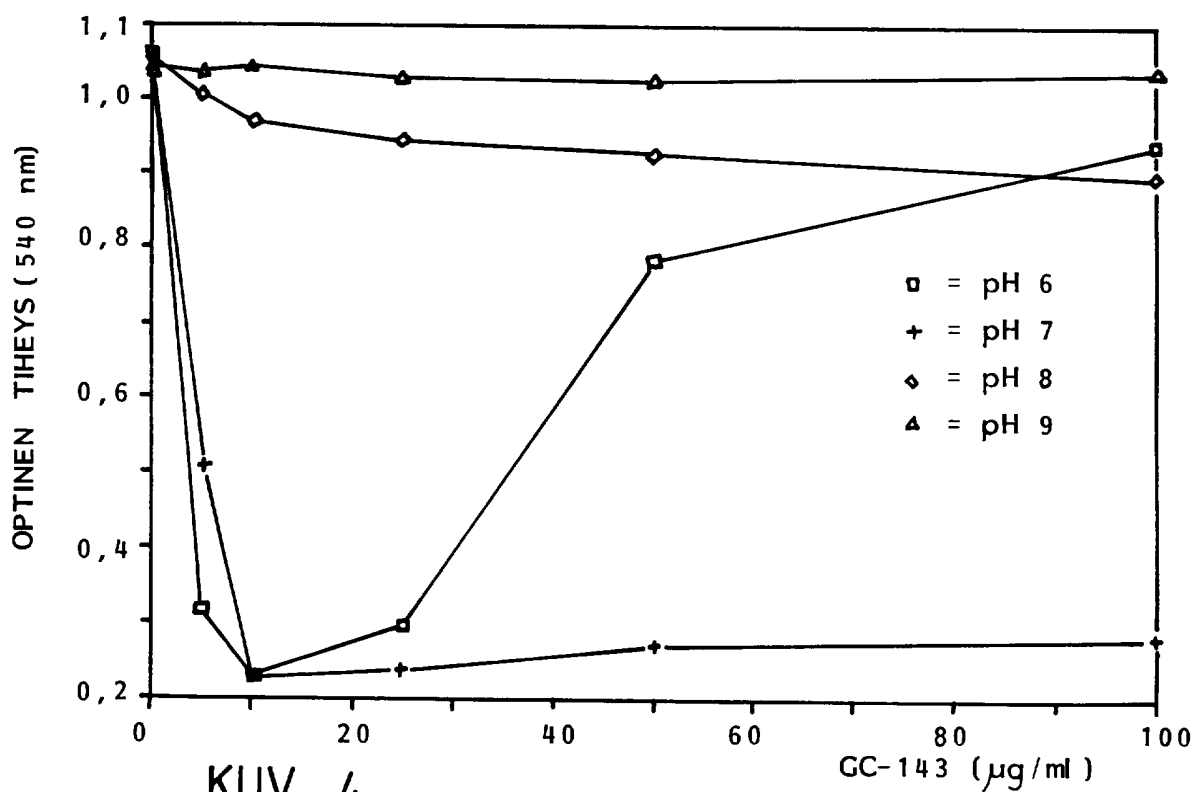


GC-143-ADSORPTIOSOOLI ILMAN SUOLAN LISÄYSTÄ



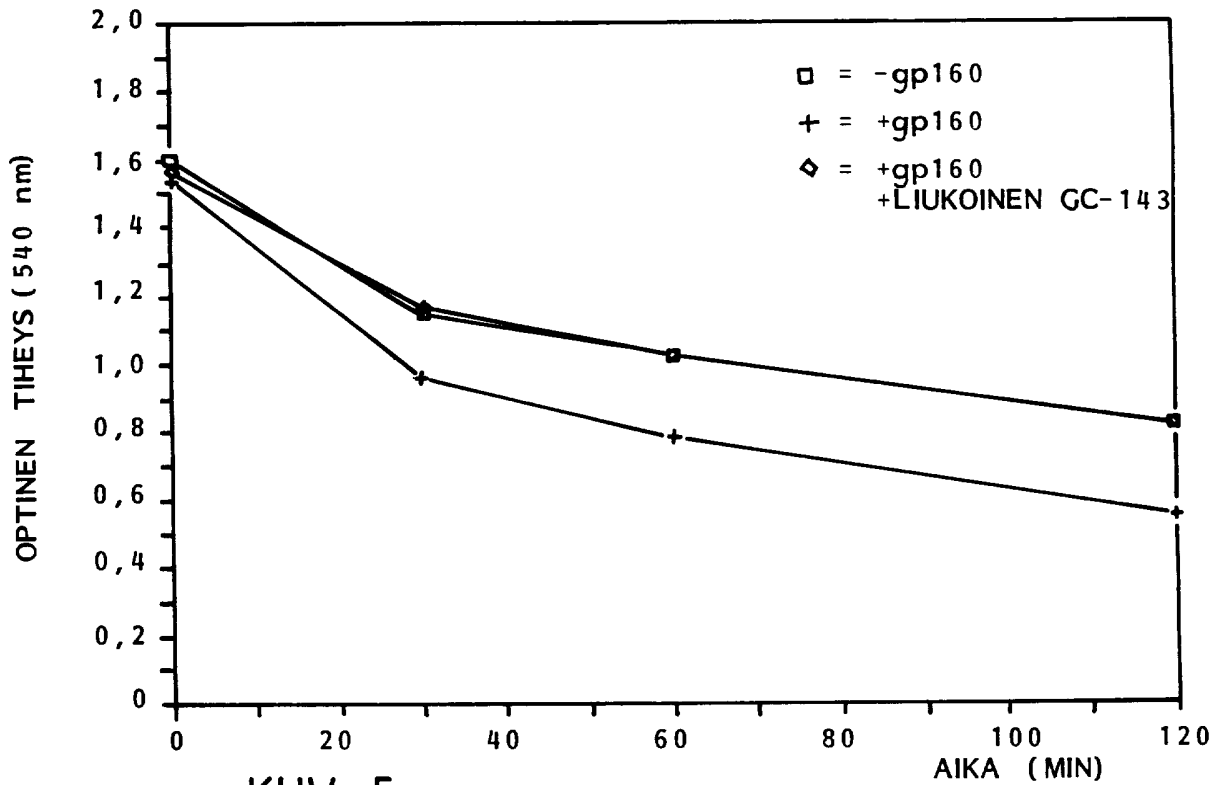
KUV. 3

GC-143-TTC-ADSORPTIOSOOLI ILMAN SUOLAN LISÄYSTÄ



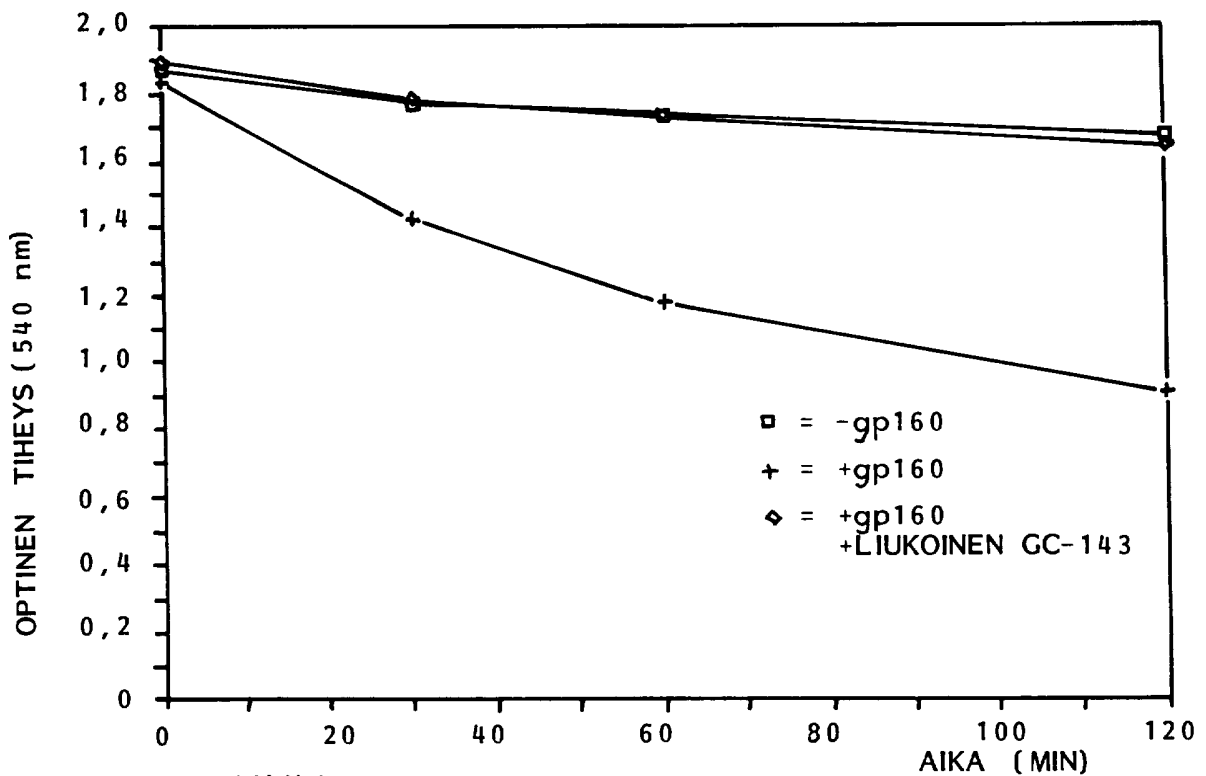
KUV. 4

gp160-SPIA
PERINTEINEN GC-143-SOOLI



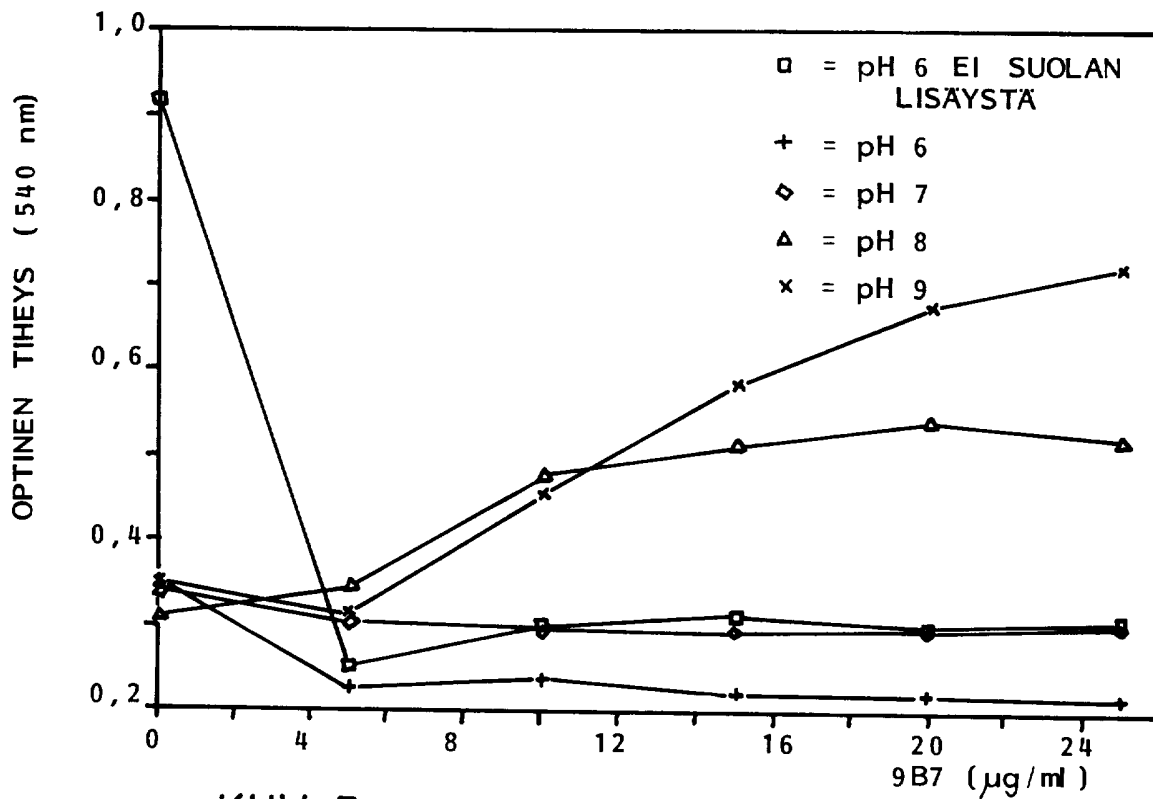
KUV. 5

gp160-SPIA
GC-143-TTC-SOOLI



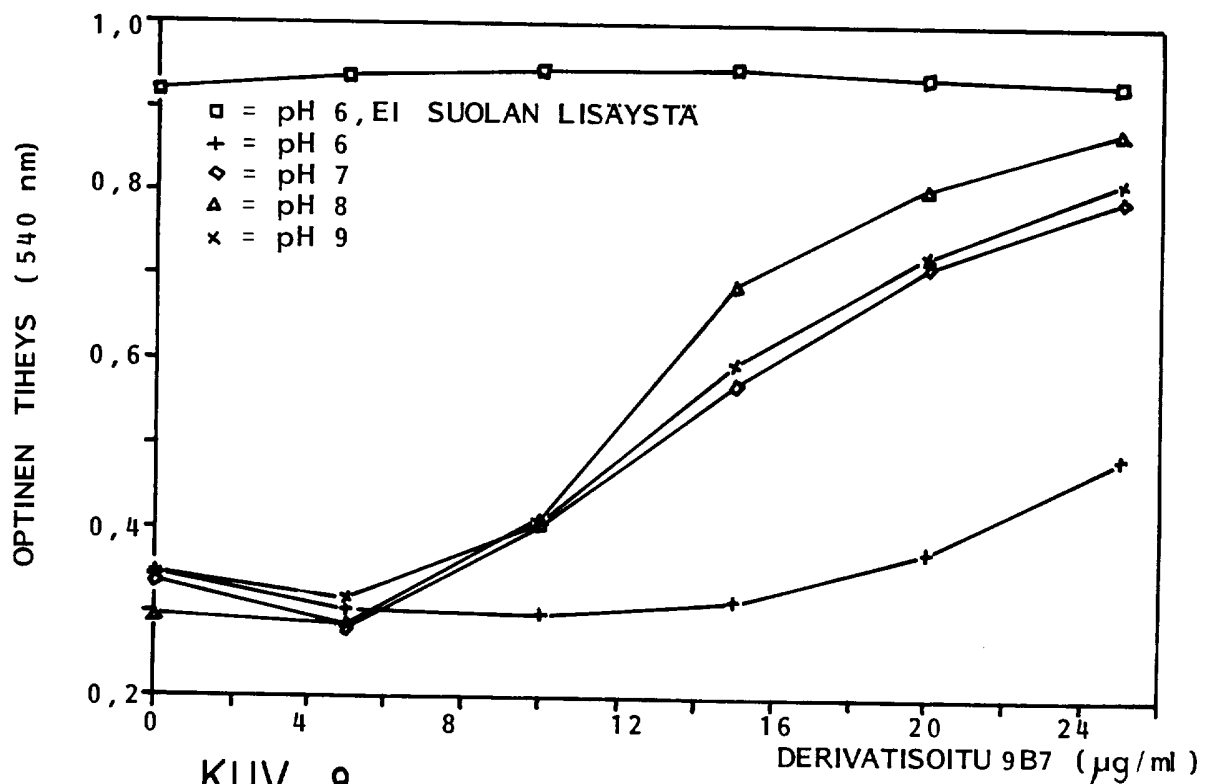
KUV. 6

SUOLASUOJAUS DERIVATISOIMATTOMALLA 9B7:LLÄ



KUV. 7

SUOLASUOJAUS SATA-DERIVATISOIDULLA 9B7:LLÄ



KUV. 8