

公 告 本

申請日期	86.4.3
案 號	86104286
Int. 別	G01N 33/44, C07K 16/00

A4
C4

454088

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	利用免疫分析技術鑑定並定量聚合物之方法
	英 文	METHOD FOR IDENTIFYING AND QUANTIFYING POLYMERS UTILIZING IMMUNOASSAY TECHNIQUES
二、發明 人	姓 名	(1)羅利安·赫羅瓦克·凱勒 (2)貝利·旺斯汀
	國 籍	美 國
三、申請人	住、居所	(1)美國·賓州19446·蘭斯達爾·潘布魯克街611號 (2)美國·賓州19025·卓爾仕·藍鳥巷419號
	姓 名 (名稱)	羅門哈斯公司
	國 籍	美 國
	住、居所 (事務所)	美國·賓州·費勒德費亞市·獨立大道西區100號
	代 表 人 姓 名	馬可S·亞達爾

裝

訂

線

454088

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

美 國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☒無主張優先權
1996年1月18日 60/010184

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明背景

本發明係有關一種利用免疫分析技術鑑定並定量水性系統中之聚合物的方法。特別是構築對應於下述物質之單株抗體(MAb)彼等物質為：用於起始聚合物製程的引發劑(或其片段)；使用於聚合反應過程，以製備預檢測之聚合物的鏈轉移劑；或可後續地粘附於鏈轉移劑的官能基。本發明亦有關表現此等MAb之新穎融合瘤(永生化細胞系)。本發明在測定使用於水處理應用之聚合物濃度上特別有效。

水溶性聚合物使用於多數水性系統，例如：作為礦物質分散劑；作為鍋爐水、冷却塔、逆滲透應用、製糖、造紙、地熱處理及油井用的水處理添加劑；及用作清潔劑添加劑之增滌劑、抗薄膜形成劑、分散劑、多價螯合劑、水垢抑制劑。於此等應用類型中，例如使聚合物與水中所含的礦物質或其他物質形成錯合物而將之自水中去除，以防止水處理應用上之腐蝕及礦物質沈澱(水垢)。經過一段時間後，當聚合物上的錯合位置變成飽和時，則聚合物會變得不活化或分解，必需添加更多活性聚合物。此點在水處理應用上特別重要，而活性聚合物不足時，常使水處理(系統)為已溶解的礦物質所壓制著，造成嚴重的腐蝕或水垢沈澱，但當維持高於所需的活性聚合物濃度時，又造成浪費且無效率。因此期待能夠隨時敏銳地檢測系統中之聚合物濃度，以便決定是否應該添加額外的聚合物。

關於檢測水性系統中之聚合物的問題之一，係傳統的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(2)

檢測方法如色度或螢光度分析缺乏靈敏度，此乃由於聚合物通常以極低量[自每百萬份含500份至低於5份(ppm)]存在。關於檢測水溶液中之聚合物的另一個問題係彼等檢測方法通常缺乏選擇性，且對水性系統中聚合物以外之成分可能提供錯誤結果。

為克服此等問題而嘗試進行者包含製造對應於產品聚合物部分之MAb，再利用免疫分析技術，以此等MAb檢測產品聚合物之存在或濃度的方法。此等方法揭示並討論於例如EP540314A1(Wetegrove等)，EP535347A2(Wetegrove等)，及EP559249A1(Weatherby等)。在此等方法中，MAb鍵結於聚合物的選擇位置，但由於聚合物鏈中大量的重複單元，使MAb與特殊的聚合物鏈間之一對一配合未必能成功；再者，由於聚合物具有各種鏈長，將使得結合於各聚合物上之MAb的數目不同。因此，MAb對聚合物濃度比例的測定將為批次依賴型(即其比例將依所製備之聚合物的特別批次而異)，且此等測量值之精確度可能有極大的差異性。

PCT US94/09264(Garner等)揭示一種供晚期鑑定而標幟產物的方法。此方法包含製造一種低分子量的半抗原，使該半抗原共價性地結合於載體化合物上，並使此半抗原標記的化合物與產物連結，如此該半抗原扮演一種可利用免疫分析技術而於晚期檢測得之標幟。該載體化合物可以是一種聚合物，如此，半抗原粘附於已形成之聚合物上，或是半抗原可於聚合反應前粘附於單體。此方法欲有效，則半抗原標記之化合物(標幟化合物)需為對產品無害、對

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

錄

五、發明說明(3)

產品呈惰性，且並非早已連接於產物者。該標幟化合物通常藉由使標幟化合物與產物混合而與產物相連，但其可於產物包裹或標記中存在。

雖然 Garner 等揭示：此種對未經標籤化 (untagged) 之化合物呈固定比例之經標籤化 (tagged) 的化合物的使用，使經標籤化的化合物之追蹤變得可能，但是當產物為聚合物時，該方法的本質阻礙對產物濃度之快速且便利的測定。Garner 等教示半抗原可粘附於已形成的聚合物上，或聚合反應前之單體；然而在任一情形下，該方法未能絕對地測定半抗原與聚合物的比例，此係由於各聚合物鍵之長度不一致，且半抗原粘附至各特殊聚合物鍵之數目亦有不同。因此，半抗原與聚合物之比例將為批次依賴型，使得聚合物濃度之檢測困難：因其標準濃度曲線需隨標記之聚合物的各批次劃定；添加至系統中之聚合物未必是如先前添加之聚合物般來自相同批次，此可能影響分析之計量度及精確度；且系統中之總聚合物濃度可能由不同批次而非單一批次之聚合物組成，此亦可能影響分析之計量度及精確度。

發明之陳述

本發明係有關一種鑑定及定量水性系統中之聚合物的方法，於本方法中，至少一部分之聚合物含有選自鏈轉移劑，引發劑或引發劑片段或粘附於鏈轉移劑之基的可檢測之末端，此方法包括下列步驟：a) 製造一種對應於該可檢測之末端的單株或多株抗體；b) 製得欲試驗之水性系統的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(4)

樣品，並使該樣品與該單株或多株抗體同時培養；及c)檢測並計算單株或多株抗體之結合度，以鑑定聚合物，並測定水性系統中聚合物的濃度。

圖式之簡單說明

第1圖係描繪聚合物濃度($\mu\text{g/ml}$)相對於反應性(%抑制)之座標圖，並說明在TNT-Tag免疫分析中各種聚合物的反應性。座標圖中之說明如下：-◆- = TNT-CYS-PAA；-■- = CYS-PAA；-▲- = PAA-PAA；及-X- = Acusol® 445N。

發明之詳細描述

使用於本說明書之下列用詞，除非另於本文中明確指出，否則具有下述定義。"免疫性抗原"或"免疫性分子"係指當以官能性免疫系統引入動物體時，誘發出免疫反應，而產生免疫狀態的物質。"抗原決定因素"或"表位(epitope)"係指特定抗體辨識之免疫性分子的一部分。"半抗體"係指一種不具真正的免疫性，但可作為免疫性分子上之抗原決定因素之一部分的低分子量分子；亦即，若此等半抗原先與免疫性抗原偶合，則抗體可對應於該複合物之不同部分形成(包含某些將專一地結合於該半抗原者)。"Tag"係指聚合物鏈上之可檢測的末端，且該末端業已發展出單株或多株抗體者，其中，該可檢測之末端係選自鏈轉移劑、引發劑(或其片段)、或粘附於鏈轉移劑之基；及所用之關於聚合物之"經標籤化(Tagged)"係指所參照之聚合物含有Tag。所指之範圍，除非另有特殊定義外，否則指全數包括(inclusive)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(5)

於自由基聚合反應過程中，當使用鏈轉移劑時，聚合反應係受鏈轉移劑所終止。如此生成的自由基成為新聚合鏈之起始。當僅有有限量之聚合物分枝時[通常，在此情形下，具有低分子量(少於50,000)之聚合物—通常係用於抗鍋垢(anti-scalants)]，鏈轉移劑對聚合物鏈之比例約為1比1；因此，檢測經標籤化之聚合物濃度的方法將獲致系統中聚合物總濃度之直接測定。本發明方法提供一種利用敏感性及選擇性免疫分析技術，藉由檢測Tag而可簡易且有效地檢測聚合物濃度之途徑。

使用於水性系統中之所有聚合物皆可以經標籤化，或者聚合物的特定部分亦可經標籤化。以Tag僅占系統中聚合物之少許百分比比較宜當僅部分聚合物係經標籤化時，未經標籤化之聚合物不需與經標籤化之聚合物相同，但較好是系統中未經標籤化與經標籤化之聚合物為相似者，如此使經標籤化之聚合物的消耗比例精確地反映出整個系統之消耗比例。

本發明之經標籤化的聚合物可為與鏈轉移劑(一般指乙烯基聚合反應)可聚合的任何形式者。當本發明之經標籤化的聚合物使用於檢測水處理聚合物時，其一具體實例較佳為使用聚羧酸之聚合物或共聚物，尤其是丙烯酸酯聚合物及其衍生物。特別有用的丙烯酸酯聚合物包含由每莫耳含有3至5個碳原子之乙烯系不飽和單羧酸，及每莫耳含有4至8個碳原子之乙烯系不飽和二羧酸，及其鹼金屬鹽及銨鹽，以及順式二羧酸酐之單體製得的聚合物及共聚

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

物。單羧酸之實例包含但不限於丙烯酸、甲基丙烯酸、乙烯基乙酸、巴豆酸及丙烯醯氧基丙酸。此等之中，以丙烯酸與甲基丙烯酸為較佳。適宜的二羧酸單體之實例包含但不限於順丁烯二酸、伊康酸、中康酸、反丁烯二酸、檸檬酸、四氫酞酸、四氫酞酸酐及順丁烯二酸酐。於此等二羧酸單體中，以順丁烯二酸酐為較佳。

起始聚合物又可由高達70重量%(wt%)之不含酸的單乙烯系不飽和單體組成，只要聚合物維持水溶性即可。此等其餘之單體包含但不限於丙烯酸或甲基丙烯酸之烷酯，如丙烯酸甲酯、丙烯酸乙酯、丙烯酸丁酯、甲基丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸丁酯及甲基丙烯酸異丁酯；丙烯酸或甲基丙烯酸之經烷酯，如丙烯酸經乙酯、丙烯酸經丙酯、甲基丙烯酸經乙酯及甲基丙烯酸經丙酯；其他丙烯酸酯或甲基丙烯酸酯之類型如(甲基)丙烯酸2-磺醯基乙酯、(甲基)丙烯酸3-磺醯基丙酯、(甲基)丙烯酸2-硫酸基乙酯、丙烯酸二甲胺基乙酯及甲基丙烯酸磷乙酯；丙烯醯胺及經烷基取代之丙烯醯胺如甲基丙烯醯胺、第三丁基丙烯醯胺、N-第三丁基丙烯醯胺、N-甲基丙烯醯胺、N,N-二甲基丙烯醯胺及3-N,N-二甲胺基丙基丙烯醯胺；丙烯腈如甲基丙烯腈；烯丙醇；烯丙基磺酸；烯丙基磷酸；乙烯基磷酸；2-乙烯基吡啶；4-乙烯基吡啶；N-乙烯基吡咯酮；N-乙烯基甲醯胺；N-乙烯基咪唑；N-丙烯醯基嗎啉；丙烯醛二丙烯酸乙二醇酯；三丙烯酸三甲醇丙烷酯；酞酸二烯丙酯；乙酸乙烯酯；苯乙烯；乙烯基磺酸、對-苯乙

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

烯基磺酸及2-丙烯醯胺基-2-甲基丙烷磺酸；磺酸甲基烯丙酯及磺酸1-烯丙氧基-2-羥丙酯(COPS®)；丙烯醯胺基羥基乙酸；及彼等之塩為適宜者。

起始聚合物最宜為聚丙烯酸或丙烯酸與順丁烯二酸或順丁烯二酸酐之共聚物。此外，起始聚合物或共聚物之數目平均分子量(Mn)較宜在500至100,000的範圍內，更宜為1000至50,000，最宜為2000至25000。

任何可用於控制聚合物組成物之分子量的鏈轉移劑皆可使用作為本發明之Tag。此等鏈轉移劑包含但不限於硫醇類、次磷酸塩類、磷酸塩類、亞磺酸類(如苯基亞磺酸及對-甲苯亞磺酸)及胺-硫醇類。適宜之次磷酸塩包含彼等揭示於U.S. 5,294,371(Clubley等)中式I(第1欄)之化合物，及彼等揭示於U.S. 5,376,731(Kerr等)中式III(第4欄)之化合物，而適宜的胺-硫醇類包含揭示於U.S. 5,298,585(McCallum等)中之類型者。將此三件專利案中關於描述鏈轉移劑之該等類型及彼等之製備方法的範圍併入本文中，以作為參考。較宜為使用半胱胺酸("CYS")，胺基乙硫醇(AET)或苯基次磷酸("PPA")作為鏈轉移劑。

任何可用於起始自由基加成聚合反應之引發劑或引發劑片段皆可使用作為本發明中的Tag。此等引發劑或引發劑片段包含但不限於過氧化酯類，如過氧苯甲酸第三丁基酯及過氧苯甲酸第三戊基酯；二烷基過氧化物如二異丙苯過氧化物；二醯基過氧化物如苯甲醯基過氧化物；氫過氧化物類如枯烯氫過氧化物；偶氮化合物如2-苯基偶氮-4-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

甲氧基-2,4-二甲基戊醯脲, 2,2'-偶氮雙-2-甲基-N-苯基丙醯脲二塩酸塩, 2,2'-偶氮雙-2-(N-(4-氯苯基)-2-甲基丙醯脲)二塩酸塩, 2,2'-偶氮雙(2-(5-甲基-2-咪唑啉-2-基)丙烷)二塩酸塩, 及2,2'-偶氮雙(2-(2-咪唑啉-2-基)丙烷)二塩酸塩。

當Tag為粘附於鏈轉移劑之基時, 所選擇之鏈轉移劑為胺-硫醇類, 特別是CYS或AET。可粘附於此等鏈轉移劑之基為彼等將與所欲基行特異性反應, 而不與聚合物的其他部分反應者。當鏈轉移劑含有懸垂胺(pendant amine), 較宜為將胺反應性基粘附其上而作為Tag, 較佳的胺反應性基包含, 但不限於1-(二甲胺基)-5-萘磺酸及其鹵化物(dansyl); 4-二甲胺基偶氮苯-4-磺酸及其鹵化物(dabsyl); 2,4,6-三硝基苯磺酸及其塩(TNT); 3-苯甲醯基喹啉-2-羧醛; 3-[2-糠醯基(furfoyl)]喹啉-2-羧醛; 2,4-二硝基氟苯[山格氏(Sanger's)試劑]; 及茚滿三酮(ninhydrin)。特佳之基包含 dansyl, dabsyl 及 TNT。

本發明之單株及多株抗體可由熟習該項技藝人士已知習用之技術製得。有多種用以製造多株抗體的技術, 包含彼等由 B.A.L. Hurn 及 S. M. Chantler 於 酵素學方法, 70:104-142(1980)中之"試劑抗體之製造(Production of Reagent Antibodies)"記載之彼等技術。製造 MAb 之技術首先由 G. Kohler 及 C. Milstein 記載於 自然, 265: 495(1975)。較宜係使用本發明免疫分析技術中之 MAb。

為製造專一性對應於Tag之MAb, 首先使Tag與免疫性

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(9)

載體之免疫性結合體於經該結合體接種之老鼠中製造。在1至300天或300天以上的期間內進行多次接種。接種可利用任意之各種途徑包含腹膜內，靜脈內或皮下注射，以每次注射5至50微克(μg)結合體之劑量進行。結合體可單獨注射或與其他物質合併注射，以增加結合體的免疫性。在免疫期間結束後，自脾臟收集淋巴球，並與骨髓瘤腫瘤細胞融合，形成融合瘤。此等融合瘤接著再經分離，培養及試驗，以測定出對Tag具有所需之專一性與親和力的融合瘤。得自此等選取出之融合瘤的MAb再依熟習該項技藝人士已知習用之技術於試管內或體內生長。

本發明之融合瘤包含彼等經設計之由Swiss或Balb/c小鼠免疫作用獲得的Hybrid 1, Hybrid 2及Hybrid 3。由此等融合瘤與單獨之PPA、2-羧丙基(苯基)次磷酸(特別是PPA加1單位之AA)或經標籤化之聚合物(PPA-PAA)反應製得之MAb的濃度低至1ppm，但其對未經標籤化之聚合物(PAA)僅有少許或幾乎無親和力。此等MAb適用於本發明之免疫分析檢測方法，該方法包含直接夾層式(Sandwich)間接夾層式及競爭性ELISA分析。較佳係使用直接夾層式ELISA。

於競爭性分析中，首先使抗原吸附於塑膠擔體上，接著加入游離的(未鍵結的)抗原(抗原通常來自標準溶液)，接著添加抗體，然後培養此溶液。當溶液於培養期間結束而被沖洗流失時，只有粘附於經鍵結之抗原上的抗體存留，並被檢測出。殘存之抗體濃度與樣品中半抗原的濃度呈

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(10)

反比。

就非競爭性分析而言，使用兩種不同之各別作用於抗原上的不同表位的抗體，其中一種抗體結合於粘附在固體模型上的抗體，而第二種抗體則用於檢測抗原並計量其濃度。於直接夾層式中，可檢測之標記直接粘附於第二抗體；而於間接夾層式中，第二抗體則利用經標記之抗免疫球蛋白自行計畫。

由對Tag具有所需之專一性及選擇性之融合瘤細胞表現的MAb(抗-Tag MAb)可用於本發明之免疫分析檢測法。通常，選取適宜的融合瘤系，並依熟習該項技藝人士已知習用之技術，使用由此等融合瘤系表現的MAb作為試劑並使之適於特定的免疫分析。

下列縮寫係用於下述實例者：L=公升；mL=毫升； μ L=微升；g=克， μ g=微克；M=莫耳；mM=毫莫耳；rpm=每分鐘轉數，及nm=奈米。KLH=栓孔鰓血藍質(keyhole limpet hemocyanin)；BSA=牛血清白蛋白；OVA=卵白蛋白；及AP=鹼性磷酸酶。CFA=完全富蘭氏佐劑(Complete Freund's Adjuvant)；及IFA："不完全"富蘭氏佐劑。此外，使用下列試劑於下述實例中。PBS：13.8mM NaCl+2.7mM KCl，pH 7.4。10×PBS(10L)：138mM NaCl(800g)+2.7mM KCl(20g)+4.28mM=鹼式NaPO₄ 7H₂O(115g)+1.46mM KP0₄(20g)，pH 7.2。PT(20L)：10×PBS(2L)+5% Tween® 20(200mL)+水(適量)。PCT(1L)：PBS(990mL)+酪胺酸(10g)+5% Tween® 20(10mL)，pH 7.2。組織培養培養基(1L)：

五、發明說明(11)

胎牛血清(10%)+L-谷胺酸(1%)+乙硫醇(mercapthanol)(6%)+艾斯考改質之杜貝谷氏培養基(Iscove's modified Dulbecco's medium(適量))。TMB: 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(0.4g/L)溶於酸性緩衝劑。此段落中所有的%皆以體積計。

實例 1: 免疫性結合體(Immunoconjugate)之製備

A. TNT-酵素結合體(DNP-AP)之製備

藉由將不同比例(w/w)之TNT(二硝基苯磺酸)衍生物添加至鹼性磷酸酶(AP)中，製得TNT-酵素結合體，未反應之半抗原藉由緩衝液大量透析予以去除。

B. PPA-PAA-蛋白質結合體之製備

以不同莫耳比之羧化二亞胺活化經苯基次磷酸(PPA)改質之聚合物的丙烯酸部分(其中PPA係使用作為鏈轉移劑)，接著，將此等經活化的聚合物以不同比例加至載體蛋白質(選自KLH、BSA、OVA或AP)，以生成適宜之PPA-PAA-蛋白質結合體。以PBS大量透析去除未反應之半抗原。為達比較目的，PPA-蛋白質結合體亦依相同方法製備。

實例 2: MAbs之製備

各組5隻小鼠，依下述之免疫作用法則，以三個月為一期，注射實例1B的免疫性結合體之其中一種。

在出生約兩個月後，將五隻Swiss小鼠放血(由尾靜脈放血)，收集血液，並分析血清。約兩週後，將乳化於0.1 mL CFA(溶於塩液)中之0.1 mL抗原(免疫性結合體)注入各小鼠的腹腔中。在其後約三個月內，每隔兩週，將乳化於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

編

五、發明說明(12)

0.1mL IFA中之含於塩液之0.1mL抗原之混合物，經腹膜注射至小鼠中。每隔一個月以及於免疫期結束時抽取血液樣本，以便監測抗體量。

在免疫期結束時，自脾臟收取過敏化的淋巴球，並與骨髓瘤細胞融合，形成融合瘤。任何大量的骨髓瘤細胞系皆有用，但較好的細胞系為P3×63Ag8.653。此等融合法則為熟習該項技藝人士已知者；例如，由Kearney等載述於免疫學期刊(J. Immunol.)，123: 1548(1979)者。簡言之，使淋巴球及骨髓瘤細胞於聚乙二醇存在下結合一段時間，培養，並測試對抗原之不同部分的專一性。

實例3：測試MAb之專一性

使用經各種末端基標籤化之聚合物進行競爭性分析。

藉由使半胱胺酸改質之聚合物的胺基末端與TNBS反應，製備TNT-CYS-聚合物(經標籤化之聚合物)。使用Amicron®微濃縮器以隔膜過濾方式去除未反應之TNBS。此半胱胺酸改質之聚合物(其中，半胱胺酸係使用作為鏈轉移劑)，參考前文McCallum等所述者。

Immulon-2培養盤以用量為100μL/孔之溶於0.1M碳酸塩緩衝液(pH 9.6)中的5μg/mL之純化的抗-TNT MAb被覆培養盤於4℃培養隔夜，或於37℃培養1小時。培養後，使培養盤於180°旋轉下以PT洗滌3次，再另以PT洗滌3次。此時，加入125μL/孔之PCT，並使培養盤於設定為120rpm的培養盤振盪器上培養1小時。培養後，使培養盤於180°旋轉下，以PT洗滌3次，再另以PT洗滌3次。製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(13)

備不同濃度之 TNT-CYS-聚合物-CYS-PAA、PPA-PAA及 Acusol® 之抑制溶液，將此等抑制溶液各別與 1:75 倍稀釋之 DNP-AP 同時添加至一孔中。培養盤接著於設定在 120rpm 之培養盤振盪器中，於室溫下培養 1 小時。培養後，以 PT 洗滌三次，使培養盤旋轉 180°，再另以 PT 洗滌三次。然後於各孔中加入 100μL 稀釋於二乙醇胺基質緩衝液中之磷酸對-硝基苯酯 (PNPP)。接著使培養盤於室溫下，在設定於 120rpm 之培養盤振盪器上再培養 15 分鐘。最後，培養盤以設於 405nm 的螢光計讀值。

第一圖顯示實驗結果。所繪數據明顯證實 TNT-CYS-PAA 在 0.1 至 10μg/mL 的濃度範圍內時可被輕易地檢測出，而相似濃度之 CYS-PAA、PPA-PAA 及 Acusol® 445N 則顯現極小的反應。再者，第一圖的數據顯示，至少在試驗濃度範圍內，反應性與聚合物濃度間呈線性關係。

第 1 圖中所示之數據概略如下表。

	Run A	Run B	Run C	TNT-CYS-PAA	
TNT-CYS-PAA (μg/ml)	PCT-Int. 抑制率% n	TNT-CYS-PAA 抑制率%	TNT-CYS-PAA 抑制率%	平均抑制率%	STDev
10.00	94.0	84.5	86.5	88.3	5.0
5.00	91.9	73.5	81.8	82.4	9.2
2.50	86.3	58.6	71.8	72.3	13.8
1.25	71.8	43.0	56.4	57.1	14.4
0.63	53.1	26.4	39.2	39.6	13.3
0.31	32.9	17.5	26.4	25.6	7.7
0.16	18.5	10.9	15.5	15.0	3.8
0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (13-1)

TNT-CYS-PAA ($\mu\text{g/ml}$)	Run A	Run B	CYS-PAA 平均抑制率%	STDev
	CYS-PAA 抑制率% n	CYS-PAA 抑制率%		
10.00	16.4	5.4	10.9	7.8
5.00	19.5	11.3	15.4	5.8
2.50	16.0	9.1	12.6	4.9
1.25	14.4	3.6	9.0	7.6
0.63	12.4	1.8	7.1	7.5
0.31	9.8	0.5	5.1	6.6
0.16	7.3	0.2	3.7	5.0
0.00	0.0	0.0	0.0	0.0

TNT-CYS-PAA ($\mu\text{g/ml}$)	Run A	Run B	PPA-PAA 平均抑制率%	STDev
	PPA-PAA 抑制率% n	PPA-PAA 抑制率%		
10.00	16.3	8.1	12.2	5.8
5.00	12.9	11.8	12.3	0.8
2.50	13.6	7.0	10.3	4.7
1.25	12.8	7.7	10.2	3.6
0.63	7.7	6.5	7.1	0.8
0.31	7.1	3.6	5.4	2.5
0.16	2.6	2.0	2.3	0.4
0.00	0.0	0.0	0.0	0.0

TNT-CYS-PAA ($\mu\text{g/ml}$)	Run A	Run B	Acusol 平均抑制率%	STDev
	Acusol 抑制率% n	Acusol 抑制率%		
10.00	23.3	16.5	19.9	4.9
5.00	20.4	10.9	15.6	6.8
2.50	15.6	5.4	10.5	7.2
1.25	11.0	-1.5	4.7	8.8
0.63	7.6	2.5	5.0	3.6
0.31	6.6	3.1	4.8	2.5
0.16	4.3	-1.6	1.3	4.2
0.00	0.0	0.0	0.0	0.0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 利用免疫分析技術鑑定並定量聚合物
之方法)

揭示一種利用免疫分析技術定量地鑑定水性系統中之聚合物的方法，其中至少一部分的聚合物含有可檢測之末端。此方法在水處理系統特別有用。亦揭示表現專一性地辨視該等可檢測之末端的單株抗體 (MAb) 之新穎的融合瘤細胞系。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要 (發明之名稱： METHOD FOR IDENTIFYING AND QUANTIFYING
POLYMERS UTILIZING IMMUNOASSAY TECHNIQUES)

Disclosed is a method for quantitatively identifying polymers in an aqueous system using immunoassay techniques, wherein at least a portion of the polymers contain a detectable terminus. This is particularly useful in water treatment systems. Also disclosed are new hybridoma cell lines which express MAbs which specifically recognize such a detectable terminus.

訂

線

第 86104286 號 專利 申請 案

申請專利範圍修正本

(88年1月13日)

1. 一種鑑定並定量水性系統中之聚合物的方法，此方法中至少一部份聚合物含有選自鏈轉移劑、引發劑（或其片段）、或粘附於胺-硫醇之胺反應基的可檢測之末端，其中該鏈轉移劑係選自由硫醇類、次膦酸類、膦酸類、亞磺酸類、胺-硫醇類及其塩等而成的群體者，其中該引發劑或引發劑片段係選自由過氧化酯類、二烷基過氧化物、二鹵基過氧化物、氫過氧化物及偶氮化合物而成之群體者，及其中聚合物包括聚丙烯酸，或是丙烯酸與丙二酸或丙二酸酐之共聚物，

此方法包括下列步驟：

- a) 製得欲測試之水性系統的樣品，並使樣品與由適當的融合瘤細胞系表現之單株或多株抗體同時培養；及
- b) 檢測並計量單株或多株抗體結合於經鑑定的聚合物之量，並測定水性系統中的聚合物濃度。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，又包括於檢測末端製造適合的單株或多株抗體的步驟。
3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該鏈轉移劑包括胺-硫醇類。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該胺反應基係由1-(二甲胺基)-5-萘磺酸及其鹵化物；4-二甲胺基偶氮-苯-4-磺酸及其鹵化物；2,4,6-三硝基苯磺酸及其塩；

3-苯甲醯基喹啉-2-羧醛；3-(2-糠醯基)喹啉-2-羧醛；
2,4-二氟硝基苯；及茚滿三酮而成之群體選出者。

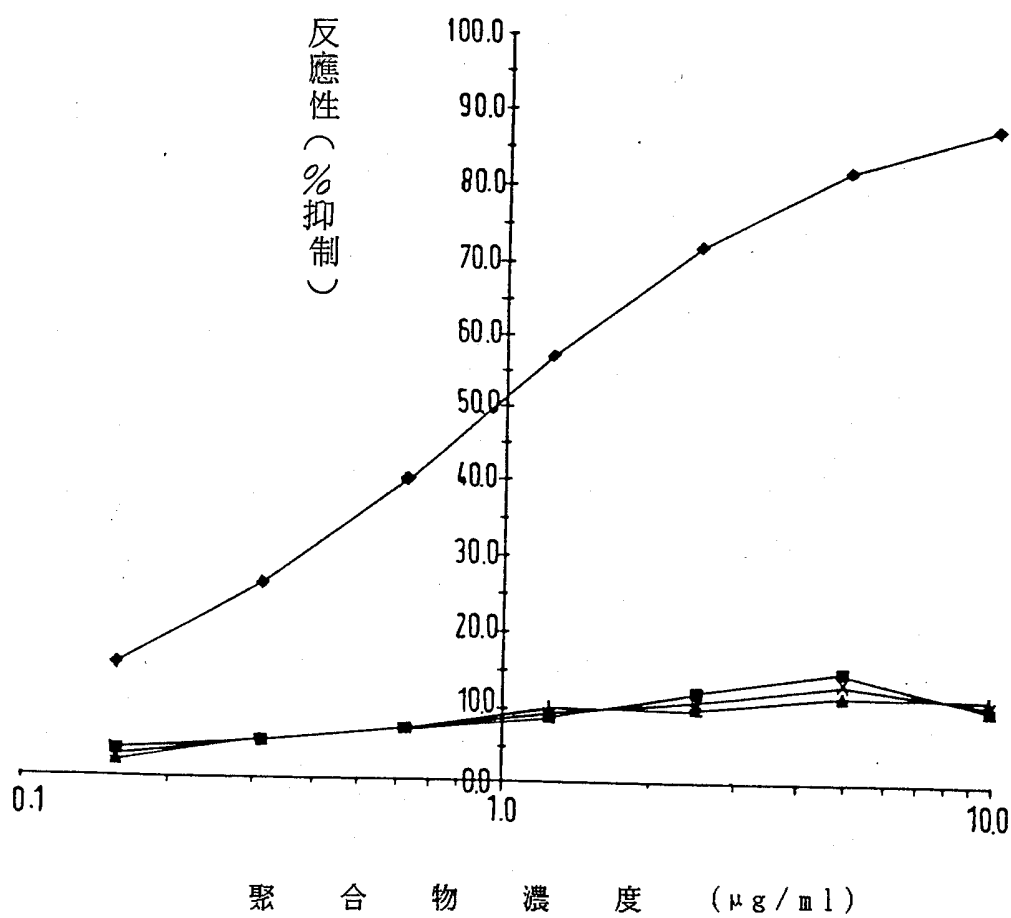
5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中係使用ELISA分析
檢測並計量單株或多株抗體之結合量者。

第 86104286 號 專 利 申 請 案

87.2.18 修正
補充附
件
四

圖 式 修 正 本

(87年 2月 18日)



第 1 圖

五、發明說明(13)

備不同濃度之 TNT-CYS-聚合物-CYS-PAA、PPA-PAA及 Acusol[®] 之抑制溶液，將此等抑制溶液各別與 1:75 倍稀釋之 DNP-AP 同時添加至一孔中。培養盤接著於設定在 120rpm 之培養盤振盪器中，於室溫下培養 1 小時。培養後，以 PT 洗滌三次，使培養盤旋轉 180°，再另以 PT 洗滌三次。然後於各孔中加入 100 μ L 稀釋於二乙醇胺基質緩衝液中之磷酸對-硝基苯酯 (PNPP)。接著使培養盤於室溫下，在設定於 120rpm 之培養盤振盪器上再培養 15 分鐘。最後，培養盤以設於 405nm 的螢光計讀值。

第一圖顯示實驗結果。所繪數據明顯證實 TNT-CYS-PAA 在 0.1 至 10 μ g/mL 的濃度範圍內時可被輕易地檢測出，而相似濃度之 CYS-PAA、PPA-PAA 及 Acusol[®] 445N 則顯現極小的反應。再者，第一圖的數據顯示，至少在試驗濃度範圍內，反應性與聚合物濃度間呈線性關係。

第 1 圖中所示之數據概略如下表。

	Run A	Run B	Run C	TNT-CYS-PAA	
TNT-CYS-PAA (μ g/ml)	PCT-Int. 抑制率% n	TNT-CYS-PAA 抑制率%	TNT-CYS-PAA 抑制率%	平均抑制 率%	STDev
10.00	94.0	84.5	86.5	88.3	5.0
5.00	91.9	73.5	81.8	82.4	9.2
2.50	86.3	58.6	71.8	72.3	13.8
1.25	71.8	43.0	56.4	57.1	14.4
0.63	53.1	26.4	39.2	39.6	13.3
0.31	32.9	17.5	26.4	25.6	7.7
0.16	18.5	10.9	15.5	15.0	3.8
0.00	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

第 86104286 號 專利 申請 案

申請專利範圍修正本

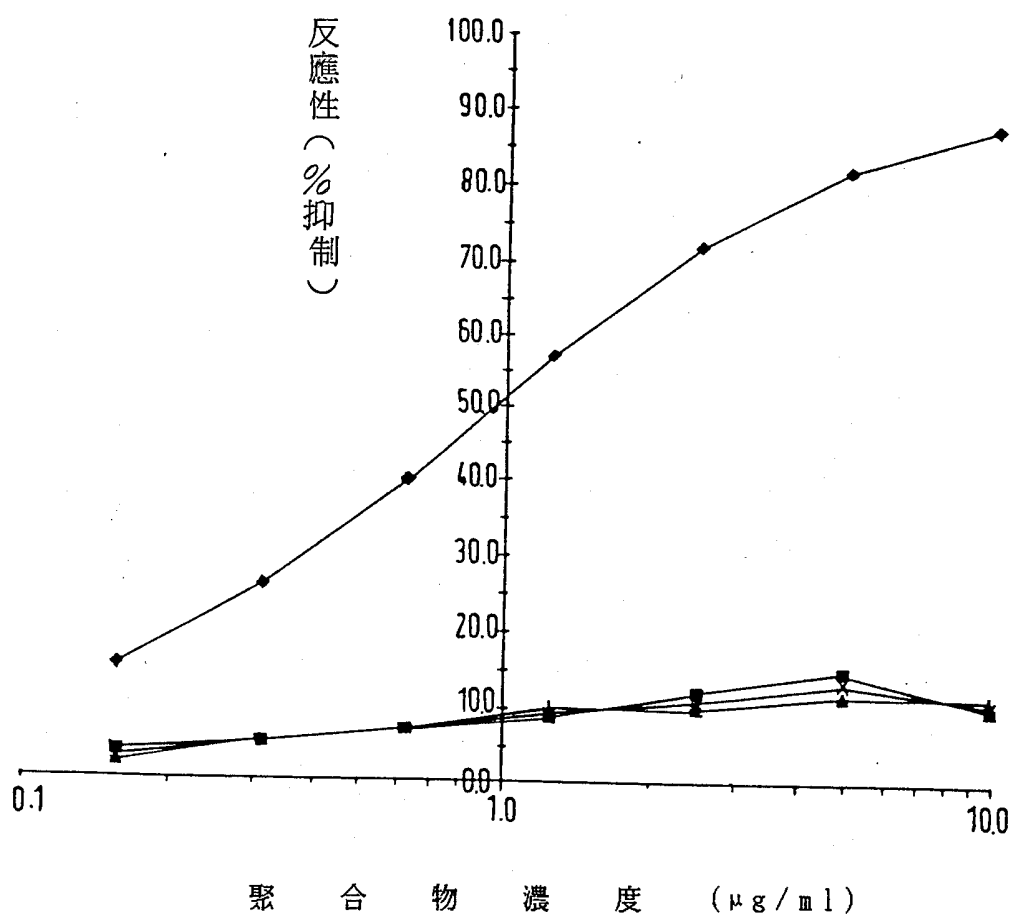
(88年1月13日)

1. 一種鑑定並定量水性系統中之聚合物的方法，此方法中至少一部份聚合物含有選自鏈轉移劑、引發劑（或其片段）、或粘附於胺-硫醇之胺反應基的可檢測之末端，其中該鏈轉移劑係選自由硫醇類、次膦酸類、膦酸類、亞磺酸類、胺-硫醇類及其塩等而成的群體者，其中該引發劑或引發劑片段係選自由過氧化酯類、二烷基過氧化物、二鹵基過氧化物、氫過氧化物及偶氮化合物而成之群體者，及其中聚合物包括聚丙烯酸，或是丙烯酸與丙二酸或丙二酸酐之共聚物，

此方法包括下列步驟：

- a) 製得欲測試之水性系統的樣品，並使樣品與由適當的融合瘤細胞系表現之單株或多株抗體同時培養；及
- b) 檢測並計量單株或多株抗體結合於經鑑定的聚合物之量，並測定水性系統中的聚合物濃度。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，又包括於檢測末端製造適合的單株或多株抗體的步驟。
3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該鏈轉移劑包括胺-硫醇類。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該胺反應基係由1-(二甲胺基)-5-萘磺酸及其鹵化物；4-二甲胺基偶氮-苯-4-磺酸及其鹵化物；2,4,6-三硝基苯磺酸及其塩；

(87年 2月 18日)



第 1 圖