



[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 72394

C (45) Patenti on myönnetty
Patentti on myönnetty 11.05.1987

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ G 01 N 33/533, 33/58

SUOMI—FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus — Patentansökning 812771
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag 07.09.81
(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag 07.09.81
(41) Tullut julkiseksi — Blivit offentlig 09.03.82
(44) Nähtäväksi panton ja kuul.julkaisun pvm. —
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 30.01.87
(86) Kv. hakemus — Int. ansökan
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet 08.09.80
USA(US) 185235 Toteennäytetty-Styrkt

- (71) Whittaker Corporation, 10880 Wilshire Boulevard, Los Angeles, California, USA(US)
(72) Yuh-Geng Tsay, San Jose, California,
Janet H. Chen, San Jose, California,
Richard J. Palmer, Santa Clara, California, USA(US)
(74) Leitzinger Oy
(54) Fluoresoiva reagenssi ja immunofluoresenssi-määritysmenetelmä -
Fluoreserande reagens och immunofluoresensbestämningsförfarande

(57) Tiivistelmä

Keksinnön kohteena on fluoresoiva diagnostinen reagenssi, joka sisältää yhdistettä, joka on muodostettu
a) hydrofobisesta hapteenistä
b) hydrofiilisestä yhdisteestä ryhmästä, johon kuuluvat aminoglykosidit, peptidit, proteiinit tai polyakryyliamidihiydratsiini ja
c) fluoresiini-, umbelliferoni- tai fluoresamiini-pohjaisesta hydrofobisesta fluoresoivasta yhdisteestä, jolloin sekä hydrofobinen hapteeni että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste on sidottu hydrofiiliseen yhdisteeseen toisistaan erillään. Keksinnön kohteena on edelleen immuno-fluoresenssi-määritysmenetelmä, jossa käytetään edellä mainittua reagenssia.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser en fluorescerande, diagnostisk reagens, som innehåller en förening, som bildats av
a) ett hydrofobt hapten
b) en hydrofil förening ur en grupp, till vilken hör aminoglykosider, peptider, proteiner eller polyakrylamidhydrazin och
c) en fluorescein-, umbelliferon- eller fluorescaminbaserad, hydrofob, fluorescerande förening, varvid både det hydrofoba haptenet och den hydrofoba, fluorescerande föreningen är bundna till den hydrofila föreningen skilt för sig. Uppfinningen avser även ett immunofluorescensbestämningsförfarande, i vilket ovanstående reagens användes.

Fluoresoiva reagenssi ja immunofluoresenssi-määritysmenetelmä -
Fluoreserande reagens och immunofluoresensbestämningsförfarande

Keksinnön kohteena on parannettu fluoresoiva reagenssi ja immunofluoresenssi-määritysmenetelmä.

Tunnetuissa kiinteillä pinnoilla suoritetuissa immunofluoresenssi-määritysmenetelmissä merkitään analysoitava aine, esimerkiksi hapteeni, fluoresoivalla komponentilla ja kiinnitetään adsorboimalla tai muulla tavoin pinnalle kilpailutilanteessa merkitsemättömän hapteenin kanssa (Tsay et al., "Quantitation of Serum Gentamicin Concentration by a Solid Phase Immuno-fluorescence Method", Clin. Chem., Vol. 26 (1980)). Kun tämä pinta, johon on sidottu tietty määrä vasta-ainetta, upotetaan seeruminäytteeseen, merkittyä ja ei-merkittyä hapteneita sitoutuu immunologisesti vasta-aineen sitoutumismahdollisuutta vastaava, rajoitettu määrä. Sen jälkeen, kun pinta on poistettu seerumista, mitataan hapteeni-antigeenin konsentraatio seerumissa tai veressä tarkkuus-fluoresenssimittarin avulla. Sopiva tarkkuus-fluoresenssimittari on FIAX^R-systeemi 100, joka sopii sekä kvalitatiiviseen että kvantitatiiviseen mittaukseen.

Kiinteällä pinnalla tapahtuva immunofluoresenssi-määritys on nopea, yksinkertainen ja suhteellisen tarkka menetelmällä analysoitavan aineen kvantitatiiviseen määrittämiseen. Sillä on kuitenkin ainakin kolme vakavaa haittaa, nimittäin epäspesifiset sidokset pintaan, alentunut antigeenisuus ja epäspesifinen sitoutuminen muiden seerumin komponenttien kanssa ja tästä johtuva fluoresenssin sammuminen. Oheisen keksinnön tavoitteena on välttää nämä haitat.

Merkityn hapteenin epäspesifisten sidosten suuri lukumäärä pinnalla johtuu oletettavasti oleellisesti kiinteän pinnan ja fluoresenssimerkityn hapteeni-kompleksin välisistä hydro-

fobisista vuorovaikutuksista. Kun esimerkiksi fluoresoiva yhdiste tai merkkiaine on fluoresiini-isotiosyanaatti ja hapteeni on difenyylihydantoiini, niin fluoresenssimerkitty hapteeni-kompleksi on hydrofobinen. Monilla tavanomaisilla selluloosapohjaisilla pinnoilla fluoresenssimerkitty kompleksi ei sitoudu spesifisesti vasta-aineeseen, vaan epäspesifisesti koko kiinteälle pinnalle.

Fluoresenssimerkityn hapteeni-kompleksin alhainen tai alen-
tunut antigeenisuus johtuu todennäköisesti hapteenin ja
fluoresenssimolekyyliosian välisestä steerisestä esteestä.
Fluoresenssimerkityssä kompleksissa pienentää hydrofobisen
fluoresenssimolekyyliosian läheisyys vasta-aineen ja hapteenin
lähentymistä. Sitä paitsi tämä rajoittaa kompleksin voimakasta
sitoutumista albumiiniin tai muihin seerumin komponentteihin.
Tästä johtuen fluoresenssisignaali pienenee, mitä kutsutaan
myös "fluoresenssin sammumiseksi".

Mainitut onelmat ovat siten johdettavissa fluoresenssiyhdisteen
ja hapteenimolekyyliosian tilallisesta läheisyydestä kompleksi-
molekyyliissä. Kummankin molekyyliosian hydrofobinen luonne
voimistaa ongelmia. Nytemmin on havaittu, että mainitut haitat
vältetään, kun molekyylin kummankin edellä mainitun osan väliin
rakennetaan hydrofiilinen väliosa ("spacer"). Tällä tavoin
saadaan parempi fluoresoiva reagenssi ja parempi immunofluore-
senssi-määrittäminen.

Oheisen keksinnön tavoitteena on siten voimakkaasti heikentää
fluoresenssimerkityn hapteeni-kompleksin ja kiinteän pinnan
välistä epäspesifistä sitoutumista muodostamalla merkittyyn
kompleksiin hydrofiilinen väliosa. Oheisen keksinnön tavoit-
teena on edelleen lisätä fluoresenssimerkityn hapteenin anti-
geenisyyttä. Oheisen keksinnön tavoitteena on edelleen vähentää
fluoresenssimerkityn hapteenin albumiinista ja muista seerumin
komponenteista johtuvaa fluoresenssi sammumista.

Oheisen keksinnön kohteena on fluoresoiva diagnostinen reagenssi, joka sisältää yhdistettä, joka on muodostettu seuraavista

- a) hydrofobinen haptteeni,
- b) hydrofiilinen yhdiste luokasta, johon kuuluvat aminoglykosidit, peptidit, proteiinit tai polyakryyliamidihyd-ratsiini ja
- c) fluoresiini-, umbelliferoni- tai fluoresamiini-pohjainen hydrofobinen fluoresoiva yhdiste,

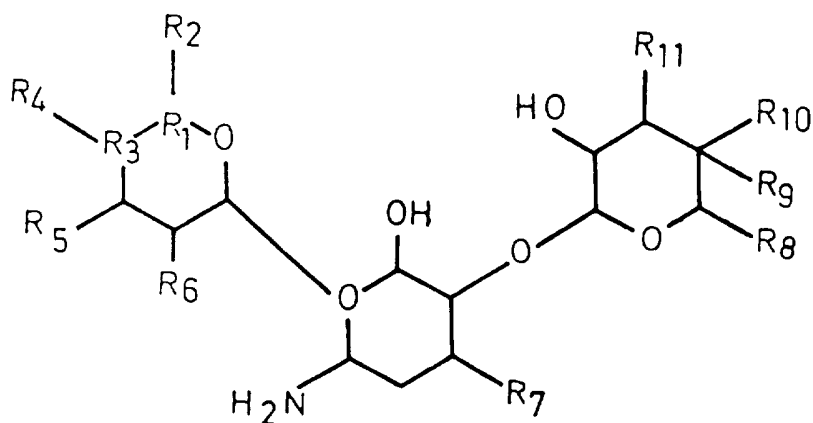
jolloin sekä hydrofobinen haptteeni että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste ovat sidotut hydrofiiliseen yhdisteeseen toisistaan erillään.

Keksintöä voidaan käyttää käytännöllisesti katsoen ilman rajoituksia haptteenin suhteen. Ainoa edellytys on ainoastaan, että haptteeni on hydrofobinen molekyyli ja että siinä joko jo on hydrofiilisen väliosian sitomiseen sopiva funktionaalinen molekyyli-ryhmä tai se voidaan modifioida varustamalla tällaisella molekyyli-ryhmällä. Tällöin on kysymys samoista funktionaalisista ryhmistä, joita normaalisti käytetään haptteenin liittämiseen fluoresenssimerkkiaineen kanssa, esimerkiksi alkoholi-, eetteri-, esteri-, amidi-, halogeeni-, nitrilo- ja merkaptoryhmistä, erityisesti amino- ja karboksyyli-ryhmistä. Analysoitavalle haptteenille on olemassa runsaasti mahdollisuuksia valita sopiva funktionaalinen ryhmä ja liittää nämä joko haptteenin synteesin jälkeen tai jo sen aikana. Fenobarbitaali-, difenyylihydantoiini- ja primidoni-haptteenien tapauksessa mainittakoon esimerkiksi aminoryhmä ja karboksyyli-ryhmät, kuten metyyli-karboksimeyyli-, metyylikarboksibutyyli-, karboksimeyyli- ja karboksibutyyli-ryhmät.

Keksintöä voidaan käyttää erityisesti antokonvulsivien, kuten esimerkiksi fenobarbitaalin, difenyylihydantoiinin

ja primidonin määrittämiseen. Näitä lääkeaineita käytetään hermostojärjestelmän kroonisissa sairauksissa, esimerkiksi epilepsiassa. Koska lääkeaineopissa useissa tapauksissa riippuu lääkkeen konsentraatiosta seerumissa, vaikuttaako se lääkeaineena vai myrkkynä, sen konsentraation täsmällinen määrittäminen seerumissa on erittäin tärkeää. Keksinnön mukaisen reagenssin ja keksinnön mukaisen immunfluoresenssi-määrityksen avulla on mahdollista suorittaa tämä seerumin määrittäminen.

Keksinnön mukaiselle reagenssille on tunnusomaista se, että hydrofiilinen yhdiste on aminoglykosidi, jonka yleiskaava on:



jossa:

R_1 : $=C$ tai $-CH$;

R_2 : $-CH_2OH$, $-CH_2NH_2$, $-CH_2NHCH_3$,
 $\begin{array}{cc} CH_3 & CH_3 \\ | & | \end{array}$
 $-CHNH_2$ tai $-CHNHCH_3$;

R_3 : $=C$ tai $-CH$;

R_4 , R_5 ja R_9 : $-H$ tai $-OH$

R_6 : $-OH$ tai $-NH_2$

R_7 : $-NH_2$, $-NHCH_2CH_3$ tai $-NH-COC(OH)CH_2CH_2NH_2$

R_8 : $-H$ tai $-CH_2OH$

R_{10} : $-OH$ tai $-CH_3$ ja

R_{11} : $-NH_2$ tai $-NHCH_3$

Näistä yhdisteistä on koottu esimerkkejä taulukkoon I.

T a u l u k k o I

AMINOGLYKOSIDI

N:o Substituentit

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₉	R ₁₀	R ₁₁
1.	-CH	-CH ₂ OH	-CH	-OH	-OH	-NH ₂	-NH ₂	-H	-H	-OH	-NHCH ₃
2.	-CH	-CH ₂ NH ₂	-CH	-H	-H	-NH ₂	-NH ₂	-H	-OH	-CH ₃	-NHCH ₃
3.	-CH	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{-CHNHCH}_3 \end{array}$	-CH	-H	-H	-NH ₂	-NH ₂	-H	-OH	-CH ₃	-NHCH ₃
4.	-CH	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{-CHNH}_2 \end{array}$	-CH	-H	-H	-NH ₂	-NH ₂	-H	-OH	-CH ₃	-NHCH ₃
5.	-CH	-CH ₂ NH ₂	-CH	-OH	-H	-NH ₂	-NH ₂	-CH ₂ OH	-H	-OH	-NH ₂
6.	-CH	-CH ₂ NH ₂	-CH	-OH	-OH	-OH	$\begin{array}{c} \text{-NHCOCH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \end{array}$	-CH ₂ OH	-H	-OH	-NH ₂
7.	=C	-CH ₂ NH ₂	=C	-H	-H	-NH ₂	-NH ₂	-H	-OH	-CH ₃	-NHCH ₃
8.	=C	-CH ₂ NH ₂	=C	-H	-OH	-OH	-NHCH ₂ CH ₃	-CH ₂ OH	-H	-OH	-NH ₂
9.	-CH	-CH ₂ NH ₂	-CH	-OH	-OH	-OH	-NH ₂	-CH ₂ OH	-H	-OH	-NH ₂
10.	-CH	-CH ₂ NH ₂	-CH	-OH	-OH	-NH ₂	-NH ₂	-CH ₂ OH	-H	-OH	-NH ₂
11.	-CH	-CH ₂ OH	-CH	-OH	-OH	-NH ₂	-NH ₂	-CH ₂ OH	-H	-OH	-NH ₂
12.	-CH	-CH ₂ NHCH ₃	-CH	-H	-H	-NH ₂	-NH ₂	-H	-OH	-CH ₃	-NHCH ₃

Taulukossa II on annettu taulukon I esittämien yhdisteiden selitykset.

Taulukko II

Taulukossa I annettujen aminoglykosidien selitykset.

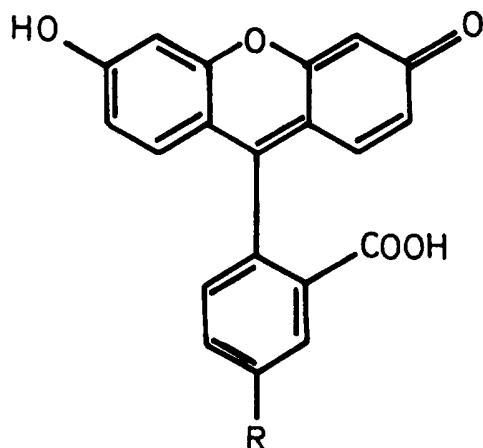
Yhdisteen n:o
taulukossa I

Nimi

1	<u>Gentamisiini A</u>
2	<u>Gentamisiini* C_{1a}</u>
3	<u>Gentamisiini* C₁</u>
4	<u>Gentamisiini* C₂</u>
5	<u>Tobramisiini</u>
6	<u>Amikasiini</u>
7	<u>Sisomisiini</u>
8	<u>Netilmisiini</u>
9	<u>Kanamysiini A</u>
10	<u>Kanamysiini B</u>
11	<u>Kanamysiini C</u>
12	<u>Sagamisiini</u>

*Gentamisiini C on seos, joka sisältää yhtä suuret osat numeroilla 2 - 4 mainittuja isomeerejä.

Hydrofobinen fluoresoiva yhdiste voidaan valita monista tunnetuista fluoresoivista reagensseista, erityisesti fluoresenssimerkkauksessa tavanomaisista yhdisteistä. Esimerkkejä sopivista yhdisteistä ovat fluoreseiinin, umbelliferonin ja fluoresamiinin johdokset. Erityisen hyvinä pidetään 5-jodiasetyyli-aminofluoreseiinia, 5-aminofluoreseiinia, fluoresiini-isotiosyanaattia, 5-diklooritriatsinyyli-aminofluoreseiinia ja rodamiini-isotiosyanaattia. Fluoreseiini-isotiosyanaatilla (R= -NCS) ja 5-aminofluoresiinilla (R= -NH₂) on seuraava rakenne:



Hydrofobisessa fluoresoivassa yhdisteessä on parhaiten vain yksi reaktiivinen molekyylin kohta, sillä jos reaktiivisia molekyylin kohtia on useampia analysoitavan hapterenin kvantitatiivinen määrittäminen on usein epätarkempi.

Keksinnön mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi valmistetaan tavalliseen tapaan siten, että hydrofobinen haptereni saatetaan ensin reagoimaan reaktiivisena johdoksena hydrofiilisen yhdisteen kanssa ja sen jälkeen reaktiotuote saatetaan reagoimaan fluoresoivan yhdisteen kanssa sitomalla jälkimmäinen hydrofiiliseen välisosaan.

Reaktiokomponentit saatetaan reagoimaan moolisuhteessa 1:1:1. Reagenssin valmistus tapahtuu fluoresenssimerkityn hapterenin synteesissä tavanomaisella tavalla ja se on esitetty myös muutamassa suoritusesimerkissä.

Parhaina pidettyjä keksinnön mukaisia fluoresoivia reagensseja ovat yhdisteet, joiden valmistuksessa on käytetty edellä mainittuja, annetun yleiskaavan mukaisia aminoglykosideja ja 5-aminofluoresiinia tai fluoresiini-isotiosya-

naattia ja antikonvulsiivia, erityisesti difenyylihydantoinia, fenobarbitaalia tai primidonia. Erityisen hyvänä pidetään yhdisteitä, joiden valmistuksessa on käytetty antikonvulsiivia, erityisesti difenyylihydantoinia, fluoresiiniisotiosyanaattia ja gentamisiiniä, sekä yhdisteitä, joiden valmistuksessa on käytetty antikonvulsiivia, erityisesti fenobarbitaalia, tobramisiiniä ja fluoresiiniisotiosyanaattia.

Oheisen keksinnön kohteena on edelleen haptereni-antigeenin immunofluoresenssi-määritysmenetelmä, jossa käytetään reagenssia, joka sisältää yhdistettä, joka on muodostettu

- a) hydrofobisesta hapterenista,
- b) hydrofiilisestä yhdisteestä valittuna ryhmästä, johon kuuluva aminoglykosidit, peptidit, proteiinit tai polyakryyliamidihydratsiin ja
- c) fluoresiini-, umbelliferoni tai fluoresamiini-pohjaisesta hydrofobisesta fluoresoivasta yhdisteestä,

jolloin sekä haptereni että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste ovat sidotut hydrofiiliseen yhdisteeseen toisistaan erillään ja jolle menetelmälle on tunnusomaista se, että hydrofiilisenä aineena käytetään edellä kuvatun yleiskaavan mukaista aminoglykosidia. Toisessa suositellussa määritysmenetelmässä on reagenssin sisältämä yhdiste valmistettu edellä mainitusta aminoglykosidista ja 5-aminofluoreseiinista tai fluoresiiniisotiosyanaatista, erityisesti hapterenina käytetystä antikonvulsiivista, erityisesti difenyylihydantoinista, fenobarbitaalista tai primidonista. Eräässä erityisen hyvänä pidetyssä määritysmenetelmässä reagenssin sisältämä yhdiste on syntetisoitu antikonvulsiivista, erityisesti difenyylihydantoinista sekä fluoresiini-

isotiosyanaatista ja gentamisiinistä tai hapteenina käytetystä antikonvulsiivista, erityisesti fenobarbitaalista, tobramisiinista ja fluoresiini-isotiosyanaatista.

Esimerkki

Seuraavalla tavalla valmistettiin fluoresoiva diagnostinen reagenssi hapteenina käytetystä difenyylihydantoiinista (DPH), hydrofiilisenä yhdisteenä käytetystä gentamisiinista ja fluoresoivana yhdisteenä käytetystä fluoresiini-isotiosyanaatista.

Difenyylihydantoiini-gentamisiini-johdoksen valmistus:

0,75 millimoolia disykloheksyylikarbodi-imidiä (CDD) lisättiin liuokseen, joka sisälsi 1 ml:ssa vedetöntä dimetyyliformamidia karboksyylihappojohdosta, joka oli valmistettu 0,5 millimoolista difenyylihydantoiinia ja 0,5 millimoolista N-hydroksisukkinimidiä (NHS). Tämän jälkeen seosta sekoitettiin vielä 1 tunti huoneen lämpötilassa ja jäähdytettiin yön yli kylmäkaapissa samalla sekoittaen. Valkoinen sakka erotettiin suodattamalla, minkä jälkeen suodos lisättiin hitaasti liuokseen, joka sisälsi 600 mg gentamisiiniä 5 ml:ssa 0,01-molaarista karbonaattipuskuria, pH 9,0. Gentamisiinillä tarkoitetaan taulukossa I numeroilla 2, 3 ja 4 mainittujen yhdisteiden seosta. Reaktioseoksen pH-arvoa seurattiin ja pidettiin vakiona arvossa 9,0. Tämän jälkeen reaktioseos jäähdytettiin yön yli kylmäkaapissa samalla sekoittaen ja sen jälkeen sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 3000 kierr./min. Yläosa puhdistettiin käyttämällä silikageelillä päällystettyjä levyjä, jolloin eluoitiin kolme kertaa metanolin ja kloroformin 10:7 seoksella ja kerran ammoniakkipitoisen metanolin ja kloroformin seoksella (metanoli:kloroformi:5 n NH_4OH = 2:1:1). UV-positiivinen vyöhyke, joka liikkui vasta eluoitaessa metanolin, kloroformin ja 5n-ammoniakin seoksella, erotettiin ja uutettiin metanolin, kloroformin

ja 5n-ammoniakin seoksella. Liuotin poistettiin alipaineessa, jolloin jäännöksenä saatiin difenyylihydantoiini-gentamisiiniä.

Difenyylihydantoiini-gentamisiini-fluoresiini-isotiosyanaatti-johdoksen valmistus:

Synteesi tapahtui analogisesti difenyylihydantoiini-gentamisiini-johdoksen valmistuksen kanssa.

Edellä kuvatulla tavalla saatu difenyylihydantoiini-gentamisiini-johdos liuotettiin 2 ml:aan 0,01-molaarista karbonaattipuskuria (pH 9,0) ja liuokseen lisättiin annoksittain yhtä suuri moolimäärä fluoresiini-isotiosyanaattia. Tämän jälkeen reaktioseosta sekoitettiin yön yli huoneen lämpötilassa valolta suojattuna. Tämän jälkeen reaktio oli tapahtunut loppuun. Sakka erotettiin sentrifugoimalla. Yläosa puhdistettiin käyttämällä silikageelillä päällystettyjä levyjä, jolloin eluointi suoritettiin edellä kuvatulla tavalla.

Fluoresoiva vyöhyke erotettiin ja uutettiin metanolin, kloroformin ja 5n-ammoniakin seoksella. Liuotin poistettiin alipaineessa ja kiinteä jäännös otettiin tislattuun veteen, johon oli lisätty yksi tippa väkevää ammoniakkia.

Taulukossa III on verrattu fenobarbitaali- ja difenyylihydantoiini-hapteenien vesiliukoisuutta muuttumattomassa muodossa, modifioidussa muodossa (karboksyloituna tai aminoituna ja nk. konjugoidussa muodossa, nimittäin reaktiotuotteena gentamisiinin kanssa. Taulukosta havaitaan, että hapteenit ovat hydrofobisia muuttumattomassa ja modifioidussa muodossa (veteen liukenemattomuus on yhdisteen hydrofobisuuden mitta). Mitä enemmän yhdisteet ovat veteen liukenemattomia, sitä suurempi on hydrofobisuus ja todennäköisyys, että ne sitoutuvat pinnoille, jolloin epäspesifiset sitoutumiset aiheuttavat suurta epätarkkuutta immuno fluoresenssi-määritysmenetelmässä. Taulukosta III voidaan

edelleen havaita, että liukoinen, so. hydrofiilinen tuote saadaan, kun hydrofobinen haptteeni, kuten fenobarbitaali tai difenyylihydantoiini sidotaan hydrofiilisen yhdisteen, kuten gentamisiinin kanssa. Tällaiset tuotteet eivät sitoudu sellaisenaan kiinteisiin pintoihin.

Taulukko III

Vesiliukoisuuksien vertailu

	Modifioi- maton haptteeni	Modifioi- tu hap- teeni	Aminoitu	Karboksyloitu ja gentamisiinin kanssa reagoimaan saatu tuote
=====	=====	=====	=====	=====
Fenobar- bitaali	Liuke- nematon	Liuke- nematon	Liuke- nematon	Liukoinen
Difenyylihy- dantoiini	Liuke- nematon	Liuke- nematon	Liuke- nematon	Liukoinen

* Karboksyloitu yhdiste on joko metyylikarboksimetyyli-, metyylikarboksibutyyli-, karboksimetyyli- tai karboksi-butyyljohdos.

Koska tavalliset fluoresenssireagenssit ovat hydrofobisia, albumiini ja muut seerumiproteiinit liittyvät niihin ja estävät tai alentavat fluoresointikykyä, kun immuno-fluoresenssi-määrityksessä niihin kohdistetaan aktivointi-säteilyä. Taulukossa IV on esitetty albumiinin fluoresenssia sammuttava vaikutus kahdella fluoresenssireagenssilla, nimittäin fluoresiini-isotiosyanaatilla ja 5-aminofluore-siinilla, ja muuttumattomalla fluoresenssireagenssilla, haptteenin kanssa reagoimaan saatetulla tuotteella sekä keksinnön mukaisella reagenssilla (haptteeni-gentamisiini-konjugaatti), joka on valmistettu haptteenista, fluoresoivasta yhdisteestä ja hydrofiilisestä yhdisteestä.

Taulukko IV

Albumiinin fluoresenssia sammuttava vaikutus

Fluoresoiva yhdiste	Fluoresoiva yhdiste muut- tumattomana	Reaktiotuote hapteenin kanssa	Hapteeni- gentamysiini- konjugaatti
=====			
Fluoresiini- isotiosyanaatti	kyllä	kyllä	ei
Aminofluore- siini	kyllä	kyllä	ei

Seuraava taulukko V osoittaa hapteenin, joka on yksi keksinnön mukaisen fluoresoivan reagenssin komponentti, parantuneen antigeenisyyden. Kun esimerkiksi difenyylihydantoiini-hapteeni yhdistetään vain hydrofobisen fluoresoivan yhdisteen kanssa, pienenee sen antigeenisuus, joka tarkoittaa kykyä yhtyä vastaavan antigeenin kanssa, huomattavasti; kun kuitenkin keksinnön mukaisesti mukaan laitetaan vielä hydrofiilinen yhdiste, esimerkiksi gentamysiini, antigeenisuus on suurempi kuin hapteenin ja fluoresoivan yhdisteen reaktiotuotteella tai jopa yhtä suuri kuin puhtaalla hapteenilla.

Taulukko V

Difenyylihydantoiiniin (DPH) antigeenisuus

laskettuna DPH:sta prosentteina

Modifioi- maton DPH	DPH:n ja fluoresoivan yhdisteen reaktiotuote	DPH:n, gentamiinin ja fluoresoivien yhdisteen reaktiotuote
Karboksime- tyyliidi- nyylihydan- toiini-amino- fluoresiini	N-aminopropyyli- difenyylihydan- toiini-fluore- siini-isotio- syanaatti	Karboksi - propyyliidi- fenyylily- dantoiini- gentamisiini- fluoresiini- isotiosya- naatti
	Karboksi - propyyliidi- fenyylily- dantoiini- gentamisiini- fluoresiini- isotiosya- naatti	Karboksi - propyyliidi- fenyylily- dantoiini- gentamisiini- nifluoresii- ni-isotio- syanaatti
100	17	30
	100	101
	58	150

14

* Erotettiin kolme erilaista yhdistettä, jotka vastaavat taulukossa I annettuja gentamisiinin isomeerejä.

72394

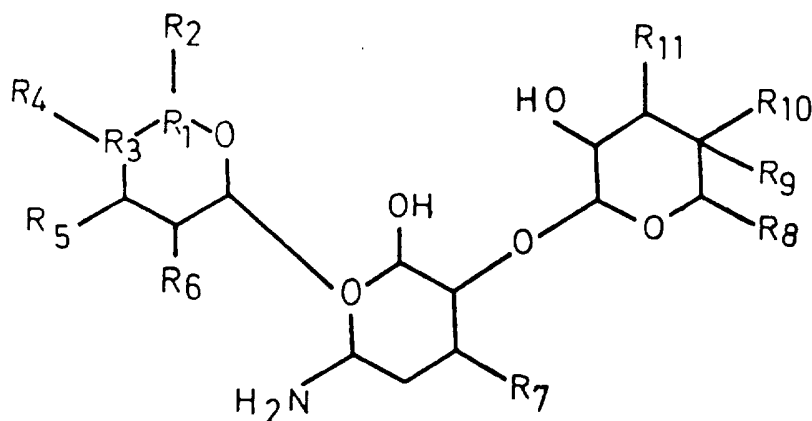
Suoritus-esimerkistä havaitaan, että hydrofiilisen yhdisteen muodostaminen ratkaisee kaikki vaikeudet, joita esiintyy immunofluoresenssi-määritysmenetelmässä, kun hydrofobinen testimolekyyli, kuten esimerkiksi hapteeni yhdistetään hydrofobisen merkkiaineen, kuten esimerkiksi fluoresoivan yhdisteen kanssa. Näin on osoitettu, että keksinnön mukaiset fluoresoivat reagenssit välttävät tähän mennessä tavanomais-ten fluoresenssi-määritysmenetelmien haitat.

Patenttivaatimukset

1. Fluoresoiva diagnostinen reagenssi, joka sisältää yhdistettä, joka on muodostettu

- hydrofobisesta hapterenista,
- hydrofiilisestä yhdisteestä, ja
- fluoresiini-, umbelliferoni- tai fluoresamiinipohjaisesta hydrofobisesta fluoresoivasta yhdisteestä,

jolloin sekä hydrofobinen haptereni että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste on sidottu hydrofiiliseen yhdisteeseen toisistaan erillään, t u n n e t t u siitä, että hydrofiilinen yhdiste on aminoglykosidi, jonka yleiskaava on



jossa:

R₁: =C tai -CH;

R₂: -CH₂OH, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, $\overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{-CHNH}_2}}$ tai $\overset{\text{CH}_3}{\underset{|}{\text{-CHCHCH}_3}}$;

R₃: =C tai -CH;

R₄, R₅ ja R₉: -H tai -OH

R₆: -OH tai -NH₂

R₇: -NH₂, NHCH₂CH₃ tai -NH-COC(OH)CH₂CH₂NH₂

R₈: -H tai -CH₂OH

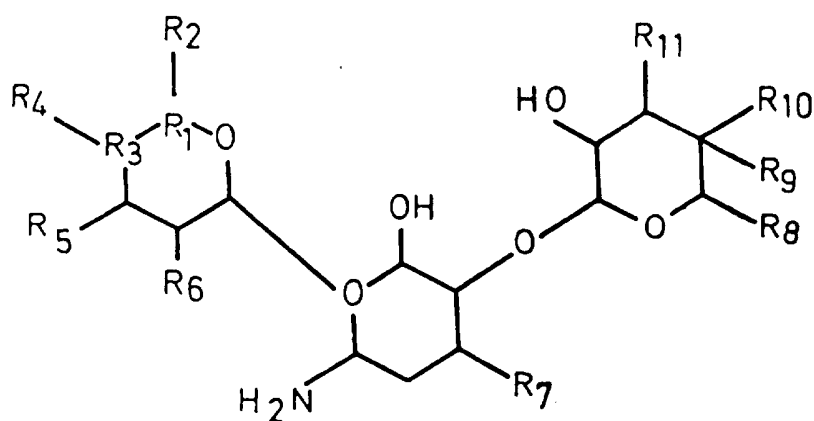
R₁₀: -OH tai -CH₃ ja

R₁₁: -NH₂ tai -NHCH₃

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi, tunnettu siitä, että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste on 5-aminofluoresiini.
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi, tunnettu siitä, että hydrofobiinen fluoresoiva yhdiste on fluoresiini-isotiosyanaatti.
4. Patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi, tunnettu siitä, että haptereni on antikonvulsiivi.
5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi, tunnettu siitä, että antikonvulsiivi on difenyylihydantoiini.
6. Patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi, tunnettu siitä, että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste on fluoresiini-isotiosyanatti ja aminoglukosidi on gentamisiini.
7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi, tunnettu siitä, että antikonvulsiivi on fenobarbitaali.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi, tunnettu siitä, että fluoresoiva yhdiste on fluoresiini-isotiosyanaatti ja aminoglykosidi on tobramysiini.
9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen fluoresoiva diagnostinen reagenssi, tunnettu siitä, että antikonvulsiivi on primidoni.

10. Hapteeniantigeenin immunofluoresenssi-määrittämissä menetelmä, jossa käytetään reagenssia, joka sisältää yhdistettä, joka on muodostettu

- hydrofobisesta hapteenista,
 - hydrofiilisestä yhdisteestä ja
 - fluoresiini-, umbelliferoni- tai fluoresamiini-pohjaisesta hydrofobisesta fluoresoivasta yhdisteestä,
- jolloin sekä hydrofobinen hapteeni että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste on sidottu hydrofiiliseen yhdisteeseen toisistaan erillään, tunnettu siitä, että hydrofiilinen yhdiste on aminoglykosidi, jonka yleiskaava on



jossa:

R_1 : =C tai -CH;

R_2 : -CH₂OH, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, -CH(CH₃)NH₂ tai -CH(CH₃)CH₃;

R_3 : =C tai -CH;

R_4 , R_5 ja R_9 : -H tai -OH

R_6 : -OH tai -NH₂

R_7 : -NH₂, NHCH₂CH₃ tai -NH-CO(OH)CH₂CH₂NH₂

R_8 : -H tai -CH₂OH

R_{10} : -OH tai -CH₃ ja

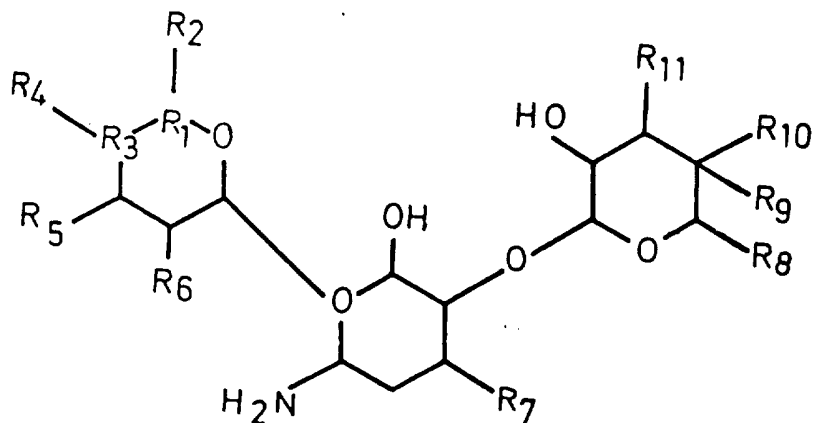
R_{11} : -NH₂ tai -NHCH₃

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen immunofluoresenssimäärittysmenetelmä, tunnetaan siitä, että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste on 5-aminofluoresiini.
12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen immunofluoresenssimäärittysmenetelmä, tunnetaan siitä, että hydrofobinen fluoresoiva yhdiste on fluoresiini-isotiosyanaatti.
13. Patenttivaatimuksen 11 tai 12 mukainen immunofluoresenssimäärittysmenetelmä, tunnetaan siitä, että hapteeni on antikonvulsiivi.
14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen immunofluoresenssimäärittysmenetelmä, tunnetaan siitä, että antikonvulsiivi on difenyylihydantoiini.
15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen immunofluoresenssimäärittysmenetelmä, tunnetaan siitä, että hydrofiilinen fluoresoiva yhdiste on fluoresiini-isotiosyanaatti ja aminoglykosidi on gentamisiini.
16. Patenttivaatimuksen 13 mukainen immunofluoresenssimäärittysmenetelmä, tunnetaan siitä, että antikonvulsiivi on fenobarbitaali.
17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen immunofluoresenssimäärittysmenetelmä, tunnetaan siitä, että hydrofiilinen fluoresoiva yhdiste on fluoresiini-isotiosyanaatti ja aminoglykosidi on tobramysiini.
18. Patenttivaatimuksen 13 mukainen immunofluoresenssimäärittysmenetelmä, tunnetaan siitä, että antikonvulsiivi on primidoni.

1. Fluorescerande, diagnostisk reagens, som innehåller en förening, som bildats av

- a) en hydrofob haptén,
- b) en hydrofil förening och
- c) en fluorescein-, umbelliferon- eller fluorescaminbaserad, hydrofob, fluorescerande förening,

varvid såväl det hydrofoba haptenet som den hydrofoba, fluorescerande föreningen är bundna till den hydrofila föreningen skilt för sig, k ä n n e t e c k n a d därav, att den hydrofila föreningen är en aminoglykosid med den allmänna formeln

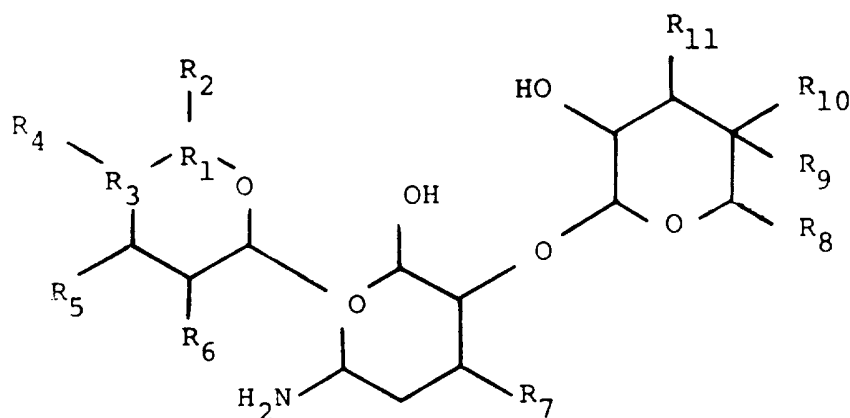

$$R_{11}: -NH_2 \text{ eller } -NHCH_3$$

2. Fluorescerande, diagnostisk reagens enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den hydrofoba, fluorescerande föreningen är 5-aminofluorescein.
3. Fluorescerande, diagnostisk reagens enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d därav, att den hydrofoba fluorescerande föreningen är fluoresceinisotiocyanat.
4. Fluorescerande, diagnostisk reagens enligt patentkravet 1, 2 eller 3, k ä n n e t e c k n a d därav, att haptenet är antikonvulsivt.
5. Fluorescerande, diagnostisk reagens enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att antikonvulsivet är difenylhydantoin.
6. Fluorescerande, diagnostisk reagens enligt patentkravet 4 eller 5, k ä n n e t e c k n a d därav, att den hydrofoba, fluorescerande föreningen är fluoresceinisotiocyanat och aminoglykosiden är gentamisin.
7. Fluorescerande, diagnostisk reagens enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att antikonvulsivet är fenobarbital.
8. Fluorescerande, diagnostisk reagens enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att den fluorescerande föreningen är fluoresceinisotiocyanat och aminoglykosiden är tobramycin.
9. Fluorescerande, diagnostisk reagens enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a d därav, att antikonvulsivet är primidon.

10. Immunofluorescensbestämningsförfarande för haptenantigen, vid vilket användes en reagens som innehåller en förening, som bildats av

- a) en hydrofob haptent,
- b) en hydrofil förening och
- c) en fluorescein-, umbelliferon- eller fluorescaminbaserad, hydrofob, fluorescerande förening,

varvid såväl det hydrofoba haptenet som den hydrofoba, fluorescerande föreningen är bundna till den hydrofila föreningen skilt för sig, k ä n n e t e c k n a t därav, att den hydrofila föreningen är en aminoglykosid med den allmänna formeln



vari:

R₁: =C eller -CH;

R₂: -CH₂OH, -CH₂NH₂, -CH₂NHCH₃, $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ -\text{CHNH}_2 \end{array}$ eller $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ -\text{CHCHCH}_3 \end{array}$;

R₃: =C eller -CH;

R₄, R₅ och R₉: -H eller -OH

R₆: -OH eller -NH₂

R₇: -NH₂, -NHCH₂CH₃ eller -NH-COC(OH)CH₂CH₂NH₂

R₈: -H eller -CH₂OH

R₁₀: -OH eller -CH₃ och

R₁₁: -NH₂ eller -NHCH₃

11. Immunofluorescensbestämningsförfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att den hydrofoba, fluorescerande föreningen är fluoresceinisocyanat.
12. Immunofluorescensbestämningsförfarande enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a t därav, att den hydrofoba, fluorescerande föreningen är fluoresceinisotiocyanat.
13. Immunofluorescensbestämningsförfarande enligt patentkravet 11 eller 12, k ä n n e t e c k n a t därav, att haptenet är antikonvulsivt.
14. Immunofluorescensbestämningsförfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att antikonvulsivet är difenylhydantoin.
15. Immunofluorescensbestämningsförfarande enligt patentkravet 14, k ä n n e t e c k n a t därav, att den hydrofoba, fluorescerande föreningen är fluoresceinisotiocyanat och aminoglykosiden är gentamicin.
16. Immunofluorescensbestämningsförfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att antikonvulsivet är fenobarbital.
17. Immunofluorescensbestämningsförfarande enligt patentkravet 16, k ä n n e t e c k n a t därav, att den fluorescerande föreningen är fluoresceinisotiocyanat och aminoglycosiden är tobramycin.
18. Immunofluorescensbestämningsförfarande enligt patentkravet 13, k ä n n e t e c k n a t därav, att antikonvulsivet är primidon.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

Hakemusjulkaisuja:-Ansökningspublikationer: EP 3583 (C 07 G 15/00).
Saksan liittotasavalta-Förbundsrepubliken Tyskland(DE) 2 430 356 (C 07 G 7/00),
2 727 208 (G 01 N 33/16). Iso-Britannia-Storbritannien(GB) 2 039 484
(C 07 D 233/72), 2 039 485 (C 07 D 233/72).
Patenttijulkaisuja:-Patentskrifter: USA(US) 4 169 137 (A 61 K 29/00).