

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 834603 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **834603**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
G01N 33/52

(22) Tekemispäivä - Ingningsdag - Filing date **14.12.1983**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **14.12.1983**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **15.06.1984**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

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

14.12.1982 US 449,709

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Packard Instrument CO., 2200 Warrenville Road Downers Grove, Illinois, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Capone, James Joseph, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Forssén & Salomaa Oy, Lautatarhankatu 8 B, 00580 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Menetelmä ja koostumus fagosyyttisen vasteen ilmaisemiseksi.

Förfarande och sammansättning för indikering av fagocytiskt svar.

Menetelmä ja koostumus fagosyyttisen vasteen määrittämiseksi
Förfarande och sammansättning för indikering av fagocytiskt svar

Keksintö kohdistuu koemenetelmään organismin tulehdusta vastustavan kyvyn mittaamiseksi, siinä käyttökelpoisiin koostumuksiin ja menetelmiin tällaisten koostumusten valmistamiseksi.

- 5 Havaintoja, että tietyt verestä ja elimistä, kuten keuhkoista löydetty fagosyyttiset solut tuottavat valoa partikkelien kuten bakteerien tai elottomien koostumusten fysikaaliseen soluun tunkeutumisen tuloksena on julkaistu jo vuosia tieteiskirjallisuudessa. Nämä havainnot perustuvat tiettyihin veressä tai elimissä tavattaviin soluihin, joiden toiminnan
- 10 tiedetään olevan kriittinen sellaisten partikkelien kuten bakteerien etsimisessä, syömisessä (nielaisemisessä) ja tappamisessa monimutkaisten kemiallisten mekanismien avulla. Nämä solut voivat myöskin etsiä ja poistaa ei-infektiivisiä aineita kuten ilmasta peräisin olevia partikkelimaisia epäpuhtauksia. Osana tässä solun kemiallisessa mekanismissa on suhteellisen suurien happivälituotteiden tuottaminen. Solu tuottaa näitä kemikaaleja tullessaan stimuloitua fagosyyttisesti. Nämä korkean energiset happivälituotteet voivat asettua elämälle energiatasolle ja tässä prosessissa syntyy valoa. Vaikka nämä alhaiset valon tasot ovat mitattavissa sellaisia instrumentteja kuten nestetuikespektrometrejä
- 20 käyttäen, tämä on erittäin hankala tekniikka, jolla ei voida analysoida nopeasti suuria näytemääriä tai näytteitä, joissa on tutkittavana suuri joukko muuttujia. Ja vaikka tämä ilmiö on tunnettu jo jonkin aikaa, siitä on ollut hyötyä vain vähän johtuen yllä kuvatuista rajoituksista ja vaikeuksista saada suhteellisen stabiileja reagensseja.

25

- Tämä keksintö kohdistuu menetelmään erilaisten fagosyyttisten solujen fagosyyttisen vasteen mittaamiseksi. Tällainen menetelmä perustuu organismin käyttämään fagocytoosi-prosessiin tulehduksen vastustamiseksi tai partikkelimaisen materiaalin poistamiseksi keuhkoista jne. Verestä tai
- 30 elimistä johdettujen fagosyyttisten solujen näyte otetaan ihmisestä tai eläimestä ja siihen lisätään partikkeleita sisältävää materiaalia, jonka fagosyyttiset solut nielaisevat. Solut vastaavat partikkeleita sisältä-

vään materiaaliin ja tuottavat happivälituotteita, jotka vuorostaan reagoivat partikkeleita sisältävän materiaalin kemikaalin kanssa. Tämä reaktio tuottaa tuloksena valoa. Näin tuotettu valo vastaanotetaan ja mitataan.

5

Keksintö kohdistuu lisäksi tällaiseen partikkeleita sisältävään reagenssiin, joka soveltuu solujen fagosytosoitavaksi ja joka käsittää polymeerirakeita, jotka on pinnoitettu proteiineilla, joihin luminoiva kemikaali kuten 5-amino-2,3, dihydro-1,4-ftalaaliatsiinidioni (luminol) sitoutuu.

10

Keksintö kohdistuu edelleen toiseen tällaiseen partikkeleita sisältävään reagenssiin, joka soveltuu solujen fagosytosoitavaksi ja joka käsittää polysakkaridipartikkeleita, jotka on johdettu hiivasolujen seinistä (zymosan) ja joihin luminoivaan kemikaaliin (luminol) sekoitetut proteiinit on adsorboitu.

15

Keksintö kohdistuu edelleen menetelmään tämän keksinnön mukaisten pinnoitettujen, partikkelimaisten polymeerirakeiden valmistamiseksi. Polymeerirakeet, n. 2-9 μ halkaisijaltaan, pinnoitetaan proteiinilla ja luminoivala kemikaalilla. Proteiini voidaan peittää luminoivalla kemikaalilla tai luminoiva kemikaali voidaan sekoittaa proteiiniin ja molemmat yhdessä voidaan tuoda polymeerirakeiden pinnalle. Saadut partikkelit pestään, suspendoidaan uudelleen lopulliseen konsentraatioon ja lyofilisoidaan.

20

Edelleen keksintö kohdistuu menetelmään tämän keksinnön mukaisesti käytettävien pinnoitettujen zymosan-partikkeleiden valmistamiseksi. Zymosan-partikkelit pinnoitetaan proteiinilla. Luminol sekoitetaan pinnoitettujen partikkeleiden kanssa ja saatu materiaali lyofilisoidaan stabiiliksi, homogeeniseksi tuotteeksi.

25

Edellä kuvattu ja muut tämän keksinnön piirteet ja edut ilmenevät tarkemmin seuraavasta kuvauksesta ja piirroksista.

30

Kuvio 1 osoittaa laimennetun täysveren kemiluminesenssikokeen tyypillisen vasteen käytettäessä zymosan-pohjaista reagenssia.

Kuvio 2 osoittaa eristetyn neutrofiili-kokeen tyypillisen vasteen käytet-

täessä zymosan-pohjaista reagenssia.

Kuvio 3 osoittaa eristetyn neutrofiili-kokeen tyypillisen vasteen käytettäessä polymeerirea-pohjaista reagenssia.

5

Kuvio 4 osoittaa laimennetun täysveren kemiluminesenssikokeen tyypillisen vasteen käytettäessä zymosan-pohjaista reagenssia.

10

Kuvio 5 osoittaa eristetyn neutrofiili-kokeen tyypillisen vasteen käytettäessä zymosan-pohjaista reagenssia.

Kuvio 6 osoittaa eristetyn neutrofiili-kokeen tyypillisen vasteen käytettäessä polymeeripohjaista reagenssia.

15

Vaikkakin mitä tahansa partikkelimaista fagosyyttiseen solusysteemiin sopivaa materiaalia voidaan käyttää, orgaanisen polymeerimateriaalin ja partikkelimaisten polyakryyliamidien (esim. Bio-Rad^R-partikkelit, Richmond, California) ja zymosan-partikkeleiden on havaittu olevan erityisen sopivia.

20

Jotta tämä systeemi toimisi sopivasti, on välttämätöntä pinnoittaa partikkelimateriaali proteiinilla. Tätä pinnoitusta voidaan täydentää sitomalla proteiini partikkeliin kemiallisesti tai yksinkertaisella elektrostaattisella adsorptiolla. Mitä tahansa sopivaa proteiinia tai proteiinien seosta voidaan käyttää rakeiden herkistämisessä. Sopiviin proteiineihin lukeutuvat puhdistettu humaanin tai eläimen immunoglobuliini G.

25

Seuraavaksi luminoiva kemikaali, joko kemiallisesti tai adsorptiolla, pinnoitetaan tai sekoitetaan proteiinilla pinnoitettuihin partikkeleihin.

30

Vaikkakin mitä tahansa luminoivaa kemikaalia, joka reagoi happivälituotteiden kanssa tuottaen suorasti tai epäsuorasti valoa, voidaan käyttää, luminolin (esim. tuottaa Eastman Organics, Rochester, New York) on havaittu olevan erittäin sopivan. Jos käytetään polymeerirakeita, luminol liuotetaan puskurin vesiliuokseen ja edullisesti reagoitetaan reaktiiviseksi atsovälituotteeksi. Atsovälituote reagoi sitten proteiinilla pinnoitetun polymeeripartikkelien kanssa. Tämä johtaa atsoluminol-proteiiniadduktiin samoin kuin elektrostaattisesti sitoutuneeseen luminol-polyakryyli-

35

amidiin. Saadut partikkelit pestään, suspendoidaan uudelleen lopulliseen konsentraatioon, täytetään viaaleihin ja lyofilisoidaan. Tästä prosesista saadaan stabiili, homogeeninen tuote.

- 5 Luminol voidaan myöskin yksinkertaisesti sekoittaa zymosan-partikkeleiden suspensioon, jonka partikkelit on aikaisemmin pinnoitettu sopivalla proteiinilla. Saatu seos täytetään viaaleihin ja lyofilisoidaan. Tästä prosessista saadaan stabiili, homogeeninen tuote.
- 10 Ylläkuvattu lyofilisoitu tuote on veteen sekoittamisen jälkeen valmista käytettäväksi koemenetelmässä.

- Koemenetelmässä, jossa käytettiin polymeeripartikkeleita 1,000,000-
n. 2,000,000 polyakryyliamidipartikkelia 50 mikrolitrassa puskuria sekoitettiin n. 200,000 puhdistetun fagosyyttisolun kanssa 100 mikrolitrassa
15 puskuria. Zymosan-partikkeliden yhteydessä käytetyt kaksi koemenetelmää olivat: (1) täysveri laimennetaan suhteessa 1:3 (yksi osa antikoaguloitua verta, kaksi osaa puskuria). Viisikymmentä mikrolitraa tätä laimennusta sekoitetaan 200 mikrolitraan luminolia sisältävään, pinnoitettuun zymosaniin. Kukin millilitra zymosan-seosta sisältää keskimäärin
20 50,000,000 partikkelia; ja (2) Viisikymmentä mikrolitraa zymosan-suspensiota sekoitetaan 100 mikrolitraan puskuria, joka sisältää keskimäärin 200,000 puhdistettua fagosyyttisolua. Tämän seoksen tuottamaa valoa tarkkaillaan tietyin aikaväleihin ja fagosyyttisoluvalmisteen fagosyyttinen ja
25 biokemiallinen aktiivisuus mitataan. Soluihin, jotka mitataan tällä tekniikalla lukeutuvat neutrofiilit, monosyytit ja keuhkorakkuloiden makrofagit. Kahta ensimmäistä näistä solutyypeistä saadaan täysverestä, johon kohdistetaan tiheysgradientti kuten FicollTM - HypaqueTM ja sentrifugoidaan. Nämä solut sitoutuvat gradienttiin ja ne voidaan siten puhdistaa.
- 30 Makrofagit saadaan keuhkon pesunesteestä eivätkä ne vaadi puhdistusta. Seuraavassa esimerkissä käytetään neutrofiilejä.

Esimerkki 1

- 35 200 mg ylläkuvattuja polyakryyliamidirakeita, joiden halkaisija on 2-9 mikronia, suspendoidaan 20 ml:an vettä. Tähän suspensioon lisätään 10 mg humaania immunoglobuliinia G (IgG). Proteiiniraesuspensiota sekoitetaan

varovasti ja jäädytetään $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$:en. 40 mg 1-etyyli-3,3-dimetyyli-aminopropyylikarbodi-imidihydrokloridia listään. Kuusi tuntia myöhemmin lisätään 150 mg glysiiniä. Seosta sekoitetaan yön yli $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$:ssa. Seuraavana päivänä suspensio pestään sentrifugoimalla fosfaattipuskuriliuoksella, 1,4 M natriumkloridia fosfaattipuskurissa ja lopuksi 0,005 M fosfaattipuskurilla. Rakeet sentrifugoidaan jälleen ja suspendoidaan uudelleen 8,5 ml:an 0,5 M boraattipuskuria, pH 8,5.

Luminolin diatsoiumsuola valmistetaan suspendoimalla 200 mg luminolia 20 ml:an 2,4 N HCl:a. Seos jäädytetään jäissä. 2,0 ml:a 100 mg per ml natriumnitriittiä lisätään, sekoitetaan ja lisätään nopeasti jäädytety puskuri, 50 ml 0,5 m pH 8,5. pH-arvoa tarkkaillaan ja säädetään 10 N natriumhydroksidilla pH-arvoon $7,1 \pm 0,1$. 14 ml luminolin diatsoniumsuola lisätään sitten 8,5 ml:an ylläkuvattuja uudelleensuspendoituja rakeita ja pH säädetään arvoon 8,5. Suspensiota sekoitetaan kolme tuntia pimeässä $2^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$:ssa.

Diatsoitujen rakeiden suspensio dialysoidaan tämän jälkeen.

Dialyysi etenee vähintään 24 tuntia.

Sitten rakeet pestään sentrifugoimalla käyttäen 0,2 M pH 8,0 boraattipuskuria, kunnes sakan päällä olevan nesteen valon määrä on alle 1,0 % kokonaissuspension alkuperäisestä valosta, ts. suurempi kuin 99 % rakeisiin kiinnittyneestä luminolista.

Rakeet sentrifugoidaan jälleen kerran. Rakeet suspendoidaan uudelleen fosfaattipuskurin suolaliuokseen. Raekonsentraatio säädetään n. 50,000,000 rakeeseen per millilitra määritettynä hemosytometrillä. Sitten viaalit täytetään suspensiolla 1,0 ml:n annoksilla ja lyofilisoidaan alle 5 prosentin jäännöskosteuteen määritettynä Karl Fisher-titrauksella.

Käytettäväksi fagosyyttisessä kokeessa viaaliin lisätään 1,0 ml puhdistettua vettä.

Esimerkki 2

Zymosan A (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) suspendoidaan fosfaattipuskuriliuokseen konsentraatioon 24 ml per ml. Tähän suspensioon lisätään sama tilavuus 50 prosenttista normaalia kaninin seerumia, joka on laimennettu fosfaattipuskuriliuoksella. Suspensiota inkuboidaan tunnin ajan 37°C:ssa ravistuksessa vesihauteessa. Suspensio sentrifugoidaan, ja sakan päällä oleva neste poistetaan ja tällä tavalla käsitelty Zymosan A (pelletti) suspendoidaan uudelleen pieneen tilavuuteen fosfaattipuskuriliuosta. Suspensio vedetään sitten ruiskun neulan (18-26 mittaa) läpi suspension homogenisoimiseksi. Lopuksi lisätään fosfaattipuskuriliuosta suspension alkuperäisen tilavuuden nelinkertaistamiseksi, joka on keskimäärin 6 ml per ml suspensiota. Tämä suspensio ohjataan sitten lasivillatulpan läpi jäljellä olevien suurien zymosan-paakkujen poistamiseksi.

Luminolin perusliuos valmistetaan liuottamalla se 0,01 N natriumhydroksiidiin. Osa tätä liuosta lisätään sitten liuokseen, joka sisältää 20 % syntymättömän vasikan seerumia fosfaattipuskuriliuoksessa, jolloin saatu luminol-pitoisuus on 14,4 mikrogrammaa per ml.

Yhteen tilavuusosaan zymosan-suspensiota lisätään yksi tilavuusosa luminol-syntymättömän vasikan seerumiliuosta. Saatua suspensiota sekoitetaan, täytetään viaaleihin 2,0 ml:n annoksina ja lyofilisoidaan alle 5 prosentin jäännöskosteuteen määritettynä Karl Fisher-titrauksella.

Käytettäessä fagosyyttisessä kokeessa viaaliin lisätään 2,0 ml vettä.

Esimerkki 3

Useita lapsia, joilla aikaisemmin oli todettu olevan jyväiskasvaumatauti (CGD), tutkittiin käyttämällä yllä kuvattuja reagensseja ja koemenetelmää. Tämä tauti valittiin siksi, koska sen toimintahäiriöt tunnetaan. CGD:n aiheuttaa veren fagosyyttisistä soluista löydettyjen tiettyjen entsyymien puutteesta. Vaikka fagosyyttiset solut pystyvät nielaisemaan bakteerin (partikkeleita), solut eivät pysty inaktivoimaan tai tappamaan bakteeria, koska fagosyyttisiltä soluilta puuttuu kyky tuottaa korkeaenergisistä hap-pivälituotteita. Tällaisina ne eivät voi aiheuttaa solujen nielaiseman

luminolin hapetusta, ja tästä johtuen mitattavaa valovastetta ei havaita. Kliinisesti tämä puute ilmenee näillä lapsilla tyypillisesti vakavan tulehduksia vastustavan kyvyn heikkenemisenä. Katso tyypillisiä vasteita kuvioissa 1-3. Kun näitä lapsia testattiin yhdessä ilmeisesti terveiden
 5 kontrollikohteiden kanssa, he eivät tuottaneet valoa luminolin hapetuksessa, vaikka partikkelit nielaistiin yhtä tehokkaasti kuin kontrolleissa.

Esimerkki 4

10 Joukolta lapsia, joilla aikaisemmin oli todettu olevan astma, tutkittiin fagosyyttisten solujen fagosyyttinen/biokemiallinen vaste. Keskimäärin puolet lapsista sai terapeuttisia annoksia teofylliiniä; muille lapsille ei annettu tätä lääkitystä. Teofylliinillä on ajateltu olevan vaikutusta sykliseen adenosinimonofosfaattiin (c-AMP), jonka tiedetään aikaansaa-
 15 van säätötahtuman fagosyyttisten solujen tietyissä biokemiallisissa toiminnoissa. Katso kuvioita 4-6. Teofylliiniä saavat lapset yleensä osoittivat happivälituotteen tuotannon laskua määritettynä alentuneena luminolin hapetuksena ja valon tuotantona.

20 Tällaisilla kuvatuilla menetelmillä on erityistä käyttöä määrättäessä infektion vastustusta fagosyyttisenä aktiivisuutena. Kuitenkin tällaisella prosessilla on sovellutuksia myöskin lääketieteellisissä diagnooseissa, immunotogsikologiassa, farmakologiassa kuten esimerkiksi tarkkailta-
 25 essa toksisuutta kemoterapia- ja säteilytysterapiapotilailla. Sitä voidaan käyttää arvioitaessa immunokompetenssia, tiettyjen veren seerumin proteiinien puutteita jne. Tutkimusvälineenä sitä voidaan käyttää testattaessa farmaseuttisia yhdisteitä ja niiden vaikutusta fagosyytteihin, epäpuh-
 tauksien vaikutuksista fagosyyttisiin soluihin ja toksisten yhdisteiden vaikutusta eläimiin ja ihmisiin.

30

Vaikka tätä keksintöä on kuvattu tiettyjen sovellutusmuotojen valossa, alan ammattimiehelle on ilmeistä, että useita sen muunnelmia voidaan soveltaa vaatimusten puitteissa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä organismin infektiota vastustavan kyvyn mittaamiseksi menetelmän käsittäessä verinäytteen ottamisen organismista, fagosyyttisten solujen erottamisen verestä, proteiinilla pinnoitettujen partikkelien lisäämisen fagosyyttisiin soluihin luminoivan kemikaalin ollessa sidottu proteiiniin, siten saaden fagosyyttiset solut nielaisemaan partikkelit tällä tavoin aktivoiden solujen biokemiallista mekanismia, joka reagoi luminoivan kemikaalin kanssa aikaansaaden valoa, joka mitataan lumino-
- 5 metrillä.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että partikkelit ovat polymeerirakeita, joiden halkaisijat ovat n. 2 - n. 9 mikronia.
3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakeet ovat polyakryyliamidia.
- 15 4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että partikkelit ovat zymosan-partikkeleita.
5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että luminoiva kemikaali on luminol.
- 20 6. Fagosyyttinen koostumus, joka käsittää polyakryyliamidipartikkeleita, joiden halkaisijat ovat n. 2 - n. 9 mikronia ja jotka on päällystetty kerroksella seerumiproteiinia, johon luminolkerros on sitoutunut.
- 25 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen koostumus lyofiilisisä muodossa.
8. Fagosyyttinen koostumus, joka käsittää seerumiproteiini- ja luminolkerroksella pinnoitettuja zymosan-partikkeleita.
- 30 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen koostumus lyofiilisisä muodossa.
10. Menetelmä fagosyyttisen reagenssin valmistamiseksi menetelmän käsittäessä partikkelimaisen halkaisijaltaan n. 2 - n. 9 mikronia olevan mate-
- 35

riaalin pinnoittamisen proteiinin ja luminoivan aineen kerroksella ja pinnoitettujen partikkelien lyofilisoimisen stabiiliksi, homogeeniseksi tuotteeksi.

5 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proteiinikerros tuodaan ensin ja sen jälkeen luminoiva kemikaali.

12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että luminoiva kemikaali sekoitetaan proteiiniin ennen lisäämistä partik-
10 kelimaiseen materiaaliin.

13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että luminoiva kemikaali on luminol.

15 14. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että partikkelimainen materiaali on polyakryyliamidi tai zymosan.

Fig. 1

LAIMENNETUN TÄYSVEREN KEMILUMINESENSSIKOEEN
TYYPILLINEN VASTE KÄYTETTÄESSÄ ZYMOSAN-POHJAISTA
REAGENSIA

- Henkilökohtainen terveys
- Neljä lasta, jotka sairastavat
kroonista jyväskaasvaumatautia.

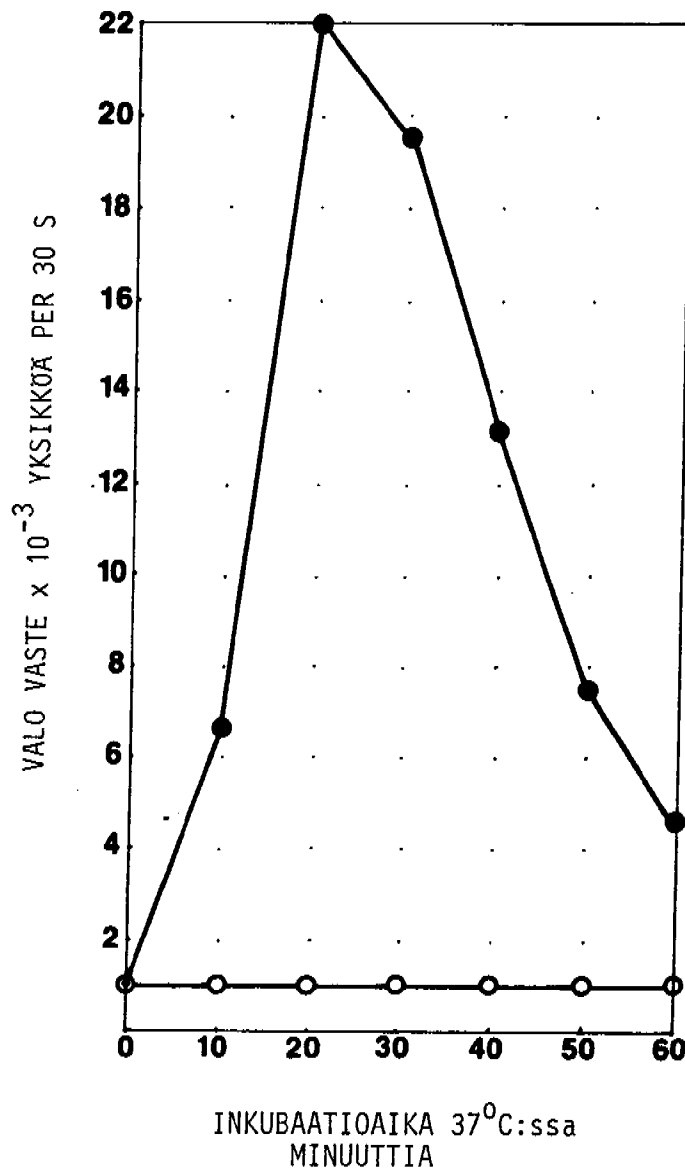


Fig.2 ERISTETYN NEUTROFIILI-KOKEEN TYYPILLINEN VASTE
KÄYTETTÄESSÄ ZYMOSAN-POHJAISTA REAGENSIA

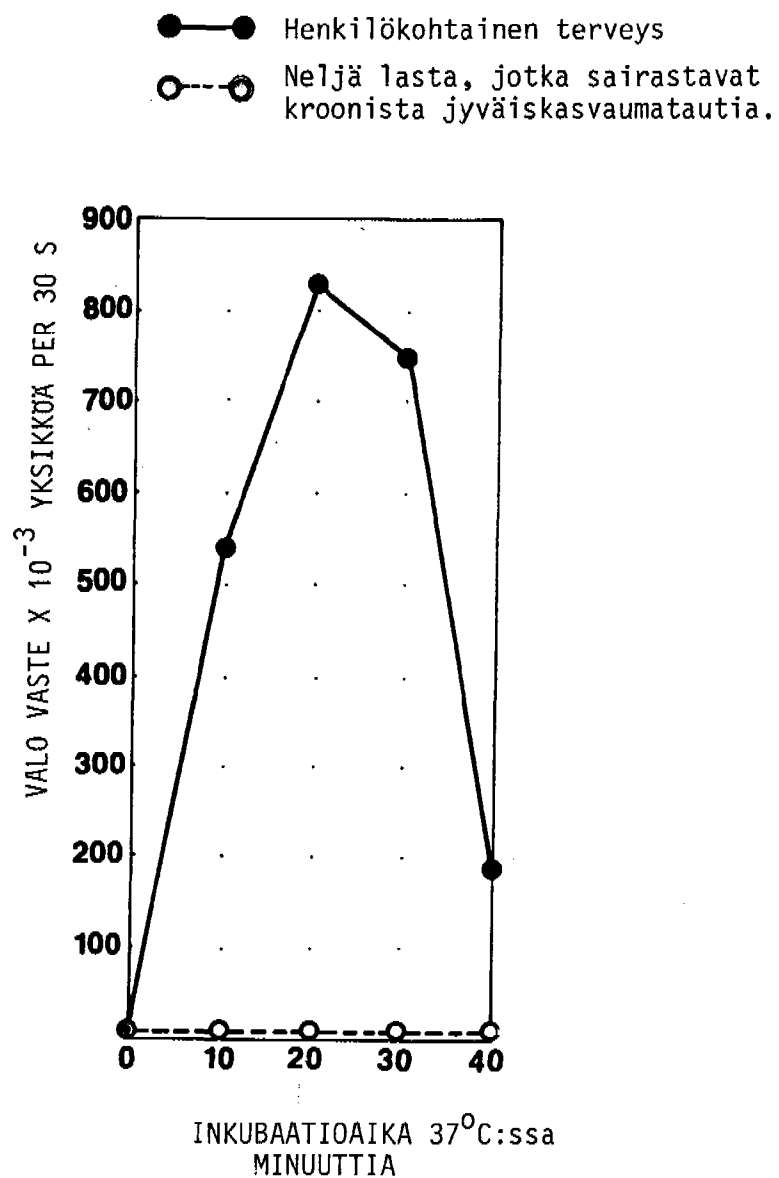


Fig.3

ERISTETYN NEUTROFIILI-KOKEEN TYYPILLINEN VASTE
KÄYTETTÄESSÄ POLYMEERIRAE-POHJAISTA REAGENSsia

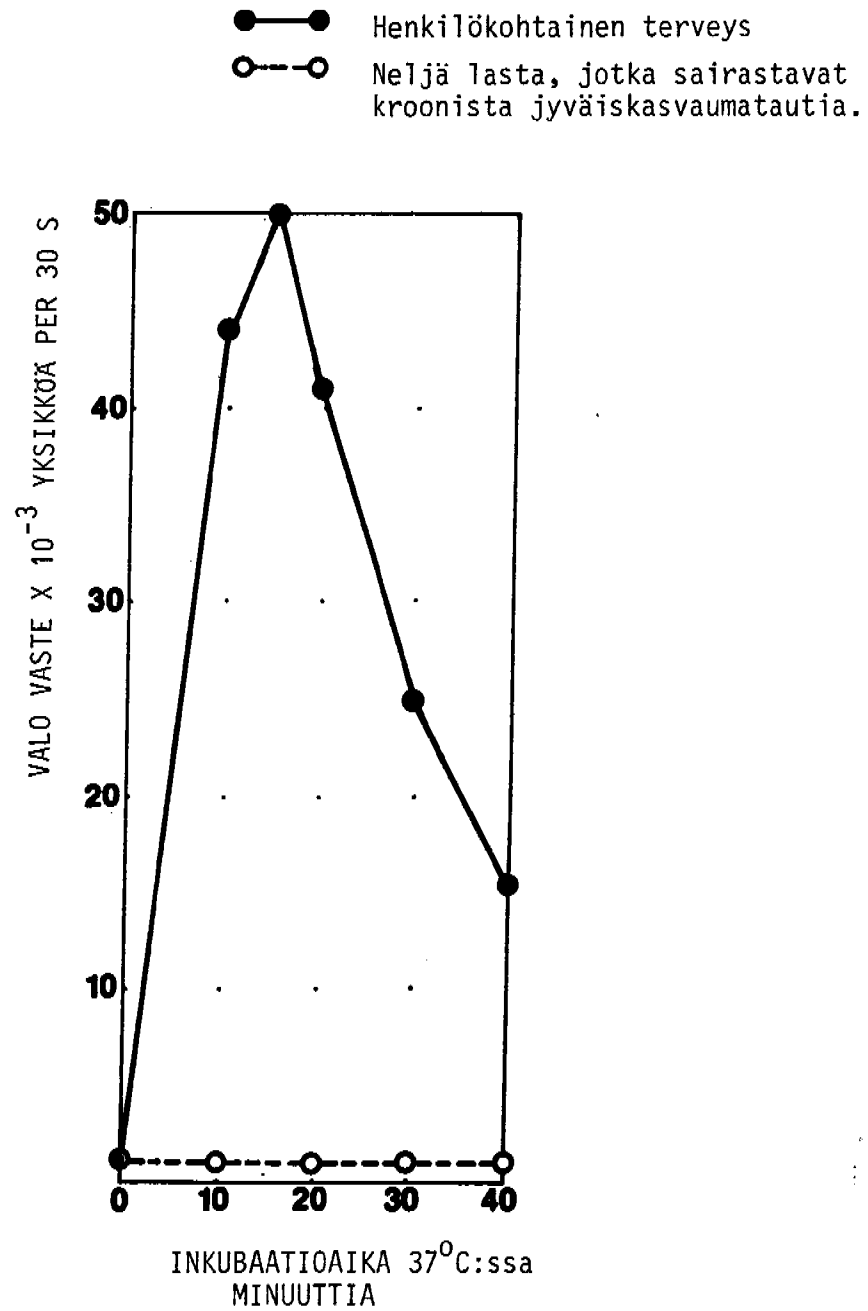


Fig.4

LAIMENNETUN TÄYSVEREN KEMILUMINESENSSIKOEEN
TYYPILLINEN VASTE KÄYTETTÄESSÄ ZYMOSAN-POHJAISTA
REAGENSIA

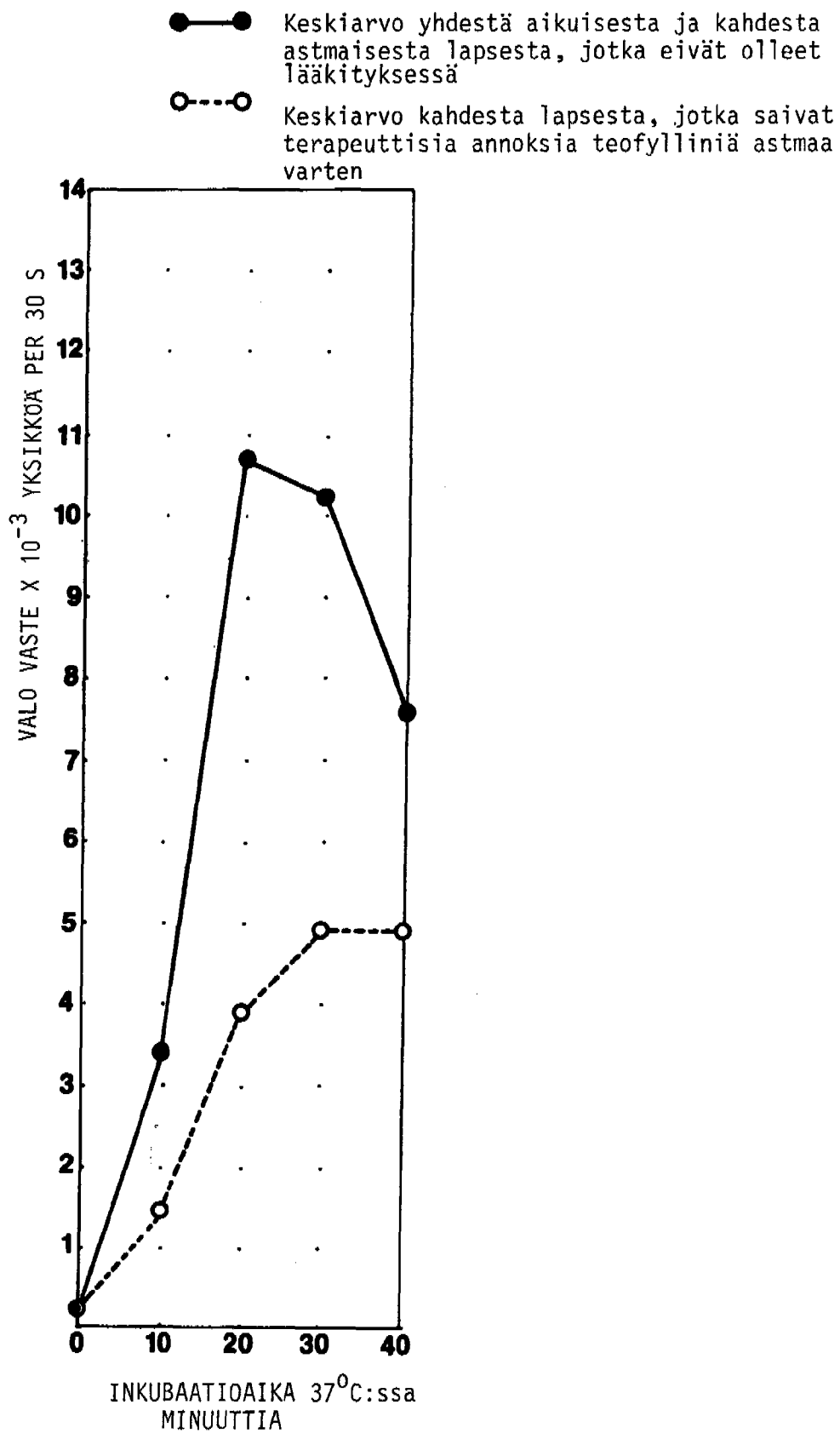


Fig. 5

ERISTETYN NEUTROFIILI-KOKEEN TYYPILLINEN VASTE
KÄYTETÄESSÄ ZYMOSAN-POHJAISTA REAGENSIA

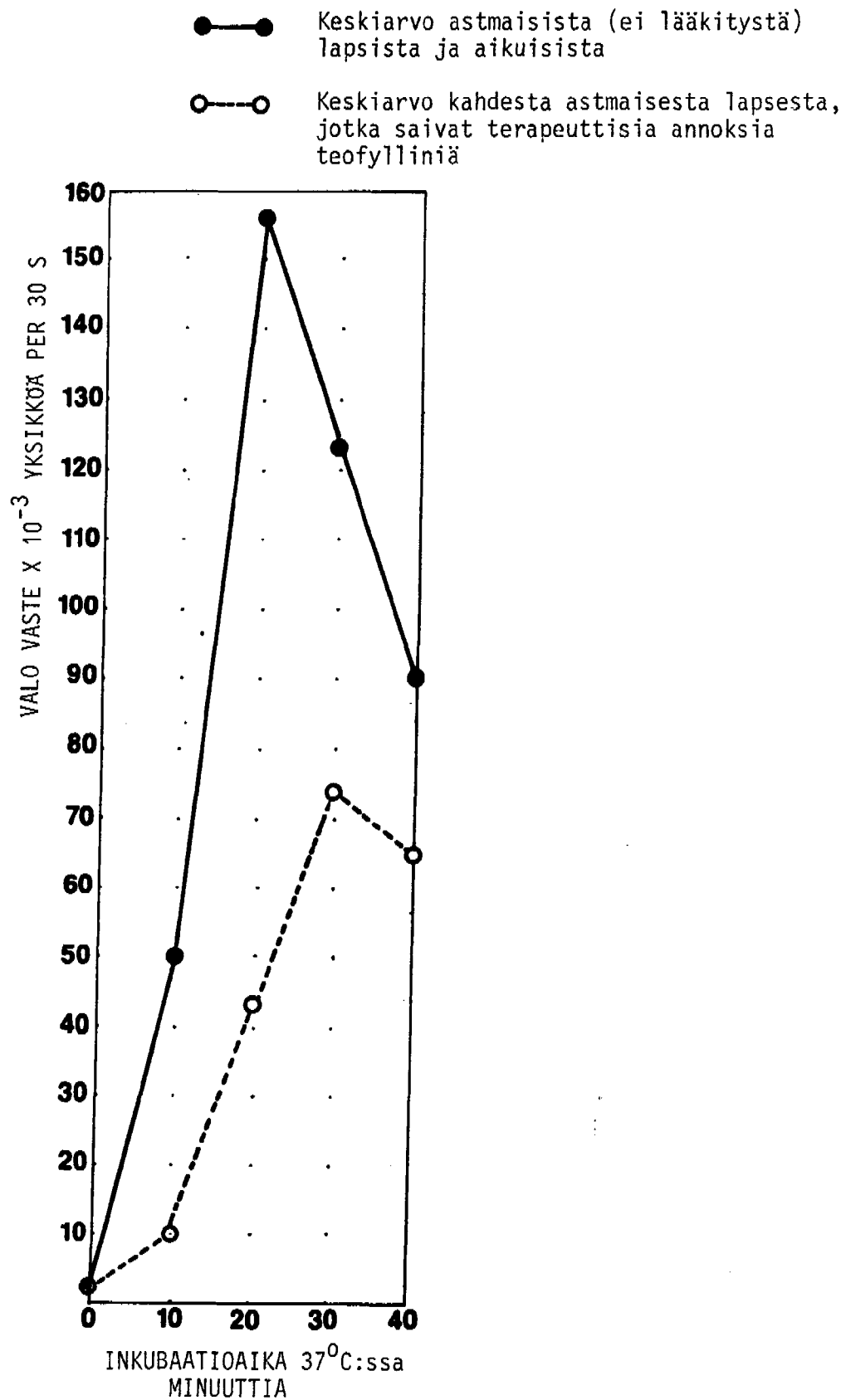
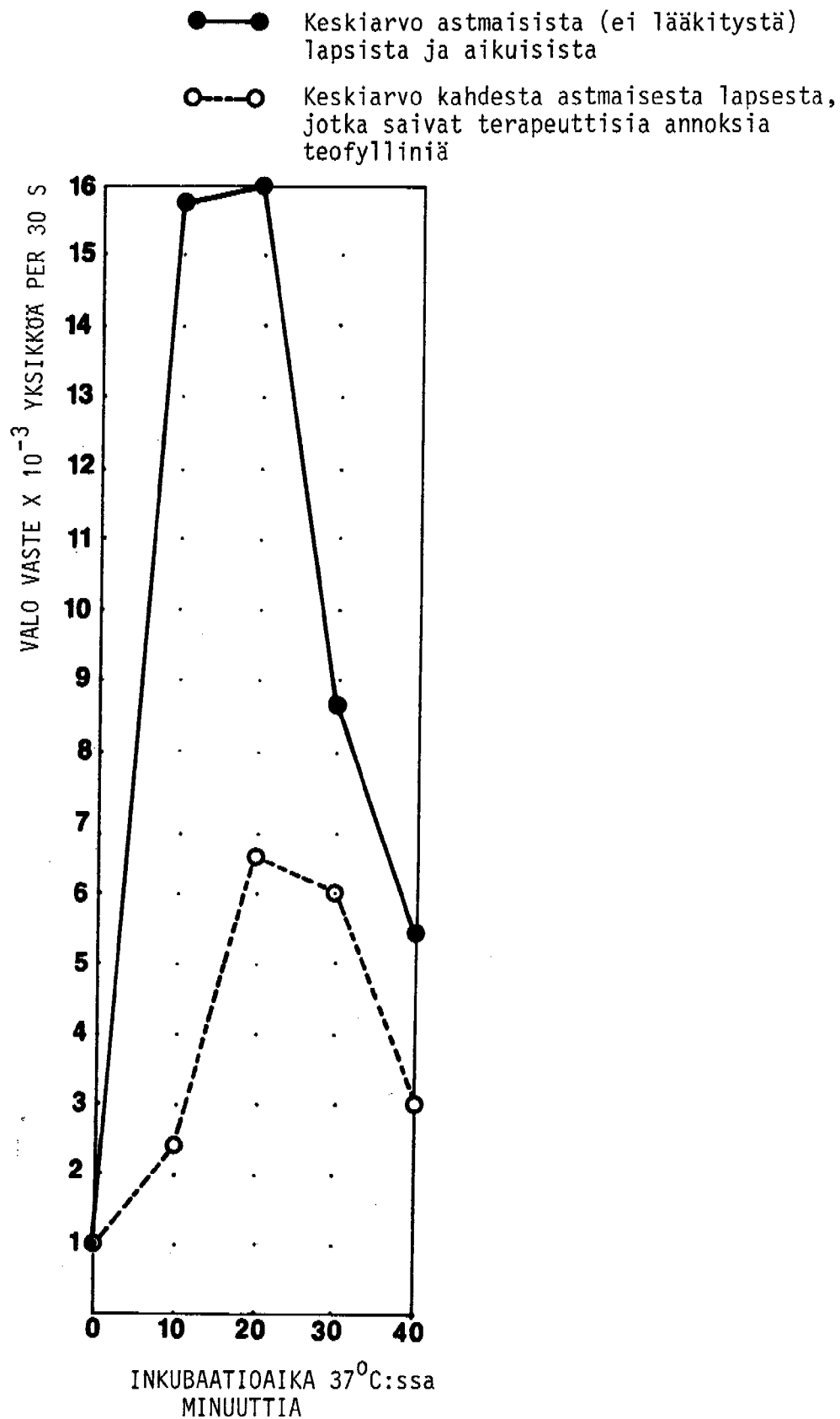


Fig.6

ERISTETYN NEUTROFIILI-KOKEEN TYYPILLINEN VASTE
KÄYTETÄESSÄ POLYMEERIRAEPÖHJAISTA REAGENSIA



Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar.

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB _____

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisuun (esim. saksan... Offentl. Anzeiger) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisuun numeron eteen K ja P.

EP

WO

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Ritva Karén

Allekirjoitus