

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 781220 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 781220

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **20.04.1978**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **20.04.1978**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **12.11.1978**

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

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

11.05.1977 DE 2721267

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Chandon Investment Planning Ltd, West Wind Bldg. P.O. Box 1111, Grand Cayman, CAYMANSAARET, (KY)

2 •Thoma, Hans A., München, BRD, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Thoma, Hans A., SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Akryyliamidiin pohjautuva polymeerimatriisi

Polymermatrix som baserar sig på akrylamid

Chandon Investment Planning Ltd., West Wind Bldg. P.O. Box 1111,
Grand Cayman, Cayman Island, Länsi-Intian liittovaltio

Polymeerimatriksi, joka on akryyliamidia - Polymermatrix som ut-
göres av akrylamid

Keksintö koskee polymeerimatriksia, joka on akryyliamidia ja jota
voidaan käyttää vasta-aineiden immobilisoimiseen hormonien ja far-
maseuttisten aineiden radioimmunologisessa määrityksessä.

Radioimmunologisessa hormonien ja farmaseuttisten aineiden määri-
tyksessä tapahtuu hormonien ja farmaseuttisten aineiden reaktio
vasta-aineen kanssa. Reaktion spesifisyys on riippuvainen immunolo-
gisesta komplementti-ilmiöstä, so. samanlaisen kemiallisen konfigu-
raation omaavien aineiden välillä voi tapahtua ristireaktioita.
Eräässä estrioli- C_6 -konjugaatissa esiintyy estrioli sellaisessa im-
muunisuutta määräävässä konfiguraatiossa, jossa lähes kaikki tärkeät
estriolin funktionaaliset ryhmät esiintyvät vasta-aineen sitomis-
alueella. Tästä huolimatta sitoo vasta-aine estriolikonjugaatteja,
joiden sulfaatti- tai glukoronidijäännös on fenolisen C_3 :n asen-
nossa, huomattavassa määrässä. Tämä on epäedullista vapaiden steroidi-
dien määrityksessä erikoisesti silloin, kun näytteiden konjugaatti-
konsentraatio ylittää kymmenkertaiseesti steroidikonsentraation,
kuten on laita raskausseerumin estrogeenien suhteen.

Edellä olevista syistä on tähän asti käytetty etupäässä menetelmiä, joissa spesifisyys varmistetaan liuottimen avulla tapahtuvalla uutamisella ennen radioimmunisuuskoea. Liuottimen avulla uuttamiset kuitenkin estävät sarjassa tapahtuvan ja koneellisen näytteiden käsittelyn.

Kokeissa, joissa yritettiin yksinkertaistaa radioimmunologisia kokeita kiinteän faasin tekniikalla tapahtuviksi, sidottiin vasta-aineet kovalenttisesti erilaisiin matrikseihin, kuten esimerkiksi agarroosiin, selluloosaan, lasihiukkasiin, polyamideihin ja polyakryyliamideihin. Matriksiin sidottujen vasta-aineiden etuina on korkean molekyylipainon omaavien molekyylien häiritsevän vaikutuksen poistaminen, pipetoimis- ja sentrifugoimisvaiheiden säästyminen ja immobilisoidun vasta-aineen pitkäaikainen säilyvyys huoneenlämmössä.

On kuitenkin osoittautunut, ettei matriksiin tunnetulla tavalla immobilisoidun vasta-aineen sitoutumisspesifisyys vastaa vaatimuksia.

Keksinnön tehtävänä on sen vuoksi saada aikaan sellainen polymeerimatriksi, johon sidotun vasta-aineen sitoutumisspesifisyys paranee ja ei-toivotut ristiin menevät reaktiot voidaan estää.

Yllättäen on havaittu, että vasta-aineen sitoutumisspesifisyyttä voidaan vaihdella ja parantaa sellaisilla polymeerimatrikseilla, jotka ovat akryyliamidin kopolymeraatteja.

Keksinnön kohteena on akryyliamidista tehty polymeerimatriksi, jonka avulla voidaan immobilisoida vasta-aineita hormonien ja farmaseuttisten aineiden radioimmunologisessa määrittämisessä, tunnettu siitä, että se on akryyliamidin kopolymeraatti.

Parhaina pidetään erikoisesti kopolymeraatteja, jotka ovat valmistettu akryyliamidista ja yhdestä tai useammasta seuraavista yhdisteistä: akryylihapo, metakryylihapo, matakryyliamidi, niiden johdannaiset ja akryylihapon tai metakryylihapon suolat.

Akryyliamidin ja sen kanssa kopolymeroituvien yhdisteiden kopolymeroinnin avulla voidaan vaikuttaa polymeerimatriksin mikroympäristöön. Tämä vaikutus perustuu olennaisesti hydrofobisiin ja hydrofi-

lisiin samoin kuin elektrostaattisiin efekteihin.

Muuntelemalla polymeerimatriksia kopolymerisaation avulla on mahdollista parantaa olennaisesti vasta-aineen sitoutumisspesifisyyttä ja estää ei-haluttuja ristiin meneviä reaktioita. Polymeerimatriksia muunnellaan sopivan kopolymerisaation avulla, jotta voidaan taata toisaalta hapteenien spesifinen reaktiot immobilisoidun vasta-aineen kanssa ja toisaalta estää ristiinreagoivat hapteenit.

Suuremman spesifisyyden ansiosta voidaan keksinnön mukaisissa polymeerimatrikseissa suorittaa mittaus suoraan ei-suutetussa seerumissa.

Keksinnön mukaisten polymeerimatriksien avulla on mahdollista hyvin tarkka hormoonien ja farmaseuttisten aineiden radioimmunologinen määrittäminen, koska määrittämissarvojen epätarkka heilahtelu steroidimolekyylien ja matriksin välisten ei-spesifisten sidosten vuoksi on saatu minimiin kopolymeroinnin avulla.

Erilaisissa määrittämissä kuten esimerkiksi kilpirauhashormonien tyroksiinin ja trijodityronin määrittämissä käytetään hyväksi kompetitiivisiä aineita kuten anilinonaftolisulfonihappoa, mertiolaattia tai salisylaatteja, jotta ne ajaisivat hormoonit ulos sidoksista erilaisten sidosproteiinien kanssa seerumiin.

On kuitenkin tunnettua, että näiden kompetitiivisten aineiden konsentraation ollessa korkea se vaikuttaa hormoonin ja vasta-aineen väliseen sidokseen. Keksinnön mukaisen polymeerimatriksin ansiosta voidaan, luultavasti elektrostaattisten vuorovaikutusten johdosta, nostaa kompetitiivisten aineiden konsentraatiota olennaisesti, nimitään 100-kertaisesti, ilman että esiintyisi hormooni-vasta-ainesidoksen heikentymistä.

Akryyliamidin osuus kopolymeraatissa voi nousta 1-99 mooliprosenttiin, edullisimmin 5-95 mooliprosenttiin ja erityisesti 20-80 mooliprosenttiin.

Erityisen hyvin sopivia ovat akryyliamidin ja metakryylihapon kopolymeraatit ja varsinkin sellaiset, joissa metakryylihapon osuus on 20-60 mooliprosenttia. Metakryylihapo tekee toisaalta matriksin hydrofobiseksi ja toisaalta aikaansaa varausefektin, minkä kautta voidaan estää määritettävien aineiden ei-spesifiset sidokset hyvin suuressa määrässä.

Käyttämällä keksinnön mukaisia kopolymeraatteja, jotka sisältävät akryylihappoa tai metakryylihappoa tai niiden suoloja, saadaan aikaan vielä neutralisointieffekti tai puskurivaikutus happamille ja vastaavasti alkalisille liuoksille. Tämä on useissa määrityksissä huomattava etu.

Akryylihapon tai metakryylihapon suoloista pidetään parhaina alkali- ja/tai maa-alkalisuoloja. Erikoisesti tulevat kyseeseen natrium- ja kaliumsuolat.

Akryylihapon ja metakryylihapon johdannaisista tulevat kyseeseen erikoisesti niiden esterit, esimerkiksi metyyli- ja etyyliesteri.

Sopivia metakryyliamidin johdannaisia ovat esimerkiksi N-substituoit-
dut yhdisteet, kuten N-hydroksimetyylimetakryyliamidi.

Akryyliamidin kanssa kopolymeroitaviksi soveltuvia yhdisteitä ovat akryyliamidin johdannaiset, varsinkin N-substituoit-
dut yhdisteet, kuten N-hydroksimetyyliakryyliamidi.

Esimerkkinä muista akryyliamidin kanssa kopolymeroituvista yhdis-
teistä on N,N'-diallyylitartardiamidi.

Vasta-aineen immobilisoiminen tapahtuu sulkemalla polymeerimatriksin
sisään ja/tai sitomalla kovalenttisesti polymeerimatriksiin.

Yksityiskohtainen selostus radioimmuunikokeista on esimerkiksi jul-
kaisussa Clinical Chemistry, osa 19 N:o 2, 1973, sivu 145. Radio-
immunologista tekniikkaa, jossa käytetään immobilisoitua vasta-ai-
netta, on selostettu julkaisuissa Clinical Chemistry, osa 19, N:o 12,
1973 sivu 1339 ja Clinical Chemistry osa 21, N:o 7, 1975, sivu 829.

Keksinnön mukaiset polymeerimatriksit soveltuvat käytettäviksi eri-
laisten hormonien ja farmaseuttisten aineiden määrityksessä, joita
on seerumissa tai plasmassa osittain spesifisiin tai ei-spesifisiin
sidosproteiineihin sitoutuneina. Kyseeseen tulevat kipurauhashor-
moonit, varsinkin tyroksiini ja trijodityroniini, steroidihormoonit
kuten kortisoli, testosteroni, progesteroni, estroni, estradioli
ja estrioli ja sydämglykosidit kuten digitoksiini ja digoksiini.
Lisäksi voidaan suorittaa määrityksiä vitamiineista, erikoisesti

vitamiini B 12:sta ja foolihaposta, ja farmaseuttisista aineista, joissa on voimakas proteiinisisidos, kuten esimerkiksi antikoagulan-teista, dikumarolista, analgeettisista aineista ja salisylaateista.

Radioimmunologisen määrityksen lisäksi tulevat mahdollisesti kysee-seen myös vaihtoehtoiset määritysmenetelmät kuten fluoroimmunologi-nen määritys tai määritys, jossa käytetään entsyymaattista merkintää.

Antigeenien synteesi, antiseerumien valmistaminen esimerkiksi immuni-soimalla kaneja ja vasta-aineiden eristäminen ja immobilisoiminen ovat ennestään tunnettuja (vrt. esimerkiksi Clinical Chemistry, osa 19, N:o 2, 1973, sivu 146 ff.

Keksinnön mukaisia polymeerimatrikseja, joissa on immobilisoitu vasta-aine, voidaan valmistaa esimerkiksi siten, että vasta-aineen liuos pannaan monomeeriseokseen. Seos polymeroidaan vapaiden radi-kaalien avulla ja saatu polymeraatti pienennetään, pestään ja kui-vataan.

Akryyliamidiin lisättyjen kopolymeerien valinta ja määräsuhteet riippuvat polymeerimatriksin halutuista ominaisuuksista spesifisyy-den suhteen. Spesifisyyteen voidaan vaikuttaa laajoissa rajoissa muuttamalla matriksin hydrofobisuutta ja varausta. Metakryyliamidin lisäys nostaa hydrofobisuutta. Lisäämällä akryylihappoa tai metak-ryylihappoa tai niiden suoloja voidaan muunnella matriksin varausta. On mahdollista lisätä akryylihapon tai metakryylihapon suolat suo-raan monomeeriseokseen tai vaihtoehtoisesti voidaan hapot polymeroi-da ja muodostaa tämän jälkeen suolat ioninvaihdon avulla polymeeri-matriksissa.

Polymeerimatriksin sopivan huokoskoon saamiseksi vaihdellaan mono-meerikonsentraatiota. Noin 20 %:n monomeerikonsentraatiolla saadaan aikaan huokoskoko 7-10 Å.

Edullisessa kopolymeraatissa saattaa esimerkiksi olla akryyliamidia ja 20-60 mooliprosenttia akryylihappoa ja/tai metakryylihappoa, joka on valmistettu noin 20-prosenttisesta monomeeriliuoksesta ja vähin-täin osa happoryhmistä on tällöin muutettu vastaaviksi alkali- tai maa-alkalisuoloiksi.

Keksintöä valaistaan seuraavassa esimerkkien avulla.

Esimerkki 1

Tässä esimerkissä osoitetaan polymeerimatriksin vaikutus est. trioli-3-glukoronidin ja estrioli-3-sulfaatin ristiin reagoimiseen (K).

Ristiin reagoiminen K lasketaan satakertaisesta määrästä vastaavan hapterenin massaa, joka tarvitaan y:tä kohti (= 50) jaettua ristiin-reagoivan hapterenin massalla, joka tarvitaan y:tä kohti (= 50). Arovt lasketaan ID_{50} :n perusteella.

Valittu antiestrioli-vasta-aine osoitti 3-glukoronidi-konjugaattien tai 3-sulfaatti-konjugaattien suhteen voimakasta ristiinreagoimista.

Jokaisen polymerointiseoksen konsentraatio säädettiin siten, että totaalin monomeerikonsentraatio oli 2,9 moolia/l. Erästä reaktio-seosta varten liuotettiin esimerkiksi 5 g akryyliamidia ja 1,25 g N,N'-metyleenibisakryyliamidia dekantterissa 24 ml:n fosfaattipuskuria, jonka pH-arvo oli 7,2. Vasta-aine sekoitettiin 1 ml:an fosfaattipuskuria ja sen jälkeen aloitettiin reaktio 0,15 mg:n kanssa riboflaviinia ja 0,10 ml:n kanssa N,N,N',N'-tetrametyylietyleenidiamiinia ja säteilytettiin UV-valolla. Säteilytyksen aikana, joka oli 45 min, pidettiin lämpötila 50°C:ssa. Geelilohkare pienennettiin sen jälkeen, pestiin tislatusella vedellä ja kuivattiin.

Pieniin pylväisiin punnittiin 22 mg kuivaa antiestrioli-vasta-ainegeeliä ja päälle kaadettiin 0,150 ml inkubaatioliuosta. Tämä inkubaatioliuos sisälsi 3H -estriolia ja ei-merkittyä hapterenia (estriolia, estrioli-3-glukoronidia tai estrioli-3-sulfaattia). Reaktiolämpötila pidettiin vakiona 0°C. 30 minuutin inkubaatioajan jälkeen seurasi vapaan, vasta-aineeseen sitoutuneen hapterenin erottaminen eluoimalla albumiinipitoisella fosfaattipuskurilla. Eluaatti otettiin pieniin tuikelaseihin, niihin lisättiin 15 ml tuikenestettä ja mitattiin radioaktiivisuus nestetuikelaskurissa. Impulsseista laskettiin vapaan indikaattorihapterenin 3H -estriolin konsentraatio.

Tulokset määrityksistä vesisysteemissä käyttäen polymeerimatrikseja, jotka on akryyliamidia ja akryyliamidikopolymeerejä, on koottu seuraavassa tulevaan taulukkoon. Ilmoitetut arvot ovat edellä määritettyjä ristiinreagoimisarvoja.

Vesisysteemi	Akryyliamidi	Akryylihapon natrium- suola/akryyliamidi	Metakryylihapon nat- riumsuola/akryyliamidi				
	100	10:90	30:70	50:50	20:80	40:60	60:40
Estrioli-3- glukorinidi	61	29	19	10	14	4	21
Estrioli-3- sulfaatti	47	33	30	12	24	6	23

Tulokset osoittavat, että kopolymeraateilla saadaan aikaan vesisysteemeihin ja akryyliamidihomopolymeraatteihin verrattuna huomattava sidosspesifisyyden nousu. Sopivan kopolymeraatin valinnan ansiosta voidaan saavuttaa 15-kertainen spesifisyyden nousu vesisysteemeihin ja 7-kertainen nousu akryyliamidihomopolymeereihin verrattuna. Tämä käy ilmi verrattaessa vesisysteemin ja akryyliamidihomopolymeraatin arvoja metakryylihapon ja akryyliamidin 40/60 kopolymeraatin kanssa.

Esimerkki 2

Tämä esimerkki esittää keksinnön mukaisen polymeerimatriksin osuuden suoritettaessa kokonaismääritys tyfoksiinista pepsiniin kanssa entsymaattisen hydrolyysin avulla.

Vasta-ainegeelin polymeerimatriksi oli kopolymeraattia, joka oli valmistettu akryyliamidista ja 40 mooliprosentista metakryylihapon natriumsuolaa, monomeeriliuos oli 20-prosenttinen.

10 μ l:an seerumia, joka sisälsi 18 μ g tyroksiinia 100 ml:a kohti, lisättiin 160 μ l entsyymiliuosta, jossa oli 2 mg/ml pepsiniä liuotettuna 0,1 N suolahappoon.

Reaktio entsyymin kanssa suoritettiin huoneenlämmössä 30 min kuluessa.

Tähän 170 μ l:n määrään lisättiin sitten 150 μ l merkkiliuosta, joka sisälsi 5,2 ng/ml radioaktiivisesti merkittyä tyroksiinia.

Koko liuos kaadettiin sitten 60 mg:n päälle vasta-ainegeeliä. Inkubaatioaika oli 30 min, lämpötila 22°C.

Tulosten arviointi osoitti erittäin korkeata löydösprosenttia, 98.

Esimerkki 3

Tämä esimerkki osoittaa keksinnön mukaisen polymeerimatriksin osuuden kortisolin kokonaismäärityksessä.

Vasta-ainegeelin polymeerimatriksi oli kopolymeraattia, joka oli valmistettu akryyliamidista ja 40 mooliprosentista metakryylihapon natrium- ja kalsiumsuolojen seosta, monomeeriliuos oli 20-prosenttista.

Otettiin 10 μ l seerumia tai plasmaa, joka sisälsi 15 μ g kortisolia 100 ml kohti. Siihen lisättiin 500 μ l merkkiliuodta, jossa oli ^{125}J -kortisolia sitraattipuskurin vesiliuoksessa, jonka pH-arvo oli 3,5.

Koko tämä liuos kaadettiin sen jälkeen 100 mg:n päälle vasta-ainegeeliä. Inkubaatioaika oli 20 min, lämpötila 25°C.

Koetulosten arviointi osoitti erittäin korkeata löydösprosenttia, 99.

Esimerkki 4

Tämä esimerkki osoittaa keksinnön mukaisen polymeerimatriksin osuuden, kun määrätään tyroksiini lisäten kompetitiivisiä aineita.

Vasta-ainegeelin polymeerimatriksi oli kopolymeraattia, joka sisälsi akryyliamidia ja 40 mooliprosenttia metakryylihapon kalsium- ja natriumsuolojen seosta, valmistettu 20-prosenttisesta monomeeriliuoksesta.

500 μ l merkkiliuosta, jossa oli ^{125}J -tyroksiinia fosfaattipuskurissa, pH-arvo 9,6, kaadettiin 80 mg:n päälle vasta-ainegeeliä.

Lisäksi kaadettiin 500 μ l samaa merkkiliuosta, joka sisälsi 6 mg/ml aniliinonaftolisulfonihappoa, 80 mg:n päälle vasta-ainegeeliä.

Molemmat kokeet inkuboitiin 22°C:en lämpötilassa 20 min kulueessa.

Koetulosten arviointi osoitti, ettei tyroksiinin sitoutumiseen vasta-aineen kanssa vaikuttanut mitään liuoksessa mukana ollut kompetitiivisen aineen, nimittäin aniliinonaftolisulfonihapon korkea konsentraatio.

Patenttivaatimukset

1. Polymeerimatriksi, joka on akryyliamidia ja jota voidaan käyttää vasta-aineiden immobilisointiin hormonien ja farmaseuttisten aineiden radioimmunologisissa määrityksissä, t u n n e t t u siitä, että polymeerimatriksi on akryyliamidin kopolymeraattia.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen polymeerimatriksi, t u n n e t t u siitä, että se on kopolymeraattia, joka sisältää akryyliamidia ja yhtä tai useampaa yhdisteistä: akryylihapo, metakryylihapo, metakryyliamidi, niiden johdannaiset ja akryylihapon tai metakryylihapon suolat.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen polymeerimatriksi, t u n n e t t u siitä, että se on kopolymeraattia, joka sisältää akryyliamidia ja 20-60 mooliprosenttia metakryylihapoa.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1-3 mukainen polymeerimatriksi, t u n n e t t u siitä, että se on kopolymeraattia, joka sisältää akryylihapoa ja akryylihapon tai metakryylihapon alkali- tai maa-alkalisuolaa.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer, utlägg-
nings- och patentskrifter:

Suomi - Finland _____
Iso-Britannia - Storbritannien _____
Norja - Norge _____
Ranska - Frankrike _____
Ruotsi - Sverige _____
Saksa - BRD - Tyskland H 2546 377 (C 08 K 5/00)
Sveitsi - Schweiz _____
Tanska - Danmark _____
USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

Ritva Käräinen

Allekirjoitus

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.