

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 973561 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **973561**

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

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **29.02.1996**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **29.08.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **29.08.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **29.02.1996** **PCT/EP1996/000823**
Internationell ansökan - International
application

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

01.03.1995 DE 19508772

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Schering Aktiengesellschaft, Müllerstrasse 178, 13353 Berlin, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Weitschies, Werner, BRD, SAKSA, (DE)

2 • Kötitz, Roman, Germany, SAKSA, (DE)

3 • Trahms, Lutz, Germany, SAKSA, (DE)

4 • Bunte, Thomas, Germany, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Menetelmä ja yhdisteitä analysoitavien aineiden määrittämiseksi remane nssimittausten avulla ja mainittujen yhdisteiden käyttö

Förfarande och föreningar för detektion av analyter med hjälp av reman ensmätning och användning av nämnda föreningar

(57) Tiivistelmä - Sammandrag - Abstract

Keksintö koskee menetelmää analysoitavien aineiden kvantitatiiviseksi määrittämiseksi neste- ja kiinteissä faaseissa sitoutumisremanenssimittauksen avulla, siihen sopivia menetelmiä ja niiden käyttöä analytiikassa.

Uppfinningen avser ett förfarande för kvantitativ bestämning av analyter ur vätske- och fasta fasar med hjälp av bindingsremanensmätning, för detta ändamål lämpliga föreningar och användning av dem inom analytiken.

Menetelmä ja yhdisteitä analysoitavien aineiden määrittämiseksi remanenssimittauksen avulla ja mainittujen yhdisteiden käyttö

5 Keksintö koskee patenttivaatimuksissa esitettyä kohdetta eli menetelmää analysoitavien aineiden kvalitatiiviseksi ja/tai kvantitatiiviseksi määrittämiseksi neste- ja kiinteissä faaseissa remanenssimittauksen avulla, siihen sopivia yhdisteitä ja niiden käyttöä analytiikassa.

10 On tunnettua, että kvantitatiiviset immunomääritykset sekä muut sitoutumismääritykset (esimerkiksi reseptorisitoutumismääritykset) tekevät mahdolliseksi määrittää hyvin suuren joukon aineita, joilla voi olla myös biologista merkitystä, erilaisen koostumuksen omaavista näytteistä. Tavallisesti kokeessa määritetään tällöin kuitenkin vain yksi parametri näytettä kohti. Ajankohtaisen katsauksen erilaisista menetelmistä on esittänyt T. Chard [An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 4. painos, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1990)]. Kaikkien sitoutumismääritysten perustana on isotooppimerkittyjen tai muuten merkittyjen yhdisteiden suuri analyysiherkkyys yhdessä ligandi-reseptorireaktioiden suuren spesifisyyden kanssa.

25 Tunnetuilla määritysmenetelmillä on kuitenkin seuraavia haittoja:

 Menetelmät erilaisten analysoitavien aineiden määrittämiseksi samanaikaisesti perustuvat eri tavalla radio-, fluoresenssi- tai entsymologisesti merkittyjen sondien sitoutumiseen analyyttisiin aineisiin. Tällöin mitataan tavallisesti sondin sitoutumaton ja sitoutunut aktiivisuus erotuksen ja pesun jälkeen analysoitavan aineen kvantitatiivista määritystä varten. Käytettyjen erilaisten sondimerkkien määrä on tällöin voimakkaasti rajoitettu.

35 Esimerkiksi erilaisten radioisotooppien ollessa sondimerk-

kiaineina esiintyy niin kutsuttuja limittymisilmiöitä, jotka johtavat yksittäisten signaalien kvantitatiivisen tarkkuuden nopeaan vähenemiseen. Erilaisten entsyymien yhdistelmä sondimerkkeinä aiheuttaa siihen verrattavissa
 5 olevia ongelmia, jolloin toteutettavuus vaikeutuu tässä lisäksi sellaisten reaktio-olosuhteiden välttämättömän etsimisen takia, jotka tekevät mahdolliseksi entsyymireaktioiden yhtäaikaisen määrittämisen systeemissä.

JP-hakemusjulkaisu 3-220 442 julkaistussa menetelmässä toteutetaan antigeenititterin määrittäminen mittaamalla
 10 vasta-ainevälitteisen aggregoitumisen (yhteenliimautumisen) määrä julkaisussa julkistetun menetelmän avulla mittaamalla agglomeroituneiden magneettisten hiukkasten hiukkaskoot. Menetelmä hiukkaskoon määrittämiseksi on sellainen,
 15 jossa kytketään magneettikenttä, joka tunkeutuu paikallaan olevaan sedimentoituneeseen näytteeseen, ja agglomeroitujen magneettisten hiukkasten jäännösmagneettinen vuontiheys mitataan.

US-patenttihakemuksessa 4 661 408 tunnetaan ferrofluideja, jotka sisältävät kromioksidista olevia superparamagneettisia hiukkasia, joissa on niihin liittyneitä
 20 vasta-aineita. Julkaisun patenttivaatimuksissa esitetään, että näillä hiukkasilla on hyvin pienet sisäiset relaksatioajat, ja ne eivät sen vuoksi vastaa käyttövaatimuksia remanenssimittauksiin.
 25

Menetelmien herkkyys on rajoitettu esimerkiksi matriisin ja sondin epäspesifisten vuorovaikutusten vuoksi tai sondin rajoitetun merkintämahdollisuuden vuoksi (vähäinen ominaisaktiivisuus).

30 Menetelmän menestyksekkäs toteuttaminen edellyttää tavallisesti saadun näytemateriaalin käsittelyä (esimerkiksi seerumin tai plasman valmistus kokoverestä, näytteiden uuttaminen orgaanisilla liuottimilla, analysoitavien aineiden rikastus kromatografisin menetelmin jne.).

Menetelmän menestyksestä toteuttamista varten välttämättömiä ovat eristys- ja pesuvaiheet, joiden tarkoituksena on sidottujen ja sitoutumattomien reseptorien tai ligandien erotus.

5 Radioimmunomäärittysten toteutusta varten kalliiden ja käsittelyssä hankalien säteilevien nuklidien käyttö on välttämätöntä.

Tähän asti käytettyjen merkkiaineiden varastointi tarjoaa usein käytännössä ongelmia, koska ne joko eivät
10 ole stabiileja (radioimmunomääritykset), ja sen vuoksi niitä täytyy sen vuoksi tuottaa aina tuoreina, tai ne reagoivat herkästi ympäristön vaikutuksiin.

Tämän keksinnön tehtävänä oli löytää uudenlainen menetelmä ja aineita, jotka ylittävät edellä mainitun tek-
15 niikan tason.

Tämä tehtävä ratkaistaan tämän keksinnön avulla.

Keksittiin, että analysoitavien aineiden kvalita-
tiivinen ja/tai kvantitatiivinen määrittäminen neste- ja/tai
kiinteässä faasissa onnistuu, kun stabiileja tai kvasista-
20 biileja ferro- tai ferrimagneettisia aineita käytetään analysoitavana magneettisena merkintänä immunokokeissa tai sitoutumiskokeissa ja näytteen jäännösmagneettisuus määritetään mittasuurena.

Seuraavassa kuvataan ensin menetelmiä, jotka ohit-
25 tavat tunnettujen menetelmien haitat.

Keksinnön mukaisten menetelmien perustana on sel-
laisten kolloidisten ferromagneettisten tai ferrimagneet-
tisten aineiden käyttö, seuraavassa magneettiseksi merkit-
semiseksi kutsuttu, joita aineita yhdistetään tutkittavi-
30 en aineiden - seuraavassa kutsuttu analysoitaviksi ai-
neiksi - tai rakennespesifisten aineiden kanssa. Sellai-
sia magneettisista merkinnöistä koostuvia yhdistelmiä ana-
lysoitavien aineiden tai rakennespesifisten aineiden kans-
sa kutsutaan seuraavassa myös magneettisiksi merkkiaineik-
35 si. Käyttämällä käsitettä kolloidiset aineet tarkoitetaan

sekä hiukkasten tai aineiden kokoaluetta kolloidien koko-
 alueella eli alueella 1 nm - n. 1 000 nm että niiden käyt-
 töä dispergoituna faasina sopivaan dispergointiväliaineeseen,
 joka on useimmiten vettä sisältävä. Kolloidiset ai-
 neet, joita seuraavassa kutsutaan myös hiukkasiksi, voivat
 olla parannetun varastointi- ja kuljetuskestävyyden vuoksi
 kuivattuina tai pakastettuina, mutta mittausten toteutuk-
 sen aikana ne ovat tavallisesti nestefaasissa dispergoi-
 dussa tilassa.

Keksinnön oleellisena perustana on se, että ferro-
 tai ferrimagneettisten kolloidisten aineiden magnetoitu-
 misen aikariippuvuus ulkoisen magnetoivan kentän poiskyt-
 kemisen jälkeen on hyvin herkästi riippuvainen aineesta ja
 muodosta (käytetyn hiukkasmateriaalin anisotropiavakiot),
 käytettyjen hiukkasten tilavuudesta ja lämpötilasta. Sen
 aiheuttaa sisäisen magneettivektorin pyörintä hiukkasten
 sisällä. Tätä mekanismia kutsutaan Néelin relaksaatioksi.
 Jos hiukkasten magnetoituminen purkautuu mittauksen aika-
 na, sitä kutsutaan sisäiseksi superparamagneettisuudeksi.
 Hiukkasia, joiden Néelin relaksaatioajat ovat oleellisesti
 pitempiä kuin havaintoaika, kutsutaan remanenteiksi hiuk-
 kasiksi tai myös stabiileiksi hiukkasiksi. Hiukkasia, joi-
 den Néelin relaksaatioajat ovat havaintoajan suuruusluok-
 kaa, kutsutaan kvasistabiileiksi hiukkasiksi.

Keksinnön toisena oleellisena perustana on se, että
 vapaasti liikkuvien stabiilien tai kvasistabiilien ferro-
 tai ferrimagneettisten kolloidisten hiukkasten kokonai-
 suuden magnetoituminen purkautuu ulkoisen magnetoivan ken-
 tän poiskytkemisen jälkeen mittausajan aikana toisen meka-
 nismin mukaan. Tällöin päädytään kaikkien kolloidisten
 hiukkasten pyörintään ympäröivässä nesteessä, jolloin ai-
 kavakiot riippuvat hiukkasten hydrodynaamisesta halkaisi-
 jasta mukaan lukien kuori, kantajanesteen viskositeetista
 ja lämpötilasta. Nämä parametrit määräytyvät pääasiassa

hiukkasten ympäristöstä. Mekanismia kutsutaan Brownin relaxaatioksi tai ulkoiseksi superparamagneettisuudeksi.

Keksinnön mukainen menetelmä analysoitavien aineiden kvalitatiiviseksi ja/tai kvantitatiiviseksi määrittämiseksi neste- tai kiinteässä faasissa toteutetaan niin, että

- (i) ensin rakennespesifiset aineet merkitään ferri-
magneettisilla tai ferromagneettisilla aineilla ja sen jälkeen
- 10 (ii) nämä magneettisesti merkityt rakennespesifiset aineet laitetaan mitattavaan näytteeseen,
- (iii) mitattava näyte magnetoidaan sopivan voimakkuuden omaavan ulkoisen magneettikentän avulla ja
- (iv) ulkoisen kentän sulkemisen jälkeen kolloidisten hiukkasten (magneettinen merkintä) magneettisuuden jäännösmagneettisuus mitataan magneettikenttätunnistimilla, jolloin ominaissitoutumisen vuoksi esiintyvä jäännösmagneettisuus ja sen määrä tulee analysoiduksi.
- 15

Tekniikan tason mukaisissa menetelmissä vain poikkeustapauksissa mahdollinen sitoutuneiden ja sitoutumattomien merkkiaineiden erottaminen on keksinnön mukaisessa menetelmässä mahdollista, kun siinä käytetään hyväksi sitoutumattomien magneettisten merkkiaineiden häviävää jäännösmagneettisuutta (eli ulkoista superparamagneettisuutta) nestefaasissa. Sitoutuneiden magneettisten merkkiaineiden kokonaisuus sitä vastoin osoittaa - hiukkasaineksesta riippuvan - mitattavan jäännösmagneettisuuden. Määritettävän näytteen jäännösmagneettisuuden mittauksessa otetaan mukaan siis vain sitoutuneiden magneettisten merkkiaineiden osuus. Menetelmää kutsutaan siis seuraavassa myös sitoutumisremanenssin mittaukseksi tai sitoutumisjäännösmagneettisuusmittaukseksi, ja se perustuu sidottujen rakennespesifisten merkkiaineiden määrittämiseen.

Toisin sanoen analysoitavien aineiden määrittäminen voi tapahtua ilman työlästä erotus- ja pesuvaihetta, koska

vain analysoitaviin aineisiin spesifisesti sitoutuneet stabiilit tai kvasistabiilit ferromagneettiset tai ferrimagneettiset aineet (jotka on yhdistetty rakennespesifiin aineisiin spesifisyyden aikaansaamiseksi) aiheuttavat
 5 jäännösmagneettisuutta, mitä vastoin samanaikaisesti näytteessä olevien ylimääräisten, sitoutumattomien stabiilien tai kvasistabiilien ferromagneettisten tai ferrimagneettisten aineiden (jotka on myös yhdistetty rakennespesifiin aineisiin) magneettisuus on vaimentunut jo ennen mit-
 10 tauksen alkua ulkoisen superparamagneettisuuden vuoksi.

Keksinnön toisessa suoritusmuodossa menetelmää on muokattu niin, että rakennespesifisten aineiden sijasta itse analysoitavat aineet on yhdistetty stabiilien tai kvasistabiilien ferromagneettisten tai ferrimagneettisten
 15 aineiden kanssa, aivan samoin kuin tätä käytetään esimerkiksi suoritettaessa kompetitiivisia radioimmunokokeita. Näytteisiin täytyy silloin liittää vielä lisäksi rakennespesifinen aine:

Menetelmä voidaan toteuttaa kuitenkin myös moni-
 20 ainemäärityksenä, joka tekee mahdolliseksi useiden eri aineiden suoran samanaikaisen määrittämisen nesteissä tai kiintoaineissa. Sitä varten on tarpeen merkitä analysoitavat aineet ensin erilaisilla ferromagneettisilla tai ferrimagneettisilla kolloidisilla aineilla, joilla on riittä-
 25 västi erilliset koersitiivikentänvoimakkuudet. Magneettisten merkkiaineiden sitoutumisen aikana asetetaan magnetointi-
 30 kenttä (primaarinen magnetointikenttä), mikä johtaa kaikkien näytteessä olevien magneettisten merkkiaineiden suuntautumiseen kevyen akselinsa suuntaisesti. Sen jälkeen määritetään näytteen jäännösmagneettisuus. Seuraavissa vaiheissa näyte magnetoidaan uudelleen ulkoisilla vasta-
 35 kentillä (asetettu kohtisuoraan primaarista magnetointikenttää vastaan), jotka on viritetty voimakkuudeltaan magneettisten merkintöjen koersitiivikentänvoimakkuuksien mukaan. Siten on mahdollista suunnata uudelleen aina vain

ne merkityt aineet, joiden koersitiivikentänvoimakkuudet ovat pienempiä kuin asetettu magnetoiva kenttä. Uudelleenmagnetoinnin yksittäisten vaiheiden välillä määritetään aina uudelleen näytteen jäännösmagneettisuus. Näytteen

5 mitatuista jäännösmagneettisuuksista kussakin yksittäisessä magnetointivaiheessa voidaan siten määrittää erilaisten sitoutuneiden magneettisten merkkiaineiden osuus. Tällä menetelmällä on mahdollista määrittää samanaikaisesti useita analysoitavia aineita näytettä kohti.

10 Keksinnön mukaista menetelmää sekä menetelmän muunnelmia voidaan käyttää hedelmällisyydessä, kudosten yhteensopivuudessa, allergiatutkimuksessa, infektiotutkimuksessa, hygieniassa, genetiikassa, virologiassa, bakteriologiassa, toksikologiassa, patologiassa, ympäristöanalytiikassa ja lääketieteen diagnostiikassa.

Sitoutumisjäännösmagneettisuuden osoittaminen tapahtuu tunnetuin, siihen soveltuvin mittajärjestelyin, kuten esimerkiksi laitteistolla Superconducting Quantum Interference Devices (SQUID), jolloin ensin toteutetaan

20 magnetointi sopivalla magneettikentällä ja sen jälkeen, kentän sulkemisen jälkeen, toteutetaan magnetoidun rakennespesifisen aineen jäännösmagneettisuuden tai siitä riippuvien signaalien mittausta herkkien magneettikenttätunnistimien avulla.

25 Mittauksen aikana näytettä voidaan edullisesti liikutella. E erityisen edullista on signaalin modulointi värähtelyttämällä tai pyörittämällä näytettä. Siten toteutetaan dc-mittasignaalin siirtämien korkeammalla taajuusalueelle.

30 Mittaukseen voidaan käyttää - mainittujen SQUIDien lisäksi - myös gradiometrisesti kytkettyjä induktiokeloja, Fluxgate-magnetometrejä, Giant - magnetoresistanssitunnistimia tai magnetoresistiivisiä muuntajia.

Käytettäessä tunnistimia, jotka voivat mitata dc-

35 kenttiä (esimerkiksi SQUIDit, Fluxgate-magnetometrit,

Giant-magnetoresistanssitunnistimet tai magnetoresisttiiviset muuntajat) jäännösmagneettisuuden mittausta näytteen etukäteismagnetoinnin jälkeen on myös mahdollista, ilman että tätä liikutellaan.

5 Sopiva mittausjärjestely on esimerkiksi kuvattu kuviossa 1. Sellaista järjestelyä käytettiin myös seuraavissa esimerkeissä.

Keksinnön toinen näkökohta koskee yhdisteitä sitoutumisjäännösmagneettisuuden mittaukseen. Sopivat yhdisteet
10 koostuvat ferrimagneettisten tai ferromagneettisten aineiden ja rakennespesifisten aineiden tai analysoitavien aineiden kolloidisista suspensioista.

Rakennespesifisillä aineilla tarkoitetaan tämän keksinnön puitteissa kaikkia aineita, jotka sitoutuvat
15 spesifisesti haluttuun rakenteeseen, kuten esimerkiksi vasta-aineet, vasta-ainefragmentit, biotiini tai biotiinia spesifisesti sitovat aineet kuten avidiini tai streptavidiini, spesifisesti reseptoreihin sitoutuvat agonistit kuten zytokiinit, lymfokiinit, endoteliinit tai niiden
20 antagonistit, spesifiset peptidit ja proteiinit, reseptorit, entsyymit, entsyymisubstraatit, nukleotidit, ribonukleiinihapot, desoksiribonukleiinihapot, hiilihydraatit, lipoproteiinit jne. Näistä edullisia ovat aineet, joiden sitoutumisvakiot ovat alueella $10^5 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$, erityisesti aineet, joiden sitoutumisvakiot ovat alueella
25 $10^7 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$.

Ferro- tai ferrimagneettisina kolloidisina aineina voidaan käyttää kaikkia ferromagneettisia ja ferrimagneettisia aineita, joiden sisäinen Néelin relaksaatioaika on
30 suurempi tai sama kuin mittausaika, ja siten ne ovat stabiileja tai kvasistabiileja.

Erityisen sopivia ovat kaikki ferromagneettiset tai ferrimagneettiset aineet, joiden relaksaatioaika lämpötilassa 20°C on pitempi kuin 10^{-4} s. Erityisen sopivia ovat

kaikki ferromagneettiset ja ferrimagneettiset aineet, joiden relaksaatioaika on pitempi kuin 1 s.

5 Ferromagneettiset ja ferrimagneettiset aineet voidaan stabiloida edullisesti kuorella, joka koostuu oligomeerisistä tai polymeerisistä hiilihydraateista, proteiineista, peptideistä, nukleotideista, tensideistä, synteettisistä polymeereistä ja/tai lipideistä.

10 Ferromagneettisten ja ferrimagneettisten aineiden hiukkaskoko on edullisesti välillä 1 - 1 000 nm. Erityisen edullisia ovat hiukkaskoot 2 - 500 nm. (Hiukkaskokoa koskevat tiedot koskevat hydrodynaamisia halkaisijoita.)

15 Ferro- tai ferrimagneettisina aineina erityisen sopivia ovat stabiilit tai kvasistabiilit kolloidiset hiukkaset, jotka muodostuvat rautaoksideista (Fe_3O_4 , gamma- Fe_2O_3), bariumferriitistä, strontiumferriitistä, puhtaasta raudasta, kromidioksidista, nikkelistä, koboltista sekä rautaoksideista, joissa on mangaani-, kupari-, nikkeli- tai koboltilisäyksiä (kuten esimerkiksi DE-hakemusjulkaisuissa 3 027 012 ja 4 116 093 on kuvattu).

20 Sellaisten keksinnön mukaisesti käytettävien yhdisteiden valmistus, jotka koostuvat stabiileista tai kvasistabiileista ferromagneettisista tai ferrimagneettisista aineista, jotka on sidottu rakennespesifisiin aineisiin tai analysoitaviin aineisiin, tapahtuu immuno-, peptidi- ja proteiinikemian alalla tavallisten menetelmien avulla. Tällöin rakennespesifinen aine tai analysoitava aine kyt-

25 ketään ferromagneettisia tai ferrimagneettisia aineita muodostavien aineiden stabiloivan kuoren kanssa kovalentein sidoksin. Stabiloivana kuorena kyseeseen tulevat esimerkiksi hiilihydraatit, peptidit, nukleotidit, proteiinit, lipidit, tensidit tai polymeerit. Erityisen edullisia kytkentämenetelmiä ovat esimerkiksi aktivointi ja kytkentä

30 karbodi-imidien avulla [Jakoby ja Wilchek, toim., (1974), Methods Enzymol 34], Schiffin emästen muodostus, kun per-

35 jodaatit ovat vaikuttaneet hiilihydraatteja sisältäviin

yhdisteisiin (Wichek ja Bayer, toim., Methods Enzym 184: 177), jotka mahdollisesti sen jälkeen vielä pelkistetään stabiloinnin parantamiseksi, kytkentä glutaaridialdehydin välityksellä [Heitzmann ja Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974) 3537], bromoasetyloitujen hiukkasten poikittaisverkkoutus tiolyloiduilla aineilla [Angerer et al., Cell 9 (1976) 81] sekä pelkistävä alkylointi [Bayer et al., J. Histochem. Cytochem. 24 (1976) 933].

Voidaan valmistaa myös ferromagneettisia tai ferri-
 10 magneettisia kolloidisia hiukkasia, joissa on stabiloiva kuori rakennespesifisestä aineesta tai itse analysoitavasta aineesta, niin että hiukkaset saatetaan valmistuksen jälkeen joko suoraan rakennespesifisen aineen tai analysoitavan aineen liuokseen, mahdollisesti niin että mukana
 15 on muita apuaineita kuten esimerkiksi proteiineja, hiilihydraatteja sekä luontaisia, synteettisiä tai osittain synteettisiä pinta-aktiivisia aineita jne., tai suoraan niin että mukana on rakennespesifisiä aineita tai analysoitavia aineita.

Moniainemääritysten toteuttamiseksi voidaan käyttää myös sellaisten yhdisteiden seoksia, jotka koostuvat useista erilaisista magneettisista merkkiaineista, jolloin erilaiset magneettiset merkkiaineet koostuvat erilaisten rakennespesifisten aineiden tai osoitettavien analysoitavien aineiden yhdistelmästä erilaisten ferromagneettisten tai ferrimagneettisten aineiden kanssa. Tämän erilaisten magneettisten merkkiaineiden yhdistelmien keksinnön mukaisen käytön perustana on se, että magneettiseen merk-
 25 kaukseen kyseisiin rakennespesifisiin aineisiin tai osoitettaviin analysoitaviin aineisiin käytetään ferromagneettisia tai ferrimagneettisia aineita, joilla on helposti erotettavat koersitiivikentänvoimakkuudet (H_c), jolloin parametrit koersitiivikentänvoimakkuus (H_c) ja remanentti magnetoituminen (M_R) erilaisille magneettisille merkinnöil-

le ovat tunnetulla tavalla etukäteen erikseen määritettävissä ja siten tunnettuja.

5 Ferromagneettisilla tai ferrimagneettisilla kolloidisilla aineilla merkityt rakennespesifiset aineet voivat olla myös kuivina (esimerkiksi lyofilisaatteina), mahdollisesti yhdessä muiden apuaineiden kanssa, jotka helpottavat kuivatusta tai lisäävät kuivatun tuotteen stabiiliisuutta. Käyttövalmiiden aineiden valmistus sellaisista lyofilisaateista tapahtuu suspendoimalla uudelleen sopi-

10 vaan suspensioväliaineeseen välittömästi ennen käyttöä.

Keksinnön lisäkohde koskee siten sellaisia aineita sitoutumisremanenssimittaukseen, jotka sisältävät ferrotai ferrimagneettisia kolloidisia aineita sopivassa suspensioväliaineessa.

15 Suspensioväliaineina kyseeseen tulevat kaikki nesteet, joissa kolloidiset hiukkaset voivat liikkua vapaasti. Jos mittaukset suoritetaan ilman erotus- ja pesuvaiheita, käytetyn suspensioväliaineen viskositeetti täytyy sovitaa ferromagneettisten ja ferrimagneettisten aineiden

20 Néelin relaksaatioaikaan ja mittausaikaan, koska suspensioväliaine määrää oleellisesti Brownin relaksaation aikavakiot. Muuten esimerkiksi käytettäessä hiukkasia, joilla on lyhyt relaksaatioaika (esimerkiksi 0,01 s) korkean viskositeetin omaavassa suspensioväliaineessa (esimerkiksi

25 80 % glyserolia), ja lyhyttä mittausaikaa (esimerkiksi 0,0001 s ulkoisen kentän sulkemisen jälkeen) Brownin relaksaatio (ulkoinen superparamagneettisuus) voi olla siten hidastunut, että enää ei voida erottaa sidottuja ja sitoutumattomia merkkiaineita. Tavallisesti on edullista käyttää suspensioväliaineita, joiden viskositeetti on pienempi

30 kuin 100 mPas.

Suspensioväliaineiksi sopivia ovat vesi, pinta-aktiivisten apuaineiden kuten esimerkiksi tensidien tai oligomeeristen tai polymeeristen hiilihydraattien ja proteiinien vesiliuokset sekä veden seokset alkoholien kuten esi-

35

merkiksi glyserolin ja polyetyleeniglykolin kanssa, jolloin injektiotarkoituksiin sopiva vesi on edullista. Suspensioväliaineissa voi olla lisäksi osmoottista painetta muuttavia apuaineita kuten esimerkiksi keittosuolaa. Lisäksi ne voivat sisältää pH-arvoa säätäviä puskuriaineita

5 kuten esimerkiksi fosfaatteja.

Keksinnön lisäkohteena on yhdisteiden käyttö keksinnön mukaisessa menetelmässä sitoutumisremanenssin mittaamiseksi.

10 Fysikaalisiin mekanismeihin perustuvan sitoutumiselvityksen perusteella epäspesifiset mittaussignaalit (matriisi-ilmiöt) ovat mahdottomia. Menetelmän spesifisyys riippuu siten enää vain rakennespesifisten aineiden "todellisesta" spesifisyydestä (vasta-aineiden ristireaktiivisuus, ligandien epäspesifinen sitoutuminen).

15

Keksinnön mukaisen menetelmän suuren herkkyyden perusteella muuten tavalliset sitoutumismäärityksen havaitsemisrajat alitetaan vaivattomasti.

Päinvastoin kuin tunnetuissa menetelmissä (JP-patenttihakemuksessa 235 774 ja WO 91/15 243) keksinnön mukaisessa menetelmässä ei mitata staattista magnetoitumista ulkoisen magneettikentän läsnä ollessa, vaan magneettikentän poissa ollessa sitoutumisremanenssi tai siitä riippuvia signaaleja. Vasta siten voidaan saada tietoja merkki-

20

25 aineiden sitoutumistilasta.

Lisäksi sen avulla vältetään myös dia- tai paramagneettisten komponenttien tai epäpuhtauksien vaikutus mittasignaaliin, mikä tuo mukanaan mittausherkkyyden lisäko-

30

35 hoamisen.

Keksinnön mukaisia menetelmiä sitoutumisremanenssin mittaamiseksi voidaan käyttää lisäksi myös osoittamaan ferro- tai ferrimagneettisten aineiden sijaintipaikka in vivo. Tällöin on erityisen edullista, että sitoutumisremanenssin määrittämiseen voidaan käyttää ferro- tai ferrimagneettisia aineita ja siten voidaan välttää ihmiselle

erityisen arveluttavaa radioaktiivisten isotooppien käyttöä, jolloin keksinnön mukaisen menetelmän herkkyyks saavuttaa tavallisten ydinlääketieteellisten menetelmien gammatuikelaskentamenetelmän tai positroni-emissio-tomografi-an herkkyyden. Sitä paitsi ei tarvita verenkierrrossa olevien sitoutumattomien merkkiaineiden erotusta etukäteen, koska nämä (päinvastoin kuin radiodiagnostisissa menetelmissä) eivät aiheuta "häiriösignaalia" ja siten eivät vaikuta spesifisesti sitoutuneen merkkiaineen havaitsemiseen.

Keksinnön mukaisesti potilaalle annetaan tätä varten stabiilien tai kvasistabiilien ferro- tai ferrimagneettisten aineiden suspensiota. Käyttötapoina sopivia ovat paikallinen levitys, anto suun kautta ja kaikki parenteraaliset antomuodot. Erityisen sopivia ovat suonensisäiset antomuodot.

Kolloidiset aineet jakautuvat elimistöön, jolloin jakautumismalliin kehossa vaikuttavat antotapa sekä erilaiset muut farmakokineettiset parametrit. Sitoutumisremanenssin paikkakohtainen määrittäminen eri ajankohtina stabiilien tai kvasistabiilien ferro- tai ferrimagneettisten aineiden käytön jälkeen voi auttaa määrittämään kehon patologisia tiloja, joille ovat tunnusomaisia epätavalliset rikastumiset tai rikastumien puuttuva esiintyminen.

Erityisen edullista ihmiskehon patologisten rakenteiden kuvaukselle voi olla rakennespesifisten aineiden kanssa yhdistettyjen stabiilien tai kvasistabiilien ferro- tai ferrimagneettisten aineiden (magneettisia merkkiaineita) keksinnön mukainen käyttö. Tässä magneettisten merkkiaineiden spesifinen sitoutuminen patalogiseen rakenteeseen johtaa spesifiseen signaaliin, joka voidaan keksinnön mukaisesti määrittää sitoutumiskokeen toteuttamiseksi kuvatulla sitoutumisremanenssin menetelmällä in vivo.

Esimerkkinä stabiilien tai kvasistabiilien ferro- tai ferrimagneettisten aineiden keksinnön mukaisesta käy-

töstä yhdessä sitoutumisremanenssimittausmenetelmän kanssa esitetään tuumorien havaitseminen kehossa käyttämällä tuumorispesifisiä magneettisia merkkiaineita. Tuumorispesifiset merkkiaineet voivat olla esimerkiksi stabiilien tai kvasistabiilien ferro- tai ferrimagneettisten aineiden yhdistelmiä tuumorispesifisten aineiden kuten esimerkiksi vasta-aineiden, vasta-ainefragmenttien, peptidien, reseptoreiden, proteiinien, nukleiinihappojen, oligonukleotidien, monomeeristen, oligomeeristen tai polymeeristen hiilihydraattien kanssa.

Muita esimerkkejä mahdollisiin sovelluksiin ovat tukosten, ateroskleroottisten läiskien, tulehdusreaktioiden, reumaattisten tai reuman kaltaisten muutosten kuvaus, jolloin kulloinkin magneettisina merkkiaineina käytetään edullisesti keksinnön mukaisia yhdistelmiä stabiileista tai kvasistabiileista ferro- tai ferrimagneettisista aineista yhdessä kyseiselle patologiselle rakenteelle spesifisten aineiden kanssa.

Ihmiselle annettujen stabiilien tai kvasistabiilien magneettisten merkkiaineiden kolmiulotteisen jakautumisen in vivo -mittaus tapahtuu keksinnön mukaisesti kahden vaihtoehdon mukaan:

1. Mahdollisimman homogeenisen magneettikentän luominen kiinnostavalle kehonalueelle, kentän sulkeminen ja sitoutumisremanenssin kolmiulotteisen jakautumisen mittaus SQUID-monikanavatunnistimella, jollaisia käytetään esimerkiksi biomagneettisiin tutkimuksiin [vrt. D. Drung, IEEE Trans. Appl. Supercond. 5 (1995) 2112-2117]. Tämän tulisi ympäröidä mittauskohde mahdollisimman täydellisesti. Riittävän mittausinformaation tuottamiseksi on edullista toteuttaa mittaus useita kertoja käyttämällä mittauskohteen järjestelmällistä kartoitusta.

2. Kolmiulotteisesti rajoitetun paikallisen kentän järjestelmällinen tuottaminen, kentän sulkeminen ja kolmiulotteisen sitoutumisremanenssin mittaus yksikanavatun-

nistimella. Monikanavatunnistimen käyttö on myös mahdollista.

5 Molemmissa menetelmissä suurimman mahdollisen informaation saamiseksi sekä mittauskohteen magnetoinnille että tuloksena olevan magneettikentän mittaukselle kaikissa kolmessa suunnassa on annettava etusija.

10 Mittaustietojen analysointi voi tapahtua sopivalla approksimointimenetelmällä. Perustana voi olla esimerkiksi magneettisen dipolin, multipoolin tai multidipolin malli. Mallin erityysparametrit, esimerkiksi dipolien tai multipoolien paikat, löydetään approksimointimenetelmän avulla, joka minimoi poikkeamat mittaustietojen ja mallin parametrien välillä. Näistä parametreista voidaan saada selville magneettisten hiukkasten kolmiulotteinen jakautuminen siinänsä tunnetulla tavalla.

Vastaava menettelytapa on tunnettu ja hyvänä pidetty analysoitaessa bioelektristen virtausten magneettikenttiä.

20 Sitoutumisremanenssin mittaukseen in vivo soveltuvat käytettäviksi periaatteessa samat aineet - tai niistä valmistetut aineet - kuin in vitro -tutkimuksissa.

Erityisen sopivia in vivo -käyttöön ovat magneettiset merkinnät, jotka ovat virologisesti hajoavia ja yhteensopivia. Tämä koskee erityisesti magneettisia merkintöjä, jotka koostuvat rautaoksideista tai rautaoksidien yhdistelmistä mangaanin tai koboltin kanssa. Magneettisia hiukkasia, joihin mainituilla menetelmillä voidaan kytkeä rakennespesifisiä aineita, on esitetty esimerkiksi ydin-

30 spintomografiseen käyttöön ja niitä on kuvattu mm. julkaisuissa WO 92/12 735, WO 92/22 586 sekä EP-hakemusjulkaisussa 0 186 616. Keksinnön toinen näkökohta koskee siten magneettisten merkintöjen käyttöä in vivo -menetelmässä sitoutumisremanenssin mittaamiseksi.

35 Rakennespesifisillä aineilla tarkoitetaan sitoutumisremanenssimittauksen in vivo -käytön yhteydessä eri-

tyisesti kaikkia aineita, jotka sitoutuvat spesifisesti ihmiskehon analysoitaviin rakenteisiin. Erityisen sopivia ovat vasta-aineet, vasta-ainefragmentit, spesifisesti reseptoreihin sitoutuvat agonistit tai niiden antagonistit, spesifiset peptidit ja proteiinit, reseptorit, entsyymit, entsyymisubstraatit, nukleotidit, ribonukleiinihapot, deoksiribonukleiinihapot, hiilihydraatit tai lipoproteiinit. Reseptoreihin sitoutuvista agonisteista ovat erityisesti sopivia zytokiinit, lymfokiinit tai endoteliinit.

Hyvin sopivia ovat kaikki rakennespesifiset aineet, joiden sitoutumisvakiot ovat alueella $10^5 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$. Erityisen sopivia ovat kaikki rakennespesifiset aineet, joiden sitoutumisvakiot ovat alueella $10^7 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$.

Seuraavat esimerkit selventävät vielä keksinnön kohdetta, ilman että keksintö kuitenkaan rajoittuisi näihin.

Esimerkki 1

100 μg kollageeni III:n monoklonaalista vasta-ainetta, jota seuraavassa kutsutaan antikollageeni III:ksi, liuotetaan 500 μl :aan 0,1-M natriumvetykarbonaattiliuosta. 1 ml dekstraanilla päällystettyä magnetiittisuspensiota (Meito Sangyo), jossa on 1 mol Fe/l ja jonka hiukkaskoko on n. 40 nm (hydrodynaaminen halkaisija), puskuroidaan vielä Sephadex-pylväällä (Pharmacia PD 10) käyttämällä 0,1-M natriumvetykarbonaattia. Suspensioon lisätään 0,5 ml 10 mmol natriumperjodaattiliuosta. Liuos jätetään seiso-

maan pimeään 2 tunniksi. Sen jälkeen eluoidaan PD 10:llä käyttäen 0,1-M natriumvetykarbonaattiliuosta. Suspensioon lisätään antikollageeni III -liuosta. Seos jätetään seisomaan pimeään 3 tunniksi lämpötilaan 4°C . Sen jälkeen lisätään 5 mg NaBH_4 kiintoaineena ja heilutetaan vähän aikaa. Seos jätetään seisomaan pimeään 8 tunniksi lämpötilaan 4°C . Sen jälkeen magneettimerkitty antikollageeni III (seuraavassa kutsutaan Mag-antikollageeni III:ksi)

eluoidaan PD 10 -pylväällä fosfaattipuskuroidulla keittosuolaliuoksella (PBS, pH 7,4).

5 Liuosta, joka sisältää 5 μg kollageeni III:a 200 μl :ssa puskuria [fosfaattipuskuroitu keittosuolaliuos (PBS)], inkuboidaan polystyreenisessä näyteastiassa. (Näyteastia toimii tässä kiinteänä faasina, johon osa kollageenista kiinnittyy.) Sen jälkeen nestefaasi heitetään pois. Näyteastiaa huuhdellaan kolme kertaa fosfaattipuskuroidulla keittosuolaliuoksella, joka sisältää 0,1 % Tween^R 10 20:ta (seuraavassa merkitty PBST), jotta kiinnittymätön kollageeni peseytyisi pois. Näyteastiaan laitetaan sitten 5 μl Mag-antikollageeni III:a liuotettuna 200 μl :aan PBST. Inkuboidaan 1 tunti huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen näyte magnetoidaan magneettisesti suojatussa kammiossa kentässä, 15 jonka voimakkuus on 2 mT, 4 cm Squid-detektorin alapuolella (ks. kuv. 1). Magneettikentän sulkemisen jälkeen näyte mitataan. Sitä varten näyte poistetaan mittauksen ajaksi magnetointikelasta. Ilmoitettujen - magneettikentän sulkemisen jälkeen - magneettivuon tiheyksien erotuksesta ennen 20 näytteen poistamista mittauskentästä ja sen jälkeen saadaan remanenssi. Tämän esimerkin tapauksessa remanenssi voitiin määrittää.

Esimerkki 2

25 Liuosta, joka sisältää 5 μg kollageeni V:ttä 200 μl :ssa PBS-puskuria pH 7,4, inkuboidaan polystyreenisessä näyteastiassa. Sen jälkeen nestefaasi heitetään pois. Näyteastiaa huuhdellaan kolme kertaa PBST-pesupuskurilla pH 7,4. Näytteeseen lisätään 5 μg Mag-antikollageeni III:a, joka on valmistettu esimerkin 1 mukaan, 200 μl :ssa PBST. 30 Inkuboidaan 1 tunti huoneenlämpötilassa. Sen jälkeen näyte magnetoidaan magneettisesti suojatussa kammiossa kentässä, jonka voimakkuus on 2 mT, 4 cm Squid-detektorin alapuolella (ks. kuvio 1). Magneettikentän sulkemisen jälkeen näyte mitataan. Sitä varten näyte poistetaan mittauksen ajaksi

magnetointikelasta. Kollageeni V:ttä sisältävässä näytteessä ei ole todettavissa remanenssia.

Esimerkki 3

10 ml:sta 1,9 mg/ml sisältävää kollageeni III -liuosta PBS:ssa (pH 7,4) valmistetaan kulloinkin 5 ml seuraavia laimennoksia: 1 000 ng/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml. Jokaisesta laimennoksesta pipetoidaan 1 ml aina polystyreeniputkeen (tilavuus 2,5 ml). Kolmea koeputkea inkuboidaan 1 tunti lämpötilassa 37 °C. Sen jälkeen putkien sisältö
5 heitetään pois. Putket pestään 3 kertaa jokainen aina 1 ml:lla PBST. Jokaiseen putkeen laitetaan 1 ml 1:100-laimennosta magnetiitilla merkittyä vasta-ainetta, joka on valmistettu esimerkin 1 mukaan. Putket jätetään seisomaan 1 tunniksi huoneenlämpötilaan. Sen jälkeen näytteet magne-
10 toidaan kuviossa 1 esitetyllä mittausjärjestelyllä (2 mT) ja magnetoivan kentän sulkemisen jälkeen näytteet mitataan. Sitä varten näytteet poistetaan mittauksen ajaksi magnetointikelasta. Mitattujen signaalien arvo on mitta-
15 sitoutumisremanenssille ja siitä saadaan kuviossa 2 esitetty yhteys.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä analysoitavien aineiden kvalitatiiviseen ja/tai kvantitatiiviseen toteamiseen, t u n n e t -
 5 t u siitä, että stabiileja tai kvasistabiileja ferro- tai ferrimagneettisia aineita käytetään analysoitavana magneettisena merkintänä heterogeenisessä immunomäärityksessä ja näytteen jäännösmagnetointi määritetään mittasuurena.

2. Menetelmä analysoitavien aineiden kvalitatiiviseksi ja/tai kvantitatiiviseksi määrittämiseksi heterogeenisissä immunomäärityksissä, t u n n e t t u siitä, että sitoutuneet magneettiset merkkiaineet saavat aikaan mit-
 10 taushetkellä kokonaisuudessaan näytteen jäännösmagnetoinnin, kun taas myös näytteessä olevien sitoutumattomien magneettisten merkkiaineiden magneettisuus mittauksen
 15 ajankohtana on häipynyt kokonaisuudessaan ulkoisen superparamagneettisuuden vaikutuksesta.

3. Menetelmä analysoitavien aineiden kvalitatiiviseksi ja/tai kvantitatiiviseksi määrittämiseksi heterogeenisissä immunomäärityksissä, t u n n e t t u siitä, että

(i) ensin rakennespesifiset aineet merkitään ferri-
 magneettisilla tai ferromagneettisilla aineilla ja sen jälkeen

25 (ii) nämä magneettisesti merkityt rakennespesifiset aineet laitetaan mitattavaan näytteeseen,

(iii) mitattava näyte magnetoidaan sopivan voimakkuuden omaavan ulkoisen magneettikentän avulla ja

30 (iv) ulkoisen kentän sulkemisen jälkeen kolloidisten hiukkasten magneettisuuden remanenssi mitataan magneettikenttätunnistimilla, jolloin spesifisen sitoutumisen vuoksi esiintyvä jäännösmagneettisuus ja sen määrä tulee analysoiduksi.

4. Jonkin patenttivaatimuksen 2 tai 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakennespesifisten
 35

aineiden sijasta analysoitavat aineet merkitään ferrimagneettisilla tai ferromagneettisilla aineilla ja mitattaviin näytteisiin lisätään rakennespesifiset aineet.

5 5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakennespesifiset aineet ovat vasta-aineita, vasta-ainefragmentteja, biotiinia tai biotiinia spesifisesti sitovia aineita, avidiinia tai streptavidiinia, spesifisesti reseptoreihin sidottuja agonisteja tai niiden antagonistteja, spesifisiä peptidejä
10 ja proteiineja, reseptoreita, entsyymejä, entsyymisubstraatteja, nukleotideja, ribonukleiinihappoja, desoksiribonukleiinihappoja, hiilihydraatteja tai lipoproteiineja.

6. Patenttivaatimuksen 3, 4 tai 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakennespesifisten aineiden sitoutumisvakiot ovat alueella $10^5 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$.
15

7. Patenttivaatimuksen 3, 4 tai 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakennespesifisten aineiden sitoutumisvakiot ovat alueella $10^7 - 10^{15} \text{ (mol/l)}^{-1}$.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että näytettä liikutellaan mittauksen aikana ja siten näytesignaalia moduloidaan.
20

9. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että magneettikenttätunnistimina käytetään gradiometreiksi kytkettyjä induktioke-
25 loja, Fluxgate-magnetometrejä, Giant-magnetoresistanssistunnistimia tai magnetoresistiivisiä muuntajia.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että magneettikenttätunnistimina käytetään SQUIDEjä.
30

11. Patenttivaatimusten 1 - 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että useiden erilaisten analysoitavien aineiden samanaikainen määrittäminen toteutetaan magne-
toimalla mitattava näyte vaiheittain.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä,
35 t u n n e t t u siitä, että analysoitavien aineiden sa-

manaikaiseen kvantitatiiviseen määrittelykseen käytetään erilaisia ferromagneettisia tai ferrimagneettisia aineita, joilla on erilliset koersitiivikentänvoimakkuudet.

5 13. Patenttivaatimusten 1 - 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytettyjen ferromagneettisten ja ferrimagneettisten aineiden Néelin relaksaatioaika on pitempi kuin mittausaika.

10 14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytettyjen ferromagneettisten ja ferrimagneettisten aineiden Néelin relaksaatioaika lämpötilassa 20 °C on pitempi kuin 10^{-4} s.

15 15. Patenttivaatimuksen 13 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytettyjen ferromagneettisten ja ferrimagneettisten aineiden Néelin relaksaatioaika lämpötilassa 20 °C on pitempi kuin 1 s.

20 16. Patenttivaatimusten 1 - 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ferromagneettisten ja ferrimagneettisten aineiden hiukkaskoko on alueella 1 - 1 000 nm.

25 17. Patenttivaatimusten 1 - 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ferromagneettisten ja ferrimagneettisten aineiden hiukkaskoko on alueella 2 - 500 nm.

30 18. Patenttivaatimusten 1 - 17 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ferromagneettiset ja ferrimagneettiset aineet on stabiloitu päällysteellä, joka on oligomeerisistä tai polymeerisistä hiilihydraateista, proteiineista, peptideistä, nukleotideista, tensideistä, synteettisistä polymeereistä ja/tai lipideistä.

35 19. Yhdisteitä käytettäväksi patenttivaatimusten 1 - 18 mukaisissa menetelmissä, t u n n e t t u j a siitä, että ne koostuvat stabiilien tai kvasistabiilien ferrimagneettisten tai ferromagneettisten aineiden yhdistelmistä rakennespesifisten aineiden kanssa.

40 20. Yhdisteitä käytettäväksi patenttivaatimusten 1 - 18 mukaisissa menetelmissä, t u n n e t t u j a siitä,

tä, että ferrimagneettisilla tai ferromagneettisilla hiukkasilla on Néelin relaksaatioaika, joka on pitempi kuin 10^{-4} s.

21. Yhdisteitä käytettäväksi jonkin patenttivaatimuksen 1 - 18 mukaisessa menetelmässä, t u n n e t t u j a siitä, että ferrimagneettisilla tai ferromagneettisilla hiukkasilla on Néelin relaksaatioaika, joka on pitempi kuin 1 s.

22. Patenttivaatimuksen 19 mukaisia yhdisteitä, t u n n e t t u j a siitä, että rakennespesifiset aineet ovat vasta-aineita, vasta-ainefragmentteja, spesifisesti reseptoreihin sitoutuvia agonisteja, zytokiinejä, lymfokiinejä, endoteliinejä tai niiden antagonisteja, muita spesifisiä peptidejä ja proteiineja, reseptoreita, entsyymejä, entsyymisubstraatteja, nukleotidejä, ribonukleiinihappoja, desoksiribonukleiinihappoja, hiilihydraatteja tai lipoproteiineja.

23. Yhdisteitä käytettäväksi patenttivaatimusten 1 - 18 mukaisissa menetelmissä, t u n n e t t u j a siitä, että ferromagneettiset tai ferrimagneettiset aineet ovat stabiileja tai kvasistabiileja kolloidisia hiukkasia rautaoksideista, bariumferriitistä, strontiumferriitistä, puhtaasta raudasta, kromidioksidista, nikkelistä, koboltista sekä rautaoksideista, joissa on mangaani-, kupari-, nikkeli- tai kobolttilisäyksiä.

24. Aineita käytettäväksi jonkin patenttivaatimuksen 11 tai 12 mukaisissa menetelmissä, t u n n e t t u j a siitä, että ne sisältävät useita ferromagneettisia tai ferrimagneettisia aineita, joilla on erilaiset koersitiivikentänvoimakkuudet.

25. Patenttivaatimusten 1 - 18 mukaisten menetelmien käyttö hedelmällisyydessä, kudosten yhteensopivuudessa, allergiatutkimuksessa, infektiotutkimuksessa, hygieniassa, genetiikassa, virologiassa, bakteriologiassa, toksikologi-

assa, patologiassa, ympäristöanalytiikassa tai lääketieteellisessä diagnostiikassa.

26. Menetelmä ihmiskehoon saatettujen tai ihmiskeholle levitettyjen ferro- tai ferrimagneettisten aineiden
5 määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että ferro- tai ferrimagneettisten aineiden jäännösmagneettisuus määritetään magnetoivan kentän sulkemisen jälkeen.

27. Menetelmä ihmiskehoon saatettujen tai ihmiskeholle levitettyjen ferro- tai ferrimagneettisten aineiden
10 määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että ensin

(i) rakennespesifiset aineet merkitään ferrimagneettisilla tai ferromagneettisilla aineilla ja sen jälkeen

(ii) nämä magneettisesti merkityt rakennespesifiset
15 aineet saatetaan elävään organismiin tai levitetään organismille,

(iii) kiinnostava tilavuus organismia magnetoidaan ulkoisesti asetetun magneettikentän avulla ja

(iv) ulkoisen kentän sulkemisen jälkeen magneettisten
20 merkkiaineiden magneettisuuden remanenssi mitataan magneettikenttätunnistimilla.

28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että rakennespesifisinä aineina
käytetään vasta-aineita, vasta-ainefragmentteja, spesifi-
25 sesti reseptoreihin sitoutuneita agonisteja tai niiden antagonistejä, spesifisiä peptidejä ja proteiineja, reseptoreita, entsyymejä, entsyymisubstraatteja, nukleotideja, ribonukleiinihappoja, desoksiribonukleiinihappoja, hiilihydraatteja tai lipoproteiineja.

29. Patenttivaatimuksen 28 mukainen menetelmä,
30 t u n n e t t u siitä, että spesifisesti reseptoreihin sitoutuvat agonistit tai antagonistit ovat zytokiineja, lymfokiineja, endoteliineja tai niiden antagonistejä.

30. Jonkin patenttivaatimuksen 28 tai 29 mukainen
35 menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakennespesifis-

ten aineiden sitoutumisvakiot ovat alueella $10^5 - 10^{15}$ (mol/l)⁻¹.

31. Jonkin patenttivaatimuksen 28 tai 29 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rakennespesifisten aineiden sitoutumisvakiot ovat alueella $10^7 - 10^{15}$ (mol/l)⁻¹.

32. Patenttivaatimusten 26 - 31 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että magneettikenttätunnistimina käytetään laitteista Superconducting Quantum Interference Devices (SQUIDeja), induktiokeloja, Fluxgate-magnetometrejä, Giant-magnetoresistanssitunnistimia tai magnetoresisttiivisiä muuntajia.

33. Jonkin patenttivaatimuksen 19 - 23 mukaisten yhdisteiden käyttö patenttivaatimusten 27 - 32 mukaisissa menetelmissä.

34. Ferri- tai ferromagneettisten aineiden käyttö patenttivaatimuksen 26 mukaisessa menetelmässä.

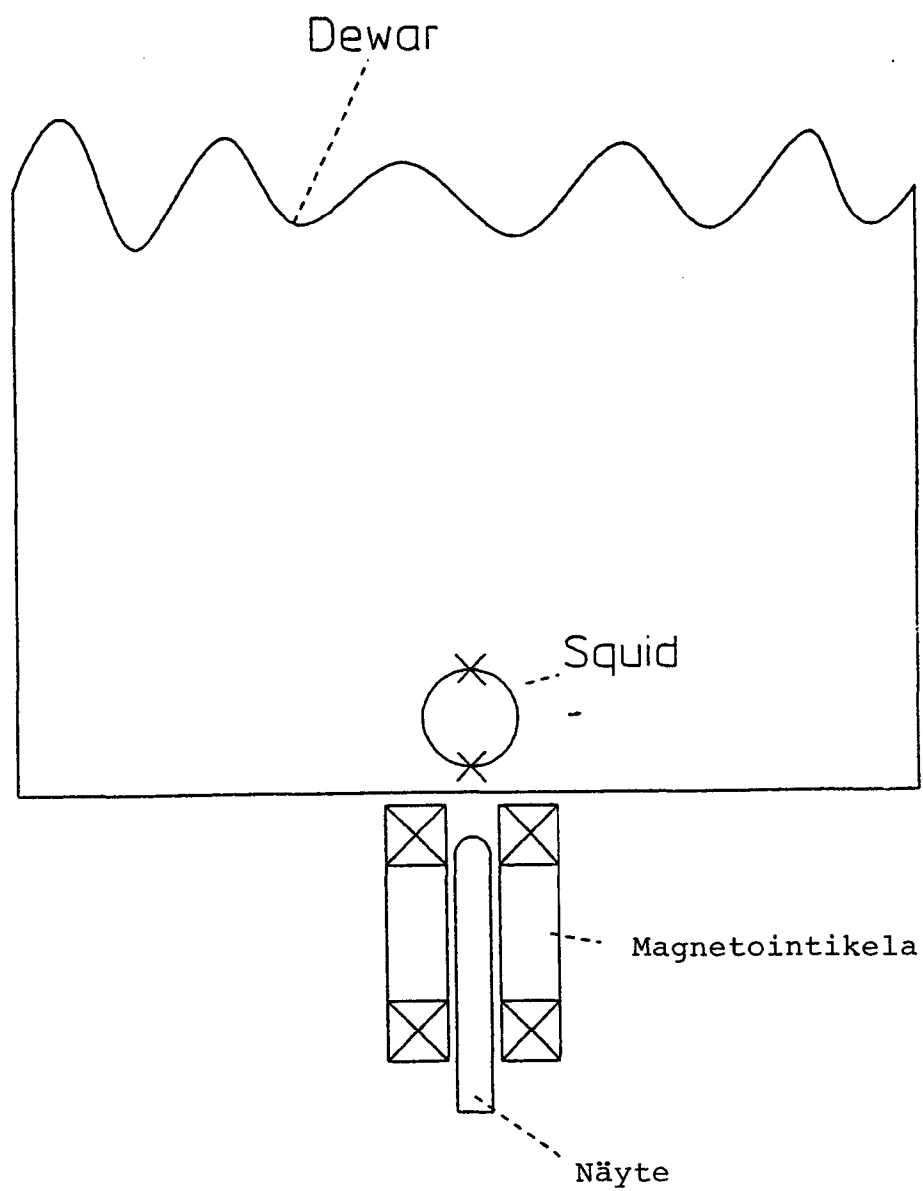
35. Aineita käytettäväksi patenttivaatimusten 27 - 32 mukaisissa menetelmissä, t u n n e t t u j a siitä, että ne sisältävät erilaisten ferri- tai ferromagneettisten aineiden seosta rakennespesifisten aineiden kanssa.

36. Yhdisteitä käytettäväksi patenttivaatimusten 26 - 32 mukaisissa menetelmissä, t u n n e t t u j a siitä, että ferro- tai ferrimagneettisten aineiden Néelin relaksaatioaika lämpötilassa 37 °C on pitempi kuin 10^{-4} s.

37. Yhdisteitä käytettäväksi patenttivaatimusten 26 - 32 mukaisissa menetelmissä, t u n n e t t u j a siitä, että ferro- tai ferrimagneettisten aineiden Néelin relaksaatioaika lämpötilassa 37 °C on pitempi kuin 1 s.

38. Patenttivaatimusten 36 ja 37 mukaisia yhdisteitä, t u n n e t t u j a siitä, että ferri- tai ferromagneettiset aineet ovat rautaoksideja tai rautaoksideja, joissa on mangaani-, kupari-, nikkeli- tai kobolttilisäyksiä.

Fig. 1



Näyte poistetaan mittauksen aikana

Fig. 2

