

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 760074 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 760074

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **14.01.1976**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **14.01.1976**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **28.07.1976**

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

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

27.01.1975 SE 75008417

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • AB Kabi, Stockholm, Sverige, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Grubb, Anders, Sverige, SVERIGE, (SE)

2 • Glad, Ulla Cristina, Sverige, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Diagnostinen väliaine ja menetelmä immunokemiallista määrittystä varten

Diagnostiskt medel och förfarande för immunokemisk diagnos

Aktiebolaget Kabi, S-104 25, Tukholma, Ruotsi.

Diagnostinen väline ja menetelmä immuno-kemiallista määrittystä varten - Diagnostiskt medel och förfarande för immuno-kemisk diagnos

Tämä keksintö kohdistuu diagnostisiin välineisiin immuno-kemiallista määrittystä varten, edullisesti valmistettuina koelius-koiksi, jotka muodostuvat kapillaareja sisältävästä kantajamateriaalista ja menetelmään tällaisen analyysin suorittamiseksi.

Tarkemmin sanottuna diagnostinen väline muodostuu vasta-aineita sisältävästä, kapillaaripitoisesta huokoisesta kantajamateriaalista. Analyysimenetelmä käsittää immuno-kemiallisen määrittelyn, jolle on tunnusomaista huokoisessa kantajamateriaalissa, johon on liitetty vasta-aineita alalla tunnetulla tavalla esimerkiksi absorboimalla tai kovalenttisen sidoksen avulla esim. syanogeenibromidia tai glutarialdehydiä käyttäen, esiintyvien kapillaarivoimien hyväksikäyttö.

Määritettävää antigeenia sisältävät näytteet lisätään kapillaaripitoiseen diagnostiseen välineeseen. Kapillaarisen imeytymisen annetaan tapahtua, jonka jälkeen diagnostisen laitteen antigeenia

sisältävät alueet osoitetaan lisäämällä vasta-aineita sopivaan väri-indikaattoriin sidottuna, kuten fluoresoivaan yhdisteeseen sidottuna tai entsyymikatalysoimalla värireaktio.

Tähän mennessä käytetyt kvantitatiiviset immuno-kemialliset menetelmät perustuvat immunodiffuusioon, kuten esim. Mancini- tai Ouchterlony-menetelmät, jotka ovat saaneet nimensä keksijöittensä mukaan tai immunoelektroforeesin käyttöön kuten Laurell'in elektro-immunoanalyysissä. Näissä menetelmissä, samoinkuin niiden muunnoksissa, saadaan antigeenin ja vasta-aineen välttämätön vuorovaikutus aikaan diffuusioprosessin ja/tai elektroforeettisen prosessin avulla, kun taas tässä esiteltävä menetelmä perustuu huokoisen kantajamateriaalin, johon on liitetty vasta-aineita, kapillaarivoimien käyttöön.

Keksinnön soveltamiseen sopivina kapillaaripitoisina materiaaleina voidaan käyttää erilaisia selluloosakuituja sisältäviä materiaaleja, kuten suodatinpaperia, kromatograafista paperia, ioninvaihtopaperia, selluloosa-asetaattikalvoa, selluloosa-asetaatti-levyjä, selluloosaa olevia ohutkerroskromatograafisia levyjä sekä myös sellaisia aineita kuten tärkkelystä, Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala), muovimateriaaleja kuten polyvinyylikloridia, keraamisia materiaaleja ja aineyhdistelmiä kuten polyvinyyliklorodivkvarssi. Sopivia vasta-aineita saadaan immunisoimalla alalla tunnetulla tavalla.

Keksintöä esitellään seuraavien esimerkkien avulla.

Diagnostisen välineen valmistus

Esimerkki 1

Tässä esimerkissä käsitellään vasta-aineiden saattamista liukenemattomiksi CNBr-yhdisteen avulla. 10 g selluloosapitoista materiaalia sijoitetaan tislattuun veteen viideksi minuutiksi. Tämän jälkeen lisätään liuos, joka sisältää 8 g CNBr 300 millilitrassa tislattua vettä ja pH säädetään arvoon 10,3 1M NaOH-liuoksen avulla. Ylläpitäen tätä pH-arvoa pH-säätöjen avulla reaktio suoritetaan 20 minuutin aikana ja liuos dekantoidaan sitten pois. Selluloosamateriaali pestään 2 litralla 0,005M NaHCO₃-liuosta. Pesuliuoksen poistamisen jälkeen inkuboidaan selluloosamateriaalia yön ylitse +4°C:n lämpötilassa liuoksella, joka sisältää 500 mg kanin gammaglobuliinia

ihmisen gammaglobuliinia vastaan (IgG Fc-osa) 10 millilitrassa 0,1M NaHCO₃-liuosta ja inkuboidaan sitten uudestaan 3 tuntia 100 millilitralla 0,005 etanoliamiiniliuosta, jonka jälkeen suoritettiin uusi pesu 500 millilitralla 0,5M NaHCO₃-liuosta ja sitten 200 millilitralla 0,1M asetaattipuskuria, jonka pH-arvo on 4,0 ja 500 millilitralla 0,075M natriumbarbituraattipuskuria, johon on lisätty 0,3 % albumiinia +4°C:ssa.

Esimerkki 2

Tässä esimerkissä esitellään vasta-aineiden tekeminen liukenemattomiksi kapillaaripitoisella materiaalilla glutaarialdehydiä käyttäen. 0,6 g selluloosa-asetaattimembraania inkuboidaan liuoksella, joka sisältää 100 mg kanin gammaglobuliinia ihmisen gammaglobuliinia vastaan (IgG Fc-osa) 10 millilitrassa 0,1M fosfaattipuskuria pH-arvolla 6,8 30 minuutin ajan. Kun liuos on poistettu dekantomalla, inkuboidaan membraania 10 millilitrassa 1 prosenttista glutaarialdehydiliuosta 30 minuutin ajan, jonka jälkeen inkuboidaan 10 millilitrassa 1,0M metyyliamiinia 15 minuuttia. Membraani pestään sitten 100 millilitralla natriumbarbituraattia ja pidetään samassa puskurissa +4°C:ssa, johon on lisätty 0,3 % albumiinia.

Esimerkki 3

Tässä esimerkissä esitellään vasta-aineiden tekeminen liukenemattomiksi kapillaaripitoisella kantajamateriaalilla adsorption avulla. 10 g polyvinyylikloridi-kvartsia (Microporous Plastic Sheet, American Esna Corporation, New York, N.Y.) inkuboidaan yön yli +4°C:ssa liuoksella, joka sisältää 500 mg kanin gammaglobuliinin ihmisen gammaglobuliinia vastaan (IgG Fc-osa) 100 millilitrassa 0,1M fosfaattipuskuria pH-arvolla 6,8. Inkuboinnin päätyttyä materiaali pestään 1 litralla fosfaatilla puskuroidua fysiologista NaCl-liuosta pH-arvolla 7,0. Materiaali kuivataan suodatinpaperien välissä.

Esimerkki 4

Tässä esimerkissä käsitellään fluoresoivien vasta-ainekonjugaattien valmistus.

a) 720 mg kanin gammaglobuliinia ihmisen gammaglobuliinia vastaan (IgG Fc-osa), 0,57 g NaCl, 0,259 g NaHCO₃ ja 0,049 g Na₂CO₃·10H₂O liuotetaan 72 millilitraan tislattua vettä. Reagenttiliuos jäädytetään jäähauteessa ja 36 mg fluoreseiini-isotiosyanaat-

tia lisätään sekoittaen. Liuosta sekoitetaan sitten kylmässä 18 tuntia. Tämän jälkeen seos dialysoidaan fosfaatilla puskuroitua NaCl-liuosta vastaan pH-arvolla 7,0, kunnes dialyysineste ei enään fluoresoi. Muodostunut vasta-aine-konjugaatti jäähdytetään.

b) 720 mg kanin gammaglobuliinia ihmisen gammaglobuliinia vastaan (IgG Fc-osa), 0,57 g NaCl, 0,259 g NaHCO₃ ja 0,049 g Na₂CO₃·10H₂O liuotetaan 72 millilitraan tislattua vettä. Reagenttiliuos jäähdytetään jäähauteessa ja 9 mg rodamiinia liuotettuna 2 millilitraan asetonia lisätään sekoittaen. Liuosta sekoitetaan kylmässä 18 tuntia. Seos dialysoidaan sitten fosfaatilla puskuroitua fysiologista NaCl-liuosta vastaan pH-arvoilla 7,0, kunnes dialyysineste ei enään fluoresoi. Saatu vasta-ainekonjugaatti jäähdytetään.

c) 720 mg kanin gammaglobuliinia ihmisen gammaglobuliinia vastaan (IgG Fc-osa), 0,57 g NaCl, 0,259 g NaHCO₃ ja 0,049 g Na₂CO₃·10H₂O liuotetaan 72 millilitraan tislattua vettä. Reagenttiliuos jäähdytetään jäähauteessa ja 20 mg dansyylikloridia liuotettuna 7 millilitraan asetonia lisätään sekoittaen. Liuosta sekoitetaan kylmänä useita tunteja. Seos dialysoidaan sitten fosfaatilla puskuroitua fysiologista NaCl-liuosta vastaan pH-arvolla 7,0 kunnes dialyysineste ei enään fluoresoi. Saatu vasta-ainekonjugaatti jäähdytetään.

Esimerkki 5

Tässä esimerkissä esitetään LDH-iso-entsyymi-H₄-vasta-ainekonjugaatin valmistus. Suspensio, joka sisältää 4,5 mg LDH-iso-entsyymi-H₄ ammoniumsulfaattissa, dialysoidaan 0,1M fosfaattipuskuria vastaan pH-arvolla 6,8. Sekoittaen lisätään 2,25 mg kanin gammaglobuliinia ihmisen gammaglobuliinia vastaan (IgG Fc-osa) ja fosfaattipuskuria, kunnes kokonaistilavuus on 1,35 ml. Kun kaikki kanin gammaglobuliini on liuennut, lisätään tipottain 45 µl 1 prosenttista glutaarialdehydiliuosta ja reaktioseoksen annetaan olla huoneen lämpötilassa 2 tuntia. Seos dialysoidaan sitten natriumbarbituraattipuskuria vastaan ja konjugaatti varastoidaan +4°C:n lämpötilassa. Ennen käyttöä se laimennetaan 10 millilitralla barbituraattipuskuria, johon on lisätty 2 % albumiinia.

Esimerkki 6

Liukenemattomuuden toteaminen - Kokeessa käytetään kaksi materiaaliliuoskaa, jotka on käsitelty edelläolevan esimerkin mukaisesti ja kaksi käsittelemätöntä liuskaa. Yhtä kumpaakin laatua olevaa

liuskaa inkuboidaan liuoksessa, joka sisältää 1 milligramman ihmisen gammaglobuliinia (IgG) millilitraa kohti natriumbarbituraattipuskuria. Kaikki liuskat pestään sitten 20 millilitralla natriumbarbituraattipuskuria, joka sisältää 0,15M NaCl, kymmenen kertaa kaikkiaan, jonka jälkeen niitä inkuboidaan fluoreseiini-isotiosyanaattivasta-ainekonjugaatissa 10 minuuttia. Uusintapesu suoritetaan kuitenkin edellä, liuskat kuivataan ja niitä tarkastellaan ultraviolettilla valolla, jonka aallonpituus on 340 nm, sen havaitsemiseksi, että fluoresenssia esiintyy vain liuskoilla, jotka sisältävät liukenemattomia vasta-aineita ja joita on inkuboitu IgG-liuoksessa. Tutkittaessa esimerkin 3 mukaisia liuskoja käytetään härän albumiinilla käsiteltyjä liuskoja vertailuun.

Esimerkki A. Immuno-kemiallinen määrittäminen.

Esiteltävän keksinnön mukaisesti valmistettua diagnostista välinettä käytetään immuno-kemialliseen määrittämiseen diagnostisia tarkoituksia varten seuraavasti:

Tutkittavaa materiaalia - tunnettu määrä, edullisesti 1-3, μ l sijoitetaan kapillaaripitoiseen kantajamateriaaliin, samanaikaisesti vastaava määrä standardiliuosta, joka sisältää tunnetun määrän koestettavaa antigeeniä, eri laimennuksina sijoitetaan koeliuoksen viereen.

Liikkuvana faasina kapillaarisen imeytymisen helpottamiseksi voidaan käyttää esim. 0,075M natriumbarbituraattipuskuria, johon on lisätty 0,3 % albumiinia.

Kapillaari-imeytys voidaan suorittaa sekä avoimissa että suljetuissa koeastioissa; lisäksi liikkuva faasi voidaan saada liikkumaan joko ylöspäin tai alaspäin. Edullisesti käytetään suljetun astian ja nousevan faasin yhdistelmää. Halutun ajan kuluttua kapillaari-imeytymisen alkamisesta kostea kantajamateriaali siirretään vastaaineliuokseen, joka sisältää joko fluoreseiini-isotiosyanaattiin tai laktatedihydrogenaasi(LDH):ään sidottuja vasta-aineita. Suositeltava inkubointiaika molemmissa näissä liuoksissa on 10 minuuttia. Inkuboinnin jälkeen kantajamateriaali pestään juoksevassa vedessä $+37^{\circ}\text{C}$:n lämpötilassa 5 minuutin aikana, jonka jälkeen inkuboidaan edullisesti 2 x 5 minuuttia 20 millilitrassa natriumbarbituraattipuskuria, joka sisältää 0,2 % albumiinia ja 0,15M NaCl.

Jos fluoresoivia vasta-aineita käytetään tunnistukseen, vasta-aineiden imeytymisetasoisuus mitataan ultraviolettissa valossa, jonka aallonpituus on 340 nm. Jos LDH-vasta-aineliuosta käytetään, käsitellään kantajamateriaalia värjäyskylvyssä, joka saadaan seuraavasti:

30 mg nitroblue-tetratsoliumia ja 40 mg NAD-yhdistettä liuotetaan 56 millilitraan 0,05M TRIS-puskuria pH:n arvolla 7,4. Seokseen lisätään 1,60 millilitraa 3,6M litiumlaktaattia, 5 millilitraa 0,06M kalsiumsyaniidia ja muutamia jyväsia metyyliifenatsonium-metasulfaattia liuotettuna 2 millilitraan tislattua vettä. Kapillaaripitoista materiaalia inkuboidaan värjäyskylvyssä +37°C:ssa, kunnes havaitaan selvä värjäytyminen. Värin muodostuminen johtuu siitä, että LDH katalysoi reaktion laktaatti + NAD $\rightleftharpoons$ pyruvaatti + NADH₂ ja että NADH₂ kvantitatiivisesti pelkistää nitroblue-tetratsoliumin liukenemattomaksi lilan väriksi formatsaaniksi.

Havaitut, antigeenin peittämät alueet diagnostisessa välilneessä kasvavat sitten kooltaan antigeenin pitoisuuden kasvaessa tutkittavissa näytteissä. Matriisiin sitoutuneet vasta-ainemolekyylit hidastavat antigeenimolekyylien siirtymistä vaihtoreaktioiden vaikutuksesta kapillaari-imeytymisen aikana. Mitä suurempi on antigeenin pitoisuus, sitä pienempi on hidastava vaikutus, koska keskimääräinen aika, jonka antigeenimolekyyli on liittynyt vasta-aineeseen lyhenee antigeenin pitoisuuden kasvaessa.

Esimerkki B

Esiteltävän keksinnön mukaisesti valmistettuja, vasta-aineita sisältäviä kapillaaripitoisia kantajamateriaaliliuskoja upotetaan määrättyyn, esimerkiksi 3 millimetrin syvyyteen tutkittavan aineen liuosta. Tällöin alkavan kapillaari-imeytymisen annetaan jatkua 3-20 minuuttia ja lopetetaan sitten poistamalla liuskat liuksesta. Antigeenin imeytymismatka mitataan esimerkissä A esitetyllä tavalla ja tulokset todetaan esimerkin A mukaisesti.

Vaikka keksintöä on esitetty sen määrättyjen toteutusten yhteydessä, on ymmärrettävää, että erilaisia muunnoksia ja sovellutuksia voidaan tehdä mukaanliitettyjen patenttivaatimusten puitteissa, joiden on tarkoitettu käsittävän myös määrättyt toteutukset.

Patenttivaatimukset.

1. Diagnostinen väline immuno-kemiallisia määrittäyksiä varten, edullisesti valmistettuna koeliuskaksi, t u n n e t t u siitä, että se muodostuu kapillaaripitoisesta, huokoisesta kantajamateriaalista, johon on liitetty vasta-aineita.

2. Edelläolevan patenttivaatimuksen mukainen diagnostinen väline, t u n n e t t u siitä, että vasta-aineet on liitetty kapillaaripitoiseen kantaja-materiaaliin adsorboimalla tai kovalenttisen sidoksen avulla esimerkiksi syanogeenibromidia tai glutaarialdehydiä käyttäen.

3. Edellä olevien patenttivaatimusten mukainen diagnostinen väline, t u n n e t t u siitä, että kapillaaripitoinen materiaali on selluloosakuitua, tärkkelystä, Sephadex-materiaalia (Pharmacia Fine Chemicals), muovia kuten polyvinyylidikloridia, keraamista materiaalia, materiaaliyhdistelmä kuten polyvinyylidikloridi-kvartsi.

4. Menetelmä immuno-kemiallisen ^{kvantitatiivista} määrittämistä varten, t u n n e t t u siitä, että se käsittää määritettävää antigeeniä sisältävän näytteen lisäämisen edelläolevien patenttivaatimusten mukaiselle kapillaaripitoiselle diagnostiselle välineelle, jolloin kapillaarinen imeytyminen alkaa, minkä jälkeen diagnostisen välineen antigeenipitoiset alueet analysoidaan lisäämällä vasta-aineita sidottuna sopivaan väri-indikaattoriin, kuten fluoresoivaan yhdisteeseen tai entsyymillä katalysoidun värinmuodostusreaktion avulla.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että väri-indikaattori on fluoreseiini-isotiosyanaatti, rodamiini tai dansyylikloridi.

6. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että diagnostinen väline on polyvinyylidikloridi-kvartsia oleva koeliuska, jolle on adsorboitu vasta-aineita ihmisen gammaglobuliinia vastaan.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vasta-aineeseen sidottu väri-indikaattori on fluoreseiini-isotiosyanaatti.

Patentkrav:

1. Diagnostisk anordning för immuno-kemiska mätningar, företrädesvis utformad som testremsor, k ä n n e t e c k n a d därav, att nämnda remsor omfattar ett kapillärer innehållande, poröst bärarmaterial, vid vilket bundits antikroppar.
2. Diagnostisk anordning enligt föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a d därav, att antikropparna bundits vid det kapillära bärarmaterialet genom adsorption eller kovalentbindning, såsom med cyanogenbromid eller glutaraldehyd.
3. Diagnostisk anordning enligt föregående patentkrav, k ä n n e t e c k n a d därav, att det kapillära bärarmaterialet består av cellulosafiber, stärkelse, Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals), plastmaterial såsom polyvinylklorid, keramiskt material, kombinationer såsom polyvinylklorid-kiseldioxid.
4. Förfarande för immuno-kemisk mätning, k ä n n e t e c k n a t därav, att proven innehållande antigenet som skall mätas tillsätts en kapillärer innehållande diagnostisk anordning enligt föregående patentkrav, en kapillär vandring initieras varefter de antigeninnehållande areorna i den diagnostiska anordningen provas medelst tillsättande av antikroppar bundna till en lämplig färgindikator, såsom en fluorescerande förening eller ett enzym som katalyserar en färgframkallande reaktion.
5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att färgindikatorn är fluoreceinisotiocyanat, rodamin, dansylklorid.
6. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t därav, att den diagnostiska anordningen är en testremsa av polyvinylklorid-kiseldioxid på vilken adsorberats antikroppar mot gammaglobulin av människa.
7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att den antikroppbundna färgindikatorn är fluoreceinisotiocyanat.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

751542 (GOIN 33/54)

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

Suomi - Finland 53894 (GOIN 34/14)

Iso-Britannia - Storbritannien

Norja - Norge

Ranska - Frankrike

Ruotsi - Sverige

Saksa - BRD - Tyskland

Sveitsi - Schweiz

Tanska - Danmark

USA

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

30.3.81

Käja Karm

Allekirjoitus

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