

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 763647 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **763647**

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **20.12.1976**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **20.12.1976**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **27.06.1977**

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

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

26.12.1975 IL 48741

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Rafa Laboratories Ltd., Ezor Hatassya Romena Jerusalem, Israel, ISRAEL, (IL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Grundman, Lea, Israel, ISRAEL, (IL)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

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

Raskauden määrittäminen menetelmä-väritesti

Färgtest för bestämmande av graviditet

Rafa Laboratories Ltd.
Ezor Hatassya Romema
Jerusalem
Israel

Raskauden määritysmenetelmä-väritesti. - Färgtest för bestämmande av graviditet.

Oheisen keksinnön kohteena on raskauden määrittämiseen tarkoitettu entsyymaattinen väritesti.

HCG-entsyymin määrittämiseksi tunnetaan erilaisia menetelmiä. Eräissä menetelmissä (biologiset menetelmät) on käytettävä tiettyjä eläimiä, esimerkiksi kaneja, hiiriä, sammakoita jne. Näillä biologisilla testeillä on vakavia haittoja; niissä on oltava käytettävissä useita eläimiä, jotka on säilytettävä ja joiden täytyy täyttää tiettyjä vaatimuksia, mikä tekee menetelmän aikaa vieväksi, monimutkaiseksi ja kalliiksi.

Tunnetaan myös eräitä muita testejä (immunologiset testit), joissa käytetään tiettyjä diagnostisia serodiagnostisia seoksia (kts. esim. israelilaiset patenttijulkaisut 19301 ja 34960).

Tunnetaan myös väritesti, jossa käytetään vasta-aine-entsyymi-konjugaatteja (kts. FEBS Letters, Vol. 43, n:o 2, July 1974, sivut 215-217).

Sekä immunologiset että väritestit vaativat monimutkaisia laitteita ja ne voidaan suorittaa vain riittävän hyvin varustetussa laboratoriossa ja ammattitaitoisten henkilöiden avulla.

Kuitenkin on tullut tarpeelliseksi kehittää testi, joka voidaan suorittaa kotona siten, että jokainen nainen voi helposti määrittää, onko hän raskaana vai ei. Tällaisessa menetelmässä ei luonnollisesti-
kaan tule tarvita monimutkaisia laitteita ja se on voitava suorittaa yksinkertaisten ohjeiden avulla.

Oheisen keksinnön kohteena on siten raskauden määrittäminen, jossa entsyymi-merkattua anti-HCG-IgG sekoitetaan naisen jonkin kehonesteen kanssa, minkä jälkeen mainittu seos sekoitetaan liukenemattomaksi tehdyn anti-HCG-IgG (geeli) kanssa ja tietyn ajan kuluttua sekoitetaan kehitysväriliuoksen kanssa.

HCG tarkoittaa ihmissikiön suonikalvon gonadotropiinia ja IgG on immunoglobuliini G.

Oheisen keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan entsyymeinä käyttää erilaisia tunnettuja entsyymejä. Suositeltuja entsyymejä ovat kuitenkin piparjuuriperoksidaasi, alkali-fosfataasi ja glukoosi-oksidaasi.

Käytettävät väriliuokset riippuvat käytetystä entsyymistä. Siten esimerkiksi piparjuuriperoksidaasia käytettäessä käytetään parhaiten o-dianisidiinia H_2O_2 -liuoksessa. Toisena sopivana yhdisteenä mainittakoon bentsidiini.

Anti HCG-IgG voidaan ottaa talteen mistä tahansa sopivasta lähteestä, mikäli saatu aine on riittävän spesifistä. Siten esimerkiksi mainitun aineen sopivia lähteitä voivat olla kaniinit, vuohet ja muut eläimet tai linnut.

Keksinnön eräässä suositellussa suoritustavassa lisätään yhtä tai kahta seuraavista aineista testin tekemiseksi vielä herkemmäksi:

- a. normaali γ -globuliini, joka on saatu jostain sopivasta lähteestä - esimerkiksi kaniineista, lampaista tai vuohista;
- b. jokin vapaa anti HCG-IgG, joka on saatu samasta lähteestä kuin geeli ja entsyymi-merkitty HCG-IgG. Jos näitä yhdisteitä käytetään, ne sekoitetaan ensin entsyymi-merkityn anti HCG-IgG:n kanssa.

Kehonesteenä voidaan käyttää mitä tahansa naisesta saatua nestettä, parhaiten virtsaa.

Keksinnön eräässä suositellussa suoritusmuodossa pestään koko seos ennen väriliuoksella kehittämistään useita kertoja sopivalla pesuliuoksella - esimerkiksi boraatti-suolaliuoksella.

Testi voidaan suorittaa missä tahansa sopivassa läpinäkyvässä astias-
sa, esimerkiksi koeputkessa, pussissa, paperissa jne.

Siinä tapauksessa, että nainen on raskaana, so. kehonesteessä on HCG-entsyymiä, kehitysliuoksen lisäämisen jälkeen muodostuu entsyymille spesifinen käytettyä väriä vastaava väri. Kun noin puolen tunnin kuluttua kehitysliuoksen lisäämisen jälkeen mitään väriä ei muodostu, tämä on osoitus siitä, että nainen ei ole raskaana.

Oheisen keksinnön kohteena on myös testilaatikko, joka sisältää oheisen keksinnön mukaisen testin suorittamiseen tarvittavat seuraavat ainesosat:

- a. entsyymi-merkattu anti HCG-IgG;
- b. liukenemattomaksi tehty anti-HCG-IgG;
- c. sopiva väriliuos.

Suosittelussa suoritusmuodossa entsyymi-merkattu anti HCG-IgG sisältää myös normaalia γ -globuliinia ja/tai vapaata anti HCG-IgG.

Ainesosa a. säilytetään ja myydään parhaiten lyofilisoidussa muodossa.

Kaikkia mainittuja ainesosia ei luonnollisestikaan tarvitse pakata samaan testilaatikkoon. Siten vaikkakin yksi tai kaksi mainituista ainesosista on pakattu erikseen, tämä on käsitettävä sisältyväksi oheisen keksinnön piiriin.

Oheista keksintöä havainnollistetaan viitaten seuraaviin esimerkkeihin niihin kuitenkin rajoittumatta.

Esimerkki 1Anti HCG-IgG:n valmistus

Normaaleihin kaniineihin injektoitiin kolme kertaa (kerran viikossa) jalkapohjaan lihaksensisäisesti 0,6 ml HCG:n, joka oli homogenisoitu yhtä suuren tilavuuden kanssa täydellistä Freund'in apuainetta, suspensiota. Lopullinen HCG-konsentraatio oli 0,5 mg/ml. HCG-entsyymin teho voi vaihdella välillä 2800 - 3600 u/mg eikä ole millään tavoin kriittinen immunisoinnin onnistumiselle. HCG liuotettiin 0,85-prosenttiseen natriumkloridiliuokseen. Se voidaan liuottaa myös mihin tahansa muuhun sopivaan puskuriliuokseen, jonka pH on välillä 6,8 - 8,5. Viikon kuluttua viimeisestä injektioista kaniineista valutettiin veri ja seerumi erotettiin sentrifugoimalla. Epäspesifiset vasta-aineet erotettiin seerumista inkuboimalla puoli tuntia yhtä suuren tilavuuden kanssa liukenemattomaksi tehtyä normaalin ihmisen seerumia, minkä jälkeen liuos sentrifugoitiin.

Spesifinen anti HCG-IgG saostettiin seerumista lisäämällä anti HCG-seerumiin 60 % (tilavuus/tilavuus) kyllästettyä ammoniumsulfaattiliuosta (75 % paino/tilavuus). Saatu sakka liuotettiin puskuroituu suolaliuokseen ja liuosta dialysoitiin 2 - 3 päivää samaa puskuroitua suolaliuosta vasten.

Tässä ja seuraavissa esimerkeissä käytetty boraatti-suolaliuos valmistettiin seuraavasti:

I.	NaCl	0,85 %
II.	H ₃ BO ₃	12,37 g
	NaOH	0,52 g
	NaCl	8,00 g
	H ₂ O	1000 ml:aan

97 ml liuosta I sekoitettiin 3 ml:n kanssa liuosta II.

Anti HCG-IgG konsentraatio määritetään spektrofotometrisesti aallonpituudella 280 ^{nm} ~~nm~~. 1,4 OD vastaa 1 mg/ml IgG.

Tärkeää on, että varmistetaan, ettei saatu valmiste sisällä peroksi-
daasiaktiivisuutta.

Esimerkki 2Liukenemattoman anti HCG-IgG:n valmistus

Reaktio suoritettiin fluoresenssilampun valkoisen valon alla. Valosähköinen reaktio tapahtui sen jälkeen, kun oli sekoitettu 2,5 ml bisakryyliamidiliuosta, 2,5 ml boraatti-suolaliuosta, 1 ml proteiineja (jotka sisälsivät 30 - 50 mg anti HCG-IgG ja muuta sopivaa proteiiniähdettä, esimerkiksi normaalia kaniinin IgG, härän seerumialbumiinia (BSA) jne., jonka konsentraatio oli 100 mg/ml) ja 0,1 - 0,3 ml riboflaviinia (0,2 mg/ml vesiliuosta). Kun mainittua seosta inkuboitiin puoli tuntia 25 - 36°C:ssa, muodostui liukenematon geeli. Geeli homogenisoitiin ja pestiin kolme kertaa boraatti-suolaliuoksessa. Testiin käytetty pakatun geelin määrä on noin 0,1 - 1,0. Bisakryyliamidiliuos valmistettiin seuraavasti:

1 g bis-(N,N'-metyleenibisakryyliamidia) ($7H_{10}N_2O_2$) ja
4 g akryyliamidia ($CH_2CHCONH_2$) liuotettiin 19 ml:aan tislattua vettä.

Esimerkki 3Entsyymi-merkatun anti HCG-IgG:n valmistus

5 mg piparjuuri-peroksidaasia liuotettiin 1,0 ml:aan 0,3 natriumbikarbonaattia. Mainittuun liuokseen lisättiin 0,1 ml l-prosenttista o-fluoridinitrobenzseeniliuosta absoluuttisesta alkoholissa ja seosta sekoitettiin varovasti yksi tunti. Lisättiin 1,0 ml 0,06 natriumperjodaattia ja sekoittamista jatkettiin 30 minuuttia. Sen jälkeen lisättiin 1,0 ml 0,16 etyleeniglykolia ja sekoittamista jatkettiin. Sen jälkeen seos dialysoitiin karbonaattipuskuria (0,01M pH 9,5) vasten yhden päivän ajan 4°C:ssa. 5 mg lisättiin anti HCG-IgG:en ja seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 2 - 3 tuntia. Sen jälkeen seos dialysoitiin 0,01 (FBS)-liuosta, pH 7,1, vasten 4°C:ssa. FBS-liuos valmistettiin sekoittamalla:

17,5 ml	Na_2HPO_4	0,15 +
32,5 "	KH_2PO_4	0,15 +
50 "	suolaliuos	(0,85 % NaCl)

Näin merkittiin noin 90 % immunoglobuliinista ja 70 - 90 % peroksi-
daasia kytkettiin IgG:n kanssa. Merkattu anti-HCG-IgG valmistettiin
loppuun johtamalla dialysointi Sephadex G200 (Pharmacia Ab) pylvään
läpi. Entsyymi-merkattua anti HCG voidaan säilyttää pakastekuivatussa
muodossa yhteen tai useampaan testiin sopivassa konsentraatiossa.
Entsyymien aktiivisuus mitataan spektrofotometrissä näkyvällä valolla
aallonpituudella 460 ^{nm} (0,1 ml testiseosta, 2,9 ml väriä, inku-
bointi 3 minuuttia huoneen lämpötilassa). Reaktion lopettamiseksi
lisättiin 1 pisara HCG 6N ja tulos luettiin spektrofotometrillä.
Entsyymien aktiivisuus ilmoitetaan mU-yksikköinä ja se lasketaan
seuraavasti:

$$1 \text{ mU} = \frac{A/\text{min.}}{3,766} \cdot 10^3$$

A = OD-absorptio

Esimerkki 4

Kokeen suorittaminen

Seuraavat reagenssit sekoitetaan koeputkessa ja niitä inkuboidaan
1/4 - 1/2 tuntia.

- 0,1 ml entsyymi-merkattua anti HCG, jonka entsyymien aktiivisuus
on 65 ^{nm}.
- 0,1 ml normaalia kaniinin γ -globuliinia (tai lampaan tai vuohen),
jonka konsentraatio on 10 - 100 mg/ml.
- 0,1 ml testattavaa kehonestettä, parhaiten virtsaa.

Reaktio saadaan herkemäksi lisäämällä 0,1 mg - 0,5 mg anti HCG-IgG.

Esi-inkubointijakson jälkeen seos laitetaan toiseen koeputkeen, joka
sisältää pakattua, liukenemattomaksi tehtyä anti HCG-IgG-geeliä
noin 0,3 ml. Tätä seosta inkuboidaan 15 - 30 minuuttia. Tämän jälkeen
seos pestään neljä kertaa boraatti-suolaliuoksella (sentrifugoimalla
tai johtamalla liuos boraatti-suolaliuosmäärän läpi tai upottamalla
nailonpussi liuokseen). Viimeisen pesun jälkeen lisätään 2,5 ml
kehitysväriiliuosta (valmistettu jäljempänä kuvatulla tavalla), seosta
ravistellaan hyvin ja annetaan seistä noin 5 minuuttia. Jos testatta-
vassa kehonesteessä on HCG, muodostuu punertavanruskea väri.

Väriliuoksen valmistus

0,5 ml 0,3-prosenttista H_2O_2 -liuosta lisätään 0,01 fosfaattipuskuriin, jonka pH on 6, 50 ml tilavuuteen asti. Sen jälkeen mainittuun puskuriliuokseen lisätään 0,41 ml 1-prosenttista ortodiansidiinin vesiliuosta.

Patenttivaatimukset

1. Raskauden määrittäminen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymi-merkattua anti HCG-IgG sekoitetaan naisen jonkin kehonesteen kanssa; sen jälkeen mainittua seosta sekoitetaan liukenemattomaksi tehdyn anti HCG-IgG:n (geeli) kanssa ja tietyn ajan kuluttua seos sekoitetaan kehitysväriliuoksen kanssa.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty entsyymi on piparjuuri-peroksidaasi.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että väriliuos on o-dianisidiini H_2O_2 -liuoksessa.
4. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymi-merkattu anti HCG-IgG sekoitetaan normaalin γ -globuliinin kanssa.
5. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsyymi-merkattu anti HCG-IgG sekoitetaan vapaan anti HCG-IgG:n kanssa.
6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käytetty kehoneste on virtsa.
7. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että seos pestään ennen väriliuoksen lisäämistä.
8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pesuliuos on boraatti-suolaliuos.
9. Raskauden määrittäminen menetelmä, joka on oleellisesti samanlainen kuin edellä on kuvattu esimerkkeihin viitaten.
10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 9 mukaisen raskauden määrittämenetelmän suorittamiseen tarkoitettu testilaatikko, t u n n e t t u siitä, että se sisältää seuraavat ainekset:
 - a. entsyymi-merkattu HCG-IgG;
 - b. liukenemattomaksi tehty anti HCG-IgG;
 - c. sopiva väriliuos.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen testilaatikko, t u n n e t t u siitä, että entsyymi-merkattu anti HCG-IgG sekoitetaan normaalin γ -globuliinin kanssa.

12. Patenttivaatimuksen 10 tai 11 mukainen testilaatikko, t u n n e t t u siitä, että entsyymi-merkattu anti HCG-IgG sekoitetaan vapaan anti HCG-IgG:n kanssa.

13. Jonkin patenttivaatimuksen 10 - 12 mukainen testilaatikko, t u n n e t t u siitä, että ainesosa a. on lyofilisoidussa muodossa.

Patentkrav

1. Bestämningsförfarande av graviditet, k ä n n e t e c k n a t därav, att entsymmärkt anti HCG-IgG blandas i någorn av kvinnans kroppsvätskor; varefter den nämnda blandningen blandas med de olösliggjorda anti HCG-IgG (gel) och efter en viss tid blandas blandningen med framkallningsfärglösningen.
2. Förfarandet enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det använda entsymet avser pepparrot-peroxidas.
3. Förfarandet enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att färglösningen avser o-dianisid i H_2O_2 -lösningen.
4. Förfarandet enligt ågot av patentkraven 1-3, k ä n n e t e c k n a t därav, att det entsym-märkta anti HCG-IgG blandas med normal γ -globulin.
5. Förfarandet enligt något av patentkraven 1-4, k ä n n e t e c k n a t därav, att det entsym-märkta anti HCG-IgG blandas med fri anti HCG-IgG.
6. Förfarandet enligt något av patentkraven 1-5, k ä n n e t e c k n a t därav, att den använda kroppsvätskan är urin.
7. Förfarandet enligt något av patentkraven 1-6, k ä n n e t e c k n a t därav, att blandningen tvättas före tillsats av färglösningen.
8. Förfarandet enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att tvättlösningen är borat-saltlösning.
9. Bestämningsförfarandet av graviditet, som är väsentligt likadant som förut har beskrivits enligt exemplena.
10. Testasken för utförande av bestämningsförfarandet av graviditet enligt något av patentkraven 1-9, k ä n n e t e c k n a t därav, att den innehåller följande ämnen:
 - a. entsym-märkt HCG-IgG;
 - b. olösliggjord anti HCG-IgG;
 - c. passande färglösning.

11. Testask enligt patentkravet 10, k ä n n e t e c k n a d därav, att det ensym-märkta anti HCG-IgG blandas med normal γ -globulin.

12. Testask enligt patentkravet 10 eller 11, k ä n n e t e c k n a d därav, att det ensym-märkta anti HCG-IgG blandas med fri anti HCG-IgG.

13. Testask enligt något av patentkraven 10-12, k ä n n e t e c k -
n a d därav, att ämnesdelen a är i lyofilt tillstånd.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

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

Suomi - Finland 54033, 54034 (901 N³/14), 53894 (901 N³/14)
 Iso-Britannia - Storbritannien _____
 Norja - Norge _____
 Ranska - Frankrike _____
 Ruotsi - Sverige _____
 Saksa - BRD - Tyskland _____
 Sveitsi - Schweiz _____
 Tanska - Danmark _____
 USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

13.10.81

Kaija Karm

Allekirjoitus

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