

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 772747 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **772747**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C07G

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **19.09.1977**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **19.09.1977**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **25.03.1978**

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

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

24.09.1976 NL 7610608

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Akzo N.V., IJsellaan 82 Arnheim, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Dawson, Edward Cecil, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

2 •Homan, Jan Daniel Herman, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

3 •Van Weemen, Bauke Klaas, Netherlands, ALANKOMAAT, (NL)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Menetelmä peroksidaasin sisältävien seosten stabiloimiseksi

Förfarande för stabilisering av blandningar innehållande peroxidas

AKZO N.V.l, IJssellaan 82, Arnhem, Hollanti.

entsyödi → reakti-aine

Ks.
muut
vasta.
Menetelmä peroksidaasia sisältävien seosten stabiloimiseksi
- Förfarande för stabilisering av blandningar innehållande
peroxidas

Keksintö käsittää menetelmää peroksidaasia sisältävien seosten stabiloimiseksi.

On tunnettua, että ^{eivät} peroksidaasit, kytkeytyneenä toiseen aine-osaan tai yksinään, ~~eivät~~ ole kovin stabiileja, erikoisesti alhaisissa konsentraatioissa, ja niiden säilymisominaisuudet ovat sen vuoksi huonot.

On edelleen osoitettu, että peroksidaaseja sisältävät seokset ovat hyvin herkkiä ja alttiita vahingoittumaan pakastekuivauksessa.

Peroksidaasit ovat entsyymejä, jotka katalysoivat tiettyjen yhdisteiden hapettumista, jonka hapettumisen kuluessa peroksidi, ja erikoisesti vetyperoksidi, toimii donorina. Niitä voidaan saada kasveista, esim. piparjuuriperoksidaasi, selkärangaisista eläimistä, esimerkiksi tryptofaanipyrrolaasi, ja mikro-organismeista, kuten cytochrome c peroksidaasi Pseudomonaksesta.

Peroksidaaseja käytetään hyvin sekalaisiin tarkoituksiin, joihin kuuluu niiden käyttö reagensseina diagnostisissa määrityksissä, esim. reagenssina glukoosioksidaasimenetelmässä glukoosia määritettäessä, ja niiden tärkeys on entisestään kasvanut niin kutsutun entsyymi-immunotestin kehittämisen jälkeen^{Taus} immunologisenⁿ arviointimenetelmän, jolla osoitetaan haptteenit, antigeenit ja antibodit, jossa immunologista aineosaa, esim. antigeeniä, kytkettyinä entsyymiin käytetään reagenssina. Arvioitavan aineosan ja lisätyn aineosan (lisättyjen aineosien) välisen reaktion jälkeen, lopullisen reaktioseoksen tai sen tietyn osan entsyymiaktiivisuus mitataan ja tämä entsyymiaktiivisuus on arvioitavan aineosan määrän mitta. Suurehko määrä tämän immunologisen testimenetelmän muunnoksia ja erilaisten suoritustapojen käyttö ovat tunnettuja. Mahdollinen testin suoritustapa antigeenin osoittamiseksi, esim. HCG raskauden osoittamiseksi, sisältää virtsanäytteen inkuboinnin tietyn määrän kanssa HCG kytkentätuotetta ja entsyymiä, ja tietyn määrän kanssa HCG:n antibodiä, joka on saatettu liukenemattomiksi tai voidaan jälkeinpäin saattaa liukenemattomaksi. Kilpaileva reaktio tapahtuu toisaalta antibodin ja osoitettavan HCG:n välillä ja toisaalta entsyymiin kytketyn antibodin ja HCG:n välillä. Kun immunokemiallinen reaktio on päättynyt, mitataan entsyymiaktiivisuus lopulta saadussa reaktiotuotteen kiinteässä tai nestefaasissa, mainitun aktiivisuuden ollessa arvioitavan HCG:n mitta.

Peroksidaasia käytetään edullisesti entsyymien osoittajana tässä entsyymi-immunotestissä, yhden syistä ollessa se, että ~~se~~^{tämän} ~~laisen~~ entsyymien aktiivisuus voidaan helposti määrittää kolorimetrisesti, joka tarkoittaa sitä, että arviointi kvalitatiivisissa määrityksissä voi tapahtua visuaalisesti.

Testiseokset, joita markkinoidaan entsyymi-immunotestien suorittamiseksi, sisältävät sen vuoksi välttämättömänä aineosana tietyn määrän immunologista komponenttia kytkettynä peroksidaasiin, jolloin reagenssit edullisesti annetaan käyttöön lyofilisoidussa tilassa. Kuten yllä on huomautettu, peroksidaasin suurin haitta on kuitenkin se, että niiden ominaisuudet eivät säily alhaisissa konsentraatioissa liuotetussa eivätkä suspendoidussa tilassa mitään oleellista ajanjaksoa. Peroksidaasin aktiivisuus voi myös alentua pakastekuivauksen aikana tai sen seurauksena. Näistä syistä peroksidaasien käytön viehätys mitätöityy.

Nyt on hämmästyttävästi keksitty, että peroksidaasia sisältävien seosten, joko lyofilisoitujen tai lyofilisoimattomien, stabiilisuutta voidaan oleellisesti lisätä lisäämällä seokseen polyvalenttisia metalli-ioneja.

Kaikkia polyvalenttisia metalli-ioneja voidaan käyttää, mutta sopivia polyvalenttisia ioneja ovat erikoisesti jaksollisen järjestelmän jaksojen 3 ja 4 ionit, nimittäin Mg, Ca, So, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga ja Al. Edullisiin polyvalenttisiin ioneihin kuuluvat Al, Zn, Mg, Fe ja Cu, ja edullisimmin käytetään Fe -ioneja, erikoisesti ferroioneja, koska näillä yleensä on suurempi stabiloiva vaikutus kuin muilla metalli-ioneilla.

Metalli-ionit lisätään yleensä seokseen sopivien metallisuolojen muodossa, kuten sulfaattien^{lin}, fosfaatteina, halogenideina tai nitraatteina.

Tarvittava metallijohdannaisten minimimäärä stabiloivan vaikutuksen aikaansaamiseksi on 0,0001M. Maksimimäärälle ei ole pakollisia rajoja, mutta optimi stabiilisuus saavutetaan yleensä lisäämällä 0,05M, joten edelleen lisääminen on hyväksyttävää, mutta tarpeetonta ja ylenpalttista. Peroksidaasin määrä, joka on läsnä vesifaasissa, johon yllä mainittu määrä metallijohdannaista lisätään, on välillä 1 nanogramma ja 25 mikrogrammaa millilitraa kohti, ja se on yleensä välillä 10 nanogrammaa ja 10 mikrogrammaa.

On suositeltavaa lisätä myös kompleksinmuodostajaa seokseen, jotta metalli-ionien vaikutus myöhemmin suoritettavaan immunologiseen arviointiin ehkäistyy. Hämmästyttävästi kompleksinmuodostajan lisäyksellä ei ole huonontavaa vaikutusta metalli-ionien stabiloivaan kykyyn. Esimerkkejä sopivista kompleksinmuodostajista ovat: etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA), sitruunahappo, viinihappo, glukuronihappo, sakkarihappo, ja näiden happojen sopivat suolat.

Yllä mainittujen aineosien lisäksi seokseen voidaan lisätä myös muita aineita, kuten puskureita, sokereita, esim. sakkaroosia, sorbitolia tai mannitolia, polyetyleeniglykolia ja/tai proteiineja, kuten albumiinia.

Peroksidaasia sisältävät vesiliuosseokset, joihin on lisätty stabiloiva määrä metalli-ioneja ja vapaavalintaisesti muita aineosia, voidaan markkinoida sellaisenaan, vaikka ne yleensä ensin lyofilisoidaan.

Peroksidaasia sisältävien vesiliuosseosten pakastekuivaaminen tapahtuu tavallisella tavalla pakastamalla välille -40°C - -50°C ja sublimoimalla jää alennetussa paineessa.

Ennen sublimointia vesiliuosseos voidaan myös saattaa rakeiden muotoon sumuttamalla ilmaan tai antamalla vesiliuosseostip-
pojen pudota nesteeseen, joka ei ole veteen sekoittuva, ja joka on kauttaaltaan tai osaksi vesiliuosseoksen jäätymispistettä alemmassa lämpötilassa. Tämän jälkimmäisen mahdollisuuden etu on siinä, että saadaan pakastekuivattuja rakeita, jotka sisältävät ennalta määritetyt ja tarkasti mitatut määrät reagensseja.

Seuraava taulukko esittää peroksidaasivalmisteseen lisät-
tyjen eri metalli-ionien stabiloivan vaikutuksen tulosta; numerot edustavat aikaa viikkoina, jonka jälkeen enemmän kuin 80 % alku-
peräisestä entsyymiaktiivisuudesta voidaan vielä todeta.

Metalli-ioni	Konsentraatio	Lämpötila, $^{\circ}\text{C}$		
		4	25	37
Vertailu	-	8	2	1
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	0,01	16	16	10
MgSO_4	0,01	16	2	1
ZnCl_2	0,01	16	2	1
FeSO_4	0,01	20	20	20

Seuraavat esimerkit antavat joukon seoksia, jotka sopivat keksinnön edelleen kuvaamiseen.

Esimerkki I

Seos, joka sisälsi piparjuuriperoksidaasia (HRP-RZ 0,6) ja albumiinia (BSA) suhteessa 1:10, liuotettiin seuraaviin puskureihin:
(a) 0,02M fosfaattipuskuri, pH 6,0, 0,1 % laktalbumiinia, 2,5 % mannitolia ja 10^{-4}M FeSO_4 .

2b) Kuten (a), mutta FeSO_4 puuttuu.

HRP-pitoisuus kummassakin liuoksessa oli 12 ng/ml. Liuokset pakastekuivattiin lääkepulloissa.

Tuotteiden peroksidaasiaktiivisuudet määritettiin välittömästi pakastekuivauksen jälkeen; tuotteen (a) entsyymiaktiivisuus oli muuttumaton, kun taas tuotteella (b) oli vain 38 % alkuperäisestä entsyymiaktiivisuudesta.

Esimerkki II

Piparjuuriperoksidaasia (RZ 0,6) liuotettiin (8 $\mu\text{g/ml}$) seuraaviin puskureihin:

(a) 0,01 M HEPES pH 8,0, 2 % sakkaroosi, 6 % mannitoli ja 0,01M FeSO_4 .

(b) Kuten (a), mutta FeSO_4 puuttuu.

Molemmissa tapauksissa noin 50 μl tippoja kerättiin nestemäiseen tyypeen, jonka jälkeen ne pakastekuivattiin ja pidettiin huoneen lämpötilassa.

52 viikon kuluttua tuotteesta (a) oli vielä jäljellä 80 % alkuperäisestä peroksidaasiaktiivisuudesta, kun taas tuotteella (b) oli vain 17 % alkuperäisestä aktiivisuudesta.

Esimerkki III

Tuote, joka oli saatu kytkemällä estradiolia ja cytochrome c peroksidaasia, liuotettiin seuraaviin puskureihin:

(a) 0,36M HEPES, 2 % sakkaroosi, 6 % mannitoli, 0,01M EDTA ja 0,01M FeSO_4 (pH 7,4).

(b) Kuten (a), mutta FeSO_4 puuttuu.

Liuokset pakastekuivattiin ja pidettiin 37°C:ssa.

Peroksidaasipitoisuus oli 270 ng/ml.

16 viikon kuluttua tuotteen (a) entsyymiaktiivisuus oli käytännöllisesti katsoen muuttumaton ja käyttäytyminen entsyymi-immunotestissä oli sama kuin alkuperäisellä konjugaatilla, kun taas tuotteen (b) entsyymiaktiivisuus oli alentunut alle 50 % alkuperäisestä aktiivisuudesta.

Esimerkki IV

Tuote, joka oli saatu kytkemällä esteriolia ja piparjuuriperoksidaasia, liuotettiin seuraaviin väliaineisiin:

(a) 0,01M HEPES, 0,01M EDTA, 2 % sakkaroosi ja 0,01M $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$.

(b) Kuten (a), mutta $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ puuttuu.

Molempien liuosten peroksidaasipitoisuus oli 180 ng/ml.

Molemmat liuokset pakastekuivattiin pisaramuodossa esimerkissä II kuvatulla tavalla ja pidettiin sitten 37°C:ssa.

11 viikon kuluttua tuotteen (a) peroksidaasiaktiivisuus oli muuttumaton, kun taas tuotteen (b) entsyymiaktiivisuus oli jo hävinnyt muutaman päivän kuluttua.

Esimerkki V

Esimerkissä III kuvattua tapaa vastaavalla tavalla liuotettiin, pakastekuivattiin ja säilytettiin ihmisen istukan laktogeenistä (HPL) ja piparjuuriperoksidaasista (HRP-RZ 0,6) kytkemällä saatu tuote.

Tuote (a): 22 viikon kuluttua, 94 % entsyymiaktiivisuus.

Tuote (b): 22 viikon kuluttua, ei entsyymiaktiivisuutta.

Analogiset tulokset saatiin tuotteella, joka oli saatu kytkemällä anti-hepatitis B antibodit ja piparjuuriperoksidaasi, mutta korvaamalla FeSO_4 liuoksessa (a) MgSO_4 :llä stabilisaattorina, ja tuotteella, joka oli saatu kytkemällä lampaan antibodit ihmisen immunoglobuliinia ja cytochrome c peroksidaasia vastaan, mutta käyttäen ZnCl_2 stabilisaattorina liuoksessa (a).

Patenttivaatimukset.

1. Menetelmä peroksidaasia sisältävien seosten stabiloimiseksi, t u n n e t t u siitä, että siihen on lisätty polyvalenttista metalli-ionia stabilisaattoriksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kyseistä metalliyhdistettä lisätään vähimmäistasolla 0,0001 molaarisena.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että metalliyhdiste on rautasuola.

4. Patenttivaatimusten 1 ja 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että peroksidia on läsnä määrässä välillä 1 nanogramma - 25 mikrogrammaa millilitraa kohti.

5. Jonkun edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että peroksidaasia sisältävä seos on lyofilisoitu tuote.

6. Jonkun edeltävän patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että seokseen lisätään myös kompleksinmuodostajaa.

7. Peroksidaasia sisältävä seos, t u n n e t t u siitä, että se on stabiloitu lisäämällä polyvalenttista metalli-ionia.

8. Patenttivaatimuksen 7 seos, t u n n e t t u siitä, että polyvalenttinen ioni on osa rautasuolaa.

9. Patenttivaatimuksen 8 seos, t u n n e t t u siitä, että polyvalenttinen ioni on osa ferrosuolaa.

10. Patenttivaatimuksen 7 seos, t u n n e t t u siitä, että peroksidaasia sisältävä seos on lyofilisoitu.

11. Patenttivaatimuksen 7 seos, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sopivan kompleksinmuodostajan.

12. Patenttivaatimuksen 7 seos, t u n n e t t u siitä, että käytetty peroksidaasi on piparjuuriperoksidaasi.

13. Patenttivaatimuksen 7 seos, t u n n e t t u siitä, että polyvalenttiset ionit ovat läsnä määrässä välillä noin 0,0001M - noin 0,05M.

14. Patenttivaatimuksen 7 seos, t u n n e t t u siitä, että peroksidaasia on läsnä määrässä välillä noin 10 nanogrammaa millilitraa kohti - noin 10 mikrogrammaa millilitraa kohti.

Patentkrav.

1. Förfarande för stabiliserande av peroxidashaltiga kompositioner, k ä n n e t e c k n a t därav, att tillsätter en polyvalent metalljon som stabilisator.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man tillsätter ifrågavarande metallförening i minimal grad av 0,0001 mol.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att metallföreningen är ett järnsalt.
4. Förfarande enligt patentkraven 1 och 2, k ä n n e t e c k n a t därav, att peroxidaset är närvarande i en mängd från 1 nanogram till 25 mikrogram per milliliter.
5. Förfarande enligt något av föregående patentkravet, k ä n n e t e c k n a t därav, att den peroxidashaltiga kompositionen är en lyofiliserad produkt.
6. Förfarande enligt något av föregående patentkravet, k ä n n e t e c k n a t därav, att ett sekvesteringsmedel även tillsätts kompositionen.
7. Peroxidashaltig komposition, k ä n n e t e c k n a d därav, att den stabiliserats genom tillsats av en polyvalent metalljon.
8. Komposition enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att den polyvalenta jonen bildar del av ett järnsalt.
9. Komposition enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a d att den polyvalenta jonen bildar del av ett ferrosalt.
10. Komposition enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d att den peroxidashaltiga kompositionen är lyofiliserad.
11. Komposition enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller ett lämpligt sekvesteringsmedel.
12. Komposition enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att det använda peroxidaset är pepparrotsperoxidas.
13. Komposition enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav att de polyvalenta jonerna är närvarande i en mängd från ca. 0,0001M till ca. 0,05M.
14. Komposition enligt patentkravet 7, k ä n n e t e c k n a d därav, att peroxidaset är närvarande i en mängd från ca. 10 nanogram per milliliter till ca. 10 mikrogram per milliliter.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patent-
ansökningar: _____

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja - Ansökningspublikationer,
utläggings- och patenskrifter:

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA 3947324 (C07G 7/022)

NL 7501215 (G01N 33/16)

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

J. appl. Chem. Biotechn. (1976) 26, 576-583
CA 55: 19097 g

1987-02-04 Eero Kinnu

Allekirjoitus

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