



F10000968028

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT**

96802

**U (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 26 08 1996**

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

G 01N 33/569, 33/543

SUOMI-FINLAND**(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patentihakemus - Patentansökning	895472
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	16.11.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	16.11.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	18.05.90
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	15.05.96
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
17.11.88 US 272380 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Becton, Dickinson and Company, One Becton Drive, Franklin Lakes, NJ 07417-1880, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Henderson, Glenn L., 2908 Red Clay Drive, Apt. 605, Raleigh, NC, USA, (US)
 2. Hoke, Randal A., 107 Steel Trap Court, Cary, NC, USA, (US)
 3. Hopkins, Anne C., 105 Seth Court, Cary, NC, USA, (US)
 4. McLaurin, Daniel A., 912 Vickie Drive, Cary, NC, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä virusantigeenin määrittämiseksi nesteestä ja materiaalipakkaus menetelmän suorittamiseksi
Förfarande för bestämning av en virusantigen i en vätska och materialförpackning för detta

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 280560 (B 01D 13/04), EP A 101912 (G 01N 33/54), EP A 271731 (G 01N 33/542),
 WO A 84/02193 (G 01N 33/54)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu menetelmään virusantigeenin immunologiseksi määrittämiseksi, joka menetelmä toteutetaan edeltäkäs in inertillä proteiinilla pinnoitetun kalvon pinnalla. Antigeenin ei-immunologinen kiinnittyminen tapahtuu absorboitumalla pinnoitetun kalvon pinnalle. Kalvoon vangittu antigeeni sitoutuu jäljittäjään, joka käsittää spesifiseen vasta-aineeseen konjugoidun leiman, inertin proteiinin estäessä samalla jäljittäjän epäspesifisen sitoutumisen. Leima voi olla entsyymi, joka muuttaa substraatin ilmaistavaksi tuotteeksi tai joka muuttaa suojatun inhibiittorin inhibiittoriksi, joka inhiboi toista entsyymiä siten, ettei se voi muuttaa substraattia tuotteeksi. Keksinnön kohteena on materiaalipakkaus määrittäksen toteuttamiseksi keksinnön kohteena olevan menetelmän mukaisesti.

Uppfinningen avser ett förfarande för immunologisk bestämning av en virusantigen, vilket förfarande genomförs på en yta av en på förhand med inert protein ytbelagd film. Icke-immunologisk vidfästning av antigen sker genom absorbering på ytan av den belagda filmen. Den på filmen fängslade antigenen binds till en spårare, som omfattar en till specifik antikropp konjugerad stämpel, varvid det inerta proteinet samtidigt förhindrar ospecifikt bindning av spåraren. Stämpeln kan vara ett enzym, som förvandlar substratet till en detekterbar produkt eller som förvandlar en skyddad inhibitor till en inhibitor, som inhiberar ett annat enzym så, att det inte kan förvandla substratet till en produkt. Uppfinningen avser en materialförpackning för genomföring av bestämningen enligt förfarandet, som är föremålet för uppfinningen.

Menetelmä virusantigeenin määrittämiseksi nesteestä ja materiaalipakkaus menetelmän suorittamiseksi

Keksintö kohdistuu ligandien ja sen sisältämien materiaalien määrittämiseen, ja se kohdistuu erityisemmin määrittämiseen, jossa ligandi kiinnitetään suoraan kiinteälle, epäspesifisellä antigeenilla esipinnoitetulle pinnalle.

Alalla on kehitetty lukuisia nopeita ja herkkiä määrittämissysteemejä ligandin ilmaisemiseksi tai sen pitoisuuden määrittämiseksi nesteestä. Perinteiset immuunimäärittämissysteemit riippuvat ligandin sitoutumisesta spesifiseen antiligandiin, ja ne ovat olleet erityisen käyttökelpoisia, koska niiden spesifisyys ja herkkyys ovat olleet hyvät. Näissä määrittämissysteimeissä yhtä edellä mainittua reagenssia käytetään leimatusta muodosta ja tätä leimattua reagenssia kutsutaan usein jäljittäjäksi.

Alalla on kehitetty monia leimausmenetelmiä. Radioimmuunimäärittämissysteimeissä (RIA) käytetään radioisotooppeja leimoina, ja nämä määrittämissysteemit ovat hyvin herkkiä ja toistettavia, ja ne voidaan automatisoida suurien näytemäärien nopeaksi käsittelyä varten. Fluori-immuunimäärittämissysteimeissä (FAI) käytetään fluorokromeja leimoina, ja näillä määrittämissysteimeillä leima ilmaistaan suoraan siten, että väriaine viritetään aallonpituudeltaan sopivalla virittäväällä säteilyllä, minkä jälkeen väriaineen fluoresenssi ilmaistaan.

Myös entsyymejä on käytetty leimoina immuunimäärittämissysteimeissä. Entsyymiä käyttävässä immuunimäärittämissysteimeissä (EIA) entsyymillä leimattujen reagenssien valmistaminen on halpaa ja ne ovat erittäin stabiileja, jolloin niiden säilymisaika on pitkä. Kuitenkin niihin perustuvien määrittämissysteimien herkkyys on lähes sama kuin radioimmuunimäärittämissysteimin herkkyys, ja niillä saatavat asianmukaiset tulokset voidaan määrittää joko näköhavainnon perusteella tai suhteellisen yksinkertaisella laitteella kuten spektrofotometrillä.

Perinteisessä EIA-menetelmässä entsyymi on konjugoitu kovalenttisesti spesifisesti sitoutuvan antigeeni-vasta-aine-parin yhteen komponenttiin, ja tuloksena oleva entsyymikonjugaatti saatetaan reagoimaan substraatin kanssa värin aikaansaamiseksi, joka väri mitataan. Konjugoimaton komponentti, kuten vasta-aine, immobilisoidaan usein kiinteään kantajaan ja sen tehtävänä on vangita antigeeni spesifisessä sitoutumisreaktiossa. Edustava perinteinen EIA-menetelmä on kuvattu nimellä Schuurs et al. myönnettyssä US-patenttijulkaisussa 3 654 090.

Bucher et al. kuvaavat US-patenttijulkaisussa 4 588 680 menetelmän eri viruksissa, mukaan lukien influenssavirukset A, B ja C, esiintyvän M-proteiinin määrittämiseksi. Tässä määrittäysmenetelmässä virus hajotetaan M-proteiinin vapauttamiseksi, joka proteiini absorboidaan suoraan polymeerikantajaan.

Julkaistussa PCT-hakemuksessa WO 86/02733 kuvataan menetelmä Herpes simplex -viruksen (HSV) määrittämiseksi, jossa menetelmässä antigeeniset glykoproteiinit gA/B, gC ja gD absorboidaan suoraan polymeerikantajaan tai ne vangitaan kantajan pinnalla olevilla spesifisillä monoklonaalisilla vasta-aineilla.

Sankolli et al. kuvaavat julkaisussa Journal of Immunological Methods, 104, 191 (1987), immunologisen määrittäysmenetelmän estradiolia varten, jossa menetelmässä kiinteä kantaja on käsitelty edeltäkäs in spesifisellä anti-IgG-vasta-aineella. Tämä vasta-aine vangitsee spesifisen antiestradioli-vasta-aineen, joka puolestaan vangitsee estradiolin, jolloin saadaan toistettavuudeltaan parantunut koe.

Armstrong et al. kuvaavat US-patenttijulkaisussa 4 497 899 määrittäysmenetelmän Chlamydia-antigeenia varten, jossa menetelmässä antigeeni absorboidaan suoraan kiinteään kantajaan, joka voi olla helmi, putki, liuska, kiekko tai mikrotiitterilevy. Sitten absorboitunut antigeeni määritetään millä tahansa perinteisellä EIA-, RIA- tai FIA-tekniikalla.

Kiinteään faasiin perustuvissa immuunimäärittäyksissä, erityisesti molekyylejä, joiden molekyyllipaino on suuri, varten mää-

ritettävässä näytteessä läsnä olevat materiaalit pyrkivät usein kiinnittymään epäspesifisellä tavalla kiinteään kantajaan. Erityinen syy määrityksen herkkyyden pienenemiseen tai toistettavuuden menettämiseen on leimatus antiligandikonjugaaatin (jäljittäjän) epäspesifinen absorboituminen suoraan kiinteään kantajan sitoutumiskohtiin, joita antiligandi ei ole täyttänyt. Tämä ongelma on vältetty perinteisesti salpaamalla vapaiksi jääneet sitoutumiskohdat antiligandilla käsittelyn jälkeen sellaisella proteiinilla, joka ei reagoi leimatus konjugaatin kanssa. Cole et al. kuvaavat US-patenttijulkaisussa 4 407 943 huokoisen kalvon pinnoittamisen veteen liukenemattomalla proteiinilla, kuten maissiproteiinilla, antigeenin tai vasta-aineen kiinnittämisen maissiproteiinikerrokseen sekä immuunikemiallisesti neutraalin proteiinin immobilisoimisen tähän antigeeniin vieraan proteiinin epäspesifisen sitoutumisen estämiseksi.

Vaikka tämä perinteinen, jälkikäteen toteutettu suojaaminen onkin parantanut määrityksen herkkyyttä, niin kiinteään faasin käsitleminen peräkkäin antiligandilla ja suojaavalla proteiinilla ennen ligandin sitomista on kuitenkin hankala, aikaa vievä ja kallista antiligandia kuluttava toimenpide. Näin ollen olemassa on tarve saada parannetuksi edelleen kiinteään faasiin perustuvaa immuunimääritystekniikkaa, mitä tulee erityisesti epäspesifisen sitoutumisen välttämiseen.

Menetelmässä ligandin, jota oletetaan olevan läsnä nesteessä, määrittämiseksi tämä neste saatetaan kosketukseen kiinteään kantajan, johon on kiinnitetty inerttiä proteiinia, sekä ligandia varten tarkoitettun, leimaa käsittävän jäljittäjän kanssa, jolloin kantaja vangitsee ligandin ja ligandi sitoutuu jäljittäjään. Oheisessa julkaisussa käsitteellä inertti proteiini tarkoitetaan sellaista proteiinia, joka ei ole immunologisesti reaktiivista minkään muun määritykseen osallistuvan komponentin kanssa, jolloin selvää on kuitenkin se, että inertti proteiini voi hyvin olla immunologisesti reaktiivista muiden sellaisten materiaalien kanssa, jotka materiaalit eivät osallistu keksinnön mukaiseen määritykseen. Sitoutumisen jälkeen kantaja erotetaan nesteestä ja kantajalla oleva leima il-

maistaan, jolloin ligandin läsnäolo nesteessä saadaan osoitetuksi. Leima voi olla radioaktiivinen atomi, fluoresoiva väriaine tai entsyymi, joka on konjugoitu antiligandiin tai kapseloitu antiligandiin konjugoituun liposomiin.

Keksinnön oleelliset tunnusmerkit on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

Keksinnön mukainen edullinen määrittäminen on kalvon läpi kulkeva EIA-menetelmä virusantigeenia varten, jossa määrittämisessä leima on tälle antigeenille spesifiseen vasta-aineeseen konjogoitu entsyymi ja jossa entsyymileima ilmaistaan saattamalla se reagoimaan värittömän substraatin kanssa substraatin muuttamiseksi värilliseksi tuotteeksi.

Keksinnön mukainen vaihtoehtoinen määrittämismenetelmä on kaksinkertainen entsyymimäärittäminen virusantigeenia varten. Kantajalla olevaan antigeeniin sidottuun spesifiseen vasta-aineeseen konjogoitu hydrolaasi poistaa suojaavan ryhmän suojatusta inhibiittorista, jolloin inhibiittori vapautuu. Tämä inhibiittori estää esterisubstraatin hydrolyysin esteraasin vaikutuksesta värilliseksi tuotteeksi, jolloin värin puuttuminen osoittaa antigeenin läsnäolon nesteessä.

Keksinnön muu piirre kohdistuu reagenssipakkaukseen, jonka sisältämiä materiaaleja voidaan käyttää määrittäksen toteuttamiseen keksinnön mukaista menetelmää noudattaen.

Näin ollen keksinnössä saadaan aikaan määrittämismenetelmä virusantigeenia varten, jossa menetelmässä olennaisesti kaikki kiinteän kantajan pinnalla olevat sitoutumiskohdat täytetään inertillä proteiinilla. Antigeenin vangitseminen inerttiä proteiinia sisältävän kantajan pinnalle toteutetaan ilman spesifistä vangitsevaa vasta-ainetta, jolloin menetelmässä vältetään aikaa vievä ja työtä runsaasti vaativa vaihe spesifisen vangitsevan vasta-aineen tuottamiseksi. Tämä inertti proteiini estää muiden proteiinien, jäljittäjä mukaan lukien, epäspesifisen sitoutumisen olennaisen täydellisesti, joka epäspesifinen sitoutuminen

pienentäisi muussa tapauksessa määrityksen herkkyyttä. Koska inerttiä proteiinia on helposti saatavana ja koska se on halpaa, niin keksinnössä saadaan aikaan yksinkertaistettu, kustannuksia merkittävästi säästävä määritysmenetelmä.

Kuviot 1-3 esittävät keksinnön kohteena olevan menetelmän mukaisesti toteutetuista RSV-, influenssa A- ja HSV-määrityksistä saatuja tuloksia, vastaavasti.

Vaikka hyvin monenlaiset suoritusmuodot tyydyttävätkin keksinnön vaatimukset, niin seuraavassa kuvataan yksityiskohtaisesti keksinnön edulliset suoritusmuodot pitäen kuitenkin mielessä se, että oheisen kuvauksen tarkoituksena on vain havainnollistaa keksinnön periaatteita, muttei rajoittaa keksintöä havainnollistettuihin ja kuvattuihin suoritusmuotoihin. Keksinnön puitteet määritellään liitteenä olevissa patenttivaatimuksissa ja niiden vastineissa.

Keksinnön eräs piirre kohdistuu menetelmään nestemäisessä näytteessä olevan ligandin immunologiseksi määrittämiseksi kiinteään faasin avulla, jossa menetelmässä olennaisesti kaikki kantajan pinnalla olevat sitoutumiskohdat suojataan edeltäkäsin inertistä proteiinista muodostetulla pinnoitteella. Hakijat ovat todenneet, että määritettävässä näytteessä olevaa ligandia voidaan vangita muulla tavalla kuin immunologisesti pinnoitettuun kantajaan määränä, joka on verrannollinen sen pitoisuuteen näytteessä, tällöin kuitenkin heikentämättä inertin proteiinin kykyä salvata täydellisesti muiden proteiinien epäspesifinen absorptio. Keksinnön mukainen immuunimääritys voidaan toteuttaa siten, että sillä saadaan ilmaistuksi ligandin läsnäolo näytteessä tai määritetyksi sen pitoisuus, ja käsitteellä "määrittää" tarkoitetaan joko kvalitatiivista tai kvantitatiivista ligandimääritystä.

Ligandi voi olla peräisin mistä tahansa lähteestä ja se voi olla antigeeni, vasta-aine tai hapteeni. Ligandi voi olla esimerkiksi ruumiinnesteessä läsnäoleva antigeeni tai se on voitu eristää ruumiinnesteestä ja siirtää sitten muuhun nesteeseen,

esimerkiksi puskuriin. Muissa tapauksissa ligandi voi olla peräisin muusta lähteestä kuin ruumiinnesteestä, esimerkiksi mikro-organismien viljelmästä tai siitä saadusta solu-uutteesta. Edullisia ligandeja ovat antigeenit, edullisimmin ruumiinnesteessä läsnäolevat virusantigeenit kuten adenovirus, parainfluenssa 3-virus ja edullisimmin Herpes simplex-virus (HSV), hengityselinten solusitkosvirus (RSV) ja influenssavirus A (Flu A). Keksintö kuvataan seuraavassa yleisesti virusantigeenin avulla.

Seuraavassa kuvataan yksityiskohtaisesti määrittelyn komponentit. Alalla tunnettu kiinteä kantaja voi olla mikä tahansa sellainen kantaja, mikä ei häiritse olennaisesti mitään muuta määrittelyyn osallistuvaa komponenttia tai määrittelyn muuta vaihetta. Esimerkkeinä käyttökelpoisista kiinteistä kantajista voidaan mainita lasi ja polymeerimateriaalit kuten polyetyleenä, polyvinylideenifluoridi, polystyreeni ja muut vastaavat. Tällaiset kantajat on voitu valmistaa mihin tahansa sopivaan muotoon kuten arkeiksi, putkiksi, mikrotiitterilevyn koloiksi tai edullisimmin kalvoiksi. Edullisia kalvoja voivat olla nailon ja nitroselluloosa. Erityisen edullinen kalvo on muokattu nailonkalvo, jota on saatavana kaupallisesti yhtiöstä Pall Corp., Glen Cove, New York, tavaramerkkeinä Immunodyne[®] ja Biodyne[®] A, B ja C.

Kalvon pinnalle voidaan pinnoittaa mitä tahansa sellaista inerttiä proteiinia, joka ei häiritse antigeenin ja jäljittäjän välistä myöhempää sitoutumisreaktiota, ja joka ei sitoudu olennaisesti epäspesifisesti määrittelyn väliaineessa läsnäoleviin muihin proteiineihin. Edustavina esimerkkeinä sopivista inerteista proteiineista voidaan mainita kaseiini ja albumiini, näihin kuitenkin rajoittumatta, vaikka myös muut ovat ilmeisiä alan asiantuntijalle. Kalvon pinnoittaminen inertillä proteiinilla voidaan toteuttaa millä tahansa sopivalla menetelmällä, edullisesti inkuboimalla kalvoa proteiiniliuoksessa, jolloin proteiini absorboituu fysikaalisesti kalvopinnan polymeerimatriisiin.

Inertillä proteiinilla pinnoitettu kalvo saatetaan kosketukseen sellaisen näytteen kanssa, jonka näytteen oletetaan sisältävän virusantigeenia. Pinnoitettua kalvoa inkuboidaan edullisesti näytteen kanssa hetkellisenä läpivirtausjärjestelynä noin 1-15 minuuttia, edullisesti noin 5 minuuttia, noin alueella 0-50 °C olevassa lämpötilassa, edullisesti noin ympäristön lämpötilassa. Tämän toimenpiteen seurauksena näytteessä olevaa anti-geenia absorboituu pinnoitettuun kalvoon määränä, joka on verrannollinen sen pitoisuuteen näytteessä. Lisäksi ollaan todettu, että virusantigeenia absorboituu edullisesti silloinkin, kun näyte sisältää suuren ylimäärän vierasta proteiinia, kuten asianlaita on ruumiinnesteen toimiessa näytteenä.

Jäljittäjä käsittää antigeenille spesifisen vasta-aineen, johon on konjugoitu leima. Tämä leima voi olla mikä tahansa sellainen perinteinen merkitsin, joka sen jälkeen, kun jäljittäjä on sitoutunut pinnoitetun kantajan vangitsemaan antigeeniin, tuottaa ilmaistavan signaalin. Näin ollen tämä leima voi olla radioaktiivinen atomi tai fluoresoiva väriaine, joka on konjugoitu vasta-aineeseen. Mikäli leima on radioaktiivinen alkua-aine, niin signaalina ovat radioaktiiviset impulssit. Mikäli leima on fluoresoiva väriaine, niin signaalina on fluoresenssi-emissio, joka ilmaistaa sen jälkeen, kun väriaineeseen on kohdistettu aallonpituudeltaan sopivaa virittävää valoa. Tyypillinen radioaktiivinen leima on esimerkiksi ^{127}I ja tyypillinen fluoresoiva väriaine on esimerkiksi fluoreseiini-isotiosyanaatti (FITC). Radioaktiivisen ja fluoresoivan leiman konjugoiminen vasta-aineisiin on tavanomaista, ja täten yksityiskohtia, jotka liittyvät radioaktiivisten ja fluoresoivien leimojen valmistukseen ja käyttöön immuunimäärityksessä, ei tarvitse esittää tämän enempää, jotta alan asiantuntija ymmärtäisi täydellisesti oheisen keksinnön.

Keksinnön mukainen edullinen jäljittäjä on vasta-aine, johon on konjugoitu entsyymi. Siinä voidaan käyttää mitä tahansa sellaista entsyymiä, joka voidaan konjugoida vasta-aineeseen, ja jolle on olemassa värilliseksi tuotteeksi muutettavissa oleva substraatti. Sopivia entsyymejä ovat esimerkiksi syklaa-

sit, isomeraasit ja peroksidaasit. Edullinen peroksidaasi on piparjuuren peroksidaasi. Edullisia entsyymejä ovat hydrolaasit kuten peptidaasit, esteraasit, fosfataasit ja glykosidaasit. Kaikkein edullisimmat jäljittäjät käsittävät alkalisen fosfaatin tai karboksiesteraasin vasta-aineeseen konjugoituna. Entsyymien konjugoiminen vasta-aineisiin on hyvin tunnettua ja alan asiantuntijalle täysin selvää.

Vaihtoehtoisesti radioaktiivinen atomi, fluoresoiva väriaine tai entsyymi voidaan kapseloida liposomiin. Samoin täysin tavanomaista on leimojen kapseloiminen liposomeihin ja liposomien konjugoiminen vasta-aineisiin niiden käyttämiseksi jäljittäjinä immuunimäärityksessä.

Substraatin valinta riippuu luonnollisestikin jäljittäjän entsyymikomponentista, ja kullekin entsyymiluokalle tunnetaan monia erilaisia substraatteja. Edullisia substraatteja ovat ne, jotka muodostavat liukenemattomia saostumia kalvoille. Mikäli entsyymi on peroksidaasi, niin edullinen substraatti on diaminobentsidiini. Hydrolaasien edullisia substraatteja ovat indolyyl johdannaiset. Esimerkiksi, mikäli entsyymi on alkalinen fosfataasi, niin edullinen substraatti on 3-indolyylifosfaatti. Mikäli entsyymi on esteraasi, niin edullisia substraatteja ovat 3-indolyylasettaatti ja ja -butyraatti. Kaikki nämä substraatit ovat alalla hyvin tunnettuja.

Keksinnön mukaisen edullisen määritysmenetelmän mukaisesti inertillä proteiinilla pinnoitettua kalvoa, jonka pinnalle on vangittu virusantigeeni edellä kuvatulla tavalla, inkuboidaan jäljittäjää ja nestettä sisältävän liuoksen kanssa antigeenin ja jäljittäjään kuuluvan vasta-ainekomponentin immunologisen sitoutumisen indusoimiseksi. Kalvo, jonka pinnalla on antigeenistä ja vasta-aineesta muodostunut sitoutunut fraktio, voidaan tämän jälkeen erottaa määrityksessä käytetyn väliaineen nestefaasista millä tahansa sopivalla menetelmällä, edullisesti siten, että neste saatetaan virtaamaan kalvon läpi. Neste voidaan saada virtaamaan kalvon läpi painovoiman avulla tai virtaamista voidaan edistää kalvon alle sijoitetun absorbentti-

materiaalin indusoiman kapillaarivaikutuksen avulla. Sitten kalvo voidaan upottaa toiseen nesteeseen kuten veteen, suola-liuokseen tai puskuriin, johon entsyymisubstraatti on liuotettu. Sitoutuneessa fraktiossa läsnäoleva entsyymi muuttaa substraatin tuotteeksi, joka voidaan ilmaista sellaisen signaalin perusteella, johon signaaliin liittyy värireaktio. Täten ilmaistava signaali voi olla värin kehittyminen tai katoaminen tai värin vaihtuminen toiseksi väriksi tai muutos siinä nopeudessa, jolla substraatti muuttuu tuotteeksi, jolloin esimerkiksi substraatin värin voidaan havaita pysyvän muuttumattomana tietyn pituisen ajanjakson ajan. On edullista, että substraatti on väritöntä niin kauan, kunnes entsyymileima pilkkoo sen värikköiseksi tuotteeksi. Värin muodostumisen voimakkuus on verrannollinen antigeenin pitoisuuteen, joka voidaan selvittää määrittämällä nestenäytteitä, jotka sisältävät tunnettuja määriä antigeenia, ja vertaamalla värien voimakkuutta. Mittaaminen voidaan suorittaa joko laitteella tai edullisesti pelkän näköhavainnon perusteella.

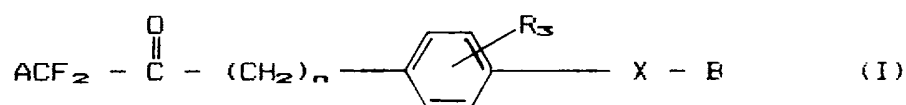
Keksinnön mukainen vaihtoehtoinen määritysmenetelmä on kaksinkertainen entsyymaattinen määritys, joka toteutetaan pinnoitetun kantajan, jolle on absorboitu antigeenia, pinnalla. Määritysmenetelmän tässä suoritusmuodossa leimana voidaan pitää ensimmäistä entsyymiä, joka poistaa suojaavan ryhmän suojatusta inhibiittorista. Sopivia ensimmäisiä entsyymejä ovat yleensä hydrolaasit kuten fosfataasit, peptidaasit, esteraasit, glykosidaasit ja muut vastaavat. Esimerkkeinä sopivista ensimmäisistä entsyymeistä voidaan mainita trypsiini, trombiini, nisäkään maksan esteraasi, asetyylikoliiniesteraasi, β -galaktosidaasi sekä edullisimmin alkalinen fosfataasi, näihin kuitenkin rajoittumatta.

Suojattu inhibiittori voi olla mitä tahansa sellaista materiaalia, jonka ensimmäinen entsyymi voi muuttaa toisen entsyymin inhibiittoriksi. Edullisessa suojatussa inhibiittorissa on kaksi komponenttia eli inhibiittori ja suojaava ryhmä, ja se ei reagoi toisen entsyymin kanssa ennenkuin ensimmäinen entsyymi on poistanut siinä olevan suojaavan ryhmän, jolloin inhi-

biittori vapautuu määrityksen väliaineeseen. Näin ollen suojatun inhibiittorin komponenttien valinta riippuu käytettävästä ensimmäisestä ja toisesta entsyymistä. Suojaavan ryhmän tulisi olla sellainen, joka voidaan konjugoida kovalenttisesti inhibiittoriin sidoksella, jonka ensimmäinen entsyymi kykenee katkaisemaan olennaisen selektiivisesti, ja inhibiittorikomponentin tulisi inhiboida toisen entsyymin aktiivisuutta siten, ettei se vaikuta olennaisesti ensimmäiseen entsyymiin. Täten seuraavassa tarkastellaan ensin toisen entsyymin ja sen substraatin luonnetta ennen suojatun inhibiittorin ja inhibiittorin kuvaamista.

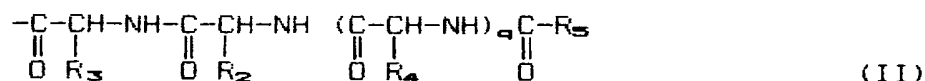
Tässä kaksinkertaisessa entsyymimäärityksessä käytettävä toinen entsyymi on yleensä hydrolaasi, joka muuttaa substraatin sellaisen signaalin perusteella ilmaistavaksi tuotteeksi, johon signaaliin liittyy värireaktio. On edullista, että tämä toinen entsyymi ei reagoi olennaisesti suojatun inhibiittorin kanssa. Sopivia hydrolaaseja ovat esimerkiksi fosfataasit, peptidaasit, kuten trypsiini, kymotrypsiini ja pepsiini, tai edullisesti esteraasit, kuten asetyylikoliiniesteraasi (AChE) ja butyylikoliiniesteraasi. Kaikkein edullisin toinen entsyymi on karboksiesteraasi, kuten sian tai kaniinin maksan esteraasi (KME), jolloin edullinen substraatti on indolyyliesteri.

Kuten edellä mainittiin, jäljittäjän ensimmäinen entsyymikomponentti pilkkoo suojaavan ryhmän irti suojatusta inhibiittorista, jolloin saadaan toisen entsyymin inhibiittori. Seuraava yleinen kaava (I) esittää sopivia inhibiittoreita ja suojattuja entsyymi-inhibiittoreita siten, että tässä kaavassa esiintyvän ja jäljempänä kuvattavan ryhmän B luonne määrää sen, onko tämä yhdiste inhibiittori tai suojattu inhibiittori:



Tässä kaavassa (I) R_1 voi olla H, 1-6 hiiliatomia käsittävä suora- tai haaraketjuinen alempi alkyyli, nitro, alkoksi, halogeeni tai muu vastaava; X voi olla O, S, tai NR_2 , jolloin R_2 voi olla H tai 1-6 hiiliatomia käsittävä alempi alkyyli; n

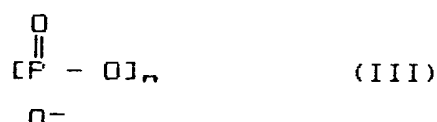
voi olla 1-6; A voi olla F tai CF_3 ; ja B voi olla H, fosforihappo tai suola, glykosyyliryhmä, aminohappojäännös kuten lyysiini- tai arginiini-jäännös, joka on sitoutunut kovalenttisesti ryhmään X aminohapon karboksyyli-ryhmän välityksellä, 2-4 hiiliatomia käsittävä asyyli-ryhmä kuten asetyyli- tai butyryyli-ryhmä tai peptidi, jolla on seuraava kaava II:



missä R_3 on $(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ $(\text{CH}_2)_3\text{NH}-\text{C} \begin{array}{l} \text{NH} \\ \text{NH}_2 \end{array}$ tai bentsyyli

R_4 voi olla H, 1-4 hiiliatomia käsittävä suora- tai haaraketjuinen alempi alkyyli tai hydroksi-alempi alkyyli, CH_2COOH tai $(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$; R_5 voi olla 1-4 hiiliatomia käsittävä suora- tai haaraketjuinen alempi alkyyli tai alempi alkoksi, fenyylili tai bentsyylioksi; ja q voi olla 0-10.

Mikäli B on H, niin kaava (I) esittää entsyymi-inhibiittoria. Mikäli B on mikä tahansa muu ryhmä kuin H, niin kaava (I) esittää suojattua entsyymi-inhibiittoria. Kun B on fosforihappo tai sen suola, niin ryhmän B on tällöin tarkoitus olla kaavan (III) mukainen:



missä P on sitoutunut ryhmään X ja n voi olla edellä esitetyn kuvauksen mukainen.

Kaavan (I) mukainen inhibiittori ja suojattu inhibiittori voidaan syntetoida millä tahansa sarjalla perinteisiä kemiallisia reaktioita, jotka ovat ilmeisiä alan asiantuntijalle. Sopivia ja tarkoituksenmukaisia menetelmiä on esitetty alla olevissa esimerkeissä. Seuraavan luettelon tarkoituksena on esittää vain eräitä esimerkkejä eräistä tehokkaista entsyymi-inhibiitoreista.

<u>Nimi</u>	<u>NMR-tulokset</u>	<u>KI (M)[^]</u> <u>(Esteraasi)</u>
1. 1,1,1-trifluori-3-(4-hydroksifenyyli)propanoni	(CDCl ₃) - 3,91 (s, 2H), 5,21 (bs, 1H) 6,90 (d, 2H), 7,10 (d, 2H)	2,0x10 ⁻⁶ KME
2. 1,1,1-trifluori-3-(3-hydroksifenyyli)-2-propanoni	(CDCl ₃) - 4,00 (s, 2H), 4,80 (bs, 1H) 6,80 (m, 3H), 7,30 (m, 1H)	>10 ⁻⁴ SME
3. 1,1,1-trifluori-4-(4-hydroksifenyyli)-2-butanoni	(CDCl ₃) - 2,95 (m, 4H), 4,90 (bs, 1H) 6,92 (dd, 4H) J=4,60Hz	2,0x10 ⁻⁸ KME
4. 1,1,1-trifluori-4-(3-hydroksifenyyli)-2-butanoni	(CDCl ₃) - 2,94 (t, 2H), 3,05 (t, 2H) 5,70 (bs, 1H), 6,80 (m, 3H), 7,15 (m, 1H)	1,0x10 ⁻⁷ KME
5. 1,1,1-trifluori-5-(4-hydroksifenyyli)-2-pentanoni	(CDCl ₃) - 1,91 (t, 2H), 2,59 (t, 2H) 2,68 (t, 2H), 5,23 (bs, 1H), 6,95 (d, 2H), 7,10 (d, 2H)	1,0x10 ⁻⁸ KME
6. 1,1,1-trifluori-5-(3-hydroksifenyyli)-2-pentanoni	(CDCl ₃) - 1,95 (p, 2H), 2,70 (t, 2H) 2,95 (t, 2H), 5,40 (bs, 1H) 6,70 (m, 3H), 7,30 (m, 1H)	1,7x10 ⁻⁷ KME
7. 1,1,1-trifluori-6-(4-hydroksifenyyli)-2-heksanoni	(CDCl ₃) - 1,63 (m, 4H), 2,59 (q, 2H) 2,70 (q, 2H), 5,55 (bs, 1H) 6,77 (d, 2H), 7,02 (d, 2H)	2,0x10 ⁻⁸ KME
8. 1,1,1,2,2-pentafluori-5-(4-hydroksifenyyli)-3-pentanoni	(CDCl ₃) - 2,94 (m, 2H), 3,04 (m, 2H) 4,75 (bs, 1H), 6,90 (d, 2H), 7,10 (m, 2H)	8,0x10 ⁻⁷ KME

[^]SME sian maksan esteraasi (E.C. 3.1.1.1)

KME kaniinin maksan esteraasi (E.C. 3.1.1.1.)

Keksinnön muu piirre kohdistuu reagenssipakkaukseen eli pakattuihin materiaaleihin ligandimäärityksen toteuttamiseksi keksinnön kohteena olevaa menetelmää noudattaen. Tämä reagenssipakkaus voi sisältää inertillä proteiinilla pinnoitetun kiinteän kantajan, joka on edullisesti kalvo, antiligandin, antiligandiin konjugoidun entsyymin sekä entsyymin substraatin. Reagenssipakkaus voi myös sisältää toisen entsyymin sekä tämän toisen entsyymin suojatun inhibiittorin, ligandistandardit, esimerkiksi yhden tai useamman pitoisuudeltaan tunnetun ligan-

dinäytteen, tai se voi käsittää muita reagensseja, entsyymi-substraatteja tai muita leimattuja tai leimaamattomia spesifisiä ligandeja, antiligandeja tai niiden komplekseja, joita voidaan käyttää määrityksen toteuttamiseen. Se voi sisältää liuoksia kuten suolaliuosta tai puskureita. Tämän reagenssipakkauksen komponentit voidaan koota koteloon, edullisesti muovikoteloon, joka sisältää kalvon alle sijoitettua materiaalia, esimerkiksi imupaperia, helpottamaan määritysnesteiden virtaamista kalvojen läpi kapillaarivaikutuksen seurauksena.

Rutiininomaisesti käytetyt analyysitekniikat olivat seuraavat: Pikakromatografia silikageeliä käyttäen toteutettiin ICN-silikageelillä (koko 32-63 mesh) noin 0,2-0,5 baarin paineessa. Analyyttinen ohutkerroskromatografia (TLC) toteutettiin alumiinitaustaisilla silikageelilevyillä, joiden koko oli 0,25 mm 5x20 cm, ja jotka oli saatu yhtiöstä EM Scientific. Preparaatiivinen ohutkerroskromatografia toteutettiin lasitaustaisilla silikageelilevyillä, joiden koko oli 2,0 mm x 20 cm x 20 cm, ja jotka oli saatu yhtiöstä EM Scientific. Sulamispisteet määritettiin Thomas Hoover-merkkisellä, kapillaariin perustuvalla sulamispisteen määrityslaitteella, ja sulamispisteet ovat korjaamattomassa muodossa. NMR-spektrit saatiin IBM WP-200SY-spektrofotometrillä ja kemialliset siirtymät on ilmoitettu yksikössä ppm trimetyylisilaaniin verrattuna. Suuripaineinen nestekromatografinen (HPLC) määritys toteutettiin Waters 510-merkkisellä, kaksi pumppua käsittävällä järjestelmällä käyttäen UV-ilmaisinta, jompaa kumpaa kahdesta liuotinjärjestelmästä sekä Brownlee AX-300-kolonnia, jonka mitat olivat 7 x 250 mm. Liuotinjärjestelmä A: aluksi 5 minuutin ajan 30 mM NH_4OAc , pH 6,5, mitä seurasi lineaarinen gradientti arvoon 2,0 M NH_4OAc 30 minuutin aikana, minkä jälkeen pitoisuus pidettiin arvossa 1,0 M NH_4OAc 5 minuutin ajan. Järjestelmässä B käytettiin isokraattista puskurijärjestelmää, joka oli 30 mM NH_4OAc , pH 6,5, 40 minuutin ajan. Virtausnopeudet olivat 1,0 ml/minuutti. Kaasukromatografia (GC) toteutettiin HP 5840A-kaasukromatografilla, joka oli varustettu liekki-ionisaatioon perustuvalla ilmaisimella (FID) sekä automaattisella injektorilla, ja siinä käytettiin kolonnina yhtiöstä J&W Scientific, Inc. hankittua 30

M DB-1 Megabore-kolonnia. GC-olosuhteet olivat seuraavat: lämpötila pidettiin 3 minuutin ajan arvossa 100 °C, minkä jälkeen sitä nostettiin nopeudella 10 °C/minuutti arvoon 250 °C ja pidettiin sitten 250 °C:ssa 3,0 minuuttia, virtausnopeuden ollessa 16,0 ml/min.

Inhibitiovakiot mitattiin 50 mM Tris-puskurissa, pH 8,0. Entsyymiä ja inhibiittoria inkuboitiin ympäristön lämpötilassa 20 minuuttia. Sitten lisättiin entsyymin substraatti ja hydrolyysin nopeutta seurattiin spektrofotometrisesti. SME:n ja KME:n substraatti oli o-nitrofenyylibutyraatti ja AChE:n substraatti oli asetyyliitiokoliini ja Ellman'in reagensi.

Seuraavien esimerkkien tarkoituksena on havainnollistaa edelleen keksintöä sitä kuitenkaan millään tavalla rajoittamatta.

Esimerkki I

Diammonium[4-(3-okso-4,4,4-trifluoributyryyli)fenyyli]fosfaatti

A. Etyyli-2-(4-metoksibentsyyli)-3-okso-4,4,4-trifluoributanonaatin valmistus

Nelikaulaiseen, pyöreäpohjaiseen pulloon, jonka tilavuus oli 1 litra, ja joka oli varustettu palautusjäähdyttäjällä, tiputussuppilolla, argonin sisäänmenolla sekä magneettisekoittajalla, laitettiin 7,17 g (0,149 mol) natriumhydridin 50 % (w/v) öljydispersiota ja 300 ml kuivaa etyylietetteriä. Tähän liuokseen, jota sekoitettiin, lisättiin hitaasti absoluuttista etanolia (9,0 ml). Sen jälkeen, kun vedyn kehittyminen oli päätynyt, seokseen lisättiin 1 tunnin aikana seos, joka sisälsi 25 g (0,136 mol) etyyli-4,4,4-trifluoriasetoasetaattia ja 21,3 g (0,136 mol) 4-metoksibentsyylikloridia. Tuloksena ollut seosta palautusjäähdytettiin yön yli, se jäähdytettiin, uutettiin vedellä, 1 N kloorivetyhapolla, kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaatilla ja haihdutettiin pyöröhaihduttajalla alennetussa paineessa. Raaka reaktioseos (33,5 g) käsiteltiin kromatografisesti silikageelikolonniilla, jonka mitat olivat 60 mm x 300 mm, käyttäen eluenttina etyyliasetaatin ja heksaanin 25:75 seosta. Samankaltaiset fraktiot yhdistettiin, jolloin

tuotteena saatiin 9,4 g (23 %) (spektroskooppisesti kompleksista) öljyä.

NMR (CDCl₃): 1,26(m,3H), 3,77(s,3H), 4,12(m,2H), 7,08(m,2H).

B. 1,1,1-trifluori-4-(4-hydroksifenyyli)-butan-2-onin valmistus
100 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon, joka oli varustettu palautusjäähdyttäjällä, magneettisekoittajalla ja argonin sisäänmenolla, laitettiin 2,05 g (6,7 mmol) etyyli-2-(4-metoksibentsoyyli)-3-okso-4,4,4-trifluoributanoaattia (I), 20 ml 31 % (w/v) bromivetyä etikkahapossa sekä 10 ml vettä. Tätä seosta kuumentettiin yön yli 120 °C:n lämpötilassa, se jäähdytettiin, väkevöitiin alennetussa paineessa ja ositettiin dikloorimetaaniin ja veteen. Orgaaninen kerros uutettiin peräkkäin bisulfiitin vesiliuoksella ja kylläisellä natriumbikarbonaatilla, minkä jälkeen se kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaattilla. Liuotin poistettiin alennetussa paineessa. Raaka reaktioseos käsiteltiin kromatografisesti silikageelikolonnilla, jonka mitat olivat 50 mm x 300 mm, käyttäen eluenttina etyyliasetaatia ja heksaanin 50:50-seosta. Samankaltaiset fraktiot yhdistettiin ja liuotin poistettiin alennetussa paineessa, jolloin tuotteena saatiin 600 mg (41 %) kirkasta öljyä. NMR (CDCl₃): 2,95(m,4H), 5,40(bs, 1H), 6,93(dd,4H) J = 4,40 Hz.

C. Dietyyli[4-(3-okso-4,4,4-trifluoributyyli)fenyyli]fosfaatin valmistus

10 ml:n pyöreäpohjaiseen pulloon, joka oli varustettu argonin sisäänmenolla ja magneettisekoittajalla, laitettiin 400 mg (1,8 mmol) 1,1,1-trifluori-4-(4-hydroksifenyyli)-butan-2-onia, 400 mg (2,3 mmol) dietyylikloorifosfaattia, 0,15 ml kuivaa pyridiiniä ja 5 ml dikloorimetaania. Reaktioseosta sekoitettiin yön yli ympäristön lämpötilassa, se suodatettiin pyridiniumhydrokloridin poistamiseksi, uutettiin 0,2 N kloorivetyhapolla, uutettiin vedellä ja kuivattiin vedettömällä magnesiumsulfaattilla. Liuotin poistettiin alennetussa paineessa, jolloin raakatuotteena saatiin 600 mg ruskeata öljyä. 200 mg (31 %) kirkasta öljyä eristettiin preparatiiviselta TLC-levyltä, joka oli kehitetty etyyliasetaatia ja heksaanin 50:50-seoksella. NMR (CDCl₃): 1,50(m,6H), 3,0(m,4H), 4,20(m,4H), 7,15(s,4H).

D. Diammonium[4-(3-okso-4,4,4-trifluoributyryli)fenyyli]fosfaatin valmistus

25 ml:n yksikaulaiseen, pyöreäpohjaiseen pulloon, joka oli varustettu argonin sisäänmenolla ja magneettisekoittajalla, laitettiin 5,0 ml dikloorimetaania, 140 mg (0,40 mmol) dietyyli[4-(3-okso-4,4,4-trifluoributyryli)fenyyli]fosfaattia (III) ja 2,0 ml bromitrimetyylisilaania. Sen jälkeen, kun tätä seosta oli sekoitettu 3 tuntia ympäristön lämpötilassa, siihen lisättiin 10 ml metanolia ja haihtuvat materiaalit poistettiin alennetussa paineessa. Jäännös liuotettiin veteen ja pH asetettiin arvoon 7,0 käyttäen 1,0 N natriumhydroksidia. Vesiliuos uutettiin dietyylieetterillä ja lyofilisoitiin, jolloin saatiin 190 mg valkoista kiintoainetta. Tämä materiaali liuotettiin 10 ml:aan vettä ja se puhdistettiin anioninvaihtoon perustavalla HPLC-menetelmällä. Gradienttiosuhteet: eluenttina käytettiin aluksi 5 minuutin ajan 20 mM ammoniumasetaattia, pH 6,5, mitä seurasi ammoniumasetaatin pitoisuuden nostaminen lineaarisesti arvoon 1,0 M 20 minuutin pituisen ajanjakson aikana, minkä jälkeen eluenttina käytettiin 15 minuutin ajan 1,0 M ammoniumasetaattia. Virtausnopeus oli 2,5 ml/min, jolloin tuote eluoitui noin 32 minuutin kuluttua. Kolonnin kapasiteetti oli 20 mg. Useista HPLC-ajoista saadut tuotefraktiot yhdistettiin ja lyofilisoitiin, jolloin tuotetta saatiin 50 mg (37 %). Sp. 235–240 °C.

NMR (D₂O): 1,90(m,2H), 2,56(m,2H), 4,65(s,DOH), 6,88(dd,4H)
J = 6,82 Hz.

Esimerkki II

Hengityselinten solusitkosviruksen (RSV) määrittäminen

Ensin koottiin kalvosuodatuskerroste, jonka rakenne oli seuraava:

Ylin kerros: 3 mikronin Immunodyne-immuunifaffiniteetti-kalvo (Pall, East Hills, New York, no. BIA0030HC5). Pinnoitettu edeltäkäs in upotamalla fosfaatilla puskuroituun ja 0,3 % kaseiinia sisältävään suolaliuokseen 30 minuutiksi ympäristön lämpötilassa.

Seuraava kerros: raionia oleva huovikekerros (Schleicher ja Schuell, Keene, New Hampshire; no. 5-S).

Alin kerros: kaksi imukykyistä selluloosatyyynyä (Filtration Sciences, Mount Holly Springs, Pennsylvania; no. ED 320-200).

Kalvokerrokset suljettiin muovipidikkeen sisään, joka pidike käsittää ylimmän kerroksen yläpuolelle muodostetun vastaanotto-syvennöksen. Tähän syvennökseen sijoitettiin virtausta rajoittava upoke, jossa oleva aukko oli kapeampi kuin vastaanotto-syvennös, ja joka sijaitsee ylitä kalvoa vasten, sen kanssa samassa tasossa.

Antigeeninäyte valmistettiin hengityselinten solusitkosviruksella (RSV; Long-kanta) infektoiduista HEp-2-soluista, joiden laimentamiseen käytetty puskuri sisälsi: 250 mM tris(hydroksimetyyli)aminometaani-hydrokloridia (Tris-HCl), 150 mM natriumkloridia (NaCl), 10 mM etyleenidiamiinitetra-asetaattia (EDTA), 4 % (v/v) polyoksietyleenisorbitaani-monolauraattia (Tween 20), 1 % n-asetyylikysteiiniä ja 0,2 % natriumatsidia (NaN_3), pH 8,5. Vertailuantigeeni valmistettiin samalla tavalla käyttäen infektoitumattomia HEp-2-soluja.

150 µl tätä antigeeninäytettä (tai vertailua) laitettiin kuvattuun laitteeseen ja sen annettiin valua virtausta rajoittavan upokkeen läpi ja edelleen ylimmän kalvokerroksen päälle. (Kannattavien adsorbenttikerrosten kapillaarivaikutus vetää nesteen ylimmän kalvon läpi.) Tämän jälkeen virtausta rajoittava upoke poistettiin ja laitteeseen lisättiin 150 µl pesuliuosta, jonka koostumus oli 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2 % NaN_3 , pH 7,2 [Tris-puskuroitu suolaliuos (TBS)], joka sisälsi lisäksi kaniinin IgG:tä pitoisuutena 1 mg/ml.

Liuos, joka sisälsi 27 µg/ml alkaliseen fosfataasiin konjugoitua anti-RSV-vasta-ainetta, valmistettiin puskuriin, joka sisälsi 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 200 mM natriumfosfaattia, 1 % kaseiinia, 1 mM magnesiumkloridia, 0,1 mM sinkkikloridia

ja 1 mM 2-merkaptoetanolia, pH 7,5. 150 µl:n erä tätä seosta lisättiin laitteeseen ja sen annettiin imeytyä kalvokerrosteeseen. Lyhyen (kaksi minuuttia kestäneen) inkuboinnin jälkeen laite pestiin 300 µl:lla TBS-liuosta (joka ei sisältänyt IgG:tä).

Laitteeseen lisättiin 150 µl liuosta, joka sisälsi 0,33 mg/ml nitrosinitetratsoliumia, 1 % metanolia ja 0,2 % yhdistettä NaN_3 . Sen jälkeen lisättiin 150 µl liuosta, joka sisälsi 12 mM levamisolia, 50 mM 2-amino-2-metyyli-1-propanoliasetaattia (AMP HOAc), 0,2 % NaN_3 , 19 mM magnesiumkloridia, pH 9,8. Huoneen lämpötilassa viisi minuuttia kestäneen inkuboinnin jälkeen värinmuodostusreaktio pysäytettiin lisäämällä 150 µl liuosta, joka sisälsi 200 mM kaliumfosfaattia, 10 mM EDTA, 0,2 % NaN_3 , pH 7,2.

Tuloksena saadun kalvon värin voimakkuus mitattiin heijastuskykyyn perustuvalla densitometrillä (Gretag, Seattle, Washington, malli 183). Antigeenin laimennossarjalla toteutetun kokeen tulokset on esitetty kuviossa 1.

Esimerkki III

Tyyppiä A olevan influenssaviruksen määrittäminen

Influenssaviruksen määrittäminen toteutettiin esimerkissä II kuvatulla tavalla, lukuunottamatta seuraavia poikkeuksia:

- 1) Antigeeninäyte valmistettiin influenssa A-viruksella (WSN-kanta) infektoiduista Madin-Darby-koiran munuaissoluista (MDCK-soluista).
- 2) Ylimmän kerroksen kalvo oli Immunodyne-kalvon sijasta 3 mikronin Biodyne C-kalvo (Pall, East Hills, New York; no. BNPCH5).
- 3) Puskuroitu antigeeninäyte valmistettiin käyttäen Tris-hydrokloridin sijasta Tris-asetaattia, joka ei sisältänyt natriumkloridia, ja joka sisälsi lisäksi 1 mM etyleeni-bis(oksietyleeninitriilo)tetraetikkahappoa (EGTA).

- 4) Konjugaattilaimennin sisälsi 100 mM eikä 50 mM yhdistettä Tris ja 150 mM eikä 100 mM natriumkloridia.
- 5) Levamisolin pitoisuus oli 16 mM eikä 12 mM.

Antigeenin laimennossarjalla toteutetusta kokeesta saadut tulokset on esitetty kuviossa 2.

Esimerkki IV

Herpes simplex-viruksen (HSV) määrittäminen

Herpes simplex-viruksen (tyyppi I ja II) määrittäminen toteutettiin esimerkissä II kuvatulla tavalla, lukuunottamatta seuraavia poikkeuksia:

- 1) Antigeeninäyte valmistettiin tyyppiä II olevalla HS-viruksella infektoiduista Vero-soluista.

Antigeenin laimennossarjalla toteutetusta kokeesta saadut tulokset on esitetty kuviossa 3.

Esimerkki V

Kaksinkertainen entsymaattinen kaskadimääritys hengityselinten solusitkosviruksen (RSV) määrittämiseksi

Kaksinkertainen entsymaattinen kaskadimääritys RSV:tä varten toteutetaan esimerkissä II kuvatulla tavalla lukuunottamatta seuraavia poikkeuksia:

- 1) Kaniinin maksan karboksiesteraasi pinnoitetaan Immunodyne-immuuniaffiniteettikalvon pinnalle. Sitten kalvo suojataan kaseiinilla edellä kuvatulla tavalla.
- 2) Kalvolle laitetaan alkaliseen fosfataasiin konjugoitua vasta-ainetta ja se pestiin, minkä jälkeen laitteeseen laitetaan liuos, joka sisältää 0,15 mM suojattua inhibiittoria [4-(3-okso-4,4,4-trifluoributyyli)fenyylifosfaatti] 50 mM dietanoliamiinissa, pH 9,0. Tätä liuosta inkuboidaan ympäristön lämpötilassa 20 minuuttia. Sitten laitteeseen lisätään kromogeeninen liuos, joka sisältää 0,5 mM 3-indolyyli-

butyraattia (Research Organics, Cleveland, Ohio) TBS-liuoksessa. Värin kehittyminen pysäytetään sopivan ajanjakson kuluttua lisäämällä 1 mM 1,1,1-trifluoriasetofenonia (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin). Värin tiheys mitataan heijastuskykyyn perustuvalla densitometrillä aikaisemmissa esimerkeissä kuvatulla tavalla.

Tuntemattoman näytteen värin tiheyttä verrataan infektoimattomaan vertailuun. Mikäli tuntematon näyte vaikuttaa merkittävästi vaaleammalta kuin vertailu (heijastuskykyyn perustuva tiheys alle puolet vertailun tiheydestä), niin tällöin tulos katsotaan positiiviseksi, eli sen katsotaan osoittavan virusmateriaalin läsnäolon.

Näin ollen keksinnössä saadaan aikaan virusantigeenin määrittämis menetelmä, jossa ei käytetä antigeenin spesifisesti vangitsevaa vasta-ainetta. Sen sijaan kiinteä kantaja pinnoitetaan ensin inertillä proteiinilla ja antigeeni vangitaan suoraan pinnoitetun kantajan päälle. Edelleen, vaikka tätä inerttiä proteiinia käytetäänkin esipinnoitteena ennen antigeenin vangitsemista, niin se estää kuitenkin olennaisen täydellisesti muiden proteiinien, kuten jäljittäjän, epäspesifisen sitoutumisen, joka muussa tapauksessa pienentäisi määrityksen herkkyyttä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä virusantigeenin määrittämiseksi nesteestä, **tunnettu** siitä, että

- a) ensimmäinen neste, jonka oletetaan sisältävän virusantigeenia, saatetaan kosketukseen inertillä proteiinilla mutta ei spesifisellä vangitsevalla antiligandilla pinnoitetun kalvon ja entsyymiä sisältävän jäljittäjän kanssa, jolloin mainittu virusantigeeni kiinnittyy mainittuun pinnoitettuun kalvoon ja sitoutuu mainittuun jäljittäjään, jolloin saatava sitoutunut fraktio sisältää mainitun entsyymin mainitun kalvon pinnalla;
- b) mainittu kalvo erotetaan ensimmäisestä nesteestä siten, että ensimmäinen neste johdetaan kalvon läpi;
- c) mainitun entsyymin substraattia sisältävää toista nestettä johdetaan kalvon läpi, jolloin kalvon pinnalla oleva entsyymi muuntaa substraatin värilliseksi tuotteeksi; ja
- d) mainittu virusantigeeni ilmaistaan mainitun tuotteen väriin liittyvän signaalin perusteella.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu inertti proteiini valitaan kaseiinin ja albumiinin joukosta.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu jäljittäjä käsittää lisäksi mainitulle antigeenille spesifisen vasta-aineen, johon mainittu entsyymi on konjugoitu.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu jäljittäjä käsittää lisäksi mainitulle antigeenille spesifisen vasta-aineen sekä tähän vasta-aineeseen konjugoidun liposomin, jonka sisään mainittu entsyymi on kapseloitu.

5. Menetelmä antigeenin määrittämiseksi nesteestä, **tunnettu** siitä, että

- a) neste, jonka oletetaan sisältävän virusantigeenia, saatetaan kosketukseen inertillä proteiinilla mutta ei spesifisellä vangitsevalla antiligandilla pinnoitetun kiinteän kantajan ja leiman käsittävän jäljittäjän kanssa, jolloin mainittu virusantigeeni kiinnittyy mainittuun pinnoitettuun kantajaan ja sitoutuu mainittuun jäljittäjään, jolloin saatava sitoutunut fraktio sisältää mainitun leiman mainitun kantajan pinnalla;
- b) mainittu kantaja erotetaan mainitusta nesteestä; ja
- c) mainitun kantajan pinnalla oleva leima ilmaistaan, mikä perusteella voidaan päätellä, että mainittua virusantigeenia on läsnä mainituksa nesteessä.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu leima valitaan radioaktiivisen atomin ja fluoresoivan väriaineen joukosta, joka radioaktiivinen atomi ilmaistaan siitä saatavina radioaktiivisuusimpulsseina, ja joka fluoresoiva väriaine ilmaistaan kohdistamalla mainittuun väriaineeseen virittävää valoa ja määrittämällä sen lähettämä fluoresenssisäteily.

7. Menetelmä virusantigeenin määrittämiseksi nesteestä, **tunnettu** siitä, että

- a) ensimmäinen neste, jonka oletetaan sisältävän virusantigeenia, saatetaan kosketukseen inertillä proteiinilla mutta ei spesifisellä vangitsevalla antiligandilla pinnoitetun kalvon ja mainitulle antigeenille spesifisen vasta-aineen kanssa, johon vasta-aineeseen on konjugoitu ensimmäinen hydrolaasi, jolloin mainittu virusantigeeni kiinnittyy mainittuun pinnoitettuun kalvoon ja sitoutuu mainittuun vasta-aineeseen, jolloin saatava sitoutunut fraktio sisältää mainitun hydrolaasin mainitun kalvon pinnalla;
- b) mainittu kalvo erotetaan ensimmäisestä nesteestä siten, että ensimmäinen neste johdetaan kalvon läpi;
- c) mainittu pinnoitettu kalvo saatetaan kosketukseen toisen nesteen kanssa, joka neste sisältää suojattua inhibiittoria, mainitun suojatun inhibiittorin kanssa olen-

naisesti epäreaktiivista toista hydrolaasia sekä mainitun toisen hydrolaasin substraattia, jolloin kantajan pinnalla oleva ensimmäinen hydrolaasi muuttaa suojatun inhibiittorin inhibiittoriksi, joka estää mainitun substraatin muuttumisen värilliseksi tuotteeksi toisen hydrolaasin vaikutuksesta; ja

- d) mainittu virusantigeeni ilmaistaan mainitun tuotteen väriin liittyvän signaalin perusteella.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu suojattu inhibiittori on suojattu fluori-ketoni.

9. Materiaalipakkaus virusantigeenin määrittämiseksi patenttivaatimuksen 1 mukaisella menetelmällä, **tunnettu** siitä, että se käsittää inertillä proteiinilla mutta ei spesifisellä vangitsevalla vasta-aineella pinnoitetun kalvon, vasta-aineen, johon on konjugoitu entsyymi, mainitun entsyymin substraatin sekä kotelon, joka sisältää mainitun kalvon vierreeseen sijoitettua imukykyistä materiaalia.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen materiaalipakkaus, **tunnettu** siitä, että se käsittää vähintään yhtä muuta reagenssia, joka valitaan entsyymin, entsyymisubstraatin, suojatun inhibiittorin, puskurin ja suolaliuoksen joukosta.

Patentkrav

1. Förfarande för bestämning av virusantigen i en vätska, **kännetecknat** av att

- a) en första vätska, som antas innehålla virusantigen, sätts i beröring med ett membran beklätt med inert protein men inte en specifik kapterande antiligand och ett spårmedel innehållande enzym, varvid nämnda virusantigen fästes vid nämnda beklädda membran och binds vid nämnda spårmedel, varvid den erhållna bundna fraktionen innehåller nämnda enzym på ytan av nämnda membran;
- b) nämnda membran avskiljs från den första vätskan så att den första vätskan leds genom membranet;

- c) en andra vätska innehållande substrat av nämnda enzym leds genom membranet, varvid enzymet på membranets yta omvandlar substratet till en färgad produkt; och
- d) nämnda virusantigen detekteras på basen av en signal i anslutning till nämnda produkts färg.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att nämnda inerta protein väljs bland kasein och albumin.

3. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att nämnda spårmedel vidare omfattar en specifik antikropp mot nämnda antigen, med vilken nämnda enzym konjugerats.

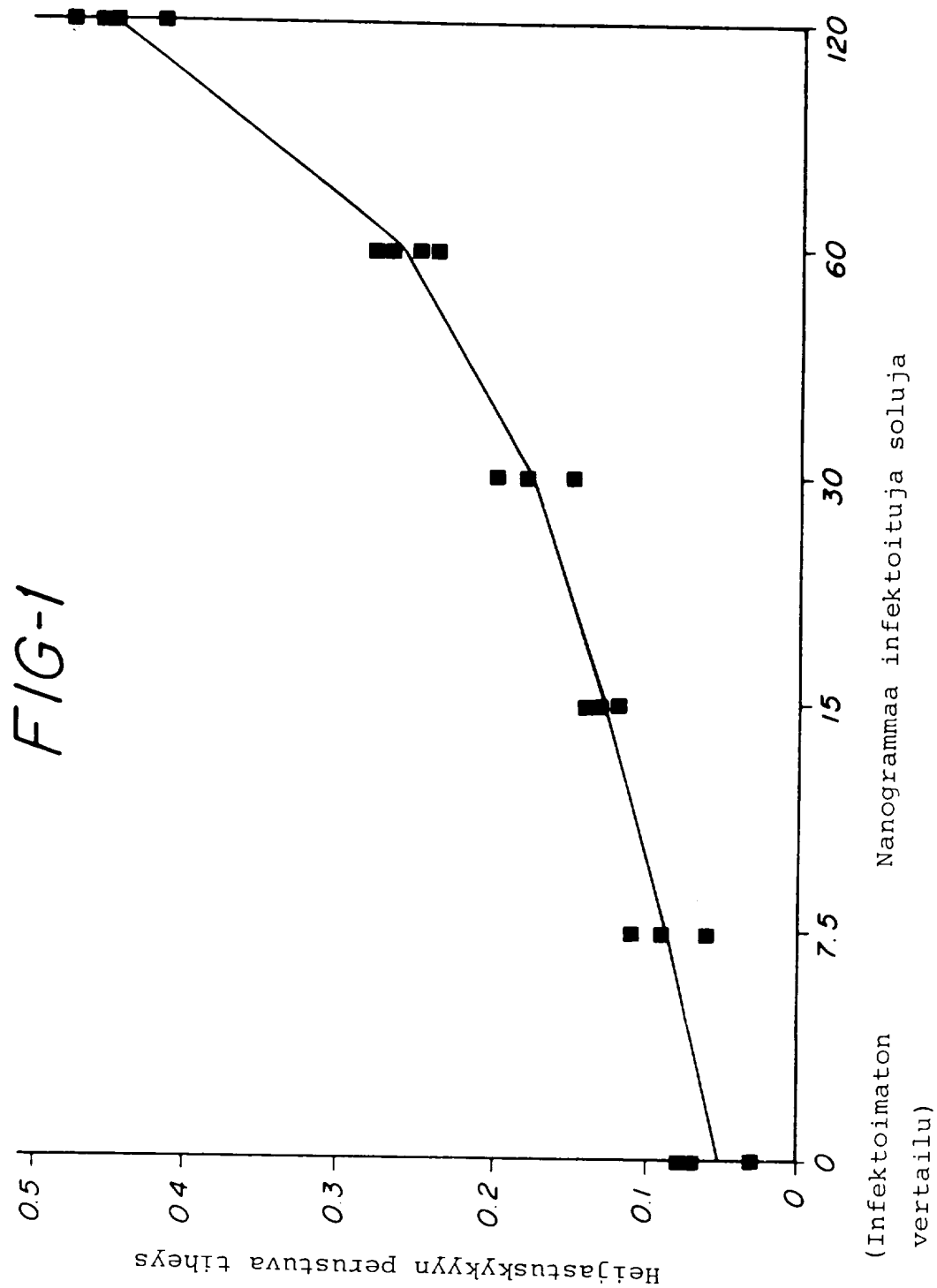
4. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att nämnda spårmedel vidare omfattar en specifik antikropp mot nämnda antigen samt en liposom konjugerad med denna antikropp, i vilken nämnda enzym inkapslats.

5. Förfarande för bestämning av en antigen, **kännetecknat** av att

- a) vätskan som antas innehålla virusantigen sätts i beröring med en fast bärare beklädd med inert protein men inte med en specifik kapterande antiligand och ett spårmedel omfattande en markör, varvid nämnda virusantigen fästes vid nämnda beklädda bärare och binds vid nämnda spårmedel, varvid den erhållna bundna fraktionen innehåller nämnda markör på ytan av nämnda bärare;
- b) nämnda bärare avskiljs från nämnda vätska; och
- c) markören på ytan av nämnda bärare detekteras, och på basen av detta kan man dra slutsatsen att nämnda virusantigen är närvarande i nämnda vätska.

6. Förfarande enligt patentkrav 5, **kännetecknat** av att nämnda markör väljs bland en radioaktiv atom och ett fluorescerande färgmedel, och den radioaktiva atomen detekteras som radioaktivitetsimpulser som erhålls ur den, och det fluorescerande färgmedlet detekteras genom att utsätta nämnda färgmedel för exciterande ljus och genom att bestämma den fluorescensstrålning den avger.

7. Förfarande för att bestämma en virusantigen i en vätska, **kännetecknat** av att
- a) en första vätska, som antas innehålla virusantigen, sätts i beröring med ett membran beklätt med inert protein men inte med specifikt kapterande antikropp och en specifik antikropp mot nämnda antigen, varvid en första hydrolas konjugerats med antikroppen, varvid nämnda virusantigen fästes vid nämnda beklädda membran och binds vid nämnda antikropp, varvid den erhållna bundna fraktionen innehåller nämnda hydrolas på ytan av nämnda membran;
 - b) nämnda membran avskiljs från den första vätskan så att den första vätskan leds genom membranet;
 - c) nämnda beklädda membran sätts i beröring med en andra vätska, som innehåller en skyddad inhibitor, en andra hydrolas som är väsentligt icke-reaktiv med nämnda skyddade inhibitor samt substrat av nämnda andra hydrolas, varvid den första hydrolasen på bärarens yta ändrar den skyddade inhibitorn till en inhibitor som hindrar nämnda substrat från att ändras till en färgad produkt under inverkan av den andra hydrolasen; och
 - d) nämnda virusantigen detekteras på basen av en signal i anslutning till nämnda produkts färg.
8. Förfarande enligt patentkrav 7, **kännetecknat** av att nämnda skyddade inhibitor är en skyddad fluorketon.
9. Materialförpackning för att bestämma virusantigen med förfarandet enligt patentkrav 1, **kännetecknad** av att den omfattar ett membran beklätt med inert protein men inte med specifikt kapterande antikropp, en antikropp med vilken enzymet konjugerats, substrat av nämnda enzym samt en kapsel som innehåller absorberande material placerat invid nämnda membran.
10. Materialförpackning enligt patentkrav 9, **kännetecknad** av att den omfattar minst en annan reagens, som väljs bland enzymer, enzymsubstrat, skyddad inhibitor, buffer och saltlösning.



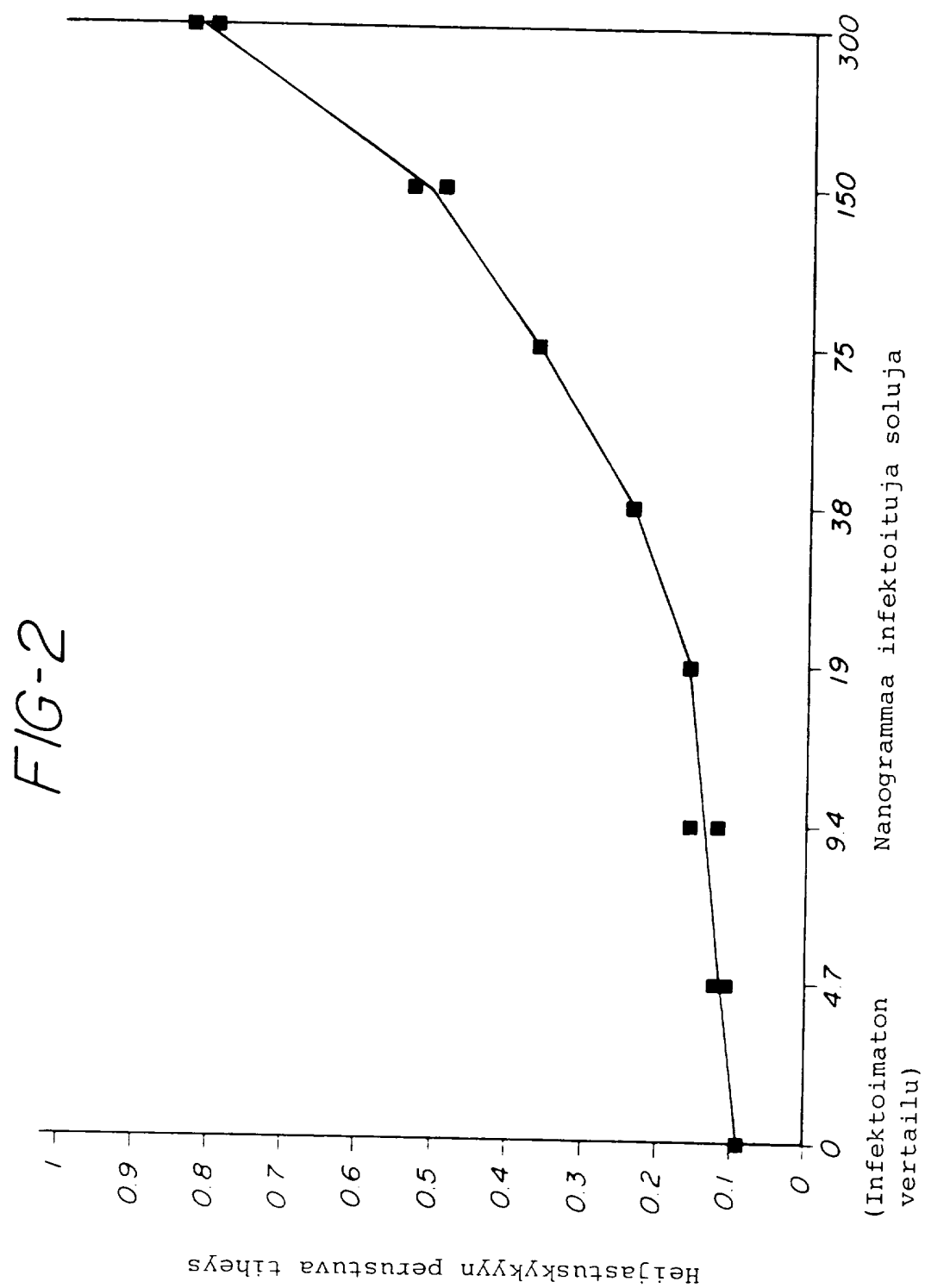


FIG-3

