



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

89503

(5) (6) 1. 8. 1986 julkaisuvuorokauden alku
Patentti julkaisut 11.10.1986

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 08F 257/02, 291/00, C 07K 17/08, G 01N 33/545
// (C 08F 257/02, 220:58)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	871664
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	15.04.87
(24) Alkupäivä - Löpdag	15.04.87
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	19.10.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	30.06.93
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
18.04.86 DE 3613111 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Behringwerke Aktiengesellschaft, 3550 Marburg, BRD, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Kapmeyer, Wolfgang, Reinhardswaldstrasse 5, 3550 Marburg, BRD, (DE)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

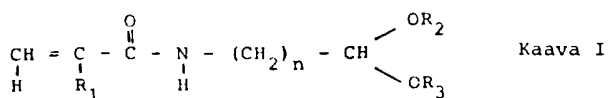
Ydin-kuori-dispersiopolymeerejä, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö
Kärn-skal-dispersionspolymerer, förfarande för deras framställning och deras användning

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

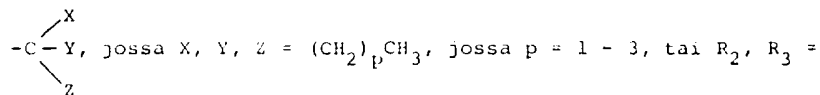
FI A 865184 (C 08F 257/02), FI C 72127 (C 08F 257/02), GB B 1469358 (C 07G 7/02)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee dispersiopolymeerejä, menetelmää niiden valmistamiseksi ja niiden käyttöä, jotka dispersiopolymeerit valmistetaan siemenpolymeraatiomenetelmällä siemenlateksin, jonka jäännösmonomeeripitoisuus on suuri, sekä monomeeriseoksen läsnäollessa, joka seos sisältää ainakin yhtä yhdistettä, jolla on kaava I,



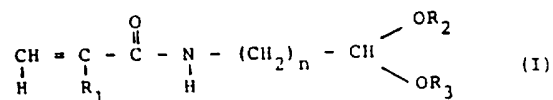
jossa $n = 1 - 6$; $R_1 = \text{H}$ tai CH_3 ja R_2 ja R_3 ovat samanlaisia tai erilaisia ryhmiä, jolloin $R_2, R_3 = -(\text{CH}_2)_m - \text{CH}_3$, jossa $m = 0 - 7$, tai



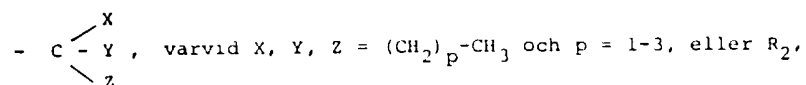
aryyliryhmä, ja mahdollisesti akryylihappoa, metakryylihappoa, krotonihappoa ja monomeerejä, joista siemenlateksi on valmistettu. Keksintö koskee lisäksi näitä dispersiopolymeerejä käyttämällä saatavia biologisesti aktiivisia lateksikonjugaatteja, jotka soveltuvat erityisesti serologisiin ja immunologisiin määrittämenetelmiin.

89503

Uppfinningen avser dispersionspolymerer, ett förfarande för framställning av desamma och deras användning, varvid dispersionspolymererna erhålls genom ett ymppolymerisationsförfarande i närvaro av ymplatexar med hög restmonomerhalt och en monomerblandning av åtminstone en förening med formeln I,



vari $n = 1-6$, $R_1 = H, CH_3$ och R_2 och R_3 är lika eller olika och $R_2, R_3 = -(CH_2)_m-CH_3$, vari $m = 0-7$, eller



R_3 = en arylrest, och eventuellt akrylsyra, metakrylsyra, krotonsyra och monomerer, av vilka ymplatexten framställts.

Uppfinningen avser ytterligare de under användning av disper-
sionspolymererna erhållna, biologiskt aktiva latexkonjugaten,
vilka speciellt lämpar sig för serologiska och immunologiska be-
stämningsförfaranden.

Ydin-kuori-dispersiopolymeerejä, menetelmä niiden valmistamiseksi ja niiden käyttö

5 Tämä keksintö koskee ydin-kuori-dispersiopolymeerejä, menetelmää niiden valmistamiseksi ja niiden käyttöä, jotka dispersiopolymeerit koostuvat lateksihiukkasista, jotka valmistetaan siemenpolymerointimenetelmällä sillä tavalla, että käytettävä siemenpolymeraatti sisältää vielä polymeroitumattomia monomeereja osuutena 5 - 50
10 paino-% ja siemenpolymerointi tehdään käyttämällä monomeerejä, joista vähintään yksi on asetaaliryhmiä sisältävä yhdiste.

Niistä saadaan biologisesti aktiivisia dispersiopolymeerejä sitomalla biologisesti aktiivisia aineita,
15 joissa on vapaita aminoryhmiä, keksinnön mukaisten dispersiopolymerihiukkasten pinnoilla oleviin reaktiivisiin, funktionaalisista aldehydiryhmistä peräisin oleviin ryhmiin. Nämä biologisesti aktiiviset lateksikonjugaatit soveltuvat serologisiin tai immunologisiin määrittämis-
20 telmiin.

On tunnettua, että serologisten tai immunologisten määrittämismenetelmien herkkyyttä voidaan parantaa käyttämällä indikaattori- tai kantajahiukkasia, jotka on kuorimitettu kyseessä olevalla immunologisella reagenssilla.
25 Kantajamateriaalina voidaan käyttää esimerkiksi veren punasoluja tai soluviljelmäsoluja. Tähän tarkoitukseen käytetään myös lateksihiukkasia, joiden läpimitta on 0,02 - 5 μ m.

EP-hakemuksessa 82110273.8 kuvataan lateksihiukkas-
30 sia, jotka sisältävät happoamidiryhmien kautta sidottuja funktionaalisia asetaaliryhmiä. Vesipohjaisessa väliaineessa ennalta valmistettuja lateksiytimiä liuotetaan yhdessä vinyylimonomeerien kanssa, jotka sisältävät happoamidiryhmien kautta sitoutuneita funktionaalisia asetaaliryhmiä, ja nämä vinyylimonomeerit, joiden tulee olla
35 riittävässä määrin veteen liukenemattomia, kopolymeroi-

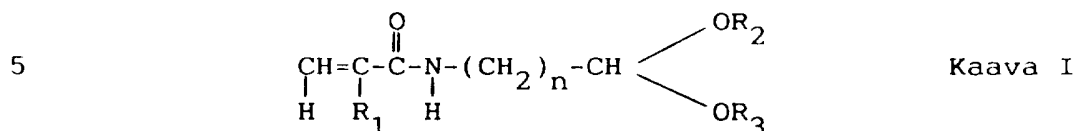
daan sitten yhdessä muiden monomeerien kanssa, jotka voivat olla luonteeltaan hydrofiilisiä tai ionisia. Tällaisia reagensseja voidaan käyttää proteiinien nefelometriseen tai turbidimetriseen määrittämiseen.

5 Tätä varten sidotaan lateksiin määritettävän proteiinin vastaista vasta-ainetta. Vasta-aineella kuormitetun lateksin sopivan laimentamisen jälkeen voidaan täten saatua reagenssia käyttää mittauksiin; inkuboitaessa määritettävän antigeenin kanssa muodostuu agglutinaatteja,
10 jotka voidaan mitata nefelometrisesti tai turbidimetrisesti. Tällä menetelmällä saadut sirontasäteilysignaalit ovat sangen heikkoja, eivätkä siten mahdollista hyvin toistettavissa olevaa mittausta. Reagenssin osoitusherkyyden parantaminen ja siten myös tunnetun reagenssin ja
15 osoitettavan antigeenin reaktiossa syntyvien sirontasäteilysignaalien voimistaminen ei ole ilman muuta mahdollista.

Nyt on yllättävästi havaittu, että kuvatut tunnettujen menetelmien epäkohdat voidaan välttää käyttämällä
20 kantajahiukkasia, jotka valmistetaan menetelmällä, jolle on tunnusmerkillistä se, että käytetään ennalta valmistettuja, loppuun asti polymeroitumattomia lateksihiukkasia, joissa huomattava osa käytetyistä monomeereista on vielä polymeroitumatta ja joiden jäännösmonomeeripitoisuus on siis suuri, ja kopolymeroidaan nämä loppuun asti
25 polymeroitumattomat ja siten monomeerin, esimerkiksi styreenin, joukossa olevat lateksiytimet vesipohjaisessa väliaineessa olevien akryyli- tai metakryylimonomeerien, jotka sisältävät happoamidiryhmien kautta sitoutuneita
30 asetaaliryhmiä, ja mahdollisesti akryyli- tai metakryylihappomonomeerien kanssa.

Keksintö koskee siten ydin-kuori-dispersiopolymerejä käytettäväksi diagnostisissa menetelmissä, joissa
mitataan hiukkaskoon muutoksia, jotka sisältävät lateksihiukkasia, joiden pinnalla on kopolymeraattia, joka on
35 valmistettu monomeeriseoksesta, joka sisältää vähintään

yhtä asetaaliryhmiä sisältävää yhdistettä, jolla on kaava I



jossa

$$n = 1 - 6,$$

10 $\text{R}_1 = \text{H}, \text{CH}_3 \text{ ja}$

R_2 ja R_3 ovat samanlaisia tai erilaisia ryhmiä,

jolloin $\text{R}_2, \text{R}_3 = -(\text{CH}_2)_m - \text{CH}_3$, jossa $m = 0 - 7$, tai



jossa $p = 1 - 3$, jolloin X, Y ja Z ovat samanlaisia tai erilaisia, tai $\text{R}_2, \text{R}_3 =$ akryyliryhmä,

20 ja mahdollisesti sisältää krotoni- ja/tai akryyli- ja/tai metakryylihappoa ja/tai karbosyklisiä, aromaattisia monovinylideeni-monomeerejä.

Keksintö koskee lisäksi menetelmää dispersioiden valmistamiseksi, jolle menetelmälle on tunnusmerkillistä se, että valmistetaan ensin lateksidispersiosien poly-
 25 meroimalla monomeereja, esimerkiksi styreeniä, sillä tavalla, että vain 30 - 90 paino-% käytetyistä monomeereista polymeroituu, ja erotetaan sitten ylimääräinen monomeeri, joka ei ole liuenneena polymeeriin, suodattamalla
 30 tai dialysoimalla perusteellisesti, ja lisätään sitten monomeeriseos ja tehdään polymerointi. Tämä seos sisältää kaavan I mukaisia yhdisteitä, joissa on pääteasemassa olevia asetaaliryhmiä, ja mahdollisesti krotoni- ja/tai akryyli- ja/tai metakryylimonomeereja samoin kuin mono-
 35 meereja, joista siemenpolymeeri koostuu, esimerkiksi styreeniä. Siemenlateksi polymeroidaan edullisesti sillä ta-

valla, että vain 40 - 80 paino-% monomeereista polymeroituu. Erityisen edullinen on sellainen menetelmä siemenlateksin polymeroimiseksi, jossa 50 - 70 paino-% monomeereista polymeroituu.

5 Keksinnölle on tunnusomaista, että ydinlateksihiukkasten jäännöspolymeeripitoisuus ennen kuoren polymerointia on 5 - 50 paino-% lateksihiukkasista laskettuna. Valmisteet, jotka sisältävät 10 - 40 paino-% monomeeria polymeerista laskettuna, ovat edullisia. Erityisen edullisia ovat valmisteet, jotka sisältävät 20 - 30 paino-%
10 monomeeria polymeeristä laskettuna.

 Lateksihiukkasten, joita käytetään keksinnön mukaisten dispersioiden siemendispersioina, tulee olla kalvoa muodostamattomia polymeraatteja. "Kalvoa muodostamattomina" pidetään polymeerilateksihiukkasia, jotka eivät muodosta kalvoa eivätkä sulaudu yhteen käyttöolosuhteissa. Karbosyklisten, aromaattisten monovinylideenimonomeerien, kuten styreenin, vinyylitolueenin ja vinyylinaftaleenin, samoin kuin näiden monomeerien seokset keskenään
15 ja/tai metyylietakrylaatin ja akryylnitriilin kanssa ovat edullisia. Erityisen edullista siemendispersioita ovat polystyreenilateksit. Polystyreenisiemendispersio valmistetaan sinänsä tunnetulla tavalla.
20

 Keksinnön mukaisen dispersiopolymeerin valmistamiseksi lisätään ennalta valmistettuun lateksiin, jossa
25 hiukkasläpimitta on 0,02 - 2 μm , edullisesti 0,05 - 0,5 μm , ensin emulgaattoria noin 20 - 80 paino-% siitä määrästä, joka tarvittaisiin lateksipinnan peittämiseen kokonaan yksimolekyylikerroksella. Se emulgaattorimäärä,
30 joka johtaa lateksipinnan peittymiseen kokonaan, määritetään tensiometrin avulla. Tällaisia mittauksia ovat kuvanneet esimerkiksi I. Phrma ja S.-R. Chen [Journal of Colloid and Interface Science 74 (1979) 90 - 102] ja ensimmäisen kerran S. H. Maron, M. E. Elder ja I. N.
35 Ulevitch [Journal of Colloid Interface Sciences 9 (1954) 89 - 104].

Kyseeseen tulevia emulgaattoreita ovat esimerkiksi pitkäketjuisten, alifaattisten alkoholien, joissa on edullisesti 10 - 20 hiiliatomia, alkyylifenolien, joiden alkyyliryhmät sisältävät edullisesti 6 - 12 hiiliatomia, tai dialkyyli- tai trialkyylifenolien, joiden alkyyliryhmät ovat edullisesti haaroittuneita ja sisältävät kukin 3 - 12 hiiliatomia, polyglykolieetterit. Esimerkkejä tällaisista aineista ovat etyleenioksidin reaktiotuotteet lauryylialkoholin, stearyylialkoholin, oleyylialkoholin, kookosrasva-alkoholin, oktyylifenolin, ninyylifenolin, di-isopropyylifenolin, tri-isopropyylifenolin, di-t-butyyllifenolin ja tri-t-butyyllifenolin kanssa. Etyleenioksidin ja polypropyleeniglykolin reaktiotuotteet ovat myös soveltuvia.

Ionisista emulgaattoreista ovat soveltuvia ennen kaikkea anioniset emulgaattorit, erityisesti alkyylisulfaattien tai alkyyliaryylisulfaattien samoin kuin vastaavien sulfaattien, fosfaattien tai fosfonaattien, joissa on mahdollisesti oksietyleeniyksiköitä kyseessä olevan hiilivetyryhmän ja anionisen ryhmän välissä, alkalimetallit tai ammoniumsuolat. Esimerkkejä tällaisista aineista ovat natriumdodekyylisulfaatti, natriumlauryylisulfaatti, natriumoktyylifenoliglykolieetterisulfaatti, natriumdodekylibentseenisulfaatti, natriumlaurylidiglykolisulfaatti, ammonium-tri-t-butyyllifenolipentaglykolisulfaatti ja ammonium-tri-t-butyyllifenolioktaglykolisulfaatti. Edullisesti käytetään natriumdodekyylisulfaattia.

Siemendisersion, joka sisältää emulgaattorin lisäksi radikaali-initiaattoria, lisätään pisaroittain ja sekoittaen monomeeriseos, joka sisältää ainakin yhtä kaavan I mukaista asetaali-ryhmiä sisältävää yhdistettä. Dispersion lämpötila on + 10 - + 120°C, edullisesti + 50 - 90°C.

Polymerointi tehdään sinänsä tunnetulla tavalla radikaaleja muodostavan initiaattorin, esimerkiksi peroksidiyhdisteen tai alifaattisen atsoyhdisteen, läsnä-

ollessa. Initiaattori on vesiliukoinen ja sitä käytetään 0,05 - 10, edullisesti 0,1 - 3 paino-% (monomeerien kokonaismäärästä laskettuna). Tunnettuja radikaaleja muodostavia initiaattoreita ovat esimerkiksi vetyperoksidi, peroksidirikkihapon tai peroksidifosforihapon alkalimetalli tai ammoniumsuolat, esimerkiksi natriumperoksidisulfaatti, kaliumperoksidisulfaatti ja ammoniumperoksidisulfaatti, sekä lisäksi alkyylhydroperoksidi, kuten t-butyylhydroperoksidi, dialkyyliperoksidi, kuten di-t-butyyliperoksidi, diasyyliperoksidi, kuten diasetyyliperoksidi, dialauroyliperoksidi ja dibentsoyliperoksidi, samoin kuin atsidi-isovoihaponitriili, atsodikarbonamidi ja atso-gamma, gamma'-bis(4-syaanivaleriaanahappo). Edullisesti käytetään peroksidirikkihapon alkalimetalli- tai ammoniumsuoloja, kuten natrium-, kalium- ja ammoniumperoksidisulfaattia.

Initiaattoria käytetään mahdollisesti yhdessä pelkistimen, erityisesti pelkistävän rikkihapon alkali- tai maa-alkalimetallisuolan, kanssa; edullisia ovat sulfiitit, bisulfiitit, pyrosulfiitit, ditioniitit, tiosulfaatit ja formaldehydisulfoksylaatit. Myös glukosia ja askorbiinihappoa voidaan käyttää.

Asetaaliryhmiä sisältävinä monomeereina käytetään kaavan I mukaisia yhdisteitä; edullisesti käytetään akryyli- tai metakryyliamidoalkyyli-aldehydi-dialkyyliasetaalia, jonka alkyyliryhmä sisältää 2 - 8 hiiliatomia. Erityisen edullisia ovat akryyli- tai metakryyliamidoasetaldehydi-di-n-pentyyliasetaali.

Kaavan I mukaista yhdistettä sisältävään monomeeriseokseen voidaan lisätä korkeintaan 30 paino-% seoksen kokonaismäärästä styreeniä, vinyylinaftaleenia tai vinyylitolueenia. Lisäksi monomeeriseos voi sisältää mahdollisesti vielä korkeintaan 30 paino-% seoksen kokonaismäärästä metakryylihappoa, akryylihappoa tai krotonihappoa.

Siemendisersionon lisätään monomeeriseosta 90 - 5, edullisesti 40 - 10 paino-% siemendisersion ja monomeeriseoksen yhteismäärästä laskettuna.

Tärkeää siemenpolymeerin läsnäollessa tehtävän polymeroinnin onnistumiselle voi olla se, että monomeeri-seos lisätään pisaroittain koko ajan sekoittaen lateksiydinsuspensioon polymerointiolosuhteissa, ts. lämpötilassa + 10 - + 120°C, edullisesti + 50 - + 90°C. Pisaroittaen tehtävän lisäyksen aikana kiinnittyy lisättävä monomeerimäärä pysyvästi jo valmiille siemenlateksihiukkasille, polymeroituu siinä ja muodostaa lisää polymeeriä lateksihiukkasille.

Sen jälkeen polymeraatista poistetaan ylimääräiset monomeerit, initiaattorijäännökset ja emulgaattori tavanomaisesti. On edullista tehdä polymeraatille dialyysi, esimerkiksi NaHCO_3 -puskuria (0,01 - 0,05 paino-%:inen) vastaan.

Keksinnön mukaisten, biologisesti aktiivisten dispersioiden, joita kutsutaan tästedes myös lateksikonjugaateiksi, valmistamiseksi säädetään edellä kuvattujen siemenpolymeroitujen lateksihiukkasten suspension pH arvoon alle 5, edullisesti alle 3, ja inkuboidaan sitä sidottavan, immunologisesti aktiivisen materiaalin, kuten esimerkiksi vasta-aineiden, antigeenien tai hapteenien, kanssa.

Proteiinin aminoryhmän ja keksinnön mukaisella lateksihiukkasella olevan vapautuneen aldehydin väliset labiilit sidokset pelkistetään tunnetulla tavalla. Tähän tarkoitukseen käytetään edullisesti natriumsyaaniborihydridin liuosta neutraalissa puskurissa. Reaktioseoksesta poistetaan mahdollinen sitoutumaton immunologisesti aktiivinen materiaali tai muut epäpuhtaudet. Tämän on tarkoituksenmukaista tehdä sentrifugoimalla tai pesemällä sopivan kalvon päällä.

Keksinnön mukaiset siemenpolymeroidut lateksit ovat erityisen stabiileja. Ne soveltuvat herkkien reagenssien valmistukseen. Keksinnön mukaiset reagenssit voidaan kylmäkuivata.

Tunnetuilla menetelmillä valmistetut reagenssit reagoivat nefelometrisen tai turbidimetrisen mittauksen yhteydessä osoitettavan antigeenin kanssa, jolloin tapahtuu agglutinaatio ja siten sirontasäteilysignaalin tai ekstintion voimistuminen kyvetissä. Niinpä on valmistettu esimerkiksi C-reaktiivisen proteiinin määrittämisreagenssi käyttämällä C-reaktiivisen proteiinin (CRP) vastaisia kaniinin vasta-aineita. Kun tämän reagenssin annetaan reagoida erilaisten CRP-pitoisuuksien kanssa ja mitataan sirontasäteilysignaali nefelometrillä 30 min:n inkuboinnin jälkeen, saadaan standardikäyrä, jossa sirontasäteily voimistuu CRP-pitoisuuden kasvaessa. Kuvio 1 esittää tällaista standardikäyrää. Siitä nähdään selvästi, että käytetyillä CRP-pitoisuuksilla voidaan mitata vain heikkoja sirontasäteilysignaaleja. Siihen liittyy mittauksen huono herkkyys; havaittavuusraja tällä reagenssilla on noin 288 $\mu\text{g/l}$ CRP:tä, ts. CRP-pitoisuuksia 36 - 288 $\mu\text{g/l}$ ei enää voida määrittää.

Keksinnön mukaisella reagenssilla, joka on valmistettu sitomalla esimerkiksi CRP-vasta-aineita lateksi-valmisteille, jotka on valmistettu siemenpolymeroimalla loppuun asti polymeroimattomille, monomeerijäännöksiä sisältäville polymeereille, tapahtuu sen sijaan paljon voimakkaampi agglotinaatioreaktio sen reagoitua CRP:n kanssa. Kun tämän keksinnön mukaisen reagenssin annetaan reagoida erilaisten CRP-pitoisuuksien kanssa ja mitataan 30 min:n inkuboinnin jälkeen sirontasäteilysignaali nefelometrillä, saadaan standardikäyrä, jossa sirontasäteilysignaalit ovat voimakkaita jo pienilläkin CRP-pitoisuuksilla. Kuvio 2 esittää tällaista standardikäyrää. Nähdään, että reagenssin herkkyys on niin hyvä, että voidaan mitata pieniäkin CRP-pitoisuuksia aina pitoisuuteen 36 $\mu\text{g/l}$ asti. Sirontasäteilysignaali on CRP-pitoisuuksilla 36 - 2800 $\mu\text{g/l}$ lisäksi sängen paljon voimakkaampi kuin tähän asti tunnetulla reagenssilla. Tämä merkitsee sitä, että

mittauksen toistettavuus on sängen paljon parempi kuin tähänastisilla menetelmillä.

Muita keksinnön mukaisia reagensseja, joilla on vastaavat edulliset ominaisuudet, saadaan kuormittamalla keksinnön mukaiset lateksivalmisteet esimerkiksi alfa-fetoproteiinin (AFP:n), ferritiinin, ihmisen istukkalaktogeenin (HPL:n), tyroksiinia sitovan globuliinin (TGB:n), immunoglobuliini E:n, β_2 -mikroglobuliinin, raskausspesifisen β_1 -glykoproteiinin ja ihmisen koriogonadotropiinin (SHCG:n) vastakkaisilla vasta-aineilla.

Keksinnön mukaisten reagenssien valmistukseen voidaan edullisesti käyttää myös monoklonaalisia vasta-aineita. Lateksivalmisteet voidaan kuormittaa myös bakteeri- tai virusproteiineilla, kuten esimerkiksi streptolysiini O:lla, H. influenzae -antigeenilla, Pneumococcus-antigeenilla, kuppa-antigeenilla, toksoplasma-antigeeneilla, BHsAg:lla, vihurirokkoantigeenilla, herpesantigeenilla ja jäykkäkouristusantigeenilla, ja osoittaa vastaavat vasta-aineet näillä antigeenilla kuormitetuilla, keksinnön mukaisilla reagensseilla.

Lopuksi mainittakoon, että keksinnön mukaiset lateksivalmisteet voidaan samalla tavalla kuormittaa hapteenijohdoksilla, esimerkiksi hormoneilla tai lääkeaineilla, kuten tyroksiinilla (T_4 :llä), trijodityroniinilla (T_3 :lla), kortisonilla, progesteronilla, testosteronilla, gentamysiinillä ja digoksiinilla, jolloin saadaan biologisesti aktiivisia dispersiopolymeerejä, siis keksinnön mukaisia reagensseja, joilla voidaan inhibitiotestien kautta, siis käyttämällä samanaikaisesti sopivia vasta-aineita, mitata mainittujen hapteenien pitoisuus.

Keksinnön mukaiset lateksivalmisteet ovat yksinkertaisesti valmistettavissa ja yhdistettävissä säästävällä tavalla herkkien immunologisesti aktiivisten materiaalien kanssa diagnostiseksi reagenssiksi.

Lateksikonjugaatteja voidaan käyttää kaikissa diagnostisissa menetelmissä, joissa mitataan hiukkaskoon

muutoksia, esimerkiksi aineiden kvalitatiivisissa ja puoli-
kvantitatiivisissa määrityksissä visuaalisten lateksiagg-
lutinaatiotestien avulla samoin kuin hivenainepitoisuuksi-
na esiintyvien proteiinien nefelometrisissa tai turbidi-
5 metrisissa määrityksissä suoralla tai kompetitiivisella
agglutinaatiotestillä tai lateksi-hapteeni-inhibitiotes-
tillä.

Esimerkkejä

1. Siemenpolymeraatin valmistus

10 Kaasunsyöttö- ja -poistoputkella ja magneettisau-
valla varustettuun lieriön muotoiseen lasiastiaan laitet-
tiin 310 ml typellä kyllästettyä kahdesti tislattua vettä.
Lisättiin 500 mg natriumstearaattia ja liuotettiin se
sekoittamalla. Lisäksi lisättiin 1,5 ml 25 %:ista ammoniak-
15 kia. Mitattiin pH, ja todettiin sen olevan 11,09. Polyme-
rointiastia tehtiin hapettomaksi imemällä se useaan ker-
taan tyhjäksi kaasusta ja täyttämällä typellä. Detergent-
tiliuos kuumennettiin vesihauteen avulla lämpötilaan
+ 70°C koko ajan sekoittaen.

20 Sen jälkeen lisättiin typpi suojakaasuna 90 ml juuri
tislattua styreeniä paineentasaimella varustetusta tipu-
tussuppilosta polymerointiastiaan. Sekoitettiin 15 min
lämpötilassa + 70°C styreenin emulgoimiseksi. Sen jälkeen
lämpötila kohotettiin 90°C:seen ja sekoitettiin vielä
25 tunti. Sen jälkeen lisättiin 67,5 mg kaliumproksidisul-
faattia liuotettuna 50 ml:aan typellä kyllästettyä tis-
lattua vettä. Sekoitettiin 80 min lämpötilassa + 90°C.
Polystyreeni suodatettiin poimusuodattimella. Tällöin
suodattimelle jäi näissä olosuhteissa muutamia millilit-
30 roja styreeniä. Tätä styreeniä ei voitu liuottaa täydeli-
sesti polystyreeniin, koska sitä oli jonkin verran yli-
määrin.

Suodatettua polystyreeniä dialysoitiin 50 tuntia
10 l:aa vastaan 0,01 paino-%:ista ammoniumvetykarbonaat-
35 tiliuosta (0,01 paino-% NH_4HCO_3 :a ja 0,01 paino-% NaN_3 :ä,

pH säädettiin arvoon 10,0 lisäämällä 10,5 ml 25 paino-%:ista ammoniakkia/10 l). Dialyysin jälkeen saatiin 410 ml polymeraattia, jonka tiheys kuivana oli 12,8 g/dl. Siten noin 60 paino-% käytetystä monomeerista polymeroitui. Pidentämällä polymerointiaikaa 5 - 10 min voitiin polymeroituneen styreenin osuutta suurentaa ja samalla vähentää polystyreeniin liuennutta monomeeria.

Lyhentämällä polymerointiaikaa 5 - 10 min voitiin sitä vastoin pienentää polymeroituneen styreenin osuutta lisäten samalla styreeniin liuenneen monomeerin määrää.

2. Siemenpolymerointi, jossa käytetään esimerkin 1 mukaisesti valmistettua polymeeriä

Kaasusyöttö- ja poistoputkella ja magneettisauvalla varustettuun lieriön muotoiseen lasiastiaan laitettiin 156,3 ml polystyreenilateksidispersiota, jonka kiintoainepitoisuus oli 12,8 paino-%, sekä 238,7 ml tislattua vettä ja 250 mg natriumdodekyylisulfaattia, ja liuotettiin sekoittaen. Tyhjentämällä astia useaan kertaan kaasusta ja täyttämällä se tyypellä tehtiin polymerointiastia hapettomaksi. Lateksi-detergenttiseos kuumennettiin koko ajan sekoittaen lämpötilaan + 70°C vesihauteessa.

Lisättiin monomeeriseos, joka oli valmistettu styreenistä (2 ml), metakryyliamidoasetaldehydi-di-n-pentyyliasetaalista (2 ml) ja metakryylihaposta (1 ml), tyyppi suojakaasuna. Sen jälkeen seos emulgoitiin sekoittaen 1 tunti lämpötilassa noin 20°C.

Sen jälkeen polymerointipanos kuumennettiin lämpötilaan + 70°C vesihauteessa. Kun oli sekoitettu 15 min lämpötilassa + 70°C, aloitettiin kopolymerointi. Sen aikaansaamiseksi lisättiin 5 ml kaliumperoksidisulfaattiliuosta (16 mg/ml tislatussa vedessä). Polymerointipanoksen lämpötila pidettiin + 70°C:na. Sekoitettiin 5 tuntia mainitussa lämpötilassa. Polymeroituminen meni tällöin loppuun, ja dispersio jäähdytettiin huoneen lämpötilaan ja suodatettiin poimusuodattimella. Saatiin 395 ml lateksisuspensiota. Sitä dialysoitiin 17 tuntia NaHCO₃-puskuri-

liuosta vastaan (0,25 g/l, pH 8 - 8,2). Saatiin 415 ml lateksidispersiota, jonka kiintoainepitoisuus oli noin 6,8 %.

3. Anti-CRP-vasta-aineiden sitominen keksinnön mukaiseen polymeraattiin

Esimerkin 2 mukaisesti valmistettuun polymeraattiin sidottiin anti-CRP-vasta-aineita. Käytetty polymeraatti laimennettiin tislatusella vedellä kiintoainepitoisuuteen 5,8 paino-%. Antiseerumi, jota saatiin immunisoimalla kaniinit puhdistetulla CRP:llä, eristettiin tunnetulla menetelmällä gammafraktiona. Sen jälkeen sitä konsentroidtiin, kunnes saavutettiin proteiinipitoisuus 10 mg/ml.

Sekoitettiin 0,5 ml edellä mainittua polymeraattia ja 0,05 ml anti-CRP-vasta-aineliuosta. Sen jälkeen lisättiin 0,025 ml eikosaoksietyleenisorbitaanilauryylihappo-esterin (Tween^R 20) 20-%:ista vesiliuosta, ja sekoitettiin. Lisättiin 0,01 ml 1 N HCl:a, niin että pH-arvoksi tuli noin 2. Kun oli inkuboitu 30 min huoneen lämpötilassa, lisättiin 0,125 ml natriumvetyfosfaatin kylläistä vesiliuosta (pH 6,5) ja 0,125 ml natriumsyaaniboorihydridin vesiliuosta (25 mg/ml), ja sekoitettiin hyvin. Sen jälkeen inkuboitettiin 1 tunti huoneen lämpötilassa. Tätä kuorituspanosta sentrifugoitiin sitten 30 min suunnilleen kiihtyvyydellä 50 000 x g (Beckman-sentrifugi, kierrosnopeus 20 000 min⁻¹). Supernatantti heitettiin pois. Jäännös suspendoitiin 0,75 ml:aan glysiini-NaCl-puskuria /0,1 mol/l glysiiniä, 0,17 mol/l NaCl:a ja 0,5 paino-% eikosaoksietyleenisorbitaanilauryylihappoesteriä (Tween^R 20), pH 8,27

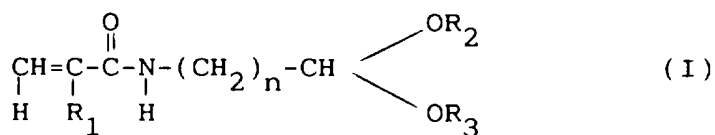
Sen jälkeen tehtiin 2 s kestävä ultraäänikäsittely (Bronson Sonyfier B 15). Siten takaisindispersgoitu reagenssi laimennettiin suhteessa 1:80 edellä mainitulla glysiini-NaCl-puskurilla, ja ultraäänikäsiteltiin uudelleen 30 s.

4. Seeruminäytteiden CRP-pitoisuuksien mittaaminen

Reagenssia, joka oli valmistettu esimerkin 3 mukaisesti sitomalla anti-CRP-vasta-aineita keksinnön mukaisiin lateksivalmisteisiin, käytettiin potilasseerumien CRP-pitoisuuksien mittamiseen. Standardina käytettiin LN-CRP-standardia (ihminen) (Fa. Behringwerke AG). Tämä CRP-standardi sisälsi pakkauksessa annettujen tietojen mukaan 86 mg/l CRP:tä. Standardi laimennettiin glysiini-NaCl-puskurilla (0,1 mol/l glysiiniä, 0,17 mol/l NaCl:a, pH 8,2) ensin pitoisuuteen 2,3 mg/l, ja edelleen vaiheittain aina kaksinkertaiseen tilavuuteen. Siten saatiin standardisarja, jossa CRP-pitoisuus pieneni. Mittauksen tekemiseksi sekoitettiin 10 μ l standardiseerumilaimennosta, 150 μ l reaktiopuskuria (0,1 mol/l glysiiniä, 0,17 mol/l NaCl:a, 4 paino-% polyetyleeniglykoli (PEG) 6000:a ja 0,5 paino-% eikosaoksietyleenisorbitaanilauryylihapoes-teriä (Tween[®] 20), pH 8,27 ja 50 μ l esimerkin 3 mukaista reagenssia BLN-kyveteissä (Fa. Behringwerke AG), ja inkuboitiin 30 min huoneen lämpötilassa. Sitten kyvetit mitattiin laserefelometrillä (Fa. Behringwerke AG). Standardisarjan mittauksista saatu vertailukäyrä piirrettiin puolilogaritmipaperille, ja katsottiin siltä potilasseerumiarvot. Kuvio 2 esittää tyypillistä vertailukäyryä.

Patenttivaatimukset

1. Ydin-kuori-dispersiopolymeerejä käytettäväksi
diagnostisissa menetelmissä, joissa mitataan hiukkaskoon
muutoksia, jotka sisältävät lateksihiukkasia, joiden pin-
nalla on kopolymeraattia, joka on valmistettu monomeeri-
seoksesta, joka sisältää vähintään yhtä asetaaliryhmiä
sisältävää yhdistettä, jolla on kaava I

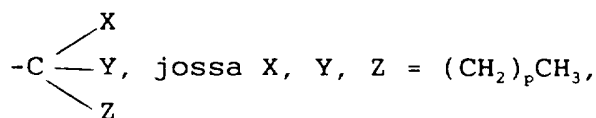


jossa

$$n = 1 - 6,$$

$$\text{R}_1 = \text{H}, \text{CH}_3 \text{ ja}$$

R_2 ja R_3 ovat samanlaisia tai erilaisia ryhmiä,
jolloin $\text{R}_2, \text{R}_3 = -(\text{CH}_2)_m - \text{CH}_3$, jossa $m = 0 - 7$, tai



jossa $p = 1 - 3$, jolloin X, Y ja Z ovat samanlaisia tai
erilaisia, tai $\text{R}_2, \text{R}_3 =$ akryyliryhmä, ja mahdollisesti
sisältää krotonihappoa ja/tai akryylihappoa ja/tai metak-
ryylihappoa ja/tai karbosyklisiä, aromaattisia monoviny-
lideeni-monomeerejä, t u n n e t t u siitä, että ydin-
lateksihiukkasten jäännöspolymeeripitoisuus ennen kuoren
polymerointia on 5 - 50 paino-% lateksihiukkasista las-
kettuna.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukaisia dispersiopoly-
meerejä, t u n n e t t u siitä, että siemenpolymeeri on
polystyreenilateksi.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukaisia dispersiopoly-
meerejä, t u n n e t t u siitä, että siemenpolymeerin

jäännösmonomeeripitoisuus on 10 - 40 paino-% polymeeristä laskettuna.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukaisia dispersiopolymeerejä, t u n n e t u t siitä, että kaavan I mukaisina monomeereina käytetään akryyli- tai metakryyliamidoalkyy-
5 lialdehydi-di-alkyyliasetaaleja, joiden alkyyli-ryhmässä on 2 - 8 hiiliatomia.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukaisia dispersiopolymeerejä, t u n n e t u t siitä, että kaavan I mukaisena monomeerinä käytetään metakryyliamidoasetaldehydi-di-n-
10 pentyylisasetaalia.

6. Menetelmä dispersiopolymeerien valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että valmistetaan ensin siemen-
polymeerejä, joiden jäännösmonomeeripitoisuus on 5 - 50
15 paino-%, suorittamalla polymerointi sillä tavalla, että vain 30 - 90 % läsnä olevista monomeereista polymeroituu, erotetaan sitten polymeeriin sitoutumattomat monomeerit ja polymeroidaan sitten siten saatujen siemenpolymeerien
20 läsnä ollessa polymeroidaan monomeeriseos, joka sisältää vähintään yhtä kaavan I mukaista yhdistettä ja lisäksi 0 - 30 paino-% seoksesta akryyli-, metakryyli- ja/tai krotonihappoa ja/tai vielä 0 - 30 paino-% myös seoksen kokonaismäärästä laskettuna, karbosyklisiä, aromaattisia
25 vinylideenimonomeerejä.

7. Biologisesti aktiivisia dispersiopolymeerejä, t u n n e t u t siitä, että ne koostuvat patenttivaati-
muksen 1 mukaisista dispersiopolymeereistä ja niihin si-
dotuista vasta-aineista, antigeeneistä tai hapteeneistä.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukaisen biologisesti ak-
30 tiivisen dispersiopolymeerin käyttö antigeenien, vasta-
aineiden tai hapteenien diagnostiseen osoittamiseen.

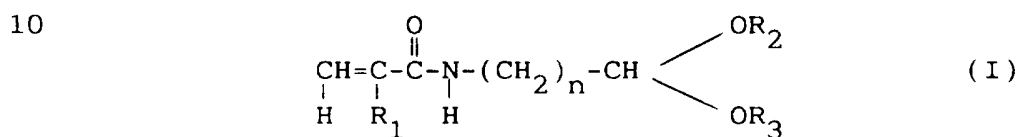
9. Patenttivaatimuksen 7 mukaisen biologisesti ak-
tiivisen dispersiopolymeerin käyttö nefelometrisessä ja
turbidimetrisessä menetelmässä samoin kuin hiukkaslasken-
35 tamenetelmässä.

10. Diagnostinen aine, t u n n e t t u siitä, että se sisältää biologisesti aktiivisia dispersiopolymeerejä, jotka koostuvat patenttivaatimuksen 1 mukaisista dispersiopolymeereistä ja niihin sidotuista vasta-aineista, antigeeneista tai hapteeneista.

5

Patentkrav

1. Kärn-skäl-dispersionspolymerer för användning vid diagnostiska förfaranden, varvid förändringar av partikelstorleken mätes, vilka innehåller latexpartiklar på vars yta finnes kopolymerat som är tillverkat av en monomerblandning innehållande åtminstone en förening innehållande acetalgrupper, med formeln

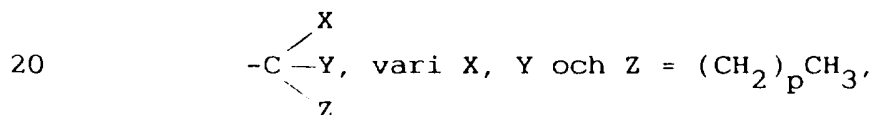


vari $n = 1 - 6$,

$\text{R}_1 = \text{H}, \text{CH}_3$ och

R_2 och R_3 är likadana eller olika grupper, varvid

$\text{R}_2, \text{R}_3 = -(\text{CH}_2)_m - \text{CH}_3$, vari $m = 0 - 7$, eller



vari $p = 1 - 3$, varvid X, Y och Z är likadana eller olika, eller $\text{R}_2, \text{R}_3 =$ akrylrest, och eventuellt innehåller krotonsyra och/eller akrylsyra och/eller metakrylsyra och/eller karbocykliska, aromatiska monovinylidenmonomerer, k ä n n e t e c k n a d e därav, att restmonomerhalten hos kärnlatexpartiklarna före polymering av skalet, utgör 5 - 50 vikt-% av latexpartiklarna.

2. Dispersionspolymerer enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d e därav, att fröpolymeren utgörs av polystyrenlatex.

3. Dispersionspolymerer enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d e därav, att fröpolymeren uppvisar en restmonomerhalt på 10 - 40 vikt-% beräknar på polymeren.

4. Dispersionspolymerer enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d e därav, att som monomerer med formeln I användes akryl- eller metakrylamidoalkylaldehyd-di-alkylacetal, vilkas alkylgrupper innehåller 2 -
5 8 kolatomer.

5. Dispersionspolymerer enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a d e därav, att som monomerer med formeln I användes metakrylamidoalkylaldehyd-di-n-pentyl-acetal.

10 6. Förfarande för framställning av dispersionspolymerer, k ä n n e t e c k n a t därav, att först framställles fröpolymerer med en restmonomerhalt på 5 - 50 vikt-%, genom att utföra polymerisationen sålunda, att endast 30 - 90 % av de närvarande monomererna polymeriseras, varefter de till polymeren ej bundna monomererna av-
15 skiljes och därefter polymeriseras i närvaro av den sålunda erhållna fröpolymeren en monomerblandning, som innehåller åtminstone en förening med formeln I och dessutom 0 - 30 vikt-% av blandningen, akryl-, metakryl-
20 och/eller krotonsyra och/eller 0 - 30 vikt-%, även så av blandningens totalmängd, karbocykliska, aromatiska viny-lidenmonomerer.

7. Biologiskt aktiva dispersionspolymerer k ä n n e t e c k n a d e därav, att de består av dispersionspolymerer enligt patentkravet 1 och till dessa bundna antikroppar, antigener eller haptener.

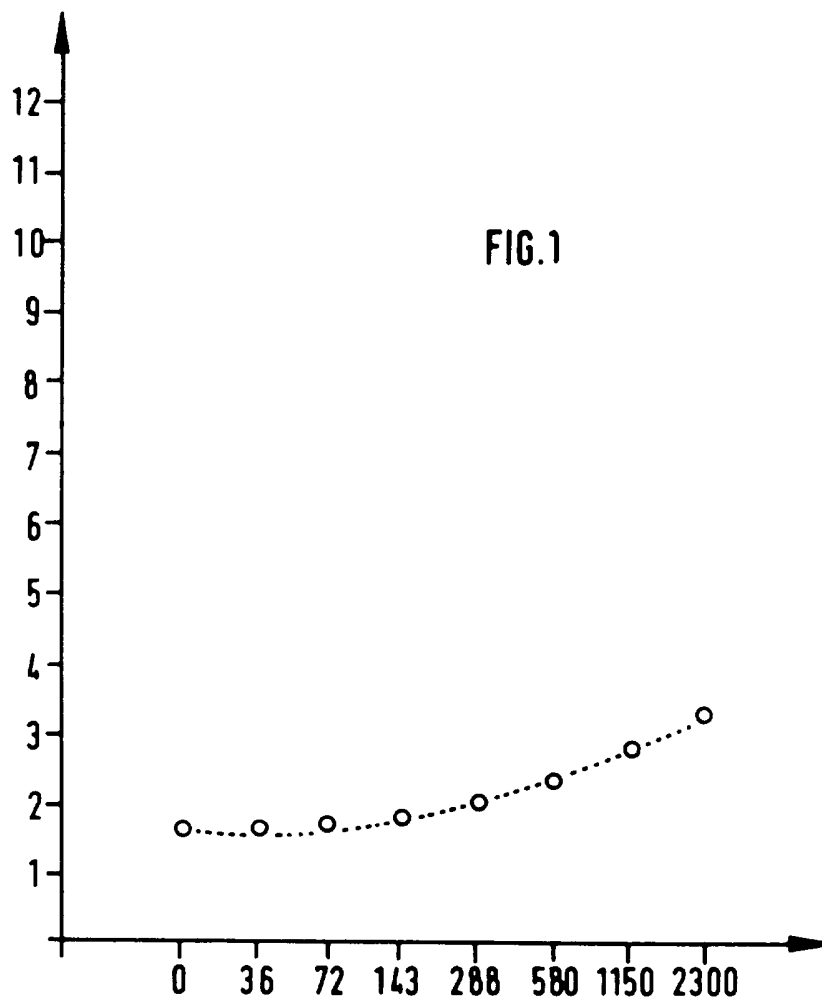
8. Användning av en biologiskt aktiv dispersionspolymer enligt patentkravet 7 för att diagnostiskt påvisa antikroppar, antigener eller haptener.

30 9. Användning av en biologiskt aktiv dispersionspolymer enligt patentkravet 7 i ett nefelometriskt och ett turbidimetriskt förfarande, samt i ett partikelräkningsförfarande.

35 10. Diagnostiskt medel, k ä n n e t e c k n a t därav, att det innehåller biologiskt aktiva dispersionspolymer, vilka består av dispersionspolymerer enligt patentkravet 1 och till dessa bundna antikroppar, antigener eller haptener.

39503

Suhteellinen sirontasäteilysignaali (V)



CRP-pitoisuus, µg/l

89503

Suhteellinen sirontasäteilysignaali (V)

