

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 762727 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **762727**

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **23.09.1976**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **23.09.1976**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **07.04.1977**

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

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

06.10.1975 SE 7511148

(71) Hakija - Sökande - Applicant

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

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Arwin, Hans Rune, Sverige, SVERIGE, (SE)

2 •Lundström, Kurt Ingemar, Sverige, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Entsyaattisten ynnä muiden biokemiallisten reaktioiden tutkimismenetelmä

Förfarande för studium av entzymatiska och andra biokemiska reaktioner

Entsymbolag

Entsymbolagisten ynnä muiden biokemiallisten reaktioiden tutkimis-
menetelmä - Förfarande för studium av entzymatiska och andra
biokemiska reaktioner

5. V. 11. Esillä oleva keksintö koskee menetelmää sen tyyppisten entsymbolagisten ja muiden biokemiallisten reaktioiden tutkimiseksi, joissa se aine, jonka aktiviteetti tai väkevyys on tarkoitus määrittää, vaikuttaa biokemialliselle reaktiolle spesifiseen substraattiin.

Menetelmä on tarkoitettu käytettäväksi mm. entsymbolagisten aktiviteetin määrittämiseen varsinkin seriini-proteaasi-tyyppisille entsyymeille (trombiini, plasmiini, trypsiini jne.). Useat näistä entsyymeistä säätelevät veren koagulaatiota ja fibrinolyysia, ja häiriöt normaaleissa entsyymimäärissä aiheuttavat patologisia muutoksia kuten verenvuotoja tai suonitukostautia.

Menetelmää voidaan käyttää myös immunologisten reaktioiden kuten antigeeni-vasta-aine-kytkentöjen tutkimiseen. Muita järjestelmiä, joita myös voidaan tutkia, ovat mm. inhibiittori-entsyymikytkennät, reseptori-hormoonikytkennät ja reseptori-steroidikytkennät.

Ennestään on tunnettu entsyymaattisten reaktioiden tutkiminen "entsyymielektrodien" avulla, jolloin mitataan reaktion jätetuotteelle spesifinen potentiaaliero kalvojen ylitse. Katso myös Gough D.A. ja Andrade J.D., Enzyme Electrodes, Science Vol 180, pp. 380-384.

Immunologisia reaktioita tutkittaessa on tunnettua käyttää nikkelillä metallisoituja lasilevyjä, joille on absorboitu antigeenejä pintakerrokseksi, niin että kun lasilevy upotetaan vasta-aineita sisältävään liuokseen, antigeenien ja vasta-aineiden välillä tapahtuu kytkentä, josta seuraa, että kerroksen paksuus suurenee. Kytkentä havaitaan mittaamalla kerroksen paksuus optisesti ellipsometrin avulla. Katso myös Rothen A., Immunologic and enzymatic reactions carried out at a solid-liquid interface, Physiol Chem & Physics 5, 1973.

Ennestään on tunnettu myös entsyymaattisen aktiviteetin määrittäminen konduktometrisella menetelmällä, katso Lawrence A.J. ja Moores G.R., Conductometry in Enzyme Studies, Eur J. Biochem 24 (1972), pp 538-546.

Lisäksi tiedetään, että orgaaniset molekyylit voivat adsorboitua elektrodipinnoille ja muuttaa elektrodien sähköisiä ominaisuuksia, katso Bockris J.O.M. ja Reddy A.K.N., Modern Electrochemistry, Plenum Press, Vol 2, chap 7.

On myös kehitetty erikoissubstraatteja, joilla on suuri herkkyys kyseessä oleviin entsyymeihin nähden, erityisesti amidityyppisiä substraatteja, joilla on luontainen kyky hydrolysoitua entsyymin läsnäollessa, kehittäen väriä kantavia tuotteita. Tapahtuva värin muutos voidaan helposti mitata spektrofotometrisesti, esimerkiksi optisen absorptiospektrometrin avulla. Substraatti, jota voidaan käyttää entsyymaattisen aktiviteetin optiseen havaintiin ja joka helpottaa esimerkiksi antitrombiini- ja protrombiinimäärien kliinistä testiä, on selitetty US-patenttijulkaisussa 3 884 896.

Tällä optisella havaintimenetelmällä on se varjopuoli, että se vaatii varsin monimutkaisen ja kalliin laitteen, ja että mittausmenetelyssä tarvitaan huomattava määrä substraattia. Lisäksi entsyymaattista aktiviteettia ei ole mahdollista tutkia suoraan verestä, veren sameuden vuoksi, ^{Veren} sen sijaan on käytettävä plasmaa (veren punasolut poistettu) tai seerumia (myös fibrinogeeni poistettu).

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on saada aikaan yksinkertainen menetelmä, josta edellä mainitut haitat on poistettu. Keksinölle on tällöin pääasiallisesti tunnusmerkillistä se, että ensiksi mitataan kahden elektrodin välinen kapasitanssi pelkän substraatin läsnäollessa, ja sen jälkeen mitataan kapasitanssi, kun lisäksi on läsnä sitä ainetta, jonka aktiviteetti tai väkevyys on tarkoitus määrittää, jolloin kapasitanssin muutos aikayksikköä kohti tai kapasitanssin kokonaismuutos on aineen aktiviteetin tai väkevyyden mitta.

Keksintö selitetään seuraavassa yksityiskohtaisemmin oheisen piirustuksen yhteydessä, jossa

kuvio 1 esittää sähköistä mittauslaitetta elektrodien välisen kapasitanssin mittaamista varten,

kuvio 2 esittää mittauslaitteen yksinkertaistettua ekvivalentti-piiridiagrammaa,

kuvio 3 esittää mitatun kapasitanssin käyrää funktiona ajasta, kun substraatti on lisätty,

kuvio 4 esittää kaaviollisesti entsymaattisen aktiviteetin määrittämenettelyä,

kuvio 5 esittää adsorboituneiden substraattimolekyylien kerrospak-suutta ($\sim 1/C_s$) liuoksen substraattipitoisuuden funktiona,

kuvio 6 esittää kaaviollisena kuvantona immunologista reaktiota tutkittaessa käytettyä menettelyä, ja

kuvio 7 esittää kaaviollisena kuvantona menettelyä silloin kun tutkitaan biokemiallista reaktiota, jossa vaikutetaan ympäröivässä liuoksessa olevaan substraattiin.

Suoritus-esimerkit numeroidut ja esitetyt selitykset löytyvät

Ensimmäisessä sovellutusesimerkissään keksintö selitetään seriini-proteaasien entsymaattisen aktiviteetin määrittäksen yhteydessä.

Keksintö perustuu siihen, että sillä substraatilla, jota käytetään, on luontainen kyky adsorboitua metalliselle pinnalle ja desorboitua kyseessä olevien entsyymien läsnäollessa. Kuviossa 1 on esitetty mittauslaite, jonka avulla mitataan liuokseen 4 upotettujen kahden platinaelektrodin 2, 3 välinen vaihtojänniteimpedanssi. Mittauslaitteeseen kuuluu impedanssi-mittaussilta 1, signaalin kehitin 5 ja nollahavaintsimella varustettu vahvistin 6. Aluksi mittauslaite sisältää pelkästään puskuriliuosta, jonka pH on 8,2 ja ioniväkevyys 0,15. Näillä pH:n ja ioniväkevyyden arvoilla kyseessä olevien tutkittavien entsyymien aktiviteetti on optimissaan. Kun ioniväkevyys

on suuri, se aiheuttaa elektrodien polarisoitumista, jos mittaus suoritetaan verraten alhaisessa taajuudessa (tässä tapauksessa 100 kHz). Sarjan vastuksen R_g määrää elektrolyytin johtokyky, ja sen kapasitanssin C_g pääasiassa elektrodien polarisaatio ja mahdollinen adsorboitunut molekyylikerros.

Kuvion 1 mukaan on ilmeistä, että mittauslaite on kytketty sillä tavoin, että se muodostaa impedanssi-mittaussillan yhden haaran. Jos ^{substraatti}puskuriliuokseen lisätään nyt pieni määrä sitä lajia polypeptidisubstraattia, joka on mainittu US-patenttijulkaisussa 3 884 896, mitattu kapasitanssi C_g muuttuu ajan funktiona, katso kuviota 3. Kapasitanssi C_g pienenee ajan funktiona, katso käyrää a kuviossa 3, sen johdosta, että polypeptidimolekyylit adsorboituvat elektrodipinnoille. Vähitellen saavutetaan tasapaino liuoksessa olevien polypeptidimolekyylien ja elektrodipinnoille adsorboituneiden molekyylien välillä. Tällöin elektrodipinnoille adsorboituneena on oletettavasti yksimolekyylinen kerros substraattimolekyyliä.

Jos nyt kuvion 3 pisteen A kohdalla lisätään entsyymiliuosta, jolla on kyky halkaista polypeptidi, mitattu kapasitanssi C_g muuttuu taas. Kapasitanssi C_g suurenee ja palautuu alkuperäiseen arvoonsa, katso käyrää b kuviossa 3. Tämä kapasitanssin muutos johtuu pääasiassa siitä, että lisätty entsyymi vaikuttaa adsorboituneeseen polypeptidiin. Tämä lisätty entsyymi voi olla esimerkiksi trombiinia, trypsiiniä tai plasmiinia (seriini-proteaaseja), joka hydrolysoi polypeptidisubstraatin, jolloin adsorboituneet molekyylit täydellisesti tai osaksi irtautuvat eli "kuluvat", niin että mittauslaitteen kapasitanssi muuttuu. Kapasitanssin muutos aikayksikköä johti eli kuvion 3 käyrän b alkukaltevuus, on entsyymäattisen aktiviteetin mitta.

Mittauslaite voidaan kalibroida tunnetun entsyymimäärän avulla. Kalibrointikäyrää voidaan sitten käyttää mitattaessa liuosta, jossa on tuntematon määrä entsyymiä. Veriplasmasta mitattaessa antientsyymimäärällä on mielenkiintoa. Mainittu määrä voidaan määrittää lisäämällä veriplasmaan tunnettu määrä entsyymiä. Muutaman minuutin kuluttua, kun antientsyymi on inhiboitunut, jäljellä oleva entsyymimäärä mitataan. Jos tämä menettely suoritetaan kahdelle erilaiselle entsyymi- tai plasmamäärälle, alkuperäinen entsyymimäärä voidaan ekstrapoloida.

Nyt selitettävä menetelmä entsyymiaktiviteetin määrittämiseksi on kaaviollisesti esitetty kuviossa 4, jossa kuvio 4a esittää mittauslaitetta elektrodit upotettuna substraattiliuokseen, jolloin substraattimolekyylit S ovat jakautuneina liuoksessa oleviksi molekyyleiksi ja elektrodipinnoille adsorboituneiksi molekyyleiksi. Kun pitoisuus on pieni, niiden välinen suhde pysyy vakiona. Kun suhde suurenee, elektrodipinnat täyttyvät vähitellen, ja yhä pienempi osa lisätystä molekyyleistä adsorboituu. Kuvion 5 diagramma esittää kerroksen paksuutta polypeptidisubstraatin eri väkevyyksissä (1 mM 0,5 ml:ssa puskuriliuosta sisältävän polypeptidin eri määriä). Diagrammasta selviää, että todennäköisesti yksimolekyylinen kerros peptidimolekyylejä adsorboituu suurissa peptidipitoisuuksissa. Jos substraattia vielä lisätään, tämä suurentaa pääasiassa liuoksessa olevien molekyyliden lukumäärää.

Jos nyt lisätään jotakin entsyymiä, katso kuviota 4b, entsyymimolekyylit E vaikuttavat liuoksessa oleviin molekyyleihin sekä adsorboituneihin molekyyleihin. Kuviossa 4c on esitetty, miten sarjan kapasitanssi C_s muuttuu, kun substraattimolekyylejä S ja sen jälkeen entsyymimolekyylejä E lisätään. Koska mittauslaite havaitsee ainoastaan adsorboituneiden molekyyliden lukumäärän vaihtelut, on toivottavaa, että niin suuri osa entsyymistä kuin mahdollista vaikuttaa adsorboituneisiin molekyyleihin. Herkkyyden optimi on näin ollen odotettavissa silloin kun läsnä on tietty määrä lisättyä peptidiä. Alhaisessa peptidipitoisuudessa tapahtuu herkkyyden menetyksiä, koska elektrodipintojen täyttymissuhde on pieni, ja suurissa pitoisuuksissa suurin osa lisätystä entsyymistä vaikuttaa liuoksessa oleviin molekyyleihin. Mittauksetkin osoittavat, että tällainen optimi on olemassa.

Edellä selitettyssä esimerkissä substraattina on US-patenttijulkaisussa 3 884 896 selitettyä tyyppiä olevaa polypeptidia, jolla on herkkyyttä trombiinille ynnä muille peptidi-peptidohydrolaasi-tyypisille proteolyyttisille entsyymeille. Substraatti, jota on käytetty, hydrolysoidaan kyseessä olevien entsyymien läsnäollessa, jolloin se kehittää väriä kantavan tuotteen, joka voidaan mitata spektrofotometrisesti. Substraatti, jota on käytetty, ei missään nimessä ole optimaalinen edellä selitettyä sähköistä havaintia varten, mutta pääasia on se, että substraatti perusteellisesti tarttuu kiinni elektrodisiin ja että merkitsevä osa irtoaa entsyymatisessa hydrolyysissä, joka aiheuttaa merkitsevän muutoksen metallielektro-

dien kapasitanssissa. Substraatin on näin ollen tartuttava kiinnisillä tavoin, että entsyymi pääsee käsiksi "herkkään" sidokseen.

~~Samalla~~ Kokeet ovat osoittaneet, että parhaan havaintitehokkuuden saavuttamiseksi substraatin ei pidä kokonaan kyllästä pintaa.

Selitettyssä esimerkissä substraatti on myös lisätty puskuriliuokseen mittauslaitteessa, minkä jälkeen substraatti adsorboituu metallielektrodeille. Eräs vaihtoehto on varustaa elektrodit substraattikerroksella ennen mittausta, so. käyttää esivalmistettuja elektrodia, ja tutkia aiheutuvan kapasitanssin muutosta kun nämä elektrodit upotetaan kyseessä olevaan entsyymiliuokseen. Näin ollen ei ole välttämätöntä, että substraatti adsorboituu metallielektrodille, substraatti voi esimerkiksi olla kemiallisesti sidottu elektrodipintaan, edellyttäen, että substraattimolekyyleillä on sellaiset ominaisuudet, että entsyymi pääsee käsiksi "herkkään" liitokseen, ja että osa substraattimolekyyleistä tai ne kaikki irtoavat, kun entsyymi vaikuttaa molekyyleihin.

Kuvio 6 esittää esimerkkiä, jossa mittauslaitetta käytetään tyyppiä antigeeni-vasta-aine-sidonta olevan immunologisen reaktion tutkimiseen. Edellä selitetyn esimerkin mukaan kahden elektrodin 2, 3 välinen kapasitanssi mitataan impedanssi-mittaussillan 1 avulla, jonka rakenne on samanlainen kuin kuviossa 1. Elektrodipinnat ovat joko jo alunperin esivalmistetut antigeeneillä, tai elektrodit on upotettu antigeenejä sisältävään liuokseen, jolloin antigeenit adsorboituvat elektrodipinnoille ja kapasitanssi mitataan tässä tapauksessa. Sitten elektrodit upotetaan vasta-aineita sisältävään liuokseen, jolloin vasta-aineet sitoutuvat adsorboituneihin antigeeneihin niin että elektrodien pinnalla oleva kerros paksunee, so. kapasitanssi C_s pienenee. Kuvio 6a esittää elektrodia upotettuina puskuriliuokseen 4 ja kun antigeenimolekyylejä (merkitty kirjaimella S) lisätään, antigeenimolekyylejä adsorboituu elektrodipinnoille, kunnes vihdoin syntyy tasapaino liuoksessa olevien antigeenien ja elektrodipinnoille adsorboituneiden antigeenien välille, katso kuviota 6b. Kuviossa 6c esitetään vihdoin vasta-aineiden E lisääminen liuokseen. Jotkin vasta-aineista ovat sidottuina liuoksessa oleviin antigeeneihin ja jotkin niistä elektrodipinnoilla oleviin antigeeneihin. Tässäkin esiintyy lopulta tasapaino, katso käyrää 6d, joka esittää elektrodipintojen välistä sarjakapasitanssia C_s ajan funktiona, kun lisätään antigeenia (S) ja vasta-aineita (E). Käyrän

alkukaltevuuden vasta-aineiden (E) lisäämisen jälkeen määrää vasta-aineiden pitoisuus ja se on pitoisuuden kvantitatiivinen mitta. Vasta-aineiden pitoisuuden kvantitatiivinen mitta voidaan saada myös kapasitanssin kokonaismuutoksesta vasta-aineita lisättäessä.

olet substraattina olevia aineita, jotka sitoutuvat
 Nyt selitettävässä esimerkissä käytettävä erityissubstraatti koostuu vasta-aineista, joiden molekyyleillä on oltava kyky tarttua elektrodien sille tavoin, että vasta-aineiden molekyylit voivat sitoutua antigeenimolekyyliin, ja lisäksi, että muodostuvan antigeeni-vasta-ainekerroksen on pysyttävä riittävän lujasti elektrodilla. Jos antigeeni-vasta-ainekompleksi irtoaa elektrodipinnasta, niin tämä menetelmä toimii edellisen esimerkin mukaan.

Vasta-aineidenkin havaintiin nähden on olemassa optimaalinen antigeenipitoisuus, joka riippuu liuoksessa olevien antigeenien ja elektrodien pinnalla olevien antigeenien välisestä tasapainosta ja jopa yksinäisten ja sidottujen antigeeni- ja vasta-ainemolekyylien tasapainosta.

liuoksessa oleva aine vaikuttaa ainoastaan liuoksessa olevaan substraattiin, menetelmä suoritetaan seuraavalla tavalla.
 Siinä tapauksessa, että tutkittavana oleva aine vaikuttaa ainoastaan liuoksessa olevaan substraattiin, menetelmä suoritetaan seuraavalla tavalla.

liuoksessa oleva aine vaikuttaa ainoastaan liuoksessa olevaan substraattiin, menetelmä suoritetaan seuraavalla tavalla.
 Kun mittauslaitteessa olevaan liuokseen lisätään ainetta, joka vaikuttaa ainoastaan liuoksessa olevaan substraattiin, niin substraattimolekyylien pitoisuus alenee. Liuoksessa olevan substraatin ja adsorboitun substraatin välisen tasapainon ylläpitämiseksi absorboitunut substraatti lähtee irti elektrodipinnasta, mistä seuraa, että elektrodipinnassa oleva kerros ohenee ja kapasitanssi C_s suurenee, katso kuviota 7d. Kapasitanssin muutoksen aikayksikköä kohti eli käyrän kaltevuuden, kun kyseessä olevaa ainetta lisätään, määrää tämän aineen pitoisuus, ja kaltevuus antaa kvantitatiivisen mitan tästä. Sama koskee kapasitanssin kokonaismuutosta (pitkän ajan kuluttua), jota näin ollen voidaan käyttää kyseessä olevan aineen pitoisuuden tai aktiviteetin mittana.

Monissa tapauksissa lisätty aine vaikuttaa sekä liuoksessa olevaan substraattiin että elektrodilla olevaan substraattiin. Kapasitanssin muutos riippuu tällöin kahdesta prosessista, mutta on silti lisätyn aineen pitoisuuden tai aktiviteetin mitta.

Edellä selitetyissä esimerkeissä käytettiin platinaelektrodeja. Elektrodiaineena voidaan käyttää muitakin metalleja. Sellaiset metallit kuin kupari, hopea, molybdeeni, titaani, kulta, palladium ja nikkelikromi ovat myös osoittautuneet toimivan elektrodiaineina. On kuitenkin selvää, että muitakin elektrodityyppejä, kuten puolijohdinelektrodeja, voidaan käyttää. Esimerkkeihin nähden on lisäksi voimassa se, että impedanssi-mittausilta mieluummin on varustettu ulostuloilla, jotka osoittavat kyseessä olevan näytteen kapasitanssin muutosta aikayksikköä kohti ("hetkellinen entsyymiaktiviteetti") ja kapasitanssin kokonaismuutosta ("intergroitu entsyymiaktiviteetti").

Esillä oleva keksintö ei ole rajoitettu edellä olevien esimerkkien mukaisiin menetelmiin, vaan monenlaisia modifikaatioita voidaan tehdä keksinnön hengestä ja puitteista poikkeamatta.

Patenttivaatimukset

4.2.3 b 1. Menetelmä entsyymaattisten ynnä muiden biokemiallisten reaktioi-
den tutkimiseksi, joissa se aine, jonka aktiviteetti/pitoisuus on
tarkoitus määrittää, vaikuttaa substraattiin, joka on spesifinen
kyseessä olevalle reaktiolle, t u n n e t t u siitä, että substraati-
tilla päällystetyillä elektrodeilla varustetun mittauslaitteen kap-
sitanssi määritetään vertailuarvona, minkä jälkeen se aine, jonka
aktiviteetti/pitoisuus on tarkoitus määrittää, lisätään mittauslait-
teeseen, minkä jälkeen suoritetaan kapasitanssin muutoksen mittaus,
jonka muodossa saadaan kvantitatiivinen mitta sen aineen aktivitee-
tista/pitoisuudesta, joka on näytteessä läsnä ja vaikuttaa elektro-
deihin sidottuun spesifiseen substraattiin.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
että elektrodipinnoilla oleva substraattikerros muodostetaan upot-
tamalla elektrodit liuokseen, jossa on elektrodipinnoille adsorboi-
tumiskykyistä substraattia.

fos
PH 31 3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,
että sitä ainetta lisättäessä, jonka aktiviteetti tai pitoisuus on
tarkoitus määrittää, elektrodipinnoille adsorboituneet substraatti-
molekyylit dissosioituvat täydellisesti tai osittain.

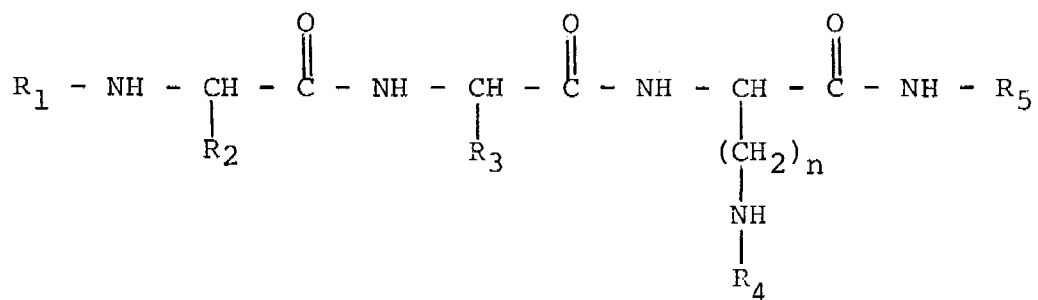
4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä,

että sitä ainetta lisättäessä, jonka aktiviteetti tai pitoisuus on tarkoitus määrittää, adsorboituneet substraattimolekyylit sitovat lisätyt molekyylit, jolloin elektrodipinnoilla olevan kerroksen paksuus suurenee.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että elektrodien välinen kapasitanssi mitataan sähköisen impedanssimittaussillan avulla.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että määrittäminen suoritetaan seriiniproteaasille, jolloin substraatti koostuu synteettisistä; halkaistavissa olevista polypeptideistä, jotka ovat spesifisiä seriiniproteaaseille.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että substraatti on kaavan



mukaista ainetta tai jotakin sen suolaa, jossa kaavassa R_1 on vety, jokin alkyylidikarbonyyli, jossa on 1-12 hiiliatomia, jokin ω -aminoalkyylidikarbonyyli, jossa on 1-12 hiiliatomia suorassa ketjussa, sykloheksyylidikarbonyyli, ω -sykloheksyylialkyylidikarbonyyli, jossa on 1-6 hiiliatomia suorassa ketjussa, 4-aminoetyyli-sykloheksyylidikarbonyyli, bensoyyli, yhdellä tai useammalla, halogeeniatomien, metyylin, amino- ja fenyyli-ryhmien joukosta valitulla substituentilla substituoitu bensoyyli, jokin ω -fenyylialkyyli-karbonyyli, jossa on 1-6 hiiliatomia suorassa ketjussa, benseenisulfonyyli, 4-tolueenisulfonyyli tai N^{α} -bensoyyli-fenyyli-alkyyli; R_2 on fenyyli, bensyyli, 4-hydroksibensyyli, 4-metoksibensyyli tai 4-metyylibensyyli; R_3 on suoraketjuinen, haaraketjuinen tai syklinen alkyyli, jossa on 3-8 hiiliatomia, fenyyli tai bensyyli; n on 3 tai 4; R_4 on vety tai guanyyli; ja R_5 on fenyyli, nitrofenyyli, metyylinitrofenyyli, dinitrofenyyli, naftyyli, nitronaftyyli, kinolyyli tai nitrokinolyyli.

8. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että adsorboituneet substraattimolekyylit ovat niiden molekyylien inhibiittoreita, joiden aktiviteetti tai pitoisuus on tarkoitus määrittää.

9. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, adsorboituneet substraattimolekyylit koostuvat niiden hormonien reseptoreista, joiden aktiviteetti tai pitoisuus on tarkoitus määrittää.

10. Biokemiallisesti spesifisellä substraatilla päällystetyt elektrodit sellaisten aineitten määrittystä varten, joilla on entsyymaattista, immunologista tai muuta biokemiallista aktiviteettia, t u n n e t t u siitä, että määritettävä aine vaikuttaa substraattiin sillä tavoin, että kapasitanssi päällystetyt elektrodit sisältävässä mittauskennossa muuttuu niihin vertailuarvoihin verrattuna, jotka on mitattu mittauslaitteessa ilman substraattiin vaikuttavaa ainetta.

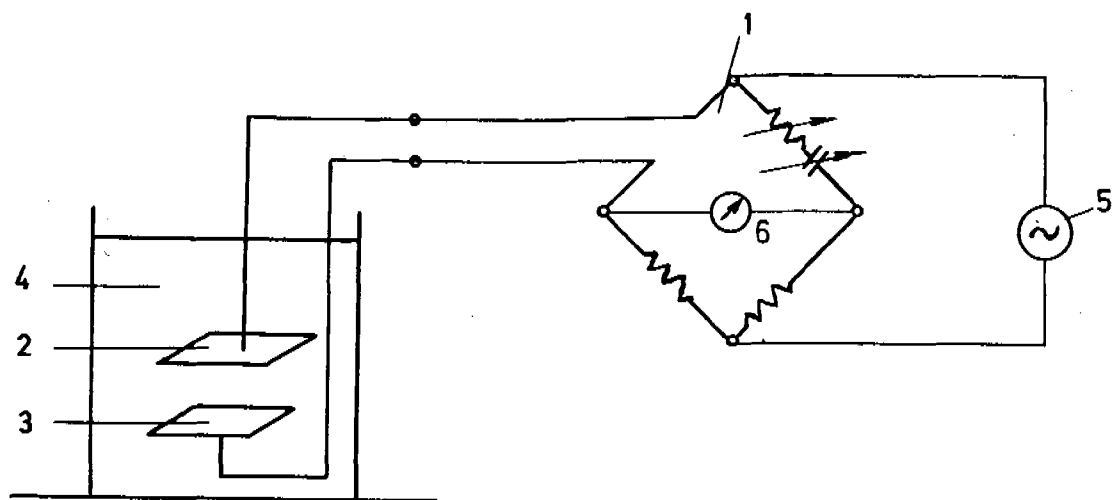


Fig. 1

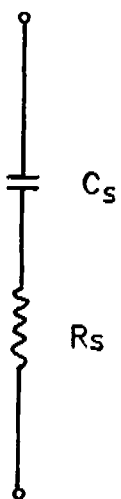


Fig. 2

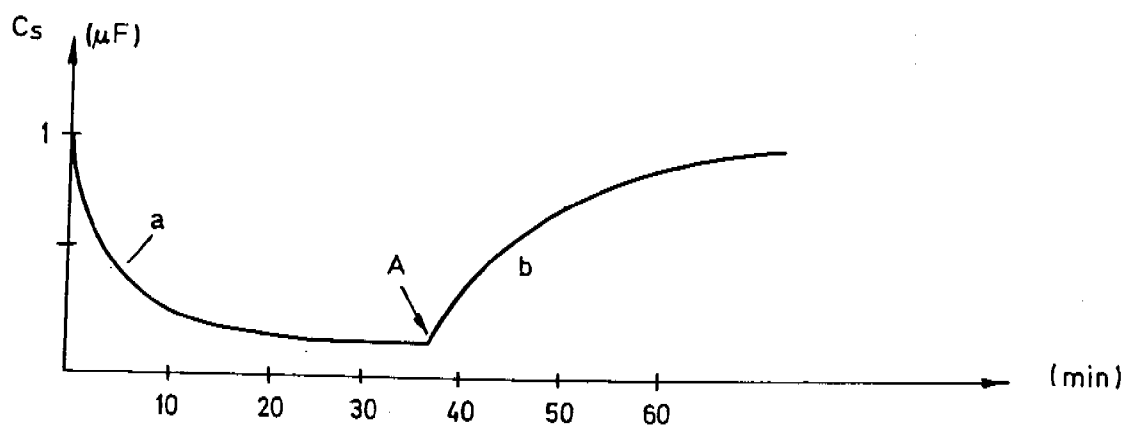


Fig. 3

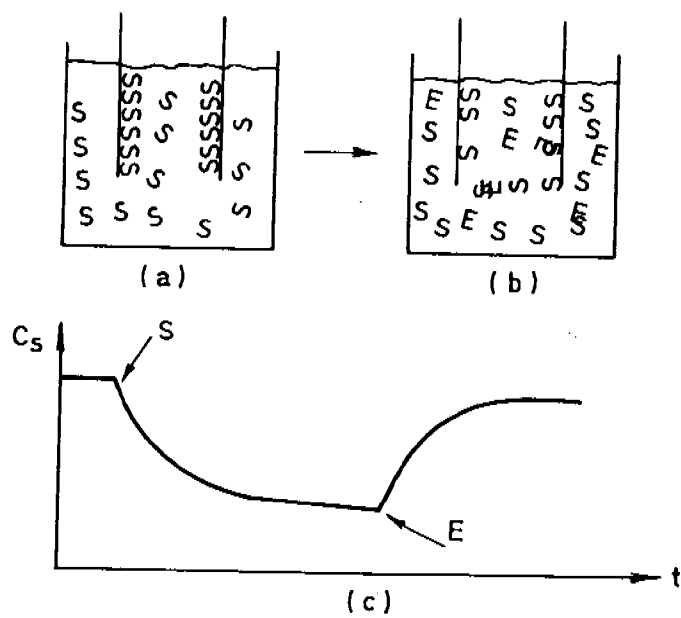


Fig. 4

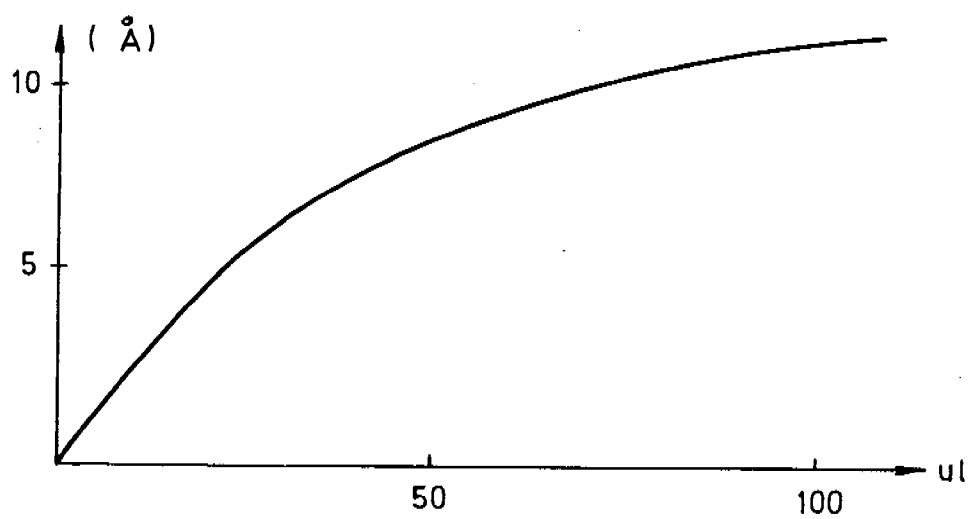


Fig. 5

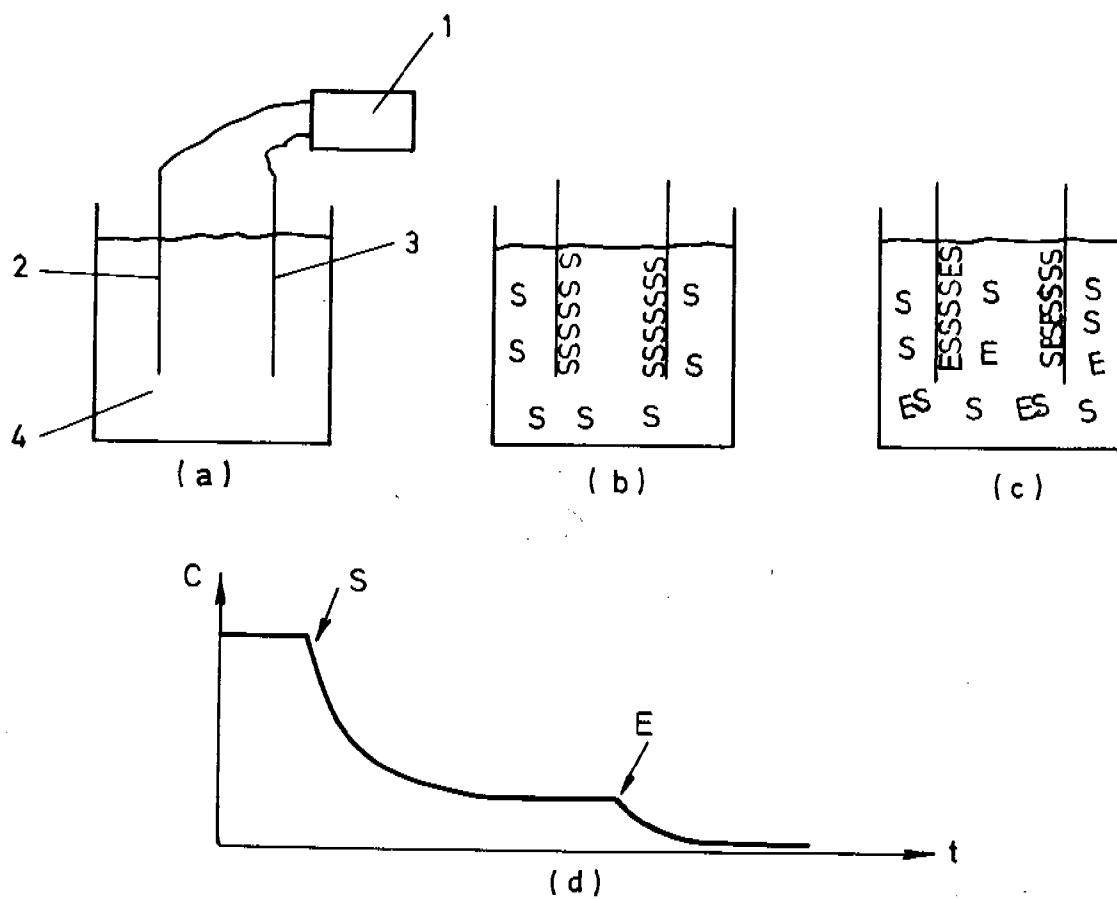
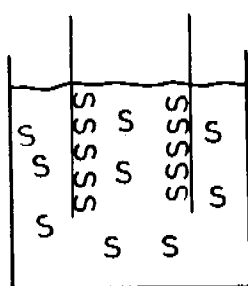
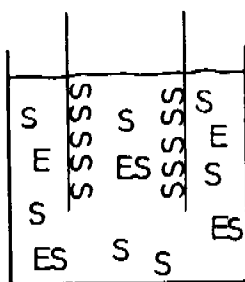


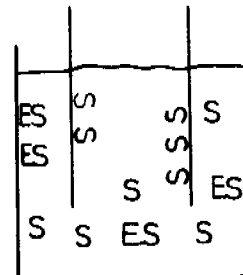
Fig. 6



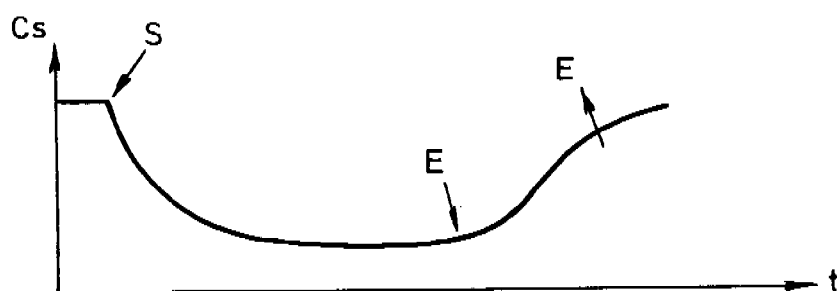
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 7

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

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

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

Suomi - Finland _____

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige

K 6913270-2 (G01N 33/16)

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

62.81 Ewa Kainio

Allekirjoitus