



FI 0000963678



(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT
C (45) Patentti myönnetty
Patent meddelat 10 06 1996

96367

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

G 01N 33/546, 33/533, 33/58, 21/64

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	944865
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	17.10.94
(24) Alkupäivä - Löpdag	17.10.94
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	29.02.96
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.02.96

(71) Hakija - Sökande

1. Soini, Erkki Juhani, Parainen, Kryingintie 20, 21610 Kirjala, (FI)
2. Savitsky, Alexander Pavlovich, Selskohozejstvennaja, UL. 11-3-43, 129226 Moskva, Russian Federation, (RU)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Soini, Erkki Juhani, Parainen, Kryingintie 20, 21610 Kirjala, (FI)
2. Savitsky, Alexander Pavlovich, Selskohozejstvennaja, UL. 11-3-43, 129226 Moskva, Russian Federation, (RU)

(74) Asiamies - Ombud: Turun Patenttitoimisto Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Biospecifinen määritysmenetelmä
Biospesifik bestämningssmetod

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI C 90695 (G 01N 33/546), EP A 71991 (G 01N 33/58), EP A 127797 (C 07D 487/22),
EP A 126450 (G 01N 33/58), US A 5028545 (G 01N 33/566)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee biospesifistä moniparametrasta määritysmenetelmää, jossa käytetään ennakolta valmistettujen, eri luokkiin jaettujen ja eri analyyttejä edustavien mikropartikkeleiden seosta. Eri luokkia edustavat mikropartikkelit on päällystetty eri analyyttejä sitovilla biospesifisillä reagensseillä ja partikkelit sisältävät yhtä tai useampaa fluoresoivaa tetrapyrroliyhdistettä yhtenä tai useampana pitoisuutena mikropartikkeliluokasta riippuen. Tetrapyrroliyhdisteiden fluoresenssiemission voimakkuus ilmaisee mikropartikkelin luokan ja luminesenssin emissio ilmaisee mikropartikkeliin sitoutuneen analyytin määrän.

Uppfinningen gäller en biospecifik multiparametrisk bestämningssmetod, där man använder en blandning av på förhand tillverkade, i olika kategorier indelade mikropartiklar som representerar olika analyter. Mikropartiklar hörande till olika kategorier är belagda med olika biospecifika reagens, som binder olika analyter och mikropartiklarna innehåller en eller flera olika fluorescerande tetrapyrroolföreningar i en eller flera koncentrationer beroende på mikropartikelkategorin. Styrkan hos tetrapyrroolföreningarnas fluorescensemission anger mikropartikelns kategori och luminiscensemissionen anger mängden av analyt bunden till mikropartikeln.

BIOSPESIFINEN MÄÄRITYSMENETELMÄ

Immunomääritys on vakiintunut biospesifinen
määritysmenetelmä ja sen eri sovellutuksia käytetään
laajalti rutiinidiagnostiikassa ja tutkimustoiminnassa.
Toinen biospesifisten määritysten ryhmä, joskin vielä
5 kehityksen alaisena oleva, on DNA- ja
RNA-hybridisaatiomääritys. Tavallisimmin nämä menetelmät
perustuvat merkkiainetekniikkaan, joka tarkoittaa sitä,
että spesifiseen reagenssiin on liitetty leima. Nykyisin
käytettyjä leimoja ovat radioisotoopit, entsyymit,
10 luminoivat leimat ja fluoresoivat leimat.
Rutiinidiagnostiikassa on jatkuvasti kasvava moniparametri-
sen analytiikan tarve. Valitettavasti nykyiset menetelmät
eivät salli useamman kuin kahden tai kolmen samanaikaisesti
mitattavan bioaffinitettireagenssien leiman käyttöä, koska
15 näiden eri leimojen antamien signaalien spektrometrinen
erottelu ei ole mahdollista riittävällä tarkkuudella. Eri
radioisotooppien tai fluoresoivien leimojen emissiokaistat
peittävät huomattavasti toisiaan ja sen seurauksena eri
analyyttien erottelu samasta näytteestä on huonoa
20 vaaditulla pitoisuusalueella.

Moniparametrinen määrittäminen voidaan tehdä mm. siten, että
kutakin analyyttiä vastaavat spesifiset
bioaffiniteettireagenssit on kiinnitetty eri
mikropartikkeleihin, jotka toimivat kiinteinä
25 reaktioalustoina reaktioliuoksessa, jossa on tarpeelliset
reagenssit ja johon lisätään näyte. Mikropartikkelien
sisään tai pintaan on liitetty yksi tai useampi fluoresoiva
väriaine $D_1, D_2, D_3, \dots D_k$ (jäljempänä D_k) kyseessä olevan
mikropartikkelin ja samalla analyytin tunnistamiseksi
30 näiden fluoresoivien väriaineiden antamien signaalien
avulla. Jokaisen partikkelin pinnalla tapahtuva
biospesifinen reaktio mittaa ko. partikkelille spesifistä
analyyttiä ja reagensseihin liitetty fotoluminesenssia
antavan leiman F signaalin perusteella määritetään ko.
35 analyytin pitoisuus reaktioliuoksessa. Näissä tunnetuissa

menetelmissä käytettävät fluoresoivat väriaineet D_k ja fotoluminoiva leima F on valittu siten, että niiden antamat signaalit voidaan erottaa toisistaan signaalien eriaikaisuuden avulla.

- 5 Jäljempänä olevassa tekstissä nimitetään mikropartikkelin luokan tunnistamisessa käytettäviä väriaineita D_k fluoresoiviksi väriaineiksi ja biospesifisen reaktion leimana käytettävää ainetta F fotoluminoivaksi leimaksi, ja viimeksi mainittu voi olla joko fluoresoiva, fosforoiva tai
10 kemi- tai bioluminesenssia synnyttävä leima.

- Edellä kuvatussa menetelmässä mikropartikkeleiden luokan määrittäminen voi perustua mikropartikkelin sisältämän yhden lyhytikäisen väriaineen pitoisuuden mittaamiseen siten, että kyseessä olevan väriaineen pitoisuus vaihtelee eri
15 luokkiin kuuluvissa mikropartikkeleissa esim. 1, 2, 4, 8, jne. Edellisen lisäksi mikropartikkelin luokan määrittäminen voi tapahtua kahden tai useamman väriaineen kombinaation perusteella. Bioaffinitettireaktion mittaamista varten näissä menetelmissä voidaan käyttää fotoluminoivana leimana
20 fluoresoivaa lantanidikelaattia (US-pat. no 5,028,545), bio- tai kemiluminoivaa yhdistettä (FI-pat. no. 89837) tai fosforoivaa yhdistettä (FI-pat. no. 90695).

- Muissa edellä mainituissa patenttijulkaisuissa kuvatut menetelmät perustuvat sellaisiin fluoresoivien ja
25 fotoluminoivien leimojen samanaikaiseen käyttöön, joilla on eri pituiset emission purkautumisajat. Nämä menetelmät perustuvat erityisesti siihen, että fotoluminoivan leiman F signaali voidaan mitata laajalla dynamiikka-alueella ilman, että fluoresoivien leimojen D_k signaalit häiritsevät
30 signaalia F, koska emissiot tapahtuvat oleellisesti eri aikoina. Käytännössä tämä tarkoittaa sitä, että mittaus suoritetaan aikaerotteisella mittausmenetelmällä, joka erottaa tehokkaasti lyhytikäisen fluoresenssiemission pitkäikäisestä emissiosta. Väriaineiden D_k ja leiman F

viritys tapahtuu valopulssilla ja väriaineiden D_k purkautumisaika on yleensä ainakin kaksi kertalukua lyhyempi kuin leiman F. Jos fotoluminoivana leimana käytetään leimaa, jonka emission purkautumisaika on 10-1000
5 mikrosekuntia (esim. lantanidikelaatteja tai metalloporfyriinejä), voivat väriaineet D_k voivat olla tavanomaisia fluoresoivia väriaineitä, joiden fluoresenssin purkautumisaika on lyhyempi kuin 10 ns. Jos fotoluminoivana leimana käytetään bio- tai kemiluminoivaa leimaa, jonka
10 emission purkautumisaika on vähintään useita sekunteja ja lisäksi kemiallisella aktivaattorilla liipaistavissa, voivat väriaineet D_k olla paitsi tavanomaisia fluoresoivia väriaineita myös esimerkiksi lantanidikelaatteja tai metalloporfyriinejä tai muita fluoresoivia tai fosforoivia
15 yhdisteitä, joiden emission purkautumisaika on yleensä vähintään 10 mikrosekunnin ja enintään 10 millisekunnin pituinen.

On selvää, että tässä menetelmässä tarvittava mittauslaite tulee yksinkertaisemmaksi, jos kaikkien fluoresoivien
20 väriaineiden D_k viritysaallonpituus on sama ja emissioaallonpituudet eroavat toisistaan niin paljon, että ne voidaan yksinkertaisin spektrometrisin menetelmin erottaa toisistaan.

Esimerkkinä tällaisista fluoresoivista väriaineista voidaan
25 mainita esim. kaupallisesti saatavat ja yleisesti käytössä olevat fluoresoivat väriaineet fluoreskeiini, RBE (rhodamiini), RBE + Texas Red ja RBE + CY, joista kaksi viimeksi mainittua on ns. "tandem"-väriaineita eli kahden värin konjugaatteja. Tandem-väriaineissa tapahtuu tehokas
30 energiasiirto väriaineelta toiselle ja viritys tehdään ensimmäisen väriaineen viritysaaltopituudella ja emissio saadaan toisen väriaineen emissioaaltopituudella. Näiden neljän väriaineen yhdistelmää voidaan virittää yhdellä ja samalla aaltopituudella 488 nm ja emissiot tapahtuvat 520,
35 560, 613 ja 680 nm:n aaltopituuksilla. Vastaavia usean

väriaineen ja tandemväriaineen yhdistelmiä tunnetaan muitakin.

Toinen esimerkki väriaineiksi D_k sopivasta yhdistelmästä ovat lantanidi-ionien Tb, Dy, Eu ja Sm fluoresoivat
5 kelaatit (FI-pat. hak. no. 931198). Koska näiden kaikkien kelaattien ligandeilla on absorptio 300-360 nm alueella, voidaan niiden fluoresenssi virittää yhdellä ja samalla aaltopituudella. Näiden kelaattien emissioaaltopituudet ovat vastaavasti 545, 575, 613 ja 643 nm.

10 Kolmas esimerkki väriaineiksi D_k sopivasta yhdistelmästä ovat epäorgaaniset yttriumoksidisulfidin ja sinkkisulfidin yms. mikrokiteet, joita käytetään yleisesti värillisinä loisteaineina esim. televisioputkissa. Näissä aineissa
15 käytetään fluoresenssin aktivaattorina esim lantanideja tai muita metalleja jotka määräävät kiteen fluoresenssin emissioaallonpituuden.

Tämä keksintö liittyy edellä kuvatuissa moniparametrisissä biospesifisissä määritysmenetelmissä kyseeseen tulevien fluoresoivien väriaineiden D_k valintaan. Näiltä aineilta
20 tulee vaatia seuraavia ominaisuuksia: 1) Niillä tulee olla yhteinen fluoresenssin viritysallonpituus ja mielellään bioaffiniteettileiman virityskaistalla, 2) niillä tulee olla erilliset kapeat toisistaan helposti spektrometrisesti erotettavat fluoresenssin emissiokaistat, 3) niiden
25 fluoresoivien viritystilojen purkautumisaijan tulee olla fotoluminoivan leiman emission purkautumisaikaan nähden lyhyt eli nanosekuntiluokkaa, jos fotoluminoivana leiman käytetään esim. lantanidikelaatteja tai
metalloporfyriinejä. Lisäksi keksinnön toimivuudelle on
30 edullista, jos 5) niillä ei ole pienessäkään määrässä pitkäikäisiä fluoresoivia tai fosforoivia viritystiloja ja jos 6) nämä yhdisteet ovat kemiallisesti stabiileja ja voimakkaasti fluoresoivia mikropartikkelien polymeerissä ja jos niiden viritysallonpituuksien ja

emissioaallonpituuksien erotus on suuri.

- Keksinnön tunnusmerkit ilmenevät patenttivaatimuksessa 1. Keksinnölle on tunnusomaista, että fluoresoiviksi väriaineiksi D_k on valittu yksi tai useampi seuraavien
- 5 tetrapyrroli-yhdisteluokkien johdannaisista: porfyriinit, kloriinit, bakteriokloriinit, klorofyllit, purpuriinit, feoforbidit, ftalosyaniinit ja naftalosyaniinit, jolloin valituilla väriaineilla D_k on
- yhteinen fluoresenssin viritysaallonpituus, ja
 - 10 - erilliset kapeat toisistaan helposti spektrometrisesti erottuvat fluoresenssin emissiokaistat, ja
 - niiden fluoresenssin viritystilojen purkautumisaika on lyhyt verrattuna fotoluminoivan leiman F emission purkautumisaikaan.
- 15 Koska tämän keksinnön tarkoittamassa sovelluksessa kyseeseen tulevien fluoresoivien tai fosforoivien bioaffinitettileimojen virityskaistat ovat 300nm-420nm alueella, eivät ylempänä mainitut väriaineet (fluoreskeiini, RBE, RBE + Texas Red ja RBE + CY)
- 20 samoin kuin monet muutkaan yleisesti käytössä olevat tavanomaiset fluoresoivat väriaineet tai tandem-väriaineet, joita on käytetty mikropartikkelien värjäämiseen, täytä edellä mainittua ehtoa 1. Näiden aineiden emissiospektrit ovat suhteellisen leveitä, eivätkä sen vuoksi myöskään
- 25 täytä edellä mainittua ehtoa 2 riittävän hyvin. FI-pat. hakemuksessa no. 931198 kuvatussa menetelmässä käytetyt lantanidikelaatit eivät täytä ehtoa 4 ja 5. Sama koskee myös fluoresoivien mikrokiteiden käyttöä.

- Tämä keksintö liittyy mikropartikkelien tunnistamisessa
- 30 käytettävien väriaineiden valintaan ja keksinnön sisältö on erityisesti siinä, että edellä mainittuja ehtoja 1-6 täyttäviä yhdisteitä löytyy seuraavien tetrapyrroliyhdisteiden joukosta: porfyriinit, kloriinit, bakteriokloriinit, klorofyllit, purpuriinit, feoforbidit,

ftalosyaniinit ja naftalosyaniinit. Näillä yhdisteillä on yleensä leveät toisensä peittävät absorptiokaistat lähiultraviolettialueella (320nm-450nm) ja kapeat erilliset fluoresenssin emissiokaistat punaisella ja

5 lähi-infrapuna-alueella (600nm-800nm). Näitä yhdisteitä voidaan tuottaa synteettisesti tai mikrobiologisesti (Porphyrins, D.Dolphin, Ed., Elsevier, Amsterdam-N.-Y.-London, 1980, V.1-3) ja niitä on käytetty erilaisissa analyttisissä sovelluksissa (D.B. Papkovsky,

10 Appl. Fluor. Technology 3 (1991) 16-23; EP 0127797; EP 0071991; Russian patent SU 1,659,477).

Esimerkkeinä tetrapyrroliyhdisteistä esitetään seuraavat:

- 1) deuteroporfyrini IX
- 15 2) mesoporfyrini IX
- 3) protoporfyrinin (IX) dimetyyliesteri
- 4) oktaetyyliporfiini
- 5) tetrafenyyliporfiini
- 6) tetra-(2-metoksi)-fenyyliporfiini
- 20 7) koproporfyrinin dimetyyliesterin kloriini
- 8) koproporfyrinin dimetyyliesterin bakteriokloriini
- 9) alumiiniftalosyaniini
- 10) sinkkiftalosyaniini.

Taulukossa 1 on esitetty näiden tetrapyrroliyhdisteiden

25 1-10 viritysaallonpituudet (λ_{exc}) ja emissioaallonpituudet (λ_{em}). Kuvissa 3a-3j on esitetty näiden yhdisteiden viritys ja emissiospektrit. Voidaan todeta, että mitattujen yhdisteiden spektrit täyttävät ehdot 1-3.

Näitä tetrapyrroliyhdisteitä voidaan moniparametrisessa

30 määritysmenetelmässä täydentää muilla tunnetuilla orgaanisilla fluoresoivilla yhdisteillä, joilla on sama viritysaallonpituus ja joiden emissiokaista on tetrapyrroliyhdisteiden emissioalueen lyhyemmällä puolella. Esimerkkinä tällaisesta yhdisteestä taulukossa 1 on

35 esitetty kumariini 120.

Kuvassa 1 on esitetty käyriä, jotka kuvaavat näiden tetrapyrroliyhdisteiden 1-10 emissioiden purkautumis-nopeuksia. Käyrästön logaritminen pysty akseli ilmaisee signaalin voimakkuuden ja vaaka-akseli ilmaisee aikaa millisekunteina. Mittausta varten yhdisteet oli sekoitettu kiinteään polymeerimatriisiin (Merckoglas) ja käyrät mitattiin aikaerotteisella fluorometrillä. Käyrä 11 on puhtaalla matriisilla saatu tulos, jonka emission purkautumisaajan tiedetään olevan lyhyt. Käyrä 12 on tyhjästä kyvetistä saatu tulos. Tuloksista voidaan päätellä, että ko. yhdisteiden 1-10 emission purkautumisaika on lyhyt ja ne täyttävät ehdon 4.

Kuvassa 2 on esitty näiden samojen näytteiden pitkäikäisen emission voimakkuudet aikaikkunassa, joka alkaa 100 mikrosekuntia ja loppuu 1000 mikrosekuntia virityspulssin jälkeen. Tuloksista voidaan todeta, että signaalivoimakkuudet eivät eroa merkittävästi kumariinin (11), puhtaan matriisin (12) ja tyhjän kyvetin (13) antamista signaalivoimakkuuksista yhdistettä 4 lukuunottamatta, jonka pitkäikäinen emissiokomponentti on kaksi kertaa voimakkaampi kuin muiden yhdisteiden. Kaksinkertainen ero ei kuitenkaan ole merkittävä tässä sovelluksessa. Tuloksista voidaan päätellä, että ko. yhdisteillä ei esiinny pitkäikäisiä fluoresoivia tai fosforoivia viritystiloja ja ne täyttävät ehdon 5.

Kuvissa 3a, 3b,3j on esitetty tetrapyrroli-yhdisteiden 1-10 ja kuvassa 3k kumariinin viritys- ja emissiospektrit. Näistä spektreistä voidaan helposti todeta, että niiden joukosta on helppo valita aikakin kolme eri yhdistettä, joiden emissiospektrit erottuvat selvästi toisistaan. Esimerkkinä on kuvassa 4b esitetty kolmen yhdisteen 1,6 ja 10 emissiospektrit yhdessä kumariinin emissiospektrin kanssa. Kunkin yhdisteen emissio voidaan mitata vähintään yhden kertaluvun dynamiikka-alueella ilman toisesta yhdisteestä aiheutuvaa interferenssiä, kun toisten yhdisteiden pitoisuudet vaihtelevat yhden vastaavassa

määrässä. Samojen yhdisteiden viritysspektrit on esitetty kuvassa 4a. Kaikki yhdisteet virittyvät 350-400 nm aallonpituuskaistalla. Yhdisteet olivat kiinteässä matriisissa (Merckoglas). Yhtenäinen viiva esittää 5 viritysspektriä ja katkoviiva emissiospektriä.

Mikropartikkeleita, joiden sisällä, pintakerroksessa tai pinnassa on fluoresoivia väriaineita kuten tetrapyrroliyhdisteitä, voidaan valmistaa monilla eri tunnetuilla tavoilla. Väriaineet voidaan liittää 10 partikkeleiden pintaan kovalenttisesti, jos partikkelien pinnassa on kemiallisesti aktiivisia ryhmiä (Molday, R.S. et al., J.Cell.Biol., 1975, 64, 75-88). Väriaineita voidaan imeyttää mikropartikkelien pintakerrokseen siten, että mikropartikkelit turvotetaan ensin orgaanisessa 15 liuottimessa ja väriaineen imeyttämisen jälkeen orgaaninen liuotin pestään ja haihdutetaan pois. Nämä menetelmät on kuvattu mm. seuraavissa mikropartikkelien valmistajien julkaisuissa: Dyeing Large Particles, julkaisija The Dow Chemical Co., 1972 ja Uniform Latex Particles, julkaisija 20 Seragen Diagnostics Inc. Luonnollisesti väriaineet voidaan lisätä mikropartikkelien valmistuksen yhteydessä ennen polymerisaatiota.

Alan ammattimiehelle on selvää, että keksinnön erilaiset 25 sovellutusmuodot voivat vaihdella jäljempänä esitettävien patenttivaatimusten puitteissa.

Taulukko 1

		λ_{exc}					λ_{em}		
1	deuteroporfyrini IX	397,42	496,90	527,10	569,85		622,82	651,02	689,12
2	mesoporfyrini IX	398,01	498,32	531,10	569,58		624,33	691,04	
3	protoporfyrinin (IX) dimetyyliesteri	402,81	503,13	538,68	576,71		633,91	671,06	702,36
4	oktaetyyliporfiini	396,39	496,95	527,81	567,04		623,39	653,54	689,96
5	tetrafenyyliporfiini	416,70	512,83	548,31	593,75		654,04	717,01	
6	tetra-(2-metoksi)-fenyyliporfiini	421,64	518,95	552,55	597,34		656,42	721,84	
7	koproporfyriinin dimetyyliesterin kloriini	377,97	402,17	492,50	541,26	640,13	650,61		
8	koproporfyriinin dimetyyliesterin bakteriokloriini	370,72	468,78	498,19	542,75	636,56	643,70	720,25	
9	alumiiniftalosyaniini	345,50	607,30	636,54			679,78	748,00	
10	sinkkiftalosyaniini	347,97	538,69	612,55			689,18		
11	kumariini 120	334,45	393,85				426,15		

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Biospesifinen moniparametrinen määrittämenetelmä, jossa käytetään ennakolta valmistettuja, eri luokkiin jaettuja ja eri analyyttejä edustavia mikropartikkeleita kiinteänä kantajana, jossa eri luokkiin kuuluvat mikropartikkelit on
5 päällystetty eri analyyttejä sitovilla biospesifisillä reagensseilla, jossa mikropartikkeleihin on liitetty niiden tunnistamista varten yksi tai useampia fluoresoivia väriaineita D_k yhtenä tai useampana pitoisuutena partikkeliluokasta riippuen, jossa menetelmässä
- 10 - sekoitetaan eri luokkiin kuuluvat mikropartikkelit ja lisätään analysoitava näyte seokseen ja lisätään seokseen fotoluminesenssia antavalla leimalla F leimatut biospesifiset reagenssit, ja
- aktivoidaan fluoresoivat väriaineet D_k ja
- 15 fotoluminesenssia antavat leimat F, ja
- mitataan aikaerotteisella fluorometrillä mikropartikkelien väriaineen D_k fluoresenssin voimakkuus mikropartikkeliluokan tunnistamiseksi ja leiman F fotoluminesenssin voimakkuus eri analyyttimäärien
- 20 määrittämiseksi,
t u n n e t t u siitä, että fluoresoiviksi väriaineiksi D_k on valittu yksi tai useampi seuraavien tetrapyrroli-yhdisteluokkien johdannaisista: porfyriinit, kloriinit, bakteriokloriinit, klorofyllit, purpuriinit,
- 25 feoforbidit, ftalosyaniinit ja naftalosyaniinit, jolloin valituilla väriaineilla D_k on
- yhteinen fluoresenssin viritysaallonpituus, ja
- erilliset kapeat toisistaan helposti spektrometrisesti erottuvat fluoresenssin emissiokaistat, ja
- 30 - niiden fluoresenssin viritystilojen purkautumisaika on lyhyt verrattuna fotoluminoivan leiman F emission purkautumisaikaan.

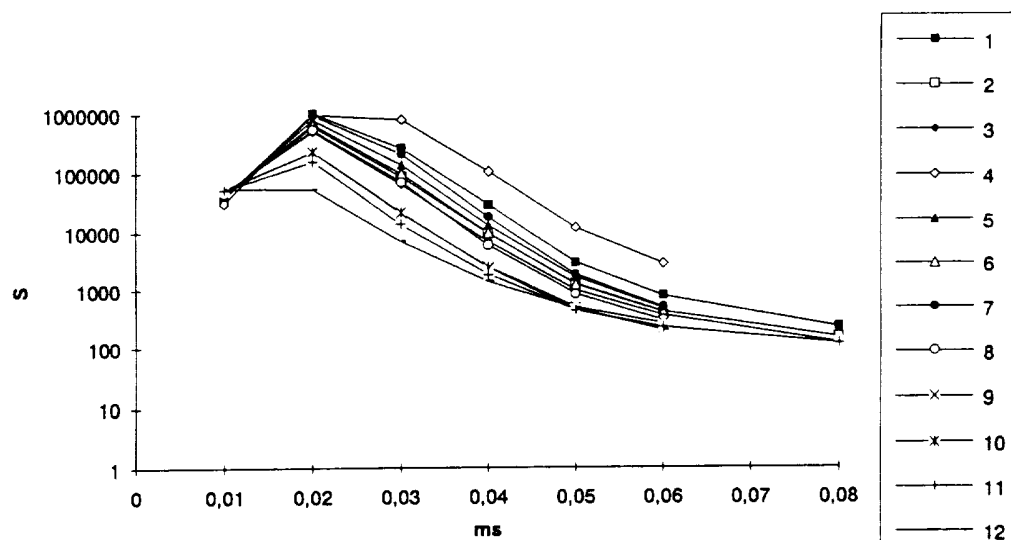
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, jossa fluoresoivina yhdisteinä käytetään yhtä tai useampaa

seuraavista tetrapyrroliyhdisteiden johdannaisista: 1)
deuteroporfyriini IX, 2) mesoporfyriini IX, 3)
protoporfyriinin (IX) dimetyyliesteri, 4)
oktaetyyliporfiini, 5) tetrafenyyliporfiini, 6)
5 tetra-(2-metoksi)-fenyyliporfiini, 7) koproporfyriinin
dimetyyliesterin kloriini 8) koproporfyriinin
dimetyyliesterin bakteriokloriini, 9)
alumiiniftalosyaniini, 10) sinkkiftalosyaniini.

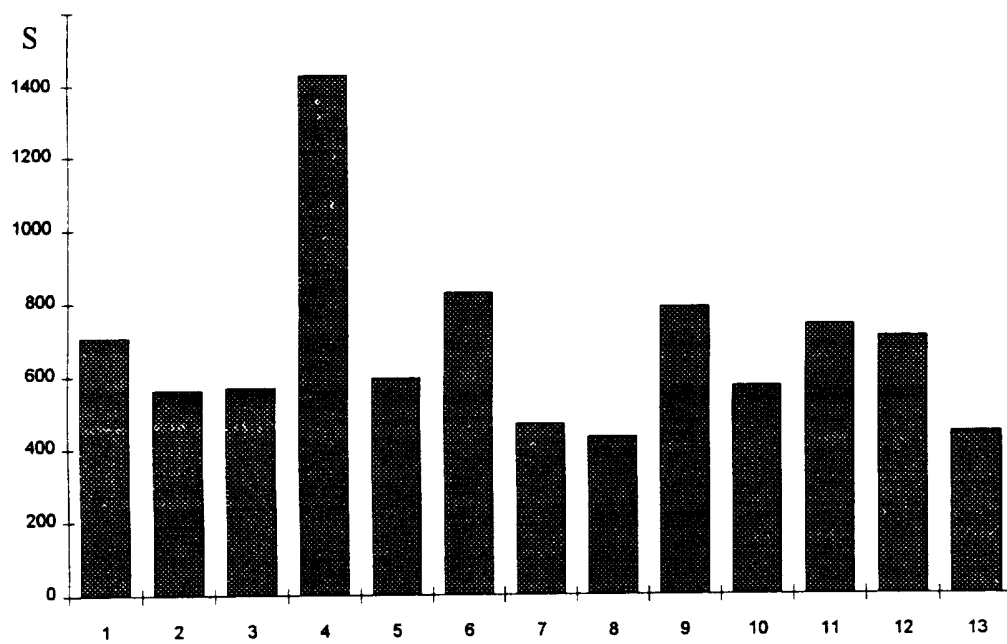
PATENTKRAV

1. Biospesifik multiparametrisk bestämningsmetod, där man använder en blandning av på förhand tillverkade, i olika kategorier indelade mikropartiklar som fast bärare representerande olika analyter, där mikropartiklar hörande till olika kategorier är belagda med olika biospecifika reagens, som binder olika analyter och där mikropartiklarna innehåller en eller flera olika fluorescerande färgämnen D_k i en eller flera koncentrationer beroende av mikropartikelkategorin, i vilken metod man
- 5
- 10 - blandar de till olika kategorier hörande mikropartiklarna och tillsätter provet som skall analyseras till blandningen och tillsätter med en fotoluminerande markör märkta biospesifika reagens till blandningen, och
- aktiverar de fluorescerande färgämnena D_k och de
- 15 fotoluminerande markörerna F , och
- med en tidsfördröjd fluorimeter mäter styrkan för fluorescensen hos mikropartiklarnas färgämne D_k för bestämning av mikropartikelkategorin och styrkan för fotoluminescensen hos markören F för bestämning av
- 20 analytmängderna, kännetecknad därav, att man som fluorescerande föreningar D_k valt ett eller flera av de följande tetrapyrroloföreningssklassernas derivat: porfyriner, kloriner, bakteriokloriner, klorofyller, purpuriner, feoforbidider, ftalosyaniner och
- 25 naftalosyaniner, varvid de valda färgämnena D_k
- har gemensam exciteringsvåglängd för fluorescensen, och
- har skilda smala från varandra spektrometriskt lätt särskiljbara emissionsband, och
- upplösningstiden för fluoressensens exciteringstillstånd
- 30 hos dem är kort jämfört med upplösningstiden för emissionen hos den fotoluminerande markören F .
2. Metod enligt patentkravet 1 kännetecknad därav, att man som fluorescerande föreningar använder ett eller flera av

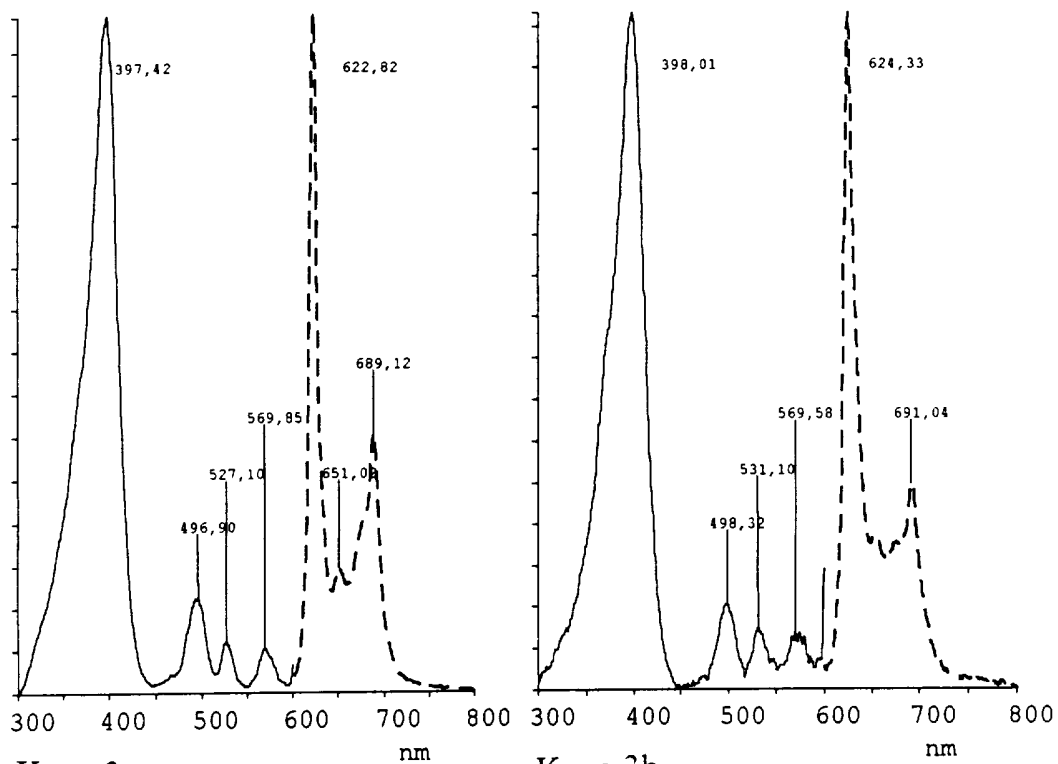
de följande tetrapyrrolföreningarnas derivat: 1)
deuteroporfyrin IX, 2) mesoporfyrin IX, 3) protoporfyrin
(IX) dimetylester, 4) oktaetylporfin, 5) tetrafenylporfin,
6) tetra-(2-metoxi)-fenylporfin, 7) koproporfyrin
5 dimetylester klorin 8) koproporfyrin dimetylester
bakterioklorin, 9) aluminiumftalosyanin, 10)
zinkftalosyanin.



Kuva 1

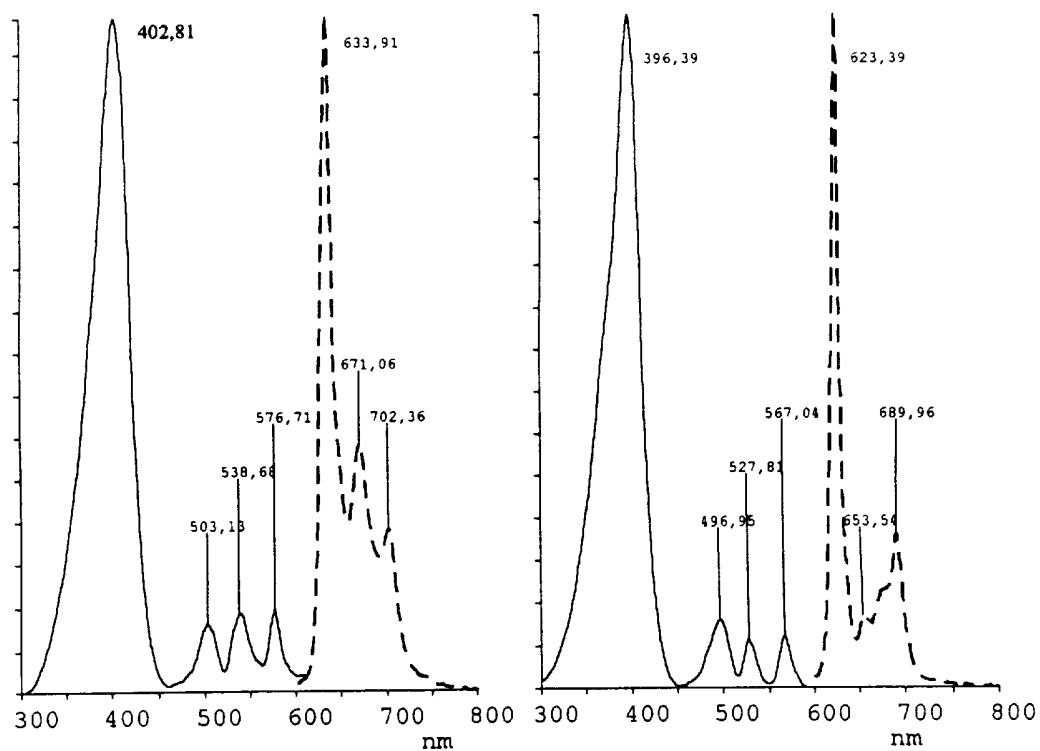


Kuva 2



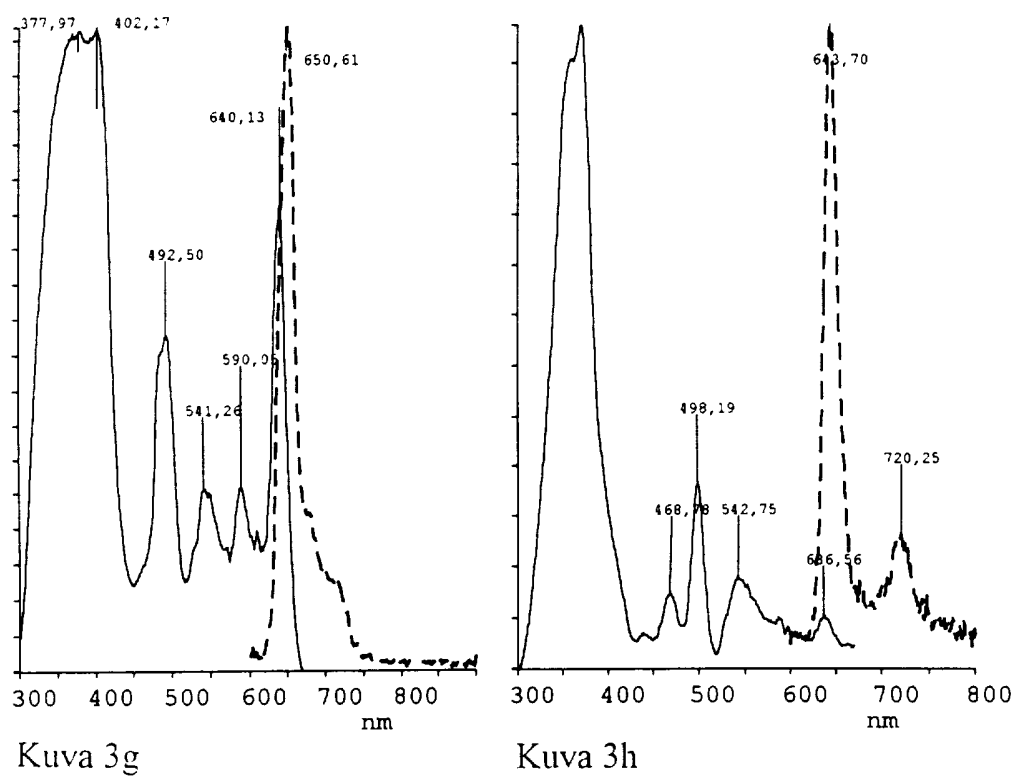
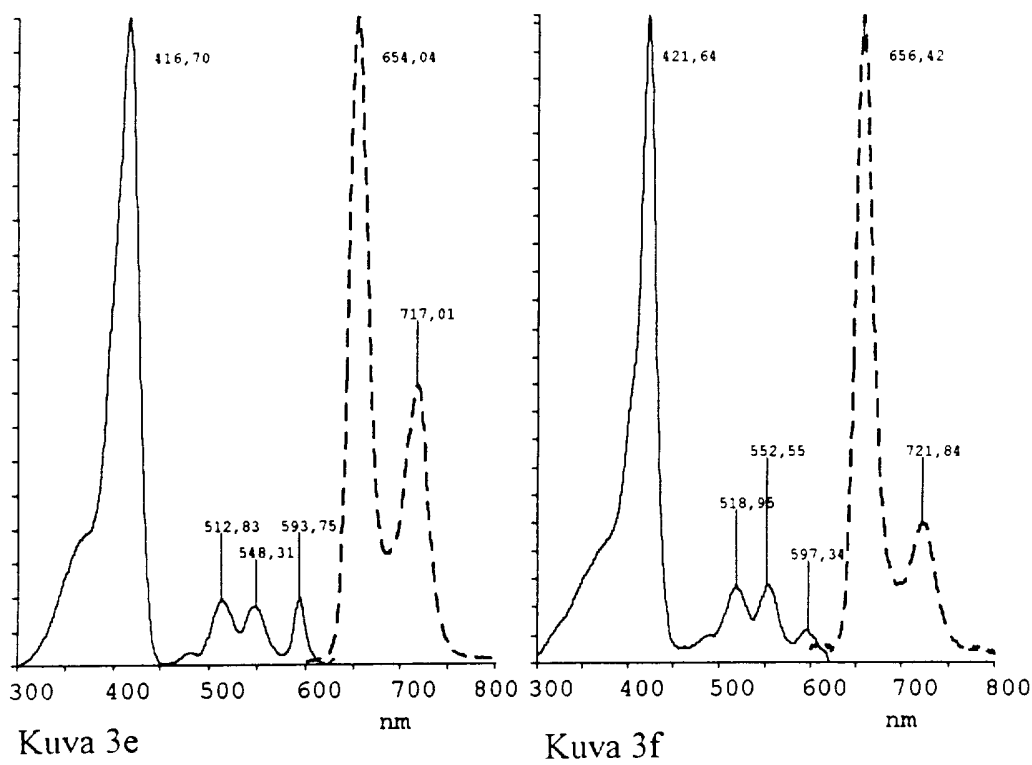
Kuva 3a

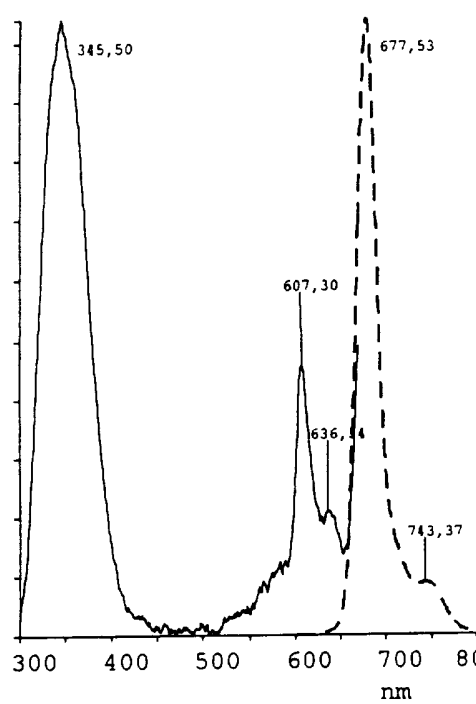
Kuva 3b



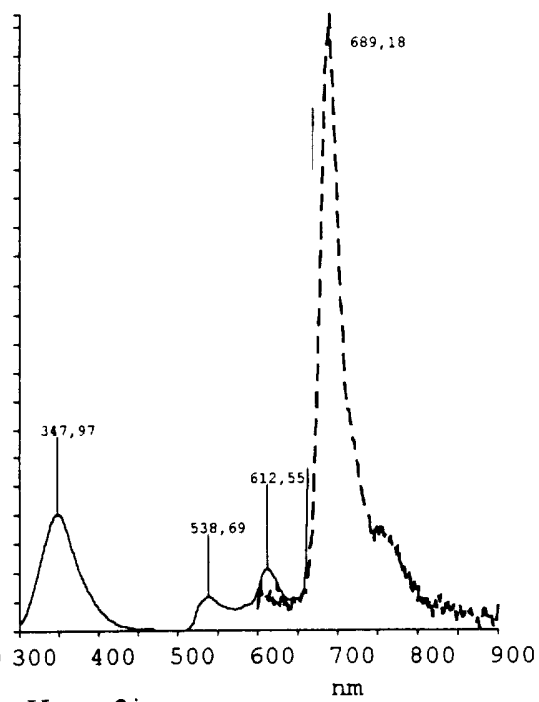
Kuva 3c

Kuva 3d

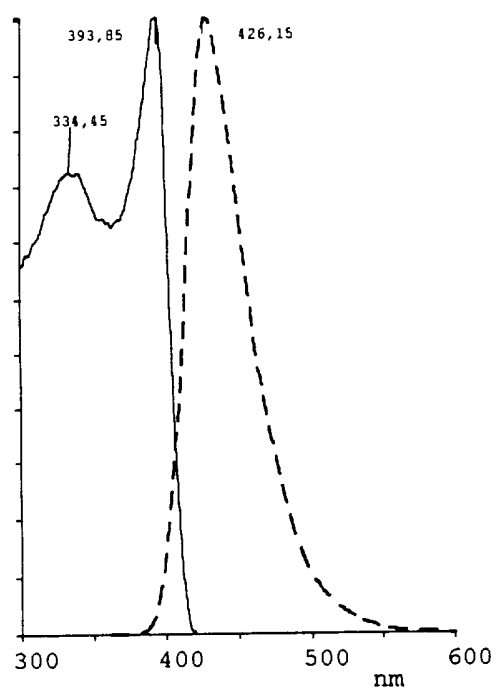




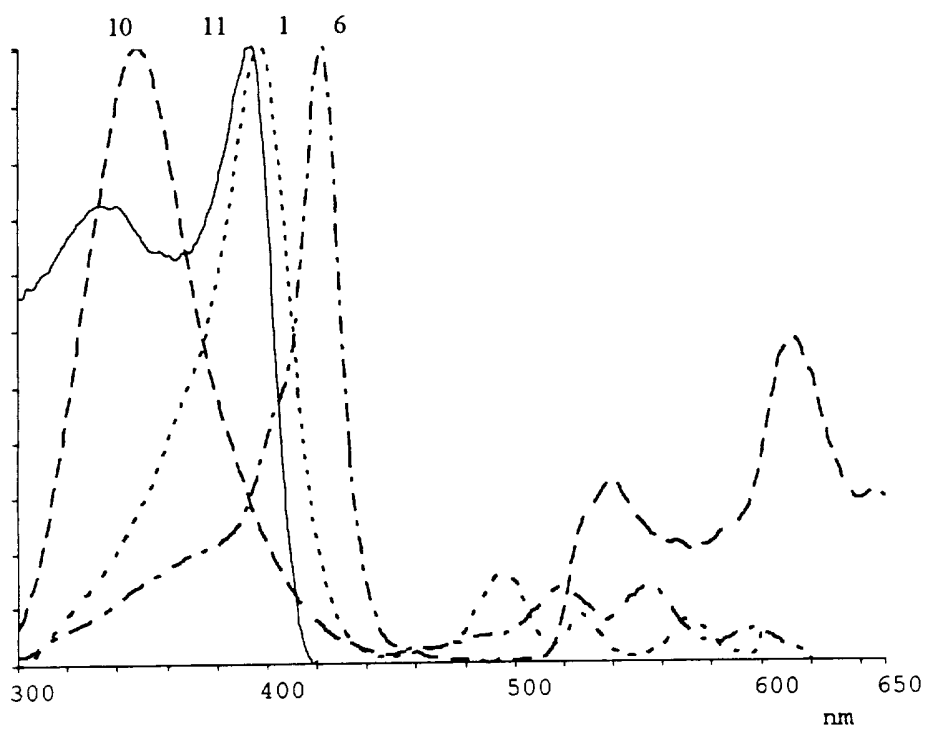
Kuva 3i



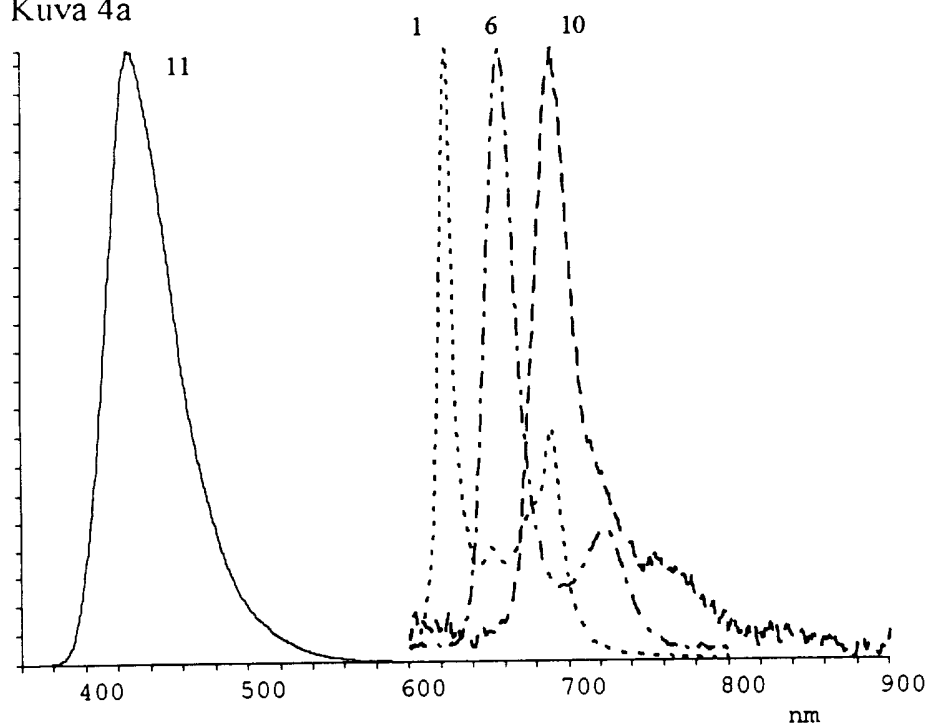
Kuva 3j



Kuva 3k



Kuva 4a



Kuva 4b