

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 770587 A7**

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

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 770587

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

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 23.02.1977

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 23.02.1977

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 27.09.1977

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

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

26.03.1976 US 670924

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Coulter Diagnostics Inc, 740 West 83rd Street Hialeah, Fla., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Armstrong, Douglas, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

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

Stabiloidut hematologiset reagenssiliuokset

Stabiliserade hematologiska reagenslösningar

COULTER DIAGNOSTICS, INC., 740 West 83rd Street, Hialeach, Florida
33014, U.S.A.

Stabiloidut hematologiset reagenssiliuokset - Stabiliserade
hematologiska reagenslösningar

Tämä keksintö koskee 2-fenoksietanolin käyttämistä bakteriostaattisena ja fungistaattisena eli bakteerien ja sienien lisääntymistä ehkäisevänä aineena ja natriumfluoridin käyttämistä stabiloivana aineena reagensseissa, kun suoritetaan hematologisia tutkimuksia käyttäen Coulter-tyyppisiä elektronisia hiukkasanalyysilaitteita.

Suomalaisessa patentissa 59173 (patenttihakemus n:o 752687) on tehty selkoa useaan tarkoitukseen soveltuvasta laimennusaineesta, jota voidaan käyttää etupäässä hematologisissa tutkimuksissa kuten verisolujen laskemisessa ja hemoglobiinikonsentraation ja muiden tärkeiden parametrien määrittämisessä verinäytteestä automaattisen elektronisen Coulter-tyyppiä olevan hiukkasanalyysilaitteen avulla. Liuos on osmoottisesti tasapainoitettu solun keskimääräisen volyymin stabiloimista varten, se on atsidivapaata ja siinä käytetään 2-fenoksietanolia bakteriostaattisena ja fungistaattisena aineena.

Natriumfluoridia on käytetty estämään solunseinämien heikkenemistä, mikä aiheutuu 2-fenoksietanolista, ja täten stabiloimaan punaisten verisolujen keskimääräistä soluntilavuutta. Natriumfluoridi edistää myös hemoglobiinin muuttumista syanmethemoglobiiniksi hemoglobiinin

kolorimetrisissä määrityksissä.

Bakteriostaattisen ja fungistaattisen aineen käyttö on aiheuttanut tähän asti haitallisia vaihteluita punaisten verisolujen keskimääräisessä soluntilavuudessa ja johtanut sen vuoksi punaisten verisolujen keskimääräisen soluntilavuuden epästabilisuuteen. Koska halutaan korvata natriumatsidi käyttämällä bakteriostaattista ainetta, kuten on selostettu aikaisemmin mainitussa patentissa, on valittu 2-fenoksietanoli huolimatta siitä, että sitä ei ole koskaan aikaisemmin käytetty tässä ominaisuudessa. 2-fenoksietanoli voi kuitenkin aiheuttaa solun seinämien tuhoutumista tai soluntilavuuden muuttumista. Hemolyysin eli solun särkymisen aiheuttaman probleeman välttämiseksi on käytetty stabiloivaa ainetta syntyneessä systeemissä. Vaikka natriumfluoridi on ollut jo kauan tunnettu säilymistä edistävänä aineena, esimerkiksi glukooksin säilyttämiseen verinäytteissä, on sen käyttäminen stabiloivana aineena syntyneessä systeemissä aivan yllättävä.

Tämän keksinnön kohteena on etoksiloidun fenolin, esimerkiksi 2-fenoksietanolin ja alkalimetallifluoridin, esimerkiksi natriumfluoridin yhdistelmä, jota voidaan käyttää tehokkaasti muissa reagenssiliuoksissa, joita käytetään muihin tarkoituksiin hematologisissa tutkimuksissa, erikoisesti sellaisissa, joissa käytetään elektronisia hiukkastutkimusmenetelmiä.

On osoittautunut, että 2-fenoksietanolia ja natriumfluoridia voidaan käyttää syntyvässä systeemissä tai yhdistelmässä punaisten verisolujen ^{hoitoon} liuotusreagenssissa. Tällaisen liuotusreagenssin on ^{hoitoon} pystyttävä liuottamaan nopeasti punaiset verisolut ja särkemään punaisen verisolun membraani niin, että hiukkaskoko on riittävän pieni, jotta esimerkiksi valkeat verisolut voidaan tunnistaa ja laskea. Samanaikaisesti on ^{hoitoon} liuotusaineen vapautettava hemoglobiini punaisista soluista ja muutettava hemoglobiini syanmethemoglobiiniksi, niin että voidaan suorittaa kolorimetrisiä ^{hoitoon} määrityksiä.

Näiden kahden mainitun aineen yhdistelmällä on saatu aikaan erittäin tehokas bakteereja ja sieniä hävittävä vaikutus, erityisesti silloin, kun ne yhdistetään neliarvoisen ammoniumyhdisteen kanssa. Natriumfluoridia käyttämällä voidaan säilyttää fluoridikonsentraatio ja se edistää myös hemoglobiinin muuttamista syanmethemoglobiiniksi.

Kun hemoglobiini määrätään kolorimetrisesti, tarvitaan kolorimetrin kalibroimiseen kalibroimisliuos. Kalibroimisliuos valmistetaan erikoisesti suolaliuoksella pestyistä ihmisen punaisista verisoluihin ja nämä liuotetaan punaisten verisolujen seinämien särkemiseksi. Kun solujen liuotus on tapahtunut täydellisesti, muutetaan vapautunut hemoglobiini syanmethemoglobiiniksi ja laimennetaan kolorimetrisissä määrityksissä tarvittavaan väkevyyteen. Bakteerien helppo lisääntyminen hemoglobiiniliuoksessa muodostaa tällöin pulman, varsinkin sen tyyppisten bakteerien, joiden kasvua edistää liuoksessa oleva syanidi-ioni, joka on sama kuin tarvitaan syanmethemoglobiinin syntymiseen. Voidaan käyttää 2-fenoksisetanolia ja natriumfluoridia, jolloin 2-fenoksisetanoli on erittäin tehokas bakteriostaattinen aine, varsinkin yhdessä neliarvoisen ammoniumyhdisteen kanssa käytettynä.

Ihmisestä tai eläimestä otettuja verisoluja käytetään suspendoituina sopivassa väliaineessa tai synteettisessä plasmassa "kontrolli" - tai "kalibroimisaineena" kun työskennellään verisolujen laskemislaitteiden avulla. Verisoluja saadaan ihmisistä ja niiden hyytyminen estetään käyttämällä koaguloimista estäviä aineita. Plasma eroitetaan sentrifugoimalla ja punaiset verisolut pestään steriileissä olosuhteissa steriilin suolaliuoksen avulla ja solut pakataan jälkeensä tapahtuvaa suspendoimista varten säilyttävään ja stabiloivaan väliaineeseen. Tämän vuoksi on valmistettu sopiva väliaine, keinotekoinen plasma, joka soveltuu lisättäväksi näihin erillisiin punaisiin verisoluihin. Väliaine sisältää laimennusaineen, joka on selostettu edellä mainitussa patentissa, ja lisäksi oksalbumiinia, laktoosia ja 2-fenoksisetanolia. Liuos sekoitetaan perusteellisesti ja osmolaliteetti säädetään natriumkloridin avulla noin 370 milliosmoliksi kiloa kohti vettä. Kun osmolaliteetti on säädetty, suodatetaan liuos ja suodos varastoidaan steriileihin lasipulloihin. Liuoksessa on natriumfluoridia, joka vaikuttaa soluntilavuutta stabiloivasti. Oksalbumiinia ja laktoosia on lisätty aikaansaamaan fysikaalis-kemiallista tasapainoa veden läpäisyn solun membraanin kautta solun sisäpuolelle. 2-fenoksisetanolia on käytetty myös bakteriostaattisena ja fungistaattisena aineena. Väliainetta eli liuosta voidaan tämän jälkeen lisätä pestyihin verisoluihin laskennassa tarvittava määrä.

2-fenoksisetanolin ja natriumfluoridin käyttämistä ns. blanking- eli täyteaineena hematologisissa määrityksissä on myös suunniteltu.

Keksinnön parhaina pidetyt toteutusmuodot käyvät ilmi seuraavissa esimerkeistä:

hapon
A. Solujen liuotusreagenssina Likimääräiset
painoyksiköt

Esimerkki 1

natriumkloridi	7,936	g/l
kaliumkloridi	0,4	"
natrium-divetyfosfaatti	0,342	"
dinatriumfosfaatti	1,922	"
natrium-etyleenidiamiini-		
tetraetikkahappo (EDTA)	0,3	"
natriumfluoridi	0,5	"
2-fenoksietanoli	3,3	"
tislattua vettä	ad. 1 litra	
neliärvoinen ammoniumyhdiste, Bretol	10,0	"
natriumnitriitti	0,20	"
kaliumsyyanidi	0,6	"
polyoksietyloitu alkyyli- fenoli	8,0	ml/l
tislattua vettä	ad. 1000 ml.	

Blank
B. Täyteaine-reagenssina (blinking-
reagenssina)

Esimerkki 2

natriumkloridi	7,847	g/l
kaliumkloridi	0,396	"
mononatriumfosfaatti-monohydraatti	0,188	"
dinatriumfosfaatti, vedetön	2,071	"
dinatrium EDTA, dihydraatti	0,376	"
2-fenoksietanoli	2,20	"
natriumfluoridi	0,495	"
natriumnitroferrisyaniidi	0,010	"
natriumnitriitti	0,010	"
C.C.S.S. (polyoksietyloitu alkyyli- fenoli) General Analine New York Film	0,40	ml
Bretol (Fine Organics Co. New York)	0,500	g/l
tislattua vettä	ad. 1000 ml.	

C. puhdistetusaineena, jolla on
bakteeriostaattisia, fungistaatti-
sia ja stabiloivia ominaisuuksia

Likimääräiset
painoyksiköt

Esimerkki 3

natriumkloridi	7,506	g/l
kaliumkloridi	0,379	"
mononatriumfosfaatti-monohydraatti	0,180	"
dinatriumfosfaatti, vedetön	1,846	"
dinatrium EDTA dihydraatti	0,360	"
2-fenoksietanoli (Dowanol EPh)	2,10	"
natriumfluoridi	0,474	"
C.C.S.S. (polyoksietyloitu alkyylifenoli)	14,9	ml
limettiöljy	0,08	"
vihreä väriaine	0,56	"
tislattua vettä	ad. 1000	"

D. Lisäaineena kuumavesihauteessa

Esimerkki 4

(a) puskurisysteeminä		
trietanoliamiinihydrokloridi	17,4	g/l
natriumhydroksidi pieninä pallo- sina	1,86	"
(b) antikorroosiosysteeminä ja ke- laatin muodostumista edistävänä aineena		
trietanoliamiinihydrokloridi (kohdas- sa (a) mainittu määrä sopii myös tähän tarkoitukseen)		
etyleenidiamiini-tetraetikkahappo, tetranatriumsuola	4,00	"
natriumfluoridi	20,00	"
(c) ei-ionisena pinta-aktiivisena pesuaineena (kostutusaineena)		
Pluronic F-68 (valmistaja Wyndotte Chemicals Corp.)	20,0	"

Likimääräiset
painoyksiköt

(d) pH-indikaattori-systeeminä sininen väriaine (French'in elintarvikeväriaine)	20,0 ml/l
bromikresoli-purppura	0,2 g/l
tymolisininen	0,4 "

a), b), c) ja d) kohdissa lisätään tarvittava määrä tislattua vettä, niin että saadaan 1000 ml ja yhdistetään sekoitettuna samaan tilavuusmäärään (1000 ml) 2-fenoksietanolia. Suositeltava määrä tehokkaaseen käyttöön on 1 tilavuus saatua liuosta 100 tilavuutta kohti tislattua tai ei-ionoitua vettä.

Mikäli käytettäessä syntyy happoa vesihauteessa, tapahtuu pH-arvon laskiessa seuraavat värinmuutokset:

<u>pH</u>	<u>Värinmuutos</u>
7,4	selvästi sininen
6,8	vihertävänsininen
6,5	sinertävänvihreä
6,0	tummanvihreä
5,5	vaaleansininen

E. Kontrolli- ja kalibrointiliuoksena

Esimerkki 5

natriumkloridi	7,936 g/l
kaliumkloridi	0,4 "
natrium-divetyfosfaatti	0,19 "
dinatriumfosfaatti	1,922 "
natrium-etyleenidiamiini-tetraetikkahappo (EDTA)	0,3 "
natriumfluoridi	0,5 "
2-fenoksietanoli	3,3 "
tislattua vettä	ad. 1 litra

1000 ml:aan tätä liuosta lisätään:

Likimääräiset
painoyksiköt

oksalbumiini	3,4 paino-%
laktoosi	4,3 "
2-fenoksisetanoli	0,34 %:iin asti

Osmoliarvo säädetään suunnilleen arvoon 370 milliosmolial/kg vettä.

Edellä määriteltujen liuosten pH-arvo säädetään välille 7-8, edullisimmin välille 7,2-7,5 käyttäen sopivaa puskuriainetta, EDTA ja fosfaattisuolaa. Liuoksen osmoliarvo pidetään sopivimmin 320-340 milliosmolina. Natriumfluoridin konsentraatio on välillä 0,03-0,1 painoprosenttia laskettuna koko liuoksesta, edullisimmin 0,05 painoprosenttia, ja 2-fenoksisetanolin väkevyys on 0,2-1,0 painoprosenttia laskettuna koko liuoksesta ja edullisimmin 0,34 % kalibrointi- eli kontrolliliuoksessa ja 0,2 % toisiin tarkoituksiin käytetyissä liuoksissa.

Osmoottinen tasapaino saadaan halutunlaiseksi käyttämällä sopivasti sekä natrium- että kaliumkloridia. Natriumhydroksidin käyttäminen puskuroimiseen ei sovi tässä tapauksessa.

Erilaisten aineiden kuten natriumkloridin, kaliumkloridin ja sellaisten puskuriaineiden kuten natriumhydroksidin käyttö osmoottisen tasapainon saavuttamiseen on ennestään tunnettu erilaisissa reagensseissa. Samoin on tunnettua käyttää kelaatinmuodostusta edistävää ainetta, joka toimii yhdessä käytetyn fosfaattisuolan kanssa saaden aikaan halutun pH-alueen, jolla liuotin on tehokas. Tällainen kelaatinmuodostusta edistävä aine on etyleenidiamiinitetraetikkahappo (EDTA).

Liuosten valmistus ei vaadi mitään erikoista menetelmää, eikä aineosia ole tarpeen lisätä missään erikoisessa järjestyksessä veteen. Keksintö ei koske siis mitään erityistä laimennusmenetelmää. Aineosien sekoittaminen tapahtuu mekaanisesti sopivan sekoitusmenetelmän mukaan noin 1-2 h aikana. Liuos suodatetaan sen jälkeen 0,2 µm:n suodattimen läpi ja varastoidaan suoraan muovisäiliöihin.

Vaikka edellä on selostettu parhaina pidetyt ^{josdy}kokemukset, voidaan pH- ja osmoliarvojen alueita laajentaa, mikäli näin on tarpeen. Siten esimerkiksi pH-alue voidaan pitää välillä 7,0-8,0. Samoin voi osmoliarvo olla välillä 300-380 milliosmolialia. Tämä saadaan aikaan vaihtelemalla

Patenttivaatimukset

1. Isotoninen, osmoottinen tasapainotettu vesiliuos hematologisten määritysten yhteydessä käytettäväksi ja sisältäen:
 - (i) natriumkloridia, kaliumkloridia ja yhtä tai useampia natriumfosfaatteja osmoottisesti tasapainotetuissa suhteissa;
 - (ii) natrium- tai kaliumfluoridia;
 - (iii) 2-fenoksietanolia; ja
 - (iv) etyleenidiamiinietikkahappoa tai sen alkalimetallisuolaa, t u n n e t t u yhden tai useamman seuraavan lisäyksestä:
 - (v) polyoksietyloitu alkyyllifenoli;-
 - (vi) neliarvoinen ammoniumyhdiste, kaliumsyanidi ja natriumnitriitti;
 - (vii) oksalbumiini sekä laktoosi; ja
 - (viii) neliarvoinen ammoniumsuola, natriumnitriitti ja natriumnitroferrisyaniidi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen liuos, t u n n e t t u siitä, että fluoridia on 0,03-0,1 paino-%:n konsentraationa.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen liuos, t u n n e t t u siitä, että 2-fenoksietanolia on 0,2-1,0 paino-%:n konsentraationa.
4. Jonkin patenttivaatimuksista 1-3 mukainen liuos, t u n n e t t u siitä, että komponentti (i) käsittää natriumkloridin, kaliumkloridin, natriumdivetyfosfaatin ja dinatriumfosfaatin osmoottisesti tasapainotetuissa suhteissa.
5. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen liuos, t u n n e t t u siitä, että liuoksen pH-arvo on 7,0-8,0 ja sen osmolaliteetti on 300-380 milliosmolialia.

Patentkrav

1. Isotonisk, osmotiskt balanserad vattenlösning för användning i samband med hematologiska bestämningar och inkluderande:
 - (i) natriumklorid, kaliumklorid och en eller flera natriumfosfater i osmotiskt balanserade proportioner;
 - (ii) natrium- eller kaliumfluorid;
 - (iii) 2-fenoxietanol; och

- (iv) etylendiamin-tetraättiksyra eller ett alkalimetallsalt därav, k ä n n e t e c k n a d av tillsats av en eller flera av följande:
- (v) en polyoxietylerad alkylfenol;
- (vi) en fyrvärd ammoniumförening kaliumcyanid och natriumnitrit;
- (vii) oxalbumin jämte laktos; och
- (viii) ett fyrvärd ammoniumsalt, natriumnitrit och natriumnitroferricyanid.

2. Lösning enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a d av att fluoriden förefinns i en koncentration av från 0,03 till 0,1 viktprocent.

3. Lösning enligt krav 1 eller 2, k ä n n e t e c k n a d av att 2-fenoxietanol förefinns i en koncentration av från 0,2 till 1,0 viktprocent.

4. Lösning enligt något av kraven 1-3, k ä n n e t e c k n a d av att komponenten (i) omfattar natriumklorid, kaliumklorid, natriumdivätefosfat och dinatriumfosfat i osmotiskt balanserade proportioner.

5. Lösning enligt något av kraven 1-4, k ä n n e t e c k n a d av att lösningen har ett pH-värde från 7,0 till 8,0 och en osmolalitet av från 300 till 380 milliosmol.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar:

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

Suomi - Finland P 59173 (G 01 N 33/72)

Iso-Britannia - Storbritannien _____

Norja - Norge _____

Ranska - Frankrike _____

Ruotsi - Sverige _____

Saksa - BRD - Tyskland _____

Sveitsi - Schweiz _____

Tanska - Danmark _____

USA _____

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:

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