



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

82144

C (11) Patenti ilmoitettiin
Patentti- ja rekisterihallituksessa 10.01.1991

(51) Kv.lk.5 - Int.cl.5

G 01N 33/58, 33/543, C 12Q 1/68

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	891354
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	22.03.89
(24) Alkupäivä - Löpdag	22.03.89
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	23.09.90
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	28.09.90

(71) Hakija - Sökande

1. Wallac Oy, PL 10, 20101 Turku, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Potter, C.G., 13, Lime Walk, Headington, United Kingdom, (GB)
2. Warner, G.T., Pullen's Field, Headington, Oxford, United Kingdom, (GB)
3. Oikari, Timo, Vatselankatu 5a 9, 20500 Turku, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Turun Patenttitoimisto/ Pikron Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä ligandien määrittämiseksi samanaikaisesti
Förfarande för samtidig bestämning av flera ligander

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

US A 4568649 (G 01N 33/52), US A 4382074 (G 01N 33/58),
Proc. Natl. Acad. Sci. vol. 82 (1985) p. 8672-8676,
Anal. Biochem. vol. 161 (1987) p. 494-500

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on menetelmä biokemiallisissa sitoutumismäärittelyksissä kahden tai useamman radioaktiivisesti leimatun ligandin määrittämiseksi samanaikaisesti. Keksinnön mukaan ligandit määritetään lähikantamamenetelmällä siten, että kunkin ligandin määrittämiseksi käytetään tukeominaisuuksiltaan erilaista kannatinainetta, johon on kiinnitetty kyseistä ligandia sitovia molekyylejä. Kannatinaine on kokonaan tai osittain tukeainetta.

Uppfinningen avser ett förfarande vid biokemiska bindningsbestämningar för samtidig bestämning av två eller flera radioaktivt stämplade ligander. Enligt uppfinningen bestäms liganderna med ett närräckviddsförfarande på sådant sätt, att för bestämning av var och en ligand används ett till scintillationsegenskaperna olik bärarämne, vid vilket har fästs molekyler som binder ifrågavarande ligand. Bärarämnet är helt eller delvis av ett scintillationsämne.

MENETELMÄ LIGANDIEN MÄÄRITTÄMISEKSI SAMANAIKAISESTI

Keksinnön kohteena on menetelmä biokemiallisissa sitoutumismäärityksissä kahden tai useamman radioaktiivisesti leimatun ligandin määrittämiseksi samanaikaisesti.

US-patentissa n:o 4.568.649 on esitetty ligandien lähikantamääritysmenetelmä (engl. proximity assay), jossa ligandeja spesifisesti sitovia biomolekyyliä on kiinnitetty tuikeaineena toimivan kantaja-aineen pintaan. Tällaisia biomolekyyliä ovat esimerkiksi immunoglobuliinit, reseptorit tai nukleiinihapot. Kantaja-aine voi olla esim. pieninä rakeina.

Menetelmän mukaan liuosta, joka sisältää tunnetun määrän radioaktiivisesti leimattua ligandia sekä tuntemattoman määrän leimaamatonta, mutta muuten samanlaista tutkittavaa ligandia, inkuboidaan rakeiden kanssa. Jos leimana käytetty isotooppi on matalaenerginen, esim. tritium, jonka lähettämien β -hiukkasten kantama on korkeintaan muutama mikrometri, vain se osuus leimasta, joka sitoutuu ja joutuu siten lähelle tuikeainetta, tuottaa tuikahduksia. Nämä voidaan sitten havaita nestetuikelaskimella. Sitoutumaton leima jää liian kauaksi tuottaakseen tuikahduksia. Leimatun ja leimaamatoman ligandin välinen kilpailu johtaa siihen, että mitä enemmän tutkittavaa eli leimaamatonta ligandia on liuoksessa sitä vähemmän leimattua ligandia pystyy sitoutumaan ja sitä vähemmän saadaan tuikahduksia.

Kuvatun menetelmän suuri etu on siinä, että se ei vaadi sitoutuneen ja sitoutumattoman leimafraktion erottamista. Menetelmän haittapuolena taas on se, että rakeiden ollessa suspendoituina nesteeseen ne voivat sakkautua vaikuttaen haitallisesti sitoutumiseen ja tuikevalon tuottoon. Myös rakeiden annostelu esimerkiksi pipetoimalla voi olla ongelmallista.

Parannukseksi on ehdotettu tukirakennetta, jossa tuikeaine prosessoidaan suodatinmaton muodostavien kuitujen sisään

tai sen pinnalle. Matto myös pidättää näytenestettä kapillaarivoimien vaikutuksesta.

Vaikka erotteluvaiheita ei lähikantamamäärityksissä tarvita, niin näytteet kuitenkin vaativat annostelua eri näyteastioihin eri ligandimäärityksissä. Ja jos halutaan määrittää useita eri ligandeja samasta näytteestä, voi näytteen kokonaismäärä rajoittaa suoritettavia määrityksiä. Kiireisessä laboratoriossa monien näyteastioiden käsittely ja laskentamahdollisuuksien rajallisuus rajoittavat kapasiteettia. Vaikka muiden isotooppien, kuten esimerkiksi ^{14}C ja ^{35}S käyttö lisäleimoina saattaisi periaatteessa olla mahdollista, niin näiden β -säteily on pitkäkantamaista ja saattaa aiheuttaa tuikahduksia vaikka ko. leima ei olisi-kaan sitoutunut tuikeaineen pintaan. Seurauksena olisi taustapulssimäärien kasvu.

Tämän keksinnön tarkoituksena on aikaansaada menetelmä, jolla ei ole edellä esitettyjä epäkohtia. Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, että ligandit määritetään lähikantamamenetelmällä siten, että kunkin ligandin määrittämiseksi käytetään tuikeominaisuuksiltaan erilaista kannatinainetta, johon on kiinnitetty kyseistä ligandia sitovia molekyylejä.

Erään edullisen sovellutusmuodon mukaan kannatinaine on kokonaan tai osittain tuikeainetta.

Keksinnön avulla voidaan lähikantamamäärityksessä määrittää samanaikaisesti useampaa kuin yhtä ligandia. Edelleen suuri etu on se, että kukin ligandi voi olla leimattuna samalla matalaenergisellä isotoopilla, kuten tritiumilla. Kunkin ligandin tuottama osuus pulssimääriin voidaan selvittää jos kukin sitova molekyylylityyppi on kiinnitetty tuikeominaisuuksiltaan erilaisten kannatinaineiden, kuten rakeiden tai suodatinkuitujen pintaan.

Eräs tuikeominaisuus, jota keksinnön avulla voidaan hyödyn-

tää, on eri tuikeaineiden antaman tuikevalon määrä viritet-
täessä niitä β -säteilyllä. Tämä ilmenee kullekin tuikeai-
neelle luonteenomaisena pulssinkorkeusjakautumana eli
spektrinä nestetuikelaskimella laskettaessa. Niinpä erään
5 toisen edullisen sovellutusmuodon mukaan kannatinaineissa
käytetään tuikeaineita, joiden tuikeominaisuuserot ovat
niiden aikaansaamien tuikepulssien korkeudessa. Tällöin
tutkittavan näytteen tuottama yhdistelmäspektri voidaan
analysoida käyttämällä jotain tunnettua spektrianalyysi
10 tekniikkaa, kuten kanavasuhdelaskentaa tai pienimmän ne-
liösumman menetelmää. Niissä tarkastellaan spektrien osuuk-
sia sopivissa osa-alueissa, kuten ikkunoissa tai kanavissa.

Mainituissa spektrianalyysitekniikoissa kunkin yksittäisen
tuikeaineen tuottama spektri tai osa-alueinformaatio on
15 etukäteen talletettu muistiin sopivia standardinäytteitä
käyttämällä. Näin voidaan kunkin tuikeaineen yhdistelmä-
spektriin tuottama osuus selvittää. Mainittuja menetelmiä on
aikaisemmin käytetty ns. monileimauslaskennassa, jossa
useita eri isotooppeja on liuenneina samaan tuikenesteeseen
20 ja mainittujen isotooppien määrä halutaan selvittää. Eri
isotoopeilla on erilaiset hajoamisenergiat ja näin ollen
myös erilaiset spektrit.

Monileimauslaskennasta poiketen käsillä oleva keksintö
liittyy tilanteeseen, jossa käytetään vain yhtä radioaktii-
25 vista isotooppia, mutta usean tyyppisiä tuikeaineita esi-
merkiksi rakeina niin, että kukin raetyyppi sitoo vain
sille spesifistä ligandia ja tuottaa kyseiselle tuikeai-
neelle tyypillisen spektrin. Esimerkkejä matalan spektrin
tuottavista tuikeaineista ovat tuike muovit, difenyylioksat-
30 soli eli PPO ja butyyli-PBD. Korkeamman spektrin taas
antavat antraseeni ja eräät epäorgaaniset tuikeaineet,
kuten keriumilla aktivoitu yttriumsilikaatti $Y_2SiO_5(Ce)$.

Toinen ominaisuus, joka vaihtelee eri tuikeaineilla, ja
jota keksinnön avulla voidaan hyödyntää on eri tuikeainei-
35 den antaman tuikepulssin ajallinen pituus eli muoto. Esi-

merkiksi tuikemuovien pulssin pituus on alle kymmenen nanosekuntia, kun taas yttriumsilikaatilla se on yli sata nanosekuntia. On olemassa elektronisia ns. pulssinmuoto-analysointilaitteita ja diskriminaattoreita, jotka tuottavat pulssin muotoon ja pituuteen verrannollisen signaalin. Tätä ominaisuutta voidaan käyttää karakterisointiin samoin menetelmin kuin edellä kuvattuja pulssinkorkeusjakautumia. Niinpä keksinnön erään kolmannen edullisen sovellutusmuodon mukaan kannatinaineissa käytetään tuikeaineita, joiden tuikeominaisuuserot ovat niiden aikaansaamien tuikepulssien muodossa.

Edellä esitetystä käy selville, että vähintään kaksi eri tuikeainetta voidaan erottaa sellaisten tuikeominaisuuksien perusteella, kuten pulssin korkeus ja muoto. Tällöin saavutetaan huomattavia säästöjä työskentelyajassa, näytämäärissä ja laskenta-ajassa.

Keksintöä selostetaan seuraavassa esimerkin avulla viittamalla oheiseen piirustukseen, joka esittää kaaviollisesti kahta erilaista tuikeaineraetta ja kahta erilaista, samalla isotopilla leimattua ligandia. Kuviossa nähdään rakeina difenyylioksaatsolia eli PPO:ta ja keriumilla aktivoitua yttriumsilikaattia eli $Y_2SiO_5(Ce)$:tä, jota kuviossa kuvaa kirjain Y. Kumpikin tuikeaine sitoo vain sille spesifistä ligandia. Ligandit on merkitty samalla radioaktiivisella isotopilla, joka on matalaenergistä tritiumia eli 3H . Leimatut ligandimolekyylit kilpailevat leimaamattoman eli mitattavien aineiden molekyyliden kanssa sitoutumisessa tuikeaineiden pyydystämolekyyleihin. Käytetyssä lähikantamäärityksessä vain sitoutunut, leimattu ligandi on riittävän lähellä tuikeainetta aiheuttaakseen valon tuikahduksen. Tuikelaskimella saadaan tällöin määritettyä mitattavan aineen osuus.

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

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Menetelmä biokemiallisissa sitoutumismäärityksissä kahden tai useamman radioaktiivisesti leimatun ligandin määrittämiseksi samanaikaisesti, t u n n e t t u siitä, että ligandit määritetään lähikantamamenetelmällä siten,
5 että kunkin ligandin määrittämiseksi käytetään tuikeominaisuuksiltaan erilaista kannatinainetta, johon on kiinnitetty kyseistä ligandia sitovia molekyylejä.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kannatinaine on kokonaan tai
10 osittain tuikeainetta.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kannatinaineissa käytetään tuikeaineita, joiden tuikeominaisuuserot ovat niiden aikaansaamien tuikepulssien korkeudessa.
- 15 4. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kannatinaineissa käytetään tuikeaineita, joiden tuikeominaisuuserot ovat niiden aikaansaamien tuikepulssien muodossa.
5. Jonkin patenttivaatimuksista 1-4 mukainen menetelmä,
20 t u n n e t t u siitä, että kannatinaineissa käytetään tuikeaineita, joilla on kaksi tai useampia eroja tuikeominaisuuksissa.

PATENTKRAV

1. Förfarande vid biokemiska bindningsbestämningar för samtidig bestämning av två eller flera radioaktivt stämplade ligander, k ä n n e t e c k n a t därav, att liganderna bestäms med ett närräckviddsförfarande på sådant
5 sätt, att för bestämning av var och en ligand används ett till scintillationsegenskaperna oliket bärarämne, vid vilket har fästs molekyler som binder ifrågavarande ligand.
2. Förfarande enligt patentkravet 1,
k ä n n e t e c k n a t därav, att bärarämnet är helt
10 eller delvis av ett scintillationsämne.
3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2,
k ä n n e t e c k n a t därav, att i bärarämnena används scintillationsämnen, vilkas skillnader i scintillations-
egenskaper ligger i höjden av de scintillationspulser som
15 de åstadkommer.
4. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2,
k ä n n e t e c k n a t därav, att i bärarämnena används scintillationsämnen, vilkas skillnader i scintillations-
egenskaper ligger i formen av de scintillationspulser som
20 de åstadkommer.
5. Förfarande enligt något av patentkraven 1-4,
k ä n n e t e c k n a t därav, att i bärarämnena används scintillationsämnen, som har två eller flera skillnader i scintillationsegenskaperna.

82144

