



FI000102921B



SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus Patent- och registerstyrelsen

(12) PATENTTIJULKAISU
PATENTSKRIFT

(10) FI 102921 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats 15.03.1999

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

G 01N 33/546, 33/543

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 920329

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 24.01.1992

(24) Alkupäivä - Löpdag 24.01.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 26.07.1992

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

25.01.1991 US 646303 P

(73) Haltija - Innehavare

1. Clinical Diagnostic Systems, Inc., 100 Indigo Creek Drive, Rochester, NY 14650, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Sutton, Richard Calvin, 113 Wimbledon Road, Rochester, NY 14617, USA, (US)
2. Ponticello, Ignazio Salvatore, 21 Copper Woods, Pittsford, NY 14534, USA, (US)
3. Danielson, Susan Jean, 9 LaCroix Court Drive, Apt K, Rochester, NY 14609, USA, (US)
4. Oenick, Marsha Denise Bale, 44 SanGabriel Drive, Rochester, NY 14610, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä biologisesti aktiivisten reagenssien valmistamiseksi sukkiini-imidiä sisältävistä polymeereistä, analyysielementti ja menetelmiä niiden käyttämiseksi
Förfarande för framställning av biologiskt aktiva reagenser från polymerer innehållande succinimid, analyselement och förfaranden för användning av dessa

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

CH A 601364 (C 08F 2/00), EP A 220899 (G 01N 33/531), EP A 323692 (G 01N 33/546)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee biologisesti aktiivisten reagenssien valmistamista kopolymeerihiukkasista, joilla on voimakkaasti aktiivisia sukkiini-imidiryhmiä. Reagensseja valmistetaan liittämällä kovalenttisesti biologisesti aktiivisia aineita, esimerkiksi vasta-aineita, hiukkasiin suoraan tai epäsuorasti amidiryhmien kautta syrjäyttämällä hiukkasen pinnalle olevat voimakkaasti aktiiviset sukkiini-imidiryhmät. Näitä reagensseja käytetään edullisesti analyttisissä elementeissä, menetelmissä spesifisesti sitoutuvien ligandien (kuten immunologisten spesiesten) määrittämiseksi, immuunimäärittelyksissä ja puhdistusmenetelmissä, kuten affiniteettikromatografiassa.

Uppfinningen avser framställning av biologiskt aktiva reagenser av sampolymerpartiklar med starkt aktiva succinimidgrupper. Reagenserna framställs genom kovalent anslutning av biologiskt aktiva substanser, exempelvis antikroppar, till partiklarna, direkt eller indirekt via amidgrupper genom undanträngande av starkt aktiva succinimidgrupper på partikelytan. Dessa reagenser används med fördel i analytiska element, förfaranden för detektering av specifikt bindande ligander (såsom immunologiska specier) och immunoanalyser, och i reningsförfaranden, såsom affinitetskromatografi.

Menetelmä biologisesti aktiivisten reagenssien valmistamiseksi sukkiini-imidiä sisältävistä polymeereistä, analyyysielementti ja menetelmiä niiden käyttämiseksi

5 Tämä keksintö koskee menetelmää biologisesti aktiivisten reagenssien valmistamiseksi, jossa käytetään polymeerihiukkasia. Se koskee myös analyyysielementtejä, jotka sisältävät tällaisia biologisesti aktiivisia reagensseja, ja immuunimäärityksiä ja spesifiseen sitoutumiseen perustuvia analyyssimenetelmiä, joissa niitä käytetään. Lisäksi
10 se koskee analyyttistä puhdistusmenetelmää, jossa käytetään näitä reagensseja. Tätä keksintöä voidaan käyttää erilaisiin kliinisiin, diagnostisiin, lääketieteellisiin ja tutkimustarkoituksiin.

15 Käytännön lääketieteessä ja tutkimuksessa ja analyyttisissä ja diagnostisissa menettelyissä tarvitaan jatkuvasti erilaisissa juoksevilla aineissa, kuten biologisissa nesteissä esiintyvien kemiallisten ja biologisten aineiden nopeita ja tarkkoja määrityksiä. Spesifiset sitoutumisreaktiot tarjoavat yhden tällaisen menetelmän,
20 jossa käytetään reagoivia aineita, joista ainakin yksi on immobilisoitu kiinteälle alustalle. Tämä menetelmä mahdollistaa tyypillisesti vesiliukoisten reagoimattomien aineiden erottamisen veteen liukenemattomasta reaktiotuotteesta. Lisäksi tällaisia immobilisoituja reagensseja voidaan
25 käyttää affiniteettikromatografiassa halutun biologisesti aktiivisen materiaalin poistamiseksi mainitunlaisten aineiden seoksesta.

 Joissakin tapauksissa hiukkasmaiset alustat, joita
30 käytetään spesifisissä sitoutumisreaktioissa, on suunniteltu siten, että niiden ulkopinnoilla on aktiivisia ryhmiä. Tämä mahdollistaa biologisten aineiden reagoinnin hiukkasten ulkopinnan kanssa. Jos hiukkasmaisen alusta on polymeerinen, se voidaan usein valmistaa monomeereista,
35 joissa on asianomaisia aktiivisia ryhmiä. US-patenttijul-

kaisu 5 030 697 koskee polymeeriin sidottua kytkettävissä olevaa väriainetta, joka sisältää vesiliukoista kopolymeriä, siihen kovalenttisesti sidottua väriainetta ja funktionaalisia ryhmiä, jotka mahdollistavat polymeeriväriaineen kovalenttisen kytkeytymisen biologisiin materiaaleihin.

Epätoivottu epäspesifinen proteiinin adsorptio on ollut jatkuva ongelma käytettäessä polymeeristä materiaalia kiinteänä alustana analyttisissä ja diagnostisissa menetelmissä. Epäspesifinen proteiini on epätoivottava, koska se aiheuttaa epätoivottua taustaa ja peittää oikeita tuloksia.

Polymeerinpinnan hydrofiilinen luonne on myös ollut huomattavan tutkimustyön kohteena. Hydrofiilisyyden kasvu vähentää joidenkin muttei kaikkien proteiinien adsorptiota.

Teollisuudessa tarvittaisiin materiaalia, josta voidaan valmistaa kiinteitä alustoja ja joka on veteen liukenematonta, silloittamatonta, huokosetonta ja kykenevää liittymään kemiallisiin ja biologisiin materiaaleihin.

Edellä mainitut ongelmat voitetaan menetelmällä biologisesti aktiivisen reagenssin valmistamiseksi, joka menetelmä käsittää vaiheen, jossa saatetaan reagoimaan

(I) veteen liukenematon, huokoseton hiukkanen, jossa ainakin ulkopinta koostuu silloittamattomasta kopolymeristä, jossa on toistuvia yksiköitä, jotka ovat peräisin

(a) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta oleofiilisestä monomeerista, jotka tekevät kopolymerin hydrofobiseksi ja joiden osuus on 80 - 99,9 mol-%, sillä edellytyksellä, että yksikään näistä monomeereista ei ole ristisitoutuva monomeeri;

(b) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joissa

on sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmä ja joiden osuus on 0,1 - 20 mol-%, ja

(c) yhdestä tai useammasta hydrofiilisestä etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joiden osuus on 0 - 10 mol-%,

(II) biologisesti aktiivisen aineen kanssa, jolloin (I) ja (II) sitoutuvat kovalenttisesti amidiryhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla.

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön myös analyysielementin, joka käsittää nestettä läpäisevän alustan, jossa on yksi tai useampia reaktiovyöhykkeitä ja joka sisältää vähintään yhdellä vyöhykkeistä biologisesti aktiivista reagenssia,

jolle elementille on tunnusmerkillistä, että biologisesti aktiivinen reagenssi on edellä kuvatun kaltainen.

Lisäksi tämä keksintö tarjoaa käyttöön analyysielementin, joka käsittää huokosettoman alustan, jolle on sijoitettu virtausyhteyteen ja seuraavassa järjestyksessä

reagenssikerros, joka sisältää yhtä tai useampaa reagenssia detektoitavissa olevan signaalin antamiseksi määrittämisessä reaktiona entsyymiin,

huokoinen levityskerros, joka sisältää biologisesti aktiivista reagenssia, ja

mihin tahansa huokosettoman alustan yläpuolella olevaan kerrokseen sijoitettuun entsyymiin sidottua ligandianalogia,

jolle elementille on tunnusmerkillistä, että biologisesti aktiivinen aineosa sisältää

(i) edellä kohdassa (I) kuvatun hiukkasen ja ligandia vastaavan reseptorin, joka on sidottu kovalenttisesti hiukkaseen amidiryhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla.

Lisäksi keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän spesifisen sitoutuvan ligandin määrittämiseksi, jossa

A. saatetaan näyte, jonka epäillään sisältävän vesiliukoista spesifistä sitoutuvaa ligandia, kosketukseen biologisesti aktiivisen reagenssin kanssa, jolloin muodostuu ligandin veteen liukenematon spesifinen sitoutumiskompleksi reseptorin kanssa, ja

B. detektoidaan kompleksin läsnäolo osoituksena ligandin läsnä- tai poissaolosta näytteessä,

jolle menetelmälle on tunnusmerkillistä, että biologisesti aktiivinen reagenssi on edellä kuvattu reagenssi.

Tämä keksintö tarjoaa lisäksi käyttöön menetelmän spesifisen sitoutuvan ligandin määrittämiseksi käyttämällä kompetitiivista sitoutumismääritystä, jossa

A. saatetaan näyte, jonka epäillään sisältävän vesiliukoista spesifistä sitoutuvaa ligandia, kosketukseen biologisesti aktiivisen reagenssin kanssa,

B. ennen vaiheessa A aikaansaattavaa kontaktia, samanaikaisesti sen kanssa tai sen jälkeen saatetaan näyte kosketukseen ligandia vastaavan reseptorin kanssa, jolloin muodostuu reseptorin vesiliukoinen spesifinen sitoutumiskompleksi vesiliukoisen ligandin kanssa ja reseptorin veteen liukenematon sitoutumiskompleksi veteen liukenemattoman ligandin kanssa,

C. erotetaan veteen liukenematon kompleksi vesiliukoisista materiaaleista ja

D. detektoidaan veteen liukenemattoman kompleksin läsnäolo osoituksena ligandin läsnä- tai poissaolosta näytteessä,

jolle menetelmälle on tunnusmerkillistä, että biologisesti aktiivinen reagenssi käsittää edellä kohdassa (I) kuvatun hiukkasen ja (II) ligandimolekyylejä, jotka on sidottu kovalenttisesti hiukkaseen amidiryhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla.

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön myös menetelmän immunologisen spesieksen määrittämiseksi, jossa

5 A. saatetaan näyte, jonka epäillään sisältävän immunologista spesiestä, kosketukseen reagenssin kanssa, joka sisältää

edellä kuvatun kaltaisen hiukkasen ja

kyseistä spesiestä vastaavan reseptorin, jolloin muodostuu spesieksen veteen liukenematon immunologinen kompleksiksi reseptorin kanssa, edullisesti mikrohuokoiselle
10 suodatuskalvolle immobilisoidun reagenssin kanssa,

B. poistetaan vesiliukoiset materiaalit kompleksista, edullisesti suodattamalla, ja

C. detektoidaan kompleksin läsnäolo osoituksena immunologisen spesieksen läsnä- tai poissaolosta näytteessä,
15 jolle menetelmälle on tunnusmerkillistä, että hiukkasen on edellä kohdassa (I) kuvatun kaltainen ja reseptori on sidottu kovalenttisesti hiukkaseen amidiryhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla.

20 Lisäksi keksintö tarjoaa käyttöön analyttisen puhdistusmenetelmän, jossa

A. johdetaan biologisesti aktiivisten aineiden seosta sisältävä näyte affiniteettikromatografiareagenssin yli, joka sisältää

25 edellä kuvatun hiukkasen ja

spesifisesti sitoutuvaa ainetta, ja

B. otetaan talteen reagenssilla oleva yksi tai useampi ennelta määrätty biologisesti aktiivinen aine,

jolle menetelmälle on tunnusmerkillistä, että hiukkasen on edellä kohdassa (I) kuvatun kaltainen, spesifisesti sitoutuva aine on sidottu kovalenttisesti hiukkaseen amidiryhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla ja spesifisesti sitoutuva aine on spesifinen biologisesti aktiivisia aineita sisältävässä näyteseoksessa olevalle yhdelle tai
35

useammalle ennalta määrätylle biologisesti aktiiviselle aineelle.

5 Tämä keksintö tarjoaa käyttöön reagensseja, jotka ovat käyttökelpoisia erilaisissa analyttisissä, diagnostisissa ja puhdistusmenetelmissä.

10 Lisäksi tarjotaan käyttöön menetelmä nukleiinihapon detektoimiseksi, jossa (a) muodostetaan veteen liukenematon hybridisaatiotuote nukleiinihapon ja reagenssin välille ja (b) detektoidaan hybridisaatiotuotteen läsnäolo osoituksena kiinnotuksen kohteena olevan nukleiinihapon läsnäolosta tai määrästä,

15 jolle menetelmälle on tunnusmerkillistä, että reagenssi sisältää edellä kohdassa (I) kuvatun kaltaiseen hiukkaseen aktiivisen sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän kautta kovalenttisesti sidottua oligonukleotidia, joka on suurin piirtein komplementaarinen kiinnostuksen kohteena-olevalle nukleiinihapolle.

20 Tämän keksinnön etuna on, että tietyt sukkiini-imidiryhmän sisältävät kopolymeerit ovat helpommin ja täydellisemmin sisällytettävissä veteen liukenemattomiin lateksihiukkasiin ja helpottavat siten proteiinien tai muiden biologisten yhdisteiden liittämistä. Lisäksi tämän keksinnön yhteydessä käyttökelpoisilla kopolymeereillä on seuraavia etuja: (1) ne ovat liukenemattomia veteen ja (2)
25 turpoamattomia vedessä, (3) kolloidi on stabiili biokemiallisten immobilisointimenetelmien yhteydessä, (4) ne eivät sisällä pinta-aktiivisia aineita eivätkä (5) polymeeriä suojaavia kolloideja, (6) ne ovat huokosettomia, (7) ne eivät muodosta ristisidoksia ja (8) ne ovat monodispersoituvia.
30

Kopolymeerien olennaiset toistuvat yksiköt ovat peräisin

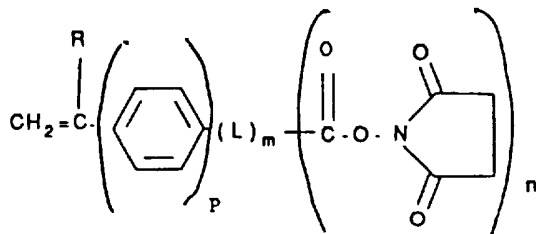
35 (a) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta oleofiilisestä monomeerista, jotka tekevät mainitun kopolymeerin hydrofobi-

seksi ja joiden osuus on 80 - 99,9 mol-%, edullisemmin 90 - 99,9 mol-% ja edullisimmin 95 - 99,9 mol-%, sillä edellytyksellä, että yksikään näistä monomeereista ei ole ristisitoutuva monomeeri, ts. monomeeri jossa kaksi tai useampia additiomekanismilla polymeroitavissa olevia vi-

nyyliryhmiä, joilla on kyky polymeroitua siten, että muodostuu kolmiulotteinen, silloittunut polymeeriverkosto, (b) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joissa on sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmä ja joiden osuus on 0,1 - 20 mol-%, edullisemmin 0,1 - 10 mol-% ja edullisimmin 0,1 - 5 mol-%, ja

(c) yhdestä tai useammasta ristisidoksia muodostamattomasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, kuten ionisista tai polaarisista hydrofiillisistä monomeereista, joiden osuus on 0 - 10 mol-%, edullisesti 0 - 5 mol-% ja edullisemmin 0 - 3 mol-%.

Kopolymeeri sisältää edullisesti edellä kuvatun kaltaista monomeeria (b), jota edustaa seuraava rakenne:



jossa

R on vetyatomi, 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyli-
liryhmä tai halogeeniatomi,

L on kytkeväryhmä, jonka kytkevässä ketjussa on vähintään kaksi hiiliatomia ja joka koostuu vähintään kahden ryhmän yhdistelmästä, joita ryhmiä ovat 1 - 8 hiiliatomia sisältävät alkyleeniryhmät, 6 - 12 hiiliatomia si-

sältävät aryleeniryhmät, heteroatomit ja heteroatomin sisältävät ryhmät,

5 m on 0 tai 1, n on 1 tai 2 ja P on 0 tai 1, sillä edellytyksellä, että kun n on 2, yksi alkyleeni- ja aryleeniryhmistä on trivalenttinen.

10 Tarkemmin määriteltynä edellä mainitussa rakenteessa R on vetyatomi, 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä (kuten metyyli-, etyyli-, isopropyli- tai n-propyyli-ryhmä) tai halogeeniatomi (kuten kloori- tai bromiatomi). R on edullisesti vetyatomi, metyyli-ryhmä tai klooriatomi. R on edullisemmin vetyatomi tai metyyli-ryhmä.

15 L on orgaaninen kytkentäryhmä, jonka kytkevässä ketjussa on vähintään kaksi hiiliatomia ja joka on yhdistelmä, joka sisältää vähintään kaksi ryhmää, joita ovat (1) alkyleeniryhmät, joissa on 1 - 8 hiiliatomia, kuten metyleeni-, etyleeni-, trimetyleeni-, propyleeni-, penta-
20 metyleeni- tai 2,2-dimetyyli-1,3-propyleeniryhmä, (2) aryleeniryhmät, joissa on 6 - 12 hiiliatomia, kuten fenyleeni-, tolyleeni-, ksylyleeni- tai naftyleeniryhmä, (3) divalenttiset heteroatomit, kuten happi- (oksi-) tai rikki-(tio-)atomi, ja (4) heteroatomin sisältävät ryhmät, kuten karbonyyli-, sulfonyyli- tai iminoryhmä ($-NR^1$, jossa R on vetyatomi tai 1 - 6 hiiliatomia sisältävä alkyyliryhmä, kuten metyyli-, etyyli-, propyyli-, butyyli-, pentyyli tai heksyyli-ryhmä).

25 Alkyleeniryhmät voivat sisältää 1 - 8 hiiliatomia ja ne voivat olla haaroittuneita, lineaarisia tai syklisiä, substituoimattomia tai substituoituja yhdellä tai useammalla alkyyliryhmällä (edullisesti 1 - 8 hiiliatomia sisältävällä, kuten metyyli-, etyyli-, isopropyli-, heksyyli- tai oktyyliryhmällä), alkoksyyliryhmällä (edullisesti 1 - 12 hiiliatomia sisältävällä, kuten metoksyyli-, etoksyyli-, propoksyyli-, t-butoksyyli- tai oktyylioksyyliryhmällä, sykloalkyyliryhmällä (edullisesti 4 - 6 hiili-
35 atomia sisältävällä, kuten syklobutyyli-, sykloheksyyli-

tai syklopentyyliryhmällä) tai aryyliiryhmällä (edullisesti 6 - 12 hiiliatomia sisältävällä, kuten fenyyli-, tolyyli-, ksylyyli-, naftyyli-, 4-metoksifenyyli- tai kloorifenyyli-ryhmällä). Tällaiset ryhmät eivät ole vaikeita suunniteltavia tai syntetisoitavia synteettisen kemian alan ammattimiehelle. Aryleeniryhmät voivat sisältää 6 - 12 rengashiiliatomia ja alkyleeniryhmien yhteydessä määritellyjä substituentteja.

m on 0 tai 1, n on 1 tai 2 ja P on 0 tai 1 sillä edellytyksellä, että kun n on 2, yksi mainituista alkyleeni- ja aryleeniryhmistä on trivalenttinen.

P ja m ovat edullisimmin 0.

Monomeeri (b) on edullisesti styreeni tai styreenijohdannainen tai akryyli- tai metakryylihapoesteri. Se on edullisemmin N-akryloyylioksisukkiini-imidi, 4-(2-sukkiini-imidoksikarbonyylietyylitiometyyli)styreeni, 4-[1,2-bis(sukkiini-imidoksikarbonyyli)etyylitiometyyli]styreeni tai 4-(2-sukkiini-imidoksikarbonyylifenyylietiometyyli)styreeni.

Vaikka edellä kohdassa (b) kuvattuja monomeereja voidaan polymeroida homopolymeereiksi, niitä käytetään edullisesti kopolymeerien valmistukseen yhdessä yhden tai useamman muun etyleenisesti tyydyttymättömän polymeroitavissa olevan monomeerin kanssa. Esimerkeiksi edellä yksiköiden (a) yhteydessä luetellut oleofiiliset monomeerit ovat käyttökelpoisia antamaan tuloksena olevalle kopolymeerille ominaisuuksia, jotka tekevät siitä hydrofobisemman ja veteen liukenemattomamman. Haluttaessa voidaan käyttää tällaisten monomeerien seosta. Yhdisteisiin, joista yksiköt (a) voivat olla peräisin, kuuluvat vinyyliaromaattiset yhdisteet (esimerkiksi styreeni ja styreenijohdannaiset, kuten 4-vinyylitolueeni, a-metyyliestyreeni, 2,5-dimetyyliestyreeni, 4-t-butyliestyreeni ja 2-klooristyreeni), akryyli- ja metakryylihapoesterit ja -amidit (esimerkiksi metyyliakrylaatti, metyylimetakrylaatti,

5 n-butyyliaakrylaatti, 2-etyyliheksyylietakrylaatti, bent-
syyliakrylaatti ja N-fenyyliaakryyliamidi), butadieeni, ak-
ryylinitriili, vinyyliaasettaatti, vinyylibentsyyliasetaat-
ti, vinyylibromidi ja vinylideenikloridi. Edullisia mono-
meereja (a) ovat vinyyliaaromaattiset yhdisteet ja edulli-
sin styreeni.

10 Lisäksi voidaan toivottujen ominaisuuksien antami-
seksi kopolymeroida etyleenisesti tyydyttymättömiä polyme-
roitavissa olevia monomeereja (c), jotka ovat muita kuin
15 edellä monomeereina (a) tai (b) kuvatut. Tällaisiin mono-
meereihin kuuluvat anioniset monomeerit, jotka sisältävät
sulfonihapporyhmiä, tai niiden suolat, mukaan luettuina
2-akryyliamido-2-metyylipropaanisulfonihappo, 3-metakrylo-
yylioksipropaani-1-sulfonihappo, p-styreenisulfonihappo ja
15 niiden suolat. Monomeeriryhmään (c) kuuluvat myös ionitto-
mat hydrofiilliset monomeerit, kuten akryyliamidi, metak-
ryyliamidi, N-isopropyyliakryyliamidi, 2-hydroksietyyliak-
rylaatti, 2-hydroksietyylietakrylaatti, pentaetyleenigly-
kolimonometakrylaatti ja N-vinyyli-2-pyrrolidoni. Lisäksi
20 voitaisiin käyttää monomeereja, joissa on aktiivisia mety-
leeniryhmiä, kuten 2-asetoasetoksietylietakrylaattia,
samoin kuin monia muita monomeereja, joita on liian lukui-
sia tässä mainittaviksi.

25 Tämän keksinnön mukaisia kopolymeerejä valmistetaan
käyttämällä tavanomaisia emulsio- tai suspensiopolymeroin-
timenetelmiä, joita kuvaavat esimerkiksi Sorenson et al.
Preparative Methods of Polymer Science, 2. p., Wiley and
Sons, New York 1968 ja Stevens teoksessa Polymer Chemist-
ry, An Introduction, Addison Wesley Publishing Co., Lontoo
30 1975.

On ratkaisevaa, että tässä kuvattuja kopolymeerejä
käytetään hiukkasmaisessa muodossa tämän keksinnön mukais-
ten reagenssien valmistukseen. Keskimääräinen hiukkaskoko
voi vaihdella suuresti reagenssin käyttötarkoituksen mu-

kaan. Se on yleensä 0,01 - 20 mm, edullisesti 0,01 - 10 mm ja edullisemmin 0,05 - 5 mm.

Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä valmiste-
tuissa reagensseissa on yksi tai useampi biologisesti ak-
5 tiivinen aine, jotka on liitetty kovalenttisesti polymeerihiukkasiin amidiryhmien kautta syrjäyttämällä hiukkasten ulkopinnalla olevat aktiiviset sukkiini-imidiesteriryhmät. Tässä käytettynä termin "biologisesti aktiivinen aine" piiriin on tarkoitettu kuuluvaksi mikä tahansa orgaaninen
10 yhdiste, joka esiintyy elävässä organismissa tai on käyttökelpoinen diagnosoinnissa, hoidossa tai elävien organismien solumateriaalin geneettisessä käsittelyssä ja jolla on kyky olla vuorovaikutuksessa muun biologisen tai kemiallisen materiaalin kanssa. Tällaiset aineet voivat olla
15 biologisissa nesteissä luonnossa esiintyviä tai esiintymättömiä. Tällaisilla materiaaleilla täytyy olla kyky liittyä hiukkasiin aktiivisten sukkiini-imidoksiryhmien syrjäytyksen kautta. Siten tämä merkitsee yleisesti ottaen, että biologisesti aktiivisessa aineessa on reaktioon
20 käytettävissä oleva amino- tai sulfhydryyliryhmä.

Reagenssin aiotun käyttötarkoituksen mukaan biologisesti aktiivisiin aineisiin kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, aminohapot, peptidit, polypeptidit, proteiinit (mukaan luettuina vasta-aineet, C-aktiivinen
25 proteiinit ja avidiini sekä sen johdannaiset), lipoproteiinit, glykoproteiinit, hormonit, lääkeaineet (esimerkiksi digoksiini, fenytoiini, fenobarbitaali, tyroksiini, trijodityroniini, gentamisiini, karbamatsepiini ja teofylliini), steroidit, vitamiinit, polysakkaridit, glykolipidit,
30 alkaloidit, mikro-organismit, virukset, alkueläimet, sienet, loiset, rikketsiat, homeet, veren komponentit, kudosten ja elinten komponentit, farmaseuttiset aineet, hapteenit, lektiinit, toksiinit, nukleiinihapot (mukaan luettuina joko yksi- tai kaksisäikeiset oligonukleotidit), anti-
35 geeniset materiaalit (mukaan luettuina proteiinit ja hii-

lihydraatit), avidiini ja sen johdannaiset, biotiini ja sen johdannaiset ja minkä tahansa edellä mainitun materiaalin komponentit.

5 Erityisen käyttökelpoisia keksinnön mukaisella menetelmällä valmistettuja reagensseja ovat reagenssit, joissa biologisesti aktiivinen aine on kiinnostuksen kohteena olevalle ligandille spesifinen reseptori. Niinpä spesifistä reaktiota, johon reagenssi osallistuu, voidaan käyttää erilaisiin menetelmiin (joita kuvataan yksityiskohtaisemmin jäljempänä). Esimerkkeihin ligandi-reseptori-10 komplekseista (ts. ligandin ja reseptorin reaktiotuotteista) kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, vasta-aine-antigeeni-, vasta-aine-hapteeni-, avidiini-biotiini-, sokeri-lektiini-, gelatiini-fibronektiini- ja proteiini A -IgG-kompleksit. Tämän keksinnön yhteydessä pidetään myös komplementaarisia nukleiinihappoja (ts. komplementaaristen säikeiden hybridisaatiotuotteita) spesifisesti sitoutuvina materiaaleina. Tällaisten komplementaaristen nukleiinihappojen (mukaan luettuina vähintään 2 emästä sisältävät oligonukleotidit) ei tarvitse olla komplementaarisia joka emäsparin suhteen, eikä nukleiinihapposekvenssin joka asemassa tarvitse olla yhteensopivaa emästä. Tämä tarkoittaa, että toinen säikeistä voi olla toista pidempi tai yhdelle säikeelle voi olla lukuisia sille
25 komplementaarisia oligonukleotideja eri sekvensseissä.

Käyttökelpoisimpia biologisesti aktiivisia aineita ovat alalla immuuniaktiivisina spesieksinä tunnetut aineet, jotka osallistuvat immunologiseen reaktioon ja joihin kuuluu (1) mikä tahansa aine, joka vaikuttaessaan immuunikompetenttiin isäntään johtaa spesifisen vasta-aineen syntymiseen, jolla on kyky sitoutua kyseisen aineen kanssa, ja (2) siten syntynyt vasta-aine. Niinpä immunologinen spesies voi olla antigeeninen materiaali tai vasta-aine (mukaan luettuina antivasta-aineet ja autovasta-aineet).
30
35 Sekä monoklonaaliset että polyklonaaliset vasta-aineet

ovat käyttökelpoisia, ja ne voivat olla kokonaisia molekyylejä tai niiden erilaisia fragmentteja, kunhan niissä on vähintään yksi aktiivinen kohta hiukkasilla olevien aktiivisten sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmien kanssa tapahtuvaa reaktiota varten.

5 Erityisen käyttökelpoisiin biologisesti aktiivisiin aineisiin kuuluvat *Streptococcus* A:n, HIV-I:n, hampaiden ympäruskudoksen sairauteen liittyvän mikro-organismin, karbamatsepiinin, tyroksiinin, ihmisen koriongonadotropiinin, fenobarbitaalin, fenytoinin, digoksiinin ja C-aktiivisen proteiinin vastaiset vasta-aineet.

10 Tietyissä suoritustavoissa immunologinen spesies on entsyymi, jossa on aktiivinen ryhmä liittymistä varten. Tyypillisiin esimerkkeihin entsyymeistä kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, piparjuuriperoksidaasi, glukosyoksidaasi, ureaasi, β -galaktosidaasi, aspartaatti-aminotransaminaasi, alaniini-aminotransaminaasi, laktaatti-dehydrogenaasi, kreatiini-fosfokinaasi, γ -glutamyyli-transferaasi, alkalinen fosfataasi, hapan fosfataasi ja eturauhasen hapan fosfataasi.

20 Joissakin suoritustavoissa, kuten kompetitiivisissä sitoutumismäärityksissä lääkkeiden tai raskauden määrittämiseksi, biologisesti aktiivinen aine on ihmisen koriongonadotropiinin, fenobarbitaalin, fenytoinin tai digoksiinin vastainen vasta-aine.

25 Biologisesti aktiivista ainetta voidaan haluttaessa muuntaa tai muuttaa kemiallisesti aktiivisten ryhmien lisäämiseksi siihen liittämistä varten, mukaan luettuna liittämiseen tarkoitetun kytkentäryhmän lisääminen.

30 Menettely, jota käytetään biologisesti aktiivisen aineen kiinnittämiseen polymeerihiukkasiin tämän keksinnön mukaisten reagenssien valmistamiseksi, on yleisesti esitettyä seuraava.

35 Polymeerihiukkasten vesisuspensio käsitellään suoraan polymeerihiukkasiin kovalenttisesti sidottavan biolo-

- gisesti aktiivisen materiaalin puskuroidulla liuoksella tai suspensiolla biologisesti aktiivisen aineen ja polymeerin välisen massasuhteen ollessa 0,1:1 000 - 1:1, edullisesti 1:1 000 - 100:1 000, ja pH:n ollessa alueella
- 5 7 - 10, edullisesti 8,5 - 9,5. Seosta sekoitetaan riittävä aika reaktion saattamiseksi loppuun, ts. jopa muutamia tunteja, vaikkakin 2 - 28 tuntia on yleensä sopiva aika. Reaktiot keskeytetään tarvittaessa naudan seerumialbumiini-
- 10 nilla, eristetään sitten hiukkaset (edullisesti sentrifugoimalla) ja suspendoidaan uudelleen puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen. Eristys- ja uudelleensuspendointi-
- 15 vaiheita toistetaan yksi tai useampi kerta ja lopullinen dispersio valmistetaan siten, että sen kiintoainepitoisuus on 0,1 - 40, edullisesti 1 - 10 paino-%, ja stabiloidaan (edullisesti käyttämällä 0,02 % mertiolaattia). Tätä me-
- nettyä voidaan muuntaa huomattavasti, erityisesti aikoja, lämpötilaa, puskureita, stabilointiaineita tai muita reagensseja ja eristys- ja keskeytysmenetelmiä, saavuttaen vastaavia tuloksia.
- 20 Reaktioseoksessa hiukkaskiintoaineen prosentuaalinen osuus on yleensä 0,01 - 40 %, edullisesti 1 - 10 %, reagenssin valmistuksen yhteydessä. Biologisesti aktiivisen aineen määrä suunnitellaan yleensä siten, että tämän aineen massasuhte kopolymeeriin on 0,1:1 000 - 1,1, edul-
- 25 lisesti 1:1 000 - 100:1 000. Tulisi kuitenkin ymmärtää, että kaikki aine ei ehkä sitoudu kovalenttisesti hiukkasiin. Itse asiassa sitä saattaa adsorboitua vain pieni määrä, ja jotkut aineet eivät ehkä sitoudu ollenkaan.
- 30 Biologisesti aktiivisen aineen ja hiukkasten sekoitus tehdään lämpötilassa 5 - 50 °C, edullisesti 18 - 40 °C, ja se kestää 2 - 28 tuntia, edullisesti 4 - 24 tuntia. Aika vaihtelee lämpötilan, biologisesti aktiivisen aineen ja halutun peiton mukaan. Voidaan käyttää mitä tahansa sopivaa puskuria, mutta 4-(2-hydroksietyyli)-1-piperatsiinipropaanisulfonihappo on edullinen.
- 35

Erilaisten reagenssien tyyppillisten valmistusmenettelyjen yksityiskohdat esitetään jäljempänä olevissa esimerkeissä.

5 Nukleiinihapporeagenssit valmistetaan edullisesti samalla tavalla kuin muut edellä kuvatut reagenssit, mutta tarkemmin määriteltynä polymeerihiukkasia, joiden keskimääräinen hiukkaskoko on 0,01 - 10 mm, on läsnä suspensiossa vähintään kiintoainepitoisuutena 1 % ja edullisesti 5 - 25 %. Tämän piirteen etuna on, että sillä saadaan aikaan reagenssi, joka antaa paljon voimakkaamman signaalin
10 sytomegalovirus-DNA:n määrittämisessä.

Yleisesti esitettynä menetelmässä nukleiinihapporeagenssien valmistamiseksi

15 saatetaan vesisuspensio, joka sisältää sukkiiniimidipitoisia polymeerihiukkasia, joiden keskimääräinen hiukkaskoko on 0,05 - 10 mm ja joita on läsnä vähintään kiintoainepitoisuutena 1 %, kosketukseen oligonukleotidin kanssa, jossa on aktiivinen amiini- tai sulfhydryyliryhmä, joka reagoi aktiivisten sukkiini-imidoksykarbonyyliryhmien
20 kanssa, jolloin hiukkasten ja oligonukleotidin välille muodostuu kovalenttinen kytkentä.

Ellei oligonukleotidissa ole tarvittavia aktiivisia amiini- tai sulfhydryyliryhmiä, niitä voidaan lisätä käyttämällä tunnettuja menettelyjä ja reagoivia aineita.

25 Tämän keksinnön mukaisissa analyttisissä tai diagnostisissa menetelmissä kyseisiä reagensseja voidaan käyttää minkä tahansa spesifisesti sitoutuvan ligandin detektointiin jolle on olemassa reseptorimolekyyli. Tämän keksinnön mukaisessa reagenssissa oleva biologisesti aktiivinen aine voi olla spesifisesti aktiivinen joko ligandin tai sen reseptorin suhteen. Ligandin detektointi voidaan tehdä liuoksessa tai kuivassa muodossa (kuvataan jäljempänä) käyttämällä vesipohjaisista nesteistä (kuten biologisista nesteistä) tai kudosta tai solumateriaalien liuoksista
30 ta koostuvia tutkittavia näytteitä, ja määrittäminen voi olla

kvantitatiivinen, kvalitatiivinen tai molempia. Tarkemmin
määriteltynä keksintöä voidaan käyttää eläinten, ihmisen
tai kasvien biologisten nesteiden, edullisesti kuitenkin
ihmisen nesteiden tutkimiseen, mukaan luettuina kokoveri,
5 seerumi, plasma, imuneste, sappineste, virtsa, selkäydin-
neste, yskökset, kyynelneste, hiki, irtosolunäytteet, ku-
dosviljelmät, uloste, solunesteet, emätineritteet ja sie-
menneste. On myös mahdollista tutkia ihmis- tai eläinku-
doksesta, kuten luurankolihaksesta, sydäimestä, munuaisis-
10 ta, keuhkoista, aivoista, luuytimeä tai ihosta valmis-
tettuja nestemäisiä preparaatteja.

Ligandi voi olla lääke, hapteeni, hormoni, antigeeninen materiaali (lipopolysakkaridi tai proteiini) tai vasta-aine, jossa on yksi tai useampia kompleksoitumiskoh-
15 tia yhden tai useamman saman tai eri reseptorimolekyylin kanssa. Tämän keksinnön mukaisissa immuunimäärityksissä ligandi voi olla lääke (kuten digoksiini, fenytoiini tai karbamatsepiini), hormoni (kuten kilpirauhasta stimuloiva hormoni, ihmisen koriongonadotropiini, luteinisoiva hor-
20 moni ja tyroksiini), retroviruskomponentti tai retroviruksen vastainen vasta-aine (kuten HIV-I:n komponentti tai sen vasta-aine), infektoiva bakteeri tai sen komponentti tai sen vastainen vasta-aine (kuten *Streptococcus A* -antigeeni, klamydia- tai gonokokkiantigeeni tai niiden vasta-
25 aine), virus tai sen komponentti (kuten hepatiitti-, sytomegalo- tai herpesvirusantigeeni) tai vasta-aine, syöpää aiheuttava aine tai C-aktiivinen proteiini. Ligandi voi olla myös biotiini tai sen johdannainen, jolloin reseptori on avidiini tai sen johdannainen.

30 Joissakin suoritusmuodoissa ligandi voi olla nukleinihappo (tavallisesti yksisäikeisessä muodossa), jonka määrä tai läsnäolo detektoidaan käyttämällä reseptorimolekyylinä komplementaarista yksisäikeistä nukleinihappoa. On olemassa erilaisia määritystapoja nukleinihappojen
35 detektoimiseksi, jotka kaikki ovat ammattimiehille tuttu-

ja. HIV-I-DNA:n, B-glöbiini-DNA:n tai sytomegalovirus-DNA:n detektointi ovat erityisen kiinnostuksen kohteina tämän keksinnön toteutuksen yhteydessä.

5 Ligandi on edullisesti antigeeninen materiaali, haptereni tai lääke. Reseptori on edullisesti vasta-aine mainitulle antigeeniselle materiaalille, hapterenille tai lääkkeelle.

10 Kuten edellä kuvattiin, käytetään kompetitiivisia sitoutumismäärityksiä, ja ne voidaan toteuttaa liuoksessa. Liuosmääritys on määrittäminen, jossa reagensseja käytetään suspensiossa, joka sisältää reagenssia ja tutkittavaa näytettä, jonka epäillä sisältyvän kiinnostuksen kohteena olevaa ligandia. Tällä määrittämisellä voidaan määrittää joko sitoutuneita (ts. kompleksoituneita) tai sitoutumattomia (ts. kompleksoitumattomia) materiaaleja. Sitoutuneiden ja sitoutumattomien materiaalien fysikaalinen erottaminen voidaan haluttaessa tehdä käyttämällä mitä tahansa sopivaa erotusmenetelmää. Käytettäessä analyyttisiä elementtejä (kuvataan jäljempänä) voidaan käyttää joko pysäytysuoraa tai vaakaruoraa erotusta. Sitoutunut ligandi voidaan määrittää käyttämällä valonsironta-, turbidimetria-, radiometria- tai spektrofotometriamenetelmiä.

25 Kompetitiivisessä sitoutumismäärityksessä reagenssia on yleensä läsnä pitoisuutena, joka riippuu immunologisen spesieksen (ts. reseptorin) määrästä polymeerihäikkäillä ja kiinnostuksen kohteena olevasta ligandista. Ligandianalogia (ligandia, joka on leimattu detektoitavissa olevaksi) käytetään myös, jolloin ligandi ja ligandianalogi kilpailevat keskenään reaktioon käytettävissä olevasta tunnetusta määrästä reseptoria. Määritys tehdään yleensä saattamalla fysikaalisesti kosketukseen ja sekoittamalla reagenssi, ligandianalogi ja tutkittava näyte sopivassa säiliössä, niin että tapahtuu kompleksoituminen. Inkubointia voidaan käyttää kompleksoitumisen edistämiseksi sekä kompleksien detektointiin mahdollisesti tarvitta-

35

via kemiallisia tai biologisia reaktioita (kuten värinmuodostusta).

Ligandi on tarkemmin määriteltynä immunologinen spesies. Ligandin ja reseptorin välisessä reaktiossa muodostuu immunologinen kompleksiksi, joka on detektoitavissa, kun vesiliukoiset (kompleksoitumattomat) materiaalit on erotettu kompleksista (esimerkiksi suodattamalla tai sentrifugoimalla). Tämä osoittaa spesieksen läsnä- tai poissaolon näytteessä.

Tämän keksinnön mukaiset menetelmät voidaan toteuttaa myös käyttämällä kuivia analyyttisiä elementtejä. Yksinkertaisin elementti voi koostua adsorbointiaineesta ja nestettä läpäisevästä substraatista, esimerkiksi ohuesta levystä itsekantavaa adsorboivaa tai imukykyistä materiaalia, kuten suodatinpaperista tai paperiliuskasta. Tässä substraatissa on yksi tai useampia reaktiovyöhykkeitä, kemiallisia, biologisia tai spesifisiä sitoutumisreaktioita varten. Tämän keksinnön mukaista reagenssia on läsnä ainakin yhdellä näistä vyöhykkeistä. Muut mahdolliset vyöhykkeet voivat sisältää muita reagensseja, kuten väriaineita, väriä muodostavia yhdisteitä, kompleksointiaineita, hapettumisenestoaineita, entsyymien substraatteja tai puskuireita, ja muita ammattimiehelle tuttuja materiaaleja. Tällaiset elementit tunnetaan alalla testiliuskoina, analyysielementteinä, levyinä tai puikkoina.

Elementtien valmistuksessa käyttökelpoisiin adsorboiviin materiaaleihin voivat kuulua selluloosapitoiset materiaalit (kuten huokoiset paperit), huokoiset polymeerikalvot, lasikuitumatot, kudotut tai kutomattomat kankaat ja muuta ammattimiehen tuntemat materiaalit. Edullisia alustoja ovat huokoiset levityskerrokset.

Edulliset elementit voivat sisältää yhden tai useampia päällekkäisiä nestettä läpäiseviä kerroksia, jotka kaikki on asetettu huokosettoman, nestettä läpäisemättömän tukialustan (joka voi olla läpinäkyvä tai läpinäky-

mätön) päälle, joka koostuu sopivasta polymeeri-, selluloosa- tai metalimateriaalista. Kerroksia voidaan käyttää eri tarkoituksiin, kuten reaktiovyöhykkeinä, pohjavyöhykkeinä, reagenssivyöhykkeinä, sulkuvyöhykkeinä, säteilyä pysäyttävinä vyöhykkeinä ja muihin alalla hyvin tunnettuihin tarkoituksiin. Reagenssit ja puskurit voivat haluttaessa liikkua pitkin toivottuihin reaktioihin tarkoitettuja kerroksia määrityksen tekemiseksi ja detektoitavissa olevan tuotteen ja sitoutuneiden ja sitoutumattomien materiaalien erottumisen aikaansaamiseksi.

Vaikka on edullista, että tämän keksinnön mukainen reagenssi sisällytetään elementtiin käyttöä varten, tämä ei ole ratkaisevaa, koska reagenssi voidaan lisätä elementtiin määrityksen tekohetkellä yhdessä tutkittavan näytteen kanssa. Tämän keksinnön mukainen ligandianalogi ja reagenssi (joka sisältää asianomaista reseptoria) sijaitsevat elementissä eri vyöhykkeillä, niin etteivät ne kompleksoidu ennen aikaisesti.

On edullista, että ligandianalogi leimataan entsyymillä, kuten edellä kuvatulla entsyymillä, ligandi on antigeeninen materiaali, hormoni, haptenei tai lääke ja reseptori on vastaava vasta-aine tai immuunireagoiva aine. Tällaiset elementit ovat erityisen käyttökelpoisia karbamatsepiinin, tyroksiinin, fenobarbitaalin, fenytoiinin tai digoksiinin määrittämisessä. Ne ovat edullisimmin käyttökelpoisia fenobarbitaalin, fenytoiinin tai digoksiinin määrittämisessä.

Tämän keksinnön mukaisesti voidaan valmistaa joukko erilaisia elementtejä määritysmenetelmän mukaan. Ne voivat olla muodoltaan erilaisia, mukaan luettuina halutun levyiset pitkänomaiset nauhat, arkit, levyt tai palat.

Tämän keksinnön mukainen liuoksessa tai kuivana tehtävä määrittäminen voi olla manuaalinen tai automaattistettu. Yleisesti esitettynä käytettäessä kuivia elementtejä analysoitavan aineen määrittäminen tehdään ottamalla elementti

rullasta, paloja sisältävästä pakkauksesta tai muusta lähteestä ja saattamalla se fysikaaliseen kosketukseen tutkittavan näytteen kanssa. Tämä menetelmä mahdollistaa myös näytteen ja elementissä olevien reagenssien sekoittumisen yhdellä tai useammalla testivyöhykkeellä. Tällainen kosketus voidaan toteuttaa millä tahansa sopivalla tavalla, esimerkiksi kastamalla tai upottamalla elementti näytteen tai edullisesti laittamalla näytepisara elementille sopivalla välineellä. Myös huuhtelunesteitä voidaan käyttää määrittämisessä.

Määrittäystulokset saadaan yleensä tarkkailemalla detektoitavissa olevia spektrofotometrisiä muutoksia elementissä joko visuaalisesti tai sopivan detektointilaitteen avulla.

Tämän keksinnön yksi suoritusmuoto ovat agglutinaatiomääritykset. Niissä ligandi kompleksoidaan tämän keksinnön mukaisen reagenssin kanssa, jolloin tapahtuu hiukkasten detektoitavissa oleva agglutinaatio tai kokkaroituminen. Tuloksena oleva agglutinaatio voidaan detektoida eri tavoin, esimerkiksi visuaalisesti tai sopivalla laitteella valonsironnan detektoimiseksi.

Agglutinaatiomääritykset tehdään edullisesti käyttämällä tämän keksinnön mukaisia reagensseja, jotka on leimattu jollakin tavalla detektoitavissa oleviksi. Merkkiaineisiin kuuluvat hiukkasessa tai siihen liitettyssä biologisesti aktiivisessa aineessa oleva radioisotooppi ja hiukkaseen liitetty kolorimetrinen tai fluorimetrinen väriaine. Väriaine on edullisimmin hiukkasen sisällä. Tämä estää biologisesti aktiivisen aineen liittämisen tai sen kompleksoinnin häiriintymisen. Tällaiset hiukkaset voivat olla ydin-vaippahiukkasia, joiden ydinpolymeerissä on väriainetta vaippapolymeerin ollessa väriaineetonta. Ydin-vaippapolymeerihiukkasissa vaippapolymeerillä on koostumus, jossa on tarvittavia aktiivisia sukkiini-imidoksikar-

bonyyliryhmiä. Ydinpolymeeri voi kuitenkin olla erilaista eikä sen tarvitse sisältää aktiivisia ryhmiä.

Tämän keksinnön mukaisesti immunologinen spesies voi olla antigeeninen materiaali ja reseptori sitä vastaava vasta-aine. Vaihtoehtoisesti immunologinen spesies voi olla vasta-aine ja reseptori sille spesifinen antigeeninen materiaali.

Tämän keksinnön mukaista reagenssia voidaan käyttää immunometrisissä määrityksissä. Mainitunlaisissa määrityksissä kiinnostuksen kohteena oleva ligandi kompleksoidaan kahden tai useamman (samanlaisen tai erilaisen) reseptorimolekyylin kanssa, joista yksi on tehty liukenemattomaksi tai on tehtävissä liukenemattomaksi (esimerkiksi avidiini-biotiinisidoksella) ja yksi on vesiliukoinen ja asianmukaisesti leimattu (esimerkiksi radioisotoopilla, entsyymillä, kemiluminesoivalla ryhmittymällä tai muulla alalla tunnetulla merkkiaineella). Ligandin, kuten ihmisen koriongonadotropiinin, immunometrinen määrittäminen voidaan tehdä esimerkiksi tämän keksinnön mukaisella reagenssilla, jossa on kyseisen hormonin vastaisia vasta-aineita yhdistettyinä entsyymillä leimattuihin gonadotropiinin vastaisiin vasta-aineisiin, jotka kompleksoituvat eri epitooppikohtien kanssa kuin reagenssivasta-aineet. Tuloksena oleva kerroskompleksi on liukenematon, detektoitavissa ja erotettavissa kompleksoitumattomista materiaaleista (esimerkiksi mikrohuokoisella suodatuskalvolla). Yhdessä edullisessa suoritustavassa tämän keksinnön mukaisessa reagenssissa on kiinnostuksen kohteena olevaa ligandia vastaava reseptori, ja se on immobilisoitu kalvolle.

Kerrosmäärittäyksessä kiinnostuksen kohteena oleva ligandi saatetaan edullisesti, joko ennen veteen liukenevattoman kompleksin muodostamista tämän keksinnön mukaisen reagenssin kanssa, samanaikaisesti sen kanssa tai sen jälkeen, reagoimaan sen suhteen spesifisesti aktiivisen, veteen liukenevan spesifisen sitoutuvan komponentin kanssa.

Muihin ligandeihin, joita voidaan detektoida tämän keksinnön mukaisilla kerrosmäärityksillä, kuuluvat, mainittuihin kuitenkin rajoittumatta, *Streptococcus*-antigeenit, hampaan ympäryskudoksen sairauksiin liittyvistä mikro-organismeista eristetyt antigeenit, hepatiittivirusan-
5 tigeenit ja HIV-I- ja muut retrovirusantigeenit.

Kerrosmäärityksessä tämän keksinnön mukainen reagenssi voidaan suoraan saattaa reagoimaan kiinnostuksen kohteena olevan ligandin kanssa, esimerkiksi ligandin ol-
10 lessa antigeeni ja reagenssin sisältäessä sitä vastaavia vasta-aineita. Vaihtoehtoisesti reagenssi kompleksoidaan epäsuorasti, ts. välissä olevan kytkentäryhmän kautta, ligandin kanssa.

Tämän keksinnön yksi suoritusmuoto on hybridisaatiomääritys, jossa kohteena oleva nukleiinihappo detektoi-
15 daan käyttämällä komplementaarisia koettimia. Yksi koettimista voidaan leimata, ja toinen on immobilisoitu tai immobilisoitavissa. Tämän keksinnön mukaista reagenssia voidaan käyttää immobilisoituna koettimena (sidottuna koetti-
20 mena) tällaisissa määrityksissä. Näitä reagensseja voidaan käyttää sidottuina koettimina myös esimerkiksi polymeerasiketjureaktiolla tehdyn monistuksen jälkeen. Monistettu nukleiinihappo immobilisoidaan hybridisaatiolla käyttämäl-
lä tämän keksinnön mukaista reagenssia.

Edullisissa hybridisaatiomäärityksissä kiinnostuk-
25 sen kohteena oleva nukleiinihappo monistetaan käyttämällä polymeerasiketjureaktiota ja sopivia reagensseja (esimerkiksi DNA-polymeraasia, dNTP:itä, alukkeita) ennen sitomista tämän keksinnön mukaisella reagenssilla. HIV-I-DNA, sytomegalovirus-DNA ja β -globiini-DNA on helppo detektoida
30 käyttämällä monistusta ja tämän keksinnön mukaista detektointia. Yhdessä suoritusmuodossa yksi alukkeista on biotinyloitu ja monistetun nukleiinihapon detektointi tehdään käyttämällä avidiinin ja entsyymin konjugaattia. Hybridi-
35 soitu tuote voidaan sitoa käyttämällä reagenssia, joka

voidaan kiinnittää jonkintyyppiseen alustaan tai sijoittaa sen määrättyyn kohtaan, mukaan luettuna mikrohuokoinen alusta, kuten kalvo, tai tarvittavat aineet sisältävän reaktiotaskun osasto.

5 Tämän keksinnön mukaiset analyyttiset, kerros- ja hybridisaatiomääritykset voidaan tehdä käyttämällä sopivia laitteita ja menettelyjä, niin että kompleksoitu tai hybridisoitu tuote sidotaan tai erotetaan kompleksoitumattomista materiaaleista suodattamalla, sentrifugoimalla tai
10 muulla tavalla. Tällaiset määritykset tehdään edullisesti käyttämällä kertakäyttöisiä testivälineitä, jotka sisältävät mikrohuukoisia suodatuskalvoja (esimerkiksi tuotteet, joita myyvät Pall Corp. ja SureCellTM-testivälineiden nimellä Eastman Kodak Co.).

15 Tämän keksinnön mukaista analyyttistä erotusmenetelmää voidaan käyttää yhden tai useamman kiinnostuksen kohteena olevan analysoitavan aineen eristämiseen biologisten materiaalien seoksesta. Niinpä tämän keksinnön mukainen reagenssi (tai useampia reagensseja, joissa on erilaisia aineita hiukkasiin kiinnitettyinä) laitetaan yleensä kolonniin, jonka läpi johdetaan biologisten materiaalien seosta sisältävää nestettä, jolloin reagenssi pääsee erottamaan nesteestä materiaalit, jotka halutaan eristää. Tämä voi olla hyödyllistä puhdistettaessa nukleiinihappoja, entsyymejä, hiilihydraatteja, proteiineja, lipidejä,
20 vitamiineja, steroideja, vasta-aineita, peptidejä tai hormoneja, ja menetelmää kutsutaan affiniteettikromatografiaksi.

 Affiniteettikromatografiaa voidaan käyttää myös
30 laimeiden proteiiniliuosten konsentroidiin proteiinien denaturoitujen muotojen poistamiseksi puhdistetuista proteiineista ja määrätyissä kemiallisissa muutoksissa muodostuneiden proteiini- ja peptidikomponenttien erottamiseksi.

Tämän menetelmän yksi käyttö on nukleiinihappojen, kuten polymeraasiketjureaktiolla tehdyssä monistuksessa muodostuneiden nukleiinihappojen, puhdistus.

5 Tämän keksinnön mukainen reagenssi voidaan toimit-
taa mitä tahansa kuvattua menetelmää varten yhtenä materi-
aalina, edellä kuvatun kaltaisessa analyttisessä elemen-
tissä tai yhdistettynä diagnoosivälineistön muihin rea-
gensseihin, testivälineisiin ja laitteisiin. Puhdistusme-
10 netelmää varten reagenssi voidaan toimittaa myös affini-
teettikromatografiakolonnissa.

Yhdessä puhdistusmenetelmäsuoritusmuodossa reagens-
silla sidotaan yksi tai useampia näyteseoksessa olevia
ennalta määrättyjä biologisesti aktiivisia aineita. Alku-
peräinen eluentti heitetään pois ja sidotut aineet pois-
15 tetaan kolonnista käyttämällä liuotinta, joka muuttaa ai-
neiden sitoutumisominaisuuksiaa ja mahdollistaa niiden
kompleksien purkamisen. Tällaisiin liuottimiin kuuluvat
pH:ta muuttavat puskurit, kompleksin ioniluonnetta muutta-
vat suolaliuokset ja liuokset, jotka sisältävät toista
20 spesiestä, joka sitoutuu spesifisesti reagenssiin ja kor-
vaa sidotun aineen.

Vaihtoehtoisesti ennalta määrätty reagenssin sito-
mat aineet heitetään pois ja otetaan talteen muut alkupe-
räiseen eluenttiin jääneet kemialliset tai biologiset ma-
25 teriaalit.

Kaikki prosenttiosuudet ovat painoprosentteja, el-
lei toisin mainita.

Esimerkki 1

Antifenobarbitaalivasta-aineen immobilisointi keksinnön mukaisille polymeerihelmille ja vasta-aineaktiivisuuden säilyminen

5 Tutkittiin seuraavat kopolymeerihelmet:

Näyte Koostumus

- 10 1 Styreeni-N-akryloyylioksisukkiini-imidikopolymeeri
(moolisuhde 96,83:3,17; massasuhde 85:5)
- 2 Ydin-vaippapolymeeri, jonka ydin on styreeni-
eteenidimetakrylaattikopolymeeriä (moolisuhde 99:1)
ja vaippa styreeni-[m- ja p-(60:40)-(2-kloorietyyli-
lisulfonyylimetyyli)styreeni]eteenidimetakrylaat-
15 titerpolymeeriä
(moolisuhde 94,5:4,5:1)
- 3 Styreeni-[m- ja p-(60:40)-2-(2-kloorietyyliisulfo-
nyylimetyyli)styreeni]metakryylihappoterpolymeeri
(moolisuhde 89,14:4,16:6.34)

20

Kaikki helmet käsiteltiin samanlaisissa olosuhteis-
sa. Valmistettiin reaktiodispersio, joka sisälsi 0,3 mg
antifenobarbitaalivasta-ainetta ja 30 mg (kuivamassa) hel-
miä puskurissa #1 [0,1 mol/l N-(2-hydroksietyyli)piperat-
25 siini-N'-(3-propaanisulfonihappoa), pH 8,5] lopputilavuun-
den ollessa 1,5 ml, ja laitettiin se koeputkiin. Reaktio-
seoksia sisältäviä suljettuja putkia pyöritettiin poikit-
taisakselinsa ympäri huoneenlämpötilassa 4 tuntia. Reakti-
ot keskeytettiin lisäämällä 0,3 ml naudan seerumialbumiini-
30 nia sisältävää (100 mg/l) liuosta. Putkia pyöritettiin
poikittaisakselinsa ympäri vielä 16 tuntia huoneenlämpöti-
lassa. Reaktioseokset sentrifugoitiin, supernatantit pois-
tettiin ja helmet suspendoitiin uudelleen fosfaattipus-
kuroituun fysiologiseen suolaliuokseen (1 ml; pH 7,4).
35 Tämä vaihe toistettiin vielä kolme kertaa. Viimeinen

uudelleensuspendointi tehtiin käyttämällä 1,8 ml fosfaattipuskuroitua fysiologista suolaliuosta (jäljempänä "fysiologinen suolaliuos") ja lisättiin mertiolaattia loppupitoisuudeksi 0,02 %.

5 Tehtiin samanlaiset reaktiot käyttämällä ^{125}I -leimattua naudan gammaglobuliinia. Nämä reaktiot tehtiin pintaan adsorboituneen vasta-aineen kokonaismassan määrittämiseksi. Analyysi tehtiin seuraavasti: Erotettiin 0,18 ml reaktioseosta naudan seerumialbumiinin lisäämisen jälkeen
10 ja mitattiin sen radioaktiivisuus. Samoin kuin vasta-ainehelmien ollessa kyseessä helmet sentrifugoitiin; erotettiin 0,18 ml näytettä ja mitattiin sen radioaktiivisuus. Loppuosa supernatantista poistettiin ja helmet suspendoitiin uudelleen käyttämällä 1 ml fosfaattipuskuroitua fysiologista suolaliuosta. Helmet sentrifugoitiin uudelleen,
15 suspendoitiin sitten 1 % natriumdodekyylisulfaattia sisältävään liuokseen (1 ml) ja mitattiin radioaktiivisuus. Pestyjen helmien radioaktiivisuuden suhdetta reaktioseoksen alkuperäiseen radioaktiivisuuteen käytettiin leimatun globuliinin määrän laskemiseen ja analogisesti helmien
20 pinnoille adsorboituneen vasta-aineen määrän laskemiseen.

Aktiivisen vasta-aineen suhteelliset määrät helmissä määritettiin määrityksellä, jossa sekoitettiin vasta-ainehelmidispersioiden laimennussarjat määrättyyn pitoisuuteen yhtä kahdesta antigeenista, jotka olivat entsyymillä leimattu fenobarbitaali ja ^3H -fenobarbitaali.
25 Reaktioseoksia, jotka sisälsivät laimennettuja vasta-ainehelmidispersioita ja entsyymimerkkiaineita fosfaattipuskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa, joka sisälsi
30 0,1 % albumiinia, inkuboitiin 1 tunti huoneenlämpötilassa jatkuvasti sekoittaen. Inkuboinnin jälkeen helmet sentrifugoitiin ja otettiin supernatantista näyte liuokseen jääneen antigeenin pitoisuuden määrittämistä varten. Laskettiin vasta-aineen sitoutumiskohtien määrä, joka tarvittiin
35 sitomaan 50 % antigeeneista. Tulokset olivat seuraavat:

Sitoutumiskohtien teoreettinen määrä (nmol), joka tarvitaan poistamaan 50 % antigeenista

Näyte	Entsyymimerkkiaine		³ H-fenobarbitaali
	5e-10M		5e-9M
5			11
	1	0,60	25
	2	1,4	25
	3	1,0	

Nämä tulokset osoittavat, että näytteen 1 helmille immobilisoitu vasta-aine voi sitoa enemmän fenobarbitaali-entsyymikonjugaattia tai fenobarbitaalilääkeainetta pienemmillä immobilisoidun vasta-aineen pitoisuuksilla, mikä osoittaa, että näille helmille immobilisoitu vasta-aine säilyttää paremmin aktiivisuutensa kuin muille helmille immobilisoitu vasta-aine.

Esimerkki 2

Antifenytoiinivasta-aineen immobilisointi keksinnön mukaisille polymeerihelmille ja vasta-aineaktiivisuuden säilyminen

Tutkittiin seuraavat kopolymeerihelmet:

Näyte Koostumus

- | | | |
|----|---|--|
| 25 | 1 | Sama polymeeri kuin esimerkin 1 näytteessä 1, mutta moolisuhde on 87,32:12,68 eikä 96,83:3,17 |
| | 2 | Sama polymeeri kuin esimerkin 1 näytteessä 2 |
| | 3 | Styreeni-[m- ja p-(60:40)-(2-kloorietyyli-sulfonyylimetyyli)styreeni]-eteenidimetakrylaatti-terpolymeeri (moolisuhde 94,5:4,5:1) |
| 30 | 4 | Styreeni-akryylihappokopolymeeri (moolisuhde 97,5:2,5) |
| | 5 | Styreeni-[m- ja p-(60:40)-(4-karboksibutyryyli-oksimetyyli)styreeni]kopolymeeri (moolisuhde 97,84:2,16) |

- 6 Styreeni-4-karboksibutyryylioksietyylimetakrylaattikopolymeeri (moolisuhde 97,84:2,16)
- 7 Styreeni-4-karboksibutyryylipolyoksietyleenimetakrylaattikopolymeeri (moolisuhde 98,71:2,19)

5

Vasta-aineen lyysiiniryhmien ja kopolymeerien 4 - 7 karboksyyli ryhmien välisen reaktion aktivaattori on 1-(1-pyrrolidinyyli)karbonyyli)pyridiumkloridi, jota kutsutaan jäljempänä "aktivaattoriksi".

10

Kaikki helmet käsiteltiin samoissa olosuhteissa. Valmistettiin reaktiodispersioita, jotka sisälsivät 0,3 mg vasta-ainetta (antifenytoiinivasta-aine DPH 1,2) ja 30 mg kuivia helmiä, ja joiden lopputilavuus oli 1,5 ml. Helmille 1 - 3 käytettiin puskuria #1 (pH 8,5). Helmille 4 - 7 käytettiin puskuria #2 [0,1 mol/l 2-(4-morfoliini)-etaanisulfonihappoa] ja läsnä oli 0,5 mmol aktivaattoria/g helmiä (0,015 mmol). Vasta-ainetta pinnallaan sisältävät helmet valmistettiin seuraavasti.

15

Polymeerihiukkasdispersioannoksia, jotka sisälsivät 30 mg (kuivamassa) helmiä, laitettiin 2 ml:n mikrosentrifugiputkiin. Lisättiin asianmukaisia puskureita siten, että seoksen tilavuus oli kussakin putkessa 1,5 ml. Helmiä sentrifugoitiin 10 min pyörimistaajuudella $13\,000\text{ min}^{-1}$ ja heitettiin supernatantti pois. Helmet 1 - 3 suspendoitiin uudelleen puskuriin #1 (1,393 ml). Helmet 4 - 7 suspedoitiin uudelleen puskuriin #2 (1,093 ml). Putkiin 4 - 7 lisättiin aktivaattoriliuosta (0,05 mol/l 0,3 ml:ssa puskuria #2), putket suljettiin ja niitä pyöritettiin poikittaisakselinsa ympäri 10 min. Kuhunkin putkeen lisättiin annos (0,107 ml, 2,82 mg/ml) antifenytoiinivasta-ainetta, putket suljettiin ja niitä pyöritettiin poikittaisakselinsa ympäri 4 tuntia.

25

30

35

Reaktiot keskeytettiin lisäämällä 0,3 ml naudan seerumialbumiinin liuosta (100 mg/ml). Putkia sekoitettiin poikittaisakselinsa ympäri vielä 16 tuntia huoneenlämpötilassa. Reaktioseokset sentrifugoitiin, supernatantit pois-

5 tettiin ja säästettiin analyysia varten ja helmet suspen-
doitiin uudelleen fysiologiseen suolaliuokseen (1 ml).
Tämä vaihe toistettiin kolmesti. Viimeinen uudelleen-
suspendointi tehtiin 1,8 ml:aan fysiologista suolaliuosta
ja lisättiin mertiolaattia loppupitoisuudeksi 0,02 %.

Reaktioseoksista saaduista supernatanteista analy-
soitiin kokonaisvasta-ainepitoisuus ELISA:lla. Tästä tu-
loksesta laskettiin pintaan sitoutuneen vasta-aineen
määrä.

10 Aktiivisen vasta-aineen suhteelliset määrät valmis-
teissa määritettiin määrityksellä, jossa sekoitettiin vas-
ta-ainehelmidispersioiden laimennussarjat määrättyyn pi-
toisuuteen yhtä kolmesta antigeenista, jotka olivat hap-
teeni-entsyymikonjugaatit, jotka oli valmistettu käyttä-
15 mällä kahta eri hapteneä [5,5-difenyylihydantoiini-3-1-
valeriaanahappo (hapteeni #1) ja 5-etyyli-5-enyylihydan-
toiini-3-1-valeriaanahappo (hapteeni #2)] ja ³H-fenytolii-
ni. Reaktioseoksia, jotka sisälsivät laimennettuja vasta-
ainehelmidispersioita ja eri antigeeneja fosfaattipusku-
20 roidussa fysiologisessa suolaliuoksessa, joka sisälsi
1,0 % albumiinia, inkuboitiin 1 tunti huoneenlämpötilassa
jatkuvasti sekoittaen. Liuokseen sentrifugoinnin jälkeen
jääneen entsyymimerkkiaineen tai ³H-fenytoliiinin määrä mää-
ritettiin ja laskettiin vasta-aineen sitoutumiskohtien
25 teoreettinen määrä, joka tarvittiin sitomaan 50 % antigeene-
neista. Tulokset olivat seuraavat:

	Näyte	Sitoutumiskohtien teoreettinen määrä (nmol), joka tarvitaan sitomaan 50 % antigeenista		
		Hapteeni #1	Hapteeni #2	³ H-fenytoliiini
30	1	2,5	2,5	1,2
	2	2,5	4,0	1,2
	3	2,0	5,0	1,1
	4	10	120	12
	5	15	120	6,0
35	6	10	80	6,0
	7	25	>250	15

Nämä tulokset osoittavat, että näytteen 1 helmille immobilisoitu vasta-aine sitoo hapteneita #2 immobilisoitujen sitoutumiskohtien pienemmällä pitoisuudella kuin millekään muille helmille immobilisoitu vasta-aine. Tämä osoittaa, että vasta-aineessa säilyy enemmän haptenin #2 sitoutumiskohtia, kun se immobilisoidaan keksinnön mukaisille helmille, kuin sidottaessa se muille helmille. Vasta-aineessa säilyy enemmän aktiivisuutta antigeenin suhteen immobilisoitaessa se näytteen 1 helmille kuin immobilisoitaessa se millekään muille karboksyylihapporyhmiä sisältäville helmille. Vasta-aineaktiivisuus haptenin #1 ja ^3H -fenytoinin suhteen tehtäessä immobilisointi näytteen 1 helmille on samanlainen kuin vasta-aineen aktiivisuus immobilisoitaessa se kloorietyylisulfonyyliryhmiä sisältävää tyyppiä oleville helmille.

Esimerkki 3

Esimerkin 1 näytteen 1 hiukkasten reaktio naudan ^3H -gammaglobuliinin kanssa

Annos esimerkin 1 näytteen 1 (93 μl , 16,2 %) kiintoainetta, joka sisälsi 15 mg polymeerikuiva-ainetta, yhdistettiin naudan leimatun (tritoidun) gammaglobuliinin liuokseen (27 μl , 10 mg/ml, 0,273 mg) ja täytettiin lopputilavuuteen 1,5 ml puskurilla #1 (pH 8,5) mikrosentrifugiputkessa. Reaktion annettiin edetä 24 tuntia huoneenlämpötilassa pyörittämällä putkia poikittaisakselinsa ympäri kierrostaajuudella 30 - 35 min^{-1} niiden ollessa kiinnitettynä 45°:n kulmaan asetetulle pyörivälle levyille. Toinen annos käsiteltiin muuten edellä kuvatulla tavalla, mutta reaktio tehtiin lämpötilassa 37 °C.

Kuvattujen reaktioaikojen lopussa kukin reaktio keskeytettiin lisäämällä ylimäärin naudan seerumialbumiinia (250 μl , 100 mg/ml) ja jatkamalla pyöritystä vielä 4 tuntia.

Sitoutuneen leimatun globuliinin kokonaismäärä määritettiin mittamalla a) reaktioseosannoksen (250 μl) radioaktiivisuus (pulssia/min), b) supernatanttiannoksen

(250 µl) radioaktiivisuus, kun reaktioseosta (1 ml) on sentrifugoitu kierrostaajudella $14\,000\text{ min}^{-1}$ 10 min, ja c) radioaktiivisuus materiaalista, joka on sitoutuneena lateksiin, kun kohdassa (b) saatu pelletti on pesty useaan kertaan. Lateksiin kovalenttisesti sitoutuneen globuliinin osuus määritettiin reagoineesta lateksista (500 µl), jota oli inkuboitu puskurin #1 (400 µl) ja 10-prosenttisen natriumdodekyyli-sulfaattiliuoksen (100 µl) kanssa 20 tuntia lämpötilassa $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pyörittäen putkia poikittaisakselinsa ympäri. Kovalenttisesti sitoutuneen määrän määrittämiseen käytetään samaa menettelyä, kuin kuvattiin edellä sitoutuneen leimatun globuliinin kokonaismäärän määrittämisen yhteydessä. Tulokset esitetään taulukoissa I ja II.

Taulukko I

Polymeeriin sitoutunut globuliini				
Näyte	Reaktiolämpötila	Tarjolla oleva leimattu globuliini	Sitoutunut osuus (%)	mg/g globuliinia/g polymeeria
1	huoneenlämpötila	0,5 mg	82	2,7
2	37°C	0,5 mg	85	2,8

Taulukko II

Kovalenttisesti sitoutunut leimattu globuliini (natriumdodekyyli-sulfaattikäsittelyn jälkeen)				
Näyte	Reaktiolämpötila	Sitoutunut osuus (%)	mg globuliinia/g polymeeria	Kovalenttisesti sitoutuneen globuliinin suhde kokonaismäärään
1	huoneenlämpötila	57	1,9	0,69
2	37°C	60	2,0	0,71

Näiden reaktioiden tulokset osoittavat, että kummassakin lämpötilassa on liittynyt kovalenttisesti suunnilleen yhtä suuret määrät leimattua globuliinia.

Patenttivaatimukset

5 1. Menetelmä biologisesti aktiivisen reagenssin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää vaiheen, jossa saatetaan reagoimaan

(I) veteen liukenematon, huokoseton hiukkanen, jossa ainakin ulkopinta koostuu silloittamattomasta kopolymeeristä, jossa on toistuvia yksiköitä, jotka ovat peräisin

10 (a) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta oleofiilisestä monomeerista, jotka tekevät kopolymerin hydrofobiseksi ja joiden osuus on 80 - 99,9 mol-%, sillä edellytyksellä, että yksikään näistä monomeereista ei ole ristisitoutuva
15 monomeeri;

(b) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joissa on sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmä ja joiden osuus on 0,1 - 20 mol-%, ja

20 (c) yhdestä tai useammasta muusta hydrofiilisestä etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joiden osuus on 0 - 10 mol-%,

(II) biologisesti aktiivisen aineen kanssa,

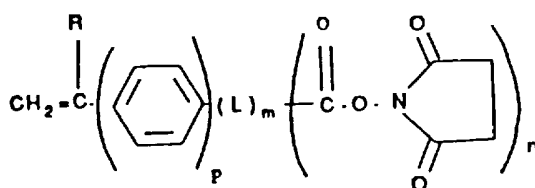
25 jolloin (I) ja (II) sitoutuvat kovalenttisesti amidirymän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla.

30 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen aine on aminohappo, peptidi, polypeptidi, proteiini, lipoproteiini, glykoproteiini, hormoni, lääkeaine, steroidi, vitamiini, polysakkaridi, glykolipidi, alkaloidi, mikro-organismi, virus, alkueläin, sieni, loinen, rikketsia, home, veren komponentti, kudokset tai elinkomponentti, farmaseuttinen aine, hapteeni, lektiini, toksiini, nukleiinihappo,
35 antigeeninen materiaali, avidiini tai sen johdannainen,

biotiini tai sen johdannainen tai jonkin edellä mainitun materiaalin komponentti.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen aine on vasta-aine.

4. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monomeeria (b) edustaa seuraava rakenne:



jossa

R on vetyatomi, 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyli-ryhmä tai halogeeniatomi,

L on kytkentäryhmä, jonka kytkevässä ketjussa on vähintään kaksi hiiliatomia ja joka koostuu vähintään kahden ryhmän yhdistelmästä, joita ryhmiä ovat 1 - 8 hiiliatomia sisältävät alkyleeniryhmät, 6 - 12 hiiliatomia sisältävät aryleeniryhmät, heteroatomit ja heteroatomin sisältävät ryhmät,

m on 0 tai 1, n on 1 tai 2 ja P on 0 tai 1, sillä edellytyksellä, että kun n on 2, yksi alkyleeni- ja aryleeniryhmistä on trivalenttinen.

5. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että monomeeri (b) on N-akryloyylioksisukkiini-imidi, 4-(2-sukkiini-imidoksi-karbonyylietyylitiometyyli)styreeni, 4-[1,2-bis(sukkiini-imidoksikarbonyyli)etyylitiometyyli]styreeni tai 4-(2-sukkiini-imidoksikarbonylifenyylitiometyyli)styreeni.

6. Analyytinen elementti, joka käsittää nestettä läpäisevän alustan, jossa on yksi tai useampia reaktiovyöhykkeitä ja joka sisältää ainakin yhdellä mainituista vyöhykkeistä biologisesti aktiivista reagenssia, t u n -

n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen reagenssi sisältää

(I) veteen liukenemattoman, huokosettoman hiukkasen, joka koostuu silloittamattomasta kopolymeeristä, jossa on toistuvia yksiköitä, jotka ovat peräisin

(a) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta oleofiilisesta monomeerista, jotka tekevät kopolymeerin hydrofobiseksi ja joiden osuus on 80 - 99,9 mol-%, sillä edellytyksellä, että yksikään näistä monomeereista ei ole ristisitoutuva monomeeri;

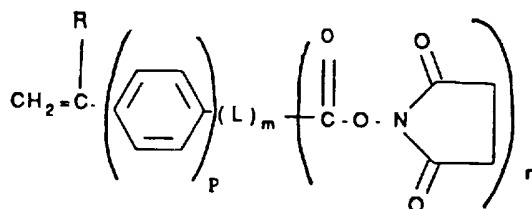
(b) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joissa on sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmä ja joiden osuus on 0,1 - 20 mol-%, ja

(c) yhdestä tai useammasta muusta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joiden osuus on 0 - 10 mol-%,

(II) biologisesti aktiivista ainetta, joka on sidottu kovalenttisesti hiukkaseen amidiryhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syryäytysreaktiolla.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen elementti, tunnettu siitä, että biologisesti aktiivinen aine on vasta-aine.

8. Patenttivaatimuksen 6 tai 7 mukainen elementti, tunnettu siitä, että monomeeria (b) edustaa seuraava rakenne:



jossa

R on vetyatomi, 1 - 3 hiiliatomia sisältävä alkyyli-
lilyhmä tai halogeeniatomi,

5 L on kytkentäryhmä, jonka kytkevässä ketjussa on
vähintään kaksi hiiliatomia ja joka koostuu vähintään kah-
den ryhmän yhdistelmästä, joita ryhmiä ovat 1 - 8 hiili-
atomia sisältävät alkyleeniryhmät, 6 - 12 hiiliatomia si-
sältävät aryleeniryhmät, heteroatomit ja heteroatomin si-
sältävät ryhmät,

10 m on 0 tai 1, n on 1 tai 2 ja P on 0 tai 1, sillä
edellytyksellä, että kun n on 2, yksi alkyleeni- ja ary-
leeniryhmistä on trivalenttinen.

9. Analyyttinen elementti, joka käsittää huokoset-
toman alustan, jolle on sijoitettu virtausyhteyteen ja
15 seuraavassa järjestyksessä

reagenssikerros, joka sisältää yhtä tai useampaa
reagenssia detektoitavissa olevan signaalin antamiseksi
määrityksessä reaktiona entsyymiin,

20 huokoinen levityskerros, joka sisältää biologisesti
aktiivista reagenssia, ja

mihin tahansa huokosettoman alustan yläpuolella
olevaan kerrokseen sijoitettuun entsyymiin sidottua ligan-
dianalogia,

t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen rea-
25 genssi sisältää

(I) veteen liukenemattoman, huokosettoman hiukka-
sen, joka koostuu silloittamattomasta kopolymeeristä, jos-
sa on toistuvia yksiköitä, jotka ovat peräisin

30 (a) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydytty-
mättömästä polymeroitavissa olevasta oleofiilisestä mono-
meerista, jotka tekevät kopolymerin hydrofobiseksi ja
joiden osuus on 80 - 99,9 mol-%, sillä edellytyksellä,
että yksikään näistä monomeereista ei ole ristisitoutuva
monomeeri;

(b) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joissa on sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmä ja joiden osuus on 0,1 - 20 mol-%, ja

5 (c) yhdestä tai useammasta muusta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joiden osuus on 0 - 10 mol-%,

10 (II) ligandia vastaavaa reseptoria, joka on sidottu kovalenttisesti hiukkaseen amidiyhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla.

10. Menetelmä spesifisesti sitoutuvan ligandin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että

15 A. saatetaan näyte, jonka epäillään sisältävän vesiliukoista spesifistä sitoutuvaa ligandia, kosketukseen biologisesti aktiivisen reagenssin kanssa, jolloin muodostuu ligandin veteen liukenematon spesifinen sitoutumiskompleksi reseptorin kanssa, ja

20 B. detektoidaan kompleksin läsnäolo osoituksena ligandin läsnä- tai poissaolosta näytteessä,

jolloin biologisesti aktiivinen reagenssi sisältää

(I) veteen liukenemattoman, huokosettoman hiukkasen, joka koostuu silloittamattomasta kopolymeeristä, jossa on toistuvia yksiköitä, jotka ovat peräisin

25 (a) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta oleofiilisestä monomeerista, jotka tekevät kopolymerin hydrofobiseksi ja joiden osuus on 80 - 99,9 mol-%, sillä edellytyksellä, että yksikään näistä monomeereista ei ole ristisitoutuva monomeeri;

30 (b) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joissa on sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmä ja joiden osuus on 0,1 - 20 mol-%, ja

(c) yhdestä tai useammasta muusta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joiden osuus on 0 - 10 mol-%, ja

5 (II) ligandia vastaavaa reseptoria, joka on sidottu kovalenttisesti hiukkaseen amidiryhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ligandi on antigeeninen materiaali, hapteeni tai lääkeaine ja reseptori on antigeenista materiaalia, hapteenia tai lääkeainetta vastaava vastaine.

12. Menetelmä spesifisesti sitoutuvan ligandin määrittämiseksi, t u n n e t t u siitä, että

15 A. saatetaan näyte, jonka epäillään sisältävän vesiliukoista spesifistä sitoutuvaa ligandia, kosketukseen biologisesti aktiivisen reagenssin kanssa,

B. ennen vaiheessa A aikaansaataavaa kontaktia, samanaikaisesti sen kanssa tai sen jälkeen saatetaan näyte kosketukseen ligandia vastaavan reseptorin kanssa, jolloin muodostuu reseptorin vesiliukoinen spesifinen sitoutumiskompleksi vesiliukoisen ligandin kanssa ja reseptorin veteen liukenematon sitoutumiskompleksi veteen liukenemattoman ligandin kanssa,

25 C. erotetaan veteen liukenematon kompleksi vesiliukoisista materiaaleista ja

D. detektoidaan veteen liukenemattoman kompleksin läsnäolo osoituksena ligandin läsnä- tai poissaolosta näytteessä,

30 jolloin biologisesti aktiivinen reagenssi sisältää

(I) veteen liukenemattoman, huokosettoman hiukkasen, joka koostuu silloittamattomasta kopolymeeristä, jossa on toistuvia yksiköitä, jotka ovat peräisin

35 (a) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta oleofiilisestä mono-

meerista, jotka tekevät kopolymeerin hydrofobiseksi ja joiden osuus on 80 - 99,9 mol-%, sillä edellytyksellä, että yksikään näistä monomeereista ei ole ristisitoutuva monomeeri;

5 (b) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joissa on sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmä ja joiden osuus on 0,1 - 20 mol-%, ja

10 (c) yhdestä tai useammasta muusta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joiden osuus on 0 - 10 mol-%,

15 (II) ligandimolekyyliä, jotka on sidottu kovalenttisesti hiukkaseen amidiryhmän kautta sukkiini-imidoksikarbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla.

13. Analyyttinen puhdistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että

20 A. johdetaan biologisesti aktiivisten aineiden seosta sisältävä näyte affiniteettikromatografiaregenssin yli, joka sisältää hiukkasen ja spesifisesti sitoutuvaa ainetta, ja

B. otetaan talteen reagenssilla oleva yksi tai useampi ennelta määrätty biologisesti aktiivinen aine,

25 jolloin hiukkanen käsittää veteen liukenemattoman, huokosettoman hiukkasen, joka koostuu silloittamattomasta kopolymeeristä, jossa on toistuvia yksiköitä, jotka ovat peräisin

30 (a) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta oleofiilisestä monomeerista, jotka tekevät kopolymeerin hydrofobiseksi ja joiden osuus on 80 - 99,9 mol-%, sillä edellytyksellä, että yksikään näistä monomeereista ei ole ristisitoutuva monomeeri;

35 (b) yhdestä tai useammasta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joissa

on sukkiini-imidoksykarbonyyliryhmä ja joiden osuus on 0,1 - 20 mol-%, ja

5 (c) yhdestä tai useammasta muusta etyleenisesti tyydyttymättömästä polymeroitavissa olevasta monomeerista, joiden osuus on 0 - 10 mol-%,

ja spesifisesti sitoutuva aine on sidottu kovalent-
tisesti hiukkaseen amidiyhmän kautta sukkiini-imidoksi-
karbonyyliryhmän sukkiini-imidoksiosan syrjäytysreaktiolla
10 ja spesifisesti sitoutuva aine on spesifinen biologisesti aktiivisia aineita sisältävän näyteseoksen yhdelle tai useammalle ennalta määrätylle biologisesti aktiiviselle aineelle.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en biologiskt aktiv reagens, k ä n n e t e c k n a t av att det omfattar ett steg där

(I) en i vatten olöslig, porlös partikel, vari åtminstone ytterytan består av en icke tvärbunden kopolymer, som har återkommande enheter som härstammar från

(a) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara, oleofila monomerer, som gör kopolymeren hydrofob, och vilkas andel är 80 - 99,9 mol-%, under förutsättning att ingen av dessa monomerer är en tvärbunden monomer;

(b) en eller flera etyleniskt omättade polymeriserbara monomerer, som har en succinimidoxikarbonylgrupp, och vilkas andel är 0,1 - 20 mol-%, och

(c) en eller flera andra hydrofila, etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer, vilkas andel är 0 - 10 mol-%, bringas att reagera med

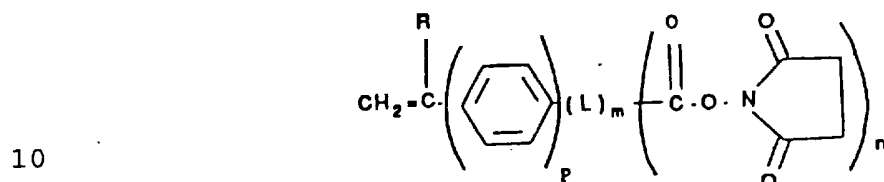
(II) ett biologiskt aktivt ämne,

varvid (I) och (II) binds kovalent via en amidgrupp genom en reaktion som undantränger succinimidoxikarbonylgruppens succinimidoxid.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att det biologiskt aktiva ämnet är en aminosyra, en peptid, en polypeptid, ett protein, ett lipoprotein, ett glykoprotein, ett hormon, ett läkemedel, en steroid, ett vitamin, en polysackararid, en glykolipid, en alkaloid, en mikroorganism, ett virus, en protozo, en svamp, en parasit, en rickettsia, ett mögel, en blodkomponent, en vävnads- eller organkomponent, ett farmaceutiskt ämne, en haptent, ett lektin, ett toxin, en nukleinsyra, ett antigeniskt material, avidin eller ett derivat av detta, biotin eller ett derivat av detta eller en komponent av något av de ovan nämnda materialen.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e -
t e c k n a t av att det biologiskt aktiva ämnet är en
antikropp.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3,
5 k ä n n e t e c k n a t av att monomeren (b) represe-
ntas av följande struktur:



vari

R är en väteatom, en alkylgrupp som innehåller 1 -
3 kolatomer, eller en halogenatom,

15 L är en kopplingsgrupp, vars kopplande kedja upp-
visar åtminstone två kolatomer och som består av en kom-
bination av åtminstone två grupper, vilka grupper utgörs
av alkylengrupper som innehåller 1 - 8 kolatomer, arylen-
grupper som innehåller 6 - 12 kolatomer, hetero-atomer och
20 grupper som innehåller en heteroatom,

m är 0 eller 1, n är 1 eller 2 och P är 0 eller 1,
under förutsättning att då n är 2 så är en av alkylen- och
arylengrupperna trivalent.

25 5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 4,
k ä n n e t e c k n a t av att monomeren (b) är N-akry-
loyloxisuccinimid, 4-(2-succinimidoxikarbonyletyl-tiome-
tyl)styren, 4-[1,2-bis(succinimidoxikarbo-nyl)etyltiome-
tyl]styren eller 4-(2-succinimidoxikar-bonylfenyltiome-
tyl)styren.

30 6. Ett analytiskt element som omfattar ett underlag
som släpper igenom vätska, vilket underlag är försett med
en eller flera reaktionszoner och innehåller på åtminstone
en av nämnda zoner en biologiskt aktiv reagens, k ä n -
n e t e c k n a t av att den biologiskt aktiva reagensen
35 omfattar

(I) en i vatten olöslig, porlös partikel som består av en icke tvärbunden kopolymer, som uppvisar återkommande enheter som härstammar från

5 (a) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara, oleofiliska monomerer som gör kopolymeren hydrofob och vilkas andel är 80 - 99,9 mol-%, under förutsättning att ingen av dessa monomerer är en tvärbunden monomer;

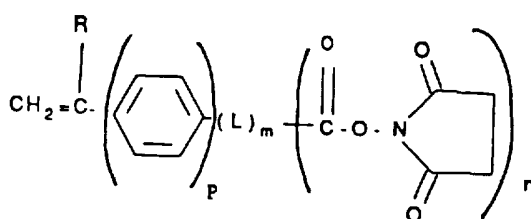
10 (b) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer, som har en succinimidoxikarbonylgrupp och vilkas andel är 0,1 - 20 mol-%, och

(c) ett eller flera andra etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer vilkas andel är 0 - 10 mol-%

15 (II) ett biologiskt aktivt ämne, som är kovalent bundet till en partikel via en amidgrupp genom en reaktion som undantränger succinimidoxikarbonylgruppens succinimidoxid.

20 7. Element enligt patentkrav 6, k ä n n e t e c k n a t av att det biologiskt aktiva ämnet är en antikropp.

8. Element enligt patentkrav 6 eller 7, k ä n n e t e c k n a t av att monomeren (b) representeras av följande struktur:



30
vari

R är en väteatom, en alkylgrupp som innehåller 1 - 3 kolatomer, eller en halogenatom,

35 L är en kopplingsgrupp, som i den kopplande kedjan har åtminstone två kolatomer och som består av en kom-

bination av åtminstone två grupper, vilka grupper är alkylengrupper innehållande 1 - 8 kolatomer, arylengrupper innehållande 6 - 12 kolatomer, heteroatomer och grupper innehållande en heteroatom,

5 m är 0 eller 1, n är 1 eller 2 och P är 0 eller 1, under förutsättning att då n är 2 så är en av alkylen- och arylengrupperna trivalent

9. Ett analytiskt element som omfattar ett porlöst underlag, på vilket i flödeskontakt och i följande ordningsföljd anordnats

ett reagensskikt som omfattar en eller flera reagenser för att avge en detekterbar signal vid bestämningen som en reaktion på ett enzym,

ett poröst spridningslager som innehåller en biologiskt aktiv reagens, och

en ligandanalogue som är bunden till ett enzym som är anordnat i vilket som helst lager ovanför det porlösa underlaget, k ä n n e t e c k n a t av att den biologiskt aktiva reagensen omfattar

20 (I) en i vatten olöslig, porlös partikel som består av en icke tvärbunden koploymer som uppvisar återkommande enheter som härstammar från

25 (a) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara, oleofila monomerer som gör kopolymeren hydrofob och vilkas andel är 80 - 99,9 mol-%, under förutsättning att ingen av dessa monomerer är en tvärbunden monomer;

(b) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer, som uppvisar en succinimidoxikarbonylgrupp och vilkas andel är 0,1 - 20 mol-%, och

30 (c) en eller flera andra etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer vilkas andel är 0 - 10 mol-%,

(II) en receptor för liganden, vilken receptor är kovalent bunden till en partikel via en amidgrupp genom en reaktion som undantränger succini-midoxikarbonylgruppens succinimidoxid.

35

10. Förfarande för bestämning av en specifikt bindande ligand, k ä n n e t e c k n a t av att

5 A. ett prov som misstänks innehålla en vattenlös-
lig, specifik, bindande ligand bringas i kontakt med en
biologiskt aktiv reagens, varvid det uppstår ett i vatten
olösligt specifikt bindingskomplex mellan liganden och
receptorn, och

10 B. komplexets närvaro detekteras som en indikator
på ligandens när- eller frånvaro i provet, varvid den bio-
logiskt aktiva reagensen omfattar

(I) en i vatten olöslig, porlös partikel som består
av en icke tvärbunden kopolymer som har åter-kommande en-
heter som härstammar från

15 (a) en eller flera etyleniskt omättade, polyme-
riserbara, oleofila monomerer som gör kopolymeren hydrofob
och vilkas andel är 80 - 99,9 mol-%, under förutsättning
att ingen av dessa monomerer är en tvärbunden monomer;

20 (b) en eller flera etyleniskt omättade, polyme-
riserbara monomerer som har en succini-midoxikarbonylgrupp
och vilkas andel är 0,1 - 20 mol-%, och

(c) en eller flera andra etyleniskt omättade, poly-
meriserbara monomerer, vilkas andel är 0 - 10 mol-%, och

25 (II) en receptor för liganden, vilken receptor är
kovalent bunden till en partikel via en amid-grupp genom
en reaktion som undantränger succini-midoxikarbonylgrup-
pens succinimidoxid.

30 11. Förfarande enligt patentkrav 10, k ä n n e -
t e c k n a t av att liganden är ett antigeniskt mate-
rial, en haptent eller ett läkemedel och att receptorn är
en antikropp för det antigeniska materialet, haptenten el-
ler läkemedlet.

12. Förfarande för bestämning av en specifik bin-
dande ligand, k ä n n e t e c k n a t av att

35 A. ett prov som misstänkt innehålla en vattenlös-
lig, specifik, bindande ligand bringas i kontakt med en
biologiskt aktiv reagens,

B. före kontakten i steg A, samtidigt med den eller efter den bringas provet i kontakt med en receptor för liganden, varvid det uppstår ett specifikt, vattenlösligt bindningskomplex mellan receptorn och den vattenlösliga liganden och ett i vatten olösligt specifikt bindningskomplex mellan receptorn och den i vatten olösliga liganden,

C. det i vatten olösliga komplexet separeras från de vattenlösliga materialen och

D. närvaron av ett i vatten olösligt komplex detekteras som en indikator på ligandens när- eller frånvaro i provet,

varvid den biologiskt aktiva reagensen omfattar

(I) en i vatten olöslig, porlös partikel som består av en icke tvärbunden kopolymer som har återkommande enheter som härstammar från

(a) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara, oleofila monomerer som gör kopolymeren hydrofob och vilkas andel är 80 - 99,9 mol-%, under förutsättning att ingen av dessa monomerer är en tvärbunden monomer;

(b) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer som har en succinimidoxikar-bonylgrupp och vilkas andel är 0,1 - 20 mol-%, och

(c) en eller flera andra etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer, vilkas andel är 0 - 10 mol-%,

(II) ligandmolekyler som är kovalent bundna till en partikel via en amidgrupp genom en reaktion som undantränger succinimidoxikarbonylgruppens succinimidoxidel.

13. Ett analytiskt reningsförfarande k ä n n e - t e c k n a t av att

A. ett prov innehållande en blandning av biologiskt aktiva ämnen leds över en affinitetskromatografireagens innehållande en partikel och ett specifikt bindande ämne, och

B. ett eller flera av de i förväg bestämda biologiskt aktiva ämnena på reagensen tas tillvara,

varvid partikeln omfattar en i vatten olöslig, porlös partikel som består av en icke tvärbunden kopolymer som har återkommande enheter vilka härstammar från

5 (a) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara, oleofila monomerer som gör kopolymeren hydrofob och vilkas andel är 80 - 99,9 mol-% under förutsättning att ingen enda av dessa monomerer är en tvärbunden monomer;

10 (b) en eller flera etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer som har en succini-midoxikarbonylgrupp och vilkas andel är 0,1 - 20 mol-%, och

(c) en eller flera andra etyleniskt omättade, polymeriserbara monomerer vilkas andel är 0 - 10 mol%,

15 och det specifikt bindande ämnet är kovalent bundet till partikeln via en amidgrupp genom en reaktion som undantränger succinimidoxikarbonylgruppens succinimidoxidel, och det specifikt bindande ämnet är specifikt för en eller flera av de i förväg bestämda biologiskt aktiva ämnena som provblandningen innehåller.