



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **341653**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
C08F 220/32 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20060406	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.04.28 PCT/GB2004/01801
(22)	Inng.dag	2006.01.25	(85)	Videreføringsdag	2006.01.25
(24)	Løpedag	2004.04.28	(30)	Prioritet	2003.07.17, US, 60/488,020
(41)	Alm.tilgj	2006.03.27			
(45)	Meddelt	2017.12.18			
(73)	Innehaver	Life Technologies AS, Postboks 114 Smestad, 0309 OSLO, Norge			
(72)	Oppfinner	Tom-Nils Nilsen, Fjordgløttv 15, 7053 RANHEIM, Norge Per Stenstad, Knut Hamsunv 1, 7024 TRONDHEIM, Norge Lars Kilaas, Skansegeta 17 C, 7014 TRONDHEIM, Norge Elin Marie Aksnes, Syrenveien 1, 0870 OSLO, Norge Ruth Baumberger Schmid, Porsmyra 60, 7091 TILLER, Norge Arvid Trygve Berge, Falsensgt 14, 7052 TRONDHEIM, Norge Jon Olav Bjørgum, Øvergeilan 7, 7089 HEIMDAL, Norge Geir Fonnum, Asbjørn Klosters vei 12 A, 1472 FJELLHAMAR, Norge Nini Kjus Hofsløkken, Rugveien 20, 0679 OSLO, Norge			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av belagte polymerpartikler inneholdende superparamagnetiske krystaller og partikkel			
(56)	Anførte publikasjoner	US 4654267 A WO 8904373 A			
(57)	Sammendrag				

Det beskrives en fremgangsmåte for fremstilling av belagte polymerpartikler som inneholder superparamagnetiske krystaller, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter omsetning av porøse, overflate-funksjonaliserte, superparamagnetiske krystallholdige polymerpartikler med en diameter på 0,5 til 1,8 µm, med minst ett polyisocyanat og minst én diol eller minst ett epoksyd.

Denne oppfinnelse vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av belagte polymerpartikler inneholdende superparamagnetiske krystaller og partikkel.

5 Magnetiske polymerpartikler er av generell anvendelighet på forskjellige medisinske og biokjemiske områder, for eksempel som transportbærere for avlevering av farmasøytiske produkter, for diagnostiske formål, for separasjon og for syntetiske formål. Slike partikler er basert på deres magnetiske egenskaper for utførelse av disse funksjonene. Ved anvendelse for diagnostiske tester, for eksempel ved påføring av et magnetfelt på en prøve som inneholder en analytt bundet til magnetiske polymerpartikler, muliggjøres isoleringen av analytten uten
10 bruk av sentrifugering eller filtrering, og for eksempel ved terapeutiske anvendelser kan påføring av et magnetfelt til pasienten tjene til å lede medikamentbærende magnetiske polymerpartikler til et ønsket kroppssted.

Med magnetisk menes her at polymerpartiklene inneholder superparamagnetiske krystaller. De magnetiske polymerpartiklene er derfor magnetisk forskyvbare, men er ikke permanent magnetiserbare. Mange fremgangsmåter for fremstilling av magnetiske polymerpartikler er kjent, hvorav et stort antall består i å fremstille maghemitt- eller magnetitt-holdige polymerpartikler fra på forhånd dannede magnetiske jernoksyder, f.eks. magnetitt. Noen av prosessene som inngår er beskrevet i US-A-4.654.267 (Ugelstad).

20 US-A-4.654.267 angir en rekke begrensninger med hensyn til de prosesser som går forut for dette, og som omfatter problemet med å oppnå magnetiske partikler av relativt lik størrelse og/eller av homogene eller uniforme magnetiske egenskaper, så vel som et mer generelt problem relatert til vansker forbundet med inkorporering av magnetisk materiale inn i hulrommene i porøse polymerpartikler.

25 Når avsetning finner sted hovedsakelig på overflaten eller i store åpne hulrom, fører følgelig utsiving av magnetpartikler, som forkorter den nyttbare levetid av magnetiske polymerpartikler for de anvendelser de er rettet mot, til problemer.

For å unngå disse ulemper foreslås i henhold til US-A-4.654.267 en preparativ metode som i dens enkleste form består i at porøse polymerpartikler
30 impregneres med løsninger av jernforbindelser, hvoretter jernet utfelles, for eksempel ved å heve pH-verdien. De utfelte jernforbindelsene kan deretter omdannes til superparamagnetiske jernoksydkrystaller ved oppvarming.

For å fremstille porøse magnetiske polymerpartikler som har magnetisk materiale deponert inne i polymerporene, foreslås i henhold til US-A-4.654.267 anvendelsen av porøse polymerpartikler som har funksjonelle grupper på overflaten, som tjener til å trekke jernioner inn i polymerpartiklene. Disse funksjonelle gruppene kunne enten være resultat av bruken av funksjonaliserte komonomerer ved produksjonen av polymeren eller skyldes behandling av polymeren etter polymerisering for å innføre de funksjonelle gruppene, f.eks. ved å koble til eller omdanne eksisterende grupper på polymeroverflaten.

Selv om oppfinnelsen angitt i US-A-4.654.267 tildels løser problemet med fremstillingen av magnetiske polymerpartikler som har mer homogene magnetiske egenskaper, gjenstår problemet med utsiving av de superparamagnetiske krystallene fra polymerpartiklene.

Vi har nå gjort den overraskende oppdagelse at dette problem kan løses for partikler av en viss størrelse, og magnetiske partikler med bestemte egnede overflatekarakteristika kan produseres ved å omsette overflate-funksjonaliserte magnetiske polymerpartikler med en kombinasjon av polyisocyanat/diol- eller epoksyd-monomerer for å fremstille en "belagt" magnetisk polymerpartikkel.

I henhold til et første aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse derfor en fremgangsmåte for fremstilling av belagte polymerpartikler inneholdende superparamagnetiske krystaller, idet den omfatter omsetning av porøse, overflate-funksjonaliserte, superparamagnetiske krystall-holdige polymerpartikler med en diameter på 0,5 til 1,8 μm , med minst ett polyisocyanat og minst én diol.

I henhold til et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse partikkel, idet den oppnås etter en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 22.

Foretrukne dioler er polyetylenglykoler eller forbindelser med formel $\text{HO}((\text{CH}_2)_m\text{O})_n\text{H}$ (hvor n er et heltall på fra 1 til 15, f.eks. 2 til 10, fortrinnsvis 2 til 4, og m er et heltall på fra 2 til 6, fortrinnsvis 2 til 3, mest foretrukket 2). Når bare én diol benyttes er denne fortrinnsvis en polyetylenglykol, f.eks. polyetylenglykol 300, 400, 500 eller 600.

De porøse polymerpartiklene benyttet for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, kan være enhver porøs polymer som har en funksjonalisert overflate, f.eks. som beskrevet i US-A-4.654.267.

Polymerens overflate-funksjonalitet er fortrinnsvis en gruppe som, eventuelt under aktivering, kan reagere med et polyisocyanat eller epoksyd for kovalent å binde polyisocyanatet eller epoksydet til overflaten. Mest foretrukket er overflaten amin-funksjonalisert.

5 Polymeren fremstilles fortrinnsvis fra kombinasjoner av vinylpolymerer, f.eks. styrener, akrylater og/eller metakrylater. Polymermaterialet kan eventuelt være kryssbundet for eksempel ved inkorporering av kryssbindende midler, for eksempel som komonomerer, f.eks. divinylbenzen (DVB) eller etylenglykol-dimetakrylat. Partikler som omfatter DVB foretrekkes.

10 Riktige mengder av de nødvendige kryssbindende midlene (f.eks. komonomerene) vil være velkjent for fagmannen. Fortrinnsvis er polymeren en kryssbundet styrenpolymer (f.eks. en styren-divinyl-benzenpolymer som kan være overflate-funksjonalisert ved bruk av en komonomer som inneholder en nitro-gruppe, f.eks. nitrostyren, og påfølgende reduksjon) eller en kryssbundet
15 (met)akrylpolymer, overflate-funksjonalisert ved anvendelsen av en komonomer som inneholder en epoksygruppe (f.eks. glycidylmetakrylat) og påfølgende aminering (f.eks. ved omsetning med etylendiamin).

De superparamagnetiske krystallene i de polymerpartikler som benyttes for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, kan være et hvilket som helst materiale som
20 kan avsettes i superparamagnetisk krystallinsk form i de porøse polymer-partiklene. Magnetiske jernoksyder, f.eks. magnetitt eller maghemitt foretrekkes, men om ønskes kan imidlertid krystallene være av blandede metalloksyder eller annet magnetisk materiale. Den totale mengde krystallinsk magnetisk materiale som inngår er i alminnelighet mer enn 1%, fortrinnsvis mer enn 3%, helst mer eller
25 likt 5 vekt%, f.eks. opptil 40 vekt%. Andelen beregnes på vektbasis av Fe (eller likeverdig metall når det gjelder andre magnetiske materialer enn jernoksyder) basert på den totale tørrvekt av de belagte partiklene.

Polymerpartikler i henhold til foreliggende oppfinnelse vil ha dimensjoner (dvs. diametere) som generelt ligger i området 0,5 til 1,8 μm , f.eks. 0,75 til 1,2 μm ,
30 fortrinnsvis 0,9 til 1,1 μm .

De porøse partiklene vil i alminnelighet ha et overflateareal på minst 15 m^2/g (målt ved hjelp av BET nitrogenabsorpsjonsmetoden), og mer foretrukket minst 30 m^2/g , f.eks. opptil 700 m^2/g , ved korrigering til en midlere partikkel-

diameter på 2,7 μm (dvs. multipliser overflatearealet med 2,7/MD, hvor MD er den midlere diameter i mikrometer). Etter samme skala er partikkelporevolumet fortrinnsvis minst 0,1 mL/g.

5 Polymerpartiklene er typisk kuleformede og tilnærmet monodisperse før de belegges, og forblir, spesielt foretrukket, kuleformede og tilnærmet monodisperse etter at de er blitt belagt.

Med tilnærmet monodisperse menes at for en flerhet av partiklene (f.eks. minst 100, mer foretrukket minst 1000) har partiklene en variasjonskoeffisient (CV) på mindre enn 20%, for eksempel mindre enn 15%, fortrinnsvis mindre enn 12%,
10 mer foretrukket mindre enn 11%, enda mer foretrukket mindre enn 10% og mest foretrukket ikke mer enn ca. 8%, f.eks. 2 til 5%. CV bestemmes i prosent som

$$\text{CV} = \frac{100 \times \text{standardavvik}}{\text{middelverdi}}$$

15

hvor middelverdi er den midlere partikkeldiameter, og standardavvik er standardavviket i partikkelstørrelse. CV beregnes fortrinnsvis etter hovedmetoden, dvs. ved å tilpasse en monomodal fordelingskurve til den påviste partikkelstørrelsesfordeling. Enkelte partikler under eller over modusstørrelsen kan således trekkes
20 fra ved beregningen, som for eksempel kan være basert på ca. 90% av totalt partikkelantall (dvs. av påvisbare partikler). En slik bestemmelse av CV kan foretas på en Coulter LS 130 partikkelstørrelsesanalysator.

Særlig anvendelige er polymerpartikler angitt i WO 99/19375 (Dyno Industrier ASA), WO 00/61648 (Dyno Speciality Polymers AS) tildels fremstilt fra
25 aminostyren som angitt i WO 01/70825.

I motsetning til hva som er beskrevet i WO 01/70825, kan funksjonalisering av polymermaterialet alternativt skje etter polymerisering, for eksempel ved nitrering og påfølgende reduksjon av de derved dannede nitrogruppene til
30 tilsvarende aminogrupper; eller ved direkte aminering, for eksempel ved behandling med aminoetanol. Som ytterligere alternativer kan polymerpartiklene fremstilles etter den velkjente tottrinns Ugelstad svellingsprosess og de forbedringer av denne som er angitt i WO 00/61647 (Dyno). Dessuten kan her også benyttes polymerpartikler fremstilt etter fremgangsmåtene angitt i WO 99/19375 og WO 00/61648. Porøse polymerpartikler fremstilt i henhold til de

prosesser som er beskrevet i disse publikasjonene, kan ha magnetiske partikler avsatt i porene ved hjelp av standardteknikker, f.eks. som beskrevet ovenfor. Som en ytterligere mulighet kan porøse polymerpartikler fremstilles fra nitrostyren og DVB, og magnetisk materiale innføres som beskrevet i US-A-4.654.267. Av disse fremgangsmåtene foretrekkes anvendelsen av aminostyren, særlig 4-aminostyren, som monomer eller komonomer ved fremstillingen av amino-bærende polymermateriale. Ved bruk av denne monomer eller komonomer unngår man behovet for nitrerings- og reduksjonsreaksjoner etter polymerisering. Den mer forutsigbare natur (homogenitet) av belegget oppnådd etter denne fremgangsmåte, tillater dessuten påføring av et mer pålitelig belegg.

Reaksjonen mellom den porøse magnetiske polymerpartikkel med epoksydene eller polyisocyanatene frembringer en polymer i porene av polymerpartiklene som i det vesentlige tjener til å blokkere disse porene ved fysisk å innkapsle de superparamagnetiske krystallene i polymerpartiklene. De resulterende "belagte" partiklene har derved redusert porøsitet i forhold til det porøse utgangsmaterialet. Vi har overraskende funnet at de superparamagnetiske krystallene synes å katalysere polymeriseringen slik at belegget fortrinnsvis dannes i nærheten av disse.

Om ønskes kan et epoksyd-polymerbelegg kryssbindes, f.eks. ved å benytte et isocyanat eller diisocyanat på kjent måte. Dersom det er ønskelig kan ytterligere materialer impregneres i de porøse partiklene enten før den beleggende polymerisasjonsreaksjon eller etter beleggings-polymerisasjon, men før belegg-polymer kryssbinding. Slike ytterligere materialer vil i alminnelighet være strålings-emittere eller absorberende midler, f.eks. kromoforer, fluorofores eller radioaktivt merkede materialer.

Partiklene kan omsettes med et enkelt epoksyd for å danne belegget. Egnede epoksyder inkluderer her glycidol, allylglycidyleter eller glycidylmetakrylat. Særlig har en beleggingsreaksjon som involverer glycidylmetakrylat i kombinasjon med jern(III)klorid gitt fordelaktige belegg.

I en foretrukket utførelsesform omsettes imidlertid de porøse polymerpartiklene med en blanding av epoksyder, f.eks. 2-6 epoksyder, spesielt 2, 3 eller 4 epoksyder. Av disse utgjør diepoksyder eller polyepoksyder fortrinnsvis minst 30 mol%, mer foretrukket minst 45 mol%.

Epoksydforbindelsene benyttet i henhold til oppfinnelsen omfatter fortrinnsvis minst ett diepoksyd, f.eks. en kombinasjon av to diepoksyder eller av et monoepoksyd og et diepoksyd. Fortrinnsvis inneholder epoksydene minst én eterbinding og eventuelt en hydrofob komponent, f.eks. en C₄₋₁₀-alkylenkjede eller en fenyl- eller bisfenylgruppe. I alminnelighet vil epoksydene ha et karbonatom-

5 innhold på fra 3 til 50, fortrinnsvis 3 til 25.

Typiske epoksyder som kan benyttes omfatter epiklorhydrin, epibromhydrin, isopropylglycidyleter, butylglycidyleter, allylglycidyleter, 1,4-butandiol-diglycidyleter (1,4-bis(2,3-epoksypropoksy)butan), neopentylglykol-diglycidyleter, etylenglykol-

10 diglycidyleter, polyetylenglykol-diglycidyleter (f.eks. med molekylvekt 150 til 1000 g/mol), glycerol-diglycidyleter, glycerolpropoksyilat-triglycidyleter, glycidol, glycidylmetakrylat og epoksyder på basis av Bisfenol A eller Bisfenol F, f.eks. 2,2-bis(4-(2,3-epoksypropoksy)fenyl)-propan.

Spesielt foretrukne epoksyder omfatter 2,2-bis(4-(2,3-epoksypropoksy)-fenyl)-propan, allylglycidyleter, 1,4-butandiol-diglycidyleter og glycidol. Særlig foretrekkes de epoksyder som omsettes under handelsnavnet Araldite, f.eks. Araldite LY-564 (en blanding av 2,2-bis(4-(2,3-epoksypropoksy)fenyl)-propan og 1,4-butandiol-diglycidyleter) og Araldite LY-026 (80% ren 1,4-butandiol-diglycidyl-

15 eter).

Det er beskrevet å først foreta en beleggingsreaksjon ved å benytte et enkelt epoksyd, og deretter foreta en andre beleggingsreaksjon ved å benytte en blanding av minst to epoksyder.

20

Beleggpolymeren kan dannes av ett eller flere (f.eks. 1, 2 eller 3) polyisocyanater og én eller flere (f.eks. 2, 3 eller 4) dioler. Fortrinnsvis bør ett polyisocyanat benyttes, f.eks. ett diisocyanat. Alternativt kan en blanding av nært beslektede polyisocyanater benyttes (f.eks. Desmodur).

25

Typiske polyisocyanater som kan benyttes omfatter metylendiisocyanat, heksametylen-diisocyanat, 2,4-toluen-diisocyanat (2,4TDI) (og isomerer eller blandinger derav), isoforon-diisocyanat (IPDI), 4,4'-oksybis(fenylisocyanat), 4,4'-difenylmetan-diisocyanat (MDI), blandinger av MDI og oligomerer basert på MDI (f.eks. Desmodur VL), 2,4-difenyldiisocyanat, metylen-biscykloheksyl-diisocyanat (H₁₂MDI), fenylene-diisocyanat (p-PDI), trans-cykloheksan-1,4-diisocyanat (CHDI), 1,6-diisocyanatoheksan (DICH), 1,5-diisocyanato-naftalen (NDI), paratetra-

30

metylxylen-diisocyanat (p-TMXDI) eller metatetrametylxylen-diisocyanat (m-TMXDI).

Et spesielt foretrukket isocyanat er MDI eller polyisocyanater på basis av dette (f.eks. Desmodur). Desmodur omfatter MDI og oligomerer derav som omfatter MDI med CH₂-fenylisocyanatrester. Desmodur er således en blanding av forskjellige isocyanater avledet fra MDI. En strukturprøve kan være

4,4-metylen-bis(fenylisocyanat) 40-50%

4,4-metylen-bis(fenylisocyanat) + benzylisocyanat: 20-25%

4,4-metylen-bis(fenylisocyanat) + 2 benzylisocyanat: 10%

4,4-metylen-bis(fenylisocyanat) + 3 benzylisocyanat: 2%.

(I en reaksjon som denne inneholder produktet også noe av 2-isomeren).

Forbindelsen forhandles av Shell under handelsnavnet Caradate og av Huntsman under handelsbetegnelsene Hylene og Rubinate.

Fortrinnsvis bør to dioler benyttes. Diolene benyttes fortrinnsvis i et mol-forhold på fra 0,5:1 til 1:0,5, mer foretrukket 0,8:1 til 1:0,8 når det benyttes to dioler. Fortrinnsvis benyttes ingen diol i en mengde som overskrider 90 mol% av diolblanding.

Foretrukne dioler omfatter dietylenglykol, tetraetylenglykol og polyetylen-glykoler, f.eks. PEG 300, 400 eller 600. En foretrukket diolkombinasjon er dietylen-glykol og tetraetylenglykol.

Under beleggingsreaksjonen som involverer polyisocyanatet, foretrekkes det at polyisocyanatet i et første trinn er i overskudd (f.eks. i forhold til en eventuell diol). Det er beskrevet å benytte kun polyisocyanat i dette trinn av beleggingsprosessen. Dette antas å minske muligheten for at det forekommer geldannelse under reaksjonen. Når et stort overskudd av polyisocyanat benyttes i en innledende beleggingsreaksjon, kan det i et andre trinn være nødvendig å omsette de belagte partiklene med ytterligere dioler (f.eks. en diol som beskrevet ovenfor) for å reagere med eventuelt uomsatte isocyanatgrupper. Når den innledende beleggingsreaksjon kun benytter polyisocyanat, er det vesentlig at den resulterende partikkel deretter omsettes med minst én diol.

I en slik utførelsesform er denne diol fortrinnsvis en polyetylen-glykol. PEG-diolets lange kjede muliggjør dannelsen av en ganske betydelig linker mellom den

partikkeldekkende overflate og letter derved reaksjon med affinitetsligander, så som streptavidin.

Det ligger således innenfor rammen av oppfinnelsen å omsette partiklene med polyisocyanat etterfulgt av diol, dvs. en trinnvis prosess, for å oppnå
5 belegging.

Beleggingsreaksjonen kan derfor i alminnelighet bevirkes ved å impregnere den porøse magnetiske polymerpartikkel med epoksydene eller polyisocyanatet og dioler, f.eks. ved å benytte en løsning av disse (for eksempel i et organisk løsningsmiddel, som f.eks. metanol eller diglyme) eller ved å blande en dispersjon
10 av de porøse partiklene i et organisk løsningsmiddel med et flytende epoksyd eller en diol/polyisocyanatblanding. Ultralydbehandling kan benyttes for å forbedre impregneringen, og reaksjonen kan aksellereres ved å heve temperaturen f.eks. til 50-100°C. Eventuelt anvendt løsningsmiddel kan ekstraheres ved anvendelse av undertrykk.

I alminnelighet fordrer de anvendelser som magnetiske polymerpartikler benyttes for, f.eks. deres anvendelse som diagnostiske hjelpemidler, en passende grad av elektrofilitet for at de tilfredsstillende skal delta i koblings- og andre reaksjoner i vandige systemer fremherskende i biologiske medier.

Selv om den generelle polaritet av beleggene helst er elektrofil, kan enkelte
20 belegg som inneholder hydrofobe deler, inkorporeres for å skreddersy graden av elektrofilitet til den som måtte ønskes. På denne måte gjør oppfinnelsen det mulig å tilveiebringe nyttige diagnostiske og andre hjelpemidler som har et stort utvalg av polariteter.

Om ønskes kan overflatene av de belagte magnetiske polymerpartiklene under fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen funksjonaliseres ytterligere, f.eks. ved
25 å tilkoble et medikamentmolekyl, en rapportørmerking (f.eks. en kromofor, fluorofor, enzym eller radioaktiv merking), eller en ligand (f.eks. et antistoff eller antistoff-fragment, et metallione-komplekserende middel, et element av et spesifikt bindingspartnerpar (f.eks. biotin eller streptavidin), et oligopeptid, et oligonukleotid
30 eller et oligosakkarid).

Slik tilkobling kan være direkte eller indirekte (og kan således eventuelt innebære anvendelse av et koblingsmiddel for å danne en kobling mellom partikkelen og den substans som kobles til dette) og være bionedbrytbar eller ikke.

Bionedbrytbare koblinger kan være ønskelige dersom de magnetiske polymer-partiklene skal benyttes for den målrettede frigjøring av et virkestoff. Etter at belegging har skjedd, kan de gruppene som stikker frem fra belegget manipuleres for å gi riktig funksjonalitet (for eksempel epoksy-, hydrokso-, amino-, etc. funksjonaliteter) for tilkoblingen av slike substanser.

Den funksjonaliserte belagte magnetiske partikkel kan bindes til en affinitetsligand hvis natur vil bli valgt på grunnlag av dens affinitet for en bestemt analytt hvis nærvær eller fravær i en prøve skal fastslås. Affinitetsmolekylet kan derfor omfatte ethvert molekyl som kan kobles til en magnetisk probe som også er i stand til spesifikk gjenkjenning av en bestemt analytt. Affinitetsligander inkluderer derfor monoklonale antistoffer, polyklonale antistoffer, antistoff-fragmenter, nukleinsyrer, oligonukleotider, proteiner, oligopeptider, polysakkarider, sukkere, peptider, peptidkodende nukleinsyremolekyler, antigener, medikamenter og andre ligander. Eksempler på egnede affinitetsligander finnes i den publiserte litteratur og er velkjente. Anvendelsen av ytterligere bindingspartnere, sekundære affinitetsligander og linkergrupper, som utgjør rutine på dette området, vil her ikke bli omtalt ytterligere, selv om det vil være klart at anvendelsen av slike elementer sammen med partiklene ifølge oppfinnelsen er mulig dersom det ønskes.

I en utførelsesform fremstilles partikkelbelegget ved å benytte en epoksydforbindelse som har en funksjonell gruppe som lar seg kopolymerisere med et akrylat, f.eks. en karbon-karbon-dobbeltbinding, for eksempel ved å benytte to eller tre epoksyder, hvorav den ene inneholder en umettet karbon-karbon-binding. De belagte partiklene kan deretter funksjonaliseres ved omsetning med en vinyl- eller akryl-monomer som har en funksjonell gruppe, for eksempel en karboksylsyregruppe (f.eks. ved å benytte akrylsyre). Ytterligere funksjonalisering kan deretter lett oppnås ved omsetning av de fremstikkende karboksylgruppene, f.eks. ved omsetning med N-hydrokso-succinimid eller med streptavidin

Det er beskrevet belagte polymerpartikler, som eventuelt er bærere av superparamagnetiske krystaller som har et belegg dannet av minst to epoksyder, hvorav minst det ene har en umettet karbon-karbon-binding som kan kopolymeriseres med en akrylmonomer.

Det er beskrevet en fremgangsmåte for fremstilling av belagte polymerpartikler, som eventuelt inneholder superparamagnetiske krystaller, hvor

prosessen omfatter omsetning av porøse overflate-funksjonaliserte, eventuelt superparamagnetiske krystallholdige polymerpartikler med minst to epoksydforbindelser, hvorav minst den ene har en umettet karbon-karbon-binding som kan kopolymeriseres med en akrylmonomer; og

5 omsetning av de dannede partiklene med en vinylmonomer (f.eks. allyl-glycidyleter eller en akrylmonomer, f.eks. akrylsyre eller akrylamid). De resulterende partiklene kan deretter omsettes videre med en affinitetsligand, f.eks. streptavidin.

Det er beskrevet anvendelse av partikler ifølge oppfinnelsen til synteser, ekstraksjoner eller analyser, særlig til nukleinsyrepåvisning.

Epoksyder til bruk i så henseende inkluderer glycidylmetakrylat og allylglycidyleter.

Innføring av vinylgrupper som lar seg polymerisere med for eksempel en akrylsyre, kan også oppnås ved å omsette beleggoverflaten med en forbindelse som f.eks. metakrylsyre-anhydrid. For eksempel vil en belagt partikkel som 15 omfatter et belegg dannet ved omsetningen av to epoksyder som vaskes (f.eks. i NaOH) for å eksponere hydroksylfunksjonaliteter, umiddelbart reagere med metylakrylsyre-anhydrid for å muliggjøre innføring av vinylgrupper på polymer-overflaten.

20 Som nevnt ovenfor kan naturen av den eksterne substans som er koblet til partiklene, velges på grunnlag av dens evne til å binde til et bestemt målmateriale. Nukleinsyrepåvisning innebærer i alminnelighet probeundersøkelse av en prøve som antas å inneholde målnukleinsyrer, ved å benytte en nukleinsyreprobe som inneholder en nukleinsyresekvens som spesifikt gjenkjenner, f.eks. hybridiserer 25 med, sekvensen til målnukleinsyrene, slik at nukleinsyre-affinitetsliganden og målnukleinsyrene i kombinasjon danner et hybridiseringslag. Passende funksjonaliserte partikler som beskrevet heri er f.eks. de som er belagt med minst to epoksyder og er bærere av en karboksylgruppe som deretter er omsatt med streptavidin, er ideelt egnet for nukleinsyrepåvisning.

30 Biotinylerte enkelttrådede oligonukleotidprober bundet til streptavidinkuler, kan benyttes til å isolere sekvensspesifikk DNA. De biotinylerte probene bindes til kulene ved å blande den riktige mengde kuler med et overskudd av biotinylert probe. Kulene/proben inkuberes deretter med DNA-prøven i en hybridiserings-

buffer, f.eks. SSPE eller SSC, under betingelser som er passende for lengden og sekvensen av proben og DNA. Overskuddet og uønsket DNA vaskes bort ved å gjøre bruk av kulenes magnetiske egenskaper. Det oppfangede DNA kan påvises/kvantifiseres ved PCR, etc.

5 Biotinylerte dobbelttrådede DNA-fragmenter bundet til streptavidinkuler, kan benyttes til å isolere DNA-sekvensspesifikke bindingsproteiner. Den biotinylerte DNA bindes til kulene ved å blande den riktige mengde kuler med et overskudd av biotinylerte DNA-fragmenter. Kulene/DNA inkuberes deretter med proteinprøven i en hybridiseringsbuffer under betingelser egnet for det protein som skal under-
10 søkes. Overskuddet og uønsket protein vaskes bort ved å utnytte kulenes magnetiske egenskaper. Det oppfangede protein kan elueres fra proben (med høy saltkonsentrasjon, lav saltkonsentrasjon, varme, lav pH, etc.) for nedstrøms anvendelser og påvisning.

Målmaterialet kan eventuelt være et materiale av biologisk eller syntetisk opprinnelse, f.eks. kan være et molekyl eller en molekylgruppe, inklusivt for
15 eksempel antistoffer, aminosyrer, proteiner, peptider, polypeptider, enzymer, enzymsubstrater, hormoner, lymfokiner, metabolitter, antigener, haptener, lektiner, avidin, streptavidin, toksiner, gifter, miljøforurensninger, karbohydrater, oligo-sakkarider, polysakkarider, glykoproteiner, glykolipider, nukleotider, oligo-
20 nukleotider, nukleinsyrer og derivatiserte nukleinsyrer, DNA, RNA, naturlige eller syntetiske medikamenter, reseptorer, viruspartikler, bakteriepartikler, virus-komponenter, celler, cellekomponenter, naturlige eller syntetiske lipidvesikler, polymermembraner, polymer "services" og partikler og glass, samt plastoverflater.

Når partiklene ifølge oppfinnelsen skal benyttes for immunoassays, har det
25 overraskende vist seg at tosylering av partiklene etter belegging resulterer i partikler som oppviser forbedret ytelse ved immunoassays. I en foretrukket utførelsesform kan således partikler som bærer et belegg tosyleres, f.eks. ved omsetning av partiklene med tosylklorid i nærvær av en base. De resulterende tosylerte belagte partiklene er nye og utgjør et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen.
30 Med tosyl menes en toluen-4-sulfonylgruppe.

Slike tosylerte forbindelser kan dessuten lett omsettes med affinitetsligander, f.eks. streptavidin, for å danne ytterligere nye partikler.

Det er videre beskrevet belagte polymerpartikler som bærer superparamagnetiske krystaller og har et belegg dannet av minst ett polyisocyanat og minst én diol, som deretter tosyleres, f.eks. ved omsetning med tosyلكlorid, og deretter eventuelt omsettes med en affinitetsligand, f.eks. streptavidin.

5 De belagte polymerpartiklene, som eventuelt bærer superparamagnetiske krystaller, som har et belegg dannet av minst ett epoksyd, kan deretter tosyleres, f.eks. ved omsetning med tosyلكlorid, og eventuelt deretter omsettes med en affinitetsligand, f.eks. streptavidin.

10 Det har dessuten overraskende vist seg at partikler av de diametere som her kreves beskyttet, har en betydelig økt kapasitet for binding sammenlignet med kuler av større dimensjon, f.eks. 3 µm kuler. Det forventes bindingskapasiteter av disse kulene som er over 200% høyere enn de for større kuler, hvilket gjør det mulig å benytte betydelig mindre mengder partikler i en analysemetode.

Partiklene heri er derfor anvendelige ved adsorpsjons/-
15 desorpsjonsprosesser analogt med mekanismene ved omvendt-fase kromatografi eller hydrofob interaksjonskromatografi. Omvendt-fase kromatografi er en separasjonsteknikk som gjør bruk av en hydrofob adsorpsjonsinteraksjon mellom et oppløst molekyl (f.eks. et protein) og en immobilisert hydrofob ligand (f.eks. overflaten av kuler). Denne interaksjon er vanligvis så sterk at den kan skje i
20 løsninger med lav ionestyrke og brytes ved bruk av organiske løsningsmidler (f.eks. acetonitril). Omvendt-fase kromatografi kan benyttes til å fraksjonere komplekse proteinprøver og for avsalting av proteinprøver. RPC foretas vanligvis ved bruk av en fast fase pakket i en kolonne. Partiklene heri gjør at teknikken kan foretas uten en kolonne, uten prøvefortynning og automatiseres for masseanalyse.

25 Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) er en separasjonsteknikk som utnytter en hydrofob adsorpsjonsinteraksjon mellom et oppløst molekyl (f.eks. et protein) og en immobilisert hydrofob ligand (f.eks. overflaten av kuler). Denne interaksjon er svakere enn de interaksjoner som utnyttes ved RPC og fordrer at den støttes av høye saltkonsentrasjoner. Avtagende saltkonsentrasjoner kan
30 følgelig benyttes til å bryte disse adsorpsjonsinteraksjonene. HIC kan benyttes til å fraksjonere komplekse proteinprøver og for avsalting av proteinprøver. HIC foretas vanligvis ved bruk av en fast fase pakket i en kolonne. Partiklene at teknikken kan foretas uten en kolonne, uten prøvefortynning og automatiseres for masseanalyse.

Oppfinnelsen vil nå bli ytterligere beskrevet under henvisning til de etterfølgende eksempler.

Eksempel 1

5 **Fremstilling av 0,3 µm kimpartikler**

1600 g styren ble ekstrahert med 2 L 10 vekt% natriumhydroksyd, vasket med vann til pH 7 og deretter spylt med argon i 10 minutter. I en 10 L reaktor ble 8000 g vann og 3,07 g boraks oppvarmet til 80°C, hvorpå 100 g vann ble avdampet for å fjerne oksygen. Deretter ble 19,97 g natriumdekylsulfat i 200 mL
10 kokt vann tilsatt og omrørt i 10 minutter. Det vaskede og tilnærmet oksygenfrie styren ble tilsatt og omrørt i 15 minutter. Deretter ble 4,80 g kaliumperoksodisulfat tilsatt i 200 g kokt vann. Blandingen ble holdt ved 80°C i en argonatmosfære i 13 timer. Det oppsto en monodispers suspensjon av polymerpartikler som hadde en partikkeldiameter på 0,3 µm.

15

Eksempel 2

Fremstilling av 1,0 µm polystyrenpartikler

8860 g vann, 866 g DOP (dioktanoylperoksyd), 433 g aceton og 51,96 g SDS ble homogenisert i 25 minutter i en totrinns Manton Gaulin homogenisator
20 ved 400 kg/cm² i det første trinn og 100 kg/cm² i det andre trinn. Etter homogenisering ble 5164 g av emulsjonen tilsatt en kim-suspensjon av monodisperse polystyrenpartikler med en diameter på 0,3 µm, fra Eksempel 1. 1891 g kim-suspensjon inneholdende 297,8 g polymerpartikler og 1593 g vann ble benyttet.

25

Etter omrøring i 24 timer ved 25°C ble 6414 g av den aktiverte kim-partikkelsuspensjonen tilsatt en emulsjon inneholdende 103400 g vann, 131 g SDS (natriumdodekylsulfat), 1556 g polyvinylpyrrolidon K-30, 4157 g 63,2% divinylbenzen, 1060 g styren og 11606 g toluen (som et porogen). Emulsjonen ble homogenisert i 25 minutter ved 400 kg/cm² i første trinn og 100 kg/cm² i det andre
30 trinn.

Etter svelling i 2 timer ved 25°C ble 46676 g vann tilsatt til reaktoren, hvorpå dispersjonen ble polymerisert i 1 time ved 60°C og 20 timer ved 70°C. En mono-dispers suspensjon som hadde en partikkeldiameter på 1,0 µm ble dannet.

5 Partiklene ble vasket med metanol og butylacetat og tørket. Ved BET ble det spesifikke overflateareal bestemt til 570 m²/g tørrsubstans.

Eksempel 3

Nitrering

10 En blanding av 9920 g 95% svovelsyre og 3020 g 65% salpetersyre ble avkjølt til 10°C og deretter tilsatt 400 g 1,0 µm tørre porøse kryssbundne polystyrenpartikler fra Eksempel 2. Temperaturen ble økt til 30°C i 1 time og 30 minutter. Suspensjonen ble tilsatt 60 L is og vann. Partiklene ble vasket med vann og metanol ved filtrering. De resulterende partikler inneholdt 9,0 vekt% nitrogen.

Eksempel 4

Inkorporering av jern

2579 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ og 3,2 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ble tilsatt til en suspensjon av 4144 g nitrerte porøse partikler fra Eksempel 3 inneholdende 450 g partikler og 3694 g vann. Suspensjonen ble omrørt ved romtemperatur i 30 minutter. 3285 g 25% NH_3 i vann ble tilsatt. Temperaturen ble økt til 60°C i 2 timer. Suspensjonen ble avkjølt og partiklene vasket med vann ved sentrifugering. Etter rensing ble partiklene overført til metanol. Analyse av partiklene viste et innhold på 330 mg Fe/g DS (tørsubstans) og 0,9 mg Mn/g DS.

Eksempel 5

Belegging

133 g av en metanolsuspensjon inneholdende 13,3 g av $1,0\ \mu\text{m}$ styren-divinylbenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) ble vasket fem ganger med 93 g diglyme. Tørsubstansen i partiklene i diglyme ble justert til 15 vekt%, og glycidol (3,07 g), 1,4-butandiolglycidyleter (Araldite DY-026, 8,06 g) og glycidylmetakrylat (5,68 g) ble tilsatt til partiklene. Blandingen ble oppvarmet til 75°C og omrørt i 20 timer. Partiklene ble deretter vasket seks ganger med 70 g metanol og fire ganger med 80 g isopropanol.

Eksempel 6

Funksjonalisering med karboksylsyregrupper

Til 1806 g av en suspensjon av partiklene fremstilt i Eksempel 5 (425 g) i isopropanol ble det tilsatt metanol (774 g), akrylsyre (514 g) og 2,2'-azoisobutyronitril (23,4 g). Blandingen ble oppvarmet til $73\text{--}75^\circ\text{C}$ og omrørt i 20 timer. Partiklene ble deretter vasket seks ganger med 2338 g metanol og én gang med 3018 g 0,15M NaOH. Partikkelinnholdet (tørsubstans basis) ble justert til 12 vekt%, og blandingen ble oppvarmet til 75°C og omrørt i 3,5 timer. Partiklene ble vasket tre ganger med 3188 g vann og fem ganger med 3188 g 0,01M NaOH.

47 g av en suspensjon av partiklene fremstilt i Trinn (A) (13,3 g) i isopropanol ble tilsatt metanol (24 g), akrylsyre (9,64 g) og 2,2'-azoisobutyronitril (0,41 g). Blandingen ble oppvarmet til $73\text{--}75^\circ\text{C}$ og omrørt i 20 timer. Partiklene ble

deretter vasket seks ganger med 73 g metanol og én gang med 94 g 0,15M NaOH. Tørrsubstansen av blandingen av partikler og 0,15M NaOH ble justert til 12 vekt%, og blandingen ble oppvarmet til 75°C og omrørt i 3,5 timer. Partiklene ble vasket tre ganger med 99 g vann og fem ganger med 99 g 0,01M NaOH.

5

Eksempel 7

Funksjonalisering av karboksylsyregrupper til N-hydroksysuccinimidester

50 g av en suspensjon av 5,0 g av partiklene i Eksempel 6 ble surgjort ved vask med 0,1M eddiksyre (3 x 50 mL). De surgjorte partiklene (som hadde et karboksylsyreinnhold på 0,5 mmol/g DS) ble deretter vasket med acetone (4 x 50 mL) og konsentrert på en magnet. Ekstra acetone ble tilsatt inntil totalt 35,6 g suspensjon ble oppnådd. N-hydroksysuccinimid (2,90 g, 25 mmol) og diisopropylkarbodiimid (3,16 g, 25 mmol) ble deretter tilsatt. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 5 timer. Partiklene ble deretter vasket med acetone (5 x 50 mL).

15

Eksempel 8

Immobilisering av streptavidin

1. 20 mg karboksylsyre-funksjonaliserte kuler fra Eksempel 6 ble dispergert i 1 mL 0,01M NaOH.
2. Kulene ble separert på en magnet og supernatanten kassert.
3. Kulene ble vasket tre ganger med 1 mL 30 mM 2-morfolino-etansulfonsyre (MES) pH 6,1.
4. 1,8 mg streptavidin løst i 900 µL 30 mM MES pH 6,1, ble tilsatt til kulene.
5. Kulene og streptavidin ble inkubert i en blandedanordning ved romtemperatur i 15 minutter.
6. 3 mg 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDC) løst i 75 µL kaldt destillert vann ble tilsatt.
7. Blanding ble inkubert i en blandedanordning ved romtemperatur i 1 time.
8. Kulene ble vasket tre ganger med fosfat-buffret saltvann (PBS), pH 7,4, med 0,01% (vekt/volum) Tween 20 for å fjerne overskudd av streptavidin og EDC.
9. Kulene ble resuspendert i PBS pH 7,4, med 0,1% Tween 20.

20

25

30

Mengden av streptavidin ble målt ved bruk av spormengder I^{125} -merket streptavidin under belegging. Den relative mengde I^{125} -merket streptavidin gir mengde streptavidin belagt på overflaten.

5 Fri biotin-bindingskapasitet ble bestemt ved tilsetning av overskudd av C^{14} -merket biotin til streptavidin-belagte kuler. Overskudd av biotin ble vasket bort og mengden C^{14} biotin målt ved å benytte beta-scintillasjonsteller.

Mengden av streptavidinbelegg ble funnet å være 68 μg per mg kuler, og den frie biotin-bindingskapasitet var 3100 pmol fritt biotin per mg kuler.

10 **Eksempel 9**

Trinn A

Til 40,0 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) i 200 g diglyme, ble det tilsatt 100 g 1,4-butandiol-diglycidyleter og 100 g glycidol.
15 Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 250 rpm i 20 timer ved 90°C. Partiklene ble deretter vasket fem ganger med 400 mL metanol og fire ganger med 400 mL deionisert vann.

Trinn B

20 Til 72 g av en vandig suspensjon av partiklene fremstilt som i Trinn A (partikkelinnhold 10 vekt%), ble 119 g natriumhydroksyd langsomt tilsatt. 169,2 g allylglycidoleter ble deretter tilsatt. Etter omrøring ved 250 rpm i 18 timer ved 60°C, ble partiklene vasket fem ganger med 1400 mL metanol.

25 **Eksempel 10**

Til 10 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) i 40 g diglyme, ble det tilsatt 16,7 g allylglycidyleter, 16,8 g 1,4-butandiol-diglycidyleter og 16,8 g glycidol. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 300 rpm ved
30 90°C i 20 timer. Partiklene ble deretter vasket fem ganger med 100 mL metanol.

Eksempel 11

78 g av en diglyme-suspensjon av 13 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) ble tilsatt Desmodur VL (35,83 g), dietylenglykol (2,82 g), tetraetylenglykol (4,84 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 21 timer.

En blanding av dietylenglykol (47,04 g), tetraetylenglykol (80,45 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (1,29 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 2 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og fire ganger med 100 g aceton.

Eksempel 12

22 g metanolsuspensjon av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) ble vasket fem ganger med 14 g diglyme. Tørsubstans av partikler i diglyme ble justert til 16 vekt%, og Araldite DY-026 (1,4-butandiol diglycidyleter) (26 g) og glycidol (26 g) ble tilsatt til partiklene. Blandingen ble oppvarmet til 90°C og omrørt i 20 timer. Partiklene ble deretter vasket fem ganger med 80 g metanol og fire ganger med 45 g diglyme.

Til 18 g av diglyme-suspensjonen av partikler ble det tilsatt metakrylsyreanhydrid (15 g) og pyridin (0,4 g). Blandingen ble oppvarmet til 75°C og omrørt i 20 timer. Partiklene ble deretter vasket fem ganger med 90 g metanol og tre ganger med 60 g isopropanol.

Eksempel 13

124,45 gram av en diglyme-suspensjon av 20 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt%, Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4), ble det tilsatt 2,2-bis[4-(glycidylloksy)fenyl]propan (Bisfenol A diglycidyleter, Araldite LY-564) (42 g). Blandingen ble oppvarmet til 60°C, omrørt i

2 timer og avkjølt til romtemperatur og omrørt over natten. Suspensjonen ble vasket tre ganger med diglyme og tørrsubstans justert til 12%.

Glycidol (4,58 g), Araldite DY-026 (1,4-butandiol diglycidyleter) (12,1 g) og glycidylmetakrylat (8,57 g) ble tilsatt. Blandingen ble oppvarmet til 75°C og omrørt i 21 timer. Partikkelsuspensjonen ble avkjølt og partiklene vasket seks ganger med 100 g metanol og fire ganger med 100 g isopropanol.

Eksempel 14

516 gram av en vannsuspensjon av 51,6 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (375 g), ble tilsatt til fast natriumhydroksyd (144,89 g), og blandingen ble omrørt og temperaturen holdt lavere enn 42°C under tilsetningen. Allylglycidyleter (206,4 g) ble tilsatt, og blandingen ble oppvarmet til 60°C og omrørt i 18 timer. Partikkelsuspensjonen ble avkjølt og partiklene vasket fire ganger med 1500 g metanol.

Eksempel 15

90 g av en metanolsuspensjon av 15 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) ble vasket tre ganger med 60 g diglyme og tilsatt 2,2-bis-[4-(glycidylloksy)fenyl]propan (Bisfenol A diglycidyleter, Araldit LY-564) (70,40 g) og 1,4-butandiol diglycidyleter (Araldit DY-026) (4,61 g). Blandingen ble oppvarmet til 95°C i 20 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og tre ganger med 100 g metanol.

Eksempel 16

Til 23,48 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4), ble det tilsatt 2,2-bis-[4-(glycidylloksy)fenyl]propan (Bisfenol A diglycidyleter, Araldit LY-564) (23,47 g) og polyetylenglykoldiglycidyleter Mw ~300

(3,07 g). Blandingen ble oppvarmet til 95°C i 20 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket fire ganger med 40 g metanol.

Eksempel 17

5 Til 24,46 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 µm styrendivinylden
polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inne-
holdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med
Eksempel 4) ble det tilsatt 2,2-bis-[4-(glycidylloxy)fenyl]propan (Bisfenol A
diglycidyleter, Araldit LY-564) (23,54 g) og polyetylenglykoldiglycidyleter Mw ~500
10 (15,28 g). Blandingen ble oppvarmet til 95°C i 20 timer. Partiklene ble avkjølt og
vasket fem ganger med 40 g metanol.

Eksempel 18

Til 26,82 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 µm styrendivinylden
15 polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inne-
holdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med
Eksempel 4) ble det tilsatt 2,2-bis-[4-(glycidylloxy)fenyl]propan (Bisfenol A
diglycidyleter, Araldit LY-564) (46,93 g) og glycerolpropoksylat-triglycidyleter
(69,98 g). Blandingen ble oppvarmet til 95°C i 20 timer. Partiklene ble avkjølt og
20 vasket fem ganger med 40 g metanol.

Eksempel 19

Immobilisering av streptavidin

20 mg belagte kuler fra Eksempel 17 ble dispergert i 1 mL 0,1M Na-
25 fosfatbuffer, pH 7,4. Kulene ble separert på en magnet og supernatanten kassert.
Dette ble gjentatt to ganger. 1 mg streptavidin løst i 900 µL 0,1M Na-fosfatbuffer,
pH 7,5, ble tilsatt til kulene. Kuler og streptavidin ble inkubert i en blandedanordning
i 20 timer ved romtemperatur. Kulene ble vasket tre ganger med PBS, pH 7,4,
med 0,1% BSA.

30 Den frie biotin-bindingskapasitet ble målt som beskrevet i Eksempel 20 og
funnet å være 1900 pmol fritt biotin per mg kuler.

Eksempel 20 Bindingskapasitet for biotinylerte DNA-molekyler

1. Plasmid DNA-fragmenter på 1090, 526, 217 basepar ble biotinylert og merket med europium ved PCR.
 2. Overskudd av biotin og europium-merkinger ble fjernet ved kommersielle PCR- renseteknikker og merket DNA kvantifisert ved optisk tetthet ved 260 nm og TRF ("Time Resolved Fluorescens").
 3. Streptavidin-belagte kuler (Eksempel 8) ble vasket én gang i en 2 ganger konsentrert bindingsbuffer (2M, NaCl, 20 mM Tris HCl, 0,2M EDTA, pH 7,5).
 4. 5 µg vaskede kuler ble resuspendert i 100 µL bindingsbuffer i hver brønn i en 96-brønnsplate.
 5. Overskudd av DNA (0,55 pmol av 1090 bp, 1,1 pmol av 526 bp og 2,2 pmol av 217 bp) fortynnet i 100 µL vann, ble tilsatt til kulene og inkubert med forsiktig risting i 15-30 minutter ved romtemperatur.
 6. Platen anbringes på magneten og supernatanten fjernes.
 7. Kule/DNA-kompleks vaskes 3 ganger med 200 µL vaskebuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,8, 0,01% Tween 20).
 8. Kule/DNA-komplekset resuspenderes i 200 µL DELFIA Enhancement-løsning og inkuberes, beskyttet mot lys, under risting ved romtemperatur i 10 minutter.
 9. Platen anbringes på magneten og Enhancement-løsningen overføres til en FluorNunc 96-brønnsplate, og europiumsignalet måles ved TRF (Wallac Victor plateleser) og angis som tellinger per sekund (cps).
 10. DNA bundet til kulene beregnes fra prosent cps tilsatt i 0,55, 1,1 og 2,2 pmol DNA, som har bundet til kulene.
- Bindingskapasiteten til kulene er ca. 200 pmol/mg for 217 bp fragmentet, 80-100 pmol/mg for 526 bp fragmentet og 35-45 pmol/mg for 1090 bp fragmentet.

Eksempel 21

- Til 23,8 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 µm styrendivinyllbenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) ble det tilsatt Desmodur VL (18,34 g), dietylenglykol (1,45 g),

tetraetylglykol (2,48 g) og diglyme (36,2 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer.

En blanding av polyetylglykol Mw ~300 (68,24 g), tetraetylglykol (41,30 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,68 g) ble tilsatt til partikkel-
 5 suspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og fire ganger med 100 g acetone.

Eksempel 22

Immobilisering av immunglobulin

10 20 mg belagte kuler fra Eksempel 21 ble dispergert i 1 mL 0,1M boratbuffer, pH 9,0. Kulene ble separert på en magnet og supernatanten kassert. Dette ble gjentatt to ganger. 1 mg mus IgG1 anti-humant alfa føtoprotein løst i 900 µL 0,1M boratbuffer, pH 9,0, ble tilsatt til kulene. Kuler og antistoff ble inkubert i en blande-anordning i 20 timer ved romtemperatur. Kulene ble vasket tre ganger med PBS,
 15 pH 7,4, med 0,1% BSA.

Mengden antistoff bundet til kulene ble målt ved bruk av spormengder I¹²⁵-merket antistoff under belegging. Den relative mengde antistoff bundet til kulene gir den totale mengde antistoff som er immobilisert. Mengde protein som var immobilisert til kulene var 22 µg antistoff per mg kuler.

20 Bindingen av alfa føtoprotein til det immobiliserte antistoff ble målt ved tilsetning av fortynninger av navlestrengsblod og påvist ved bruk av et annet muse IgG anti-humant alfa føtoprotein merket med Eu³⁺. Det merkede antistoff ble påvist med TRF-spektroskopi. En standardkurve fortynning av navlestrengsblodet viste økt signal med økt konsentrasjon.

25

Eksempel 23

26,82 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med
 30 Eksempel 4) ble tilsatt Desmodur VL (18,34 g), polyetylglykol Mw ~600 (15,84 g) og diglyme (33,20 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer.

En blanding av polyetylenglykol Mw ~600 (263,82 g) og 1,4-diazabicyklo-(2.2.2.)oktan (0,66 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og fire ganger med 100 g aceton.

5

Eksempel 24

Funksjonalisering med karboksylsyregrupper

Til 15,87 g av en suspensjon av partiklene fremstilt i Eksempel 5 (2,5 g) i isopropanol, ble det tilsatt akrylsyre (1,84 g), akrylamid (1,79 g), metanol (5,95 g) og 2,2'-azoisobutyronitril (0,28 g). Blandingen ble oppvarmet til 75°C og omrørt i 20 timer. Partiklene ble deretter vasket fire ganger med 20 g isopropanol og fire ganger med 25 g 0,15M NaOH.

10

Eksempel 25

Funksjonalisering med karboksylsyregrupper

Til 8,44 g av en suspensjon av partiklene fremstilt i Eksempel 5 (1 g) i vann, ble det tilsatt akrylsyre (0,37 g), allylglycidyleter (1,34 g), dimetylsulfoksyd (0,91 g) og 2,2'-azoisobutyronitril (0,06 g). Blandingen ble oppvarmet til 75°C og omrørt i 20 timer. Partiklene ble deretter vasket fire ganger med 10 g isopropanol og fire ganger med 10 g 0,15M NaOH.

20

Eksempel 26

3,9 g av en diglyme-suspensjon av 2,7 g av 1,0 µm styrendivinyllbenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) ble tilsatt heksametylendiisocyanat (2,5 g), dietylenglykol (0,5 g) og tetraetylenglykol (1,0 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer.

25

En blanding av dietylenglykol (2,65 g), tetraetylenglykol (4,66 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2.)oktan (0,07 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 95°C og omrørt i 2-3 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket fire ganger med 20 g aceton.

30

Eksempel 27

23,8 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) ble tilsatt Desmodur VL (18,34 g), dietylenglykol (1,45 g), tetraetylenglykol (2,48 g) og diglyme (36,2 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer.

En blanding av polyetylenglykol Mw ~400 (90,03 g), tetraetylenglykol (41,20 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,68 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og fire ganger med 100 g aceton.

Eksempel 28

23,8 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) ble tilsatt Desmodur VL (18,34 g), dietylenglykol (1,45 g), tetraetylenglykol (2,48 g) og diglyme (36,2 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer.

En blanding av polyetylenglykol Mw ~600 (135 g), tetraetylenglykol (41,30 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,66 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og fire ganger med 100 g aceton.

Eksempel 29

23,8 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) ble tilsatt Desmodur VL (18,34 g), dietylenglykol (1,45 g), tetraetylenglykol (2,48 g) og diglyme (36,2 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer.

En blanding av etylenglykol (27,29 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,66 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og fire ganger med 100 g aceton.

5

Eksempel 30

26,82 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4) ble tilsatt Desmodur VL (18,34 g) og etylenglykol (1,64 g).

10

Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer. En blanding av etylenglykol (27,29 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,66 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og fire ganger med 100 g aceton.

15

Eksempel 31

Aktivering med tosylgrupper

Til 17,1 g av en acetonsuspensjon av 4 g fra Eksempel 30 ble det tilsatt tosylklorid (16 g) og pyridin (7,85 g). Blandingen ble omrørt ved 25°C i 17 timer. Partiklene ble deretter vasket tre ganger med 50 mL aceton, én gang med 50 mL av en blanding av 80 vekt% aceton i vann, én gang med 50 mL av en blanding av 60 vekt% aceton i vann, én gang med 50 mL av en blanding av 30 vekt% aceton i vann og tre ganger med 50 mL vann.

20

25

Eksempel 32

Immunoassay for alfa føtoprotein

50 µg av immunglobulin-belagte kuler fra Eksempel 22 ble tilsatt til 100 µL fortyninger av navlestrengsblod, hvorpå innholdet av alfa føtoprotein fikk binde seg under inkubering i 15 minutter. Overskudd av navlestrengsblod ble vasket bort. Til dette kompleks ble det tilsatt et andre påvisnings mus IgG anti-humant alfa føtoprotein merket med Eu³⁺. Etter inkubering og fjerning av overskudd av påvisnings-antistoff ble mengden av merket antistoff påvist med TRF-

30

spektroskopi. En standardkurve fortykning av navlestrengsblod med kjent mengde alfa føtoprotein oppviste økende signal med økende konsentrasjon. Ved bruk av denne standardkurve kunne mengden av alfa føtoprotein i prøver bestemmes.

5 **Eksempel 33**

Immunoassay for myoglobin

Kuler belagt på tilsvarende måte som i Eksempel 22, men med mus IgG anti-humant myoglobin, ble benyttet til analyse av innholdet av myoglobin i humane citrat-tilsatte plasmaprøver på et Liaison immunoassay instrument. Kuler
10 og prøver (10 μ L) ble inkubert i 10 minutter og overskudd av prøver vasket bort. Påvisnings-antistoff konjugert med Acridium-orange-ester ble tilsatt. Etter inkubering i 10 minutter ble overskudd av påvisnings-antistoff vasket bort, og kjemiluminescenssignalet utviklet og påvist i luminescensleseren i Liaison instrumentet.

15

Eksempel 34

Immunoassay for D-dimer

Kuler belagt på tilsvarende måte som i Eksempel 22, men med mus IgG anti-human D-dimer, ble benyttet for å analysere innholdet av myoglobin i humane citrat-tilsatte plasmaprøver på et Liaison immunoassay instrument. Kuler
20 og prøver (10 μ L) ble inkubert i 10 minutter og overskudd av prøver vasket bort. Påvisnings-antistoff konjugert med Acridinium-orange-ester ble tilsatt. Etter inkubering i 10 minutter ble overskudd av påvisnings-antistoff vasket bort, og kjemiluminescenssignalet utviklet og påvist i luminescensleseren i Liaison
25 instrumentet.

Eksempel 35

Immunoassay for intakt PTH

Kuler belagt med streptavidin som i Eksempel 19, ble benyttet til å
30 analysere innholdet av intakt PTH i prøver av humant EDTA-plasma på et Liaison immunoassay instrument. 150 μ L EDTA-plasma ble inkubert med et biotinyleret polyklont geit-antistoff utviklet mot intakt PTH, og et acridinium-orange-ester konjugert polyklont geit-antistoff utviklet på lignende måte for å gi et immun-

kompleks. De streptavidin-belagte kulene ble tilsatt til immunkomplekset og inkubert for å la biotinet binde til det immobiliserte streptavidin. Kulene ble vasket og kjemiluminescenssignalet utviklet og målt i luminescensleseren i Liaison instrumentet.

5

Eksempel 36

22 g av en metanolsuspensjon av 1,0 µm styrendivinybenzen polymer-partikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4), ble vasket fem ganger med 14 g diglyme. Tørsubstans av partikler i diglyme ble justert til 16 vekt%, og glycidylmetakrylat (50 g) og jern(III)klorid (0,62 g) ble tilsatt til partiklene. Blandingen ble oppvarmet til 75°C og omrørt i 20 timer. Partiklene ble deretter vasket seks ganger med 14 g metanol og fire ganger med 13 g isopropanol.

15

Eksempel 37

26,82 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4), ble tilsatt Desmodur VL (18,34 g) og diglyme (33,20 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer. En blanding av polyetylenglykol Mw ~600 (236,82 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,66 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g diglyme og fire ganger med 100 g aceton.

25

Eksempel 38

10,74 g av en diglyme-suspensjon av 2 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4), ble tilsatt glycidol (6,84 g). Blandingen ble oppvarmet til 90°C i 20 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket åtte ganger med 17 g metanol og fire ganger med 17 g vann.

30

Eksempel 39

14,52 g av en diglyme-suspensjon av 2,50 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe) (fremstilt analogt med Eksempel 4), ble tilsatt 2,2-bis[4-(glycidyloksi)fenyl]propan (Bisfenol A diglycidyleter, Araldit LY-564) (13,03 g). Blandingen ble oppvarmet til 95°C i 20 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 17 g diglyme og fem ganger med 17 g metanol.

Eksempel 40**Bindingskapasitet for biotinylerte proteinmolekyler**

1. 5 μg streptavidin-kuler (Eks. 19) ble vasket én gang i DELFIA prøvebuffer og blandet med et overskudd av biotinylert antistoff merket med europium³⁺ i en 96-brønnsplate.
2. Inkubering ved blanding ved romtemperatur ble foretatt i 20 minutter for å la antistoffet bindes til kulene.
3. Platen ble anbrakt på magneten og supernatanten fjernet.
4. Kule-antistoffkomplekset ble vasket tre ganger med 200 μL DELFIA vaskebuffer.
5. Kule-antistoffkomplekset ble resuspendert i 200 μL DELFIA Enhancement-løsning og inkubert, beskyttet mot lys, under risting ved romtemperatur i 10 minutter.
6. Platen ble anbrakt på magneten og Enhancement-løsningen overført til en FluorNunc 96-brønnsplate, og europiumsignalet målt ved TRF (Wallac Victor plate reader) og angitt som tellinger per sekund (cps).
7. Mengden antistoff bundet til kulene ble beregnet fra den prosentandel av tilsatt cps som hadde bundet seg til kulene.

Bindingskapasiteten av kulene var ca. 8,0 μg biotinylert antistoff per mg kuler.

Eksempel 41

30,1 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 μm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inne-

holdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe), ble tilsatt Desmodur VL (13,8 g) og dietylenglykol (2,08 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer. En blanding av dietylenglykol (35 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,5 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 80 mL diglyme og fem ganger med 80 mL aceton.

Eksempel 42

30,8 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe), ble tilsatt Desmodur VL (13,8 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer. En blanding av dietylenglykol (35 g) og 1,4-diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,5 g) ble tilsatt til partikkelsuspensjonen. Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 1 time. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 80 mL diglyme og fem ganger med 80 mL aceton.

Eksempel 43

7,0 g av 1,0 µm styrendivinybenzen polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (33 vekt% Fe), ble justert til 20 vekt% tørrstoff i dietylenglykol-dimetyleter. 17,5 g Araldit DY-026 og 17,5 g glycidol ble tilsatt til suspensjonen, og blandingen ble oppvarmet til 90°C i 20 timer. Kulene ble vasket fem ganger med metanol (200 mL) og fem ganger med vann (200 mL).

Eksempel 44

Til 80 g av en suspensjon av 8,0 g kuler fra Eksempel 43, ble det tilsatt 22,5 g natriumhydroksyd og 32 g allylglycidyleter. Kulene ble omrørt og oppvarmet til 60°C i 18 timer og opparbeidet ved vasking med fire porsjoner 240 mL metanol.

Eksempel 45**Omvendt-fase kromatografi (RPC)**

Kulene fra Eksempel 41, 42, 11, 15 og 30 ble benyttet for å fraksjonere en proteinblanding bestående av conalbumin, soyabønne-trypsininhibitor, alkohol-dehydrogenase, cytokrom C og diaminoksydase, eller cellelysater fra SW 480-celler. 1 mg kuler ble på forhånd vasket og resuspendert i 10 μ L RPC-adsorpsjonsbuffer (anskaffet fra Bruker Daltonics eller alternativt 50 μ M natriumfosfatbuffer, 1M ammoniumsulfat, 0,1% trifluoreddiksyre) og inkubert med 25 μ g av proteinblandingen eller cellelysaten i 1 minutt. Etter adsorpsjon ble kulene vasket tre ganger med vaskebuffer (anskaffet fra Bruker Daltonics eller 50 mM natriumfosfatbuffer, 1M ammoniumsulfat, 0,1% trifluoreddiksyre) og proteinene deretter desorbert i fraksjoner ved bruk av desorpsjonsbuffer inneholdende økende konsentrasjoner av acetonitril (0, 15, 30, 40 & 50%).

Eksempel 46**Hydrofob interaksjonskromatografi (HIC)**

Kulene fra Eksempel 44 ble benyttet for å fraksjonere en proteinblanding bestående av conalbumin, soyabønne-trypsininhibitor, alkohol-dehydrogenase, cytokrom C og diaminoksydase. 1 mg kuler ble på forhånd vasket og resuspendert i adsorpsjonsbuffer (50 μ M natriumfosfatbuffer, pH 5,8, 1M ammoniumsulfat) og inkubert med 25 μ g av proteinblandingen i 1 minutt. Etter adsorpsjon ble kulene vasket tre ganger med en passende vaskebuffer (50 mM natriumfosfatbuffer, 1M ammoniumsulfat) og proteinene deretter desorbert i fraksjoner ved bruk av desorpsjonsbuffer inneholdende økende konsentrasjoner av ammoniumsulfat (0,8, 0,6, 0,4, 0,2 & 0,0M).

Eksempel 47

26,81 g av en diglyme-suspensjon av 5 g av 1,0 μ m styrendivinylden polymerpartikler overflate-funksjonalisert ved nitrering og reduksjon og inneholdende superparamagnetisk jernoksyd (46 vekt% Fe) (375g), ble tilsatt Desmodur VL (18,39 g) og diglyme (33,50 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C og omrørt i 20 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 100 g dimetylformamid og tilsatt 2,2-(etylendioksyd)dietylamin (74,4 g) og 1,4-

5 diazabicyklo(2.2.2)oktan (0,63 g). Blandingen ble oppvarmet til 80°C i 2 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket fire ganger med 100 g dimetylformamid. 6,66 g av denne dimetylformamid-suspensjon ble tilsatt 1,4-butandiol diglycidyleter (Araldit LY-026) (3,03 g). Blandingen ble oppvarmet til 70°C i 20 timer. Partiklene ble avkjølt og vasket tre ganger med 17 g dimetylformamid.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av belagte polymerpartikler inneholdende superparamagnetiske krystaller, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter omsetning av porøse, overflate-funksjonaliserte, superparamagnetiske krystall-
5 holdige polymerpartikler med en diameter på 0,5 til 1,8 μm , med minst ett polyisocyanat og minst én diol.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t minst to
10 dioler benyttes.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte dioler er valgt fra gruppen bestående av polyetylenglykoler og dioler med formel $\text{HO}((\text{CH}_2)_m\text{O})_n\text{H}$, hvor n er et heltall fra 1 til 15 og m er et heltall fra 2 til 6.
15
4. Fremgangsmåte ifølge krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte dioler er dietylenglykol og tetraetylenglykol.
5. Fremgangsmåte ifølge krav 2 eller 3, k a r a k t e r i s e r t v e d a t én av
20 nevnte dioler er polyetylenglykol.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 5, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte polyisocyanat er 4,4-metylen-bis(fenylisocyanat) eller et polyisocyanat som omfatter 4,4-metylen-bis(fenylisocyanat) med CH_2 -fenylisocyanat-rester.
25
7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 5, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte polyisocyanat er et diisocyanat.
8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 7,
30 k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte partikler, i et første trinn, omsettes med en blanding av polyisocyanat og minst én diol, hvor polyisocyanatet er i et molart overskudd i forhold til diolene, og, i et andre trinn, deretter omsettes med minst én diol.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d a t to dioler benyttes i det første trinn av reaksjonen og én eller to dioler benyttes i det andre trinn.
- 5
10. Fremgangsmåte ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d a t dietylen-glykol og tetraetylenglykol benyttes i begge reaksjonstrinn.
- 10
11. Fremgangsmåte ifølge krav 1 til 7, k a r a k t e r i s e r t v e d a t partiklene, i et første trinn, omsettes med polyisocyanat i fravær av diol, og, i et andre trinn, omsettes med minst én diol.
- 15
12. Fremgangsmåte ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d a t én diol benyttes og nevnte diol er en polyetylenglykol.
- 20
13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte partikler også omsettes med et polymert kryssbindende reagens.
- 25
14. Fremgangsmåte ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte kryssbindende middel er divinylbenzen.
- 30
15. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t partiklene er amin-funksjonalisert.
16. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte porøse overflate-funksjonaliserte polymerpartikler er nitrert og reduserer styrendivinylbenzen polymerpartikler.
17. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t diameteren av polymerpartiklene er mellom 0,5 til 1,2 μm .

18. Fremgangsmåte ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d a t diameteren av polymerpartiklene er ca. 1 μm .
- 5 19. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte belagte partikkel deretter tosyleres.
20. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av de foregående krav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte partikler etter beleggingsreaksjonen, kobles
10 til et medikamentmolekyl, rapportør del eller ligand.
21. Fremgangsmåte ifølge krav 20, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte ligand er et monoklonalt antistoff, polyklonalt antistoff, antistoff-fragment, nukleinsyre, oligonukleotid, protein, oligopeptid, polysakkarid, sukker, peptid,
15 peptid som koder for et nukleinsyremolekyl, antigen eller medikament.
22. Fremgangsmåte ifølge krav 21 og 20, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte ligand er streptavidin.
- 20 23. Partikkel, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den oppnås etter en fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 22.