



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4293/86

(51) Int.Cl.5 G 01 N 33/545
// C 07 G 11/00

(22) Indleveringsdag: 09 sep 1986

(41) Alm. tilgængelig: 11 mar 1987

(44) Fremlagt: 05 okt 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 10 sep 1985 GB 8522388

(71) Ansøger: *GRUPPO LEPETIT S.P.A.; 8, Via Roberto Lepetit; 20124 Milano, IT

(72) Opfinder: Angelo *Corti; IT, Angelo *Borghi; IT, Carlo *Rurali; IT, Giovanni *Cassani; IT, Francesco *Parenti; IT

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau

(54) Fremgangsmåde til bestemmelse af en analyt som er et antibiotikum af vancomycinklassen og som binder sig til en molekylær receptor repræsenteret af et D-alanyl-D-alanin-dipeptid eller et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid, samt analysesæt til anvendelse ved fremgangsmåden

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

4293-86

Fremgangsmåde til bestemmelse af en analyt som binder sig til en molekylær receptor repræsenteret af et D-alanyl-D-alanin-dipeptid eller et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid samt prøvesæt til anvendelse ved fremgangsmåden

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til bestemmelse af en substans med evne til faktisk at binde sig til et D-alanyl-D-alanin-dipeptid, navnlig til et glycopeptidisk antibiotikum af vancomycinklassen eller derivater eller aglyconer deraf; opfindelsen angår også et antistof rettet mod vedkommende substans. Desuden angår opfindelsen et analysesæt og midler til udnyttelse af fremgangsmåden.

Den foreliggende opfindelse angår en ny "sandwich"-prøve til bestemmelse af en analyt som er et antibiotikum af vancomycinklassen og som har evne til at binde sig til en molekylær receptor repræsenteret af et D-alanyl-D-alanin-dipeptid eller et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid. Fremgangsmåden er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne og har ikke blot anvendelse til bestemmelse af glykopeptidiske antibiotika af vancomycinklassen men også derivater og aglykoner deraf. Prøven forbinder den høje selektivitet af et passende D-alanyl-D-alanin-derivat til antibiotika af vancomycinklassen og specificiteten af antistof som er rettet mod det antibiotikum tilhørende klassen, der er genstand for bestemmelsen. Opfindelsen angår også et analysesæt til brug ved fremgangsmåden.

Ifølge opfindelsen kan analytten være udvalgt blandt især vancomycin, teicoplanin, actaplanin, ristocetin, avoparcin, actinoidin, antibiotikum LL-AM-374, antibiotikum A 477, antibiotikum OA 7653, antibiotikum A 35512 B, antibiotikum A 515668, antibiotikum AAD 216, antibiotikum A 41030, antibiotikum A 47934 såvel som de enkelte faktorer, derivater og aglykoner deraf, fortrinsvis teicoplanin eller en enkelt faktor, et derivat eller en aglykon deraf.

Det er kendt at vancomycin og ristocetin A griber ind i syntesen af peptidoglykan, der er den vigtigste strukturkomponent i bakteriecellevæggen. Det formodes at denne indgriben, der fører til inhibering af cellevæksten og til sidst til ødelæggelse af cellen ved lysis, skyldes en specifik binding mellem disse antibiotika og pentapeptid-prekusoren med en D-Ala-D-Ala-rest ved karboxylenden (UDP-N-Acetylmuramylpentapeptid) (H.R. Perkins, Biochem.J. 111, 195, 1969).

Det blev opdaget for nyligt at også teicoplanin virker gennem den samme mekanisme ved at binde sig til det voksende peptidoglykan i følsomme bakterier. Nærmere betegnet viste det sig at teicoplanin ligesom vancomycin og

ristocetin A og lignende antibiotika binder sig til peptidoglykaner indeholdende et D-Ala-D-Ala-dipeptid i karboxyenden. Ved at gøre det inhiberer de sandsynligvis den bakterielle transpeptidase og forhindrer tværbindingen af
5 cellevækst-peptidoglykan. Disse antibiotika binder også et D-alanyl-D-alanin-dipeptid eller et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid. Også de andre antibiotika af vancomycinklassen har vist sig eller formodes at virke ved den samme virkningsmekanisme, og de er derfor i stand til
10 at binde sig til et D-alanyl-D-alanin-dipeptid eller D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid, og de kan fremkalde dannelse af antistoffer mod dem i en egnet vært.

Hidtil kendte fremgangsmåder til bestemmelse af antibiotiske stoffer, navnlig teicoplanin og de andre antibiotika af vancomycinklassen, er hovedsagelig baseret på
15 TLC, HPLC og biobestemmelser på følsomme mikroorganismer. I betragtning af den for tiden foregående terapeutiske anvendelse eller avancerede kliniske undersøgelser af nogle af disse antibiotika, består der behov for bestemmelses-
20 metoder til bestemmelse af dem i væsker, navnlig biologiske væsker, som er specifikke, hurtige, lette, pålidelige og egnet til automatisering.

Navnlig er detekteringen af disse stoffer i legems-ekssudater, bronkie-ekspektorater, pus, hudprøver fra brand-
25 sårpatienter og lignende biologiske kilder særlig vanskelig med kendte teknikker eftersom der ofte fås falsk-positive resultater. Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er i modsætning hertil nøjagtig og pålidelig også på sådanne prøver.

30

Det D-alanyl-D-alanin-karboxyterminale oligopeptid kan være et tri-, tetra-, penta-, hexa- eller heptapeptid hvor det karboxyterminale dipeptid er repræsenteret af D-alanyl-D-alanin. Det foretrukne D-alanyl-D-alanin-karboxy-
35 terminale oligopeptid ifølge opfindelsen er tripeptidet ³⁵ ϵ -aminokaproyl-D-alanyl-D-alanin (i det følgende betegnet ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala).

Det D-alanyl-D-alanin-karboxyterminale oligopeptid er konjugeret med en passende bærer for at gøre det adsorberbart på en fast fase-overflade. En hensigtsmæssig bærer kan i dette tilfælde være et hvilket som helst protein eller andet højmolekylært stof med evne til at blive kovalent koblet til D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid til dannelsen af et konjugat som har evne til at adsorbere (dvs. i stand til at indgå i fysiske bindinger) med den valgte fast fase-overflade. Et foretrukket eksempel på en sådan bærer er albumin, navnlig oksealbumin. Imidlertid er også æg-, humant eller svinealbumin brugbare.

Den fast fase-overflade til hvilken den D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid-bærende bærer er adsorberet, er fortrinsvis overfladen af en analytisk bærer. I nærværende beskrivelse sigter udtrykket "analytisk bærer" til et hvilket som helst analysemiddel som kan indeholde eller i det mindste eksponeres til flydende reagenser og som derfor kan bruges som overflade der bærer et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid konjugeret med en passende makromolekylær bærer. Foretrukne eksempler herpå er mikrotiterplader af glas eller plast eller reagensglas eller plastark. Den mest foretrukne "analytisk bærer" er repræsenteret af rummene i en polyætylen- eller polystyren-mikrotiterplade.

Følgelig er den mest foretrukne "overtrukne analytiske bærer" (dvs. overflade med oligopeptidet båret derpå) ifølge opfindelsen plastrum eller -rør overtrukket med fra 0,025 μg til 1 μm , fortrinsvis 0,1-0,2 μg (mikrogram) BSA- ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala.

Som allerede nævnt er den analyt der formodes at være til stede i "testopløsningen" et antibiotikum af vancomycinklassen eller, mere generelt, et passende emne til at binde sig til D-alanyl-D-alanin-dipeptidet eller D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid.

"Antistoffer specifikt rettet mod det til bestemmelse værende stof" er antistoffer der frembringes i et dyr ved injektion af et passende konjugat af det til prøvning værende stof. Disse antistoffer kan være konventionelle antisera, der vindes ved immunisering af et dyr såsom en kanin, en rotte eller et andet pattedyr som ikke er et menneske, eller det kan være monokloneale antistoffer mod disse stoffer, fremstillet i det væsentlige ved at følge den af C. Milstein og G. Koheler (Nature 256, 10 495-497 (1975)) angivne cellefusionsteknik.

Eftersom analytterne er haptener (dvs. at de ikke er i stand til som sådanne af bevirke dannelse af antistoffer mod sig når de injiceres i et fra mennesket forskelligt pattedyr, men har immunogene egenskaber der kan udtrykkes (expressed) når de kobles til en passende molekylær bærer af høj molekylvægt såsom et protein) konjugeres til en passende bærer, der i almindelighed er et protein såsom okseserumalbumin forud for immuniseringen af det valgte værtsdyr.

Et hensigtsmæssigt værtsdyr til fremstilling af et konventionelt antiserum, der derefter kan renses eller fraktioneres til isolering af vedkommende IgG, er kaninen. I modsætning hertil fremstilles monokloneale antistoffer konventionelt ved hjælp af hybridomer vundet ved fusion af rottemiltceller og homologe myelomceller i nærværelse af et fusionsfremmede middel ved at man i det væsentlige følger ovennævnte fremgangsmåde ifølge Milstein og Koheler. Til hensigtsmæssig anvendelse ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen må hverken en signifikant andel af de polykloneale antistoffer i det konventionelle antisera eller de monokloneale antistoffer, som kan repræsentere de "antistoffer som er specifikt rettet mod det til bestemmelse værende stof", indgribe i bindingen af analytten (dvs. det til bestemmelse værende antibiotikum) med dens "molekylære receptor" (dvs. D-Ala-D-Ala-oligopeptidet adsorberet på vedkommende overflade), og må selvsagt ikke kryds reagere med andre antibiotika tilhørende klassen, der måtte

være til stede i prøven og samtidig binde sig til den molekylære receptor.

De "anti-antistof-antiserer", der bruges ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er konventionelle antistof-
5 præparater mod immunoglobuliner G (IgG'er) fra en given dyreart, som er den dyreart til hvilken det "første" antistof (dvs. det der er rettet mod analytten) hører. Præparater af disse antistoffer såsom gede-antiserum til kamin og gede-anti-rotte-antistoffer vindes ved konventionel-
10 le teknikker og er også tilgængelige i handelen.

Den detekterbare markør som kobles med dette anti-antistof-antiserum er en af de sædvanlige "markører" som bruges i immunbestemmelser såsom et enzym, en radioisotop eller et fluorescerende farvestof. Et foretrukket en-
15 zym er en peroxidase såsom peberrods-peroxidase, der afsløres og bestemmes kvantitativt kolorimetrisk ved hjælp af et af dets kromogene substrater såsom ortofenylendiamin i nærværelse af hydrogenperoxid. Også de anti-antistof-
20 antiserer, som er koblet til den detekterbare markør, er tilgængelige i handelen eller kan fremstilles ved konventionelle fremgangsmåder.

Som det forstås af de sagkyndige kan koblingen af det D-alanyl-D-alanin-karboxyterminale oligopeptid med den ønskede bærer opnås ved hjælp af i og for sig kendte tek-
25 nikker. Hensigtsmæssigt bruges der et koblingsmiddel; et foretrukket koblingsmiddel er glutaraldehyd. Eksempler på andre kendte koblingsmidler er karbodiimider, diisocyanater, anhydrider, diazoniumforbindelser, azider og cyanogenbromid. Tilsvarende kan der bruges kendte koblingsme-
30 toder og -reagenser til kobling af anti-antistof-antiserummet til den detekterbare markør. Disse fremgangsmåder afhænger i hovedsagen af den valgte detekterbare markørs egen-
skaber. Når den detekterbare markør er et enzym kan der bruges koblingsprocedurer som de ovenfor omtalte. Også i
35 dette tilfælde er glutaraldehyd det foretrukne koblingsmiddel. Ved disse koblingsreaktioner kan mængdeforholdene mellem reaktanterne varieres signifikant, selv om der i mange tilfælde foretrækkes et forhold på ca. 1:1 mellem

reagenserne. Desuden gælder det i tilfælde af koblingsreaktionen mellem et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid, som er ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala, og en makromolekylær bærer som er okseserumalbumin (BSA) at molforholdet mellem disse to reagenser kan variere fra 1:1 til 10:1.

Beskrevet mere udførligt er en foretrukken udførelsesform af fremgangsmåden ifølge opfindelsen som følger:

- 10 (a) Fremstilling af en standardkurve med kendte mængder af analytten i en passende fortyndingspuffer,
- (b) fremstilling af prøverne og derefter fortynding af dem i samme fortyndingspuffer som ovenfor,
- (c) særskilt tilsætning af standard fortyndingen og prøverne til den foran definerede overtrukne analytiske bærer,
- 15 (d) efter inkubering ved stuetemperatur i en fugtig, dækket kasse, vask af den overtrukne analytiske bærer og tilsætning af et præparat af det "første" antistof (anti-analyt-antistof), hensigtsmæssigt fortyndet i ovennævnte fortyndingspuffer,
- 20 (e) efter fornyet vask af den overtrukne analytiske bærer og tørring, tilsætning af det "andet" antistofpræparat (anti-antistof-præparat) hvori det arts-specifikke antistof er koblet til en detekterbar markør og til slut
- 25 (f) ved bestemmelse af den "detekterbare markør" bundet til det overtrukne analytiske system, evaluering af koncentrationen af analytten i prøven under sammenligning med værdierne i standardkurven.

30

Den ovennævnte fortyndingspuffer er en vandig puffer og fortrinsvis fosfatpuffret saltopløsning ved en pH-værdi mellem 7,0 og 7,5. Når prøven er serum, bronkial ekspektorater, pus eller hud, indeholder fortyndingspufferen fortrinsvis 10-30 rumfangs% og navnlig ca. 20 rumfangs% serum eller et serumproteinpræparat.

En fordel ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i, at det nu er muligt let og hurtigt at bestemme et antibiotikum af vancomycinklassen i nærværelse af en anden forbindelse hørende til samme klasse. Mens faktisk alle antibiotika af vancomycinklassen kobles selektivt, omend i forskelligt omfang, til et D-Ala-D-Ala-karboxyterminalt peptid, vil kun det til prøvning værende antibiotikum reagere med det specifikke antistof. Ved bestemmelse af en biologisk væske, der fx indeholder to antibiotika af vancomycinklassen (fx vancomycin og teicoplanin) ved hjælp af fremgangsmåden ifølge opfindelsen, vil begge antibiotika blive selektivt bundet til den analytiske bærer hvortil der er adsorberet til overfladen et D-alanyl-D-alaninkarboxyterminalt oligopeptid som er konjugeret med vedkommende makromolekylære bærer, mens alle de andre stoffer som er til stede i prøven og sædvanligvis vil forstyrre, vil blive vasket bort. Derefter vil det specifikke antistof (fx et antistof rettet mod teicoplanin) kun binde sig til det relevante antibiotikum (fx teicoplanin) bundet til det adsorberede D-alanyl-D-alanin-peptid, men ikke til det andet tilsvarende bundne antibiotikum (fx vancomycin).

Det species-specifikke anti-antistof-antiserum koblet med den detekterbare markør, vil, når det først er til sæt, derfor binde sig specifikt til anti-analytten (i dette tilfælde anti-teicoplanin)-antistof der for sit vedkommende er bundet til den "stationære fase" i kraft af bindingen af det specifikke antigen (i dette tilfælde teicoplanin). Den påfølgende evaluering af det "bundne" species-specifikke anti-antistof-antiserum ved hjælp af detekteringen af den koblede "markør" er derfor kun korreleret til det specifikke antibiotikum af klassen, som er den valgte genstand for bestemmelsen (i dette tilfælde teicoplanin), selv i nærværelse af andre antibiotika af samme klasse (i dette tilfælde vancomycin).

En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen er en fremgangsmåde som beskrevet ovenfor, hvor den analytiske bærer på overfladen bærer et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid konjugeret med en passende makromolekylær bærer med evne til at adsorbere til nævnte overflade, er rummene (wells) i en plast-mikroplade overtrukket med BSA- ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala, hvorhos de antistoffer som er rettet mod det til detektering værende stof er kanin-antiserum mod et antibiotikum af vancomycinklassen, og det med en detekterbar markør koblet anti-antistof-antiserum er gede-antiserum for kanin-IgG koblet med en peroxidase.

Kanin-antiserum mod et forud bestemt antibiotikum af vancomycinklassen ("forud bestemt antibiotikum") vindes ved at man gentagne gange (fx hver tredje uge i tre måneder) i kaniner injicerer et effektivt anti-"forudbestemt antibiotikum"-antistof som bevirker dannelse af et "forudbestemt antibiotikum"-albuminkonjugat frembragt ved kobling af det "forudbestemte antibiotikum" og okse-serumalbumin ved hjælp af i og for sig kendte metoder, fx ved at anvende omkring 1-10 vægtdele af det "forudbestemte antibiotikum" per vægtdel okseserumalbumin.

Der udtages blod ugentligt fra dyrene og anti-"forudbestemt antibiotikum"-antistof-titere bestemmes ved en analysemetode, fx en ELISA-metode under anvendelse af en analytisk bærer overtrukket med samme "forudbestemte antibiotikum" og en passende detekterbar sonde (probe), fx gede-antiserum til kanin-IgG koblet med peroxidase. Når der er opnået en analytisk effektiv antistofproduktion udtages der blod fra dyrene og antiserummet udvindes, hvorefter det eventuelt underkastes yderligere rensning i hovedsagen til fjernelse af anti-okse-serumalbumin immunoglobuliner. Denne rensning kan indebære absorptionskromatografering ved en modificeret matrix, fx en matrix fremstillet ved kobling af okseserumalbumin med en agarosegel (fx "Sepharose"®) aktiveret på i og for sig kendt måde. Med betegnelsen "analytisk bærer" anvendt her menes det samme som foran. Særlig er PVC-mikroplader, reagensglas

eller plastark med evne til på overfladen at få absorberet analytisk detekterbare mængder af det "forudbestemte antibiotikum" egnede midler til anvendelse ved analysemetoden.

5 Foruden at være nyttig til specifikt, hurtigt og let at detektere og bestemme analytten i opløsninger såsom opløsninger fra gæringssupper eller ekstrakter, er den foreliggende fremgangsmåde også anvendelig til detektering og bestemmelse af biologiske væsker såsom blod og
10 fraktioner deraf, urin, legemsekssudater, pus, brønkie ekspektorater og hud.

For at anvende den foreliggende fremgangsmåde på en biologisk væske er det i almindelighed ikke nødvendigt at foretage en særlig forbehandling af prøven, men som regel
15 vil fortyndingen med puffer (og, sjældent, koncentrering af prøven), så den kommer ind i det særlige anvendelsesområde for fremgangsmåden under de valgte betingelser, være tilstrækkelig.

Fortrinsvis opnås kalibreringskurven med et standard-
20 præparat af analytten opløst i samme biologiske væske som den til bestemmelse værende prøve.

I tilfælde af bronkieekspektorater, ekssudater, pus og hud er det i almindelighed nødvendigt at homogenisere prøven før analysen på sædvanlig måde. Prøven fortyndet
25 som regel med en puffer, normalt før homogenisering.

Fortrinsvis sættes der til pufferen, der er en vandig puffer med en pH fra 7 til 7,5, serum eller serumproteiner, omkring 10-30% af det samlede rumfang og fortrinsvis ca. 20% af det samlede rumfang af fortyndingspufferen.

30 En foretrukken udførelsesform for fremgangsmåden ifølge opfindelsen består i anvendelse af anti-teicoplanin-antiserum som ikke krydsreagerer med vancomycin, avoparcin, ristocetin, antibiotikum A 35512 B, actaplanin, antibiotikum A 41030, antibiotikum A 47934 og de andre antibiotika
35 af vancomycinklassen.

Det foretrukne anvendelsesområde for den foreliggende fremgangsmåde er 10-1000 ng/ml analyt og det mest

foretrukne område er 10-100 ng/ml. Præcisionen (inter assay precision; CV) er i almindelighed mellem 10 og 15%.

Nøjagtigheden og præcisionen af fremgangsmåden kan forbedres yderligere ved en god forsøgsudformning som sigter til at bringe fejlene til et minimum, ved hjælp af kendte statistiske fordelingsmetoder.

Den "analytiske bærer" er egnet til anvendelse i såvel manuelle som automatiserede prøveprocedurer. Denne fleksibilitet er af særlig betydning for at tilfredsstille den endelige brugers behov. Faktisk kan en automatiseret fremgangsmåde være yderst nyttig i klinisk overvågning af mange patienter under behandling, fx til at føre kontrol med den terapeutiske dosis og for at studere lægemidlets fordeling i de biologiske væsker, mens en manuel fremgangsmåde kan være tilstrækkelig til analyse i laboratoriemålestok.

Den foreliggende opfindelse angår også et analysesæt til anvendelse ved udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen til let, hurtig, pålidelig og nøjagtig bestemmelse af en analyt af vancomycinklassen som har den egenskab at kunne binde sig til en "molekylær receptor" repræsenteret af et D-alanyl-D-alanin-dipeptid eller et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid. Dette analysesæt er ifølge opfindelsen ejendommeligt ved det i krav 6's kendetegnende del angivne og kan desuden med fordel være udformet som angivet i krav 7's kendetegnende del.

Som allerede nævnt repræsenteres en foretrukken "analytisk bærer med en overflade som understøttet et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid konjugeret med en passende makromolekylær bærer med evne til at adsorbere til nævnte overflade" (den overtrukne analytiske bærer) af plastrum (plastic wells) i plader til mikrotitreringer, reagensglas eller plastark overtrukket med fra 0,025 mikrogram til 1 mikrogram og fortrinsvis 0,1-0,2 mikrogram BSA- ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala.

Den mængde antistof, der er specifikt fra analyt-
ten i det første antistofpræparat, må overstige mængden af
den analyt der skal detekteres. Det repræsenteres af et
monoklonealt antistof eller af et polyklonealt antistof,
5 fortrinsvis vundet ved immunisering af kaniner med en hø-
jere antistoftiter end 10^{-4} på tidspunktet for blødningen.

Det er klart koncentrationen af det "andet" anti-
stofpræparat, dvs. det species-specifikke antistofpræparat,
står i relation til koncentrationen af det "første" anti-
10 stof som skal bindes til analytten på den bærende faste
overflade og bør være i ækvimolært forhold eller i passen-
de overskud.

Det vil forstås for de sagkyndige at ikke blot kan
der om ønsket være andre komponenter til stede i reagens-
15 sættet såsom pufferopløsningerne, detekteringsmidler etc.,
men eventuelt kan nogle af sættets komponenter foreligge
i særskilt form, men til samme anvendelse.

De følgende eksempler tjener til nærmere belysning
af opfindelsen.

Eksempel 1

Fremstilling af BSA- ϵ -ACA-D-Ala-D-Ala

a) Konjugering af ϵ -aminokaproyl-D-alanyl-D-alanin
(ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala) til okseserumalbumin (BSA)

5 ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala konjugeres til BSA ved en "to-
trinsmetode" under anvendelse af glutaraldehyd som det bi-
funktionelle koblingsreagens: 250 mg BSA opløses i 4,5 ml
0,1 M Na-karbonat/bikarbonat-puffer ved pH 9,5. Der tilsæt-
tes 0,5 ml 25% vandig opløsning af glutaraldehyd og man
10 lader blandingen reagere i 1 time ved stuetemperatur. Re-
aktionsmassen dialyseres derefter natten over mod 0,9%
NaCl.

125 mg ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala opløses i 0,5 ml 0,5 M
Na-karbonatpuffer ved pH 9,5, sættes til den dialyserede
15 reaktionsmasse og omrøres i 6 timer ved stuetemperatur.
Derpå tilsættes der 0,5 ml 1M lysin og blandingen holdes
på stuetemperatur i 2 timer for at blokere de ikke-reage-
rede aktive grupper. Konjugatet dialyseres derefter mod
0,05 M K-fosfat indeholdende 0,15 M NaCl, pH 7,3.

20

b) Gelfiltrering af konjugatet

For at rense konjugatet fra overskydende ikke-rea-
geret materiale eller lavmolekylære biprodukter, føres den
25 på den ovenfor beskrevne måde dialyserede blanding gennem
en køleskabskølet "Sephacryl"[®] S-200 kolonne (kovalent
tværbundet alkyldextran og N,N'-metylen-bis-akrylamid med
kontrolleret porestørrelse; Pharmacia Fine Chemicals) med
en størrelse på 0,8 cm x 100 cm hvorved det bringes i kon-
30 takt og elueres med PBS pH 10,4 (strømningshastighed 10
ml/time). Elueringen overvåges spektrofotometrisk ved re-
gistrering af transmissionen ved 280 nm. Fraktioner sva-
rende til den top der elueres med kolonnens mellemrum-
rumfang forenes (samlet rumfang 15 ml), neutraliseres med
35 1 M HCl og fortyndes fire gange med PBS pH 7,3. Prøver på
0,5 ml af denne blanding fordeles i ampuller, frysetørres
og opbevares ved -80°C.

Eksempel 2

Overtrækning af mikroplader med BSA- ϵ -ACA-D-ALA-D-ALA

En stamopløsning til ugentlig fremstilling af mikroplader fremstilles ved opløsning af en ampuls indhold af frysetørret BSA- ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala (blev fremstillet som beskrevet i det foregående eksempel) i PBS pH 7,3 (0,5 ml); denne opløsning kan opbevares i uger uden tab af aktivitet og egner sig derfor til anvendelse som stamopløsning til ugentlige anvendelser.

Rummene (wells) af mikroplader ("Falcon"[®] Microtest III, Flexible Assay Plate; Becton Dickinson and Co., Oxnard, California 93030) fyldes med 100 mikroliter pr. rum af en 1/200 fortynding af denne stamopløsning, bortset fra at en lodret række rum (hensigtsmæssigt den sidste), der holdes som en prøve. Disse blindprøverum fyldes med 100 mikroliter PBS pH 7,3. Mikropladerne inkuberes i 3 timer ved stuetemperatur i en tildækket kasse og vaskes derefter fem gange ved tømning og genfyldning med destilleret vand. Der tilsættes 200 mikroliter/rum 3% BSA i PBS pH 7,3 og det henstod til adsorbering i 2 timer ved stuetemperatur for at blokere uovertrukket plastoverflade. Pladerne vaskedes på ny med destilleret vand, rystedes tørre og opbevarede ved 4°C indtil anvendelsen.

Eksempel 3

Fremstilling af anti-teicoplanin-antiserum

Der bruges et teicoplanin-albumin-konjugat (T-BSA) til immunisering af kaniner for at bevirke dannelse af anti-teicoplanin-antistoffer.

T-BSA fremstilles ved kobling af 200 mg teicoplanin til 50 mg BSA under anvendelse af 300 mg 1- α -etyl-3-(3-methylaminopropyl)-karbodiimid-hydroklorid som koblingsmiddel i 5 ml vand ved pH 5,5 ifølge Goodfriend et al. (T.L. Goodfriend, C. Levine og G.D. Fasman, 1964, Science 144, 1344). Det vundne T-BSA dialyseres natten over, frysetørres og suspenderes derefter i en koncentration på 1 mg/ml

i en fysiologisk opløsning indeholdende 50 rumfangs% af Freund's adjuvant. Fem sunde hvide hun-kaniner af stammen New Zealand får hver subkutant injiceret 1,2 ml af ovennævnte opløsning. Der foretages forstærkningsinjektioner i hver kanin med 0,5 ml af samme antigen-opløsning hver 3. uge i tre måneder. I løbet af denne periode udtages der ugentlig blod fra dyrene og anti-teicoplanin-titers bestemmes ved hjælp af en ELISA-metode med teicoplanin-overtrukne mikroplader under anvendelse af peberrodsperoxidase-mærket gede-antiserum til kanin IgG som den afslørende sonde.

Den ovennævnte ELISA-metode udføres på følgende måde:

PVC-mikroplader ("Falcon"[®] Microtest III Flexible Assay Plate) fyldes med 0,1 ml/rum af en opløsning indeholdende 0,4 g/l teicoplanin og 58 g/l NaCl. Mikropladerne inkuberes i 3 timer ved 37°C i en tildækket kasse og vaskes derefter tre gange ved tømning og genfyldning med fosfatpufret saltvand pH 7,3 (0,15 M NaCl, 0,05 M natriumfosfat).

En opløsning af BSA (30 g/l) i fosfatpufret saltvand pH 7,3 (0,15 M NaCl, 0,05 M natriumfosfat) indføres i rummene (0,2 ml/rum) og får lov til at adsorbere i 2 timer ved stuetemperatur for at blokere den uovertrukne plade. Pladerne vaskes på ny tre gange med fosfatpufret saltvand pH 7,3 (0,15 M NaCl, 0,05 M natriumfosfat) hvorefter der tilsættes kanin-antiserum til testopløsning (0,1 ml/rum) ved forskellige fortyndinger i logaritmisk skala (fra 1:10 til 1:10⁶) og får lov til at reagere med de sensitiverede rum i 2 timer ved 37°C. Efter grundig vask med fosfatpufret saltvand pH 7,3 (0,15 M NaCl, 0,05 M natriumfosfat) sættes der et gede-antiserum til kanin-IgG, mærket med peberrodsperoxidase, til rummene (0,1 ml/rum) og får lov til at reagere i 1 time ved 37°C. Efter grundig vask med fosfatpufret saltvand pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumchlorid) indeholdende 0,01 rumfangs% "Tween"[®] 20, rystes mikropladerne tørre og til hver mikrotiter-rum sættes der 0,2 ml af den peroxidasesubstrat-kro-

mogene opløsning (1 mg/ml o-fenylendiamin, 5 mM hydrogenperoxid i 0,1 M natriumcitratpuffer pH 5) til hvert mikrotiterum.

5 Man lader farven blive fremkaldt i 30 minutter ved stuetemperatur og farveudviklingen standses ved tilsætning af 4,5 M svovlsyre i en mængde på 0,05 ml pr. rum.

Efter 15 minutter måles absorptionen ved 492 nm. Antistoftiteren udtrykkes som den fortyndingsfaktor der giver 0,2 optiske tæthedsenheder.

10 Når antistoftiteren er mindst $1:10^4$ er der opnået analytisk effektiv antistofproduktion, og dyrene tømmes helt for blod og det ønskede antiserum udvindes og opbevares ved -20°C indtil brugen.

15 Eksempel 4

Rensning af antiteicoplanin kanin-antiserum på BSA-agarose

Der fremstilles en modificeret matrix ved kobling af 80 mg okseserumalbumin (BSA) med CNBr-aktiveret "Seph-
20 rose"[®] (10 ml kvældet harpiks) under anvendelse af 0,1 M natriumkarbonatpuffer pH 8,3 som koblingspuffer. Denne BSA-agarosematrix bruges derefter til at fjerne anti-BSA-immunoglobuliner fra det antiserum, der er vundet i henhold til det foregående eksempel 3 ved portionsvis adsorptions-
25 kromatografering ved at 2 ml af nævnte kanin-antiserum bringes i kontakt med den sedimenterede BSA-agarosematrix. Denne blanding får lov til at stå i kontakt i 1 time ved stuetemperatur og udhældes derefter på et glasfilter under vask tre gange med 6 ml fosfatpuffret saltopløsning pH 7,3 (0,05
30 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid) indeholdende 3% v/r (vægt/rumfang, dvs. forhold mellem fast stof og væske som mellem gram og ml) BSA og 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20. Det udvundne filtrat svarer til en tigganges opløsning af det oprindelige antiserum, hvorfra anti-BSA-antistofferne er
35 blevet fjernet.

Eksempel 5

Bestemmelse af teicoplaninholdige opløsninger

Der fremstilles en standardkurve ved scalare fortyndinger af teicoplanin til koncentrationer på fra 0,001 til 1 mikrogram/ml i fosfatpufret saltvand pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid) indeholdende 3% v/r BSA og 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20 (0,1 ml). Af disse opløsninger såvel som af de prøver der er blevet fortyndet ti gange i serumpufferen sættes der særskilt in triplo til rummene i BSA- ϵ -Aca-D-Ala-D-Ala-overtrukne fleksible plader tilberedt i overensstemmelse med den i foran stående eksempel 2 beskrevne fremgangsmåde. Opløsningen med den højeste koncentration sættes også til "blindrummene" (dvs. de rum som ikke er overtrukket med den specifikke D-Ala-D-Ala-binder) for at bedømme den uspecifikke binding. Hver af mikropladerne inkuberes derefter i 2 timer ved stuetemperatur i en fugtig, dækket kasse og vaskes otte gange ved tømning og genfyldning med fosfatpufret saltopopløsning pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid indeholdende 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20) og rystes tør.

Renset kanin-antiserum mod teicoplanin, tilberedt i overensstemmelse med foran stående eksempler 3 og 4, fortyndes derefter 50 gange med fosfatpufret saltopopløsning (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid, pH 7,3, indeholdende 3% v/r BSA og 0,05% rumfangs% "Tween"[®] 20); 100 mikroliter af denne opløsning sættes til hver rum og får lov til at reagere i 1 time ved stuetemperatur. Efter vask otte gange med fosfatpufret saltopopløsning pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid indeholdende 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20) og rystning til tørhed som beskrevet ovenfor, sættes der til hvert rum 100 mikroliter af en 1 til 500 ganges fortynding i fosfatpufret saltopopløsning af peberrodsperoxidase-konjugeret gede-antiserum til kanin-IgG (Bionetics Inc.), og det hele henstår i 1 time ved stuetemperatur. Derefter vaskes hvert rum på ny med fosfatpufret saltopopløsning pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid indeholdende 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20),

og der rystes til tørhed som beskrevet ovenfor hvorpå der til hvert rum sættes 200 mikroliter/rum af en opløsning af peroxidase-kromogent substrat (1 mg/ml o-fenylendiamin, 5 mM hydrogenperoxid i 0,1 M natriumcitratpuffer, pH 5), og man lader farven blive fremkaldt i 30 minutter ved stuetemperatur. Farveudviklingsreaktionen standses derefter ved tilsætning af 4,5 M svovlsyre i en mængde på 50 mikroliter/rum og efter 15 minutter måles absorptionen ved 492 nm i et "Titertek"[®] Multiscan-fotometer (Flow Lab. Inc.).

Der opnås bindingskurver ved at man stiller værdierne for absorptionen op som en funktion af koncentrationen af teicoplanin på et semi-log papir. Der opnås en dosis-responskurve med teicoplanin i området fra 0,01 mikrogram/ml til 1 mikrogram/ml, og koncentrationen i prøven bestemmes ved interpolation på standardkurven.

Den gentagne bestemmelse af opløsninger indeholdende kendte mængder teicoplanin på den ovenfor beskrevne måde viser at denne metode tilfredsstillende de analytiske fordringer med hensyn til følsomhed, præcision og nøjagtighed.

Der blev ikke iagttaget nogen binding ved gentagelse af den foran beskrevne metode under anvendelse af opløsninger af avoparcin, ristocetin, actaplanin, antibiotikum A 35512 B, antibiotikum A 41030, antibiotikum A 47934 og vancomycin.

Eksempel 6

Bestemmelse af teicoplanin indeholdende serumprøver

Der fremstilles en standardkurve med skalære fortyndinger af teicoplanin i koncentrationer på fra 0,001 til 1 mikrogram/ml i fosfatpufret saltopløsning pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid) indeholdende 3% v/r BSA, 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20 og 20% menneskeserum.

Prøverne fortyndes 5 gange i serumpufferen og 0,1 ml af disse opløsninger sættes in triplo til rummene i BSA-ε-ACA-D-Ala-D-Ala-overtrukne fleksible plader fremstillet i overensstemmelse med den i foranstående eksempel 2 be-

skrevne fremgangsmåde. Opløsningen med den højeste koncentration sættes også til "blindrummene" (dvs. de rum som ikke er overtrukket med den specifikke binder D-Ala-D-Ala) for at bedømme den uspecifikke binding. Hver af mikropla-

5 derne indkuberes derefter i 2 timer ved stuetemperatur i en fugtig dækket kasse og vaskes otte gange ved tømning og genfyldning med fosfatpufret saltopløsning pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid indeholdende 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20) og rystes tør.

10 Renset kanin-antiserum mod teicoplanin, fremstillet i overensstemmelse med foranstående eksempler 3 og 4, fortyndes derefter 50 gange med fosfatpufret saltopløsning (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid, pH 7,3, indeholdende 3% v/r BSA, 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20 og 20%

15 menneskeserum).

100 Mikroliter af denne opløsning sættes til hvert rum og får lov til at reagere i 1 time ved stuetemperatur. Efter vask otte gange med fosfatpufret saltopløsning pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid indeholdende

20 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20) og rystning til tørhed som beskrevet foran, sættes der til hvert rum 100 mikroliter af en 1 til 500 ganges fortynding, i fosfatpufret saltopløsning indeholdende 20% menneskeserum, af peberrodsperoxidase-konjugeret gede-antiserum mod kanin-IgG (Bionetics Inc.),

25 og det hele henstår i 1 time ved stuetemperatur. Derpå vaskes hvert af rummene på ny med fosfatpufret saltopløsning pH 7,3 (0,05 M natriumfosfat, 0,15 M natriumklorid indeholdende 0,05 rumfangs% "Tween"[®] 20) og rystes tør som beskrevet ovenfor, og til hvert rum sættes der 200 mikro-

30 liter/rum af en opløsning af peroxidase-kromogent substrat (1 mg/ml o-fenylendiamin, 5 mM hydrogenperoxid i 0,1 M natriumcitratpuffer, pH 5), og man lader farven fremkalde i 30 minutter ved stuetemperatur. Farveudviklingsreaktionen standses derefter ved tilsætning af 4,5 M svovlsyre i en

35 mængde på 50 mikroliter/rum og efter 15 minutter måles absorptionen ved 492 nm i et "Titertek"[®] Multiscan-fotometer. Der opnås bindingskurver ved at man opstiller værdierne for absorptionen som en funktion af koncentrationen

af teicoplanin på et semi-log papir. Der opnås en dosis-respons-kurve med teicoplanin i området 0,01 mikrogram/ml til 1 mikrogram/ml, og koncentrationen i prøven bestemmes ved interpolation på standardkuven.

5 Den gentagne bestemmelse af opløsninger indeholdende kendte mængder teicoplanin på den ovenfor beskrevne måde viser at denne metode tilfredsstiller de analytiske fordringer med hensyn til følsomhed, præcision og nøjagtighed.

10 I det ovenfor eksemplificerede tilfælde opnås der følgende resultater, der også gælder alment for enhver anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen:

Anvendelsesområde (på basis af gentagne forsøg):

15 fra 10 ng/ml
foretrukket anvendelsesområde fra 10 ng/ml til 1 mg/l teicoplanin.

Præcision:

20 - inden for den enkelte bestemmelse: CV% lig med 10,5
- mellem prøverne: CV% lig med 13,2.

Der iagttoges ingen binding ved gentagelse af den ovenfor beskrevne metode og anvendelse af opløsninger af avoparcin, ristocetin, actaplanin, antibiotikum A 35512 B, 25 antibiotikum A 41030, antibiotikum A 47934 og vancomycin.

Under anvendelse af i det væsentlige samme fremgangsmåde som beskrevet i eksempel 6 på pus, bronkial ekspektorerater og forbrændte hudprøver fra patienter behandlet med 30 teicoplanin, er koncentrationen af dette antibiotiske stof bestemt efter homogenisering af prøven i den 20% serum-pufret opløsning som er beskrevet i ovenstående eksempel. Metoden opretholdte også på disse prøver samme niveau med 35 hensyn til følsomhed, nøjagtighed og præcision som er rapporteret ovenfor.

Fremstilling af teicoplanin

Teicoplanin fremstilles ved dyrkning af stammen Actinoplanes teichomyceticus ATCC 31121 som angivet i US-patentskrift nr. 4.239.751 og renses ved hjælp af søjle-
5 kromatografering på "Sephadex"[®] eller ved anden dermed ækvivalent rensningsteknik.

P A T E N T K R A V

1. Fremgangsmåde til bestemmelse af en analyt som
10 er et antibiotikum af vancomycinklassen og binder sig til en molekylær receptor repræsenteret af et D-alanyl-D-alanin-dipeptid eller et D-alanyl-D-alanin-karboxy-terminalt oligopeptid, k e n d e t e g n e t ved at man
15 bringer en testopløsning i kontakt med en overflade som understøtter et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid, fortrinsvis ϵ -aminokaproyl-D-alanyl-D-alanin, konjugeret med en passende makromolekylær bærer, fortrinsvis et protein, især et albumin,
20 min, med evne til at adsorbere til nævnte overflade, efter skylning tilsætter antistoffer som er specifikt rettet mod det stof som skal detekteres, og afslører disse antistoffer bundet til antigenet på den stationære fase ved hjælp af et antispecifikt anti-IgG-antistof rettet mod disse bundne antistoffer (anti-antistof-antiserum) koblet til en
25 detekterbar markør.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at analytten er udvalgt blandt vancomycin, teicoplanin, actaplanin, ristocetin, avoparcin, actinoidin, antibiotikum LL-AM-374,
30 antibiotikum A 477, antibiotikum OA 7653, antibiotikum A 35512 B, antibiotikum A 515668, antibiotikum AAD 216, antibiotikum A 41030, antibiotikum A 47934 eller en individuel faktor, et derivat eller en aglycon deraf, fortrinsvis teicoplanin eller en individuel faktor, et derivat eller en aglycon deraf.
35

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at bæresubstratet er rum i mikrotiterplader eller reagensglas eller plastark, fortrinsvis rum i polyætylen- eller polystyren-mikrotiterplader.

5 4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at det specifikke antistof er et kanin-antistof og at det arts-specifikke anti-antistof-antiserum er et gede-antiserum mod kanin-IgG.

10 5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved at det specifikke antistof er et monoklonealt antistof som ikke svækker bindingen af analytten til den adsorbende molekulære receptor.

15 6. Analysesæt til anvendelse ved den i krav 1 angivne fremgangsmåde, k e n d e t e g n e t ved at det indeholder

a) en analytisk bærer hvor en overflade understøtter et D-alanyl-D-alanin-karboxyterminalt oligopeptid, fortrinsvis ϵ -aminokaproyl-D-alanyl-D-alanin, kon-
20 jugeret med en makromolekylær bærer, fortrinsvis et protein og navnlig albumin, med evne til at adsorbere på nævnte overflade, og

b) et antistofpræparat indeholdende antistoffer speci-
25 fikt rettet mod den analyt som er det stof der skal detekteres, og eventuelt

7. Analysesæt ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved at det tillige indeholder

c) et arts-specifikt anti-antistof-præparat indehol-
30 dende antistoffer specifikt rettet mod immunoglobuliner hos den dyreart hvorfra de "første" antistoffer rettet mod analyttens stammer og som er koblet med en detekterbar markør.

8. Analysesæt ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved at den analytiske bærer er rummene i mikrotiterplader, reagensglas eller plastark, fortrinsvis rummene i polyæty-
35 len- eller polystyren-mikrotiterplader.