



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT A5**

⑪

625 626

⑯1 Gesuchsnummer: 3102/77

⑯3 Inhaber:
F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft,
Basel

⑯2 Anmeldungsdatum: 11.03.1977

⑯3 Priorität(en): 25.03.1976 US 670212
28.07.1976 US 700652

⑯4 Patent erteilt: 30.09.1981

⑯2 Erfinder:
George Beskid, Upper Montclair/NJ (US)
Edward Victor Savard, Ramsey/NJ (US)

⑯4 **Verfahren zur Herstellung stabiler immunologischer Reagenzien.**

⑯7 Es wird ein Verfahren beschrieben, nach dem man in Wasser dispergierbare Präparate in Form eines gefriergetrockneten Pulvers erhält, welches Latexteilchen mit einem daran gebundenen serologisch bestimmenden Material enthält. Das Verfahren besteht darin, dass man eine wässrige Suspension enthaltend solche Latexteilchen mit einer ausreichenden Menge einer wässrigen Lösung eines Dispergierstoffes vermischt und so eine Latexsuspension herstellt, die 5 g/1 bis 30 g/1 an Dispergierstoff bezogen auf das Volumen der Latexsuspension enthält, die dann lyophilisiert wird. Als Dispergierstoff eignet sich z.B. ein wasserlösliches Saccharid, insbesondere Lactose, Dextrose und Sukrose.

Die Präparate können als Reagenzien zur Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern in diagnostischen Verfahren verwendet werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung eines stabilen in Wasser dispergierbaren lyophilisierten Präparats, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man durch Vermischen einer wässrigen Suspension enthaltend ein serologisch bestimmendes Material, das an Latexteilchen chemisch gebunden ist, mit einer ausreichenden Menge an wässriger Lösung eines Dispergierstoffes eine Latexsuspension enthaltend 5 g/l bis 30 g/l an Dispergierstoff bezogen auf das Volumen der Latexsuspension herstellt und die erhaltene Latexsuspension lyophilisiert.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Dispergierstoff ein wasserlösliches Saccharid ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das wasserlösliche Saccharid Laktose ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das serologisch bestimmende Material ein Antigen gewonnen aus Streptokokken der Gruppe A ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das serologisch bestimmende Material Immunoglobulin G ist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das serologisch bestimmende Material Immunoglobulin M ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das serologisch bestimmende Material Immunoglobulin A ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das serologisch bestimmende Material Gammaglobulin ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass das serologisch bestimmende Material menschliches Choriongonadotropin ist.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung stabiler, in Wasser dispergierbarer lyophilisierter Pulver, welche einen wasserlöslichen Dispergierstoff enthalten und aus einer wässrigen Suspension von Latexteilchen mit daran gebundenen serologisch bestimmenden Materialien erhalten werden.

Latexteilchen, welche an serologisch bestimmende Materialien wie z.B. Antigene oder Antikörpern gebunden wurden, sind bekannt und liegen meistens in Form von wässrigen Suspensionen vor. Die beschichteten Latexteilchen werden in verschiedenen Testsystemen beruhend auf einer Antigen-Antikörper Reaktion zur Bestimmung des entsprechenden Antigens oder Antikörpers eingesetzt, und ermöglichen die Diagnose von krankhaften Zuständen. Die wässrigen Suspensionen sind für den Gebrauch geeignet solange sie frisch sind. Nach längerer Lagerzeit werden sie jedoch dem Angriff von Mikroorganismen und der spontanen Degradierung des serologisch bestimmenden Materials unterworfen. Weiter können als Folge einer Wasserabdampfung Änderungen in der Zusammensetzung der Suspension eintreten. Die Abdampfung ändert die Ionenstärke der Suspension, wobei in vielen Fällen die Reaktivität in den Antigen-Antikörper Systemen vermindert wird. Es besteht somit ein Bedürfnis, an Latex gekoppelte serologisch bestimmende Materialien, wie Antigene oder Antikörper, welche über längere Zeit stabil bleiben, zur Verfügung zu stellen.

Latexsuspensionen können nicht durch übliche Methoden, wie z.B. durch Abdampfung, Sprühtrocknung, Gefriertrocknung, Vakuumtrocknung und dgl. getrocknet werden, weil diese Methoden zu einer Polymerisation und einer Quervernetzung führen. Wegen der leichten Polymerisation können Latexe nicht mehr in homogene Suspensionen übergeführt werden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich nun auf ein Verfahren zur Herstellung eines in Wasser dispergierbaren Präparates

in Form eines gefriergetrockneten Pulvers, das Latexteilchen mit einem daran gebundenen serologisch bestimmenden Material und einen wasserlöslichen Dispergierstoff enthält.

Genauer gesagt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines stabilen in Wasser dispergierbaren lyophilisierten Präparats, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man durch Vermischen einer wässrigen Suspension enthaltend ein serologisch bestimmendes Material, das an Latexteilchen chemisch gebunden ist, mit einer ausreichenden Menge an wässriger Lösung eines Dispergierstoffes eine Latexsuspension enthaltend 5 g/l bis 30 g/l an Dispergierstoff bezogen auf das Volumen der Latexsuspension herstellt und die erhaltene Latexsuspension lyophilisiert.

Es wurde gefunden, dass der Zusatz einer Substanz zu den 15 Latexsuspensionen wie z.B. ein wasserlösliches Saccharid, welches sich dazu eignet, die Latexteilchen mit daran gebundenen serologisch bestimmenden Materialien physikalisch zu beschichten, die Polymerisation des Latex verhindert. Der Zusatz wirkt als Dispergierstoff und als Polymerisationshemmer.

20 Für die Zwecke des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignete Zusätze müssen wasserlöslich sein und die Fähigkeit besitzen, die Latexteilchen zu beschichten. Weiter müssen sie mit dem Latexreagenz kompatibel sein und sich gegenüber der in der rekonstituierten Latexsuspension stattfindenden immunologischen Reaktion inert verhalten.

Typische Vertreter von geeigneten Zusätzen sind Zucker wie Laktose, Dextrose und Sukrose. Besonders geeignet für die Zwecke der vorliegenden Erfindung ist Laktose.

Die Menge an Zusatz ist von dem System, in welchem dieser 30 Zusatz eingesetzt wird, abhängig. Es wurde jedoch gefunden, dass die Zugabe einer wässrigen Lösung enthaltend den Zusatz in Konzentrationen von ungefähr 3–20 Gew.-% – in Abhängigkeit vom Volumen der Latexsuspension – ausreichend ist, wenn die Menge an Zusatz ungefähr 5 bis ungefähr 30 g/l, bezogen 35 auf das Volumen der Latexsuspension, beträgt. Mit Vorzug beträgt die Konzentration an Zusatz in der Latexsuspension 30 g/l.

Weniger als 5 g/l an Zusatz bezogen auf das Volumen der Latexsuspension ist nicht wirkungsvoll und mehr als 30 g/l an Zusatz bezogen auf das Volumen der Latexsuspension kann – je 40 nach System – die Verwendung der wiederhergestellten Suspension für diagnostische Zwecke beeinträchtigen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung bezieht sich der Ausdruck «serologisch bestimmende Materialien» auf solche Materialien, welche zur Bestimmung von spezifischen Bestandteilen in Körperflüssigkeiten menschlicher oder tierischer Herkunft unter Anwendung von immunologischen Prinzipien verwendet oder in solchen Flüssigkeiten selbst bestimmt werden können. Besonders geeignete serologisch bestimmende Materialien sind isolierte Antikörper von Mensch und Tier und Antigene. Spezifische serologisch bestimmende Materialien, welche in diagnostischen Verfahren häufig verwendet oder bestimmt werden, sind Choriongonadotropin, Gammaglobulin, Immunoglobulin G, Immunoglobulin A, Immunoglobulin M und menschliches Serumalbumin. Zusätzlich kann durch Bindung 55 von bestimmenden Materialien an Latexteilchen eine spezifische Bestimmung von Mikroorganismen erfolgen.

Für die Zwecke der vorliegenden Erfindung eignen sich alle serologisch bestimmende Materialien, welche an Teilchen eines serologisch inerten Latexpolymeren chemisch gebunden werden 60 können.

Der Ausdruck «serologisch inerte Latexpolymere» umfasst Latexpolymer, welche als Träger für die serologisch bestimmenden Materialien dienen und die immunologische Reaktion nicht beeinflussen. Geeignete Latexpolymer sind wasserunlöslich und besitzen eine Teilchengröße von ungefähr 0,01 bis 0,9 μ , sowie ein etwa dem von Wasser entsprechendes spezifisches Gewicht, so dass nach Bindung mit dem serologisch bestimmenden Material das spezifische Gewicht der Teilchen etwa 1,1 be-

trägt. Weiter müssen die Teilchen fähig sein nach chemischer Bindung an serologisch bestimmendes Material dessen immunologische Eigenschaften nicht zu zerstören.

Geeignete Latexpolymeren sind carboxylierte Copolymeren aus Styrol und Butadien, carboxylierte Polystyrole, carboxylierte Polystyrole mit Aminogruppen, Acrylsäurepolymere, Methacrylsäure-Polymeren, Mischpolymere aus Acrylnitril, Butadien und Styrol, Polyvinylacetatacrylate, Polyvinylpyridine, Vinylchlorid-Acrylate und dgl. Spezifische Latexpolymeren, welche an serologisch bestimmende Materialien gebunden sind und im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind in der US Patentschrift No. 3 857 931 beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durchgeführt, indem man eine wässrige Suspension der beschichteten Latexteilchen, welche ein Dispergierstoff, vorzugsweise Laktose enthält, bildet. Der pH-Wert der Dispersion liegt vorzugsweise zwischen ungefähr 7,5 und 8,5. Dies weil bei diesem pH die Latexteilchen nicht agglomerieren und die Aktivität der serologisch bestimmenden Materialien nicht beeinträchtigt wird. Der pH-Wert wird mittels eines Puffers, vorzugsweise mittels einer mit Phosphat (PBS), tris(Hydroxymethyl)aminoethan-hydrochlorid (Tris) oder 2-(m-Morpholino)ethansulfonsäure und dem Alkalimetallsalz davon (MES) gepufferten Kochsalzlösung, eingestellt. Die Menge an Laktose beträgt vorzugsweise 30 g/l. Die Suspension wird dann in kleine aliquote Volumen abgefüllt. z.B. 1 ml in getrennten Behälter und durch Eintauchen in ein Kühlbad, bestehend vorzugsweise aus CO₂ und Aceton, gefroren.

Die Behälter werden dann in einen Gefriertrockner gebracht und bei – 70 °C während ungefähr 48–72 Stunden unter Vakuum getrocknet. Das erhaltene Produkt ist ein poröses pulverförmiges Material mit ungefähr der gleichen Farbe wie das ursprüngliche Produkt. Das lyophilisierte Produkt enthält beschichteten Latex und Laktose in einer Menge, die ausreicht, damit das wiederhergestellte Volumen von 0,3 ml ungefähr 7,5 mg Latex und 9 mg Laktose enthält.

Das Pulver kann in eine Suspension mit der gewünschten Konzentration übergeführt werden, indem man die richtige Menge an destilliertem Wasser zusetzt. Aus diesem Grund wird, wenn aliquote Teile von 1 ml lyophilisiert werden, 1 ml Wasser jedem aliquoten Teil zugesetzt und die erhaltene Suspension gerührt. Auf diese Weise wird eine Suspension hergestellt, welche mit der ursprünglichen Suspension identisch ist. Insbesondere wird die ursprüngliche Ionenstärke der beschichteten Latexteilchen wiederhergestellt und somit sichergestellt, dass die gewünschten immunologischen Eigenschaften vorhanden sind.

Die Erfindung wird anhand der nachstehenden Beispiele näher erläutert:

Beispiel 1

Ein mit Antigen beschichteter Latex, welcher in einem 0,01M PBS Puffer (mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung) vom pH-Wert 8,0 enthaltend 30 g/l Laktose suspendiert ist, wird in Teströhren (10×75 mm) mit teilweise geöffneten Gummistopfen gegeben. Die Suspension wird in den Röhren lyophilisiert und während 48–72 Stunden unter Vakuum bei – 70 °C getrocknet. Man erhält ein poröses pulverförmiges Material.

Beispiel 2

Das gemäss Beispiel 1 erhaltene Pulver wird wieder in die ursprüngliche Suspension übergeführt indem man unter kräftigem Rühren jedem Teströhren eine Menge destilliertes Wasser zugibt, welche ausreicht, um das ursprüngliche Volumen vor der Lyophilisierung wiederherzustellen.

Beispiel 3

Latexteilchen werden unter Anwendung von Zentrifugieren 10 5mal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschliessend mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 1:10 verdünnt. 100 mg Antigen, welches aus Streptokokken der Gruppe A isoliert wurde, werden in ein Polypropylenröhren gebracht. Anschliessend werden zur Auflösung des Antigens 4 ml destilliertes Wasser zugesetzt. 4 ml des gewaschenen Latex werden zugegeben und die zwei Komponenten in einem Vortex-Mischer gemischt. Weiter werden 4 ml einer 1%igen Lösung von CDI[1-Cyclohexyl-3-(2-morpholinoäthyl)carbodiimid-metho-p-toluolsulfonat, welche frisch mit destilliertem Wasser hergestellt 15 wurde, zugesetzt, und die verschiedenen Bestandteile gemischt. Ein magnetisches Rührstäbchen wird in das Röhrchen gegeben und die Bestandteile gerührt. Die Kupplungsreaktion wird während 2 Stunden bei 22–25 °C fortgesetzt. Am Ende dieser 2 Stunden wird der mit Antigen beschichtete Latex während 30 25 Minuten bei 15.000 Upm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird abgegossen und der mit Antigen beschichtete Latex 3mal unter Anwendung von Zentrifugieren mit 12 ml 0,01M PBS vom pH-Wert 8,0 gewaschen. Nach dem letzten Waschen 30 wir der an Antigen gekuppelte Latex erneut in 8 ml 0,01M PBS vom pH-Wert 8,0 enthaltend 30 g/l Laktose suspendiert. Die erhaltene Suspension wird wie in Beispiel 1 beschrieben lyophilisiert, und wie in Beispiel 2 beschrieben, wiederhergestellt. Das erhaltene Produkt ist stabil und zeigt nach Wiederherstellung 35 der ursprünglichen Suspension eine Reaktivität, welche mit derjenigen von nicht lyophilisierten Kontrollen, die kein Saccharidzusatz enthalten, identisch ist.

In analoger Weise werden HCG (menschliches Choriongonadotropin, Immunoglobulin G, A und M und Gammaglobulin an Latex gebunden, lyophilisiert und suspendiert. Die erhaltenen Produkte sind stabil und zeigen nach Wiederherstellung der 40 ursprünglichen Suspension eine Reaktivität, welche mit derjenigen von nicht lyophilisierten Kontrollen, die kein Saccharidzusatz enthalten, identisch ist.

Latex-Kontrollproben, welche wie im vorliegenden Beispiel 45 bereits beschrieben hergestellt wurden, und keinen Saccharidzusatz enthalten, können nach Lyophilisierung nicht mehr suspendiert werden.

Der mit serologisch bestimmenden Materialien beschichtete Latex ist während 2–3 Wochen stabil, wenn er bei 4 °C in 0,01M 50 PBS vom pH-Wert 8,0 gelagert wird. Lyophilisiert man, wie in Beispiel 1 beschrieben, eine Suspension enthaltend 5 g/l bis 30 g/l Laktose, wird bei Lagerung bei 4 °C die Stabilität auf wenigstens 36 Wochen erhöht. Die Ergebnisse werden in den nachstehenden Tabellen dargestellt, wobei die Tabelle I die Ergebnisse 55 der Hemmungsreaktion von an Latex gekuppeltem Antigen, welches in 0,01M PBS (pH 8,0) enthalten 30 g/l, 10 g/l oder 5 g/l Laktose lyophilisiert und mit Wasser wieder suspendiert wurde, wiedergibt.

Tabelle I

Behälter A ¹					Behälter B ²					Behälter C ³				
Laktosekonzentration (g/l)					Laktosekonzentration (g/l)					Laktosekonzentration (g/l)				
Min.	30	20	10	5	30	20	10	5	0	30	20	10	5	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	2+	1+	2+	2+	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	3+	2+	3+	2+	0	0	0	0	0	0

Tabelle I

Behälter A ¹					Behälter B ²					Behälter C ³				
Laktosekonzentration (g/l)					Laktosekonzentration (g/l)					Laktosekonzentration (g/l)				
4	0	0	0	0	4+	3+	3+	3+	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	4+	4+	3+	3+	0	0	0	0	0	0

1. Behälter A enthalten vollständige Streptokokkenzellen, verdünntes Antiserum und Latex-Antigen und dienen zur Messung der Reaktivität des Testsystems.

2. Behälter B enthalten eine Kochsalzlösung, verdünntes Antiserum und Latex-Antigen und dienen als Kontrolle.

3. Die Behälter C enthalten vollständige Streptokokkenzellen, eine Kochsalzlösung und Latex-Antigen und dienen zur Messung der Selbstagglutination des Latex.

4. Wenn Lactose in einer Konzentration von weniger als 5 g/l verwendet wird, erfolgt nach Suspendierung des lyophilisierten Antigens in Wasser Selbstagglutination.

Tabelle II fasst die Ergebnisse der Hemmungsreaktion zusammen, die mit an Latex gekuppeltem Antigen, welches bei 4 °C in 0,01M PBS (pH 8,0) gelagert wurde, oder mit an Latex

gekuppeltem Antigen, welches in 0,01M PBS (pH 8,0) enthalten 30 g/l Lactose lyophilisiert und sofort nach Suspendieren in Wasser verwendet wurde, erhalten werden.

20

Tabelle II

Latex-Antigen in 0,01M PBS¹

Min.	Behälter A ²	Woche 1			Woche 3–4		
		Behälter B ³	Behälter C ⁴	Behälter A	Behälter B	Behälter C	Behälter C
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1+	0	0	0	0	0
3	0	2+	0	0	0	0	0
4	0	3+	0	0	0	0	0
5	0	3+	0	0	0	0	0

Latex-Antigen lyophilisiert in 0,01M PBS enthaltend 30 g/l

Lactose⁵

Min.	Behälter A	Woche 1			Woche 36		
		Behälter B	Behälter C	Behälter A	Behälter B	Behälter C	Behälter C
1	0	1+	0	0	1+	0	0
2	0	2+	0	0	2+	0	0
3	0	3+	0	0	3+	0	0
4	0	4+	0	0	4+	0	0
5	0	4+	0	0	4+	0	0

1. Antigen gelagert bei 4 °C und anschliessend in dem Hemmungstest verwendet.

2. Die Behälter A enthalten vollständige Streptokokkenzellen, verdünntes Antiserum und Latex-Antigen und dienen zur Messung der Reaktivität des Testsystems.

3. Die Behälter B enthalten eine Kochsalzlösung, verdünntes Antiserum und Latex-Antigen und dienen als Kontrolle.

4. Die Behälter C enthalten vollständige Streptokokkenzellen, eine Kochsalzlösung und Latex-Antigen und dienen zur Messung der Selbstagglutination vom Latex.

5. Lyophilisiertes Antigen gelagert bei 4 °C, in Wasser suspendiert und sofort im Hemmungstest eingesetzt.

In den Tabellen I und II bedeuten:

0 = keine Agglutination

1–4 = verschiedene Agglutinationsgrade

Wenn die Kontrollen (Behälter B) Instabilität oder Kreuzreaktionen zeigen, erfolgt keine Agglutination. Wenn das Testsystem (Behälter A) stabil ist, insbesondere in Anwesenheit von hämolytischen Streptokokken der Gruppe A beta, erfolgt keine Agglutination. Wenn das Latexsystem in Abwesenheit von Antiserum (Behälter C) instabil ist, gibt es eine Agglutination.

55

Wie durch die Tabellen I und II veranschaulicht, bleiben bei Verwendung der erfundungsgemässen Methode die Kontrollen während 36 Wochen stabil. Wird dagegen die erfundungsgemässen Methode nicht verwendet, so sind die Kontrollen nicht länger als 3 Wochen stabil.

60