

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 152296 B



(21) Patentansøgning nr.: 1176/78

(51) Int.Cl.⁴ C 12 Q 1/04

(22) Indleveringsdag: 15 mar 1978

(41) Alm. tilgængelig: 17 sep 1978

(44) Fremlagt: 15 feb 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 16 mar 1977 GB 11060/77

(71) Ansøger: *BEECHAM GROUP LIMITED; Beecham House; Great West Road; Brentford; Middlesex, GB

(72) Opfinder: Charles Bernard *Taskis; GB, Michael John *Greenway; GB, Pamela Ann *Hunter; GB

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af en pille, der kan anvendes ved testning af mikroorganismer

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 1542/77 (142424), 1672/75 (141254)
DE freml.skrift nr. 2059788, 2205986, 2608601

DK 152296 B

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en pille, der kan anvendes ved testning af mikroorganismer.

Det er velkendt, at mikroorganismers, f.eks. bakteriers, følsomhed over for antibiotika kan bestemmes bekvemt i mikroskala. Ved en sædvanlig metode fremstilles en seriefortynding af antibiotiket og inkorporeres i et egnet medium, f.eks. dyrkningsvæske eller agar, og hver fortyndingsstyrke podes på sædvanlig måde med bakterierne. Ved at iagttage den mindste antibiotikumkoncentration, ved hvilken bakterievækst ikke forekommer, kan MIC-værdien for antibiotiket bestemmes. Ved en anden sædvanlig metode anbringes papirplader, der er imprægneret med antibiotiket, på agarplader, der er podet med bakterien, og væksten iagttages. Der fås en zone rundt om hver plade (forudsat at antibiotikumkoncentrationen i pla-

den er tilstrækkelig), i hvilken den diffunderede antibiotikum-koncentration har været høj nok til at forhindre vækst. Ud fra zonernes dimensioner og antibiotikumkoncentrationen i pladerne kan MIC-værdien for antibiotiket over for bakterien beregnes.

Det er også kendt at undersøge en ukendt mikroorganismes identitet ved at anvende stoffer, som giver en positiv reaktion i nærværelse af en given mikroorganisme.

I tysk fremlæggelsesskrift nr. 2.205.986 er beskrevet papirskiver, hvorpå et reagens er anbragt. Det har imidlertid vist sig, at anvendelse af frysetørringsteknik på sædvanlige papirskiver, der er fugtet med reagensopløsningen, har flere ulemper, f.eks. dårlig eller ufuldstændig kontakt med varmeoverføringsmediet og store håndteringsproblemer, både før og efter tørringstrinnet.

Det har nu vist sig, at man kan fremstille piller indeholdende testreagenser. Disse piller er bekvemme, let håndterbare kilder til nøjagtige mikrodoseringsmængder af testreagenserne og kan f.eks. anvendes som sådanne ved sædvanlig mikroorganisme-undersøgelse af den ovenfor beskrevne art.

Den foreliggende opfindelse bygger på denne erkendelse og angår en fremgangsmåde til fremstilling af en pille, der kan anvendes ved testning af mikroorganismer, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en opløsning i et til frysetørring egnet opløsningsmiddel af et testreagens og et vandopløseligt bærestof valgt blandt polyvinylpyrrolidon, polyvinylpyrrolidon/polyvinylacetat-copolymere, natriumcarboxymethylcellulose og saccharose, frysetørres til dannelsen af legemer, der er en ikke-smuldrende mikro-porøs fast opløsning af testreagenset i bærestoffet. Kernen i den foreliggende opfindelse ligger i, at testreagenset kan formuleres i ikke-smuldrende piller, som kan anvendes både til seriefortyndingstestning og sensitivitetstestning på agarplader. De kan anvendes til seriefortyndingstests i agar i almindelige Petri-skåle, idet der gås frem på den måde, at en pille opløses i en kendt mængde agar-næringsvæske, og den således fremstillede agarplade derefter podes med én eller flere organismer, der skal testes, og der iagttages vækst eller ikke-vækst på hvert podningssted.

Der kan fremstilles en serie af sådanne agarplader med varierende antibiotikumkoncentrationer ved at variere mængden af agar-næringsvæske, antallet af anvendte piller eller begge dele. Pillerne er desuden velegnede til anvendelse på agarplader, idet testreagenset kan migrere fra pillen ud på agaren.

De papirskiver, der er beskrevet i vesttysk fremlæggeskrift nr. 2.205.986, gør ikke de håndteringsmæssige fordele ved de ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse fremstillede piller nærliggende, idet papirskiverne kun kan anvendes, når de placeres i kontakt med en agarplade, der indeholder den organisme, der testes. Arbejdsgangen i laboratoriet vil være, at der fremstilles en agartestplade af en kultur af den organisme, der testes, og der anbringes forskellige papirskiver på overfladen, hvilke papirskiver hver indeholder et forskelligt antibiotikum. I modsætning hertil har de piller, der fremstilles ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, generel anvendelighed ved sensitivitetstests. De kan anvendes i stedet for de ovenfor beskrevne papirskiver eller som middel til at tilføre en kendt mængde antibiotikum ved fremstilling af en opløsning og seriefortyndinger deraf, til anvendelse ved sædvanlige seriefortyndingstests eller til den ovenfor beskrevne agarfortyndings-sensitivitetstest.

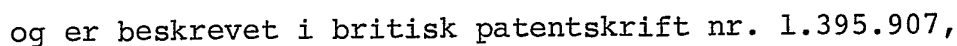
Den ikke-smuldrende mikroporøse faste opløsning af testreagenset i bærestoffet er hydrofil og ikke-hygroskopisk, og den er naturligvis bakteriologisk inert og forenelig med reagenset. De deraf dannede piller er tilstrækkeligt faste til, at det undgås, at de deformeres ved håndtering.

Bærestoffet skal være vandopløseligt, for at reagenset let skal kunne frigøres fra pillen ved kontakt med vandige medier.

Et særlig egnet organisk bærestof er polyvinylpyrrolidon (f.eks. det stof, der fås fra BASF under handelsnavnet "Kollidon" [®] (25)) og polyvinylpyrrolidon/polyvinylacetat-copolymere (f.eks. det stof, der fås fra BASF under handelsnavnet "Kollidon" [®] VA64).

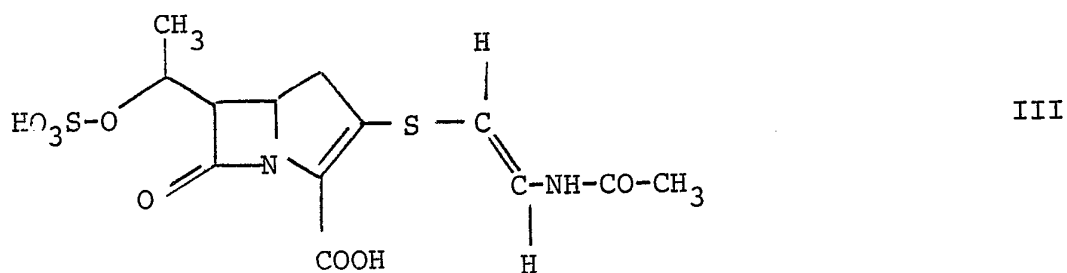
Testreagenset kan være et stof, som er i stand til at give en positiv identifikation af en bestemt mikroorganisme eller klasse af mikroorganismer, f.eks. cytochrom-oxidasereagens.

Pseudomonsyre har formeln I

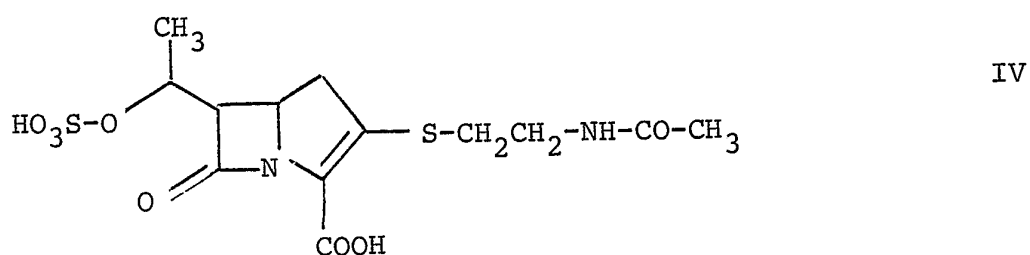
CC(C)(C(=O)NCC(C)=C1C(=O)N2C(=O)C(C(C)C)C2=C1C(=O)O)S(=O)(=O)O

II

MM13902 har formeln III

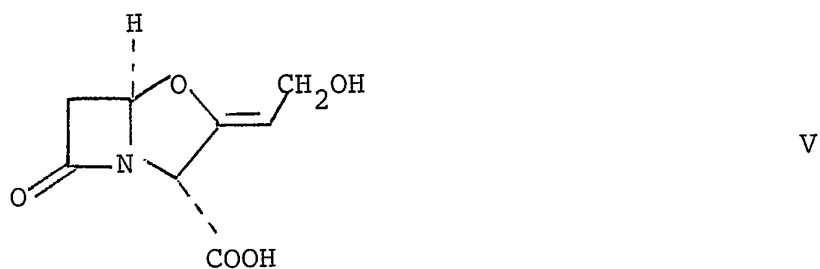


MM17880 har formlen IV



Fremstillingen af og egenskaberne ved MM4550, MM13902 og MM17880 og salte deraf er beskrevet i dansk fremlæggeskrift nr. 140.151, 140.150 og 139.532.

Clavulansyre har formlen V



Fremstillingen af og egenskaberne ved clavulansyre, salte og estere deraf er beskrevet i dansk patentskrift nr. 141.254. Fremstillingen af og egenskaberne ved etherne (f.eks. methyl- og ethyletherne) af clavulansyre er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 4574/76.

MM4550, MM13902, MM17880 og salte deraf samt clavulansyre og dens salte, estere og etherne er β -lactam-antibiotika-synergister. Således vil testreagenset i pillen ofte være et β -lactam-antibiotikum og en af de ovenfor nævnte synergister. Vægtforholdet mellem β -lactam-antibiotikum og synergist ligger bekvemt mellem ca. 10:1 og 1:10.

Særlig velegnede synergister til anvendelse heri er salte af clavulansyre såsom lithium-, natrium-, kalium- og calcium og lignende salte, der sædvanligvis dannes med penicilliner og cephalosporiner, især natrium- og kaliumsaltene; og ethere af clavulansyre såsom methyl- og ethyletherne.

Særlig velegnede β -lactam-antibiotika til anvendelse sammen med clavulansyrederivater omfatter en penicillin eller en cephalosporin med en sidekæde (knyttet til henholdsvis 6- eller 7-stillingen) med den almene formel VI



hvor R betegner phenyl, p-hydroxyphenyl eller cyclohexadienyl, (og D angiver, at det drejer sig om den højredrejende optiske isomer), eller et salt deraf. Egnede penicilliner af denne type omfatter ampicillin og amoxycillin og salte deraf såsom natrium- og kaliumsaltene. Egnede clavulansyrederivater omfatter de ovenfor angivne clavulansyresalte.

I disse præparater vil forholdet mellem antibiotikum og clavulansyrederivat normalt ligge i området mellem 10:1 og 1:10 (vægt/vægt), f.eks. mellem 5:1 og 1:1.

Forholdet mellem reagenset og bærestoffet i pillen kan varieres efter ønske, naturligvis under forudsætning af, at der bliver tilstrækkeligt bærestof tilbage til dannelselse af matricen. F.eks. kan velegnede piller indeholde 0,1 - 25% reagens, navnlig 0,1 - 10% reagens.

Pillens form er uden betydning, når blot den er tildannet til at blive opløst i et opløsningsmiddel (f.eks. i et vandigt medium til dannelselse af en opløsning af en standardreagenskoncentration som ved MIC-forsøg ved seriefortynding). I sådanne tilfælde kan pillen være sfærisk, hemi-sfærisk, frustro-konisk, pladeformet eller have en hvilken som helst anden bekvem form. Når pillerne imidlertid skal anvendes i stedet for papirsensitivitetsplader ved sensitivitetsforsøg i agarplader, er det vigtigt, at de har mindst én

flad cirkulær overflade til at komme i kontakt med agaren, således at reguleret diffusion af reagenset derfra bliver mulig. Piller til denne anvendelse er derfor hensigtsmæssigt af samme generelle størrelse og form som kendte papirsensitivitetsplader.

F.eks. kan pillerne hensigtsmæssigt have en største diameter på mellem ca. 2 og 10 mm, f.eks. ca. 6 mm. Pillerne kan f.eks. også hensigtsmæssigt veje 0,001 - 0,1 g, navnlig 0,005 - 0,05 g.

Hensigtsmæssigt fyldes portioner af opløsningen i forme eller dryppes på en egnet flad overflade, hvorefter frysetørringen udføres.

Alt afhængig af reagensets og bærestoffets opløselighed kan den nødvendige opløsning fremstilles i vandigt, organisk eller blandet opløsningsmiddel. Reagenset og bærestoffet opløses i opløsningsmidlet i de relative forhold, som ønskes i de piller, som fremstilles ud fra denne opløsning. Eksempler på egnede opløsningsmidler omfatter inerte flygtige opløsningsmidler, f.eks. sådanne opløsningsmidler, som er egnede til anvendelse ved frysetørring, f.eks. vand, tert.butanol, acetonitril, dimethylcarbonat og dimethylsulf-oxid. Hvis det er muligt, anvendes vand som opløsningsmiddel.

Hensigtsmæssigt indeholder den opløsning, som skal frysetørres, 3 - 25% bærestof.

De omhandlede piller bør oplagres sammen med et tørringsmiddel.

De omhandlede piller kan anvendes til at stille en kendt mikrodosismængde af et reagens til rådighed til afprøvning af mikroorganismer. F.eks.:

i) Når reagenset er en indikator for en bestemt mikroorganisme, kan pillerne anvendes til at fastslå identiteten af en ukendt mikroorganisme, hvorved det bliver muligt at planlægge en effektiv medikamentterapi imod denne.

ii) Når reagenset er et antibakterielt middel, kan en bestemt mikroorganismes følsomhed over for dette antibakterielle middel bestemmes ved sædvanlige MIC- eller agarpladezone-inhiberingsmetoder.

Pillerne kan også anvendes til at bestemme nøjagtige mikrodosis-mængder af testreagenset til andre formål end mikroorganisme-følsomhedsafprøvning, f.eks. til kemiske tests på selve reagenset.

Der er yderligere fordele forbundet med pillerne, nemlig

i) de forbedrer opløseligheden af tungtopløselige eller uopløselige reagenser.

ii) Efter fremstilling ved frysetørring har de god stabilitet med reagenser, som er ustabile i opløsning eller under tørring ved normale temperaturer.

iii) Anvendelsen af vandopløselige bærestoffer resulterer i, at reagenset bliver helt tilgængeligt i vandigt miljø.

iv) De har god reproducerbarhed.

v) De kan, om ønsket, gøres sterile.

vi) De håndteres let, f.eks. med pincet.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående eksempler:

Eksempel 1.

Piller indeholdende natriumamoxycillin og lithiumclavulanat i fast opløsning med "Kollidon" [®] (25).

110 mg natriumamoxycillin opløses i 25 ml vand. 64 mg lithiumclavulanat opløses for sig i 20 ml vand. 3 ml af amoxycillinopløsningen og 2 ml af clavulansyreopløsningen sættes til en opløsning af 2 g "Kollidon" [®] (25) i 10 ml vand. Opløsningen fyldes derefter op til 20 ml med vand. Dråber på 50 mg af opløsningen anbringes på en bakke af rustfrit stål ved stuetemperatur og fryses derefter ved -40°C i 1 time. Der pålægges derefter vakuum, og prøverne fry-

setørres i løbet af 24 timer med en endelig tørringstemperatur på 40°C , hvorved der fås piller.

Disse piller er hårde, ikke-smuldrende, mikroporøse plader.

Eksempel 2.

Piller indeholdende dinatriumticarcillin og lithiumclavulanat.

100 mg dinatriumticarcillin opløses i 50 ml vand. 33 mg lithium-clavulanat opløses for sig i 100 ml vand. 5 ml af ticarcillin-opløsningen og 5 ml af clavulansyreopløsningen sættes til en opløsning af 3 g "Kollidon" [®] VA64 i 10 ml vand. Dråber på 75 mg af den samlede opløsning anbringes på en bakke af rustfrit stål ved stuetemperatur og fryses derefter ved -40°C i 1 time. Der pålægges vakuum, og prøverne frysetørres i løbet af 24 timer med en endelig tørringstemperatur på 40°C , hvorved der fås piller.

Disse piller er hårde, ikke-smuldrende, mikroporøse plader.

De i tabellen angivne piller fremstilles på lignende måde som ovenfor beskrevet. De er generelt af pladeform, og de er alle ikke-smuldrende og mikroporøse.

Tabel

Eksempel nr.	Reagens + /ug reagens/plade	Koncentration af op-rindelig reagensopløsning (A)	Bærestof og koncentration af bærestofopløsning (B)	Fremstillingsmetode	Dråbevægt	Endelig bærestofkoncentration i frysetørret opløsning
3	gentamycin 250 _{ug}	20 mg fri syre i 3 ml vand	"Kollidon" (R) VA64 30 vægt/volumenprocent	2 ml (A) + 2 ml (B)	76 mg	15%
4	erythromycin 250 _{ug}	"	"	"	"	"
5	pseudomonsyre 250 _{ug}	38 mg i 5 ml vand	"	5 ml (A) + 5 ml (B)	"	"
6	cytochrom-oxidaserreagens 100 _{ug}	52 mg i 20 ml vand	"	"	"	"
7	lithiumclavulanat 20 _{ug}	28 mg i 50 ml vand	"	"	"	"
8	lithiumclavulanat 20 _{ug}	32,3 mg i 100 ml vand	SCMC 8 vægt/volumenprocent	"	130 mg	4%
9	lithiumclavulanat 20 _{ug}	"	saccharose 30 vægt/volumenprocent	"	"	15%
10	natriumflucloxacillin 50 _{ug}	85,4 mg i 100 ml vand	SCMC 8 vægt/volumenprocent	"	"	4%
11	ampicillin 20 _{ug}	36 mg i 100 ml vand	"	"	"	"
12	ampicillin 20 _{ug}	"	saccharose 30 vægt/volumenprocent	"	"	15%

DK 152296 B

Fodnoter.

S.C.M.C. er natriumcarboxymethylcellulose.

"Kollidon" [®] VA64 er en vandopløselig copolymer af 60% vinylpyrrolidon og 40% vinylacetat.

De i eksempel 3 - 12 fremstillede piller fremstilles også i "blister pack tops" og i metalforme, hvorved der fås piller af henholdsvis overvejende frustro-koniskform og pladeform.

S.C.M.C.-pladerne er deformerbare, men ikke smuldrende.

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåde til fremstilling af en pille, der kan anvendes ved testning af mikroorganismer,
k e n d e t e g n e t ved, at en opløsning i et til frysetørring egnet opløsningsmiddel af et testreagens og et vandopløseligt bærestof valgt blandt polyvinylpyrrolidon, polyvinylpyrrolidon/polyvinylacetatcopolymere, natriumcarboxymethylcellulose og saccharose, frysetørres til dannelse af legemer, der er en ikke-smuldrende mikroporøs fast opløsning af testreagenset i bærestoffet.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at testreagenset er et antibakterielt middel.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at testreagenset er et β -lactam-antibiotikum.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at testreagenset er et β -lactam-antibiotikum og en synergist derfor.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4,
k e n d e t e g n e t ved, at testreagenset er en penicillin eller
en cephalosporin med en sidekæde (knyttet til henholdsvis 6- eller
7-stillingen) med den almene formel VI



hvor R betegner phenyl, p-hydroxyphenyl eller cyclohexadienyl,
(og D angiver, at det drejer sig om den højredrejende optiske
isomer), eller et salt deraf, og clavulansyre eller et salt, en
ester eller en ether deraf.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5,
k e n d e t e g n e t ved, at vægtforholdet mellem penicillin el-
ler cephalosporin og clavulansyrederivat er 5:1 - 1:1.

7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 - 6,
k e n d e t e g n e t ved, at reagenset udgør 0,1 - 25% af pillen.

8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 - 7,
k e n d e t e g n e t ved, at pillen vejer 0,001 - 0,1 g.

9. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 - 8,
k e n d e t e g n e t ved, at dens største diameter ligger mellem
ca. 2 og 10 mm.

10. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 - 9,
k e n d e t e g n e t ved, at den er pladeformet.

11. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1 - 10,
k e n d e t e g n e t ved, at den indeholder en specifik mikro-
dosering af testreagenset.

12. Fremgangsmåde ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at frysetørringen foregår ved, at
opløsningen fyldes i forme eller dryppes på en flad overflade
og derefter frysetørres.

13. Fremgangsmåde ifølge krav 12,
k e n d e t e g n e t ved, at det til frysetørring egnede
opløsningsmiddel er vand.

14. Fremgangsmåde ifølge krav 12 eller 13,
k e n d e t e g n e t ved, at den frysetørrede opløsning har
en bærestofkoncentration på 3 - 25 vægt/volumenprocent.