

(19) **DANMARK**



PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN



(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT**

(11) **153204 B**

(21) Patentansøgning nr.: 2480/86

(51) Int.Cl.⁴ **A 61 B 10/00**

(22) Indleveringsdag: 27 maj 1986

(24) Løbedag: 23 sep 1985

(41) Alm. tilgængelig: 27 maj 1986

(44) Fremlagt: 27 jun 1988

(86) International ansøgning nr.: PCT/SE85/00361

(86) International indleveringsdag: 23 sep 1985

(85) Videreførelsesdag: 27 maj 1986

(30) Prioritet: 01 okt 1984 SE 8404895

(71) Ansøger: **TORTEL INCEMAR *FISCHER; Rosenvägen 57; 752 52 Uppsala, SE**

(72) Opfinder: **SAMME**

(74) Fuldmægtig: **Plougmann & Vingtoft Patentbureau**

(54) **Middel til udførelse af overfølsomhedstests**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

2480-86

Et middel til udførelse af occlusive epicutane tests (lap-tests) består af en teststrimmel med i det mindste én lap, på hvilken der er påført en film, hvori teststoffet er inkorporeret. Denne type test kan anvendes til detektion af kontaktallergi over for et specifikt stof (allergen) eller til testning af et stofs allergener og/eller irriterende egenskaber.

DK 153204 B

Den foreliggende opfindelse angår en hidtil ukendt måde til udførelse af occlusive epicutane tests (lap-tests) med henblik på detektion af kontaktallergier (kontaktsensibilisering) over for et specifikt stof (allergen). For nemheds skyld betegnes fremgangsmåden ifølge opfindelsen "TRUE-testen".

Udtrykket "lap-test" stammer fra, at man indledningsvis anvendte lapper af tekstil eller papir til udførelse af testen, idet disse lapper blev gennemvædet med det stof, der skulle testes. I tidens løb er der blevet anvendt mange forskellige typer lapper. I forbindelse med den foreliggende opfindelse betegner udtrykket "lap" fortrinsvis det område, der bærer teststoffet.

I den epicutane testprocedure påføres det stof, der er under mistanke for at have allergene eller irriterende egenskaber, på normal hud under occlusion i et vist tidsrum, idet denne påføring udføres på kontrolleret måde og med en hensigtsmæssig formulering og koncentration af teststoffet. Dette vil derefter i tilfælde af kontaktallergi forårsage et allergisk eksem i testområdet. Irriterende stoffer forårsager irritations-eksemreaktioner af tilsvarende karakter (*Manual of Contact Dermatitis*, red. S. Fregert, 2. udgave. Munksgaard, København, 1981, s. 71-76). Sædvanligvis påføres teststoffet i en hensigtsmæssig bærer, som regel vaseline eller vand. "Lapperne" i lap-testmetoden består nu om stunder sædvanligvis af en lille kop af aluminiumfolie, som, når testen skal udføres, udfyldes med et hensigtsmæssigt formuleret præparat af teststoffet og påføres på en sådan måde, at testen udføres under occlusion. Der fastgøres ofte flere lapper til en klæbestrimmel, som er dækket med en aftagelig beskyttelsesfolie.

De metoder og materialer, der sædvanligvis anvendes til lap-tests er utilfredsstillende med hensyn til sikkerhedskrav; dette gælder navnlig for metoder og materialer, der anvendes til metalsalte. Forbedringer er derfor ønskelige, jfr. K. Kalimo et al., *Contact Dermatitis* 10, 1984, s. 25-29; H. Schmidt et al., *Contact Dermatitis* 6, 1980, s. 91-94. Irritationsreaktioner er almindelige ved allergitestprocedurer, især hvis teststoffet anvendes i koncentrationer, der ligger tæt ved deres irritationstærskel. Dette skyldes i det mindste delvis, at test-

stofferne ikke er jævnt fordelt over hudkontaktområdet. Mikroskopiske undersøgelser af standard-lap-testmateriale har vist, at de fleste af allergenerne ved inkorporering i de anbefalede vaselinebærere dispergeres ujævnt deri, enten i form af partikler eller som dråber af varierende størrelse, jfr. D. Vannestre et al., *Contact Dermatitis* 6, 1980, s. 197-203; J. Fossereau et al., *Occupational Contact Dermatitis*, Munksgaard, København, 1982, s. 45). De største af disse inclusioner måler over 0,5 mm i diameter. Når sådanne partikler opløses i svedet, danner de en høj lokal koncentration af allergenet og forårsager poreinflammationer ("poritis") omkring hårfolliklerne. En anden ulempe er, at den mængde teststof, der påføres i en standard-lap-test, kan variere inden for et område af 6. potens, jfr. T. Fischer et al., *Contact Dermatitis* 1, 1984, s. 285-87). Alt dette viser, at det er særdeles ønskeligt at opnå forbedringer i de farmakologiske egenskaber af materialer, der skal anvendes i lap-test-procedurerne.

TRUE-testen løser mange af de ovennævnte problemer, idet den tilvejebringer en nøjagtig dosis, ensartet overfladefordeling og en høj grad af biotilgængelighed af teststoffet. TRUE-testen giver derfor en løsning på sådanne problemer som lav biotilgængelighed, usikker dosering og ujævn overfladefordeling, hvilke let kan opstå, når vaseline anvendes som bærer.

Ved den foreliggende opfindelse tilvejebringes metoder, der kan anvendes inden for occlusive lap-testteknikker, hvilke metoder a) minimerer den krævede mængde og forøger dosisnøjagtigheden af teststoffet (dosis pr. enhedsareal), b) muliggør fremstilling af testpræparater, der er lagerstabile, og c) muliggør fremstilling af præfabrikerede teststrimler, der hver især indeholder flere teststofpræparater, og hvor der er en kun ringe risiko for gensidig krydskontaminering.

Den foreliggende opfindelse angår således en teststrimmel med i det mindste én lap, der bærer et kontaktallergiteststof, og som er beregnet til anvendelse til occlusiv epicutan testning til detektion af kontaktallergi, hvorhos teststoffet er inkorporeret i en bærer, som er formuleret som en tør film på mindst én af lapperne på strimlen, hvilken bærer som filmdannende stof omfatter en filmdannende poly-

mer, som er i stand til at absorbere fugtighed fra det testede hudområde, når teststrimlen er i brug. Teststrimlen kan indeholde flere sådanne lapper, der hver især kan indeholde et forskelligt teststof.

- Det skal bemærkes, at TRUE-testen ikke må forveksles med forskellige
- 5 ikke-occlusive teknikker. Ved occlusive teknikker foregår kontakten mellem teststoffet og huden i et lukket rum; dette betyder, at luften og luftfugtigheden udelukkes, idet der samtidig foregår inklusion af fugtighed (sved) fra det testede hudområde sammen med teststoffet. For at opnå dette anvendes et forseglingsmateriale, fx en aluminium-
- 10 folie eller en uigennemtrængelig plastfolie. Denne lukket-rum-metode gør den occlusive teknik let at standardisere og har vist sig at give pålidelige resultater (jfr. V. Pirilä, *Contact Dermatitis* 1, 1975, s. 48-52). Filmdannende polymerer er tidligere blevet anvendt i ikke-occlusive teknikker (jfr. Accession nr. 31888 (prov A358) Central
- 15 Patents Index Section B, Farmdoc, Derwent Publications Ltd. London 1968).

- Ifølge opfindelsen løses de ovennævnte problemer ved anvendelse af en lap, der er i det væsentlige uigennemtrængelig over for fugtighed og vand, og på hvilken teststoffet inkorporeres i en bærer, der be-
- 20 står af en tynd bøjelig film, hvori teststoffet er ensartet fordelt. Denne lap benævnes i det følgende "filmbærer". Udtrykket "bøjelig" betegner, at filmen ikke er så sprød, at den revner, når den anvendes i TRUE-testen. På det tidspunkt, hvor den skal anvendes, skal filmen være tilstrækkeligt tør og hydrofil til at være i stand til at
- 25 absorbere ekskretionsprodukter fra huden, medens den påføres på huden under occlusive betingelser.

- For retteligt at blive anset for en "film" bør et lag have en tykkelse på under 0,25 mm (jfr. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology, Plastics, Resins, Rubbers, Fibers*, bind 6, John Wiley & Sons
- 30 Inc., USA, 1967, s. 764. I en foretrukken udførelsesform for opfindelsen anvendes film med en tykkelse på under 0,25 mm, fortrinsvis under ca. 0,1 mm, fx under ca. 0,05 mm. Disse tykkelsesværdier henviser til filmen, før den påføres på huden, dvs. før det trin, hvor den har absorberet noget fra huden. Filmområdet på hver lap,

kan være underinddelt i delområder, selv om filmområdet fortrinsvis er sammenhængende over det hele.

Teststoffer.

- Opfindelsen er først og fremmest anvendelig til detektion af kontakt-
- 5 allergier og teststofferne vælges derfor hovedsagelig blandt sådanne allergener, der forårsager eller mistænkes for at forårsage allergier. Potentielt kan enhver form for kontaktallergener anvendes ifølge opfindelsen, uanset om de skal klassificeres som faste eller flydende stoffer, organiske eller uorganiske stoffer, metalsalte eller ikke-
- 10 metalsalte, opløselige eller uopløselige (i fx vand).

- For at lette arbejdet med lap-testning er de mest almindelige allergener i forskellige geografiske områder blevet udvalgt for hvert respektivt område. Således findes der for Nordamerika en standard "bakke" (liste), der er udarbejdet i 1984 af American Academy of
- 15 Dermatology, og som består af følgende: benzocain (5% i vaseline), imidazolidinylurea (2% i vand), thiuramblanding (1% i vaseline), kanelalkohol (5% i vaseline), dibucain (1% i vaseline), mercaptobenzothiazol (1% i vaseline), neomycinsulfat (20% i vaseline), p-phenylendiamin (1% i vaseline), tetracain (1% i vaseline), p-tert.butylphenol-formaldehyd-
- 20 harpiks (1% i vaseline), thiomersal (0,1% i vaseline), formaldehyd (2% i vand), hydroxycitronellal (4% i vaseline), carbablanding (3% i vaseline), kanelaldehyd (2% i vaseline), harpiks (colophonium) (20% i vaseline), PPD-blanding (sort gummiblanding) (0,6% i vaseline), uld (lanolin)-alkoholer (30% i vaseline), cyclomethycain (1% i vaseline),
- 25 eugenol (4% i vaseline), quaternium-15 (2% i vaseline), isoeugenol (4% i vaseline), mercaptblanding (1% i vaseline), epoxyharpiks (1% i vaseline), kaliumdichromat (0,5% i vaseline), cainblanding undtagen benzocain (3% i vaseline), ethylendiamin-dihydrochlorid (1% i vaseline), benzoylperoxid (1% i vaseline), perubalsam (25% i vaseline),
- 30 quaternium-15 (2% i vand), fyrrelav (mousse de chene) (5% i vaseline), nikkelsulfat (2,5% i vaseline). I Europa omfattede den anbefalede bakke i 1984 følgende liste (for nemheds skyld er koncentrationer og bærere udeladt her): neomycinsulfat, kaliumdichromat, uldalkoholer, mercaptblanding, benzocain, nikkelsulfat, epoxyharpikser, ethylendia-

- min-dihydrochlorid, cobaltchlorid, perubalsam, thiuram-blanding, parabener (blanding), p-phenylendiamin-dihydrochlorid, colophonium, quinolin-blanding, sort gummiblanding, p-tert.butylphenol-formaldehydharpiks, carba-blanding, duftblanding, quaternium-15, primin, 5 formaldehyd. Der findes også standardbakker for kontaktdermatitis-tilstande på forskellige dele af kroppen, fx på underbenet: neomycin-sulfat, quinoform, benzocain, uldalkoholer, perubalsam, chlorquinaldol, parabener (blanding), vandfrit eucerin og colophonium.

- Disse såkaldte "standardallergener" anvendes på de fleste patienter. 10 Ofte henvises der også til patientens kliniske historie til bestemmelse af, hvilke yderligere allergener, der skal inkorporeres i netop hans eller hendes testserie. Der er yderligere ca. 2000 kendte allergener, der kan tænkes at være af interesse for lap-testmetoden.

- Teststoffet inkorporeres i en homogen bøjelig fast fase, hvori teststoffet eventuelt foreligger i mikropartikulær form. Partikelstørrelsen i 15 filmlaget er mindre end 100 μm , fx mindre end 50 μm . I retvinkel i forhold til filmpplanet kan partikelstørrelsen være mindre end 10 μm , fx mindre end 5 μm .

Bærer

- 20 Bæreren vælges blandt stoffer med filmdannende egenskaber. Det er sædvanligvis en polymer, der sammen med en flygtig væske som fx vand giver en gel eller sammenløbende emulsion, hvori det valgte teststof kan være homogent fordelt i en opløst, krystalliseret, mikroniseret, emulgeret eller dispers tilstand; i de fleste praktiske udførelsesformer for opfindelsen vælges denne polymer således, at gelen 25 eller emulsionen deraf kan tørre til dannelse af en film, når den spredes ud. Bæreren skal have hydrofile egenskaber, således at den absorberer fugtighed under brug. Bæreren bør derfor bestå af mindst én hydrofil film-dannende polymer.
- 30 Oplysninger vedrørende forskellige egenskaber, der afslører en bærers hydrofile egenskaber, er tilgængelige fra håndbøger og fra fabrikanter, jfr. fx *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*,

Plastics, Rubbers, Resins, Fibers, John Wiley & Sons Inc., bind 6, 1962, s. 778-779. Egnede polymerer findes blandt sådanne, som har en vandadsorptionsværdi (24 timer), der overstiger 0,5% og fortrinsvis overstiger 1% (målt i henhold til ASTM D 570.63, American Standard Type Methods). De filmdannende polymerer, der påtænkes anvendt ifølge den foreliggende opfindelse, er således fortrinsvis valgt blandt sådanne polymerer, som indeholder multiple polære strukturer, fx carboxy- og/eller estergrupper (såsom poly(meth)acrylater), amidgrupper (såsom poly(meth)acrylamider og polyamider), ethergrupper (såsom højere polyethylen- og polypropylenglycoler), fuldstændigt alkylerede polysaccharider (fx fuldstændigt methyleret cellulose, etc.) alkoholgrupper (fx polyvinylalkoholer) eller et hydrofilt filmdannende derivat deraf og polysaccharider såsom stivelse, eventuelt i derivatiseret form såsom hydroxyalkyleret og delvis alkyleret form, fx hydroxypropylcellulose og methylcellulose). Den afgørende faktor for graden af en polymers hydrofilitet er dens indhold af polære grupper. Således har fx polymerer såsom polypropylen, polystyren, etc., en næsten minimal evne til at adsorbere vand, hvorimod polymerer med mange tætsiddende polære strukturer har betydelige adsorptionsværdier og er mere velegnede i nærværende opfindelses sammenhæng (filmdannende polysaccharider, polyvinylalkoholer, etc.). Filmdannende polymerer, der er baseret på naturligt forekommende polymerer (biopolymerer) har som regel tilstrækkelig hydrofilitet.

Det nøjagtige valg af bærer afhænger i hvert tilfælde bl.a. af det anvendte teststof og den anvendte filmbærer. Teststoffet bør være homogent fordeleligt i bæreren. Bæreren og filmbæreren bør være valgt på en sådan måde, at de adhærer til hinanden. Hydrofile teststoffer (fx stoffer, der er opløselige i et polært flygtigt opløsningsmiddel såsom vand, ethanol eller methanol) kræver sædvanligvis bærere, som er i stand til at adsorbere mere vand (mere hydrofile bærere) sammenlignet med de tilfælde, hvor der anvendes hydrofobe teststoffer, der kræver bærere, der ikke alene er hydrofile, men som tillige i en vis grad har lipofile egenskaber. Som hydrofobe teststoffer kan nævnes kultjære, balsamer og mange duftstoffer. Hvis fagfolk tager udgangspunkt i teststoffets kemiske struktur og derefter udfører nogle simple tests, kan de finde den bærer, der er den mest

velegnede i hvert enkelt tilfælde. Det skal bemærkes, at for metalsalte og hydrofile teststoffer har det vist sig at være essentielt at vælge en filmdannende polymer, som er i stand til at danne en film sammen med et polært flygtigt opløsningsmiddel, fortrinsvis vand, ethanol, methanol, etc. eller homogene blandinger deraf. For disse typer teststoffer vælges hensigtsmæssige polymerer blandt filmdannende polysaccharider, fx alkyleret eller hydroxyalkyleret cellulose. En sådan bærer er delvis methyleret cellulose; den har en særdeles god hydrofil/hydrofob balance ud over, at den også har særdeles gode filmdannende egenskaber og ikke irriterer menneskehud. Bæreren kan bestå af en blanding af de ovennævnte polymerer; med andre ord indeholder bæreren mindst én af polymererne. Det kræves imidlertid, at blandingen er i stand til at danne en film, der er kvældbar, når den påføres occlusivt som fx i tilfælde af epicutan testning. Den filmdannende polymer er således fortrinsvis en sådan, der sammen med vand danner en gel.

På indleveringstidspunktet ansås de bedste udførelsesformer for opfindelsen at være dem, som anvendte methyleret og hydroxypropyleret cellulose i henhold til henholdsvis eksempel 2 og 3.

Når der vælges en bærer, er det vigtigt at tage hensyn til, at bæreren skal være farmaceutisk acceptabel, ikke-irriterende på huden og inert over for filmbæreren, og at den ikke i nogen væsentlig grad bør ændre teststoffets allergene og/eller irriterende egenskaber.

En væske siges at være "flygtig", hvis den er i stand til at fordampe ved den temperatur, ved hvilken det anvendte teststof forbliver i filmen uden ødelæggelse af bæreren. Som regel er det muligt at anvende en væske med et relativt højt damptryk ved stuetemperatur.

Filmbærer

Filmbæreren kan være i det væsentlige uigennemtrængeligt over for fugtighed og vand, men dette er ikke en absolut nødvendighed. Filmbæreren bør ikke indeholde noget stof, der kan forårsage hudirritation. Forskellige materialer, der egner sig i nærværende opfindelses

sammenhæng, markedsføres af flere firmaer såsom fx plastpapir (Reynolds plastovertrukne frysepapir, Reynolds Metal Co., Richmond, Virginia), Saran® "skinnende" papir, Saran® "mat" papir (Dow Chemical Co., Midland, Michigan), hydrofobe plastfilme (fx polyester (Mylar®)) og aluminiumfolie. Valget af filmbæreremateriale er ikke på
5 nogen måde kritisk for opfindelsen; ved simpelthen at følge de almindelige retningslinjer, der er angivet ovenfor, vil fagfolk være i stand til at afgøre, hvorvidt et givet materiale egner sig til det påtænkte formål eller ikke. Hvis der vælges en fugtpermeabel filmbærer, er det
10 vigtigt, at der tages forholdsregler til at muliggøre påføring under occlusion.

Fremstilling af testlappen

Der er to vigtige trin i fremstillingsprocessen, som har stor vigtighed for det vundne resultat:

- 15 1) Testallergenet skal fordeles ensartet i det filmdannende materiale.
- 2) Filmbæreren skal belægges reproducerbart med en film af jævn tykkelse. Hvis der anvendes en hydrofil bærer til påføring på en filmbærer, der har en for hydrofob karakter, kan det vise sig at være vanskeligt at belægge filmbæreren ensartet med bæreren. I dette
20 tilfælde kan filmbæreren behandles således, at den gøres mere hydrofil. En polyesterfilm kan således fx behandles i et kort tidsrum i et elektrisk felt (fx corona-udladningsbehandling) eller en polyethylenfilm kan delvis oxideres til indføring af polære strukturer.

- Ifølge den for tiden bedst kendte metode til fremstilling af filmen sæt-
25 tes teststoffet til en filmdannende polymer (bærer), der er opløst eller geleret i en flygtig væske. Hvis teststoffet er opløseligt i væsken, kan det sættes direkte til den blanding, der indeholder polymeren. Hvis det er uopløseligt, kan det dispergeres eller emulgeres homogent i findelt tilstand i blandingen. Alternativt kan teststoffet i
30 begge tilfælde fordispergeres i en lille mængde af en flygtig væske, der er blandbar med den væske, som er til stede i gelen. Filmbæreren belægges derefter med et ensartet lag af gelen, der derefter lades tørre, hvorefter dette materiale kan skæres i et hensigtsmæssigt antal

lapper, idet disse fortrinsvis har ens form og størrelse (areal). Det kan være en fordel at udforme de belagte lapper med en skrå eller afrundet kant på deres filmside. Den tørrede film kan have en tykkelse på fx 0,2, 0,1, 0,05 eller 0,01 mm afhængig af typen af belægningsgelen. Lappernes areal kan andrage 0,2-4 cm². Mængden af teststoffet i filmen pr. enhedsareal varierer i henhold til typen af allergen. Nogle allergener er stærkere end andre; derfor må fagfolk udføre visse forsøg-fejl-eksperimenter for at finde den hensigtsmæssige effektive mængde pr. enhedsareal. I TRUE-testen kan der angives generelle retningslinjer for værdier ud fra værdier, der tidligere empirisk har vist sig at være egnede til occlusionsteknik, selv om det her skal huskes, at den nødvendige mængde pr. enhedsareal i nærværende opfindelses sammenhæng kan forventes at være lavere end de mængder, der kræves til occlusionsteknikarbejde, fordi biotilgængeligheden er forbedret. Udtrykket "effektiv mængde pr. enhedsareal" betegner den mængde teststof, der ved anvendelse i testen, forårsager en allergisk reaktion hos de fleste af de sensibiliserede eller normale individer. Som regel er mængden af teststof mindre end 10 mg/cm², fx mindre end 1 mg/cm². I tilfælde af nikkel, er den effektive mængde 0,5 µmol/cm². (TRUE-test, bærer: methylcellulose). I nogle tilfælde kan det være ønskeligt at bestemme såkaldte tærskelværdier for en patient. Til dette formål fremstilles lapper, der bærer forskellige mængder pr. enhedsareal af det samme antigen.

Derefter anbringes lapperne på et trykfølsomt adhæsivt arkmateriale, der efterlader en margin på mindst ca. 5 mm, fortrinsvis mindst ca. 1 cm omkring hver lap (den filmbelagte side af hver lap anbringes således, at den vender væk fra det adhæsive arkmateriale). Lapperne anbringes med en indbyrdes afstand på mindre end 10 cm. Deres form er ikke kritisk i nærværende opfindelses sammenhæng. Således er det i princippet muligt at anvende strimler, der er ækvivalente med andre typer lapformer.

Det adhæsive materiale kan være permeabelt over for fugtighed, hvis filmbæreren er impermeabel, og bør være af en sådan art, at det nænsomt former sig efter huden.

- For at lette testproceduren er det muligt forinden at arrangere flere lapper på et fælles stykke af det adhæsive materiale, idet de individuelle lapper hver især er forsynet med forskellige allergener og/eller med det samme allergen i forskellige mængder pr. enhedsareal. Med
- 5 dette forarrangement af lapperne fås en teststrimmel, hvormed patienten vil blive testet samtidigt mod flere allergener og/eller mod forskellige mængder af det samme allergen pr. enhedsareal. Sådanne strimler kan omfatte lapper, der svarer til en standardbakke; hver strimmel kan indeholde op til 25, fortrinsvis op til 12 lapper.
- 10 En teststrimmel ifølge opfindelsen består således af en strimmel af et adhæsivt materiale ("selvklæbende", trykfølsomt adhæsivt materiale), der på sin klæbeflade har mindst ét areal (= lap), der er belagt med en film, i hvilken der er inkorporeret et teststof. Strimlen kan være dækket med et beskyttelsesark, der fjernes umiddelbart før brug.
- 15 Til transport og salg kan strimlen med sit beskyttelsesark være pakket således, at den er hermetisk forseglet mod indtrængen af luft, fugtighed og lys, om ønsket i en inært atmosfære såsom nitrogenatmosfære.

Testprocedure

- 20 Denne procedure udføres på i og for sig kendt måde, men under anvendelse af lapper ifølge den foreliggende opfindelse. Således anbringes én eller flere TRUE-teststrimler (lapper, der er anbragt på adhæsivt materiale som beskrevet ovenfor) på patientens hud på en sådan måde, at filmen kommer i kontakt med huden i testområdet,
- 25 hvorefter strimlen forsegleligt presses mod huden i fastgjort stilling.

Opfindelsen belyses nærmere ved nedenstående ikke-begrænsende eksempler.

EKSEMPEL 1

- Som et indledende forsøg blev et modelstof (methylenblåt) inkorporeret i forskellige filmdannende bærere baseret på cellulose og polyethylenglycol, hvorefter disse blev anbragt på filmbærere og anvendt
- 30

ifølge opfindelsen. De således vundne filmaftryk afslørede en ensartet fordeling af modelstoffet, hvilket viste, at bærerne sammen med hensigtsmæssige filmbærere og hensigtsmæssige teststoffer kan anvendes til udøvelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen. Methylcel-
5 lulose viste sig at have langt de bedste filmdannende egenskaber; yderligere forsøg blev derfor udført med dette cellulosederivat.

EKSEMPEL 2

Testmateriale

Cobaltchlorid 1%, nikkelsulfat 5%, kaliumdichromat 0,5% i vaseline
10 (Hermal-Chemie, Reinbek b. Hamburg, Vesttyskland).

Finn Chambers® (Epicon Oy, Finland) på Scanpor®.

Scanpor® (Norgesplaster A/S, Norge).

Kemikalier:

Cobaltchlorid *pro analysi*, nikkelchlorid *pro analysi*, nikkelsulfat *pro*
15 *analysi*, kaliumdichromat *pro analysi*, natriumhydroxid *pro analysi*, krystallinsk dimethylglyoxim (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA).

Methocel® A4M (methylcellulose) methyleringsgrad 27-31%/glucoseen-
hed; Dow Chemical Co., Midland, Mich., USA).

Hvid vaseline (Hermal-Chemie, Reinbek b. Hamburg, Vesttyskland).

20 Plastfolie og plastbelagt papir (filmbærere):

Reynolds plastbelagte frysepapir (Reynolds Metal Co., Richmond, Vir-
ginia, USA).

Polyester 0,03 mm (Mylar®).

Saran® skinnende 35 CIS/10 SARAN/15 PE, og mat 45 papir/15 PE (Dow Chemical Co., Midland, Mich., USA).

Seks frivillige forsøgspersoner, der var overfølsomme over for nikkel.

Fremstilling af testmateriale

- 5 Methocel®-gel (3% vægt/volumen) blev fremstillet ved varmtvandsmetoden (Methocel® blev rørt op i kogende vand; den resulterende blanding danner en gel ved afkøling). Metalsalte - krystallinske eller opløst i vand - blev inkorporeret i gelen. Vand sættes til en Methocel®-slutkoncentration på 2,4% vægt/volumen. Herefter blev gelerne
- 10 grundigt omrørt med en magnetomrører, indtil saltene var homogent dispergeret og opløst. Før gelerne blev påført, blev de centrifugeret, således at de var fri for luftbobler.

Disse geler blev fremstillet med følgende metalsaltkoncentrationer:

- Fortyndingstrin (mol/liter) 0,8, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025, 0,013,
- 15 0,0063, 0,0031, 0,0016, 0,00078, 0,00039, 0,00020, 0,00010 og 0,000049.

- NiCl₂: 0,8-0,000049
NiSO₄: 0,2-0,000049
CoCl₂: 0,2-0,0031
- 20 K₂Cr₂O₇: 0,1-0,0031

- Gelerne blev derefter bredt ud som et lag med ensartet tykkelse (ca. 0,1 mm) på filmbærere, der var blevet rensset med ethanol. Gellaget lodes tørre ved stuetemperatur (hvilket gav en filmtykkelse på ca. 0,01 mm), og blev derefter skåret op i firkantede lapper ved hjælp af
- 25 en skarp kniv.

Til sammenligningsformål blev der fremstillet en fortyndingsserie af nikkelsulfat ved, at et standardlaptestmateriale blev blandet med vase-line i 12 fortyndingstrin (5%, 2,5%, 1,3%, etc.) ned til 0,0025% som det 12. trin).

Nikkelanalyse

- Lapper (1,0 x 1,0 cm), der bar film med 0,1M nikkelsulfatgelen for de ovennævnte forskellige filmbærere blev analyseret i serier på 10. De blev anbragt i 8 ml deioniseret vand og sonikeret i 1 minut før
- 5 tilsætning af 12 ml indikatoropløsning. Lige dele 1,0N natriumhydroxid i deioniseret vand og 1% dimethylglyoxim i ethanol. Prøverne blev aflæst 4 timer senere i et spektrofotometer ved 470 nm.

Lap-testmetode

- Testmaterialer med vaseline/nikkelsulfat og lapper som beskrevet
- 10 ovenfor blev anbragt på den øverste del af ryggen på hvert individ, hvilket blev gjort ved hjælp af Finn Chambers® på Scanpor®-tape eller ved hjælp af Scanpor®-tape alene og forblev fastgjort i 48 timer. Aflæsninger blev foretaget ved 48 og 72 timer.

Resultater

15 Nikkelanalyser

Mængden af nikkel i fire forskellige testpapirer 1,0 x 1,0 cm med 0,1M nikkelsulfatgel og i 9-16 mg's prøver med 5% nikkelsulfat i vaseline

	$\mu\text{mol Ni}$	mg NiSO_4
20		
Polyester Mylar®	0,68±0,06	0,180±0,017
Plastbelagt papir	0,66±0,02	0,174±0,006
Saran® mat	0,73±0,08	0,192±0,021
Saran® skinnende	0,71±0,02	0,186±0,006
25 Nikkelsulfat, 5% i vaseline	2,50±0,61	0,660±0,160

Disse resultater af nikkelanalyserne viser, at testmaterialerne ifølge opfindelsen giver en større dosisnøjagtighed, end man kunne opnå med hidtil kendte teknikker.

Krystaller, der var detekterbare ved undersøgelse under mikroskop, var alle mindre end ca. 90 μm i filmplanet, og alle mindre end ca. 10 μm i det plan, der var vinkelret på filmplanet.

Lap-test

- 5 Hver af de 6 individer, der var overfølsomme over for nikkel (en af dem var også overfølsom over for cobalt) blev lap-testet med fortyndingsserier af nikkelsulfat i vaseline og med lapper ifølge opfindelsen, der indeholdt nikkelsulfat, nikkelchlorid, cobaltchlorid og kaliumdichromat. Lapperne ifølge opfindelsen havde en størrelse på 1 cm^2 .
- 10 Tre personer blev yderligere testet med nikkelsulfat på lapper af polyester og Saran® (begge 1 cm^2). To personer blev testet med 0,7 x 0,7 cm (0,5 cm^2) lapper af nikkelsulfat på plastbelagt papir.

- Testmetoden ifølge opfindelsen medførte større og mere ensartet fordelte testreaktioner end den test, der anvendte Finn Chambers®;
- 15 dette fremgik mest tydeligt i det tilfælde, hvor lapperne indeholdt allergenet i stærkt fortyndet form. Intensiteten af testreaktioner med 5% nikkelsulfat i vaseline svarede sædvanligvis til lapperne ifølge opfindelsen, der indeholdt 0,05M nikkelsulfatgel (0,3 $\mu\text{mol Ni/cm}^2$). 0,7 x 0,7 cm's lapperne havde samme reaktionsintensitet og det samme
- 20 slutpunkt i fortyndingsserier som 1,0 x 1,0 cm's lapperne, men var vanskeligere at bedømme. Reaktionerne i testserierne på polyester og Saran® var identiske med reaktionerne i papir/plastserierne. Den person, der var overfølsom over for cobalt reagerede med lige stor intensitet ved test med 1%'s cobaltchlorid i vaseline og ved test med
- 25 en 0,013 M gel af cobaltchlorid på plastbelagt papir. Fremgangsmåden ifølge opfindelsen med 0,2 og 0,1 M geler af cobaltchlorid og kaliumdichromat medførte irritationsreaktioner, der var lige så intense som de reaktioner, der vandtes med 5-10% af disse salte i vaseline (tests udført på normale personer).

- I løbet af dette tidsrum, hvor TRUE-lapperne lodes forblive fastgjort på testpersonerne, blev der iagttaget kvældning af filmen. Dette forøger film-hudkontakten og letter antageligvis penetrering af test-
- 5 hudens vandige fase, og fedtopløselige stoffer lettere finder vej til hudens lipidfase. Eksemplet viser, at en fast bøjelig film kan anvendes som bærer.

Blandt de andre teststoffer, der blev inkorporeret i Methocel®-filmene og med held bedømt klinisk, kan nævnes følgende:

- 10 Neomycinsulfat, ethylendiamin-hydrochlorid og perubalsam.

EKSEMPEL 3

- Klucel®-geler (hydroxypropyleret cellulose fra Hercules Inc., USA) indeholdende forskellige teststoffer blev fremstillet, påført på film-
- bærere og lodes tørre analogt med eksempel 2. De anvendte opløsnings-
- 15 ningsmidler var varierende blandinger af vand og ethanol, idet ethanol-koncentrationen i hvert tilfælde var tilstrækkeligt til at solubilisere det bestemte teststof, der blev anvendt.

20	Allergentype	Klucel®-koncentration	Opløsningsmiddelkoncentration	Allergenkoncentration
	Duftstofblandinger	5,6%	66% EtOH w/v	53-0,1 mg/cm ³
	Colophonium	5,6%	60% EtOH w/v	200-2,3 mg/cm ³
	p-Phenylendiamin	5,0%	0% EtOH w/v	6,7-0,01 mg/cm ³

- 25 Filmbæreren var en polyesterfilm, der var blev hydrofiliseret ved corona-udladningsbehandling til bedre adhæsion af filmen. Da den tørrede film blev underkastet mikroskopi, kunne der ikke detekteres nogen krystaldannelse. De testresultater, der blev opnået på huden, var lette at aflæse.

Blandt andre teststoffer, der er blevet inkorporeret i Klucel®-film og med held bedømt klinisk, kan nævnes: nikkelsulfat, kaliumdichromat, cain-blanding, perubalsam, ethylendiamin-hydrochlorid, cobaltchlorid, thiuramblanding og epoxyharpikser.

- 5 Af de testede stoffer indeholder perubalsam og duftstofblandinger flygtige bestanddele.

EKSEMPEL 4

- 10 Mikroniseret hydrocortisoneacetat (eksempel på et stof med en overvejende lipofil karakter) opslæmmet i vand (10 vægt/volumenprocent) sættes til Methocel®-gel, der var fremstillet ved varmtvandsmetoden. Gelen blev derefter i form af en film påført på plastbelagt papir (som beskrevet i eksempel 2). Mikroskopiundersøgelse viste, at hydrocortisoneacetatet var ensartet fordelt i filmen.

PATENTKRAV

- 15 1. Teststrimmel med i det mindste én lap, der bærer et kontaktallergiteststof, og som er beregnet til anvendelse til occlusiv epicutan testning til detektion af kontaktallergi,
k e n d e t e g n e t ved, at teststoffet er inkorporeret i en bærer, som er formuleret som en tør film på mindst én af lapperne på strimlen, hvilken bærer som filmdannende stof omfatter en filmdannende
20 polymer, som er i stand til at absorbere fugtighed fra det testede hudområde, når teststrimlen er i brug.
2. Teststrimmel ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at teststrimlen indeholder flere sådanne
25 lapper, der hver især indeholder et forskelligt teststof.
3. Teststrimmel ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at arealet af denne mindst ene lap er i området $0,2-4 \text{ cm}^2$.

4. Teststrimmel ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at filmens tykkelse er under 0,25 mm.
5. Teststrimmel ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at filmens tykkelse er under 0,10 mm.
- 5 6. Teststrimmel ifølge krav 1,
k e n d e t e g n e t ved, at bæreren består af mindst én hydrofil
filmdannende polymer.
7. Teststrimmel ifølge krav 2 eller 6,
k e n d e t e g n e t ved, at den filmdannende polymer på mindst
10 én af antallet af lapper har flere alkoholgrupper eller er et hydrofilt
filmdannende derivat deraf.
8. Teststrimmel ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at kontaktallergiteststoffet på mindst én
af antallet af lapper er metalsalt.
- 15 9. Teststrimmel ifølge krav 2,
k e n d e t e g n e t ved, at den filmdannende polymer på mindst
én af antallet af lapper er valgt blandt methylerede og hydroxypropy-
lerede celluloser og blandinger deraf.
10. Teststrimmel ifølge krav 6,
20 k e n d e t e g n e t ved, at den filmdannende polymer sammen med
vand danner en gel.