



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **233 142 A5**4(51) **C 12 Q 1/40**  
G 01 N 33/577**AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN**

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	AP C 12 Q / 269 782 6	(22)	22.11.84	(44)	19.02.86
(31)	P3342736.4	(32)	23.11.83	(33)	DE

(71) siehe (73)  
 (72) Naujoks, Kurt W., Dr. rer. nat. Biochem., DE; Gerhardt, Willie, Dr. med., SE; Hübner-Parajsz, Christa, Dr. rer. nat., AT; Wulff, Karl, Dr. rer. nat., DE; Jungfer, Herbert, Dr. med., DE; Lenz, Helmut, Dr. rer. nat., DE; Albert, Winfried, Dr. phil., AT; Wahlefeld, August W., Dr. rer. nat., DE  
 (73) Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim/Waldhof, DE

**(54) Hybridoma-Antikörper**

(57) Zur spezifischen Bestimmung von Pankreas- $\alpha$ -Amylase neben Speichel- $\alpha$ -Amylase in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum, Plasma, Duodenalsaft und Urin, durch Umsetzung mit einem System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase wird ein monoklonaler Antikörper für Speichel- $\alpha$ -Amylase mit einer Kreuzreaktion von 5% oder weniger gegenüber Pankreas- $\alpha$ -Amylase zugesetzt.

## **Erfindungsanspruch:**

1. Verfahren zur spezifischen Bestimmung von Pankreas- $\alpha$ -Amylase neben Speichel- $\alpha$ -Amylase in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum, Plasma, Duodenalsaft oder Urin, durch Umsetzung mit einem System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase in Gegenwart eines Hemmstoffes für Speichel- $\alpha$ -Amylase, **gekennzeichnet dadurch**, daß anstelle eines Hemmstoffs ein monoklonaler Antikörper mit einer Kreuzreaktivität von 5% oder weniger gegenüber Pankreas- $\alpha$ -Amylase zugesetzt wird.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß ein monoklonaler Antikörper verwendet wird, der durch Immunisierung von Versuchstieren mit nativer oder modifizierter Speichel- $\alpha$ -Amylase, Fusion von B-Lymphocyten der immunisierten Tiere mit transformierenden Agentien, Klonierung und Kultivierung der so gebildeten Hybridzellen und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus letzteren erhalten wurde.
3. Verfahren nach Punkt 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß als Versuchstiere Ratten oder Mäuse verwendet werden.
4. Verfahren nach Punkt 2 oder 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Immunisierung mit Aluminiumhydroxid und Bordatella pertussis als Adjuvanz durchgeführt wird.
5. Verfahren nach einem der Punkte 2 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß man mit nativer Speichel- $\alpha$ -Amylase immunisiert und die Immunisierung mindestens siebenmal über mindestens 9 Monate hinweg durchführt.
6. Verfahren nach einem der Punkte 2 bis 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß man die Immunisierung mit modifizierter Speichel- $\alpha$ -Amylase vornimmt und mindestens zwei Immunisierungen in vivo, gefolgt von mindestens einer Immunisierung in vitro, bei der B-Lymphocyten in von Thymocyten konditioniertem Medium gezüchtet werden, durchgeführt.
7. Verfahren nach einem der Punkte 2 bis 6, **gekennzeichnet dadurch**, daß als transformierende Agentien Myelomazellen eingesetzt werden.
8. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß man den monoklonalen Antikörper in immobilisierter Form einsetzt.
9. Verfahren nach einem Punkte 1 bis 7, **gekennzeichnet dadurch**, daß man zusätzlich ein präzipitierendes Agens zugibt und den gebildeten unlöslichen Komplex aus Speichel- $\alpha$ -Amylase, monoklonalem Antikörper und Anti-Antikörper von der Lösung abtrennt.
10. Verfahren nach Punkt 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß man als präzipitierendes Agens einen Antikörper (Anti-Antikörper) für den monoklonalen Antikörper oder für die von den Versuchstieren gebildeten Antikörpern zugibt.
11. Verfahren nach Punkt 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß man als präzipitierendes Agens Protein A zugibt.
12. Verfahren nach Punkt 9, 10 und 11, **gekennzeichnet dadurch**, daß man einen vorgebildeten Komplex aus monoklonalem Antikörper und Anti-Antikörper zusetzt.
13. Verfahren nach Punkt 9, **gekennzeichnet dadurch**, daß man zuerst den monoklonalen Antikörper zusetzt, inkubiert und dann den Komplex durch Zusatz des Anti-Antikörpers unlöslich macht.
14. Verfahren nach einem der Punkte 9 bis 13, **gekennzeichnet dadurch**, daß man Anti-Antikörper vom Schaf verwendet.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Punkte, **gekennzeichnet dadurch**, daß als System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase eine Maltopolyose mit 4 bis 7 Glucoseresten, Maltosephosphorylase,  $\beta$ -Phosphoglucomutase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase und NAD verwendet wird.
16. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß als System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase Nitrophenylmaltopolyose mit 4 bis 7 Glucoseeinheiten im Molekül zusammen mit  $\alpha$ -Glucosidase verwendet wird.
17. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 14, **gekennzeichnet dadurch**, daß als System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase Stärke, die mit bestimmaren Gruppen modifiziert ist, verwendet wird.
18. Reagenz zur spezifischen Bestimmung von Pankreas- $\alpha$ -Amylase neben Speichel- $\alpha$ -Amylase in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum, Duodenalsaft, Plasma oder Urin, enthaltend ein System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase und einen Hemmstoff für Speichel- $\alpha$ -Amylase, **gekennzeichnet dadurch**, daß es anstelle eines Hemmstoffes einen monoklonalen Antikörper mit einer Kreuzreaktivität von 5% oder weniger gegenüber Pankreas- $\alpha$ -Amylase enthält.
19. Reagenz nach Punkt 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß es als System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase eine Maltopolyose mit 4 bis 7 Glucoseresten, Maltosephosphorylase,  $\beta$ -Phosphoglucomutase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase und NAD enthält.
20. Reagenz nach Punkt 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß es als System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase eine Nitrophenylmaltopolyose mit 4 bis 7 Glucoseeinheiten und  $\alpha$ -Glucosidase enthält.
21. Reagenz nach Punkt 18, **gekennzeichnet dadurch**, daß es als System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase eine mit bestimmaren Gruppen modifizierte Stärke enthält.

## **Anwendungsgebiet der Erfindung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur spezifischen Bestimmung von Pankreas- $\alpha$ -Amylase neben Speichel- $\alpha$ -Amylase sowie ein Reagenz zur Ausführung des Verfahrens.

## **Charakteristik der bekannten technischen Lösungen**

$\alpha$ -Amylase (E.C.3.2.1.1) baut 1,4-d-glucosidisch verknüpfte Oligo- und Polysaccharid überwiegend durch zufällige Hydrolyse der 1,4- $\alpha$ -glycosidischen Bindungen zu Maltose und Malto-oligosacchariden ab. Das Enzym hat neben der industriellen Fermentationstechnik erhebliche Bedeutung im Rahmen der klinischen Analytik und Diagnostik. Bei zahlreichen Erkrankungen verändert sich nämlich der  $\alpha$ -Amylasegehalt in den Körperflüssigkeiten wie Serum, Harn oder Duodenalsekret beträchtlich. Im Körper kommen jedoch im wesentlichen zwei  $\alpha$ -Amylaseenzyme vor, das Pankreasenzym und das Speichelenzym. Da diagnostische Bedeutung nur dem Pankreasenzym zukommt, stellt sich die Aufgabe, diese beiden (neben selten und nur in geringer Menge auftretenden weiteren Isoenzymen)  $\alpha$ -Amylasen analytisch zu differenzieren. Die Schwierigkeit besteht hierbei darin, daß die beiden multiplen Formen ähnlichen Aufbau besitzen und immunologisch identisch sind (K. Lorentz, Laboratoriumsblätter 32:118 [1982]). Zur Eliminierung der Aktivität des Speichelenzyms ist es bekannt, Adsorption an Anionenaustauscher, Hemmung durch ein Weizenprotein oder Elektrophorese bzw. Elektrofokussierung anzuwenden. Diese Verfahren sind jedoch entweder in ihrer Trennwirkung unbefriedigend oder für eine Routinediagnostik zu aufwendig. Unter den genannten Methoden ist allein das in Clin. Chem. 28/7, 1525–1527 (1982) beschriebene Verfahren der Hemmung des Enzyms vom Speicheltyp durch einen aus Weizenkeimen gewonnenen Inhibitor mit einem für die Routinediagnose akzeptablen

itaufwand verbunden, jedoch ist die Selektivität unbefriedigend. Auch bei der optimalen Inhibitorkonzentration bleiben etwa % der Aktivität des Speicheltyp-Enzyms erhalten, während die Aktivität des Pankreasenzym auf etwa 81% verringert wird.

#### ! der Erfindung

ist das Ziel der Erfindung, diesen Nachteil zu beseitigen und ein Verfahren und ein Reagenz zur Verfügung zu stellen, welches rasche, einfache und zuverlässige Bestimmung der Pankreas- $\alpha$ -Amylase neben der  $\alpha$ -Amylase vom Speicheltyp in Körperflüssigkeiten ermöglicht.

#### ! rlegung des Wesens der Erfindung

! r Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Hemmstoff für Speichel- $\alpha$ -Amylase durch ein besser geeignetes Agens zu ersetzen.

! löst wird diese Aufgabe erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur spezifischen Bestimmung von Pankreas- $\alpha$ -Amylase neben Speichel- $\alpha$ -Amylase in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum, Duodenalsaft oder Urin, durch Umsetzung mit einem System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase in Gegenwart eines Hemmstoffes für Speichel- $\alpha$ -Amylase, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß anstelle eines Hemmstoffes ein monoklonaler Antikörper mit einer Kreuzreaktivität von 5% oder weniger gegenüber Pankreas- $\alpha$ -Amylase zugesetzt wird.

! s erfindungsgemäße Verfahren beruht auf sehr überraschender Auffindung eines monoklonalen Antikörpers mit sehr geringer Kreuzreaktivität gegenüber dem Pankreasenzym. Dies war nicht zu erwarten, da es bekannt war, daß das Speichel- und Pankreasenzym immunologisch identisch sind (Gerhard Pfeleiderer, Lab. Me 7, 189-193; K. Lorentz loc. cit.). So gibt Morton Schwarz in „Immunoassay of Enzymes — an Overview“ (1983), Seite 4 bis 9, z. B. an, daß Antikörper gegen humane Speichel-Amylase das Enzym vom Speicheltyp zu 78%, das Pankreasenzym zu 75% hemmen. Es war daher nicht vorhersehbar, daß es möglich sein würde, ein Verfahren zu entwickeln, welches eine praktisch quantitative Unterscheidung der beiden Enzyme auf immunologischer Basis ermöglichen würde.

! r neue, für das Verfahren der Erfindung verwendete, monoklonale Antikörper, wurde bei NCACC unter den Nummern

! n 79 = NCACC 84 111305  
! n 1a 813e10 = NCACC 84 111304  
! n 1a 814a7 = NCACC 84 111303  
! n 32c516e3 = NCACC 84 111302  
! n 32c518f11 = NCACC 84 111301

! rterlegt (National Collection of Animal Cell Cultures, Porton Down, GB).

! läßt sich erfindungsgemäß erhalten durch Immunisierung von Versuchstieren mit nativer oder modifizierter Speichel- $\alpha$ -Amylase, Fusion von B-Lymphocyten der so erhaltenen immunisierten Tiere mit transformierenden Agenzien, Klonierung und Kultivierung der so gebildeten Hybridzellen, welche den monoklonalen Antikörper produzieren und Isolierung des letzteren.

! sonders geeignete Tiere für die Herstellung der Speichel- $\alpha$ -Amylase-Antikörper sind Ratten und Mäuse.

! e Immunisierung erfolgt entweder mit nativer humaner Speichel- $\alpha$ -Amylase oder mit modifizierter Speichel-Amylase.

! rwendet man natives Enzym, so eignen sich hierzu die handelsüblichen, elektroforetisch homogenen Präparate. Chemisch modifizierte Speichel- $\alpha$ -Amylase läßt sich ebenfalls nach bekannten Methoden der Enzymmodifikation erhalten, wie sie z. B. in DE-AS 25 43 994 näher beschrieben sind. Geeignete Modifizierungsmittel sind beispielsweise N-Bromsuccinimid (NBS) oder Oxydation von Tryptophangruppen am Protein (BBA 143 [1967] 462-472), Carboxymethylierung mit Jodacetat (IAA), die hauptsächlich am Histidin angreift bzw. Nitrierung mit Tetranitromethan (J. Biol. Chem. 238 [1963] 3307), Diazotierung mit azotierter Sulfanilsäure (Meth. Enzymol. 25 [1972] 515-531) sowie Umsetzung mit Dinitrofluorbenzol (DNFB) (J. Biol. Chem. 243 [1968] 5344 bis 253). Am besten geeignet erwies sich dabei, abgesehen vom nativen Enzym, das mit DNFB modifizierte Enzym. Die Immunisierung erfolgt durch übliche Verabreichung des nativen oder modifizierten Enzyms, vorzugsweise in Kombination mit Adjuvanz. Bevorzugt wird als Adjuvanz Aluminiumhydroxid zusammen mit Bordatella pertussis.

! rd für die Immunisierung native Speichel- $\alpha$ -Amylase verwendet, so erfolgt die Immunisierung vorzugsweise über mindestens Monate mit mindestens 7 Immunisierungen (Injektionen i. P.). Verwendet man modifizierte Speichel- $\alpha$ -Amylase, so erwies es sich als zweckmäßig, einen Teil der Immunisierungen in vitro durchzuführen. Jedoch sollen mindestens zwei Immunisierungen in vivo erfolgen, ehe die in vitro Immunisierung vorgenommen wird. Bei letzterer werden B-Lymphocyten der immunisierten Tiere in einem mit Thymocyten konditionierten Medium weitergezüchtet und dem Medium Antigen zugesetzt.

! ach erfolgter Immunisierung werden die B-Lymphocyten der immunisierten Tiere nach üblichen Methoden mit transformierenden Agenzien fusioniert. Beispiele für transformierende Agenzien, die im Rahmen der Erfindung verwendet werden können, sind Myelomazellen, transformierende Viren wie z. B. Epstein-Barr-Virus oder die in der DE-OS 32 45 66 beschriebenen Agenzien. Die Fusionierung erfolgt nach dem bekannten Verfahren von Köhler und Milstein (Nature 256 [1975] 495-497). Die hierbei gebildeten Hybridzellen werden in üblicher Weise kloniert, z. B. unter Verwendung eines handelsüblichen Selektionsmediums, und die erhaltenen Klone, welche den gewünschten monoklonalen Antikörper bilden, gezüchtet. Aufgrund des langsamen Wachstums der Hybridzellen lassen sich diese auf unbestimmte Zeit weiterkultivieren und produzieren den gewünschten monoklonalen Antikörper in beliebiger Menge. Mit den so erhaltenen monoklonalen Antikörpern kann die Speichel- $\alpha$ -Amylase aus Körperflüssigkeiten quantitativ absorbiert werden, so daß die verbleibende Amylaseaktivität der Pankreas- $\alpha$ -Amylase zuzuordnen ist.

! r das erfindungsgemäße Bestimmungsverfahren können die monoklonalen Antikörper als solche oder ihre entsprechende immunologische Eigenschaften aufweisenden Fragmente ( $F_c$ -Fragmente) verwendet werden. Unter dem Begriff „monoklonaler Antikörper“ werden hier daher auch die Fragmente verstanden. Sowohl der komplette Antikörper als auch seine Fragmente können in immobilisierter Form verwendet werden.

! er erfindungsgemäß verwendete monoklonale Antikörper weist überraschenderweise gegenüber der Pankreas- $\alpha$ -Amylase eine Kreuzreaktivität von 5% oder weniger auf und erreicht in vielen Fällen eine Kreuzreaktivität von nur noch 1%. Er eignet sich daher anstelle des bisher bekannten, aus Weizenkeimen gewonnenen Hemmstoffes zur spezifischen Bestimmung der Pankreas-Amylase in Körperflüssigkeiten.

! e Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase als solche erfolgt nach den hierfür bekannten Methoden. Da der erfindungsgemäße monoklonale Antikörper selektiv die  $\alpha$ -Amylase vom Speicheltyp bindet und sie so der Enzymaktivitätsbestimmung entzieht,

entsprechen die bei der  $\alpha$ -Amylase-Bestimmung in Gegenwart des monoklonalen Antikörpers erhaltenen Werte der dem Pankreasenzym alleine zukommenden Aktivität.

Bevorzugt wird das erfindungsgemäße Verfahren mit einem System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase durchgeführt, welches eine Maltopolyose mit 4 bis 7 Glucoseresten im Molekül, Maltosephosphorylase,  $\beta$ -Phosphoglucomutase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase und NAD enthält.

Ein weiteres, im Rahmen der Erfindung bevorzugt verwendetes System zum Nachweis der  $\alpha$ -Amylase besteht aus Nitrophenylmaltopolyose mit 4 bis 7 Glucoseresten im Molekül und  $\alpha$ -Glucosidase.

Ein weiteres bevorzugtes Nachweissystem für  $\alpha$ -Amylase besteht aus mit bestimmbar Gruppen modifizierter Stärke. Der Begriff modifizierte Stärke umfaßt beispielsweise Stärke, die mit bestimmbar Gruppen modifiziert ist, z. B. das als „Phadebas“ handelsübliche Produkt sowie das in der DE-OS 28 12 154 beschriebene Produkt sowie im Abbauverhalten veränderte Stärke, beispielsweise Carboxymethylstärke und Grenzdextrine. Alle diese Systeme sind bekannt und bedürfen daher hier keiner näheren Beschreibung.

Für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die Probenflüssigkeit mit dem erfindungsgemäßen Antikörper zweckmäßig in Form einer Suspension versetzt und dann das Unlösliche abgetrennt, vorzugsweise durch kurzes Zentrifugieren. Der klare Überstand wird dann im üblichen  $\alpha$ -Amylasetest eingesetzt.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Reagenz kann der monoklonale Antikörper, sowohl in kompletter Form als auch in Form der Fragmente, auch auf einem festen Träger fixiert vorliegen, beispielsweise auf immunosorptivem Papier oder der Oberfläche von Kunststoffröhrchen bzw. -schläuchen. Auf diese Weise wird die  $\alpha$ -Amylase vom Speicheltyp an den Träger, also die feste Phase, gebunden und in der flüssigen Phase kann daher ohne weitere Trennung die Bestimmung der Restaktivität, welche auf das Pankreasenzym zurückzuführen ist, durchgeführt werden.

Besonders gute Ergebnisse werden im Rahmen der Erfindung erhalten, wenn ein monoklonales Antikörperpräparat verwendet wird, welches aus den monoklonalen Antikörpern, die durch mehrere verschiedene Klone produziert werden, gemischt ist.

Da der aus dem monoklonalen Antikörper und seinem Antigen, der Speichel- $\alpha$ -Amylase, gebildete Komplex löslich ist, falls der monoklonale Antikörper nicht in immobilisierter Form verwendet wird, besteht eine weitere Möglichkeit zu seiner Abtrennung darin, zusätzlich ein präzipitierendes Agens für den monoklonalen Antikörper oder für die von den Versuchstieren bei der Immunisierung gebildeten Antikörpern zuzusetzen. Hierbei bildet sich ein unlöslicher Komplex, der Speichel- $\alpha$ -Amylase, monoklonalen Antikörper und präzipitierendes Agens enthält.

Als präzipitierendes Agens wird vorzugsweise ein Antikörper gegen den monoklonalen Antikörper oder für die von den Versuchstieren bei der Immunisierung gebildeten Antikörper (also ein Anti-Antikörper) verwendet. Eine andere Möglichkeit besteht in der Zugabe von Protein A, vorzugsweise in immobilisierter Form.

Eine zweckmäßige Methode, diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zu praktizieren, besteht darin, zuerst einen Komplex aus monoklonalem Antikörper und Anti-Antikörper zu bilden und diesen dann der zu untersuchenden Lösung zuzusetzen, welche die  $\alpha$ -Amylasen enthält. Alternativ kann man jedoch zuerst nur den monoklonalen Antikörper zusetzen und, nach Inkubation zur Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes mit der Speichel- $\alpha$ -Amylase, dann den Anti-Antikörper zusetzen unter Bildung des unlöslichen Komplexes.

Für die Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens unter Verwendung eines Anti-Antikörpers eignen sich prinzipiell alle gegen den monoklonalen Antikörper bzw. den von den Versuchstieren gebildeten Antikörper gerichteten Anti-Antikörper. Bevorzugt verwendet man bei Verwendung von Mäusen oder Ratten für die Erzeugung des Anti-Speichel- $\alpha$ -Amylase-Serums vom Schaf gebildete Anti-Antikörper.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur spezifischen Bestimmung von Pankreas- $\alpha$ -Amylase neben Speichel- $\alpha$ -Amylase in Körperflüssigkeiten, insbesondere in Serum, Duodenalsaft, Plasma oder Urin, enthaltend ein System zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase und einen Hemmstoff für Speichel- $\alpha$ -Amylase, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es anstelle eines Hemmstoffs einen monoklonalen Antikörper mit einer Kreuzreaktivität von 5% oder weniger gegenüber Pankreas- $\alpha$ -Amylase enthält.

Hinsichtlich des im erfindungsgemäßen Reagenz enthaltenen Systems zum Nachweis von  $\alpha$ -Amylase und der übrigen Bedingungen gelten die obigen Ausführungen bezüglich des Verfahrens entsprechend.

Die Erfindung ermöglicht eine einfache und rasche Bestimmung der Pankreas- $\alpha$ -Amylase neben  $\alpha$ -Amylase vom Speicheltyp in Körperflüssigkeiten mit hoher Spezifität und verbessert damit die Möglichkeiten der klinischen Diagnostik.

#### Ausführungsbeispiel

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter.

##### Beispiel 1

- A) Balb/c-Mäuse werden mit 100  $\mu$ g humaner Speichelamylase in Aluminiumhydroxid mit BORDETELLA PERTUSSIS immunisiert. In ca. achtwöchigem Rhythmus wird mit je 50  $\mu$ g humaner Speichelamylase im gleichen Adjuvant drei- bis viermal weiterimmunisiert. Vier Tage vor Fusion wird die letzte Immunisierung mit 50  $\mu$ g Speichelamylase in physiologischer Kochsalzlösung intravenös durchgeführt.
- B) Die Fusion der Milzzellen mit Ag 8653 (ATCC CRL 1580) oder SP2/0 (ATCC CRL 1581) Myelomzellen wird nach dem Standardverfahren gemäß J. of Imm. Meth. Vol. 39, 285-308 durchgeführt. Das Fusionsverhältnis Milz zu Myelomzellen ist 5:1. Die Fusionsprodukte werden auf 10 24er-Kulturschalen (von Costar) angesät und mit  $5 \times 10^4$  peritoneal-exsudat-Zellen pro Kulturnapf gefüttert. Positive Primärkulturen (siehe Beispiel 3) werden 3 bis 4 Wochen nach Fusion mit Hilfe eines Fluor-eszenz-aktivierten Zellsorters kloniert. Die Zellen werden einzeln in 96er Costar-Platten abgelegt und mit  $2 \times 10^4$  peritoneal-exsudat-Zellen gefüttert.

##### Beispiel 2

Modifizierung der  $\alpha$ -Amylase mit Dinitrofluorbenzol 20  $\mu$ mol Speichelamylase/l und 20mmol Dinitrofluorbenzol/l (gelöst in wenig Ethanol) werden vermischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wird dann 20 Stunden gegen Phosphatpuffer (50mmol/l, pH 6,8) dialysiert (Kühlraum). Das Dialysat zeigt dann im Differenzspektrum eine Extinktionszunahme von 0,070 bei der Wellenlänge 360 nm. Die Lösung wird bis zur Immunisierung eingefroren. Die Proteinkonzentration im Dialysat beträgt 15  $\mu$ mol/l.

Mit der so erhaltenen modifizierten  $\alpha$ -Amylase wurden Mäuse, wie im Beispiel 1 beschrieben, immunisiert. Die mit modifizierter

nylase immunisierten Mäuse sterben alle nach der zweiten Immunisierung. Deshalb werden die Milzzellen dieser Mäuse nach dem ersten Boost in Kultur genommen und nach der Methode von Luben (Molec. Immunology Vol. 17 [1980] 635-639) noch vier Tage „in vitro“ in der Gegenwart von 100 µg Antigen in 30 ml Medium nachimmunisiert. Nach 4 Tagen werden die Zellen wie die im Beispiel 1 erhaltenen Milzzellen fusioniert und weiterbehandelt.

### Beispiel 3

Zur Bestimmung der Konzentration und Spezifität amy-lasebindender Antikörper im Serum immunisierter Mäuse oder im Kulturüberstand der Milzzellen oder in Ascites zu erfassen, wird ein ELISA als Testprinzip verwendet. Dazu werden 96er ELISA-Platten mit Schaf-anti-Maus-Fc-Antikörper beschichtet. Zur Reduktion unspezifischer Bindung wird mit Rinderserum-Albumin (2%ig in physiologischer Kochsalzlösung) nachbeschichtet. Danach wird mit der den Antikörper enthaltenden Probe oder mit verschiedenen Verdünnungen derselben inkubiert.

Darauf folgende Inkubation wird entweder mit Speichelamylase-Peroxidase-(POD)-Konjugat oder mit Pankreasamylase-POD-Konjugat durchgeführt. Die Aktivität der gebundenen POD wird mit ABTS (2,2'-Azinodi-1,3-benzothiazolinsulfonat[6]) (pH 4,4) bestimmt und die Extinktion direkt als Maß für die gebundenen Maus-Antikörper genommen. Zur Bestimmung der Kreuzreaktion wird für jede Probe die Bindung von Speichel- und Pankreasamylase — POD trennt bestimmt und die mit Speichelamylase-POD erhaltene Extinktion als 100% Bindung gesetzt. Die gleichzeitig erhaltene Extinktion mit Pankreas-Amylase-POD ergibt in % der Extinktion der Speichelamylase-POD die Kreuzreaktion der Probe.

Es wurden 4 Klone gefunden, bei welchen überhaupt keine Bindung der Pankreas- $\alpha$ -Amylase-POD erfolgte und 5 Klone mit Kreuzreaktionen zwischen 1,5 und unter 5%. Die nach dem Screening ausgesuchten Klone werden expandiert.

<sup>2</sup>MI-Medium ist beschrieben in J. A. M. A. 199 (1957) 519 und ist handelsüblich.

### Beispiel 4

Immobilisierung des monoklonalen Antikörpers (MAK) durch Schaf-anti-Maus-AK und nachfolgende Bindung der Speichelamylase

Ascites aus Maus

Schaf-anti-Maus-AK (IgGF<sub>1</sub>): 19 g/l

Phosphatpuffer, pH = 7,0; 0,05 mol/l

Phosphatpuffer, pH = 7,0; 0,05 mol/l mit 2% Rinderserumalbumin

Humane Speichelamylase: 1000 U/l ( $\mu$ Mol Substratumsatz/ml/min (37°C) mit 4-Nitrophenyl-maltoheptaosid als Substrat)

Humane Pankreasamylase: 1000 U/l

Essigsäure: 0,5 mol/l

Kaliumhydrogensulfonat-lösung: 2 mol/l

Der MAK aus Ascites wird im Verhältnis 1:100 mit Schaf-anti-Maus Antikörper gemischt. Diese Mischung wird 1:2 mit Phosphatpuffer verdünnt und 15 Minuten bei 37°C geschüttelt. Das entstandene Präzipitat wird zweimal mit Puffer gewaschen und dann in Essigsäure (ungefähr 1/5 des Startvolumens) gelöst. Nach 5 Minuten Schütteln wird im Verhältnis 1:2 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung gegeben. Das Präzipitat entsteht wieder. Dieses wird zweimal mit Phosphatpuffer mit RSA (Rinderserumalbumin) und danach einmal nur mit Puffer gewaschen. Anschließend wird das Präzipitat in 1/5 des Startvolumens mit Puffer suspendiert. 50 µl des Präzipitates werden zu 50 µl Speichel- bzw. Pankreas-Amylase gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird das Präzipitat abzentrifugiert und der Überstand gemäß Beispiel 7 weiterverarbeitet. Als Kontrolle dient eine Amylaseprobe, die anstatt mit Präzipitat mit 50 µl Puffer behandelt wurde.

### Beispiel 5

Immobilisierung des MAK an Speichelamylase und nachfolgende Präzipitation mit Schaf-anti-Maus-Antikörper.

Der Ascites mit monoklonalen Antikörper wird im Verhältnis 1:50 mit Puffer verdünnt. 50 µl dieser Lösung werden mit 50 µl Speichel- bzw. Pankreas-Amylase 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Als Kontrolle dient einerseits eine Mischung aus Ascitesverdünnung mit Puffer (Leerwert des Ascites) und andererseits eine Mischung aus Amylase und Puffer (Kontrolle der Amylaseaktivität). Anschließend werden 50 µl des präzipitierenden Anti-Antikörpers zugegeben. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wird das Präzipitat abzentrifugiert und der Überstand gemäß Beispiel 7 weiterverarbeitet.

### Beispiel 6

Immobilisierung des MAK durch Schaf-anti-Maus-Antikörper und nachfolgende Bindung von humaner Speichelamylase aus einer Mischung von Speichel- und Pankreasamylase.

Entsprechend Beispiel 5 wird eine Mischung aus humaner Pankreas- und Speichelamylase (je 1000 U/l) mit vorbehandeltem Präzipitat inkubiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand entsprechend Beispiel 7 weiterverarbeitet.

### Beispiel 7

Bestimmung der verbleibenden Pankreasamylase.

50 µl Überstand gemäß Beispiel 4 bis 6 werden zu 1 ml handelsüblichem Reagenz zur Bestimmung von  $\alpha$ -Amylase mit 4-Nitrophenylmaltoheptaosid als Substrat gegeben. Die Aktivität des Überstandes wird nach Anleitung bei 37°C bestimmt. Die Restaktivitäten ermitteln sich als Prozent Aktivität, bezogen auf die jeweils mitlaufenden Kontrollen. Die Restaktivität bei Beispiel 4 beträgt mit Speichel-Amylase 0 bis 5% und mit Pankreasamylase 70 bis 95%. Die Versuche gemäß Beispiel 5 ergeben Restaktivitäten mit Speichelamylase von 0 bis 5% und mit Pankreas-Amylase von 80 bis 95%.

Die gleichzeitige Anwesenheit beider Enzyme (Beispiel 6) ermöglicht die selektive Fällung der Speichelamylase, wobei die Pankreasamylase aktiv bleibt und zu 80 bis 95% bestimmt werden kann.