

Verein zur Förderung der Energie-
und Umwelttechnik e.V.

AiF-Mitgliedsvereinigung

100 ZN

AiF-Vorhaben-Nr.

01.04.2003 bis 31.12.2005

Bewilligungszeitraum

Abschlussbericht für den Zeitraum : 01.04.2003 bis 31.12.2005

zu dem aus Haushaltsmitteln des BMWi über die



geförderten Forschungsvorhaben

Forschungsthema :

**Entwicklung eines immunchromatographischen Wischtests zur schnellen vor
Ort Detektion von Zytostatikakontaminationen auf abwischbaren Flächen**

Forschungsstelle 1

Institut für Energie- und Umwelttechnik IUTA e.V.

Duisburg,

Ort, Datum

Unterschrift des Projektleiters
Dr. V. Plegge

Forschungsstelle 2

Hochschule Niederrhein Biotechnologie

Krefeld,

Ort, Datum

Unterschrift des Projektleiters
Prof. Dr.-Ing. A. Nickisch-Hartfiel

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung	7
3	Stand der Forschung	7
3.1	Grundsätzliches	7
3.2	Emissionspfade von Zytostatika	8
3.2.1	Zubereitung in Klinikapotheken	8
3.2.2	Verabreichung auf Stationen	9
3.3	Stand der analytischen Verfahren zum Wischprobenmonitoring	11
3.4	Stand der lateralen Fließtests auf immunchromatographischer Basis	11
4	Problemstellung und prinzipieller Lösungsweg	13
5	Experimente und Ergebnisse	14
5.1	Entwicklung monoklonaler Antikörper (Unterauftrag)	14
5.1.1	A monoclonal antibody having specific binding ability to methotrexate	18
5.1.2	A monoclonal antibody having specific binding ability to 5-fluorouracil	23
5.1.3	A monoclonal antibody having specific binding ability to chlorambucil	28
5.1.4	A monoclonal antibody having specific binding ability to cyclophosphamide	32
5.2	Funktionsnachweis des Detektionsprinzips (Hochschule Niederrhein)	37
5.2.1	Indirekter nicht kompetitiver ELISA zum Nachweis von Methotrexat	37
5.2.1.1	Ermittlung der optimalen Blockierungsbedingungen	38
5.2.1.2	Optimierung der Inkubationsbedingungen des Antigens und des primären Antikörpers	40
5.2.1.3	Ermittlung der optimalen Antigen-Konzentration	41
5.2.1.4	Ermittlung der optimalen primären Antikörper-Konzentration	43
5.2.1.5	Ermittlung des optimalen Anti-MTX-Klons	43
5.2.2	Indirekter kompetitiver ELISA zum Nachweis von Methotrexat	46
5.2.2.1	Vergleich des kompetitiven und nicht kompetitiven ELISAs	47
5.2.2.2	Ermittlung der optimalen MTX-Konzentration	48
5.2.2.3	Ermittlung der optimalen Anti-MTX-Antikörperkonzentration	49

5.2.2.4	Kreuzreaktivität.....	52
5.2.2.5	Wahl des Anti-MTX-Antikörpers für den Einsatz im Wischtest.....	53
5.2.3	Indirekter nicht kompetitiver ELISA zum Nachweis von 5-Fluorouracil	53
5.2.3.1	Ermittlung der optimalen Antigen-Konzentration	54
5.2.3.2	Ermittlung der optimalen primären Antikörper-Konzentration.....	54
5.2.3.3	Ermittlung des optimalen Anti-5-FU-Klons	55
5.2.4	Indirekter kompetitiver ELISA zum Nachweis von 5-Fluorouracil	57
5.2.4.1	Vergleich des kompetitiven und nicht kompetitiven ELISA.....	57
5.2.4.2	Ermittlung der optimalen 5-FU-Konzentration	58
5.2.4.3	Ermittlung der optimalen Anti-5-FU-Antikörper-Konzentration	59
5.2.4.4	Kreuzaktivität.....	62
5.2.4.5	Wahl des Antikörpers für den Einsatz im Wischtest	62
5.3	Herstellung der Antikörper-Goldkolloid-Konjugate (Hochschule Niederrhein)	63
5.3.1	Konjugation.....	63
5.3.1.1	Vorbereitung der Antikörper-Lösung	63
5.3.1.2	Titration - Konjugation	64
5.3.1.3	Scale-up der Konjugation	64
5.3.1.4	Vorbereitung des gelagerten Anti-Zytostatika-Antikörper-Goldkolloides ...	65
5.4	Membranevaluation (IUTA).....	65
5.4.1	Analytische Methoden	65
5.4.2	Membranevaluation für das Wischpad	69
5.4.2.1	Einfluss des pH-Wertes auf die Substanzaufnahme	71
5.4.3	Auswahl der analytischen Membran.....	72
5.4.4	Endgültige Membranauswahl	73
5.5	Anpassung der Reagenzienkonzentrationen	74
5.5.1	Methotrexat.....	75
5.5.2	5-Fluorouracil.....	77
5.6	Konstruktion des Wischbereiches (IUTA)	77
5.7	Funktionsnachweis des Wischtests für relevante Konzentrationen (IUTA).....	79

5.8	Validierung, vor Ort Einsatz, Lagerungsversuche.....	82
5.8.1	Validierung und vor Ort Einsatz.....	82
5.8.2	Lagerungsversuche	84
6	Ausblick	85
7	Literatur.....	85
8	Anhang.....	85

1 Kurzfassung der Ergebnisse

Die in der chemotherapeutischen Krebsbehandlung eingesetzten Zytostatika, aber auch andere Medikamente, besitzen ein erhebliches gesundheitsgefährdendes Potenzial, dem durch entsprechende Maßnahmen des Arbeits- und Umweltschutzes Rechnung getragen werden muss. Zahlreiche Studien zeigen übereinstimmend, dass die Freisetzung dieser Stoffe auch bei höchsten Sicherheitsstandards nicht vollständig vermeidbar und ein hoher Prozentsatz verschiedener Oberflächen mit den Wirksubstanzen kontaminiert ist. Um Arbeitsabläufe so zu optimieren, dass Kontaminationen reduziert werden können, müssen Informationen zur tatsächlichen Belastung während der Handhabung vorliegen.

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens sollte anhand ausgewählter Zytostatika die prinzipielle Machbarkeit gezeigt werden, mit einem Wischtest dem Anwender vor Ort schnell Informationen über Kontaminationen auf abwischbaren Oberflächen zukommen zu lassen. Dieser Test basiert auf dem immunchromatographischen Prinzip, das in vielen lateralen Fließtests verwirklicht ist.

Die Grundsätzliche Herangehensweise bestand in der Entwicklung von Antikörpern gegen ausgewählte Zytostatika. Von den vier Zytostatika konnten nur zwei (Methotrexat (MTX) und 5-Fluorouracil) erfolgreich eingesetzt werden, da die anderen beiden (Cyclophosphamid und Chlorambucil) offensichtlich immunsuppressive Eigenschaften haben, die die erfolgreiche Entwicklung von Antikörpern in der Maus verhindern. Die erfolgreich gewonnenen Antikörper wurden auf ihre Eignung für einen kompetitiven ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) getestet. Die Antikörper mit der höchsten Affinität wurden zur weiteren Verwendung im lateralen Fließtest eingesetzt. Dazu wurden sie an Goldkolloid gebunden, das im fertigen Test auf der Kontroll- und Testlinie zu sichtbaren roten Verfärbungen führt. Der aufgrund der ELISA-Ergebnisse ausgewählte Antikörper gegen 5-Fluorouracil erwies sich als nicht kompetitiv im Fließtest. Der Anti-Methotrexat-Antikörper zeigte sehr gute Konkurrenz.

Im konstruktiven Entwicklungsschritt des Vorhabens wurde ein Wischbereich aufgebaut, der aus zwei verschiedenen Membranen besteht, die einen guten Substanzabtrag von der zu untersuchenden Oberfläche und einen guten Substanztransfer in den Teststreifen ermöglichen. Nach Auswahl der analytischen Membran und der geeigneten Reagenzienkonzentrationen konnten alle Komponenten zusammengeführt werden.

Der MTX-Wischtest ermöglicht die Bestimmung von Methotrexat auf abwischbaren Oberflächen. Die Nachweisgrenze ohne technische Hilfsmittel zur Auswertung beträgt ca. 2 ng/cm^2 bei einer Wischfläche von $5 \times 5 \text{ cm}^2$.

Im Rahmen einer vor Ort Anwendung wurde der Wischtest in der Praxis für tauglich befunden. Die Ergebnisse wurden auf der MEDICA 2005 (Internationale Fachmesse mit Kongress „Weltforum der Medizin“) im Rahmen eines Gemeinschaftsstandes des Landes

Nordrhein-Westfalen einem breiten Publikum vorgestellt. Hier ergab sich ein Kontakt zu einem mittelständischen Unternehmen, mit dem zur Zeit die Markteinführung des neuen Produktes vorbereitet wird. Über den Messeauftritt wurde im Informationsdienst Wissenschaft (www.idw-online.de) am 02.11.2005 berichtet. Weiterhin wurde in der Fachzeitschrift „Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft“ (66, 2006, Nr. 1/2) in einem Kurzbericht über den Wischtest informiert.

Das Ziel des Forschungsvorhabens wurde erreicht.

2 Wissenschaftlich-technische und wirtschaftliche Problemstellung

Die in der chemotherapeutischen Krebsbehandlung eingesetzten Zytostatika, aber auch andere Medikamente, besitzen ein erhebliches gesundheitsgefährdendes Potenzial, dem durch entsprechende Maßnahmen des Arbeits- und Umweltschutzes Rechnung getragen werden muss. Zahlreiche Studien zeigen übereinstimmend, dass die Freisetzung dieser Stoffe auch bei höchsten Sicherheitsstandards nicht vollständig vermeidbar und ein hoher Prozentsatz verschiedener Oberflächen mit den Wirksubstanzen kontaminiert ist.

Um Arbeitsabläufe so zu optimieren, dass Kontaminationen reduziert werden können, müssen Informationen zur tatsächlichen Belastung während der Handhabung vorliegen. Aufgrund der hohen Kosten für das Wischprobenmonitoring mit anschließender Laboranalytik und dem damit verbundenen organisatorischen Aufwand wird dieses jedoch kaum durchgeführt.

Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens sollte anhand ausgewählter Zytostatika ein Test entwickelt werden, mit dem Anwender vor Ort schnell Informationen über Kontaminationen auf abwischbaren Oberflächen erhalten.

3 Stand der Forschung

3.1 Grundsätzliches

In intensivmedizinischen Bereichen wird im Allgemeinen mit hochwirksamen pharmazeutischen Produkten umgegangen. Vom Mediziner richtig eingesetzt, sind die meisten Medikamente dazu da, den Patienten während seiner Heilung zu unterstützen bzw. diese erst möglich zu machen. In einigen Bereichen werden aber auch pharmazeutische Produkte eingesetzt, die in erster Linie entartete Zellen abtöten sollen. Solche Zellgifte, die den Stoffwechsel von Zellen beeinflussen, indem sie die Teilung verhindern oder verzögern, werden z.B. in den Bereichen der Immunsuppression, Transplantationsmedizin oder Krebstherapie als sogenannte Zytostatika eingesetzt. Zytostatika sind keiner bestimmten chemischen Substanzklasse zuzuordnen. Beispielhaft sind Stickstoff-Lost-Derivate (wie z.B. Cyclophosphamid) ebenso wie Oxazaphosphorine oder Nitroso-Harnstoffderivate, Ethyleniminderivate, platinhaltige Verbindungen, Alkylantien und Antrazykline zu nennen.

Der Umgang mit diesen Substanzen erfolgt in der Regel nur durch Fachpersonal und in dafür vorgesehenen Bereichen. Durch Unfälle und selbst schon bei sachgemäßem Umgang können, mehr oder weniger bemerkt, diese Substanzen vorwiegend in Form ihrer wässrigen Lösungen auf verschiedenste Oberflächen (Arbeitsplatte, Boden, medizinisches Besteck,

etc.) gelangen und durch weitere Aktivitäten (z.B. Reinigungsvorgänge, Transport von Gegenständen) in andere Bereiche transportiert werden.

So konnten Belastungen durch Zytostatika sowohl im Fern- als auch im Nahbereich der Zubereitungsstätten bzw. in angrenzenden Räumen nachgewiesen werden. Untersucht wurden sowohl Böden als auch Arbeitsplatten und -bänke. Analysiert wurden Wischproben aus Apotheken, Klinikapotheken sowie ambulanten und stationären Krankenhausbereichen. Hierbei wurden insbesondere die Zytostatika Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil, Ifosfamid, Methotrexat und platinhaltige Verbindungen nachgewiesen. Dabei konnten Kontaminationen auch an Stellen detektiert werden, die zwischen dem Zeitpunkt der Wischprobenahme und dem letzten registrierten Kontakt mit Zytostatika entsprechend den Reinigungsplänen gesäubert wurden. So konnten mit Zytostatika belastete Flächen in nahezu allen untersuchten Bereichen (Apotheke, Stationen und Klinikapotheken) nachgewiesen werden. Da bei diesen Untersuchungen keine standardisierten Probennahmen erfolgten, können die ermittelten Belastungen zwar nicht direkt miteinander verglichen werden, aber auffallend ist der hohe Anteil belasteter Proben. Demnach erwiesen sich mehr als die Hälfte der hierbei in den letzten zehn Jahren (seit 1993) untersuchten Flächen als kontaminiert.

Neben US-Amerikanischen Studien sind auch Studien aus Italien, den Niederlanden und Deutschland bekannt.

Tabelle 7-1 (Seite 86) zeigt eine zusammenfassende Übersicht zu Studien zur Flächenbelastung mit Zytostatika in medizinisch relevanten Bereichen.^{1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8}

3.2 Emissionspfade von Zytostatika

3.2.1 Zubereitung in Klinikapotheken

Hauptsächlich betroffen sind die Klinikapotheken bzw. auf den Umgang mit Zytostatika spezialisierte Abteilungen, in denen aus den angelieferten Reinsubstanzen oder konzentrierten Lösungen durch Verdünnen und Mischen die individuell dosierten, applikationsfertigen Infusionen und Injektionen hergestellt werden. Aus diesen Bereichen stammt die bei weitem größte Anzahl der Studien zum Umgebungsmonitoring. Die alarmierenden Ergebnisse haben bereits zu einer erheblichen Verbesserung der technischen und administrativen Sicherheitsstandards geführt. Jedoch sind auch bei sorgfältiger Arbeitsweise unter Einhaltung der entsprechenden Vorschriften häufig Zytostatika in der Arbeitsumgebung (Flächen, Luft, Arbeitsmaterialien) sowie im Blut und Urin der Mitarbeiter nachweisbar.

Im Bereich der Zubereitung, d. h. in Klinikapotheken und Zentralen Zytostatika-Zubereitungen (ZZZ), sind die folgenden Stellen häufig betroffen:

- Arbeitsflächen innerhalb und außerhalb der Werkbank,

- Fußboden insbesondere vor der Werkbank bzw. im Bereich der Abfallbehälter,
- Arbeitsgeräte wie Einschweißapparaturen, Abfallbehälter, Computertastaturen etc.,
- häufig berührte Stellen wie Lichtschalter, Türklinken, Griffe von Schubladen, Telefonhörer etc. sowie
- Arbeitskleidung,
- Lager- und Abfallbereiche.

Die Mehrzahl dieser Kontaminationen entsteht vermutlich durch direkten Kontakt mit verunreinigten Handschuhen, Verpackungen oder Arbeitsmaterialien. Unbeabsichtigtes Verschütten von Zytostatika-Feststoffen oder Lösungen führt ebenfalls zu erheblichen Belastungen.

3.2.2 Verabreichung auf Stationen

Weit weniger gut untersucht, gesichert und überwacht ist der Bereich der Applikation auf den Stationen bzw. bei Situationen der immer häufiger werdenden ambulanten Versorgung der Chemotherapiepatienten. Zytostatika werden inzwischen in fast allen Klinikbereichen verabreicht. Dazu gehören insbesondere onkologische und chirurgische Stationen aber auch der Intensiv- und OP-Bereich. Das Freisetzungspotenzial ist aufgrund der fehlenden technischen Schutzausrüstung (Zytostatika-Werkbänke) hoch. Bei Operationen, Notfällen oder am Wochenende werden Zytostatika-Applikationen auch auf den entsprechenden Stationen zubereitet. Bekannte Ursachen für Primärkontaminationen sind z. B. Tropfenbildung beim Konnektieren und Dekonnektieren von Infusionen oder die Verwendung von Salben. Eine Vermeidung insbesondere der vom Patienten ausgehenden Kontamination ist im Vergleich mit der Apothekensituation weit schwerer zu realisieren.

Darüber hinaus sind alle Bereiche, in denen Zytostatika, Applikationen und kontaminierte Materialien gelagert, transportiert gesäubert oder entsorgt werden, zu berücksichtigen.

Neben der Primärkontamination von Flächen durch Spritzer, Verschütten von Lösungen oder Feststoffen etc. können Flächen insbesondere auch durch den unbedachten Umgang mit kontaminierten Materialien verunreinigt werden (Sekundärkontamination). Zu diesen Materialien gehören:

- Primär- und Umverpackungen der Medikamente,
- Applikationen (Infusionen, Spritzen, Tabletten, Salben etc.),
- Handschuhe, Arbeitskleidung, Schuhe
- Arbeitsmaterialien (Unterlagen, Transportbehälter etc.),
- Körperflüssigkeiten und Ausscheidungen der Patienten,
- Patienten- und Bettwäsche sowie

- Handtücher und Putzlappen.

Viele dieser Materialien werden derzeit noch ohne spezielle Sicherheitsmaßnahmen im Klinikbereich gehandhabt, transportiert, gelagert, gereinigt bzw. entsorgt.

Eine diffuse Verbreitung erfolgt über den Luftpfad in Form zytostatikahaltiger flüssiger und fester Partikel sowie durch langsame Verdampfung zuvor freigesetzter Substanzmengen. Dadurch können Flächen aller Art kontaminiert werden; eine Anreicherung im Bereich von Luftverwirbelungen aber auch an stark absorbierenden sowie kalten Oberflächen ist zu erwarten.

Auf diese Weise können unbemerkt Sekundärkontaminationen auch in weit entfernten Räumen entstehen, wodurch der Kreis der exponierten Personen weiter vergrößert wird. Die Wirksubstanzen sind bis auf wenige Ausnahmen farb- und geruchlos und nur mit aufwändigen analytischen Verfahren nachweisbar. Es können Räume außerhalb der speziell gesicherten Bereiche und ungeschulte Mitarbeiter ohne ausreichenden Personenschutz betroffen sein.

Es ist davon auszugehen, dass bislang vorwiegend Primärkontaminationen erfasst und die durch Verschleppung entstandenen Sekundärkontaminationen bestenfalls zufällig entdeckt wurden: Einmal aufgrund der im Vergleich zu Sekundärkontaminationen höheren Flächenkonzentration aber auch, weil Untersuchungen in der Regel nur dort vorgenommen wurden, wo Kontaminationen erwartet wurden.

Aus der Betrachtung der Abläufe beim Umgang mit Zytostatika (und anderen Medikamenten) werden die eingangs zitierten Untersuchungsergebnisse erklärbar. Insgesamt ergibt sich, dass eine möglichst weitgehende Verminderung der Freisetzung von Zytostatika zwar angestrebt werden muss, eine vollständige Vermeidung von Kontaminationen aber nicht zu realisieren ist.

Aus Studien der vergangenen Jahre lassen sich Tendenzen erkennen, dass durch ein Umgebungsmonitoring die „unvermeidbaren“ Kontaminationen reduziert werden können.^{9, 10,}

¹¹ Diese Zusammenhänge sind Gegenstand derzeitiger deutschlandweiter Untersuchungen. Generell können regelmäßige Umgebungsmonitorings jedoch nur mit effizienten, kostengünstigen und schnellen analytischen Verfahren durchgeführt werden. Dieses gilt insbesondere unter der Annahme, dass die Arbeitsweise während der Handhabung von Zytostatika durch die Anzeige der Ergebnisse vor Ort beeinflusst werden.

Derzeitige analytische Methoden zur Bestimmung von Zytostatikakontaminationen beruhen auf der Wischprobenahme von Verdachtsflächen mit anschließender instrumenteller Laboranalytik. Daraus können sich Zeiträume zwischen Probenahme und Ergebnisübermittlung von bis zu einigen Wochen ergeben. Durch den langen Zeitraum zwischen Handhabung der Zytostatika mit anschließender Probenahme und dem Bekannt

werden der Ergebnisse ist anzunehmen, dass die Verbindung zwischen Kontamination und Arbeitsweise des Personals schwieriger herzustellen ist.

3.3 Stand der analytischen Verfahren zum Wischprobenmonitoring

Für die Untersuchung von Oberflächen auf Kontaminationen durch Zytostatika hat sich im wesentlichen ein Verfahren durchgesetzt, das in leichten Abwandlungen Anwendung findet. Grundsätzlich findet ein Wischvorgang der zu untersuchenden Oberfläche statt, wobei Wischtücher oder Filter unter Zuhilfenahme von organischen oder/und wässrigen Lösungsmitteln verwendet werden. Diese Wischmaterialien werden gekühlt zu entsprechenden Laboratorien transportiert, in denen unterschiedliche Extraktionsvarianten genutzt werden, um die Zytostatika in Lösung zu bringen. Auch dabei werden, je nach weiterer Vorgehensweise sowohl wässrige als auch organische Extraktionsmittel eingesetzt.

Für eine begrenzte Anzahl von Verbindungen (Cyclophosphamid, Ifosfamid und 5-Fluorouracil) sind Derivatisierungsmethoden entwickelt worden, die eine anschließende gaschromatographische Bestimmung ermöglichen. Hierbei finden die Extraktionen z.B. mit Ethylacetat oder Methanol statt. Der Nachteil dieser Methodik besteht in der geringen Anzahl von Verbindungen, die parallel bestimmt werden können.

Platinhaltige Zytostatika werden gewöhnlich mit wässrigen Lösungen aus den Wischmaterialien extrahiert und mittels massenspektrometrischer (ICP-MS) Bestimmungsverfahren als Gesamtplatin quantifiziert.

Der umfassendste Ansatz zur Bestimmung möglichst vieler verschiedener Zytostatika aus einer Probelösung durch ein analytisches Verfahren stellt die Verwendung der Flüssigchromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) dar. Hierbei wird auf pH 3 eingestelltes Wasser als Wischlösung und als Extraktionsmittel verwendet. Aus dem Extrakt können direkt mittels einer LC-MS/MS-Multimethode bis zu zehn Zytostatika gleichzeitig bestimmt werden. Durch wiederholte Injektion der Probe können weitere Zytostatika in Multimethoden bestimmt werden. Dieses Verfahren diente im Forschungsvorhaben als Referenzmethode, um die Wischtestentwicklung zu validieren.

3.4 Stand der lateralen Fließtests auf immunchromatographischer Basis

Laterale Fließtests auf immunchromatographischer Basis sind bereits in vielen Bereichen vertreten. Sie stellen insbesondere im Bereich der medizinischen Diagnostik ein weit verbreitetes Testformat dar.

Den bekanntesten und wohl am häufigsten angewendeten Test dieser Art stellt der Schwangerschaftstest dar, mit dem das Schwangerschaftshormon HCG im Urin nachgewiesen wird. Die meisten dieser auch als Lateral Flow Test bezeichneten Systeme dienen zur Detektion von Substanzen in Flüssigkeiten (z.B. Urin, Blut, wässrige

Umweltproben oder Eluate). Dabei wird mit der Probe gleichzeitig das Laufmittel für den Assay aufgebracht und so der Ablauf des Tests durch Kapillarwirkung gestartet. Derzeit existieren trotz vielfältiger Anwendungsmöglichkeiten nur wenige Systeme, bei denen Oberflächen trocken mit einer dafür vorgesehenen Fläche des Testsystems abgewischt werden und nachträglich das Elutions- und Laufmittel mit eventuell weiteren Immunreagenzien aufgebracht wird.¹² Im Gegensatz zum Forschungsvorhaben, wird in diesen Wischtestsystemen ein Immunoassay auf Sandwichbasis verwendet, da die Analytmoleküle aufgrund ihrer Größe über mehr als eine Antikörper-Bindungsstelle (Epitop) verfügen.

4 Problemstellung und prinzipieller Lösungsweg

Zytostatika stellen hochwirksame Arzneimittel dar, die neben ihrer gewollten Wirkung in der Krebstherapie eine Reihe von gesundheitsschädlichen Eigenschaften besitzen, die es erforderlich machen, Personen, die mit ihnen umgehen, vor einer Exposition zu schützen. Zu diesen Eigenschaften zählen Toxizität, Teratogenität, Mutagenität, teilweise erwiesene Kanzerogenität sowie reproduktionstoxische Wirkungen. Der geschätzte Jahresverbrauch der in Deutschland zur Krebsbekämpfung eingesetzten Substanzen liegt bei ca. 8 Tonnen, wobei aufgrund von Hochrechnungen davon ausgegangen werden kann, dass jährlich mehrere hunderttausend Applikationen hergestellt werden. Untersuchungen zeigen, dass trotz hoher Sicherheitsstandards im Urin von direkt und indirekt an der Zubereitung bzw. Applikation von Zytostatika beteiligten Personen und auf Arbeitsflächen und -materialien Spuren der Wirkstoffe gefunden werden.¹³⁻²⁴

Durch die hohen Kosten und den organisatorischen Aufwand, die mit dem herkömmlichen Wischprobenmonitoring verbunden sind, wird diese Methode zur Kontaminationsermittlung nur unzureichend eingesetzt, um Arbeitsabläufe im Rahmen der Handhabung von Zytostatika zu optimieren.

Ziel dieses Forschungsprojektes war die biotechnologische und konstruktive Realisierung eines immunchromatographischen Wischtests zur schnellen vor Ort Detektion von Zytostatikakontaminationen auf abwischbaren Flächen. Kernstücke des Schnelltests stellen einerseits die immunchemische Reaktion zwischen Zytostatikum und Goldkolloid-Antikörper-Konjugat innerhalb eines kompetitiven Immunoassays, andererseits die konstruktive Gestaltung des Wisch-Assays zur leichten Handhabung und zum sicheren chromatographischen Verlauf dar.

Der Lösungsweg bestand im wesentlichen aus folgenden Teilschritten:

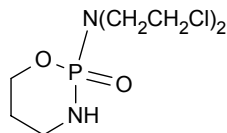
- Entwicklung monoklonaler Antikörper
- Funktionsnachweis des Detektionsprinzips (ELISA)
- Membranevaluation
- Immobilisierung der Immunreagenzien
- Anpassung der Reagenzienkonzentration
- Funktionsnachweis des Teststreifens für relevante Konzentrationen
- Konstruktion des Wischbereiches
- Funktionsnachweis des Wischtests
- Validierung, vor Ort Einsatz, Lagerungsversuche

5 Experimente und Ergebnisse

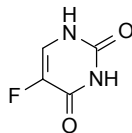
5.1 Entwicklung monoklonaler Antikörper (Unterauftrag)

Aufgrund von Verbrauchsmengen und analytischen Befunden aus Wischprobenmonitorings, die vom IUTA durchgeführt wurden, sollten gegen folgende Zytostatika monoklonale Antikörper bei der Firma BioGenes GmbH (Berlin) entwickelt werden:

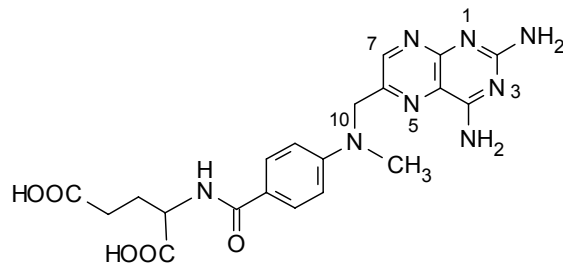
Cyclophosphamid



Fluorouracil



Methotrexat



Chlorambucil

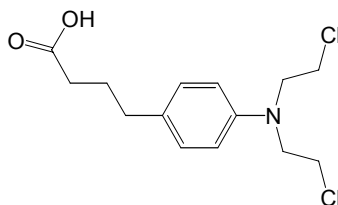


Abbildung 1 Strukturen ausgewählter Zytostatika.

Immunochemische Methoden beruhen auf der äußerst sensitiven und selektiven Erkennung eines Antigens durch einen Antikörper. Antikörper sind lösliche Glycoproteine aus der Klasse der Immunglobuline, die im Wirbeltierorganismus als Reaktion auf einen Fremdstoff

(Antigen) gebildet werden. Ein Antikörper bindet nur an einem relativ kleinen Bereich der Antigenoberfläche, die sogenannte antigene Determinante. Als Antigene werden vom Immunsystem nur Makromoleküle wie Proteine, Polysaccharide, Nucleinsäuren aber auch synthetische Polymere erkannt. Kleine Moleküle (Haptene), wie z.B. die ausgewählten Zytostatika, müssen, damit sie eine Immunreaktion auslösen können, mit einer größeren Proteineinheit (z.B. Rinderserumalbumin) konjugiert werden.

Diese kovalente Bindung stellt im allgemeinen eine besondere Herausforderung dar, da nach der chemischen Reaktion die ursprüngliche Struktur des Zytostatikums erhalten bleiben muss, um als Hapten zu dienen. Des Weiteren muss bei der Aufarbeitung darauf geachtet werden, dass Nebenprodukte, die, wie z. B. bei der Konjugation von Fluorouracil, in höheren Konzentrationen vorliegen als das gewünschte Konjugat, vollständig entfernt werden.

Methotrexat und Chlorambucil stellen relativ einfach zu koppelnde Verbindungen dar, weil beide Substanzen Carboxyl-Gruppen besitzen. Ebenso konnte Cyclophosphamid vergleichsweise einfach an reduziertes KLH gebunden werden.

5-Fluorouracil stellte eine besondere Herausforderung dar, weil weder primäre Amino-Gruppen, noch Aldehyd- oder Carboxyl-Gruppen vorliegen. Hier wurde eine Modifikation des Moleküls durchgeführt, um über einen Spacer eine Carboxyl-Gruppe einzuführen. Dadurch wurde als zu koppelndes Reagenz die 5-Fluorouracil-1N-hexansäure verwendet.

Monoklonale Antikörper (MAK, engl. Mab) werden von Immunzellen sezerniert, die von einer einzigen Antikörper-bildenden Zelle abstammen (von einem Zell-Klon). Deshalb sind MAK jeweils nur gegen ein bestimmtes Epitop einer immunogenen Substanz gerichtet, eine sog. „Antigene Determinante“. Große Moleküle enthalten mehrere Epitope, gegen die von verschiedenen B-Zellen unterschiedliche Antikörper gebildet werden. Ein Antiserum, das ein Gemisch all dieser Antikörpern enthält, nennt man polyklonal.

Zur Gewinnung von MAK werden Lymphocyten aus der Milz einer immunisierten Maus isoliert und mit Mäuse-Tumorzellen (Myelomzellen) fusioniert. Dies ist notwendig, weil die Lebensdauer von Antikörper-sezernierenden Lymphocyten in Kultur nur auf wenige Wochen begrenzt ist. Durch die Fusion mit einer Tumorzelle entstehen Zellhybride, sog. Hybridome, die potentiell unsterblich sind.

Um nur die erfolgreich fusionierten Zellen zu gewinnen, wird für längere Zeit in einer Primärkultur mit HAT-Medium inkubiert, das Hypoxanthin, Thymidin und Azaserin statt Aminopterin (Möglichkeit der Kompetition) enthält. Nur Hybridome überleben die Kultur in HAT-Medium, weil sie gleichzeitig über die Unsterblichkeit der Myelomzellen und den metabolischen Seitenweg der Milzzellen verfügen.

Von den fusionierten Zellen bilden nur einige wenige auch Antikörper. Zum Auffinden dieser Zellen müssen die Hybridome vereinzelt und vermehrt werden.

Nach der Hybridomvermehrung werden mittels Screening die Spezifitäten der Antikörper getestet und die positiven Kulturen ausgewählt. Das Screening dient dem Aufspüren von Klonen, die Antikörper mit der erwünschten Funktionalität produzieren. Da ein katalytisches Testsystem erst entwickelt werden sollte, wurden die Antikörper zuerst anhand ihrer Spezifität gegen das Hapten getestet.

Nach dem Testen der Klone auf gebildete Antikörper werden die positiven Kulturen durch weiteres Klonen selektiert. Das Ergebnis sind Hybridome, die monoklonale Antikörper bilden.

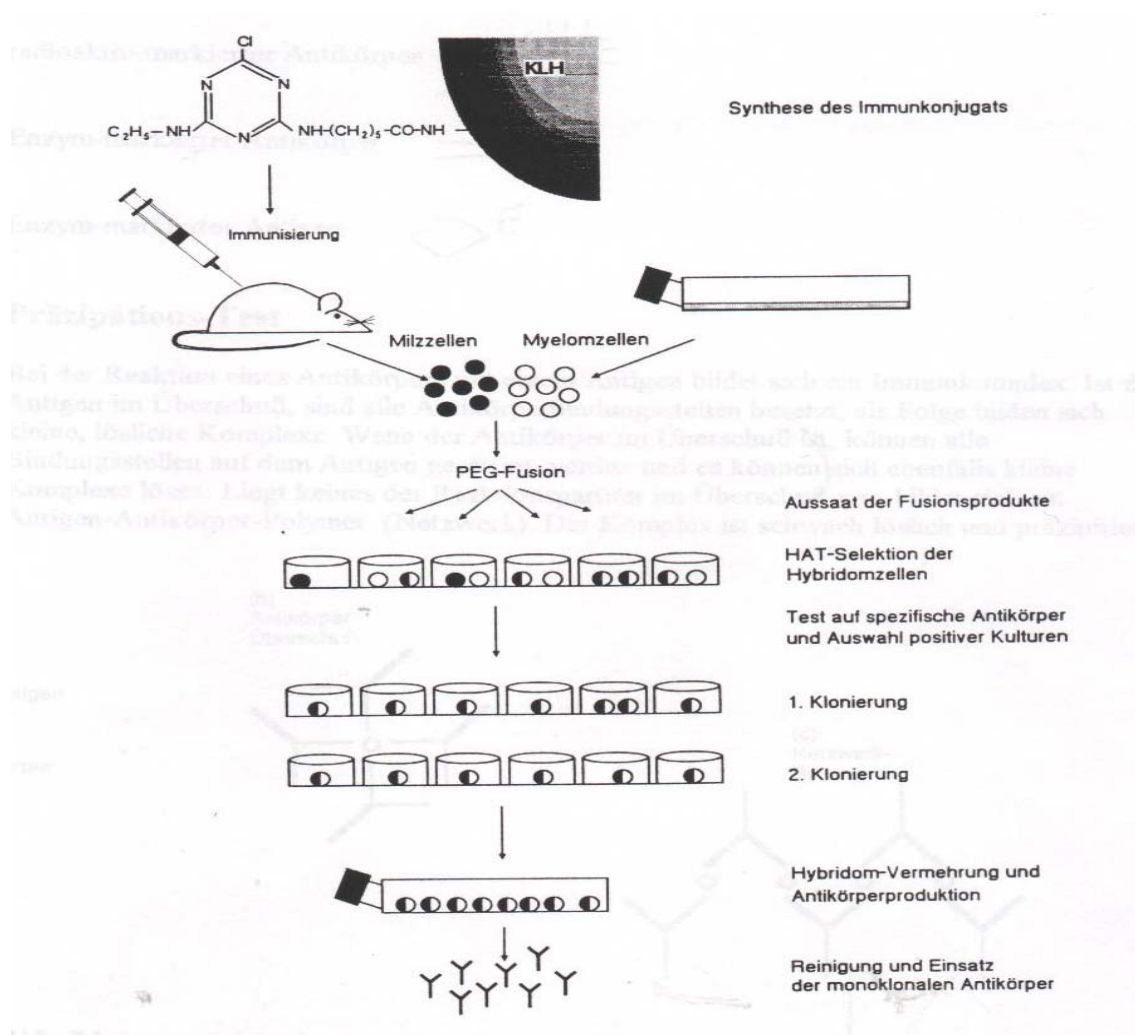


Abbildung 2 Herstellung von monoklonalen Antikörpern (MILSTEIN, 1980)

Es wurden 3 Klone, die freies 5-Fluorouracil und 8 Klone, die freies Methotrexat erkennen, isoliert.

Die Entwicklung von MAK gegen Cyclophosphamid und Chlorambucil war nicht möglich, da die Milzen der Mäuse ungewöhnlich klein blieben. Es wurde vermutet, dass die Haptene immunsuppressive Eigenschaften besitzen, durch die eine Immunantwort verhindert wurde.

Die Beschreibung der durchgeführten Arbeiten sind im folgenden als Berichte der Firma BioGenes aufgeführt. Aufgrund der internationalen Ausrichtung der Firma sind alle Ergebnisse in englischer Sprache dargestellt.

5.1.1 A monoclonal antibody having specific binding ability to methotrexate

Report to order 16584

Issued by **BioGenes GmbH**

For **IUTA**

BioGenes GmbH
Köpenicker Str. 325, 12555 Berlin, Germany
<http://www.biogenes.de>

Institut für Energie-
und Umwelttechnik IUTA e.V.
Umweltmedizin
Bliersheimer Str. 60
D-47229 Duisburg

Immunogen

For development of monoclonal antibodies against methotrexate were used two different conjugates .

For immunization purposes was used methotrexate derivative conjugated to KLH (MTX-KLH) by using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride.

For screening purposes was used methotrexate derivative conjugated to BSA (MTX-BSA) by using N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate

Total amount of both protein preparations used for immunization was $\approx 5000 \mu\text{g}$ (5 mice, $1000 \mu\text{g}$ each).

Methotrexate - KLH conjugates

Methotrexate was conjugated to KLH by the following method. The carrier protein (2 mg) was dissolved in 1 ml of the coupling buffer (0.5 M MES-Na, pH 5.0). To the resulting mixture a solution of methotrexate (5 mg in $200 \mu\text{l}$ NMP) was added during intensive agitation. After the addition of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride the reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature followed by dialysis (MW cut of 10,000) against HEPES-buffered saline (HBS, 10 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM sodium chloride) at 4°C with

eight changes of the buffer (500 ml, two changes per day). So produced conjugate was aliquoted to small portions and stored at -78°C.

Methotrexate - BSA conjugates

Methotrexate was conjugated to BSA by the following method. The carrier protein (5 mg) was dissolved in 1 ml of the coupling buffer (0.5 M MES-Na, pH 5.0). To the resulting mixture a solution of methotrexate (5 mg in 200 µl NMP) was added during intensive agitation. After the addition of N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate the reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature followed by dialysis (MW cut of 10,000) against HEPES-buffered saline (HBS, 10 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM sodium chloride) at 4°C with eight changes of the buffer(500 ml, two changes per day). So produced conjugate was aliquoted to small portions and stored at -78°C.

Immunization

Five mice (age 8 weeks) were primed by injecting with 100 µg of MTX-KLH emulsified in complete adjuvant (Biogenes GmbH) and injected into multiple sites at minus 120 days before fusion. All other injections were performed into multiple sites and intravenous by the following time schedule.

Tabelle 5-1 Time schedule for immunization (MTX)

Immunization	Days from fusion	Amount of antigen Per mouse	Adjuvant	Injection route
1	120	100	Complete	Multiple sites
2	60	100	Incomplete	Multiple sites
3	30	100	Incomplete	Multiple sites
4	17	100	Incomplete	Multiple sites
5	7	150	Incomplete	Multiple sites
6	4	150	W/o adjuvant	i.v.
7	3	150	W/o adjuvant	i.v.
8	2	150	W/o adjuvant	i.v.

Myeloma cell line

The myeloma cell line used was SP2/0-Ag14 from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. The cells were described as not synthesizing or secreting immunoglobulin chains, being resistant to azaguanine at 20 µg/ml, and not growing in HAT medium. The SP2/0 cells were routinely maintained in tissue culture flasks in standard culture media (DMEM + 10% foetal calf serum) supplemented with 20 µg/ml 8-AZG to kill any HPRT+ revertants which can grow in HAT-medium. One week prior to fusion SP2/0 cells were maintained in standard culture media without 8-AZG.

Cell fusion and plating

The spleen from immunized mouse was aseptically removed and a single cell suspension was prepared. Spleen lymphocytes were fused with SP2/0 myeloma cells (ratio 10 lymphocytes / 1 SP2/0) in the presence of polyethylene glycol 1000. The cells so produced were then resuspended in DMEM containing HAT (hypoxanthine 10⁻⁴ M, aminopterin 10⁻⁵ M and thymidine 4x10⁻⁵ M), 20% preselected foetal calf serum and 10% of our newly developed conditioned media. The cells were then plated into five 96 well tissue culture plates (Corning-Costar) containing peritoneal exudate cells as a feeder layer. The plates were incubated for 2 weeks at 37°C in a humid atmosphere containing 5% carbon dioxide. During this period cells were fed two times with HAT medium and two times with HT medium.

Screening assay

An indirect ELISA assay directed mainly for IgG detection was used for cell culture supernatants screening. Assays were carried out in 96 well flat bottom polystyrene microtiter plates (Greiner, Cat.# 756071) prepared as follows: a 50 µl aliquot of a solution of 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 MTX-BSA at a concentration of 10 µg/ml was added to each well of the plate. After incubation overnight at 4°C the plate was washed four times with PBS containing 0.01% Triton X-100 and blocked with 2% Gelatin (from cold water fish skin, Sigma, G-7765) in TBS 1 hour at room temperature. 100 µl aliquot of the cell culture supernatant was added to the appropriate assay well. As negative control wells were used wells with cell culture supernatant from SP 2/0 myeloma.

The assay plates were incubated at room temperature for 1 h. They were then washed four times with tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris, pH 7.8, 500 mM sodium chloride) containing 0.01% Triton X-100. Determination of bound antibodies was accompanied with a goat anti-mouse IgG (mouse Fc specific) conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, A-2429). Quantification of bound enzyme was performed with the help of a paranitrophenol-containing substrate buffer in the Dynex Opsys MR microplate reader.

For competitive assay, undiluted cell culture supernatants were firstly preincubated with 10 µg/ml of free methotrexate as competitor for 1 h at room temperature and then added to

MTX-BSA coated well. The assay plates were incubated at room temperature for 1 h. It was then washed four times with tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris, pH 7.8, 500 mM sodium chloride) containing 0.01% Triton X-100. Determination of bound antibodies was accompanied with a goat anti-mouse IgG (mouse Fc specific) conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, A-2429). Quantification of bound enzyme was performed with the help of a paranitrophenol-containing substrate buffer in the Dynex Opsys MR microplate reader.

Results of the 2nd cloning

After first screening twelve primary cells populations were selected as positive and were transferred into wells of 24-well plate. Eight primary cells populations out of twelve still produce anti-MTX-BSA antibodies after precloning distribution. Cell culture supernatants from these primary populations were subjected to competitive assay.

After 2nd cloning all eight clones still stably produce IgG against MTX-BSA and show good inhibition with free methotrexate.

Subclass analysis has shown the following results:

Tabelle 5-2 Subclass analysis (MTX)

Clone	Heavy chain subclass	Light chain subclass
MTX 2-20-1	IgG2a	<input type="checkbox"/>
MTX 4-10-2	IgG2a	<input type="checkbox"/>
MTX 6-1-5	IgG2a	<input type="checkbox"/>
MTX 9-12-5	IgG2b	<input type="checkbox"/>
MTX 10-3-6	IgG2a	<input type="checkbox"/>
MTX 13-1-3	IgG2a	<input type="checkbox"/>
MTX 20-1-2	IgG2a	<input type="checkbox"/>
MTX 64-6-8	IgG2b	<input type="checkbox"/>

Enclosing

We supply the next 8 cell culture supernatants after second cloning:

Tabelle 5-3 Supplied cell culture supernatants (MTX)

Clone name
Anti-Methotrexate clone MTX 2-20-1
Anti-Methotrexate clone MTX 4-10-2
Anti-Methotrexate clone MTX 6-1-5
Anti-Methotrexate clone MTX 9-12-5
Anti-Methotrexate clone MTX 10-3-6
Anti-Methotrexate clone MTX 13-1-3
Anti-Methotrexate clone MTX 20-1-2
Anti-Methotrexate clone MTX 64-6-8

in a volume of 10 ml. All these culture supernatants give strong positive signal in ELISA against MTX-BSA, good competition with free methotrexate and negligible nonspecific binding.

5.1.2 A monoclonal antibody having specific binding ability to 5-fluorouracil

Report to order 16594

Issued by **BioGenes GmbH**

For **IUTA**

BioGenes GmbH
Köpenicker Str. 325, 12555 Berlin, Germany
<http://www.biogenes.de>

Institut für Energie-
und Umwelttechnik IUTA e.V.
Umweltmedizin
Bliersheimer Str. 60
D-47229 Duisburg

Immunogen

For development of monoclonal antibodies against 5-fluorouracil-N-hexanoic acid (FU) were used two different conjugates.

For immunization purposes was used 5-fluorouracil-N-hexanoic acid conjugated to KLH (FU-KLH) by using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride.

For screening purposes was used 5-fluorouracil-N-hexanoic acid conjugated to BSA (FU-BSA) by using N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate

Total amount of both conjugates preparations used for immunization was $\approx 5000 \mu\text{g}$ (5 mice, $1000 \mu\text{g}$ each).

5-fluorouracil-N-hexanoic acid - KLH conjugates (FU-KLH)

5-fluorouracil-N-hexanoic acid was conjugated to KLH by the following method. The carrier protein (2 mg) was dissolved in 1 ml of the coupling buffer (0.5 M MES-Na, pH 5.0). To the resulting mixture a solution of 5-fluorouracil-N-hexanoic acid (5 mg in $200 \mu\text{l}$ NMP) was added during intensive agitation. After the addition of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride the reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature followed by dialysis (MW cut of 10,000) against HEPES-buffered saline (HBS, 10 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM sodium chloride) at 4°C with eight changes of the

buffer (500 ml, two changes per day). So produced conjugate was aliquoted to small portions and stored at -78°C.

5-fluorouracil-N-hexanoic acid - BSA conjugates (FU-BSA)

5-fluorouracil-N-hexanoic acid was conjugated to BSA by the following method. The carrier protein (5 mg) was dissolved in 1 ml of the coupling buffer (0.5 M MES-Na, pH 5.0). To the resulting mixture a solution of 5-fluorouracil-N-hexanoic acid (5 mg in 200 µl NMP) was added during intensive agitation. After the addition of N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate the reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature followed by dialysis (MW cut of 10,000) against HEPES-buffered saline (HBS, 10 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM sodium chloride) at 4°C with eight changes of the buffer(500 ml, two changes per day). So produced conjugate was aliquoted to small portions and stored at -78°C.

Immunization

Five mice (age 8 weeks) were primed by injecting with 100 µg of FU-KLH emulsified in complete adjuvant (Biogenes GmbH) and injected into multiple sites at minus 120 days before fusion. All other injections were performed into multiple sites and intravenous by the following time schedule.

Tabelle 5-4 Time schedule for immunization (5-FU)

Immunization	Days from fusion	Amount of antigen Per mouse	Adjuvant	Injection route
1	120	100	Complete	Multiple sites
2	60	100	Incomplete	Multiple sites
3	30	100	Incomplete	Multiple sites
4	17	100	Incomplete	Multiple sites
5	7	150	Incomplete	Multiple sites
6	4	150	W/o adjuvant	i.v.
7	3	150	W/o adjuvant	i.v.
8	2	150	W/o adjuvant	i.v.

Myeloma cell line

The myeloma cell line used was SP2/0-Ag14 from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. The cells were described as not synthesizing or secreting immunoglobulin chains, being resistant to azaguanine at 20 µg/ml, and not growing in HAT medium. The SP2/0 cells were routinely maintained in tissue culture flasks in standard culture medium (DMEM + 10% foetal calf serum) supplemented with 20 µg/ml 8-AZG to kill any HPRT+ revertants which can grow in HAT-medium. One week prior to fusion SP2/0 cells were maintained in standard culture medium without 8-AZG.

Cell fusion and plating

The spleens from immunized mice were aseptically removed and a single cell suspension was prepared. Spleen lymphocytes were fused with SP2/0 myeloma cells (ratio 10 lymphocytes / 1 SP2/0) in the presence of polyethylene glycol 1000. The cells so produced were then resuspended in DMEM containing HAT (hypoxanthine 10⁻⁴ M, aminopterin 10⁻⁵ M and thymidine 4x10⁻⁵ M), 20% preselected foetal calf serum and 10% of our newly developed conditioned medium. The cells were then plated into five 96 well tissue culture plates (Corning-Costar) containing peritoneal exudate cells as a feeder layer. The plates were incubated for 2 weeks at 37°C in a humid atmosphere containing 5% carbon dioxide. During this period cells were fed two times with HAT medium and two times with HT medium.

Screening assay

An indirect ELISA assay directed mainly for IgG detection was used for cell culture supernatants screening. Assays were carried out in 96 well flat bottom polystyrene microtiter plates (Greiner, Cat.# 756071) prepared as follows: a 50 µl aliquot of a solution of 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 FU-BSA at a concentration of 10 µg/ml was added to each well of the plate. After incubation overnight at 4°C the plate was washed four times with PBS containing 0.01% Triton X-100 and blocked with 2% Gelatin (from cold water fish skin, Sigma, G-7765) in TBS 1 hour at room temperature. 100 µl aliquot of the cell culture supernatant was added to the appropriate assay well. As negative control wells were used wells with cell culture supernatant from SP 2/0 myeloma.

The assay plates were incubated at room temperature for 1 h. They were then washed four times with tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris, pH 7.8, 500 mM sodium chloride) containing 0.01% Triton X-100. Determination of bound antibodies was accompanied with a goat anti-mouse IgG (mouse Fc specific) conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, A-2429). Quantification of bound enzyme was performed with the help of a paranitrophenol-containing substrate buffer in the Dynex Opsys MR microplate reader.

For competitive assay, undiluted cell culture supernatants were firstly preincubated with 10 µg/ml of free 5-fluorouracil as competitor for 1 h at room temperature and then added to FU-BSA coated well. The assay plates were incubated at room temperature for 1 h. It was then washed four times with tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris, pH 7.8, 500 mM sodium chloride) containing 0.01% Triton X-100. Determination of bound antibodies was accompanied with a goat anti-mouse IgG (mouse Fc specific) conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, A-2429). Quantification of bound enzyme was performed with the help of a paranitrophenol-containing substrate buffer in the Dynex Opsys MR microplate reader.

Results of the first screening

After first screening 22 primary cells populations were selected as positive and were transferred into wells of 24-well plate. Nine primary cells populations out of twelve still produce anti-FU-BSA antibodies after precloning distribution. Cell culture supernatants from these primary populations were subjected to competitive assay.

Results of the competitive assay with competitor (free 5-fluorouracil at 10 µg/ml) have shown inhibition with 5-fluorouracil for three of these cell culture supernatants.

Limiting dilution cloning

Cells from wells (corresponding to individual primary cell population), that had given the strongest positive signal and the minimal nonspecific signal in ELISA were selected for cloning by limiting dilution:

Cells from each positive well were distributed into two 96 well plates at a concentration of 1-3 cells per well. In 8-10 days all plates were visually inspected under the microscope for detection of monoclonal growth and culture supernatants from such wells were screened for specific immunoglobulin content by using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

In each of these cloning procedures cells from six wells, which gave the best signal in ELISA were transferred into wells of 24 well plate and cultivated 12-16 days more (depending on growth characteristics of each individual clone). Assay procedure was performed and two best clones were selected for further cultivation during the next 12-16 days. Then, assay procedure was repeated and one best clone corresponding to one primary cell population was selected for second limiting dilution cloning.

All procedures, which were made after the first cloning, were repeated after the second one. After the second cloning and two postcloning selection steps we found, that all three newly generated hybridoma clones still stable produce anti-5-FU IgG.

Subclass analysis has shown the following results:

Tabelle 5-5 Subclass analysis (5-FU)

Clone name	Heavy chain	Light chain
Anti-5-FU clone 7-3-3	IgG1	<input type="checkbox"/>
Anti-5-FU clone 9-9-8	IgG2b	<input type="checkbox"/>
Anti-5-FU clone 22-5-2	IgG1	<input type="checkbox"/>

Two times cloned monoclonal cell lines were adapted to growth in the medium with 15% of the fetal calf serum and were frozen in freezing media (90% fetal calf serum, 10% DMSO) at concentration $3 \cdot 10^6$ cells per ml (3 cryotubes per monoclonal cell line).

Enclosing

We supply the next 3 cell culture supernatants from the best clones after second cloning:

Tabelle 5-6 Supplied cell culture supernatants (5-FU)

Anti-5-FU clone 7-3-3
Anti-5-FU clone 9-9-8
Anti-5-FU clone 22-5-2

in a volume of 10 ml. All these culture supernatants show good inhibition in ELISA with free 5-FU and negligible nonspecific binding.

5.1.3 A monoclonal antibody having specific binding ability to chlorambucil

Report to order 16589N

Issued by **BioGenes GmbH**

For **IUTA**

BioGenes GmbH
Köpenicker Str. 325, 12555 Berlin, Germany
<http://www.biogenes.de>

Institut für Energie-
und Umwelttechnik IUTA e.V.
Umweltmedizin
Bliersheimer Str. 60
D-47229 Duisburg

Immunogen

For development of monoclonal antibodies against chlorambucil (CLA) were used two different conjugates .

For immunization was used CLA conjugated to bovine thyroglobulin (CLA-BTG) by using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride.

For screening was used CLA conjugated to ovalbumin (CLA-OVA) by using N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate.

CLA-BTG conjugates

CLA was conjugated to BTG (Sigma, T-1001) by the following method. The carrier protein (2 mg) was dissolved in 1 ml of the coupling buffer (0.5 M 2-morpholinoethanesulphonic acid-Na, pH 5.0). A solution of CLA (5 mg in 500 µl N-Methylpyrrolidon) was added to the resulting mixture under intensive agitation. After the addition of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride the reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature followed by dialysis (MW cut of 10,000) against HEPES-buffered saline (HBS, 10 mM HEPES, 150 mM sodium chloride, pH 7.2) at 4°C with eight changes of the buffer (500 ml, two changes per day). So produced conjugate was aliquoted to small portions and stored at -78°C.

CLA-OVA conjugates

CLA was conjugated to OVA by the following method. The carrier protein (2.5 mg) was dissolved in 125 μ l of the coupling buffer (0.5 M 2-morpholinoethanesulphonic acid-Na, pH 5.0). A solution of CLA (1 mg in 100 μ l N-Methylpyrrolidon) was added to the resulting mixture under intensive agitation. After the addition of N-cyclohexyl-N'-(2-morpholinoethyl)-carbodiimide methyl-p-toluenesulfonate the reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature followed by dialysis (MW cut of 10,000) against HEPES-buffered saline (HBS, 10 mM HEPES, 150 mM sodium chloride, pH 7.2) at 4°C with eight changes of the buffer (500 ml, two changes per day). So produced conjugate was aliquoted to small portions and stored at -78°C.

Immunization

Three mice (age 8 weeks) were primed by injecting with 100 μ g BTG-CLA conjugate emulsified in complete adjuvant (SIGMA, F-5881) and injected into the peritoneum at 90 days before fusion. All other injections were performed into peritoneum by the following time schedule. Incomplete Freud's adjuvant was used from SIGMA (F-5506).

Tabelle 5-7 Time schedule for immunization (chlorambucil)

Immunization	Days before fusion	Amount of antigen μ g	Adjuvant
1	90	100	Complete
2	60	100	Incomplete
3	30	100	Incomplete
4	15	100	W/o adjuvant
5	7	200	W/o adjuvant
6	4	200	W/o adjuvant

Myeloma cell line

The myeloma cell line used was SP2/0-Ag14 from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. The cells were described as not synthesizing or secreting immunoglobulin chains, being resistant to azaguanine (8-AZG) at 20 μ g/ml, and not growing in HAT (hypoxanthine 10⁻⁴ M, aminopterin 10⁻⁵ M and thymidine 4x10⁻⁵ M) medium. The SP2/0 cells were routinely maintained in tissue culture flasks in standard culture media (DMEM + 10% foetal calf serum (FCS) supplemented with 20 μ g/ml 8-AZG to kill any HGPRT⁺ revertants.

One week prior to fusion SP2/0 cells were maintained in standard culture media without 8-AZG.

Cell fusion and plating

Three spleens from immunized mouse were aseptically removed and mixed. Single cell suspension was prepared. Spleen lymphocytes were fused with SP2/0 myeloma cell line (ratio 12 lymphocytes / 1 SP2/0) in the presence of polyethylene glycol 3350. The cells so produced were resuspended in DMEM containing HAT and 20% FCS. The cells were plated into eight 96 well tissue culture plates (Corning-Costar) containing peritoneal exsudate cells as a feeder layer. The plates were incubated for 10 days at 37°C in a humid atmosphere containing 5% carbon dioxide. During this period cells were fed two times with HAT medium.

An aliquot from the spleen cell was cultivated in DMEM with 10% FCS during this time in order to obtain spleen cell culture supernatant as positive control for the assays.

Aliquots of the spleen cells not used in the fusion were frozen in liquid nitrogen.

Screening assay

An indirect ELISA directed mainly for IgG detection was used for cell culture supernatants screening. Assays were carried out in 96 well flat bottom polystyrene microtiter plates (Greiner, Cat.# 756071) prepared as follows: 100 µl aliquot of a solution of 0.5 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 containing 5 µg/ml OVA-CLA conjugate (corresponding to hapten) was added to each well of the plate. After incubation overnight in a moist chamber at 4°C the plate was washed four times with tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris, 500 mM sodium chloride, pH 7.8) containing 0.01% Triton X-100 (washing buffer) and blocked with 200 µl/well 2% gelatin (from cold water fish skin, Sigma, G-7765) in TBS (block buffer) for 1 hour at room temperature. The plates were washed with washing buffer and 100 µl cell culture supernatant were added to the appropriate wells. Cell culture supernatant from SP 2/0 myeloma cells was used as negative control. As positive control served spleen cell culture supernatant.

The plates were incubated at room temperature for 1 h. After several washes the ELISA plates were incubated with goat anti-mouse IgG (mouse Fc specific) conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, A-2429) (50 µl/well; diluted in block buffer 1:5000) for 1 h at room temperature. After a new washing step 150 µl/well substrate buffer (2 mM 4-nitrophenyl phosphate (SIGMA, N3254) in 5% diethanolamine + 0.5 mM MgCl₂, pH 9.8) were added to the plates. The conversion of the substrate was detected in a 12-channel Dynex Opsys MR microplate reader at a wavelength of 405 nm.

Results and conclusions

The growth of the primary hybridoma populations after the fusion was satisfactory. The screening was carried out 10 days after the fusion. The signals obtained after the first screening were relatively low. The spleen cells culture supernatant served as positive control delivered negative signal. Nonetheless 59 primary cells populations were selected as positive (signals less higher than 0.1 after 1 h incubation with the substrate) and were transferred into wells of 24-well plates. Three days later an ELISA was carried out. All obtained signals were negative. Some days later once more an ELISA with 10 $\mu\text{g/ml}$ precoated antigen was carried out. No positive signal could be determined. The spleen cells culture supernatant served as positive control delivered a negative signal in all ELISAs.

We assume that the immune response cause by the antigen chlorambucil was low. The spleens used for the fusion were atypical small. This fact confirm our suggestion that chlorambucil is a weak immunogen or immunosuppressive.

5.1.4 A monoclonal antibody having specific binding ability to cyclophosphamide

Report to order 16589

Issued by **BioGenes GmbH**

For **IUTA**

BioGenes GmbH
Köpenicker Str. 325, 12555 Berlin, Germany
<http://www.biogenes.de>

Institut für Energie-
und Umwelttechnik IUTA e.V.
Umweltmedizin
Bliersheimer Str. 60
D-47229 Duisburg

Immunogen

For development of monoclonal antibodies against cyclophosphamide were used two different conjugates .

For immunization purposes was used cyclophosphamide conjugated to KLH (CYC-KLH) by using reduced KLH.

For screening purposes was used cyclophosphamide conjugated to BSA (CYC-BSA by using reduced BSA

Total amount of both protein preparations used for immunization was $\approx 5000 \mu\text{g}$ (5 mice, $1000 \mu\text{g}$ each).

Cyclophosphamide - KLH conjugates

Cyclophosphamide was conjugated to KLH by the following method. The carrier protein (5 mg) was dissolved in 1 ml of the degassed coupling buffer (0.5 M potassium borate, pH 9.0). To the resulting mixture a solution of 1 M DTT was added to make final concentration of DTT 50 mM. Reduction was proceeded one hour at room temperature. Excess of the reducing agent was removed by desalting on a PD-10 column equilibrated with the coupling buffer.

Cyclophosphamide (5 mg in $200 \mu\text{l}$ NMP) was added during intensive agitation to reduced KLH in the coupling buffer. After the addition of the cyclophosphamide the reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature followed by dialysis (MW cut of 10,000) against

HEPES-buffered saline (HBS, 10 mM HEPES, pH 7.2, 150 mM sodium chloride) at 4°C with eight changes of the buffer (500 ml, two changes per day). So produced conjugate was aliquoted to small portions and stored at -78°C.

Cyclophosphamide - BSA conjugates

This conjugate was made by using above method, with exception that KLH was replaced by BSA.

Immunization

Five mice (age 8 weeks) were primed by injecting with 100 µg of CYC-KLH emulsified in complete adjuvant (Biogenes GmbH) and injected into multiple sites at minus 120 days before fusion. All other injections were performed into multiple sites and intravenous by the following time schedule.

Tabelle 5-8 Time schedule for immunization (cyclophosphamide)

Immunization	Days before fusion	Amount of antigen Per mouse	Adjuvant	Injection route
1	120	100	Complete	Multiple sites
2	60	100	Incomplete	Multiple sites
3	30	100	Incomplete	Multiple sites
4	17	100	Incomplete	Multiple sites
5	7	150	Incomplete	Multiple sites
6	4	150	W/o adjuvant	i.v.
7	3	150	W/o adjuvant	i.v.
8	2	150	W/o adjuvant	i.v.

Myeloma cell line

The myeloma cell line used was SP2/0-Ag14 from German Collection of Microorganisms and Cell Cultures. The cells were described as not synthesizing or secreting immunoglobulin chains, being resistant to azaguanine at 20 µg/ml, and not growing in HAT medium. The SP2/0 cells were routinely maintained in tissue culture flasks in standard culture media (DMEM + 10% foetal calf serum) supplemented with 20 µg/ml 8-AZG to kill any HPRT+

revertants which can grow in HAT-medium. One week prior to fusion SP2/0 cells were maintained in standard culture media without 8-AZG.

Cell fusion and plating

The spleen from immunized mouse was aseptically removed and a single cell suspension was prepared. All spleens looked very small and wrinkled, that is not typically for normal hyperimmunized spleens. Spleen lymphocytes were fused with SP2/0 myeloma cells (ratio 10 lymphocytes / 1 SP2/0) in the presence of polyethylene glycol 1000. The cells so produced were then resuspended in DMEM containing HAT (hypoxanthine 10^{-4} M, aminopterin 10^{-5} M and thymidine 4×10^{-5} M), 20% preselected foetal calf serum and 10% of our newly developed conditioned media. The cells were then plated into five 96 well tissue culture plates (Corning-Costar) containing peritoneal exudate cells as a feeder layer. The plates were incubated for 2 weeks at 37°C in a humid atmosphere containing 5% carbon dioxide. During this period cells were fed two times with HAT medium and two times with HT medium.

Screening assay

An indirect ELISA assay directed mainly for IgG detection was used for cell culture supernatants screening. Assays were carried out in 96 well flat bottom polystyrene microtiter plates (Greiner, Cat.# 756071) prepared as follows: a 50 μl aliquot of a solution of 0.1 M carbonate/bicarbonate buffer, pH 9.6 CYC-BSA at a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ was added to each well of the plate. After incubation overnight at 4°C the plate was washed four times with PBS containing 0.01% Triton X-100 and blocked with 2% Gelatin (from cold water fish skin, Sigma, G-7765) in TBS 1 hour at room temperature. 100 μl aliquot of the cell culture supernatant was added to the appropriate assay well. As negative control wells were used wells with cell culture supernatant from SP 2/0 myeloma.

The assay plates were incubated at room temperature for 1 h. They were then washed four times with tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris, pH 7.8, 500 mM sodium chloride) containing 0.01% Triton X-100. Determination of bound antibodies was accompanied with a goat anti-mouse IgG (mouse Fc specific) conjugated to alkaline phosphatase (Sigma, A-2429). Quantification of bound enzyme was performed with the help of a paranitrophenol-containing substrate buffer in the Dynex Opsys MR microplate reader.

For competitive assay, undiluted cell culture supernatants were firstly preincubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of free cyclophosphamide as competitor for 1 h at room temperature and then added to CYC-BSA coated well. The assay plates were incubated at room temperature for 1 h. It was then washed four times with tris-buffered saline (TBS, 50 mM Tris, pH 7.8, 500 mM sodium chloride) containing 0.01% Triton X-100. Determination of bound antibodies was accompanied with a goat anti-mouse IgG (mouse Fc specific) conjugated to alkaline

phosphatase (Sigma, A-2429). Quantification of bound enzyme was performed with the help of a paranitrophenol-containing substrate buffer in the Dynex Opsys MR microplate reader.

Results of the first screening

On day 10 after fusion we found only 12 wells that contain growing cells. Such situation is atypical for our fusions. We consider, that such result was due to all spleens looking very small and wrinkled. But cell culture supernatants from these wells were subjected to screening.

Results of the competitive assay with competitor (free cyclophosphamide at 10 µg/ml) are shown in the following table

Tabelle 5-9 Results of the first screening (cyclophosphamide)

30 min incubation with substrate		
Culture	no Competitor	Competitor 10 µg/ml of cyclophosphamid
1	0,020	0,015
2	0,012	0,010
3	0,012	0,008
4	0,013	0,006
5	0,008	0,016
6	0,012	0,015
7	0,002	0,001
8	0,023	0,003
9	1,028	1,014
10	0,028	0,021
11	0,007	0,006
12	0,025	0,026

As indicated in the table, only one primary population shows positive signal with CYC-BSA conjugate, but no competition with free cyclophosphamide. At this stage the current project was terminated.

5.2 Funktionsnachweis des Detektionsprinzips (Hochschule Niederrhein)

Nach der Produktion der Antikörper durch die Fa. BioGenes wurde in einem ersten Schritt das Nachweissystem geprüft. Dazu wurden ein indirekter kompetitiver und ein nicht kompetitiver ELISA durchgeführt. Das Ziel hierbei war, eine Entscheidung zu treffen, mit welchem Klon der Wischtest entwickelt werden sollte. Des Weiteren wurde die optimale Beladung des Goldkolloids mit Antikörpern ermittelt, um relevante Konzentrationsbereiche mit dem Wischtest erkennen zu können.

Der ELISA ermöglicht ein quantitatives Screening nach einem bestimmten Antigen mit Antikörpern bekannter Spezifität. Bei Einsatz eines Antigens bekannter Struktur ist es weiterhin möglich, nach spezifischen Antikörpern für diese Substanz zu suchen. Der Assay wird in Mikrotiterplatten durchgeführt.

5.2.1 Indirekter nicht kompetitiver ELISA zum Nachweis von Methotrexat

Im indirekten nicht kompetitiven ELISA (Abbildung 3) wird das Antigen (Zytostatikum/BSA-Konjugat) über elektrostatische Wechselwirkung an der Kunststoffoberfläche der Mikrotiterplatte immobilisiert. Nichtbesetzte Bindungsplätze werden durch eine Blockierlösung abgesättigt, um unspezifische Bindung der Antikörper an die Mikrotiterplatte zu verhindern. Anschließend wird der erste Antikörper im Überschuss zugegeben und für die Bindung an seinem Antigen inkubiert. Die Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgt mit einem zweiten Antikörper, der mit einem Enzym (alkalische Phosphatase) gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt ein geeignetes Substrat (p-Nitrophenylphosphat) zu einem Produkt um, welches photometrisch detektiert werden kann.

Bevor der ELISA routinemäßig zum Einsatz kam, wurde der Testablauf soweit optimiert, dass eine zuverlässige Empfindlichkeit erzielt werden konnte. Dies wurde sowohl durch die Veränderungen der Blockierungs- und Inkubationsbedingungen, als auch der Konzentrationen des primären Antikörpers und des Antigens erreicht.

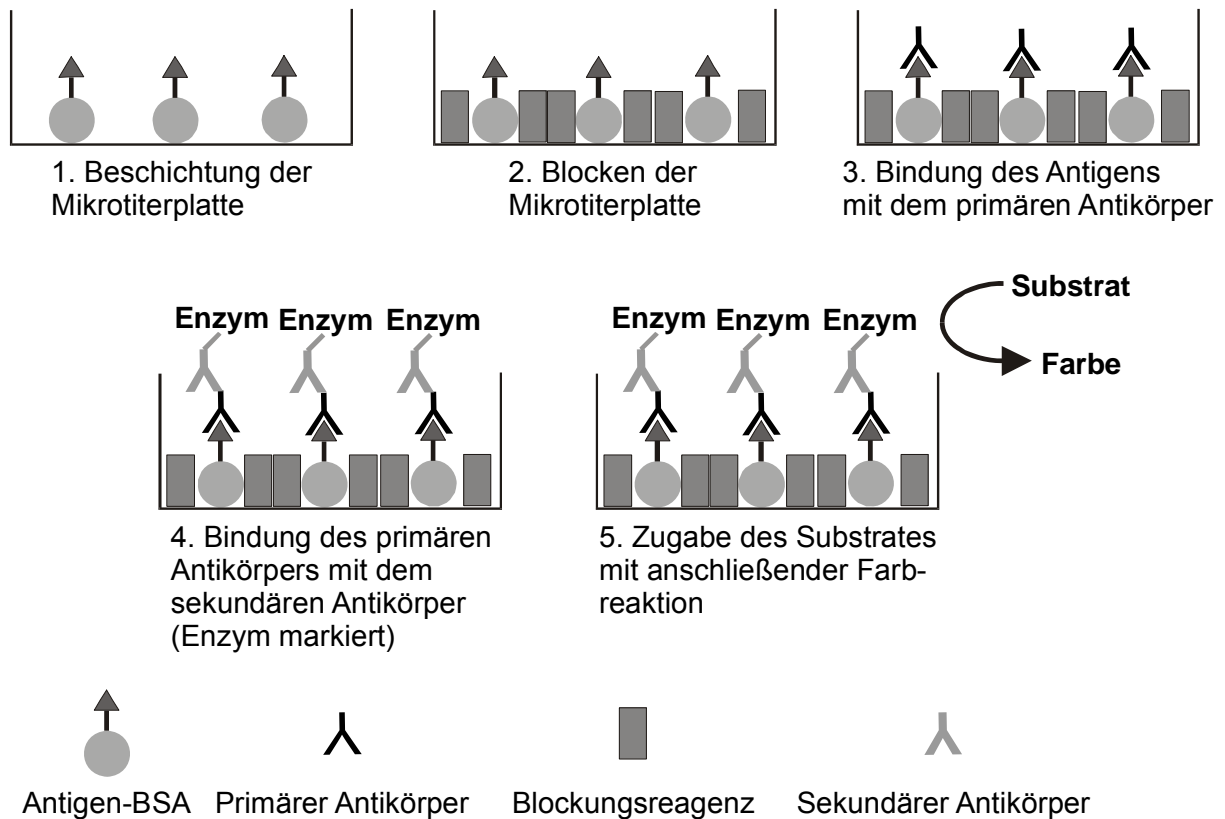


Abbildung 3 Schematischer Ablauf des indirekten nicht kompetitiven ELISA

5.2.1.1 Ermittlung der optimalen Blockierungsbedingungen

Als erster Schritt zur Optimierung eines indirekten ELISA erfolgte die Ermittlung der optimalen Blocker und Blockierungsbedingungen, um die Background-Aktivität reduzieren zu können. Dazu wurde die Blockierungstemperatur und Zeit variiert.

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist, erwies sich eine 2-stündige Inkubation bei 37 °C als optimal.

Unter diesen Bedingungen wurden der Superblocker der Firma Pierce und Gelatine verglichen. Da das unspezifische Hintergrundsignal beim Blocken mit dem Superblocker wesentlich höher war (Abbildung 5), wurde in allen weiteren Untersuchungen mit 2 % Gelatine geblockt.

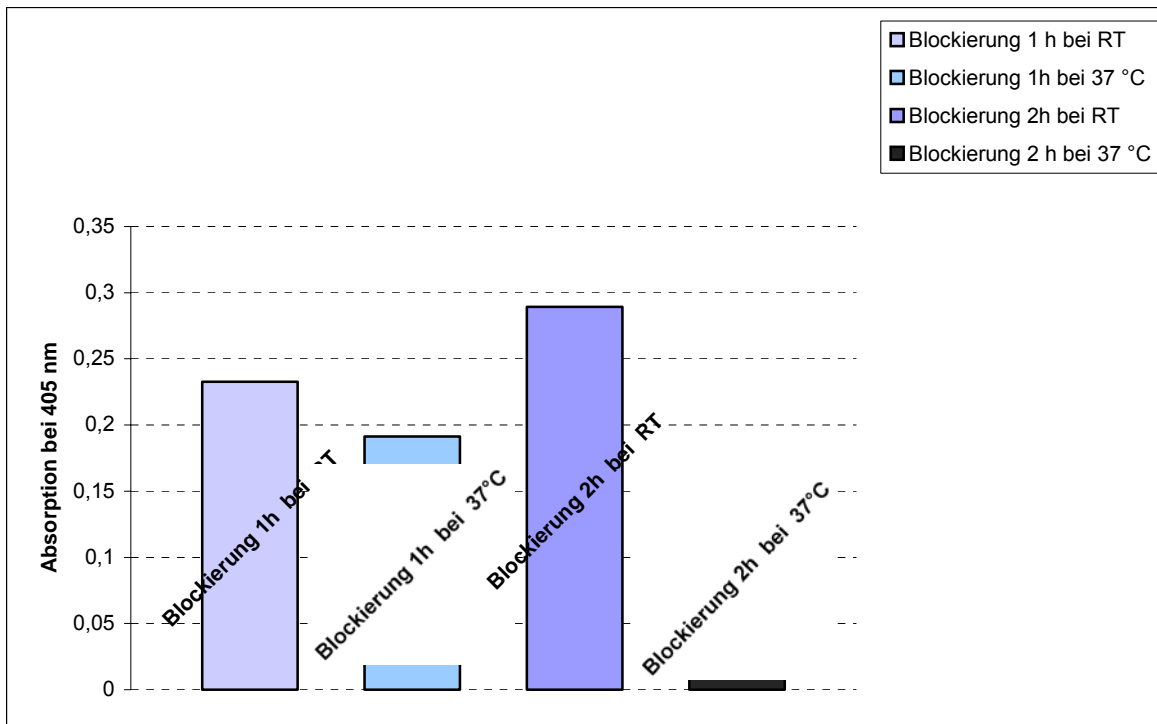


Abbildung 4 Optimierung der Blockierungszeit und -temperatur

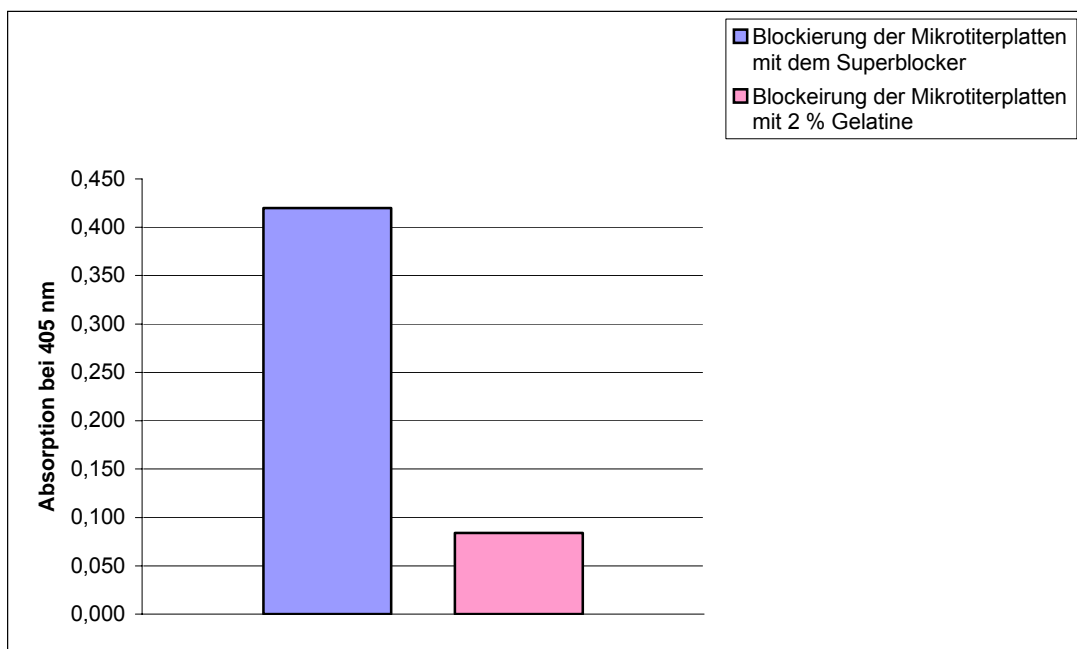


Abbildung 5 Vergleich des Hintergrundrauschens nach Einsatz des Superblockers und von Gelatine als Blockierungsmittel

5.2.1.2 Optimierung der Inkubationsbedingungen des Antigens und des primären Antikörpers

Als weiterer Schritt zur Optimierung eines indirekten ELISA erfolgte die Ermittlung der optimalen Inkubationszeit und -temperatur für die Bindung des primären Antikörpers sowie des Antigens. Dazu wurde die Inkubation einerseits mit dem Antigen 16 h bei 4 °C sowie 2 h bei RT und andererseits mit dem primären Antikörper 16 h bei 4°C, 2 h bei RT und 1 h bei 37 °C durchgeführt. Wie aus Abbildung 6 und Abbildung 7 ersichtlich, wurde nach einer 2-stündigen Inkubation mit dem Antigen bei Raumtemperatur und einer 16-stündigen Inkubation des primären Antikörpers bei 4 °C das höchste Signal erreicht.

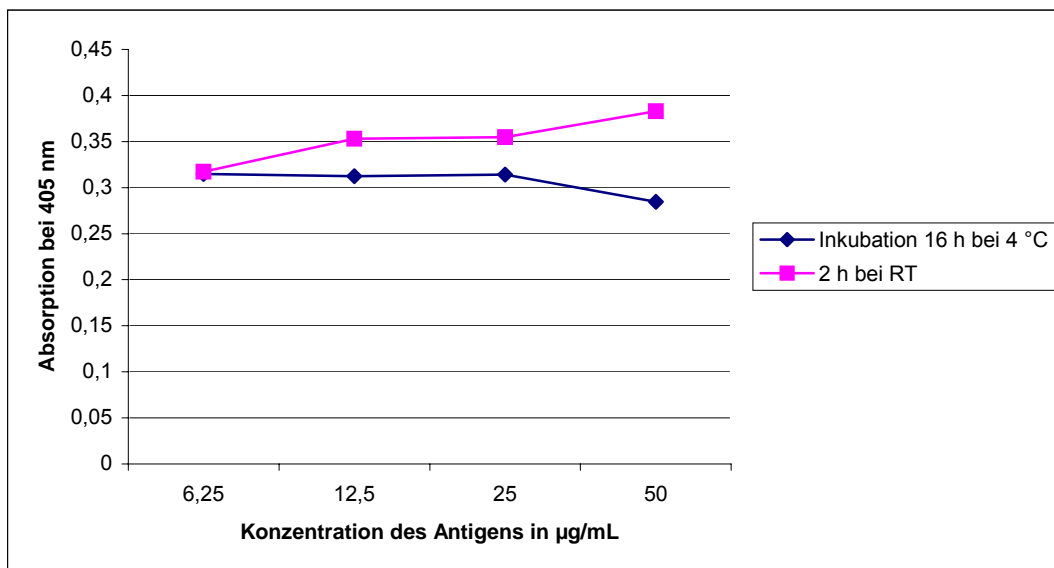


Abbildung 6 Ermittlung der optimalen Inkubationszeit und -temperatur für das Antigen

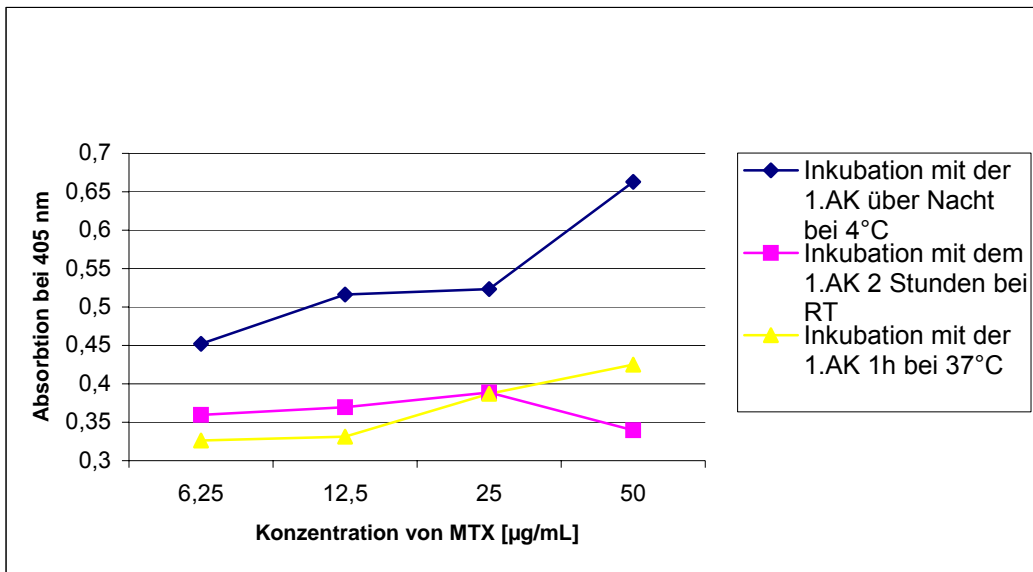


Abbildung 7 Ermittlung der optimalen Inkubationszeit und -temperatur für den primären Antikörper

5.2.1.3 Ermittlung der optimalen Antigen-Konzentration

Da das Ziel des Testes der Nachweis des freien Methotrexates ist, wurde zunächst versucht, nicht mit BSA konjugiertes Methotrexat an die Mikrotiterplatte zu binden. Es erwies sich, dass zwar eine lineare Abhängigkeit des Signals von der Methotrexatkonzentration auftrat, jedoch das Signal kaum vom Hintergrundrauschen zu unterscheiden war. Deshalb wurde zum Vergleich der verschiedenen Antikörper an BSA konjugiertes Methotrexat eingesetzt (Abbildung 8).

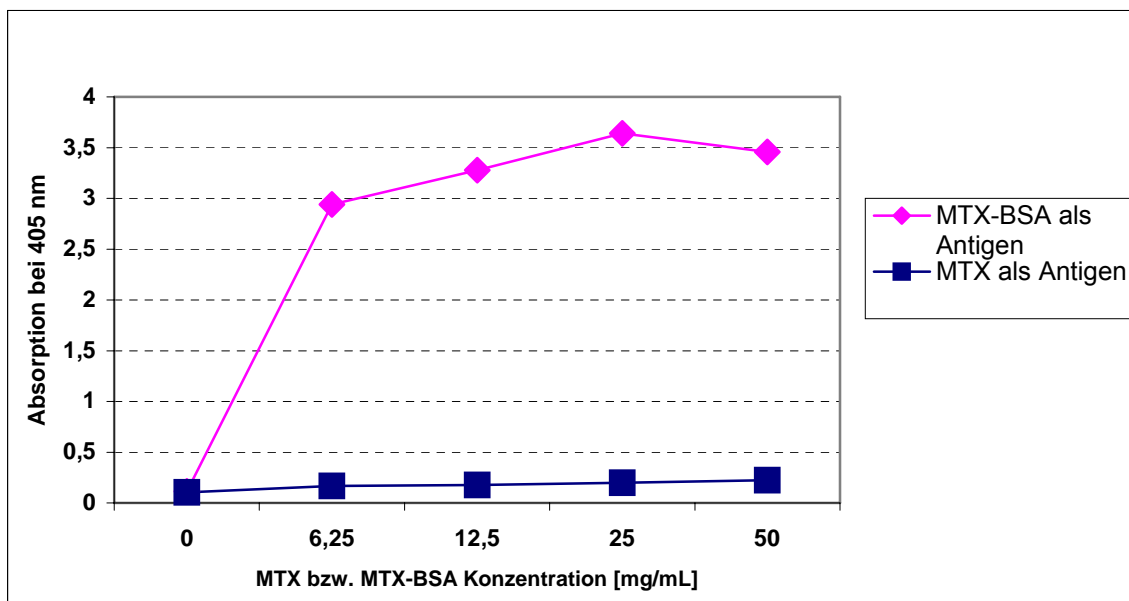


Abbildung 8 Vergleich: Methotrexat und an BSA gekoppeltes Methotrexat als Antigen

Darauf aufbauend wurden die Konzentrationsbereiche des mit BSA konjugierten Antigen ermittelt.

Die optimale Verdünnung von Antigen oder Antikörper für die Anwendung im ELISA wird durch Titration bestimmt. Allgemein gilt, dass die Konzentration von Antikörper oder Antigen als optimal betrachtet wird, wenn der Extinktionswert im oberen Abschnitt des steilen Teils der Kurve (sigmoider Kurvenverlauf) oder nahe des höchsten Extinktionswertes bei linearem Verlauf liegt.

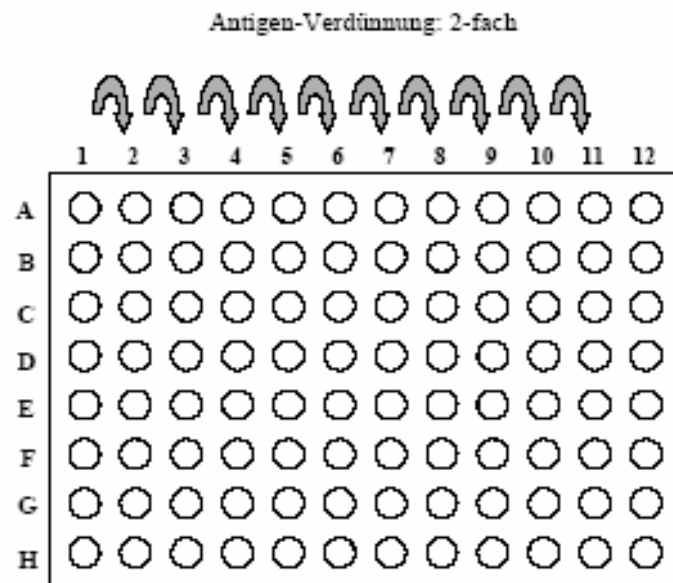


Abbildung 9 Verdünnung des Antigens in der Platte von Reihe 1 bis 11. Reihe 12 wurde nur mit Puffer versetzt.

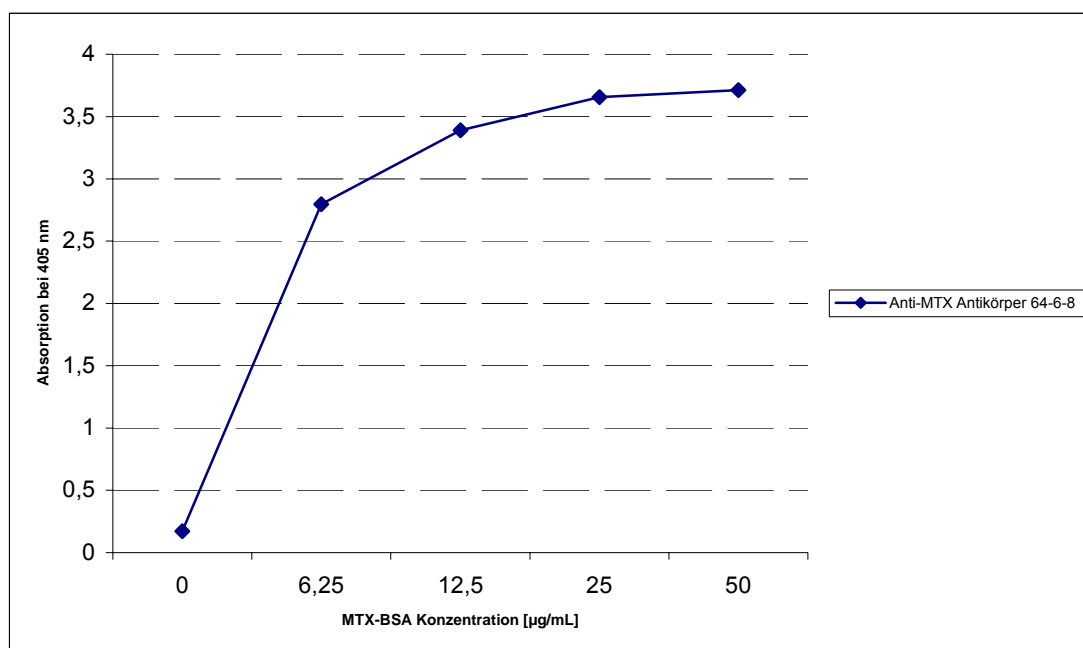


Abbildung 10 Ermittlung des Konzentrationsbereichs des Antigens

Abbildung 10 zeigt den Einfluss der Antigen-Konzentration auf die Extinktion im indirekten ELISA. Die Antigene wurden in einer jeweils zweifachen Verdünnungsreihe eingesetzt (von 6,25 bis 50 µg/mL) und an die Mikrotiterplatte angelagert. Als negative Kontrolle diente ein Test ohne Antikörper. Der Extinktionswert bei einer Konzentration des Antigens von 50 µg/ml wies den maximalen Wert (OD Wert ≥ 2) auf. In diesem Plateau-Bereich war das Antigen in einem Sättigungszustand.

Die optimale Antigen-Konzentration lag im Bereich von 6,25 bis 25 µg/mL. Deshalb wurde 12,5 µg/mL als optimale Antigen-Konzentration verwendet.

5.2.1.4 Ermittlung der optimalen primären Antikörper-Konzentration

Bei der Wahl der optimalen Konzentration des Antikörpers war zu berücksichtigen, dass die Konzentration nicht zu hoch sein darf, um eine unspezifische Reaktion zu verhindern. Andererseits darf sie nicht zu gering sein, damit die Sensitivität erhalten bleibt.

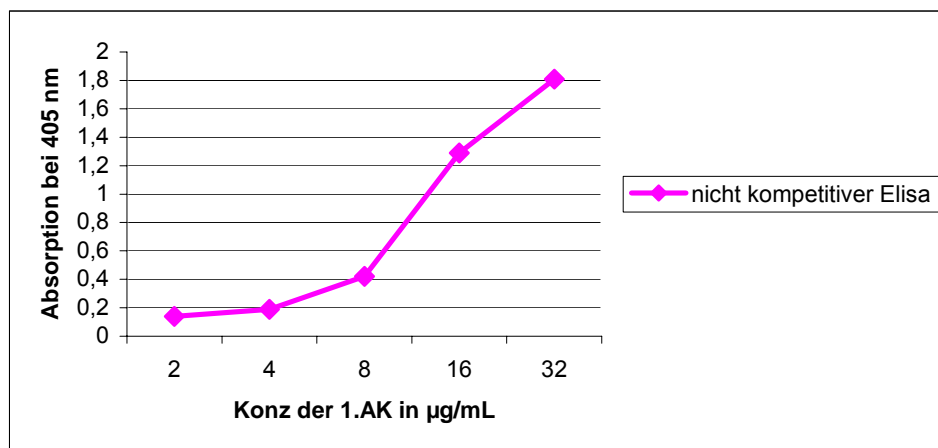


Abbildung 11 Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration für den nicht kompetitiven ELISA

Bei der Ermittlung der optimalen primär-Antikörper-Konzentration wurde der ELISA bei den optimierten Bedingungen mit Konzentrationen des primären Antikörpers von 2 µg/mL bis 32 µg/mL durchgeführt.

Wie die Abbildung 11 zeigt, lag eine Linearität zwischen Antikörperkonzentration und Signal in dem Bereich zwischen 8 und 32 µg/mL vor. Die Konzentration 16 µg/mL wurde als optimal betrachtet.

5.2.1.5 Ermittlung des optimalen Anti-MTX-Klons

Die Bindung des Antikörpers an das Antigen ist eine Gleichgewichtsreaktion, die dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung 1) gehorcht. Die Stabilität des Antigen-Antikörper-Komplexes (Ag:AK) ist abhängig von der Affinität des entsprechenden Paratops zum Epitop. Da die Gleichgewichtseinstellung temperaturabhängig ist, wurde bei vergleichenden

Untersuchungen immer bei derselben Temperatur gearbeitet. Durch den Waschvorgang ist ein Lösen der Ag:AK-Bindung möglich, wenn eine geringe Affinität vorliegt.

Gleichung 1

$$\frac{[Ag : AK]}{[Ag] + [AK]} = \frac{k_1}{k_2} = k_c$$

Nach einer Optimierungsreihe des indirekten ELISAs wurden alle Klone nach dem optimierten Schema (Abbildung 12) verglichen.

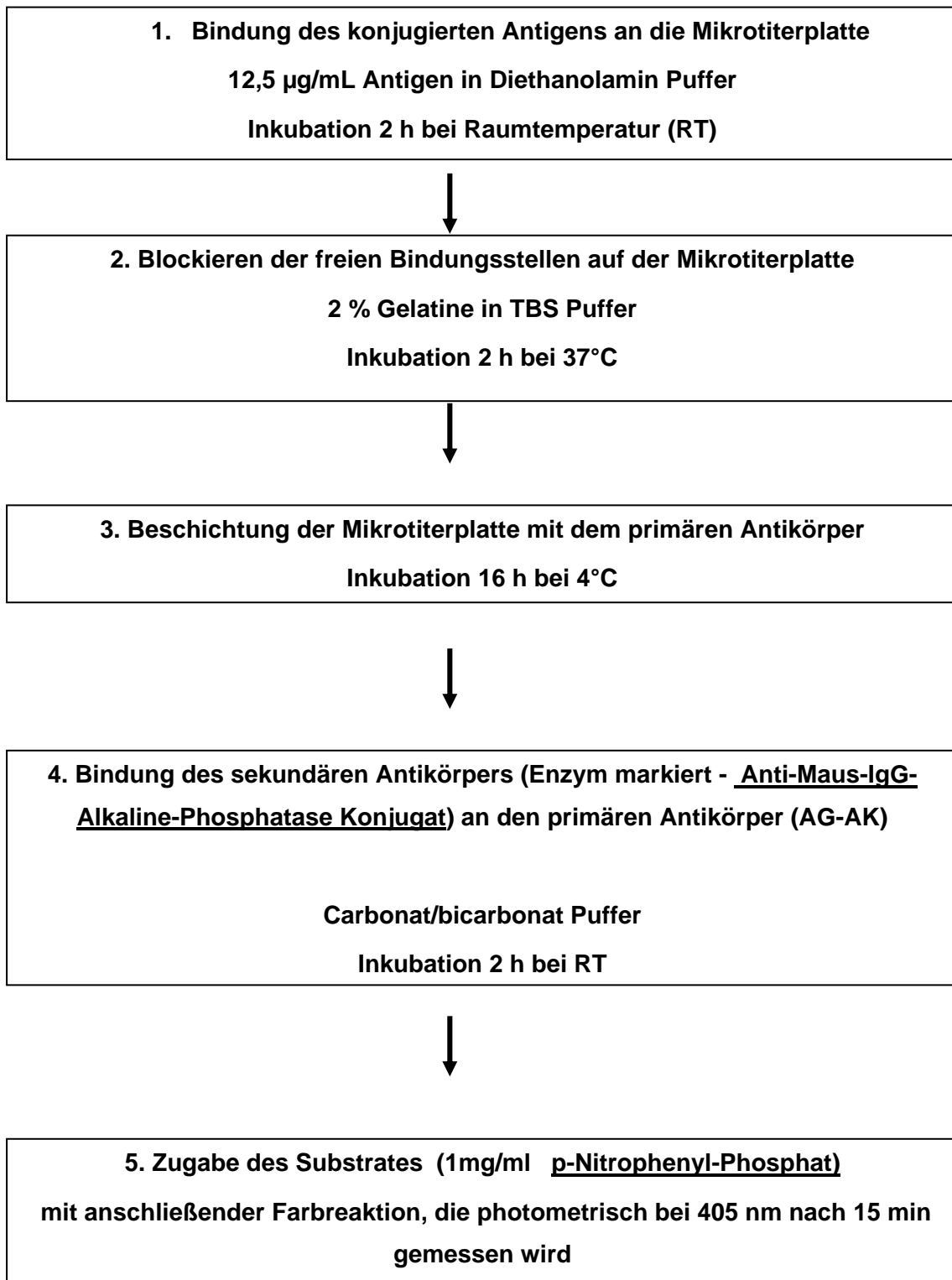


Abbildung 12 Parameter des optimierten indirekten nicht kompetitiven ELISA

Hierzu wurde das Antigen-Konjugat an die Platte gebunden, die freien Bindungsstellen mit Gelatine belegt. Nach der Inkubation mit dem primären Methotrexat-Antikörper, dem Waschvorgang und Bindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper wurden durch die Klone 10-3-6, 2-20-1 und 13-1-3 die höchsten Signale erhalten. In Abbildung 13 sind vergleichend die Absorptionswerte dargestellt.

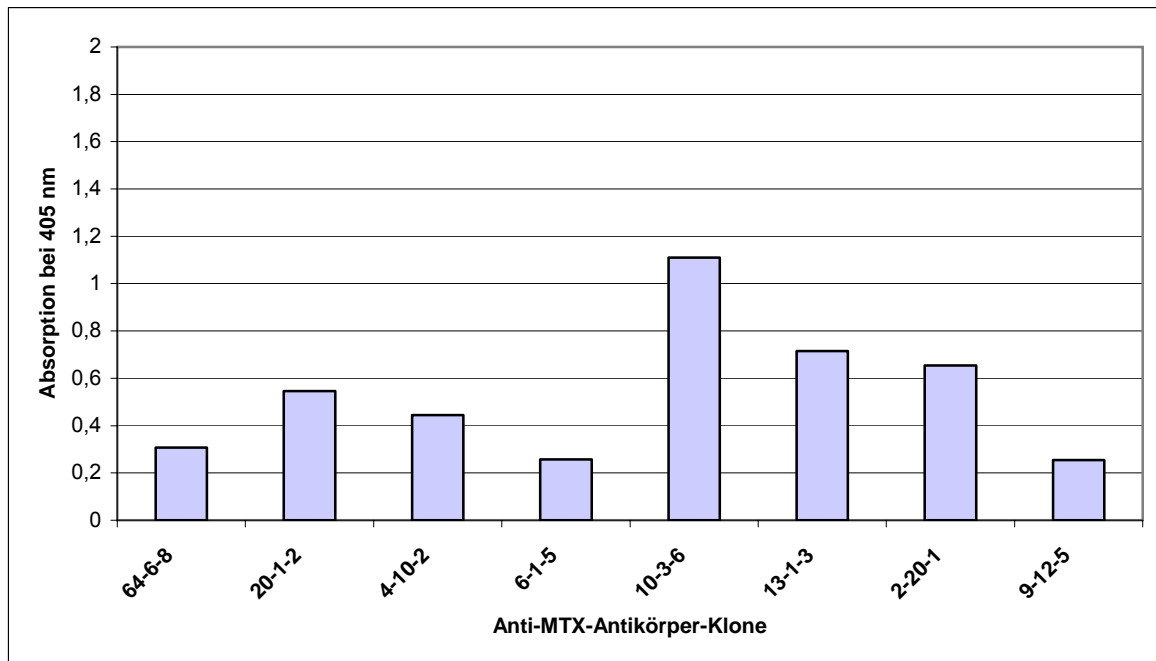


Abbildung 13 Affinitätsvergleich der verschiedenen Anti-Methotrexat-Antikörper-Klone

5.2.2 Indirekter kompetitiver ELISA zum Nachweis von Methotrexat

Der Wischtest sollte so aufgebaut werden, dass in der Reaktionszone das Zytostatikum mit dem an Goldkolloide gebundenen Antikörper bindet. Freie Antikörper werden in der Testlinie an BSA-Zytostatikum gebunden. Da der Komplex bestehend aus freiem Zytostatikum und Antikörper diese Zone passieren muss, um anschließend in der Kontrolllinie an Anti-Maus-Antikörper gebunden zu werden, musste sichergestellt werden, dass der gewählte Antikörper keine geringere Affinität zum freien Zytostatikum hat als zum BSA-Zytostatikum-Konjugat. Um zu überprüfen, ob bei einer Konkurrenzreaktion freies Zytostatikum durch BSA-Konjugat verdrängt wird, wurde ein kompetitiver Test durchgeführt.

Im indirekten kompetitiven ELISA (Abbildung 14) wird die Mikrotiterplatte mit Antigen (Zytostatikum/BSA-Konjugate) beschichtet und der für das Testantigen spezifische Antikörper wird mit dem freien Zytostatikum hinzugefügt. In einer Modifikation dieser Methode können der Antikörper und das Zytostatikum zusammen inkubiert werden, bevor sie zu der antigenbeschichteten Platte zugegeben werden. Grundsätzlich konkurriert bei beiden Varianten das freie mit dem konjugierten Antigen um den Antikörper.

Wenn das freie Zytostatikum an den Antikörper gebunden hat, wird die Bindung an das auf

der Mikrotiterplatte immobilisierte Zytostatikum/BSA-Konjugat verhindert. Somit ergibt sich eine Verringerung des photometrisch bestimmaren Signals.

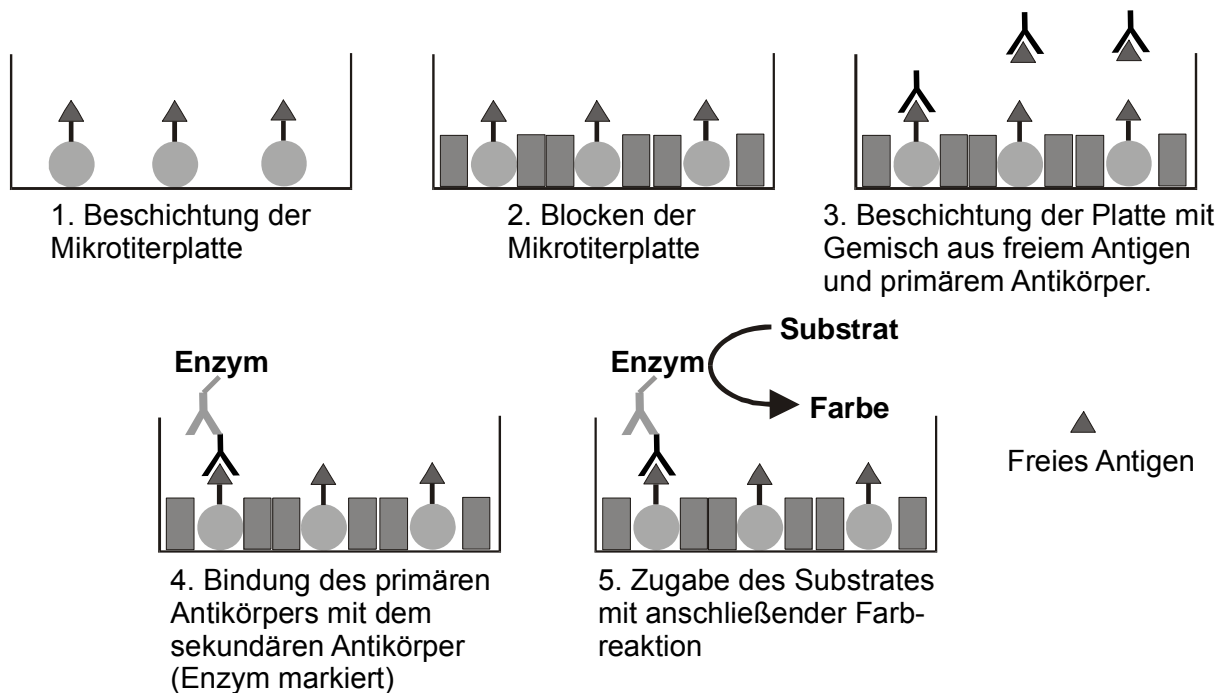


Abbildung 14 Schematischer Ablauf des indirekten kompetitiven ELISA

5.2.2.1 Vergleich des kompetitiven und nicht kompetitiven ELISAs

Mit den für den nicht kompetitiven ELISA optimierten Bedingungen wurde ein kompetitiver ELISA nach dem Schema in Abbildung 14 aufgebaut.

In dieser Versuchsreihe wurde an die Mikrotiterplatte mit BSA-konjugiertes Zytostatikum gebunden und freie Bindungsstellen mit Gelatine belegt. Die Antikörper wurden, bevor sie auf die Mikrotiterplatte dosiert wurden, mit freiem Zytostatikum inkubiert. Orientierend wird in Abbildung 15 deutlich, dass eine Konkurrenz stattfindet, denn das Signal ist sehr schwach im Vergleich zum nicht kompetitiven Test, da hier der freie Antikörper an das BSA-Zytostatikum-Konjugat auf der Mikrotiterplatte bindet.

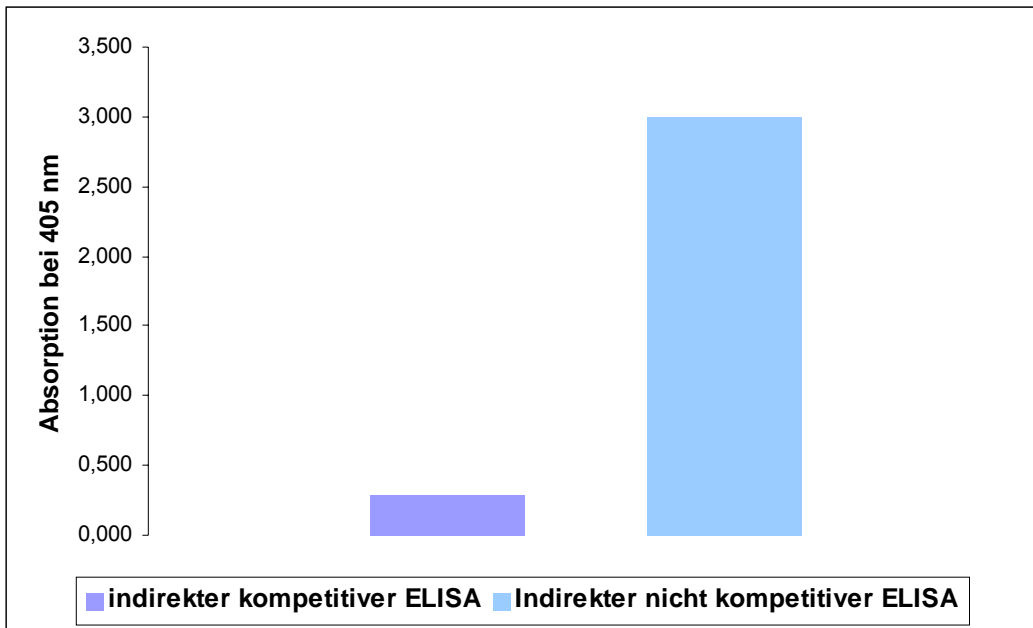


Abbildung 15 Vergleich des kompetitiven und nicht kompetitiven ELISA

5.2.2.2 Ermittlung der optimalen MTX-Konzentration

Im nächsten Schritt wurde die Zytostatikum-Konzentration ermittelt, die für die Konkurrenz eingesetzt werden sollte. Da bei den drei getesteten Konzentrationen kaum Signalunterschiede auftraten, wurde im kompetitiven ELISA 12,5 µg/mL freies Methotrexat mit Antikörpern inkubiert; das entsprach der in den Kavitäten vorliegenden BSA-MTX-Konzentration.

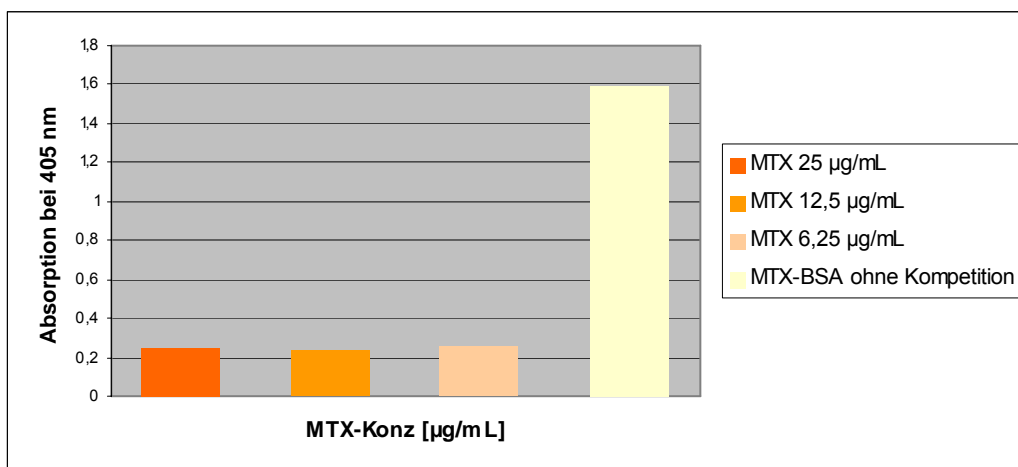


Abbildung 16 Ermittlung der optimalen MTX-Konzentration

5.2.2.3 Ermittlung der optimalen Anti-MTX-Antikörperkonzentration

Besitzt der Antikörper eine gute Affinität zum Antigen, bleibt dieser Komplex auch während des Kontaktes mit dem an die Mikrotiterplatte gebundenen Antigen erhalten. Mit der oben definierten Antigenkonzentration wurde im Weiteren gearbeitet, variiert wurde die Antikörperkonzentration.

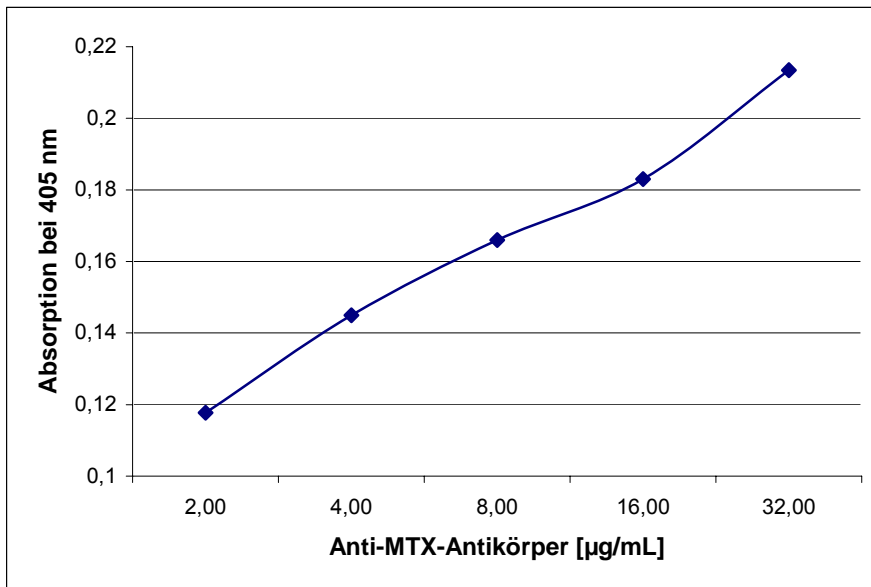


Abbildung 17 Ermittlung der optimalen Anti-MTX-Antikörper-Konzentration

Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender Antikörperkonzentration im Konzentrationsbereich von 2 bis 32 µg/mL eine Linearität zwischen Antikörperkonzentration und Signal vorlag. In den folgenden Untersuchungen wurde mit 16 µg/mL Anti-MTX-Antikörper gearbeitet (Abbildung 17).

Abschließend wurden alle Klone nach dem optimierten Schema (Abbildung 18) verglichen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 und Abbildung 20 dargestellt. Die Antikörper der Klone 2-20-1, 10-3-6 und 13-1-3 zeigten im kompetitiven und nicht kompetitiven Test die größte Affinität sowohl zum freien als auch zum konjugierten Antigen.

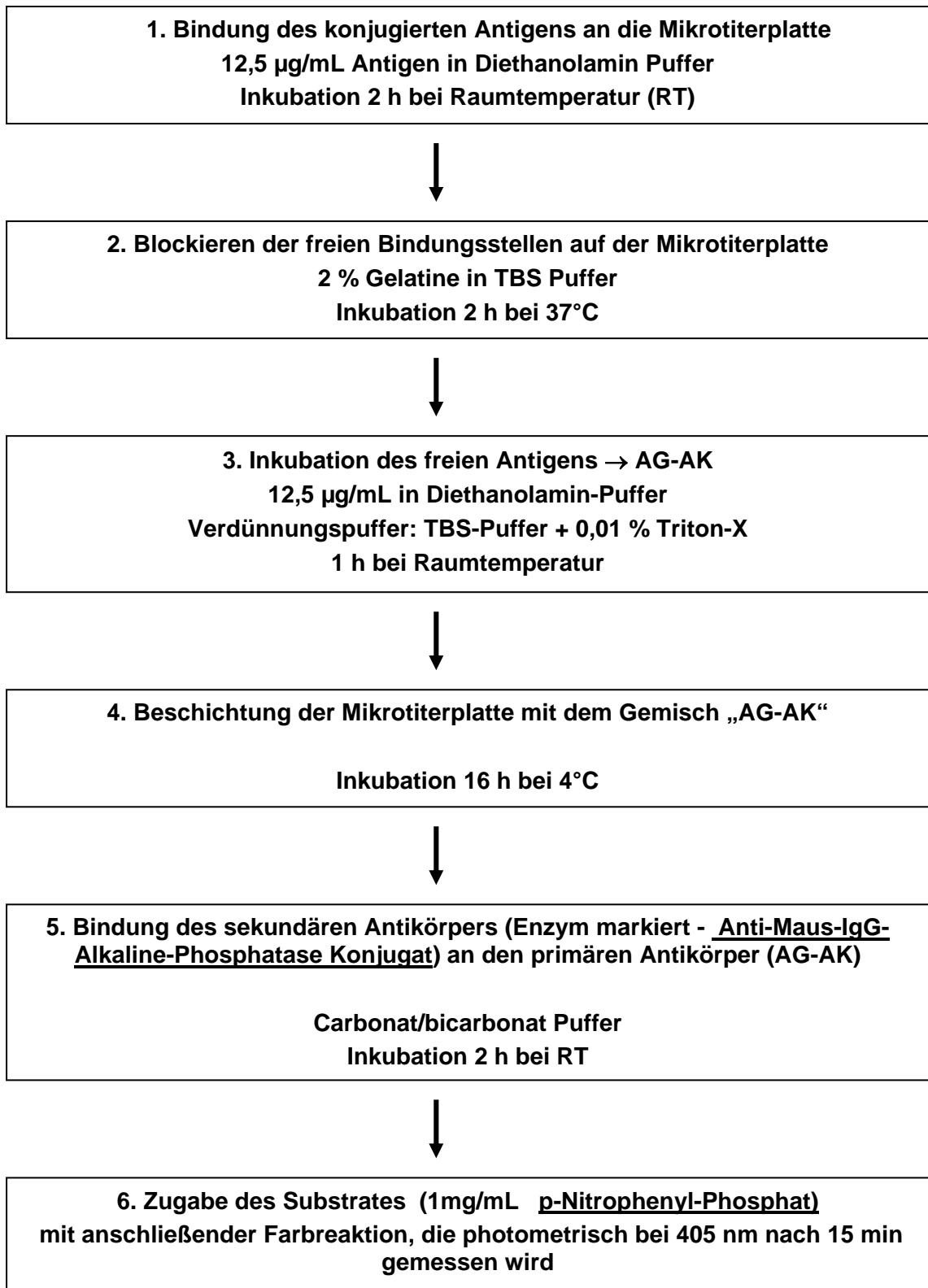


Abbildung 18 Parameter des optimierten kompetitiven ELISA

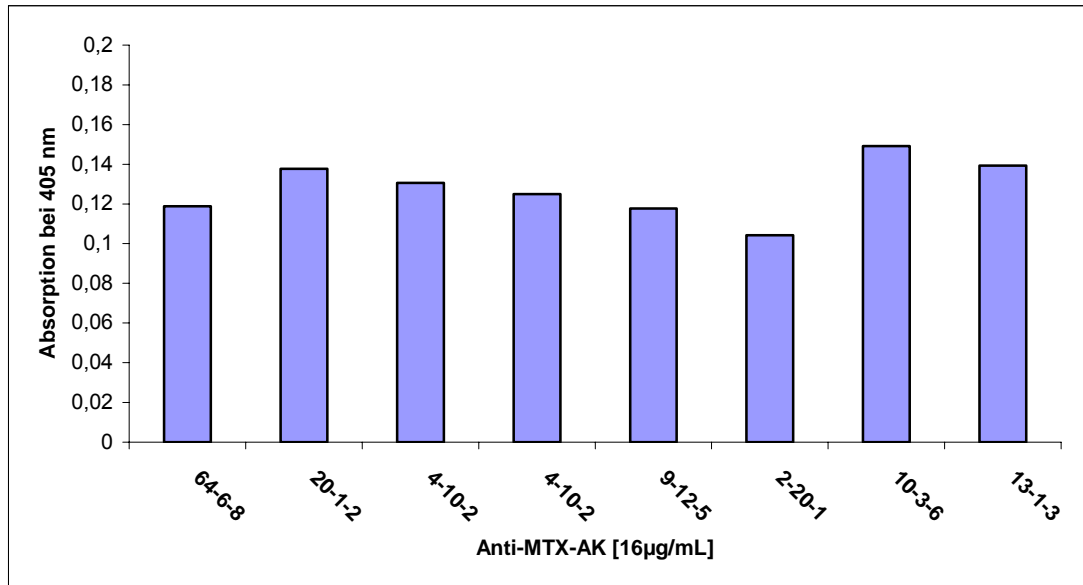


Abbildung 19 Vergleich der verschiedenen Anti-Methotrexat-Antikörperklone im kompetitiven ELISA

Alle Antikörper binden sowohl freies als auch BSA-konjugiertes Zytostatikum. Die Signalstärke im nicht kompetitiven Test ist bei den Antikörpern 2-20-1, 10-3-6 und 13-1-3 am stärksten (Abbildung 20).

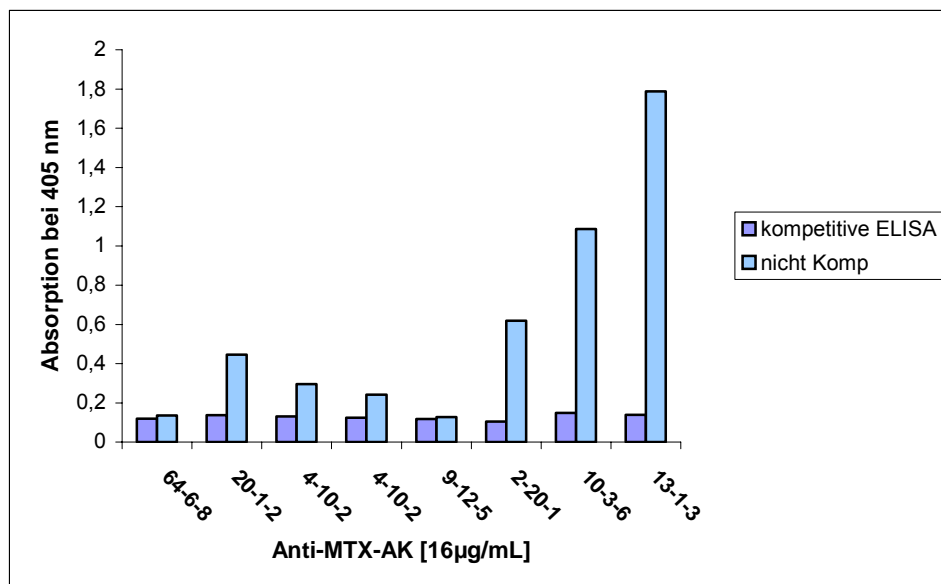


Abbildung 20 Vergleich der verschiedenen Anti-Methotrexat-Antikörperklone im kompetitiven und nicht kompetitiven ELISA

Da bei immunologischen Tests keine absoluten Werte aufgrund starker Schwankungen angegeben werden können, wird bei jedem kompetitiven Test das Verhältnis der

Signalstärken in % (häufig auch als % Bo-Wert bezeichnet) in Gegenwart und Abwesenheit der nachzuweisenden Substanz berechnet. Liegt keine Testsubstanz vor, ergibt sich ein Wert von 100 %, da keine Konkurrenz eintritt. Mit steigender Testsubstanzkonzentration sinkt der % Bo-Wert. Je höher die Bindung der freien Testsubstanz an die Antikörper ist, desto niedriger sind die % Bo-Werte. Unter definierten Bedingungen heißt das, dass die Konkurrenz zwischen freiem und gebundenem Methotrexat um so größer ist, je kleiner der % Bo-Wert ist.

Dies trat bei den Antikörpern der Klone 2-20-1, 10-3-6 und 13-1-3 auf.

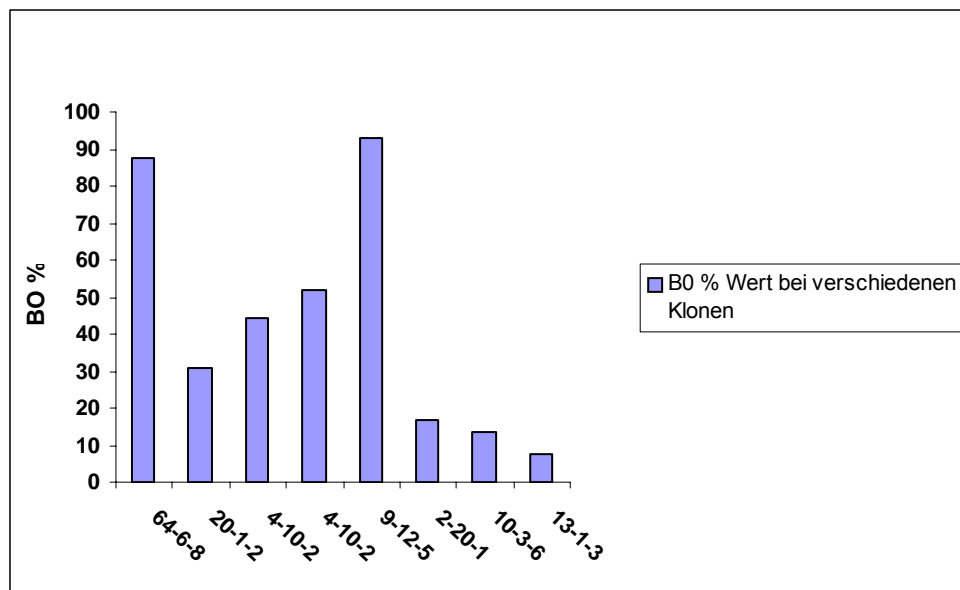


Abbildung 21 Darstellung der Bo %-Werte der verschiedenen Anti-Methotrexat-Antikörperklone für den kompetitiven ELISA

5.2.2.4 Kreuzreaktivität

Antikörper können ggf. nicht nur eine Affinität zu dem Antigen haben, das zur Immunisierung verwendet wurde, sondern auch zu anderen strukturell verwandten Analyten mit identischen oder ähnlichen Epitopen. Allerdings liegt dann meist eine niedrigere Affinität vor. Diese Kreuzreaktivität kann nachteilig sein oder zu falsch-positiven Ergebnissen führen, wenn ein Analyt quantitativ bestimmt werden soll. Aus diesem Grund wurde mit einem indirekten nicht kompetitiven ELISA ermittelt, ob Kreuzreaktionen gegenüber BSA, Folsäure und Fluorouracil auftreten (Abb. 23). Mit dem Anti-MTX-Antikörper 13-1-3 ließen sich BSA, Folsäure und Fluorouracil nicht nachweisen.

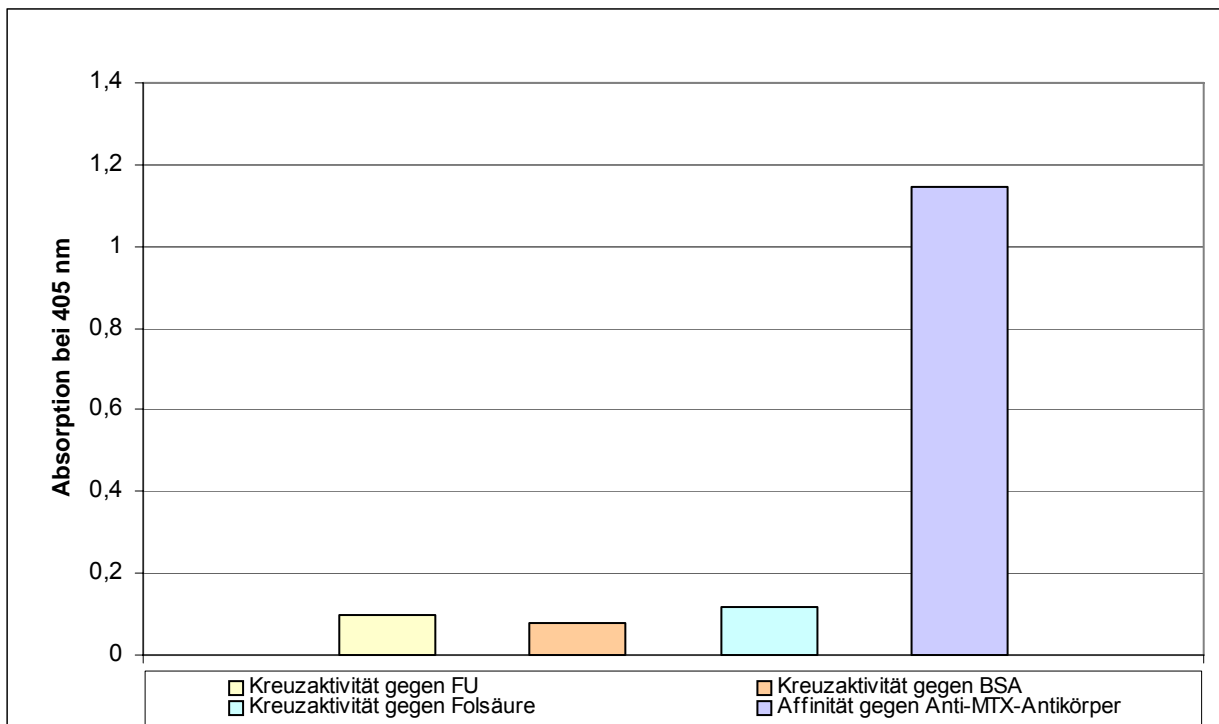


Abbildung 22 Ermittlung der Kreuzreaktion des Anti-Methotrexat-Antikörpers

5.2.2.5 Wahl des Anti-MTX-Antikörpers für den Einsatz im Wischtest

Beim Vergleich der verschiedenen Antikörper zeigte sich, dass die Antikörper der Klone 2-20-1, 10-3-6 und 13-1-3 die höchsten Signale sowohl im nicht kompetitiven als auch im kompetitiven Test zeigten. Daher wurde für den Aufbau des Tests der Klon 13-1-3 gewählt.

5.2.3 Indirekter nicht kompetitiver ELISA zum Nachweis von 5-Fluorouracil

Nach dem gleichen Schema, wie für Methotrexat beschrieben, wurden die gegen 5-Fluorouracil gerichteten Antikörper verglichen. Es ergaben sich die gleichen optimalen Blockierungs- und Inkubationsbedingungen wie beim indirekten ELISA zum Nachweis von Methotrexat (siehe 5.2.1 oben).

5.2.3.1 Ermittlung der optimalen Antigen-Konzentration

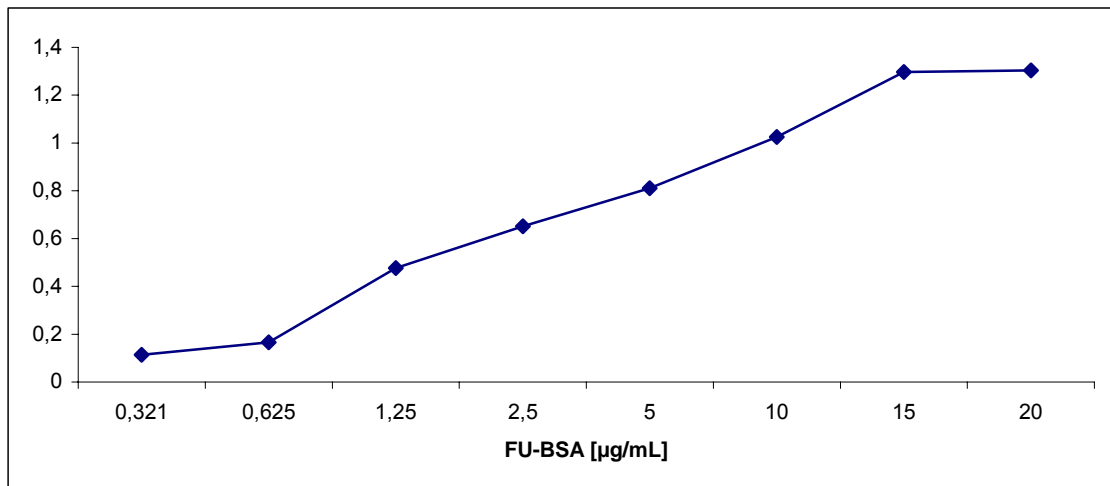


Abbildung 23 Ermittlung des Konzentrationsbereiches des Antigens

Das FU-BSA-Konjugat wurde in jeweils zweifacher Verdünnungsreihe eingesetzt (von 0,321 bis 20 $\mu\text{g/mL}$) und die Mikrotiterplatte damit beschichtet. In der Negativ-Kontrolle wurde kein Antikörper eingesetzt.

Abbildung 23 zeigt, dass der Extinktionswert bei einer Verdünnung des Antigens von 15 und 20 $\mu\text{g/mL}$ den maximalen Wert aufwies. In diesem Plateau-Bereich war das Antigen in einem Sättigungszustand.

Die optimale Antigen-Konzentration lag im Bereich von 1,25 bis 10 $\mu\text{g/mL}$. Für alle weiteren Tests wurde eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ Antigen eingesetzt.

5.2.3.2 Ermittlung der optimalen primären Antikörper-Konzentration

Bei der Ermittlung der optimalen primären Antikörper-Konzentration wurde der ELISA unter optimierten Bedingungen mit AK-Konzentrationen von 1,25 bis 15 $\mu\text{g/mL}$ durchgeführt.

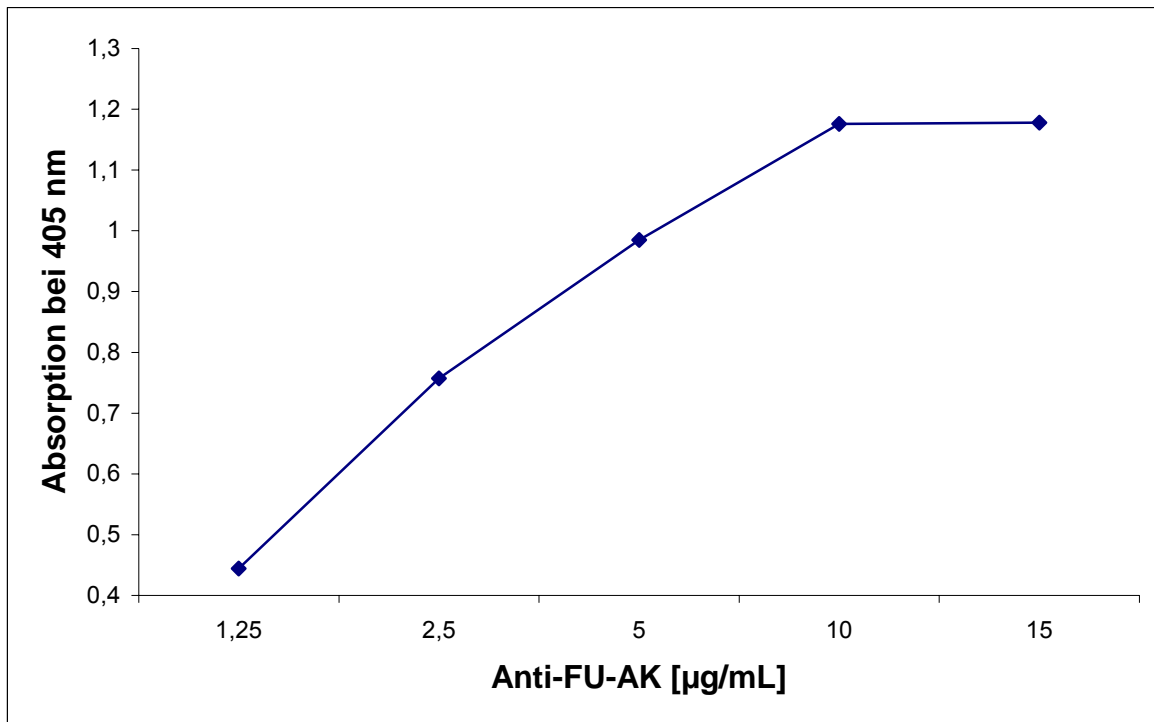


Abbildung 24 Ermittlung der optimalen primären Antikörper-Konzentration für den nicht kompetitiven ELISA

Wie die Abbildung 24 zeigt, lag eine Linearität zwischen Antikörperkonzentrationen von 1,25 bis 10 $\mu\text{g/mL}$ und dem Signal vor. Die Konzentration 10 $\mu\text{g/mL}$ wurde als optimal betrachtet.

5.2.3.3 Ermittlung des optimalen Anti-5-FU-Klons

Nach der Optimierung des indirekten ELISA wurden alle drei Anti-5-FU-Antikörper nach dem optimierten Schema (Abbildung 25) verglichen.

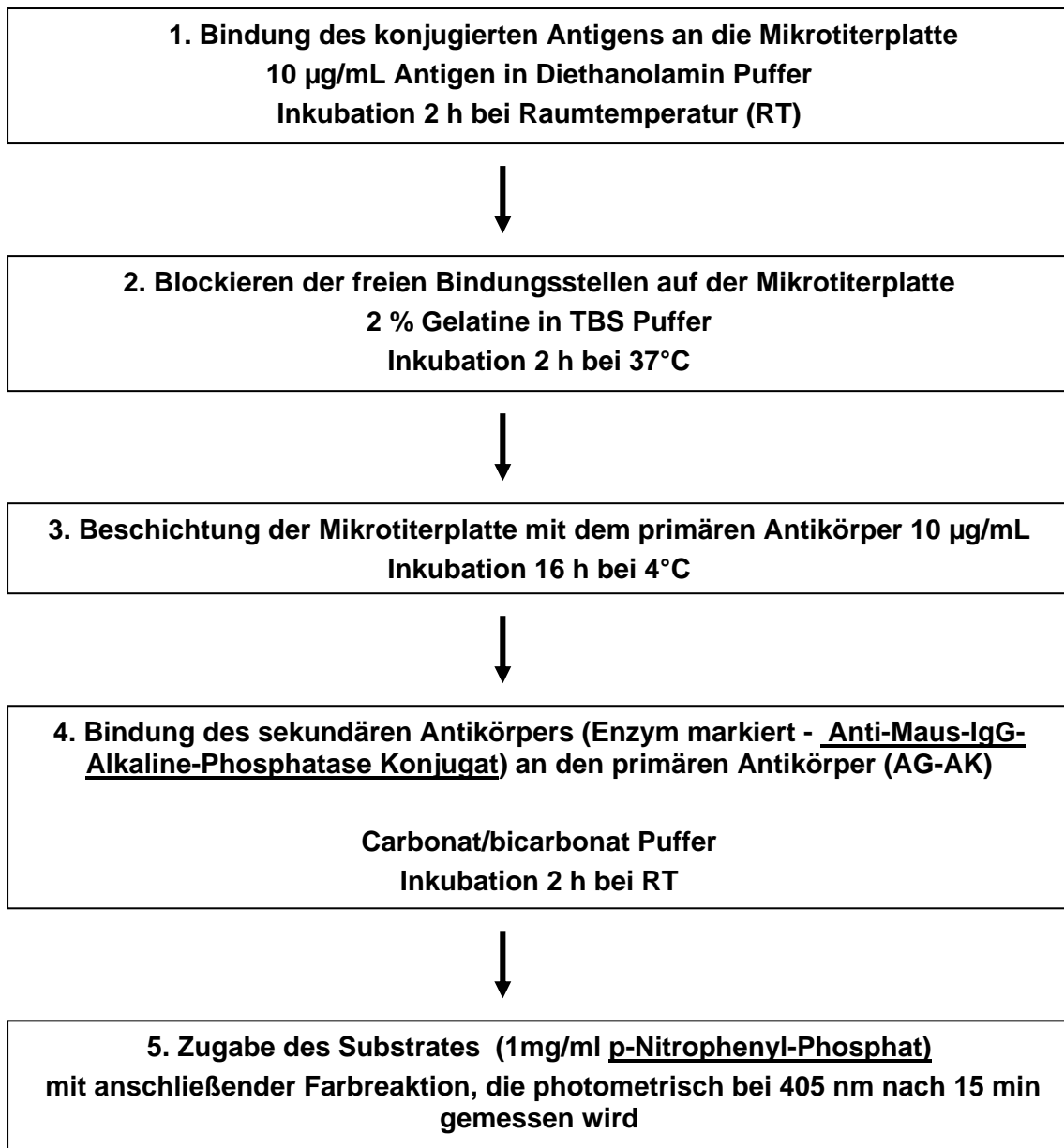


Abbildung 25 Parameter des optimierten indirekten nicht kompetitiven ELISA zum Nachweis von 5-FU

Wie in Abbildung 26 ersichtlich ist, hat der Anti-5-FU-Antikörper-Klon (9-9) die größte Affinität zum Antigen.

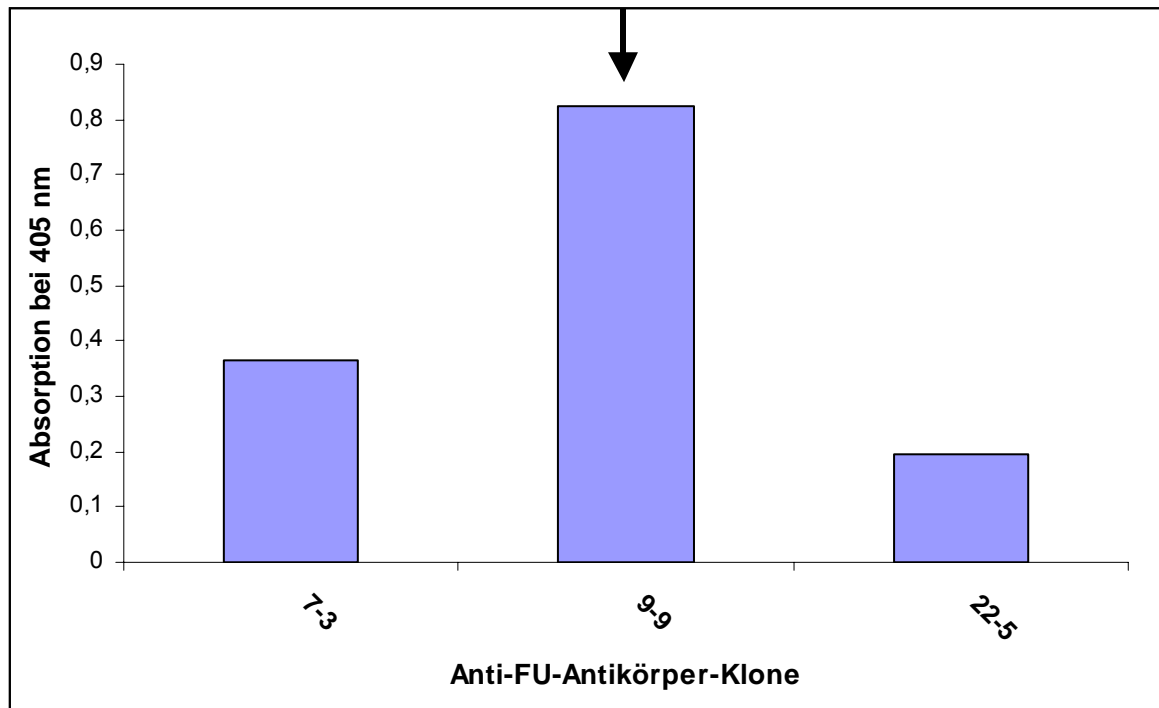


Abbildung 26 Vergleich der verschiedenen Anti-5-FU-Antikörper-Klone

5.2.4 Indirekter kompetitiver ELISA zum Nachweis von 5-Fluorouracil

Im indirekten kompetitiven ELISA wird die Mikrotiterplatte mit Antigen (5-FU/BSA-Konjugat) beschichtet. Der Antikörper und das freie 5-FU werden, bevor sie auf die mit Antigen beschichtete Platte gegeben werden, zusammen inkubiert. Unter optimierten Bedingungen wurde ein kompetitiver ELISA durchgeführt, der schematisch in Abbildung 14 dargestellt ist.

5.2.4.1 Vergleich des kompetitiven und nicht kompetitiven ELISA

Wie in Abbildung 27 dargestellt, erwies sich die Konkurrenz als erfolgreich.

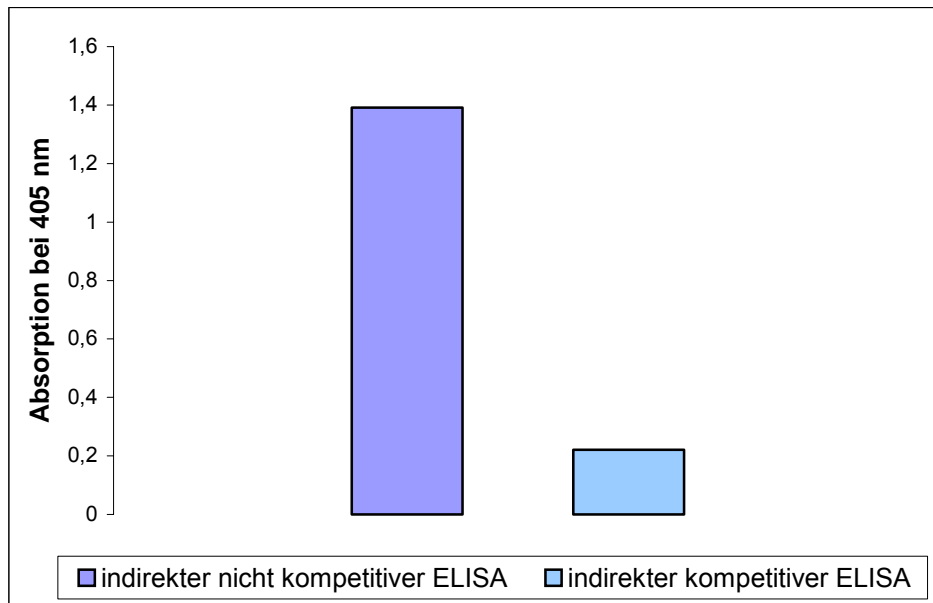


Abbildung 27 Vergleich des kompetitiven und nicht kompetitiven ELISA

5.2.4.2 Ermittlung der optimalen 5-FU-Konzentration

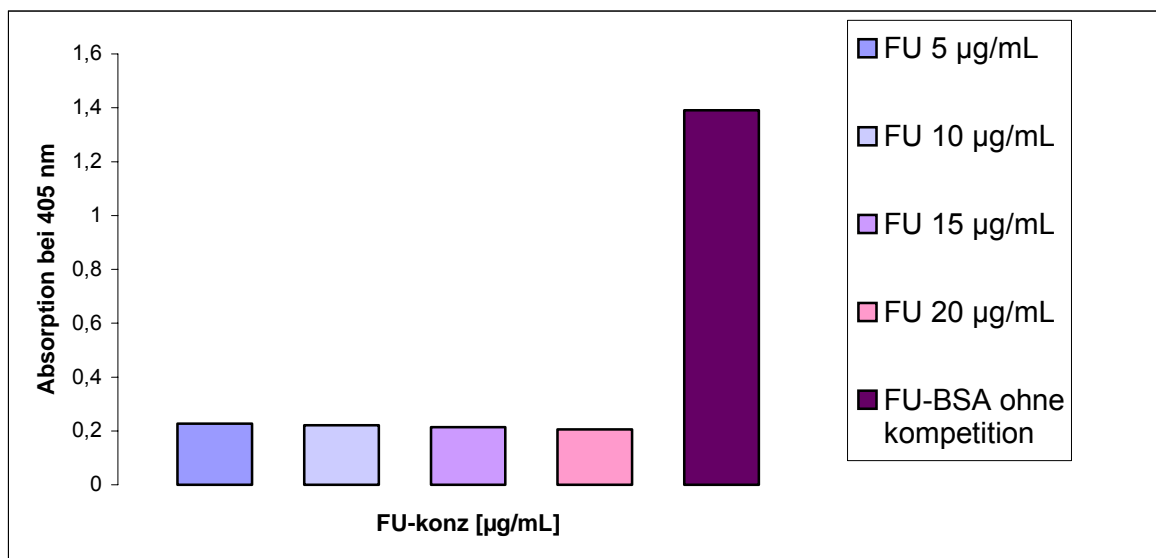


Abbildung 28 Ermittlung der optimalen 5-FU-Konzentration

Abbildung 28 zeigt, dass bei den 4 getesteten Konzentrationen kaum Signalunterschiede auftraten. Daher wurde für den kompetitiven ELISA 10 µg/mL freies 5-FU mit Antikörper inkubiert.

5.2.4.3 Ermittlung der optimalen Anti-5-FU-Antikörper-Konzentration

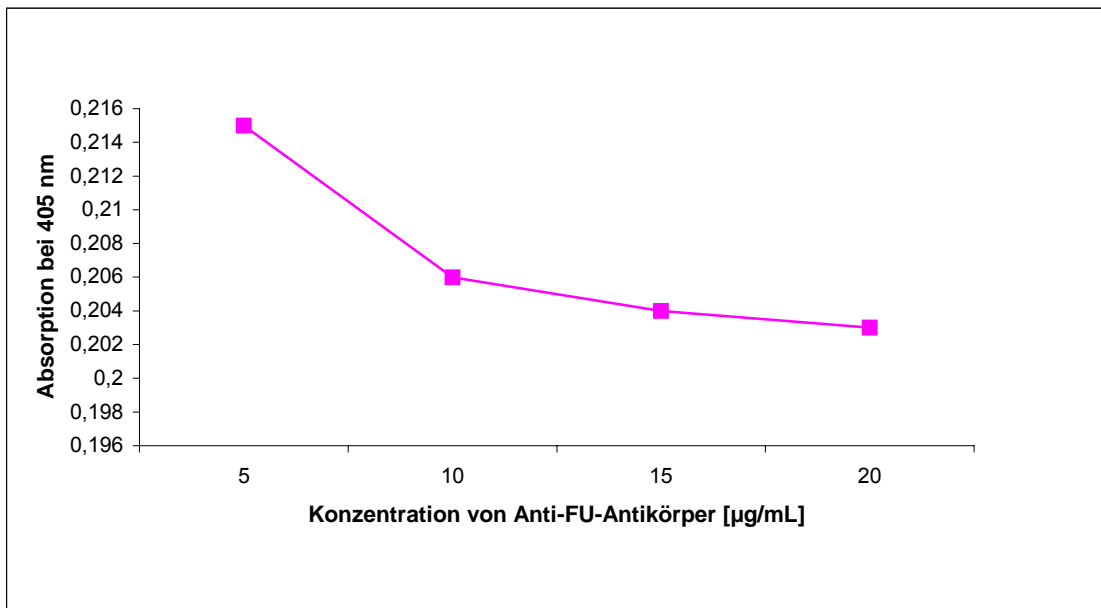


Abbildung 29 Ermittlung der optimalen Anti-5-FU-Antikörper-Konzentration

Es lag eine Linearität zwischen Antikörperkonzentration und Signal in dem Konzentrationsbereich von 10 bis 20 $\mu\text{g/mL}$ vor. In den folgenden Untersuchungen wurde mit 10 $\mu\text{g/mL}$ gearbeitet (Abbildung 29).

Abschließend wurden alle Klone nach dem optimierten Schema (Abbildung 30) verglichen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 und Abbildung 32 dargestellt. Auch hier wurde mit dem Klon 9-9 das intensivste Signal erhalten.

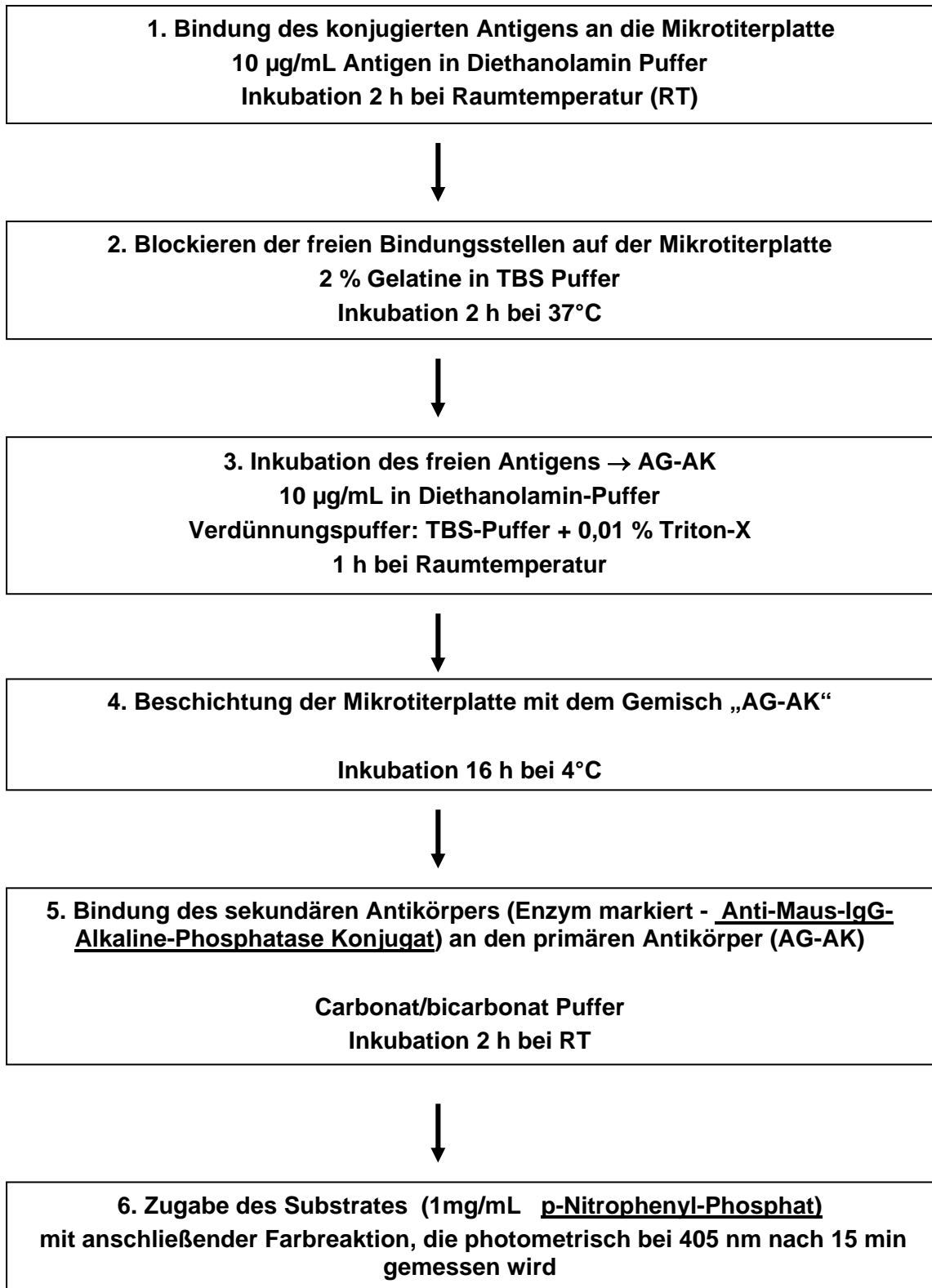


Abbildung 30 Parameter des optimierten kompetitiven ELISA zum Nachweis von 5-FU

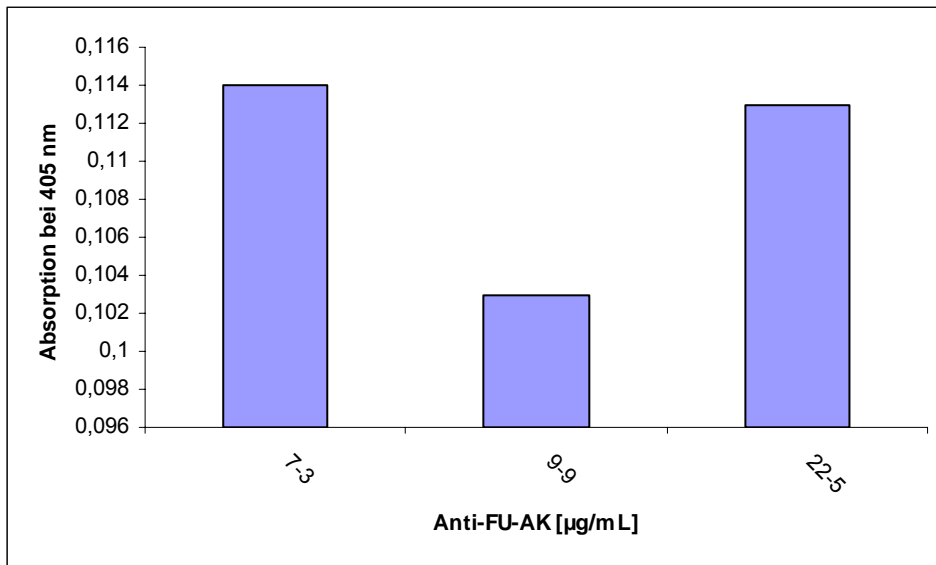


Abbildung 31 Vergleich der verschiedenen Anti-5-FU-Antikörper-Klone im kompetitiven ELISA

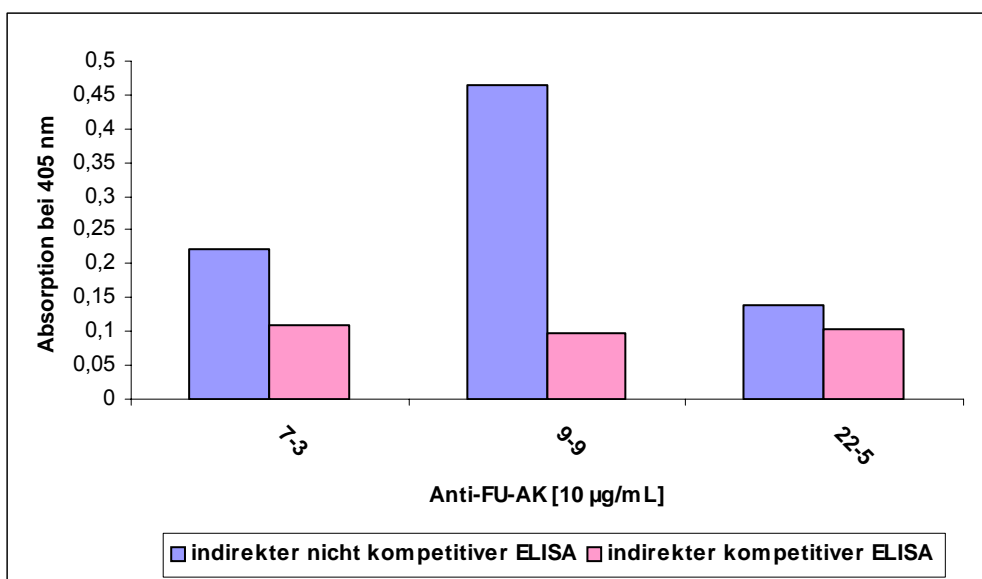


Abbildung 32 Vergleich der verschiedenen Anti-5-FU-Antikörper-Klone im kompetitiven und nicht kompetitiven ELISA

Der Klon 9-9 ergab im kompetitiven Test den geringsten % Bo-Wert, so dass er für die Herstellung des Wischtestes in größeren Mengen produziert wurde.

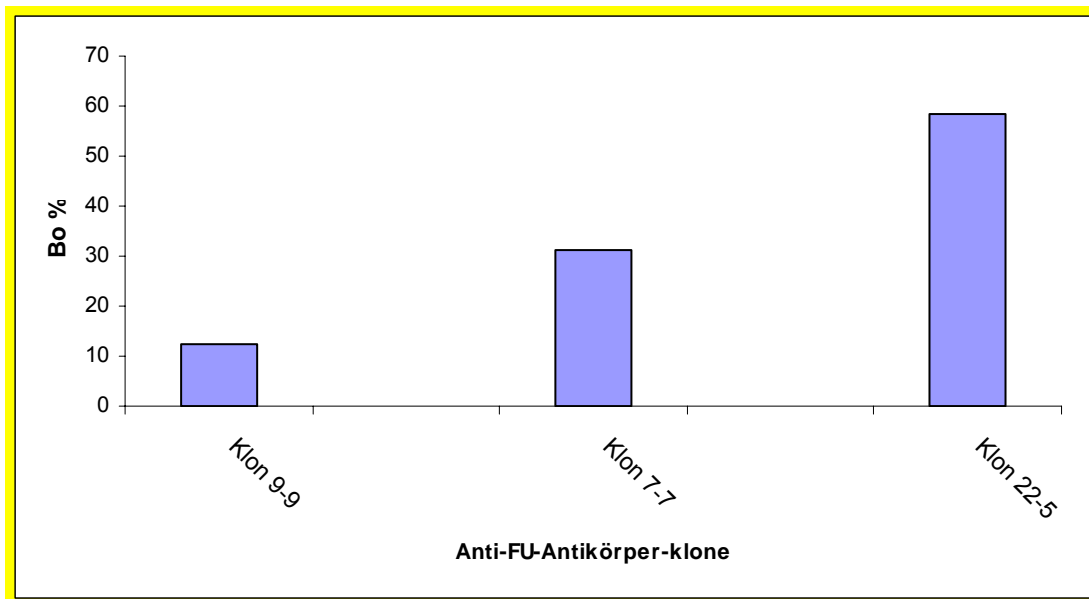


Abbildung 33 Darstellung der % Bo-Wert der verschiedenen Anti-5-FU-Antikörper-Klone im kompetitiven ELISA

5.2.4.4 Kreuzaktivität

Es wurde mittels des indirekten nicht kompetitiven ELISA ermittelt, ob der Anti-5-FU-Antikörper eine Kreuzreaktivität gegenüber BSA und Folsäure aufweist (Abbildung 34). Mit dem Anti-5-FU-Antikörper ließ sich BSA und Folsäure nicht nachweisen.

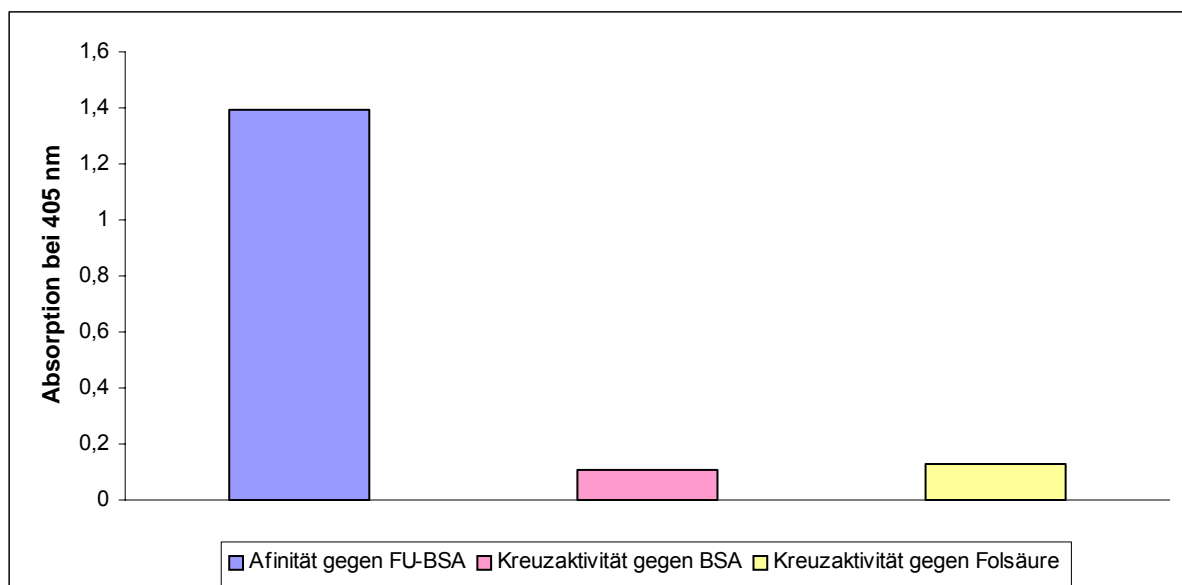


Abbildung 34 Ermittlung der Kreuzreaktion des Anti-5-FU-Antikörpers

5.2.4.5 Wahl des Antikörpers für den Einsatz im Wischtest

Für den Aufbau des Wischtestes wurde der Klon 9-9 gewählt, weil er sowohl im nicht kompetitiven als auch kompetitiven Test die höchsten Signale zeigte.

5.3 Herstellung der Antikörper-Goldkolloid-Konjugate (Hochschule Niederrhein)

Der Wischtestaufbau sieht vor, dass an bestimmten Signalzonen sichtbar wird, ob Zytostatikum auf der abgewischten Fläche vorlag oder nicht. Um dieser Forderung gerecht zu werden, werden an den Signalzonen entweder mit BSA-konjugiertes-Zytostatikum bzw. Anti-Maus-Fangantikörper fixiert.

Um die Anwesenheit der Anti-Zytostatika-Antikörper an den Signalzonen erkennen zu können, müssen die Anti-Zytostatika-Antikörper farblich markiert sein. In der Praxis hat sich der Einsatz von Goldkolloiden bewährt, an die die Anti-Zytostatika-Antikörper konjugiert werden.

Drei Mechanismen bewirken eine Interaktion zwischen Proteinen und Goldkolloiden.

1. Ionenbindung zwischen positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren und der negativ geladenen kolloidalen Oberfläche.
2. Hydrophobe Anziehung zwischen nichtpolaren Aminosäuren und der Partikeloberfläche.
3. Bindung der Schwefelatome (Cystein und in geringerem Ausmaß in Methionin) an Goldmoleküle.

5.3.1 Konjugation

Da Goldkonjugate empfindlich auf Tenside reagieren, muss vor der Konjugation sicher gestellt sein, dass die Glasgeräte tensidfrei sind. Es wird empfohlen, Einweg-Polycarbonat-Behälter zu benutzen. Benutzte Glasware sollte nur mit destilliertem Wasser gereinigt werden. Anhaftende Goldkolloide lassen sich mit einem Gemisch aus 50% HCl und 50% HNO₃ entfernen.

Es treten Schwankungen im Absorptionsmaximum von Gold-Kolloiden auf. Vor der Messung wird zunächst der pH-Wert der Gold-Kolloidlösung mit 0,2 molarer K₂CO₃ und 0,1 molarer HCl auf 9,0 eingestellt. Anschließend wird ein λ -Scan im Wellenlängenbereich von 400 bis 700 nm durchgeführt. Das Absorptionsmaximum von Gold-Kolloiden liegt im Bereich von $\lambda_{\max} = 520 - 525 \text{ nm}$.

5.3.1.1 Vorbereitung der Antikörper-Lösung

Da sichergestellt werden muss, dass eine vollständige Bindung der Antikörper an das Gold-Kolloid erfolgt ist, wird die Proteinkonzentration der Antikörper-Lösung mittels Bradford ermittelt.

Zur Konservierung wurde die Antikörper-Lösung mit Natriumazid versetzt. Damit keine Störung bei der Reaktion auftreten werden, müssen durch eine Dialyse mit Tetraboratpuffer pH = 9,4 h bei RT alle niedermolekularen Substanzen entfernt.

Für die Besprühung der Membran war eine Konzentration von 0,2 mg/mL Antikörper notwendig, so dass die dialysierte Antikörperlösung mit Dialyse-Puffer auf diesen Wert eingestellt werden muss. Anhand des Proteinsnachweises nach Bradford wird der Wert noch einmal kontrolliert.

Alternativ zur Dialyse kann eine Ultrazentrifugation bei 100.000 g durchgeführt werden. Vorteilhaft hierbei ist, dass gleichzeitig eine Konzentrierung der Antikörper möglich ist

5.3.1.2 Titration - Konjugation

Zur Ermittlung des optimalen Konzentrationsverhältnisses von Antikörper und Gold-Kolloid für den Konjugationsprozess wird eine Titration durchgeführt. Verfolgt wird diese über die Messung der OD beim Absorptionsmaximum der Goldkolloide.

Tab. 1: Richtwerte für die Titration

<i>Antibody (µl)</i>	<i>Buffer (µl)</i>	<i>Gold (µl)</i>	<i>10% NaCl (µl)</i>
50	0	500	100
45	5	500	100
40	10	500	100
35	15	500	100
30	20	500	100
25	25	500	100
20	30	500	100
15	35	500	100
10	40	500	100
5	45	500	100
0	50	500	100

In jede Küvette werden entsprechend der Tabelle Antikörper und Dialyse-Puffer auf 50 µL aufgefüllt, 500 µL Goldkolloid-Lösung zugegeben, kurz mischen und 2 min bei RT inkubiert.

Anschließend wird µL 100 NaCl-Lösung 10% (w/v) zugeben, kurz gemischt, 5 min inkubiert und abschließend die optische Dichte beim Absorptionsmaximum gemessen. Die Extinktionswerte werden graphisch in Abhängigkeit von dem Antikörpervolumen aufgetragen. Die optimale AK-Menge, die für die Konjugation eingesetzt werden sollte, wird anhand der Graphik ermittelt. Eingesetzt wird für die Konjugation die Menge an Gold-Kolloid und Antikörper, die in der Graphik auf dem Plateau liegen. Zur Kontrolle, ob der Antikörper vollständig gebunden worden ist, kann noch einmal die Proteinkonzentration im Überstand nach einer Zentrifugation überprüft werden.

5.3.1.3 Scale-up der Konjugation

An die benötigte Menge des Gold-Konjugates werden die Volumina entsprechend der bei der Titration ermittelten Werte angepasst.

Zu berücksichtigen ist, dass keine NaCl-Lösung zugefügt werden darf. In das mit Goldkolloid gefüllte Reaktionsgefäß wird tröpfchenweise die Antikörperlösung hinzugefügt und 10 min bei RT durch langsames Rollen gemischt.

Zur Kontrolle, ob die Konjugation erfolgreich war, werden je 1 mL des Konjugationsansatzes in 2 Eppendoprfgefäße gegeben; 15 min bei 14000 g bei 4 ° C zentrifugiert und im Überstand die Proteinkonzentration bestimmt. Hier wird nicht gebundener Antikörper erfasst.

Zur Blockierung evt. freigebliebener Stellen auf dem Goldkolloid wird dem Reaktionsansatz soviel BSA-Lösung zugesetzt, dass als Endkonzentration 1 % Protein vorliegt. Nach 10 minütigem Rollen wird das Protein-Goldkolloid-Konjugat durch 45 minütige Zentrifugation bei 10000 g bei 4 ° C von der überschüssigen Proteinlösung befreit.

Der Überstand wird vorsichtig durch Pipettieren entfernt und das Pellet zur Weiterverarbeitung in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt, mit Lagerungspuffer suspendiert und die gewünschte OD eingestellt und kann bei 4 ° C gelagert oder direkt weiter verarbeitet werden.

5.3.1.4 Vorbereitung des gelagerten Anti-Zytostatika-Antikörper-Goldkolloides

Vor dem Auftragen des Anti-Zytostatika-Antikörper-Goldkolloides auf die Konjugat-Zone wird dem Anti-Zytostatika-Antikörper-Goldkolloides 20 % Saccharose und 5 % Trehalose als Feststoff zugesetzt, über ein Cellulose-Acetat-Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm filtriert. Diese Lösung kann direkt auf die Konjugatzone gegeben oder bei 4 ° C gelagert werden.

5.4 Membranevaluation (IUTA)

5.4.1 Analytische Methoden

Zur Membranevaluation wurde eine Analytik etabliert, die, anfangs basierend auf Modellsubstanzen, die Verfolgung der Zytostatika in den einzelnen Bereichen des Teststreifens ermöglicht. Dieses war eine Voraussetzung, um geeignete Membranen definieren zu können, die verschiedene Funktionen im Wischtest erfüllen müssen. Als Modellsubstanzen wurden für Methotrexat Folsäure und Folinsäure eingesetzt, da diese Substanzen strukturell sehr ähnlich sind. Für 5-Fluorouracil wurde 5-Chlorouracil verwendet, bei dem das Fluor durch ein Chloratom substituiert ist. Der Einsatz von Modellsubstanzen sollte die orientierenden Versuche erleichtern, da die gewählten Verbindungen wesentlich ungefährlicher und somit auch umweltfreundlicher in der Entsorgung und leichter handhabbar sind als die Zytostatika. Die Analytik der Substanzen wurde mittels HPLC-MS/MS mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer durchgeführt (Agilent 1100 HPLC, MS API3000 mit ESI Interface).

Die für die Messungen verwendeten Geräteeinstellungen der HPLC und des Triple-Quadrupol Systems sind in den folgenden Tabellen dargestellt.

Analyt	Q1 Mass (amu)	Q3 Mass (amu)	Polarität
5-Chlorouracil (Fragment 1)	145	42,1	-
5-Chlorouracil (Fragment 2)	145	102	-
Folinsäure (Fragment 1)	472,1	315,1	-
Folinsäure (Fragment 2)	472,1	343,1	-
Folsäure	440,1	311	-
5-Fluorouracil	129	42	-
Cyclophosphamid	261	140	+
Methotrexat	453,1	324	-

Tabelle 5-10 Massen der Molekül- und Fragmentionen

Eluent A (85 %)	Wasser mit 0,1 % Ameisensäure
Eluent B (15 %)	Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure
Fluss	300 µl / min
Injektionsvolumen	20 µl
Säule	125 * 2 Nucleodur 100 – 5 C18 EC (MN)
Säulen Temp.	30 °C

Tabelle 5-11 HPLC-Parameter für Folinsäure und 5-Chlorouracil

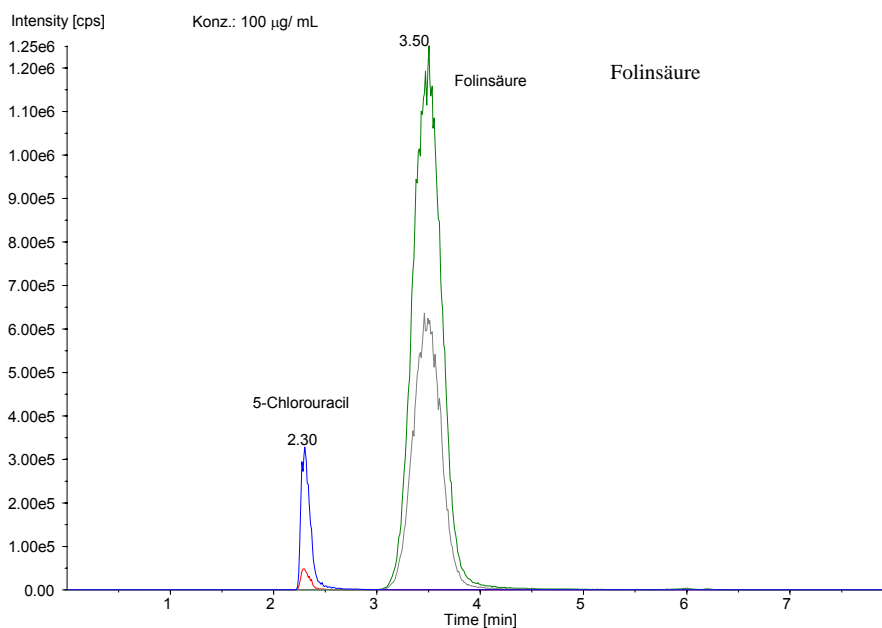


Abbildung 35 Chromatogramm Folsäure und 5-Chlorouracil

Für die simultane Analyse des Zytostatika-Mix aus Methotrexat, Cyclophosphamid, 5-Fluorouracil mit Folsäure und 5-Chlorouracil als interne Standards wurde, um eine zeitaufwendige Methodenentwicklung einzusparen, die im IUTA etablierte Methode zur Trennung von 7 Zytostatika in drei Zeitfenstern um 5-Chlorouracil und Folsäure erweitert.

Eluent A	Wasser mit 0,1 % Ameisensäure
Eluent B	Acetonitril mit 0,1% Ameisensäure
Injektionsvolumen	20 µl
Säule	125 * 2 Nucleodur 100 –5 C18
Säulen Temp.	30 °C

Tabelle 5-12 HPLC-Parameter für Zytostatika-Mix

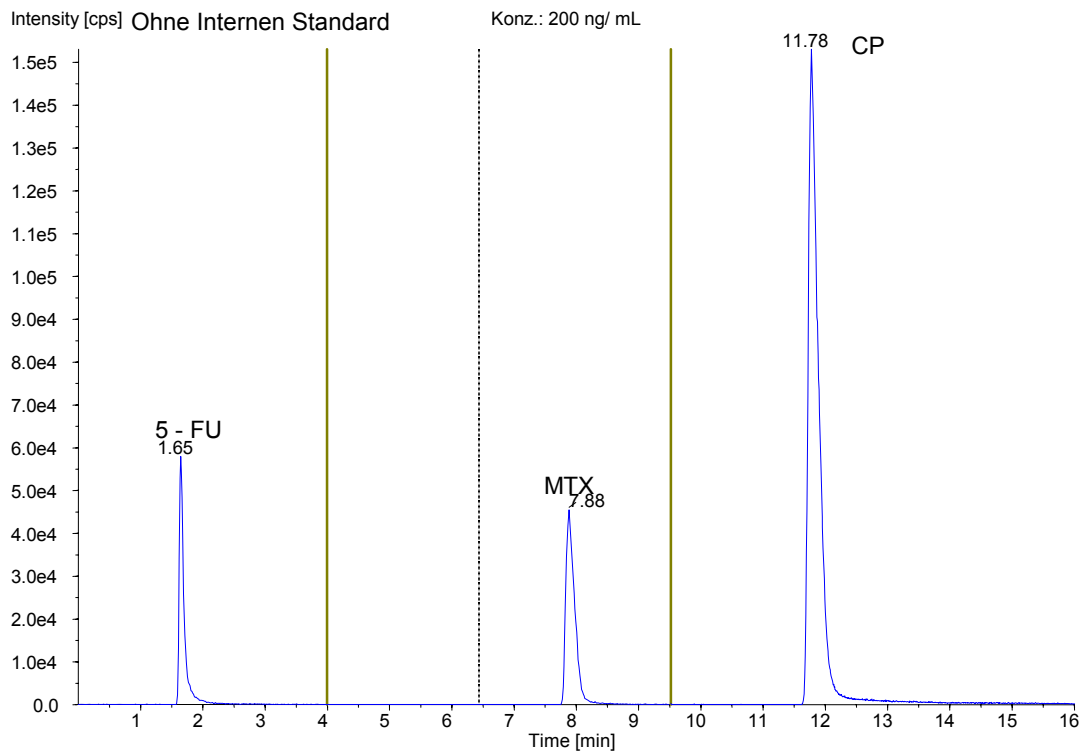


Abbildung 36 Chromatogramm Zytostatika ohne interne Standards (IS)

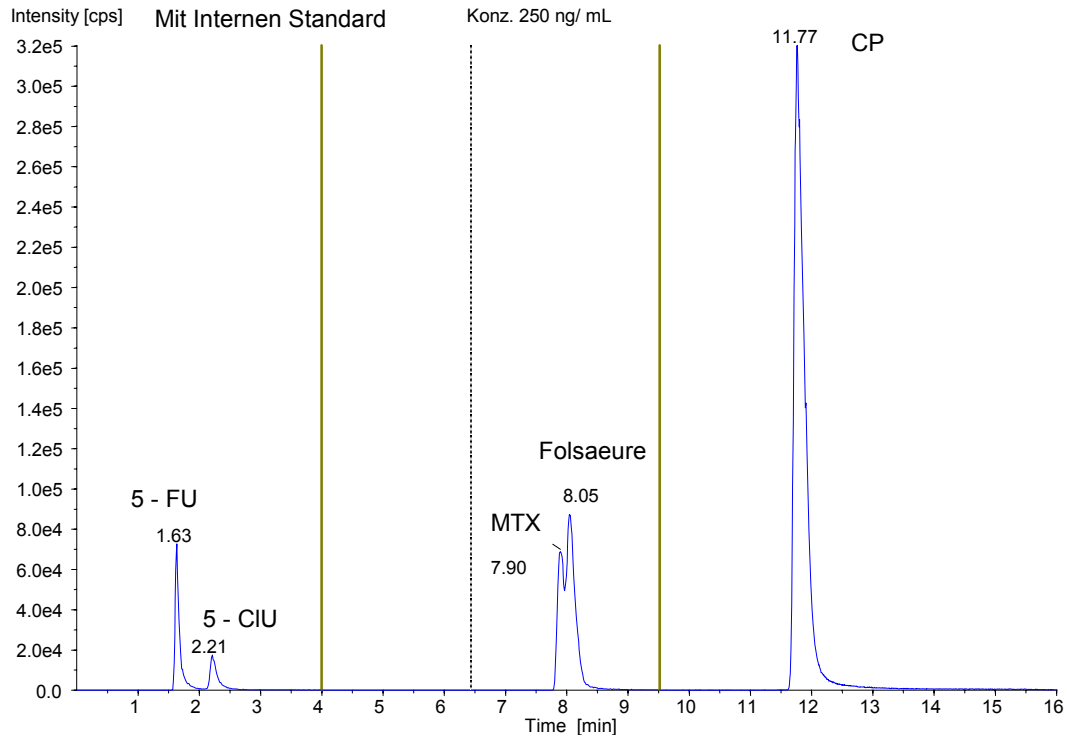


Abbildung 37 Chromatogramm Zytostatika mit internen Standards (IS)

Substanz	RT (min)
5-Fluorouracil	1,6
5-Chlorouracil	2,2
Folsäure	8,0
Methotrexat	7,9
Cyclophosphamid	11,8

Tabelle 5-13 Retentionszeiten Zytostatika-Mix mit IS

Um eine größere Probenanzahl mit längeren massenspektrometrischen Wartungsintervallen messen zu können, wurde die analytische Methode modifiziert. Unter Ausnutzung eines zweiten Sechsportventils wird nur in den Zeitfenstern, in denen die Analyten eluieren, der Eluent auf das MS gegeben. In der verbleibenden Zeit wird der Eluent verworfen, um den Matrixeintrag in das MS zu minimieren.

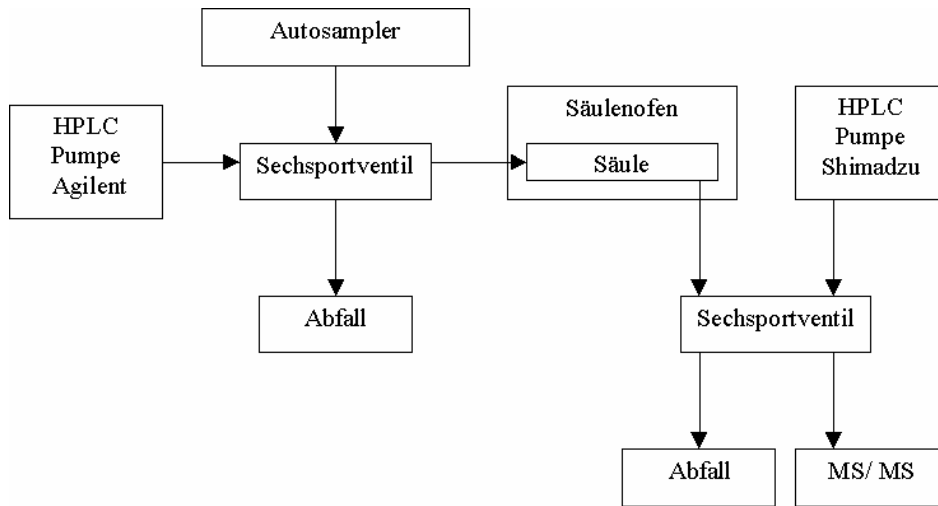


Abbildung 38 Schematischer Aufbau HPLC Anlage

5.4.2 Membranevaluation für das Wischpad

Aus dem Aufbau und der vorgesehenen Verwendung des Schnelltests als Wischtest wird deutlich, dass einer der wesentlichsten Bestandteile das sogenannte Wischpad darstellt (Abbildung 39). Dieses entscheidet durch seine Eigenschaften über die Aufnahme der zu bestimmenden Substanzen von der zu untersuchenden Oberfläche in den Schnelltest. Damit stellt dieser Schritt einen limitierenden Faktor für die Nachweisstärke des Verfahrens dar, weil nur die tatsächlich aufgenommene Substanzmenge durch den immunchromatographischen Test nachgewiesen werden kann.

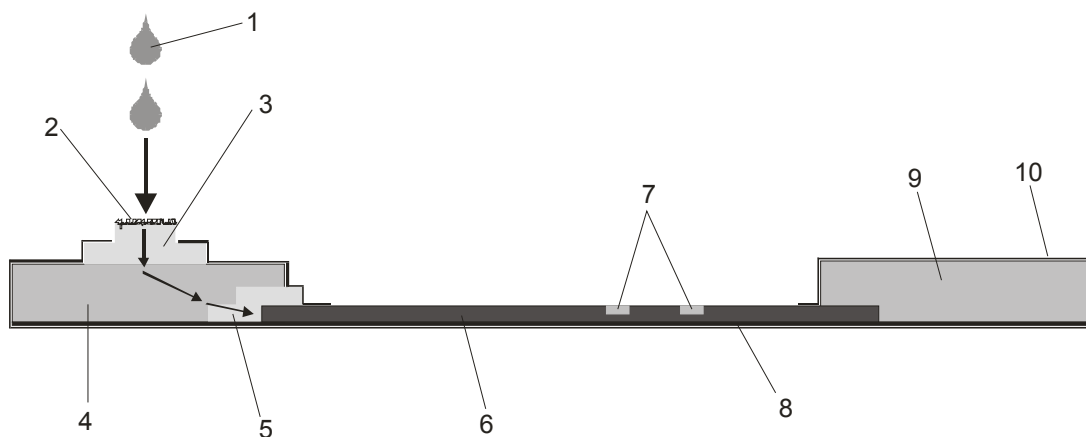


Abbildung 39 Schematische Darstellung eines Zytostatika-Wischttests (Vertikalschnitt) mit Wischpad (3), Transferzone (4), Konjugatzone (5), Reaktionszone (6), Signalzonen (7), Trägerplatte (8), Auffangzone (9) und Gehäuse (10). Das Elutionsmittel (1) kann nach dem Wischen auf das mit Zytostatika-kontamination (2) belegte Wischpad aufgetropft werden. Die Ausmaße des Teststreifens liegen (ohne Gehäuse) bei $6 \times 0,5 \times 0,2 \text{ cm}^3$.

Als Material für Wischprobenahmen werden bereits seit Jahren unterschiedlichste Produkte eingesetzt. Aus der Literatur wurden einige dort angegebene Varianten ausgewählt und die Aufnahmeeigenschaften in orientierenden Versuchen auf Edelstahloberflächen (3 x 10 cm²) untersucht:

1. Kimberly – Clark, Kimwipes Lite 100, vierlagig
2. Schleicher & Schüll, Wischpad Neugeborenen Screening Nr. 903
3. Schleicher & Schüll, Wicking Pad Nr. 900
4. Schleicher & Schüll, Blaubandfilter Nr. 589
5. Macherey – Nagel, Filter 640D
6. Macherey – Nagel, Filter 1640d
7. Macherey – Nagel, Filter 616md

Aus den sieben potentiellen Wischpad-Materialien wurden, aufgrund der Substanzaufnahme von der Edelstahloberfläche, die einen idealen Untergrund darstellt und der mechanischen Stabilität, vier (2., 3., 4. und 7.) zur weiteren Untersuchung ausgewählt. In diesen Untersuchungen wurden Edelstahl, PVC-Beläge und melaminbeschichtete Platten dotiert und mit den vier Materialien abgewischt. Letztlich wurden die Wiederfindungsraten nach Extraktion aus den Wischmaterialien ermittelt. Die drei gewählten Untergründe stellen den größten Teil der Oberfläche in Räumen dar, in denen mit Zytostatika umgegangen wird. Gleichzeitig wurde sowohl trocken als auch mit Wasser angefeuchtetem Wischpad gewischt, um die Notwendigkeit des feuchten Wischens nachzuweisen.

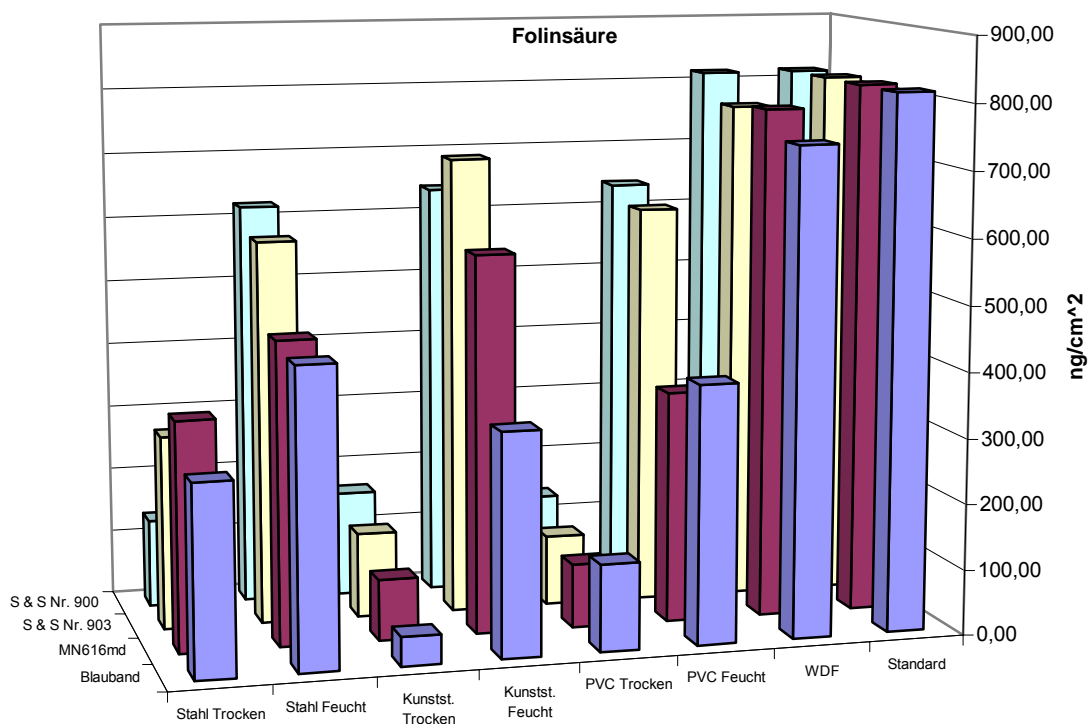


Abbildung 40 Wiederfindungsraten von Folinsäure nach trockenem und feuchtem Abwischen von Edelstahl, PVC und Melamin mit vier verschiedenen Wischmaterialien.

Die Ergebnisse am Beispiel der Folinsäure (Abbildung 40) zeigen, dass ohne Wasserzusatz insbesondere auf den Kunststoffen kaum ein Abtrag der Substanzen erfolgt. Die Wiederfindungen liegen im Bereich von 10 % und darunter. Durch das Anfeuchten des Wischpads werden Wiederfindungsraten von bis zu 87 % erreicht. Gleichzeitig zeigen die Ergebnisse auch die Auswirkungen des Untergrundes, der abgewischt werden soll. Edelstahl, als nahezu inerte und sehr glatte Oberfläche, ermöglicht schon durch trockenes Wischen einen, in Relation zu den Kunststoffoberflächen, guten Abtrag (ca. 40 % Wiederfindung). Zur endgültigen Auswahl des Wischpad-Materials musste sowohl der Abtrag der Substanzen von den unterschiedlichen Oberflächen als auch die mechanische Stabilität des Materials in Erwägung gezogen werden. Dadurch fiel die Wahl auf das Material Nr. 2 (S&S Nr. 903), das neben guten auch gleichbleibende Abtragseigenschaften auf den verschiedenen Untergründen aufweist. Die Wiederfindungsrate für Folinsäure nach feuchtem Wischen auf Edelstahl, PVC und Melamin liegt im Durchschnitt bei 79 % ($\pm 1,3$ %).

5.4.2.1 Einfluss des pH-Wertes auf die Substanzaufnahme

In einer weiteren Untersuchung sollte nun ermittelt werden, in wie weit der pH-Wert der Flüssigkeit, die zur Anfeuchtung der zu wischenden Fläche dient, einen Einfluss auf den Abtrag der Substanzen durch den Wischvorgang hat. Dazu wurden Edelstahlplatten (30 cm²) mit definierten Konzentrationen an Fluorouracil, Methotrexat und Cyclophosphamid kontaminiert. Wischpads der Größe 8 x 15 mm dienten als Testsysteme. Nachdem die kontaminierten Flächen mit jeweils 40 µL Pufferlösung (Tris 20 mmol/L, pH 5, 7, 9) angefeuchtet worden waren, wurden sie mit den Wischpads jeweils vier Mal in Längs- und Querrichtung abgewischt. Das Wischpad-Material wurde danach mit VE-Wasser extrahiert. Die Bestimmung der drei Analyten erfolgte mit den angegebenen (siehe 5.4.1) HPLC-MS/MS-Methoden.

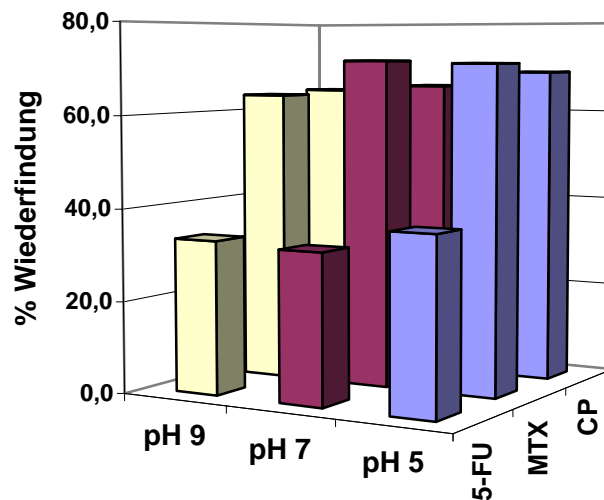


Abbildung 41 Einfluss des pH-Wertes der Wischlösung auf die Substanzaufnahme in das Wischpad.

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, stellt der pH-Wert der Wischlösung keinen entscheidenden Einflussfaktor zur Substanzaufnahme in das Wischpad dar. Das bedeutete, dass bei der weiteren Entwicklung des Testsystems der pH-Wert der Wischlösung im Wesentlichen von den biologischen Komponenten bestimmt werden konnte. Dieses bot den Vorteil, dass die empfindlichen molekularbiologischen Reaktionen, die mit einem Immunoassay verbunden sind, optimal ausgenutzt und somit eine hohe Empfindlichkeit des Wischtests erreicht werden konnte.

5.4.3 Auswahl der analytischen Membran

Zur Auswahl der analytischen Membran (siehe Abbildung 42) wurde in Zusammenarbeit mit dem projektbegleitenden Ausschussmitglied Schleicher & Schüll auf die Membranen mit den Bezeichnungen Prima 40 und Prima 125 zurückgegriffen. Diese Membranen werden bereits erfolgreich in lateralen Fließtests für andere Analyten eingesetzt. Beispielhaft auch für 5-Fluorouracil wurde mit dem Analyten Methotrexat gearbeitet.

Es wurden mit beiden Membranen sogenannte „Halfsticks“ erstellt. Diese bestehen aus der analytischen Membran und einem, an deren Ende angebrachten „Wick“, das zum Aufsaugen der durch die Membran gewanderten Flüssigkeit dient. Die Membranen wurden mit Kontrolllinien aus Anti-Maus-IgG und Testlinien aus MTX-BSA-Konjugat versehen. Dieses erfolgte mit einem Nanodispenser (Fa. BioDot XY-3000) wobei die Geräteeinstellungen so gewählt wurden, dass 1 µL/cm Flüssigkeit auf die Membranen aufgebracht werden. Beide Lösungen wurden mit einer Konzentration von ca. 1 mg/mL eingesetzt. Der Abstand beider Linien zueinander betrug 7,5 mm. Die gesprühten Membranen wurden 15 Minuten im Konvektionsofen bei 37 °C getrocknet.

Die Halfsticks wurden in, mit freiem MTX inkubierter Antikörper-Goldkolloid-Lösung gestellt, so dass die Lösung durch die analytische Membran über die Test- und Kontrolllinie in das Wick wanderte. Dabei wurden die Fronten des roten Goldkolloid und der Flüssigkeit beobachtet. Es fiel auf, dass in der Prima 125 eine Trennung der Fronten stattfand. Dieser Effekt ist unerwünscht, da davon ausgegangen werden kann, dass das freie MTX im wesentlichen mit der Flüssigkeitsfront wandert. Um aber eine maximale Reaktionszeit zwischen freiem MTX und Antikörper-Goldkolloid zu gewährleisten müssen beide Fronten zusammen laufen. Dieses war bei der Membran Prima 40 gegeben.

Dieser Effekt spiegelte sich auch im Vergleich der Intensitäten der Testlinien von Prima 40 und 125 bei gleicher eingesetzten MTX-Konzentration wider. Die Testlinie der Prima 40 war deutlich schwächer gefärbt, was auf eine bessere Competition im Verlauf der analytischen Membran hindeutet.

Für den weiteren Testaufbau wurde somit die Membran Prima 40 ausgewählt.

5.4.4 Endgültige Membranauswahl

Die endgültige Membranauswahl ergab sich aus den oben angeführten Ergebnissen und aus Erfahrungswerten der Firma Schleicher & Schüll (S&S).

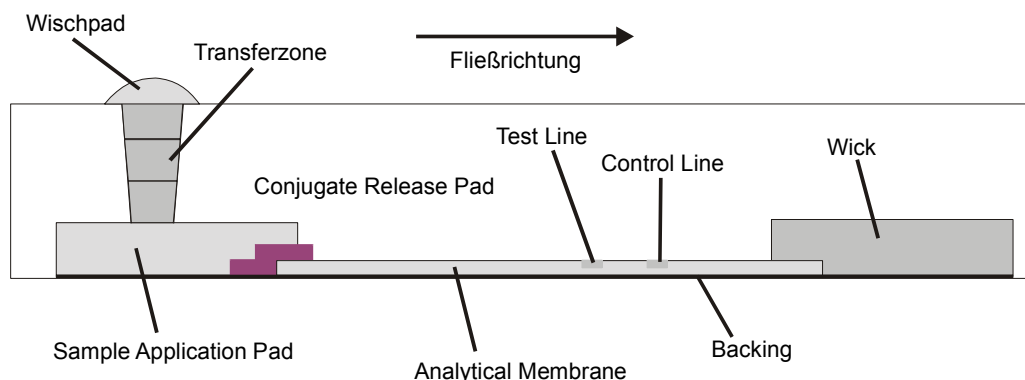


Abbildung 42 Schematische Darstellung des Testaufbaus.

Die eingesetzten Materialien sind im folgenden aufgelistet. Die Komponentenbenennungen beziehen sich auf die Abbildung 42.

- Wischpad: S&S 903 (Baumwolllinter)
- Transferzone: S&S 900 (Baumwolllinter)
- Sample Application Pad: S&S 903 (Baumwolllinter)
- Conjugate Release Pad: S&S GF 33 (Glasfaser)
- Analytical Membrane: S&S Prima 40 (Nitrocellulose)
- Wick: S&S 900 (Baumwolllinter)
- Backing: Polyester

5.5 Anpassung der Reagenzienkonzentrationen (IUTA, Hochschule Niederrhein)

Die Immunreagenzien für die Test- und Kontrolllinie (MTX-BSA bzw. 5-FU-BSA und Ziege-Anti-Maus-IgG) wurden, wie bereits in Kapitel 5.4.3 kurz dargestellt, mittels eines Nanodispensers (Fa. BioDot XY-3000) auf die Membranen aufgesprüht. Dabei werden Tropfen mit einem Volumen von 50 nL im zeitlichen Abstand von 0,25 ms und, bedingt durch die kontrollierte Bewegung der Membran, im räumlichen Abstand von 0,5 mm ausgestoßen. Der Verlauf der Flüssigkeitssuspensionen in den Poren der Membran wird dabei im wesentlichen durch deren Viskosität bestimmt. Bei hoher Viskosität findet ein schneller Verlauf der aufgetragenen Flüssigkeit statt bevor die Eintrocknung einsetzt, wodurch die Linien relativ breit werden. Bei niedriger Viskosität werden die Linien deutlich schmaler und damit bei gleicher Reagenzienkonzentration intensiver sowie schärfer abgegrenzt zur Membranfläche. Die Viskosität der Suspensionen wird im wesentlichen durch deren Proteinkonzentrationen (BSA) bestimmt.

Ein weiteres Kriterium für das Konzentrationsverhältnis zwischen Test- und Kontrolllinie stellt die Intensitätsverteilung der Färbung dar. Je höher die Konzentration an MTX-BSA bzw. 5-FU-BSA in der Testlinie, desto geringer fällt die Farbintensität der Kontrolllinie bei einer Blindwertmessung aus. Dieses ergibt sich durch die Tatsache, dass in der Testlinie die Antikörper-Goldkonjugate zurückgehalten werden, wenn sie nicht mit freiem Antigen (Zytostatikum) abgesättigt sind (Blindwert). Ziel der Anpassung der Zytostatikum-BSA-Konzentration in der Testlinie ist eine möglichst gleich starke Farbintensität beider Linien bei der Blindwertmessung um in der Anwendung einen einfachen augenscheinlichen Vergleich durchführen zu können.

Beide Effekte werden in Abbildung 43 deutlich.



Abbildung 43 Darstellung von Testlinien mit zu hoher MTX-BSA-Konzentration in der Testlinie und zu niedriger Viskosität der als Testlinie aufgesprühten Lösung. Die Testlinie (T) ist wesentlich breiter verlaufen und intensiver

gefärbt als die Kontrolllinie (C). (Kassette Nr. 5: 0,5 ng MTX, Nr. 6: 0,05 ng MTX)

Erfahrungsgemäß findet ein guter Verlauf der aufgetragenen Flüssigkeit (bei 1 µL/cm) in der Membran Prima 40 bei einer Proteinkonzentration von ca. 1 mg/mL statt, so dass dieser Wert immer als Endproteinkonzentration erzielt werden sollte. Durch die entsprechende Zugabe von Zytostatikum-BSA-Konjugat wurden verschiedene Konzentrationen (1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL und 0,15 mg/mL) eingestellt.

5.5.1 Methotrexat

Die Konzentration von 1 mg/mL MTX-BSA zeigte sich bereits bei der Verwendung in den MTX-Halfsticks als zu groß, da die Kontrolllinie sehr schwach gefärbt war. Deshalb wurden die weiteren Verdünnungen angesetzt um die optimale MTX-BSA-Konzentration zu ermitteln. Endgültig wurde mit der Konzentration 0,15 mg/ml MTX-BSA bei 1 mg/mL Gesamtprotein die optimale Variante gefunden. In der folgenden Bilderserie (Abbildung 44) sind Teststreifen mit dieser MTX-BSA Konzentration in der Testlinie nach Aufgabe von MTX dargestellt.

Die Zuordnung der aufgegebenen MTX-Menge zu der Nummerierung der Testkassetten ergibt sich aus Tabelle 5-14.

Tabelle 5-14 Zuordnung der aufgegebenen MTX-Menge zur Nummerierung der Testkassetten in Abbildung 44.

Nr. Testkassette	Aufgegebene MTX-Menge [ng]
7	5000
8	500
9	50
10	5
11	0,5
12	0,005
PBS	0

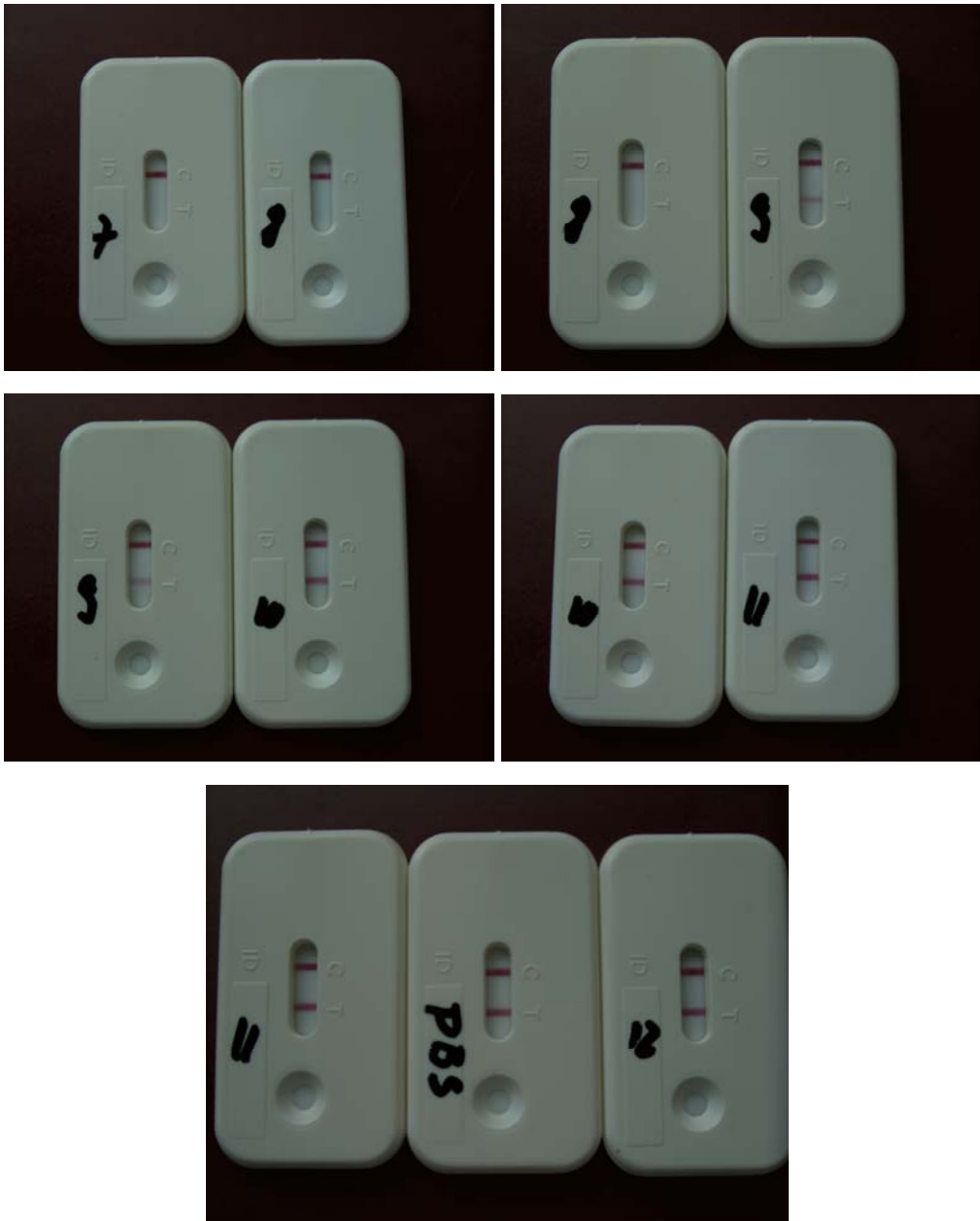


Abbildung 44 MTX-Testkassetten mit verschiedenen Mengen an MTX versetzt (MTX-Mengen siehe Tabelle 5-14). Kontrolllinie 1 µg/cm BSA, Testlinie 0,15 µg/cm MTX-BSA + 0,85 µg/cm BSA.

Bei der Zugabe von 5 µg MTX (Nr. 7) war die Testlinie nicht mehr zu erkennen. Ab 0,5 µg MTX (Nr. 8) konnte im Original eine leichte Färbung der Testlinie erkannt werden. Mit abnehmender MTX-Menge (bis 5 ng) nahm die Intensität der Testlinie kontinuierlich zu, war aber noch deutlich schwächer gefärbt, als die Testlinie eines Blindwertes (PBS). Erst ab einer MTX-Menge von 0,5 ng (Nr. 11) konnte kein Unterschied mehr in den Intensitäten der beiden Linien erkannt werden.

5.5.2 5-Fluorouracil

Für die Untersuchung der optimalen Reagenzienkonzentration von 5-FU-BSA in der Testlinie wurde die gleiche Vorgehensweise wie für das MTX durchgeführt. Hier zeigte sich bereits bei der Testung der Halfsticks, dass der ausgewählte Antikörper, trotz der besten Konkurrenz im ELISA (siehe Kapitel 5.2.3.3, 5.2.4.3) im lateralen Fließtest keine Konkurrenz aufwies. Dieses wurde bei Zugabe von freiem 5-FU deutlich, da selbst bei hohen Konzentrationen (mg-Bereich) die Testlinie immer stark gefärbt blieb. Hier konnte auch durch Variation der 5-FU-BSA-Konzentration keine Verbesserung erzielt werden.

Ein möglicher Grund für die schlechte Konkurrenz könnte in der Modifikation des 5-FU im Rahmen der Immunisierung liegen. Hier wurde ein Hexansäurederivat für die Kopplung an das Protein verwendet. Denkbar ist eine Veränderung der elektronischen Verteilung in der Ringstruktur, wodurch die entstandenen Antikörper eine höhere Affinität gegenüber dem Hexansäurederivat hätten, welches auch für die Kopplung an das BSA verwendet wurde, das in der Testlinie Verwendung findet. Dem sprechen die Ergebnisse des kompetitiven ELISA auf der Mikrotiterplatte entgegen.

Nach diesem Ergebnis wurden die Arbeiten mit 5-FU eingestellt.

5.6 Konstruktion des Wischbereiches (IUTA)

Im frühen Stadium des Vorhabens wurden erste Versuche mittels Kunststofflaminiertechnik unternommen, um die unterschiedlichen Membranen miteinander zu verbinden und ein Wischpad auf das Sample Application Pad (vergl. Abbildung 42) zu fixieren. Dabei traten eklatante Probleme in zweierlei Hinsicht auf. Einerseits bildeten sich an den Rändern der Membranen kapillare Zwischenräume, in denen ein unkontrollierbarer Flüssigkeitstransport neben der analytischen Membran stattfand, andererseits können die für die Laminierung notwendigen Temperaturen nicht auf die Membranen und Immunreagenzien angewendet werden.

Für die Funktion von lateralen Fließtests ist es essentiell, dass der Flüssigkeitstransport nur durch das Konjugatpad und die analytische Membran stattfindet, da ansonsten Färbungen der Testlinie auftreten können, die nicht im Zusammenhang mit der innerhalb der Membranen ablaufenden immunochemischen Reaktion stehen. Somit würde der Test falsche oder unklare Ergebnisse anzeigen.

Typisch für die Laminieretechnik ist die Fixierung von dünnen Schichten zwischen Kunststofffolien. Dabei sind die Oberflächen der Kunststofffolien, die gegeneinander liegen mit niedrig schmelzenden Kunststoffen belegt, die, je nach Foliendicke, auf 75 °C bis 250 °C im Laminiervorgang erhitzt werden. Die oben genannten Zwischenräume bilden sich an den Randbereichen der einlaminieren Schichten (Membranen), da hier keine vollständige

Verbindung zwischen den Laminierfolien bis direkt an den Rand der Schicht erfolgen kann (Abbildung 45).

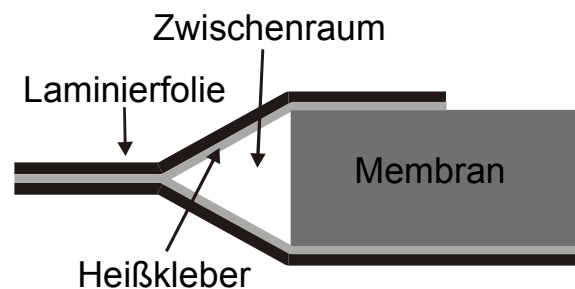


Abbildung 45 Schematischer Detailquerschnitt des kapillaren Zwischenraumes, der sich beim Einlaminieren von Membranen zwischen Kunststofffolien bildet.

Weiterhin sind insbesondere die Nitrocellulosemembranen, wie z.B. die verwendete analytische Membran (Prima 40) thermisch labil. Nach Auskunft des Herstellers kann sie sich bereits bei den angegebenen Lamiertemperaturen entzünden.

Somit stellte die Laminieretechnik, neben der konstruktiven Schwäche der Zwischenraumbildung, ein nicht hinnehmbares Sicherheitsrisiko dar.

Daraufhin wurde mit vorgefertigten Kunststoffkassetten weitergearbeitet, die von der Firma Schleicher & Schüll zur Verfügung gestellt wurden (Abbildung 44 und Abbildung 46).



Abbildung 46 Darstellung einer geöffneten Kunststoffkassette mit innenliegendem Teststreifen.

Wie in Abbildung 42 ersichtlich wird, musste zwischen dem ausgewählten Wischpad (S&S 903) und dem Sample Application Pad eine Transferzone konstruiert werden. Dieses ergab sich aus der Vorgabe durch die Kunststoffkassette, die ursprünglich für die Aufgabe von flüssigen Proben in eine Kavität oberhalb des Sample Application Pad (SAP) vorgesehen ist. Um den durch diese Kavität gebildeten Zwischenraum zu überbrücken und einen Flüssigkeitstransport in das SAP zu gewährleisten, wurde das Material S&S 900 verwendet. Drei Schichten dieses Materials übereinander stellten eine funktionierende Verbindung zwischen Wischpad und SAP her. Damit war gewährleistet, dass das Wischpad

über die Kassettenoberfläche hinausragte, so dass bei dem vorgesehenen Wischeinsatz nur das Wischpad die zu untersuchende Oberfläche berührte. Um eine Fixierung dieses Aufbaues zu erreichen, wurde Kunststoffklebefolie gelocht und als Halterung über den Wischbereich geklebt (siehe Abbildung 49, vier mittlere Testkassetten). Der Lochdurchmesser in der Folie wurde geringfügig kleiner als der Durchmesser des Wischpads gewählt. Damit wurde erreicht, dass ein kontinuierlicher Anpressdruck über das Wischpad und das Transferzonen-Material auf das SAP erfolgte. Somit wurde ein Flüssigkeitsübertritt und folglich auch der Analyttransport zwischen den verschiedenen Materialien sichergestellt.

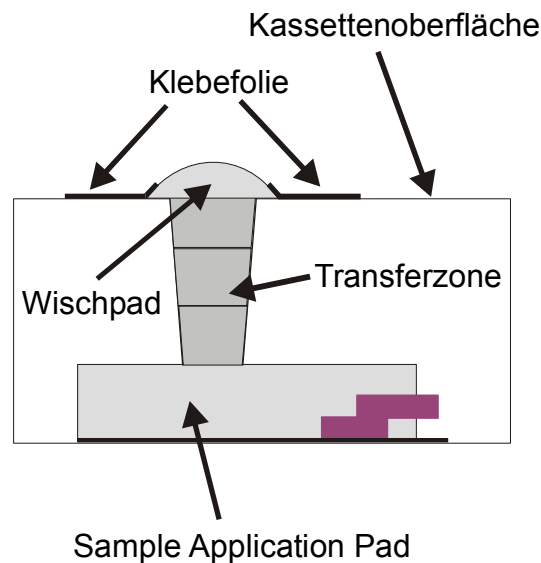


Abbildung 47 Schematische Detaildarstellung des Wischbereiches

Ein weiterer Vorteil dieser Konstruktion bildete deren Flüssigkeitsspeicherfunktion. Wie sich in der Membranevaluation für den Wischbereich (Kapitel 5.4.2) herausgestellt hatte, musste für einen guten Substanzabtrag die zu untersuchende Fläche angefeuchtet werden. Daraus ergab sich die Gefahr, dass bei dem nachfolgenden Wischvorgang mit dem Teststreifen zu viel Flüssigkeit aufgenommen und somit der chromatographische Prozess in Gang gesetzt würde. Aufgrund der dann voraussichtlich nicht ausreichenden und volumenmäßig unkontrollierten Flüssigkeitsmenge könnten unplausible Ergebnisse angezeigt werden. Die Transferzone diente nun für diese Flüssigkeit als „Pufferzone“, so dass ein unkontrollierter Start des Tests vermieden werden konnte. Die Aufnahmekapazität der Transferzone liegt bei ca. 50 μ L bis 100 μ L.

Der so konstruierte Wischbereich wurde im Rahmen des Funktionsnachweises (Kapitel 5.7) angewandt und als funktionsfähig befunden, was durch die dort dargestellten Ergebnisse belegt wird.

5.7 Funktionsnachweis des Wischtests für relevante Konzentrationen (IUTA)

Aus zahlreichen Untersuchungen des IUTA, in denen Wischprobenmonitorings in Zytostatika verarbeitenden Apotheken und Klinikstationen durchgeführt wurden, ist bekannt, dass

Flächenbelastungen, u. a. auch von MTX, im ng/cm^2 -Bereich liegen. Wie sich bereits in den vorhergehenden Kapiteln (5.5.1) gezeigt hat, konnte der MTX-Teststreifen bis zu 5 ng MTX bei direkter Aufgabe auf das Sample Application Pad durch eine erkennbare Abschwächung der Farbintensität der Testlinie im Vergleich zu einem Blindwert anzeigen. Aus den Ergebnissen der Membranauswahl (Kapitel 5.4.2) war bekannt, dass die Aufnahme in das Wischpad bei angefeuchteter Oberfläche im Bereich von 68 % bis 78 % der aufgetragenen Substanzmenge liegt. Unter der zusätzlichen Annahme, dass eine nahezu Gleichverteilung der aufgenommenen Substanz in den Membranen erfolgt (Vorversuche deuteten darauf hin, Ergebnisse nicht dargestellt), sollte ab einer Flächenkonzentration von $2 \text{ ng}/\text{cm}^2$ ein positives Testergebnis erzielt werden können, wenn eine Fläche von $5 \times 5 \text{ cm}^2$ untersucht wird.

Der entsprechende Versuchsaufbau ist in Abbildung 48 dargestellt.

Edelstahloberflächen wurden mit Markierungen versehen, die die zu untersuchende Fläche begrenzen. Da während des Wischvorganges das Wischpad durch die Testkassette verdeckt ist und somit nicht kontrolliert werden kann, ob die Flächengrenzen eingehalten werden, wurde zusätzlich eine größere Markierung (durchgezogene Linien) erstellt, die die Außenkanten der Testkassette während des Wischvorganges bezeichneten.

Die $5 \times 5 \text{ cm}^2$ - Flächen wurden mit methanolischer MTX-Lösung entsprechend den gewünschten Kontaminationsgraden (2, 4, 6 und $8 \text{ ng}/\text{cm}^2$) beaufschlagt. Vergleichbar zu realen Kontaminationsfällen wurde die Lösung in kleinen Tröpfchen mit Hilfe einer Pipette auf der Fläche verteilt. Nachdem das Methanol verdampft war, konnte die Testprozedur begonnen werden.

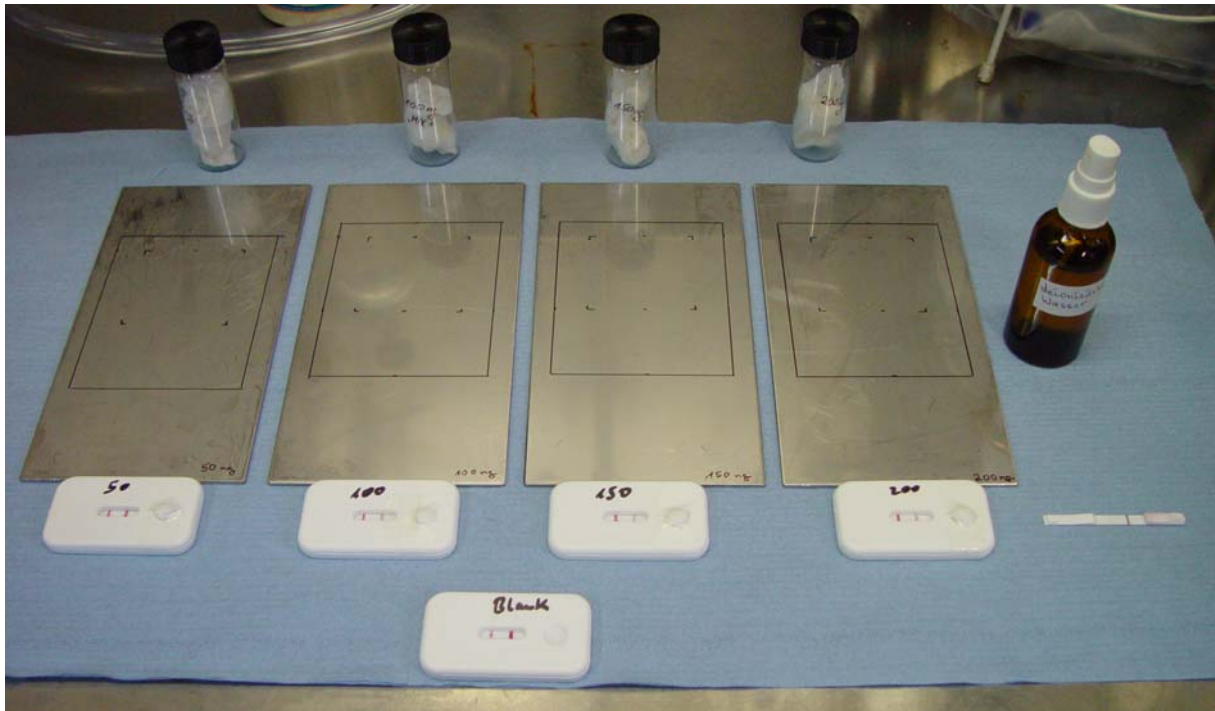


Abbildung 48 Darstellung des Versuchsaufbaus für den Funktionstest mit MTX-kontaminierten (50, 100, 150, 200 ng / 25 cm²) Edelstahlplatten.

Mit einer Pumpsprayflasche wurden die Flächen mit vollentsalztem Wasser befeuchtet. Durch gravimetrische Vorversuche war bekannt, dass durch zwei Sprühstöße ca. 50 µL VE-Wasser auf die 5 x 5 cm² - Fläche aufgebracht werden. Dieses war hinsichtlich der Aufnahmekapazität der Transferzone (vgl. 5.6) akzeptabel.

Die Fläche wurde mittels des Wischtests einmal möglichst gleichmäßig durch Hin- und Herbewegungen von links nach rechts abgewischt. Anschließend wurden 100 µL PBS-Puffer auf das Wischpad gegeben, wodurch der chromatographische Lauf gestartet wurde. Nach ca. 50 Sekunden entwickelte sich die Kontrolllinie, was die erfolgreiche Testdurchführung anzeigte. Parallel zu den vier unterschiedlichen Flächenkontaminationen wurde eine Testkassette ohne Wischbereich mit 100 µL PBS-Puffer versetzt. Dieser Test diente als Blindwertvergleich, gegen den die Testlinien der durchgeführten Wischtests hinsichtlich der Farbintensität verglichen wurden.



Abbildung 49 Darstellung der Wischtestergebnisse im Konzentrationsbereich von 50 ng bis 200 ng MTX pro 25 cm² Flächenkontamination. Links ist ein Blindwert und rechts ein Test nach direkter Aufgabe von 200 ng MTX dargestellt.

Wie in Abbildung 49 deutlich wird, konnte bereits bei einer Konzentration von 2 ng/cm² eine deutliche Intensitätsabnahme der Testlinie im Vergleich zum Blindwert beobachtet werden. Die höheren Konzentrationen erzeugten zunehmende Intensitätsverluste der Testlinien. Augenscheinlich konnte ein Zusammenhang zwischen Flächenbelastung und Intensität der Testlinie erkannt werden.

Durch einen Vergleichstest mit Aufgabe von 200 ng MTX direkt auf das Sample Application Pad eines Teststreifens wurde auch hier deutlich, dass durch den Wischvorgang keine vollständige Aufnahme der Flächenkontamination in den Wischtest stattfindet. Im Gegensatz zu einem Wischtest, der bei einer Flächenkontamination von 200 ng MTX angewandt wurde, ist die Testlinie bei Direktaufgabe vollständig entfärbt (vgl. Abbildung 49, rechts). Daraus lässt sich schließen, dass nur eine Teilmenge der Flächenkontamination tatsächlich in den Teststreifen gelang. Um diese Teilmenge abschätzen zu können, wurden die Flächen nach der Testdurchführung mittels klassischer Wischprobenahme und LC-MS/MS-Analytik untersucht. Dadurch sollte die auf der Fläche zurückgebliebene Substanzmenge ermittelt werden. **Die wiedergefundenen Mengen lagen im Bereich von 20 % bis x % der aufgetragenen Mengen** und spiegeln somit die Ergebnisse aus Kapitel 5.4.2 wider.

5.8 Validierung, vor Ort Einsatz, Lagerungsversuche (IUTA)

5.8.1 Validierung und vor Ort Einsatz

Die Validierung des Wischtests zum Nachweis von MTX-Flächenkontaminationen erfolgte durch die praktische vor Ort Anwendung im Rahmen einer Studie. Hier wurden mittels klassischem Wischprobenmonitoring in einer Universitätsklinik an 27 Stellen auf verschiedenen Stationen und in Zubereitungsräumen die Kontaminationen durch sieben Zytostatika bestimmt. Unter anderem wurde auch MTX untersucht. Parallel zum

Wischprobenmonitoring wurden möglichst dicht neben den beprobten Stellen MTX-Wischttests angewendet. Eine direkte Anwendung auf den beprobten Flächen schließt sich aus, da durch die Wischproben diese Flächen sehr stark gereinigt und somit keine höheren Konzentrationen mehr zu erwarten sind. Genauso ist die Anwendung des Wischprobenmonitorings nach der Wischtestdurchführung wenig aussagekräftig, da auch hier eine Abreinigung der beprobten Fläche stattfindet.

Aufgrund dieser inhärenten Problematik der beiden Bestimmungsmethoden (Wischproben und Wischtest) können die gewonnenen Ergebnisse nur orientierenden Charakter haben.

Die Durchführung der Wischttests erfolgte gemäß der in Kapitel 5.7 angegebenen Prozedur. Als Vergleichstest wurde jeweils ein Blindwert-Test mit reinem Puffer durchgeführt. Für die Abgrenzung der zu testenden Fläche wurden Kunststofffolien eingesetzt, die ein 5 x 5 cm² großen Ausschnitt besaßen und als Einmalartikel verwendet wurden. Diese Folien wurden auf die Flächen gelegt, die anschließend mit vollentsalztem Wasser befeuchtet wurden. Nachdem mit dem Wischtest die Fläche abgewischt worden war, wurde auf den Wischbereich mittels Pipette 100 µL Puffer aufgegeben. Nach ca. 50 Sekunden Wartezeit wurde die Testlinie mit der des Blindwertes verglichen.



Abbildung 50 Bilder zur Vorgehensweise bei der vor Ort Anwendung des MTX-Wischttests. Linkes Bild: Die Probenahmestelle wird mit einer ausgeschnittenen Folie abgegrenzt. Rechtes Bild: Nach der Befeuchtung der Fläche wird diese mit dem Wischttests beprobt.



Abbildung 51 Probenahmestelle mit positivem MTX-Befund durch den Wischtest.

Von den 27 durchgeführten Wischttests zeigte einer einen positiven Befund für MTX. Dieses wurde durch eine geringfügig schwächere Testlinie als in der Blindwertkontrolle deutlich. Durch eine anschließende Wischprobe auf derselben, aber auch darüber hinausgehenden Fläche (675 cm^2) sollte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die spätere LC-MS/MS-Analyse im IUTA zeigte ein Ergebnis von $0,013 \text{ ng/cm}^2$ MTX. Damit war bewiesen, dass sich auf der Fläche MTX befunden hat und der MTX-Wischtest ein richtiges Ergebnis anzeigte. Eine Aussage über die ursprüngliche Konzentration lässt sich aufgrund der oben angeführten Problematik nicht treffen.

Von den 27 durchgeführten Wischproben zeigten acht Proben (inkl. der im Absatz vorher erwähnten) einen positiven Befund für MTX. Die Konzentrationen der beprobten Flächen lagen im Bereich zwischen $1,5$ bis $< 0,005 \text{ ng/cm}^2$ und somit unterhalb der in Kapitel 5.7 definierten Nachweisgrenze für den Wischtest von 2 ng/cm^2 MTX bei 25 cm^2 Wischfläche. Der Vergleich mit den negativen Wischtestergebnissen ist, wie bereits angeführt, nicht möglich, da niemals dieselbe Fläche beprobt werden konnte. Die Wischprobenergebnisse geben lediglich einen Hinweis auf die Kontaminationssituation, lassen aber keinen direkten Rückschluss auf die Kontaminationen der mit dem Wischtest beprobten Flächen zu.

5.8.2 Lagerungsversuche

Für die Untersuchung der Lagerstabilität der Teststreifen mit den darin befindlichen Reagenzien wurden über neun Monate wiederholt Wischttests mit MTX dotiert, um die Funktionalität über einen langen Zeitraum zu kontrollieren.

Die Lagerung der Teststreifen erfolgte bei möglichst niedriger Luftfeuchtigkeit bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss. Dazu wurden die Streifen in aluminiumkaschierten Kunststoffbeuteln mit Trockengel-Kissen aufbewahrt. Alle zwei

Wochen wurden zwei Teststreifen verwendet, um einen Blindwertversuch und einen Versuch mit 100 ng Direktaufgabe von MTX durchzuführen. Die Lagerversuche dauern weiterhin an.

6 Ausblick

Wie im Verwertungsplan angekündigt, wird das Ergebnis des Vorhabens regelmäßig seit 2005 in den halbjährig vom IUTA veranstalteten Fortbildungsveranstaltungen „Sicherer Umgang mit Zytostatika und anderen hochwirksamen Arzneimitteln“ vorgestellt. Dabei werden Zytostatika be- und verarbeitendem Personal aus Kliniken und Apotheken Kontaminationsrisiken und -quellen bewusst gemacht. Darauf basierend werden Strategien vermittelt, wie einfache Maßnahmen vor einer Exposition schützen können. Die Veranstaltungen werden durchschnittlich von 50 bis 60 Teilnehmern besucht. Dadurch ergibt sich eine Verbreitung der Ergebnisse direkt unter den potenziellen zukünftigen Kunden der entwickelten Technik.

Im Rahmen der Präsentation des Wischtests auf der MEDICA 2005 (Internationale Fachmesse mit Kongress „Weltforum der Medizin“) in Düsseldorf wurde Kontakt mit einem mittelständischen Unternehmen aus der medizinischen Diagnostik aufgenommen. In diesem forschenden Unternehmen wurde die Entscheidung getroffen, den Wischtest zusammen mit dem Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. im Rahmen des Programmes PRO INNO II weiter zu entwickeln. Dabei soll auch der Wischtest für 5-Fluorouracil anwendbar werden.

Die Erfahrungen, die während der Antikörperentwicklung mit Cyclophosphamid und Chlorambucil gemacht wurden, führten am Institut für Energie- und Umwelttechnik e.V. zu dem Entschluss, für Cyclophosphamid einen Wischtest zu entwickeln, der auf gänzlich anderen Prinzipien beruht. Cyclophosphamid ist hinsichtlich seiner hohen Toxizität und großer Verbrauchsmengen weiterhin von Interesse für eine solche Entwicklung, was auch von den Mitgliedern des projektbegleitenden Ausschusses bestätigt wurde. Diesbezüglich ist zur Zeit ein Forschungsantrag in der Entstehung, der im IGF-Programm beantragt wird.

7 Anhang

Tabelle 7-1 Übersicht von Studien zur Flächenbelastung mit Zytostatika (Arbeitsflächen, Fußböden, Lagerflächen, Transport- und Abfallbehälter).

Zitat	Probenahmeort	Untersuchte Substanz(en)	Anzahl Flächen	Anzahl Wischproben	Anteil belasteter Wischproben	Flächenbelastung
D, 2001 ¹	13 Apotheken/ 2 Stationen	Cyclophosphamid Ifosfamid platinhaltige Zytostatika (als Pt)	k. A. k. A. k. A.	181 181 141	50% (91)* 31% (56)* 79% (112)*	1-1,3×10 ³ ng/Wp 3-106×10 ³ ng/Wp 0,013-92 ng/Wp
Canada/ USA, 1999 ²	6 Kliniken: Apotheken	Cyclophosphamid	46	46	100% (46)*	0,01-40 ng/cm ²
		Ifosfamid	32	32	75% (24)*	0,01-4,7 ng/cm ²
		Fluorouracil	46	46	25% (23)*	0,72-209 ng/cm ²
	Stationen	Cyclophosphamid	36	36	92% (33)*	0,01-1,0 ng/cm ²
		Ifosfamid	20	20	50% (10)*	0,01-0,41ng/cm ²
		Fluorouracil	36	36	47% (17)*	0,70-15 ng/cm ²
D, 1998 ³	1 Klinik-Apotheke (1991-1995)	platinhaltige Zytostatika (als Pt)	9	75	29% (22)*	6-3.200 ng/Wp
I, 1998 ⁴	2 Klinik-Apotheken	Cyclophosphamid	49	49	98% (48)*	0,02-3,8×10 ³ ng/cm ²
		Ifosfamid	49	49	80% (39)*	0,02-1,4×10 ³ ng/cm ²
NI, 1994 ⁵	Produktionsbereich	Fluorouracil	6	6	83% (5)*	70-630 ng/cm ²
USA, 1993 ⁶	1 Klinik: Apotheke, Station + amb. Bereich	Cyclophosphamid	34	34	18% (6)*	5-35 ng/cm ²
		Cyclophosphamid	42	42	14% (6)*	
NI, 1992 ⁷	1 Klinik: Apotheke Ambulant. Bereich	Fluorouracil	5	15	60% (9)*	< 0,1 ng/cm ²
		Fluorouracil	3	9	89% (8)*	< 0,1 ng/cm ²
NI, 1992 ⁸	1 Klinik-Apotheke	Cyclophosphamid	8	8	25% (2)*	1,4-1,6 ng/cm ²
		Fluorouracil	8	8	100% (8)*	48-236 ng/cm ²
		Methotrexat	8	8	0% (0)*	---

* Gesamtprobenanzahl

Material für die ELISA-Entwicklung (Abschnitt 5.2, ab Seite 37)

Mikrotiterplatten

Microlon der Firma Greiner - Bestellnummer 655061

96 Kavitäten, F-Form, Bindungskapazität hoch

Mikrotiterplatten-Reader

Typ SUNRISE der Firma TECAN

Acht-Kanal-Pipetten der Firma Eppendorf

100 µL, 300 µL

Folgende Reagenzien und Pufferlösungen wurden verwendet:

Antikörper

gegen Methotrexat

Klon 64-6-8, 20-1-2, 4-10-2, 6-1-5, 10-3-6, 13-1-3, 2-20-1, 9-12-5

gegen 5-Fluorouracil

Klon 9-9, 7-3, 22-5

Antigen

Methotrexat-BSA-Konjugat, freies Methotrexat

5-Fluorouracil-BSA-Konjugat, freies 5-Fluorouracil

Diethanolamin-Beschichtungspuffer

100 mg Na₂CO₃

200 mg NaHCO₃

95 mL Diethanolamin

pH 9,8; auf 1 Liter H₂O dest.

Carbonat/Bicarbonat-Beschichtungspuffer

2,12g Na₂CO₃

2,52 g NaHCO₃

pH 9,6; auf 1 Liter H₂O dest.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (TBS)

29,220 g NaCl

6,055 g Tris

pH 7,8; auf 1 Liter H₂O dest.

Waschpuffer (TBS), pH 7,4

TBS + 0,1% (v/v) Tween 20

Blockierungssubstanz (im optimierten Test verwendet)

2 % Gelatine (Sigma G 7765) in TBS

Superblocker von Pierce

Bestellnummer 37535, ist aufgrund eines starken Hintergrundrauschens nicht einsetzbar

Substrat für alkalische Phosphatase

P-Nitrophenyl-Phosphat

Konzentration 1 mg/mL

1 Tablette in 20 mL Diethanolaminpuffer

Material für die Antikörper-Goldkolloid-Konjugation (Abschnitt 5.3, ab Seite 63)

Magnetischer Rührer

Kühlzentrifuge (16.000 x g) bei 4°C

Spektralphotometer (Wellenlänge von 400 und 700 nm)

pH-Meter mit Gel-gefüllter Elektrode

Eppendorff-Pipetten

Pipettenspitzen (PCR-Filterpipettenspitzen)

Cellulosefilter 45 µm

Dialyseschlauch (MWCO 12000-14000)

Goldkolloide S&S 40 nm (Firma Schleicher & Schuell Bioscience GmbH)

Na-Tetraborat 2 mM (pH= 9)

0,1 M HCl

0,2 M Kaliumcarbonat

Lagerungspuffer

0,1 % NaN₃; 1 % BSA; 20 mM Na H₂PO₄, pH= 7,4

10 mM Na₂H₂PO₄

10 % (W/V) BSA

10 % NaCl

Trehalose

Saccharose

8 Literatur

-
- ¹ Pethran A, Schierl R, Schmaus G. Wischproben an Arbeitsplätzen mit Zytostatika-Exposition. *Krankenhauspharmazie*. 2001; 22(5): 11-5.
 - ² Connor TH, Anderson RW, Sessink PJM, Broadfield L, Power LA. Surface contamination with antineoplastic agents in six cancer treatment centers in Canada and the United States. *Am J Health-Syst Pharm*. 1999; 56: 1427-32.
 - ³ P.J.M. Sessink, K.A. Boer, A.P.H. Scheefhals, R.B.M. Anzion, R.P. Bos. Occupational exposure to antineoplastic agents at several departments in a hospital. Environmental contamination and excretion of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of exposed workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 1992; 64:47-52
 - ⁴ Paul H, Baumann L, Artelt S, Kock H. Umgebungskontrolle auf Kontaminationen mit Zytostatika - Nachweis von Platin auf Oberflächen mit zentraler Zytostatikaherstellung. *Krankenhauspharmazie*. 1998; 19(4): 181-6.
 - ⁵ Minoia C, Turci R, Sottani C, Schiavi A, Perbellini ., Angeleri S, Draicchio F, Apostoli P. Application of high performance liquid chromatography tandem mass Spectrometry in the environmental and biological monitoring of health care personnel occupationally exposed to Cyclophosphamide and Ifosfamide. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 1998; 12 (20): 1485-93
 - ⁶ McDevitt JJ, Lees PSJ, McDiarmid MA. Exposure of hospital pharmacists and nurses to antineoplastic agents. *Journal of Occupational Medicine*1993; 35; 57-60
 - ⁷ P.J.M. Sessink, J.L. Timmersmans, R.B.M. Anzion, R.P. Bos. Assessment of occupational exposure of pharmaceutical plant workers to 5-Fluorouracil. *J. Occup. Med*. 1994; 36:79-83
 - ⁸ P.J.M. Sessink, R.B.M. Anzion, P.H.H. van den Broek, R.P. Bos Detection of contamination with antineoplastic agents in a hospital pharmacy department. *Pharmaceutisch Weekblad [Sci]* 1992; 14: 16-22.
 - ⁹ Pethran, A., R. Schierl, et al. (2003). "Uptake of antineoplastic agents in pharmacy and hospital personnel. Part I: monitoring of urinary concentrations." *Int Arch Occup Environ Health* 76(1): 5-10.
 - ¹⁰ Schreiber, C., K. Radon, et al. (2003). "Uptake of antineoplastic agents in pharmacy personnel. Part II: study of work-related risk factors." *Int Arch Occup Environ Health* 76(1): 11-6.
 - ¹¹ Schierl R., Pethran A., et al. (2002). Beurteilung der Exposition gegenüber Zytostatika mittels standardisierter Wischproben. Schlussbericht. München, Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie, Berufsgenossenschaft für Wohlfahrtspflege, Bundesunfallkasse.