



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Fakultät für Klinische Medizin Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Aufreinigung des gegen Heparin gerichteten monoklonalen  
Antikörpers H 1.18**

Autor: Thomas Mrotzek  
Einrichtung: I. Medizinische Klinik  
Doktorvater: Prof. Dr. J. Harenberg

Nachdem es gelungen war, einen monoklonalen Antikörper gegen Heparin herzustellen und in Hybridomzellkultur zu produzieren (Semin Thromb Hemost 1994; 20: 193-204), setzte sich die vorliegende Arbeit zum Ziel, eine geeignete Technik der Aufreinigung aus den Zellkulturen zu erreichen.

Um den Antikörper in Testsystemen einsetzen zu können, muß eine Kontamination mit anderen Substanzen vermieden werden, da diese unter Umständen mit eingesetzten Agentien reagieren und so zu Effekten führen können, die dann dem Antikörper zugeschrieben werden. Darüber hinaus wird nur sehr wenig Antikörper in ein relativ großes Volumen sezerniert, daher ist es auch wichtig den Antikörper zu konzentrieren.

Es wurden verschiedene Verfahren getestet, mit denen eine Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers gegen Heparin möglich ist. Zur Anwendung kamen die Ammoniumsulfatfällung, die Caprylessigsäurefällung, die Gelfiltration, die Säulenchromatographie mit Protein A/G, die T-Gel-Aufreinigung und die Affinitätschromatographie mit Heparin-Agarose, Protein A und Protein A/G. Die Analyse der aufgereinigten Proben bestand darin, den Proteingehalt zu bestimmen, die Wirkung auf die anti-Faktor Xa Aktivität von Heparin im chromogenen Assay S 2222 zu überprüfen und ihr spezifisches Bindungsverhalten gegenüber radioaktiv markiertem Heparin in einem Radioimmunoassay zu testen (Thromb Res 1995; 79: 207-216).

Die Reinheit der Proben wurde nach Ammoniumsulfatfällung durch Kapillar-, nach Protein A-Aufreinigung durch Gelelektrophorese nachgewiesen. Die Proteindetektion nach T-Gel-Aufreinigung durch Gelelektrophorese ergab einen hohen Anteil an kontaminierenden Fremdproteinen. Die übrigen Methoden erwiesen sich als nicht geeignet.

Mit der Ammoniumsulfatfällung und der Protein A-Aufreinigung im Batch-Verfahren konnten zwei Methoden etabliert werden, mit denen eine Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers gegen Heparin möglich ist. Der aufgereinigte Antikörper steht pharmakologischen und biochemischen Studien zur Verfügung.