



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

**Entwicklung von anti-rekombinanten Hirudin-Antikörpern bei  
Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie und  
Entwicklung eines kompetitiven ELISA zur Quantifizierung von  
PEG-Hirudin im menschlichen Plasma**

Autor: Xuehong Song  
Einrichtung: I. Medizinische Klinik  
Doktorvater: Prof. Dr. J. Harenberg

Rekombinantes (r)-Hirudin ist ein kleines Protein mit einer starken Bindung an und Inhibition von Thrombin. Aufgrund seiner Proteinstruktur kann es antigen wirken. Das Auftreten und das Abfallen der Konzentration von Antihirudin-Antikörpern wurde bei Patienten mit Heparin-induzierter Thrombozytopenie (HIT) untersucht, die mit r-Hirudin für 5 und mehr Tage behandelt wurden. Die IgA, IgE, IgG und IgM Isotypen der Antihirudin-Antikörper wurden mittels Enzymimmunosorbent Assays (ELISA) vor und nach Beginn der Hirudintherapie gemessen. 56 % (13/23) Patienten entwickelten einen oder mehrere Antikörper-Isotypen während der Therapie. IgE-Antikörper entstanden nicht. IgA, IgG und IgM Antikörper wurden bei 30 % (7/21), 52 % (12/23) und 17 % (4/23) Patienten gefunden. 4 Patienten entwickelten nur IgG, 1 Patient jeweils IgM oder IgG und IgM, 5 Patienten entweder IgG oder IgA und 2 Patienten entweder IgG, IgM und IgA-Antikörper. IgM Antikörper fielen in ihrer Konzentration innerhalb von 8 Tagen nach Absetzen von r-Hirudin ab. IgA und IgE Antikörper wurden innerhalb eines Jahres außer in einem Patienten eliminiert. Die Bindung von gereinigtem IgG an r-Hirudin bei IgG Antikörper-positiven Patienten (n=7) konnte anhand eines kompetitiven ELISA für r-Hirudin bewiesen werden. Einer von 7 aufgereinigten IgG Antikörpern neutralisierten oder verstärkten die antikoagulante Wirkung von r-Hirudin. Die Ergebnisse zeigen, dass r-Hirudin bei Patienten mit Hirudintherapie bei einer HIT antigen wirkt. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die biologische Relevanz der Antikörper weiter zu definieren und die Entwicklung von Antikörpern bei anderen Erkrankungen unter r-Hirudintherapie festzulegen.

In dem zweiten Teil der Promotion wurde ein kompetitiver ELISA entwickelt und validiert, um PEG-Hirudin mit menschlichem Plasma zu messen. Eine PEG-Hirudin Verdünnungsreihe konnte empfindlich von 50 bis 7.000 ng/ml messen. Die untere Nachweisgrenze betrug 87 ng/ml. Der Intra-Assay Variationskoeffizient reichte von 16 bis 21 % und der Inter-Assay Variationskoeffizient von 8-22 % für niedrige bzw. hohe PEG-Hirudin Konzentrationen. Die Wiederfindungsrate im Plasma lag zwischen 96-111,5 %. Die interindividuellen Unterschiede zwischen 100-500 ng PEG-Hirudin/ml lagen zwischen 12-22 %. Der Korrelations-koeffizient der Konzentration, gemessen mit dem PEG-Hirudin-ELISA und der Ecarin Gerinnungszeit betrug 0,902. Keine Interaktionen fanden sich in dem ELISA mit unfraktioniertem oder niedermolekularem Heparin oder Phenprocoumon. In Thrombin oder Antithrombin III-defizientem Plasma, in Gegenwart von niedrigen, normalen oder hohen Fibrinogenkonzentrationen fanden sich keine Interaktionen im ELISA. Die Ergebnisse zeigen, dass der ELISA spezifisch die Konzentration von PEG-Hirudin messen kann und nicht durch andere Antikoagulantien oder pathologische Plasmakon-zentrationen einzelner Gerinnungsproteine beeinflusst wird.