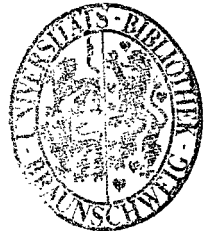


4539 - 911 6

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich - Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Apotheker Markus Mägerlein
aus Erlenbach



Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 1995

A THEORETISCHER TEIL

1 EINLEITUNG	1
1.1 PARATHORMON	1
1.1.1 <i>Biosynthese und Metabolismus</i>	1
1.1.2 <i>Physiologische Bedeutung</i>	4
1.1.3 <i>Pathophysiologie</i>	6
1.1.4 <i>Therapeutische Anwendung</i>	7
1.2 ANALYTIK VON PARATHORMON	8
1.2.1 <i>Radioimmunoassay</i>	8
1.2.2 <i>Bioassay</i>	9
1.2.3 <i>Immunometrische Assays</i>	10
1.2.3.1 <i>Immunoradiometrischer Assay</i>	11
1.2.3.2 <i>Immunochemiluminometrischer Assay</i>	12
2 PROBLEMSTELLUNG	15
3 ERGEBNISSE	17
3.1 PEPTIDSYNTHESE	17
3.2 IMMUNISIERUNG	22
3.2.1 <i>Durchführung der Immunisierung</i>	24
3.2.2 <i>Titerbestimmung</i>	25
3.2.3 <i>Titerverlauf</i>	25
3.2.4 <i>Aufreinigung der Antikörper</i>	26
3.3 PRODUKTION MONOKLONALER ANTIKÖRPER	27
3.3.1 <i>Aufreinigung</i>	27
3.4 CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPER.....	29
3.4.1 <i>Bestimmung der Bindungs epitope der poly- und monoklonalen Antikörper</i>	29
3.4.2 <i>Bindungs epitope der mAk</i>	35
3.4.3 <i>Subtypisierung der mAk</i>	36

3.5 ENTWICKLUNG EINES IMMUNOENZYMOMETRISCHEN ASSAYS FÜR HPTH-1-37	37
3.5.1 Auswahl und Konzentration der Antikörper	37
3.5.1.1 Konzentration des Wandantikörpers	37
3.5.1.2 Auswahl und Konzentration des 2. Antikörpers	38
3.5.1.3 Auswahl und Konzentration des Detektionsantikörpers	40
3.5.2 Optimierung der Konzentration des Wand- und des 2. Antikörpers	41
3.5.3 Bindungskinetik des Wandantikörpers	42
3.5.4 Bindungskinetik des 2. Antikörpers	43
3.5.5 Optimierung des Nachbeschichtungspuffers	45
3.5.6 Puffer zur Verdünnung des 2. und 3. Antikörpers	47
3.5.7 Matrix zur Herstellung der Standards	48
3.5.8 Herstellung der Standards	50
3.6 VALIDIERUNG	53
3.6.1 Kalibrierfunktion	53
3.6.2 Nachweisgrenze	55
3.6.3 Wiederfindung und Linearität bei Verdünnung	55
3.6.4 Präzision	57
3.6.5 Kreuzreaktivität mit hPTH Fragmenten	59
3.6.6 Kreuzreaktivität mit oxidiertem hPTH-1-37	60
3.6.7 Probenstabilität	63
3.7 ENTWICKLUNG EINES IMMUNOCHEMILUMINOMETRISCHEN ASSAY FÜR HPTH-1-37	66
3.7.1 Auswahl und Konzentration des Wandantikörpers	66
3.7.2 Bindungskinetik des Wandantikörpers	67
3.7.3 Konzentration des 2. Antikörpers	69
3.7.4 Bindungskinetik des 2. Antikörpers	70
3.7.5 Konzentration des Detektionsantikörpers	71
3.7.6 Bindungskinetik des Detektionsantikörpers	72
3.7.7 Puffer zur Verdünnung der Antikörper	73
3.7.8 Kalibrierfunktion	75
3.7.9 Nachweisgrenze	76

3.8 ENTWICKLUNG EINES ANTIKÖRPERASSAYS.....	77
3.8.1 <i>Direkte Immobilisierung des Antigens</i>	77
3.8.2 <i>Streptavidin - Biotin System</i>	78
3.8.2.1 Konzentration an immobilisiertem Antigen.....	79
3.8.2.2 Optimierung des Nachbeschichtungspuffers.....	81
3.8.2.3 Vergleich direkte Immobilisierung - Streptavidin-Biotin System.....	82
3.9 EVALUIERUNG DES INTACT HPTH IMMUNORADIOMETRISCHEN ASSAY FÜR DIE MESSUNG VON INTAKTEM CANINEM PTH.....	88
3.9.1 <i>Serumspiegel von intaktem PTH im Beagle-Hund nach Infusion von Ca²⁺</i>	88
3.9.2 <i>Serumspiegel von intaktem PTH im Beagle-Hund nach Infusion von EDTA</i> ...	89
4 PHARMAKOKINETISCHE UNTERSUCHUNGEN ZU HPTH-1-37	91
4.1 KONTROLLEN.....	91
4.1.1 <i>Serumspiegel des N-terminalen cPTH</i>	91
4.1.2 <i>Intact cPTH-Serumspiegel</i>	92
4.1.3 <i>1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Serumspiegel</i>	93
4.1.4 <i>Kalziumserumspiegel</i>	94
4.1.5 <i>Diskussion der Kontrollwerte</i>	95
4.2 SERUMSPIEGEL NACH GABE VON 3 µG HPTH-1-37/KG S. C.	97
4.2.1 <i>HPTH-1-37-Serumspiegel</i>	97
4.2.2 <i>Intact PTH-Serumspiegel</i>	98
4.2.3 <i>1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Serumspiegel</i>	99
4.2.4 <i>Kalziumserumspiegel</i>	99
4.2.5 <i>Pharmakokinetische Parameter</i>	100
4.3 SERUMSPIEGEL NACH GABE VON 10 µG HPTH-1-37/KG S. C.	101
4.3.1 <i>HPTH-1-37-Serumspiegel</i>	101
4.3.2 <i>Intact PTH-Serumspiegel</i>	102
4.3.3 <i>1,25(OH)₂-Vitamin D₃-Serumspiegel</i>	102
4.3.4 <i>Kalziumserumspiegel</i>	103
4.3.5 <i>Pharmakokinetische Parameter</i>	103

4.4 SERUMSPIEGEL NACH GABE VON 30 µG HPTH-1-37/KG S. C.....	104
4.4.1 HPTH-1-37-Serumspiegel.....	104
4.4.2 Intact PTH-Serumspiegel.....	105
4.4.3 1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ -Serumspiegel.....	105
4.4.4 Kalziumserumspiegel.....	106
4.4.5 Pharmakokinetische Parameter.....	106
4.5 DISKUSSION PHARMAKOKINETISCHER PARAMETER.....	107
4.6 AUSWERTUNG UND DISKUSSION DER CPTH-1-84-SERUMSPIEGEL.....	110
4.7 AUSWERTUNG UND DISKUSSION DER 1,25(OH) ₂ -VITAMIN D ₃ -SERUMSPIEGEL.....	111
4.8 AUSWERTUNG UND DISKUSSION DER KALZIUMSERUMSPIEGEL.....	112
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	114

B PRAKTISCHER TEIL

6 VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN.....	117
7 ALLGEMEINE HINWEISE.....	119
7.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	119
7.2 GERÄTE.....	119
7.3 REAGENZIEN.....	121
7.4 PEPTIDE.....	122
7.5 ANTIKÖRPER.....	123
7.6 ZELLINIEN.....	123
7.7 ZELLKULTURMEDIENTEN.....	123
7.8 PUFFER.....	124
7.9 KOMMERZIELLE TESTKITS.....	127
8 METHODEN.....	128
8.1 SIMULTANE MULTIPLE PEPTIDSYNTHESE (SMPS).....	128
8.2 ABSPALTUNG DES PEPTIDES VOM TRÄGERHARZ.....	128
8.3 REVERSE-PHASE-(RP)-CHROMATOGRAPHIE.....	130

8.4	MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE	131
8.5	IMMUNISIERUNG DER KANINCHEN.....	133
8.5.1	<i>Serumgewinnung</i>	133
8.5.2	<i>ELISA zur Antikörperbestimmung im Kaninchen</i>	133
8.5.3	<i>Affinitätschromatographie an immobilisiertem Antigen</i>	134
8.5.3.1	Kopplung eines Antigens an EAH Sepharose 4B	134
8.5.3.2	Durchführung der Chromatographie	135
8.6	ZELLKULTUR.....	135
8.6.1	<i>Kultivierung</i>	135
8.6.2	<i>Zellzählung</i>	136
8.6.3	<i>Einfrieren der Zellklone</i>	136
8.6.4	<i>Auftauen der Zellklone</i>	136
8.6.5	<i>Affinitätschromatographie an Protein G</i>	136
8.6.6	<i>Proteinbestimmung</i>	137
8.7	CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPER.....	138
8.7.1	<i>Bestimmung der Bindungs epitope</i>	138
8.7.1.1	Ergebnisse der Epitopcharakterisierung der polyklonalen Kaninchenantisera	139
8.7.1.2	Ergebnisse der Epitopcharakterisierung der monoklonalen Antikörper....	140
8.8	IMMUNOENZYMOMETRISCHER ASSAY FÜR hPTH-1-37.....	141
8.8.1	<i>ELISA zur Auswahl des Wandantikörpers</i>	142
8.8.2	<i>Kalibrierfunktion</i>	143
8.8.3	<i>Nachweisgrenze</i>	144
8.8.4	<i>Wiederfindung und Linearität bei Verdünnung</i>	144
8.8.5	<i>Präzision</i>	145
8.8.6	<i>Kreuzreaktivität mit hPTH-Fragmenten</i>	145
8.8.7	<i>Kreuzreaktivität mit oxidiertem hPTH-1-37</i>	146
8.8.8	<i>Probenstabilität</i>	147
8.9	IMMUNOCHEMILUMINOMETRISCHER ASSAY FÜR hPTH-1-37.....	148

8.10 ENZYM-LINKED-IMMUNOSORBENT-ASSAY ZUR MESSUNG VON HPTH-1-37-ANTIKÖRPERN IM BEAGLE-HUND	149
8.10.1 Immunisierung der Beagle-Hunde	149
8.10.2 Direkte Immobilisierung des Antigens.....	149
8.10.3 Streptavidin-Biotin System zur Immobilisierung des Antigens.....	150
8.11 IMMUNORADIOMETRISCHER ASSAY FÜR INTAKTES HPTH-1-84.....	152
8.11.1 Durchführung.....	152
8.11.2 Evaluierung für die Messung von caninem, intaktem PTH.....	152
8.11.2.1 Atomabsorptionsspektroskopie zur Bestimmung von Serumkalzium.....	152
8.11.2.2 Infusion von Kalzium	153
8.11.2.3 Infusion von Na ₂ EDTA.....	154
8.12 RADIOREZEPTOR ASSAY FÜR 1,25(OH) ₂ -VITAMIN D ₃	156
8.13 BESTIMMUNG DER PHARMAKOKINETIK VON HPTH-1-37 IM BEAGLE-HUND.....	157
8.13.1 Versuchsdurchführung.....	157
8.13.2 Ergebnisse der Kontrollen.....	158
8.13.2.1 Serumspiegel N-terminales cPTH.....	158
8.13.2.2 CPTH-1-84-Serumspiegel.....	159
8.13.2.3 1,25 (OH) ₂ -Vitamin D ₃ -Serumspiegel.....	159
8.13.2.4 Kalziumserumspiegel.....	160
8.13.3 Ergebnisse nach s.c. Einmalgabe von 3 µg hPTH-1-37/kg.....	161
8.13.3.1 HPTH-1-37-Serumspiegel.....	161
8.13.3.2 CPTH-1-84-Serumspiegel.....	162
8.13.3.3 1,25 (OH) ₂ -Vitamin D ₃ -Serumspiegel.....	162
8.13.3.4 Kalziumserumspiegel.....	163
8.13.4 Ergebnisse nach s.c. Einmalgabe von 10 µg hPTH-1-37/kg.....	164
8.13.4.1 HPTH-1-37-Serumspiegel.....	164
8.13.4.2 CPTH-1-84-Serumspiegel.....	165
8.13.4.3 1,25 (OH) ₂ -Vitamin D ₃ -Serumspiegel.....	165
8.13.4.4 Kalziumserumspiegel.....	166

<i>8.13.5 Ergebnisse nach s.c. Einmalgabe von 30 µg hPTH-1-37/kg</i>	167
8.13.5.1 HPTH-1-37-Serumspiegel.....	167
8.13.5.2 CPTH-1-84-Serumspiegel.....	168
8.13.5.3 1,25 (OH) ₂ -Vitamin D ₃ -Serumspiegel.....	168
8.13.5.4 Kalziumserumspiegel.....	169
<i>8.13.6 Berechnung der pharmakokinetischen Parameter</i>	170
9 LITERATURVERZEICHNIS	171