

Stephan Haas  
Dr. med.

**Proteinchemische und molekularbiologische Synthese von Hybridmolekülen aus monoklonalen anti-Fibrin Antikörpern sowie thrombolytischen und antithrombotischen Substanzen**

Geboren am 21.02.1968 in Bogotá (Kolumbien)  
Reifeprüfung am 22.05.1987  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1988 und SS 1990 – SS 1997  
Physikum am 30.03.1992 an der Universität Hamburg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg und London  
Staatsexamen am 03.06.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Ch. Bode

Bisherige Daten konnten belegen, dass durch Kopplung von fibrinolytischen oder antithrombotischen Substanzen mit Antikörpern, die gegen Fibrin oder aktivierte Thrombozyten gerichtet sind, eine deutliche Wirkungsverstärkung zu erzielen ist. Dagegen liegen keine Erkenntnisse vor, ob mit biochemischen Methoden eine Synthese von Fusionsproteinen aus anti-Fibrin Antikörpern möglich ist, die gleichzeitig ein Fibrinolytikum und eine antithrombotische Substanz enthalten.

Ziel dieser Arbeit war es, mit biochemischen Methoden den Plasminogenaktivator Urokinase sowie den stärksten in der Natur vorkommenden Thrombininhibitor Hirudin mit dem monoklonalen anti-Fibrin Antikörper IgG-59D8 zu koppeln. Dieses Hybridmolekül besitzt somit 3 wichtige Funktionen:

Durch die Bindung des anti-Fibrin Antikörpers an den Thrombus ist eine hohe Selektivität gegeben. Urokinase führt über eine Plasminogenaktivierung zu einer Fibrinolyse des Thrombus und Hirudin verhindert gleichzeitig über eine Inhibition von Thrombin die Neusynthese von Fibrin und hemmt im Bereich des Thrombus eine weitere Plättchenaktivierung durch Thrombin. Der anti-Fibrin Antikörper wurde nach intraperitonealer Injektion von 59D8-IgG produzierenden Hybridomazellen aus Mäuseaszites gewonnen und konnte affinitätschromatographisch von Albumin und anderen Proteinverunreinigungen befreit werden.

Um eine kovalente Bindung von Urokinase und Hirudin mit dem Antikörper zu ermöglichen, mussten beide Substanzen mit dem heterobifunktionellen Quervernetzungsreagenz SPDP (N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionat) umgesetzt werden. Nachdem der Antikörper mit Iminothiolane modifiziert wurde, konnte über einen Disulfidaustausch eine Kopplung von Urokinase-PDP bzw. Hirudin-PDP mit den Iminothiolane-Resten des Antikörpers erfolgen. Ein doppelaffinitätschromatographischer Reinigungsschritt mit Benzamidine-Sepharose und B- $\beta$ -Peptid-Sepharose schloß sich an, um das Hybridmolekül von den übrigen Reaktionspartnern zu befreien.

0,3 mg in einer Konzentration von 0,1 mg/ml konnten so gewonnen werden. Durch Aktivitätstests wurde die amidolytische Urokinaseaktivität und die thrombininhibitorische Hirudinaktivität bestätigt.

Die nur geringe Ausbeute mit einem damit verbundenen starkem Abfall der enzymatischen Aktivität ist durch die fehlende Selektivität der modifizierenden Reagenzien (SPDP und Iminothiolane) erklärbar, die auch diejenigen Aminosäuren von Urokinase, Hirudin und dem Antikörper chemisch verändern, die für die enzymatische Aktivität bzw. Bindungsfunktion essentiell sind. Durch chemische Veränderung dieser wichtigen Molekülbereiche verringert sich die Möglichkeit einer selektiven affinitätschromatographischen Aufreinigung.

Der zweite Teil dieser Arbeit setzte sich zum Ziel, mit molekularbiologischen Methoden ein Hybridmolekül aus einem 59D8-IgG Antikörperfragment und einem bisher nicht

charakterisierten thrombininhibitorischen Peptid zu synthetisieren, das sich von der Thrombinbindungsregion des Thrombinrezeptors ableitet.

Die für das thrombininhibitorische Peptid kodierende DNA (TIP-DNA) war in einen pQE-40 Vektor kloniert worden und wurde in einer Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der hierfür verwendete sense-Primer enthielt einen DNA-Abschnitt, der die Aminosäuresequenz für den Gerinnungsfaktor Xa kodierte. Diese Schnittstelle sollte eine Abspaltung des thrombininhibitorischen Peptids von dem Antikörperfragment nach Bindung an den Thrombus ermöglichen und somit eine optimale antithrombotische Wirkung erzielen.

Nachdem die amplifizierte TIP-DNA in einen p220-RX Expressionsvektor kloniert worden war, der die schwere Kette (mit Ausnahme der C<sub>H</sub>3-Domäne) enthielt, wurde das p220-RX Plasmid in Hybridomazellen elektroporiert. Diese enthielten die genetische Information für die leichte Kette des anti-Fibrin Antikörpers.

Weder affinitätschromatographisch noch mit Hilfe eines ELISA unter Verwendung eines Peroxidase markierten anti-(Fab')<sub>2</sub>-Antikörpers waren TIP-Fab'(C<sub>H</sub>2)-59D8-Hybridmoleküle im Zellüberstand nachweisbar. Auch die RNA-Extraktion mit anschließender RT-Reaktion und Amplifizierung der TIP-DNA erbrachte nicht den erhofften Nachweis einer Expression des Hybridmoleküls

Trotz mehrfacher Wiederholungen der Transfektion war es nicht gelungen, einen Hybridoma-Klon zu isolieren, der die genetische Information für die schwere Kette und das thrombininhibitorische Peptid in die chromosomale DNA integriert hatte, um dann das vollständige Hybridmolekül in den extrazellulären Raum zu sezernieren. Aber auch ein nicht funktionsfähiger Immunglobulin-Promoter bzw. -Enhancer sowie eine erhöhte mRNA-Instabilität können zu einer fehlenden Expression von Hybridmolekülen führen.

Inzwischen ist es gelungen, humane Antikörperfragmente in Bakterien zu synthetisieren, wodurch auf eine Immunisierung von Mäusen und die Verwendung von Hybridomazellen verzichtet werden konnte.

Diese Methode bietet die Aussicht, gentechnologisch neue, noch wirkungsvollere fibrinolytische und antithrombotische Substanzen zu gewinnen.