

Justin P. Gräber  
Dr. med.

**Therapeutische Antikörper-Fusionsproteine – Klonierung, Darstellung und Austestung von rekombinanten Fusionsproteinen aus einem fibrinspezifischen ScFv-Antikörperfragment und den Thrombininhibitoren Hirudin und Hirudisin bzw. dem Plasminogenaktivator Urokinase**

Geboren am 26. 03. 1971 in Sebnitz  
Staatsexamen am 28. 11. 2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. med. C. Bode

Eine der weltweit häufigsten Todesursachen stellt die Thrombose dar, insbesondere die der Koronararterien, die zum Herzinfarkt führen kann. Aber auch thromboembolische Komplikationen anderer Gefäße, wie z. B. von Beckenvenen, tiefen Beinvenen, Lungenvenen, Herzklappen oder Hirnarterien, sind gefürchtete Störungen des Gerinnungs- bzw. Kreislaufsystems. Seit Jahrzehnten steht die Thrombose deshalb im Zentrum der medizinischen Forschung. Es stehen bisher effektive Therapiemethoden und pharmakologische Konzepte zur Verhinderung und Beseitigung einer Thrombose zur Verfügung, unter denen aber z. T. schwerwiegende und u. U. tödliche Komplikationen, wie z. B. Blutungen, auftreten können.

Ziel der Arbeit war die Entwicklung eines neuen pharmakologischen Konzepts, das der Verbesserung des Verhältnisses von Wirkungen und Nebenwirkungen von Thrombose-Therapien dienen soll. Ein Aspekt dieses Konzepts ist die Konzentrierung der Thrombose-Therapeutika am Zielwirkort mittels kleiner Antikörperfragmente, ein anderer die ausschließlich an ihrem Zielwirkort stattfindende Aktivierung der Thrombose-Therapeutika, was aufgrund einer inserierten Faktor-Xa-Schnittstelle möglich wird. Verwirklicht wurde dieses neue pharmakologische Konzept durch die rekombinante Kontruktion kleiner bifunktionaler Fusionsproteine aus einer fibrinspezifischen Antikörperdomäne und einer antikoagulatorisch bzw. fibrinolytisch wirksamen Domäne. Diese Fusionsproteine können über rekombinante Techniken hergestellt und mittels prokaryotischer Expressionssysteme kostengünstig und effektiv produziert werden und sie besitzen günstige pharmakokinetische und immunologische Eigenschaften.

Durch rekombinante Fusion der Gene der variablen Regionen der schweren und der leichten Kette des Antikörpers 59D8, zwischen die das Gen für einen Peptidlinker kloniert wurde, gelang es, das Gen für ein fibrinaffines und –spezifisches single-chain-Antikörperfragment (ScFv<sub>59D8</sub>) herzustellen. ScFv<sub>59D8</sub> besitzt nachgewiesenermaßen eine hohe Affinität für Fibrin, nicht aber für Fibrinogen, da es an ein N-terminales Epitop bindet, welches im Fibrinogen noch verdeckt ist und erst nach Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin durch Konformationsänderungen im Molekül dem Antikörper präsentiert wird. Daher begründet sich die gleichfalls nachgewiesene hohe Spezifität für Fibrin.

Nach Expression und affinitätsabhängiger klonaler Selektion (Panning) des Translationsprodukts dieses ScFv<sub>59D8</sub>-Gens wurde es jeweils mit den Genen verschiedener haemostasiologisch wirksamer Therapeutika, wie der Antikoagulantien Hirudin und Hirudisin und des Fibrinolytikums Urokinase, rekombiniert. Dabei war es gelungen, die Gene dreier therapeutisch interessanter Fusionsproteine herzustellen, deren Translationsprodukte biochemisch charakterisiert und auf ihre Funktionen hin getestet wurden. Alle drei Fusionsproteine zeigten eine spezifische Affinität zum Fibrin und eine nachweisbare haemostasiologisch bedeutsame Wirkung: Potentiell antikoagulatorisch wirkende Fusionsproteine, die die Domänen für Hirudin oder Hirudisin enthielten, wiesen eine nachweisbare Thrombin-Inhibition auf, während potentiell fibrinolytisch wirkende Fusionsproteine eine nachweisbare Plasminogen-Aktivie-

rung zeigten. In den antikoagulatorisch wirksamen Fusionsproteinen ist die thrombininhibitorische Domäne jeweils an ihrem N-Terminus über eine proteatische Erkennungssequenz für den Haemostase-Faktor Xa mit der Antikörperdomäne verbunden. In gebundener Form entfalten die Thrombininhibitoren Hirudin und Hirudisin keine entsprechende Wirkung, da ihre Funktionalität einen freien N-Terminus verlangt. In Anwesenheit von Faktor Xa, der bei Gerinnungsaktivierung in hohen Konzentrationen am wachsenden Thrombus auftritt, können die Thrombininhibitoren aus dem Fusionsprotein unter Erlangung eines freien N-Terminus freigesetzt werden und dabei ihre volle Wirkung entfalten.

Das vielversprechendste und am ausführlichsten charakterisierte und getestete Fusionsprotein ScFv<sub>59D8</sub><sup>-Xa</sup>-DIN besteht aus dem fibrinspezifischen single-chain-Antikörperfragment ScFv<sub>59D8</sub> und dem Molekül des direkten Thrombin-Inhibitors Hirudin. Beide Domänen sind durch die Faktor-Xa-Schnittstelle verbunden. Für dieses Fusionsprotein konnte der Nachweis erbracht werden, dass es eine deutliche spezifische Fibrinaffinität besitzt und dass die antikoagulatorische Wirkung von der Anwesenheit des Faktors Xa abhängig ist. In vitro konnte am Thrombus für das Fusionsprotein ScFv<sub>59D8</sub><sup>-Xa</sup>-DIN eine fast 6-fach stärkere antikoagulatorische Wirkung im Vergleich zum nativen r-Hirudin nachgewiesen werden.

Eine günstige Gestaltung des Verhältnisses von Wirkungen und Nebenwirkungen von Thrombose-Therapeutika durch das Targeting an ihren Zielwirkort und durch ihre präferentielle Aktivierung an diesem Zielwirkort liegt nahe.

Mit dem Wissen um diese Ergebnisse darf erhofft werden, dass dieses Fusionsprotein als Anti-Thrombose-Therapeutikum bei geringen systemischen Nebenwirkungen zugleich eine hohe lokale Wirksamkeit zeigt. Damit stünde ein Anti-Thrombose-Therapeutikum zur Verfügung, welches nur an den Orten wirkt, an denen seine Wirkung auch erwünscht ist – und das außerdem nur zu der Zeit wirkt, zu der seine Wirkung auch nützlich ist. Dem klinisch tätigen Arzt wäre somit eine effiziente und sichere Therapie-Methode gegen die Thrombose im allgemeinen an die Hand gegeben.