

Petra Mehwald
Dr. med.

Inhibition der Clotbildung in vitro und in vivo durch antikörpergerichtetes Hirudin

Geboren am 21.01.1969 in Frankfurt am Main
Reifeprüfung am 20.05.1988 in Hannover
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1988/89 bis WS 1995/96
Physikum am 23.08.1990 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Galveston, Texas, USA und Zug, Schweiz
Staatsexamen am 22.11.1995 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prov.-Doz. Dr. med. C. Bode

Die Wiedereröffnung thrombotisch oder thrombembolisch verschlossener Gefäße durch PTCA, Lysetherapie oder Stenteinlage gehört heute zur Routinetherapie des Myokardinfarktes. Ein großes Problem dieser Therapien besteht in der Möglichkeit des Wiederverschlusses bereits eröffneter Gefäße und damit in der erneuten Minderversorgung der Herzmuskulatur. Bei der Entwicklung solcher Restenosen spielt Thrombin eine zentrale Rolle.

Hirudin besitzt als direkter Thrombininhibitor Vorteile gegenüber den AT-III-abhängigen Thrombininhibitoren wie z.B. Heparin. Problematische Nebenwirkungen bei alleinigem Einsatz von Hirudin sind Blutungen, die unabhängig von dem lokalen antithrombotischen Geschehen an anderen Stellen entstehen können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht, die Konzentration von Hirudin nach dem Prinzip des Antikörper-Targetings durch Kopplung an spezifische Antikörper am Thrombus zu erhöhen. Die verwendeten Antikörper sind gegen Epitope gerichtet, die am Ort des Thrombosierungsprozesses in hoher Konzentration vorliegen.

Zunächst wurde Hirudin an den gegen das Glycoprotein GPIIb/IIIa der Thrombozyten gerichteten Antikörper 7E3 gekoppelt und auf seine Anti-Thrombinaktivität unabhängig vom Zielmolekül getestet. Anschließend wurde die Bindungsfähigkeit des Konjugates an GPIIb/IIIa und seine Aktivität in gebundenem Zustand geprüft. Die Versuche ergaben, daß Hirudin-7E3 eine hohe Affinität zu GPIIb/IIIa besitzt und Hirudin auch an GPIIb/IIIa gebunden in der Lage ist, Thrombin zu inhibieren. In weiteren Versuchen wurde der Effekt des Hirudin-Konjugates auf die Aggregation der Thrombozyten untersucht. Die Versuche ergaben eine konzentrationsabhängige Hemmung der Plättchenaggregation durch Hirudin-7E3 und ungebundenes Hirudin, wobei das Konjugat einen deutlich stärkeren Effekt zeigte als ungebundenes Hirudin. Schließlich wurde das Hirudin-7E3-Konjugat unter Bedingungen getestet, die den tatsächlichen in-vivo-Verhältnissen angenähert waren. Ein radioaktiv markierter menschlicher Thrombus wurde in menschlichem Blutplasma mit radioaktiv markiertem Fibrinogen inkubiert. Die Größenzunahme des Thrombus wurde über die Anlagerung von radioaktiv markiertem Fibrin über die Zeit gemessen. Das Hirudin-7E3-Konjugat zeigte gegenüber Hirudin eine stärkere Anti-Thrombinaktivität und damit eine deutlich geringere Größenzunahme des Thrombus. Mit der Synthese von Hirudin und dem gegen das GPIIb/IIIa der Thrombozyten gerichteten Antikörper 7E3 ist es gelungen, ein gerichtetes, antithrombotisch wirksames Molekül herzustellen.

Ein zweites Konjugat aus einem fibrin-spezifischen monoklonalen Antikörper und Hirudin (Hirudin-59D8) wurde im Tierversuch an Primaten getestet. Vor Durchführung der in vivo-Experimente wurde Hirudin-59D8 im Hirudin-Blocked-Clot-Assay an Pavian-Thromben in Pavian-Plasma getestet. Die Versuche ergaben, daß Hirudin-59D8 effektiv an Fibrin des Pavians bindet und Thrombin des Pavians auch nach der Bindung an Fibrin inhibiert. Für die in vivo-Experimente wurde ein Shunt-Modell des Pavians verwendet. Die Ähnlichkeit der Gefäßanatomie sowie die enge molekulare, zelluläre und gerinnungsphysiologische Verwandtschaft des Pavians zum Menschen erlauben relevante Vorhersagen für einen möglichen klinischen Einsatz des Hirudin-59D8-Konjugates. Im Shunt-Modell wird der natürliche Blutfluß des Pavians über einen extrakorporalen Shunt durch thrombogenes Material geleitet. Das thrombogene Segment provoziert eine Thrombusformation aus Thrombozyten, Fibrin und roten Blutzellen, d.h. die arterielle Thrombose wird simuliert. An vier Tieren konnte in acht Experimenten gezeigt werden, daß Hirudin-59D8 in einer Dosierung von 450 U/kg/h in der Lage ist, das Thrombuswachstum über die gesamte Zeit der Applikation (1h) zu verhindern, während Hirudin in derselben Dosierung eine kontinuierliche Größenzunahme des Thrombus bewirkt. Wie in weiteren Versuchen festgestellt wurde, weist Hirudin auf die Inhibition des Thrombuswachstums eine mindestens 13-fach stärkere Wirkung auf, wenn es durch Bindung an 59D8 am Ort der ablaufenden Gerinnung angereichert wird.

Die lokale Wirksamkeit eines Antithrombins kann durch Kopplung an Antikörper gesteigert werden. Weil die Konzentration des Antithrombins am Thrombus erhöht wird, reicht für dieselbe Wirkung vermutlich ein niedrigerer Plasmaspiegel aus. Demzufolge wären weniger Blutungskomplikationen zu erwarten.

Für die Zukunft stellt die Steigerung der lokalen Wirksamkeit eines Antithrombins durch Antikörper-Targeting ein sinnvolles Konzept dar, mit dem Blutungskomplikationen minimiert werden können. Die klinischen Einsatzmöglichkeiten sind je nach verwendetem Antithrombin und Antikörper vielfältig.