

Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Arbeitsgruppe Pharmakologische Hämostaseologie
und
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
Laboratorio de Trombosis Experimental

Diplomarbeit

Antigenität von Dipetarudin und Polyethylen- glykol (PEG)-gekoppeltem Dipetarudin – eine tierexperimentelle Studie

Vorgelegt von: Gabriella Rimkus

Betreuer: Prof. Götz Nowak
Prof. Claus Liebmann
Dr. Mercedes López

Jena, den 23.04.2007

Zusammenfassung

Dipetarudin, ein chimäres, bivalentes, direktes Thrombininhibitor-Konstrukt aus dem N-terminalen Bereich des Dipetalogastins II aus der Raubwanze *Dipetalogaster maximus* und dem C-terminalen Bereich des Hirudins aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis*, sollte in dieser Arbeit auf seine Immunogenität untersucht und diese durch chemische Modifikation des Proteins beeinflusst werden.

Die Untersuchungen zur Immunogenität des Dipetarudins und seiner modifizierten Form (DIP-2(PEG5kD)) wurden *in vivo* in den Modellsystemen Legehennen und Wistar-Ratte untersucht. Die aus Eiern von immunisierten Hühnern gereinigten Antikörper (IgY) zeigten keine Veränderung der immunogenen Eigenschaften des ursprünglichen und des veränderten Thrombininhibitors. Dieses Modellsystem der Antikörperproduktion ist für den Nachweis, dass eine mögliche Immunogenität des Dipetarudins durch die Kopplung von Polyethylenglykol-Ketten herabgesetzt werden kann, nicht geeignet. Die gewonnenen aviären Antikörper könnten jedoch, da sie an diese Thrombininhibitoren binden, für Affinitäts-abhängige Fragen der Diagnostik und Reinigung geeignet sein.

Die mögliche Immunogenität des Dipetarudins nach der Kopplung von PEG-Ketten (PEGylierung) an das Protein wurde außerdem in Wistar-Ratten untersucht. Der Nachweis der Anti-DIP und Anti-DIP-2(PEG5kD) Antikörper (IgG) erfolgte direkt als Dot Blot und indirekt über die Änderungen der Pharmakokinetik (Immunpharmakokinetik) der verabreichten Inhibitoren. Sowohl durch die PEGylierung als auch durch die Präsenz von Antikörpern verändert sich die biologische Halbwertszeit (HWZ) der Thrombininhibitoren im Organismus und damit pharmakokinetische Parameter der Substanzen. Die Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeit verlängert sich und die Elimination aus dem zentralen Kompartiment wird herabgesetzt. Die Verteilung der Thrombininhibitoren zwischen dem zentralen und dem peripheren Kompartiment verschiebt sich in Richtung des zentralen Kompartiments.

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die ursprüngliche Immunogenität des Dipetarudins herabgesetzt wurde. Gleichzeitig erfolgte die Ausbildung einer neuen Immunogenität, die gegen das Protein-Polymer-Konstrukt gerichtet war. Durch die Veränderung der verwendeten Kopplungsreagenzien oder durch die Wahl eines anderen Syntheseweges könnte die Entstehung der neuen Epitope unterdrückt werden und die Immunogenität des PEGylierten Dipetarudins vollkommen verschwinden.

Bei allen Wistar-Ratten, die Antikörper gegen die untersuchten Thrombininhibitoren gebildet hatten, war die gleichzeitige Immunisierung mit Antigen und Adjuvans (Freund'sches Adjuvans) vorausgegangen. Erfolgte nur die Applikation des vermeintlichen Antigens ohne die Präsenz des Adjuvans, konnte die Bildung von Antikörpern nicht beobachtet werden. Hieraus ist zu schlussfolgern, dass Dipetaturidin und DIP-2(PEG5kD) nur schwache Antigene sind und sich in ihrer immunogenen Eigenschaft nicht von r-Hirudin unterscheiden. Bei erzwungener Antikörperbildung (komplettes Freund'sches Adjuvans) entstehen Antikörper, die gegen Epitope gerichtet sind, die nicht in die spezifische Antithrombin-Wirkung involviert sind („Immundepot“-Wirkung).

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
ABE I	<i>anion binding exosite I</i> oder Fibrinogen-Erkennungsregion
ABE II	<i>anion binding exosite II</i> oder Heparinbindungsstelle
A. bidest	Aqua bidest
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
AUC _{0-∞}	Gesamtfläche unter der Blutspiegelverlaufskurve
AT III	Antithrombin III oder Heparinkofaktor I
α	Verteilungskonstante
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Rinderserumalbumin
BMGY	<i>buffered complex glycerol medium</i>
BMMY	<i>buffered complex methanol medium</i>
BP	Bindungspuffer
β	Eliminationskonstante
Ca ²⁺	Calciumion
CH	Schweiz
Cl _{tot}	Gesamtclearance
CP	Cleaning-Puffer
C ₀	Inhibitorkonzentration zum Zeitpunkt 0
D	Deutschland oder applizierte Dosis
Da	Dalton
DIP	Dipetarudin
DIP-PEG5kD	mono-PEGyliertes Dipetarudin
DIP-2(PEG5kD)	di-PEGyliertes Dipetarudin
ECT	<i>Ecarin Clotting Time</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EP	Elutionspuffer
FA	Freund'sches Adjuvans
FCA	komplettes Freund'sches Adjuvans

FIA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans
fM	Femtomolar
F1.2	Fragment 1.2
FV	Faktor V
FV _a	aktivierter Faktor V
FVII	Faktor VII
FVIII	Faktor VIII
FIX	Faktor IX
FX	Faktor X
FXI	Faktor XI
FXII	Faktor XII
FXIII	Faktor XIII
g	Gramm oder Ortsfaktor (Erdbeschleunigung)
GF	<i>Growth Factor</i>
h	Stunde
HF I	Heparinkofaktor I
HF II	Heparinkofaktor II
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HMWK	<i>High Molecular Weight Kininogen</i>
HWZ	Halbwertszeit
IgY	Immunglobulin Y
IL-1	Interleukin-1
inkompl.	inkomplett
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
K _i	Inhibitorkonstante
kompl.	komplett
k ₁₂	Geschwindigkeitskonstante der Verteilung vom zentralen zum peripheren Kompartiment
k ₁₃	Eliminationsgeschwindigkeit aus dem zentralen Kompartiment
k ₂₁	Geschwindigkeitskonstante der Verteilung vom peripheren zum zentralen Kompartiment
µm	Mikrometer
M	Molar
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
MD	<i>minimal dextrose medium</i>

mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MW	Molekulargewicht
Na ⁺	Natriumion
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysi
PAR	<i>Proteinase Activated Receptor</i>
PAR1	<i>Proteinase Activated Receptor Typ 1</i>
PAR3	<i>Proteinase Activated Receptor Typ 3</i>
PAR4	<i>Proteinase Activated Receptor Typ 4</i>
PDGF	<i>Platelet derived Growth Factor</i>
PEG	Polyethylenglykol
PK	Präkallekrein
PL ⁻	Phospholipide
RP-HPLC	<i>Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
Serpin	<u><i>Serine Proteinase Inhibitor</i></u>
SPA-PEG5kD	<i>Succinimidyl Propionate PEG5kD</i>
Tab.	Tabelle
TBST	<i>Tris Buffered Salt solution Tween</i>
TF	<i>Tissue Factor</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNF	<i>Tumor Nekrosis Factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
t _{1/2α}	Verteilungshalbwertszeit
t _{1/2β}	Eliminationshalbwertszeit
V _C	Volumen des zentralen Kompartiments
V _{dss}	Verteilungsvolumen im <i>steady state</i>
% v/v	ml in 100 ml Lösung
% w/v	g in 100 ml Lösung
YNB	<i>Yeast Nitrogen Base</i>

Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierten Aminosäuren

Alanin	A	Ala	Leucin	L	Leu
Arginin	R	Arg	Lysin	K	Lys
Asparagin	N	Asn	Methionin	M	Met
Aspartat	D	Asp	Phenylalanin	F	Phe
Cystein	C	Cys	Prolin	P	Pro
Glutamat	E	Glu	Serin	S	Ser
Glutamin	Q	Gln	Threonin	T	Thr
Glycin	G	Gly	Tryptophan	W	Trp
Histidin	H	His	Tyrosin	Y	Tyr
Isoleucin	I	Ile	Valin	V	Val

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Einteilung der direkten, exogenen Thrombininhibitoren.....	19
Tab. 2	Übersicht über den Verlauf der Aufreinigung der IgY.....	43
Tab. 3	Direkter Nachweis der IgG gegen DIP und DIP-2(PEG5kD).....	45
Tab. 4	Pharmakokinetische Parameter des DIP (0,5 mg/kg KG).....	49
Tab. 5	Pharmakokinetische Parameter des DIP (1 mg/kg KG).....	49
Tab. 6	Pharmakokinetische Parameter des DIP-2(PEG5kD) (0,5 mg/kg KG)...	51

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Das plasmatische Gerinnungssystem.....	13
Abb. 2	Spaltung des α -Thrombins aus seinem Zymogen, dem Prothrombin....	16
Abb. 3	Strukturmodell des Fusionproteins Dipetarudin.....	20
Abb. 4	Darstellung des Zwei-Kompartimentmodells.....	36
Abb. 5	Anionenaustauschchromatographie von Dipetarudin mit einer Resource TM Q 6 ml-Säule.....	39
Abb. 6	Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography von Dipetarudin.....	39
Abb. 7	MALDI-TOF-Spektrum des Dipetarudins.....	40
Abb. 8	Trennung der PEGylierungsprodukte des Dipetarudins.....	41
Abb. 9	MALDI-TOF-Spektrum des zweifach PEGylierten Dipetarudin.....	42
Abb. 10	Nachweis der IgY mittels <i>Dot Blot</i>	44
Abb. 11	Pharmakokinetik des DIP und des DIP-2(PEG5kD) in unbehandelten Ratten.....	46
Abb. 12	Vergleich der Pharmakokinetik von 0,5 mg/kg KG DIP in An- und Abwesenheit von Antikörpern gegen DIP in Ratten.....	47
Abb. 13	Vergleich der Pharmakokinetik von 1 mg/kg KG DIP in An- und Abwesenheit von Antikörpern gegen DIP in Ratten.....	48
Abb. 14	Vergleich der Pharmakokinetik von 0,5 mg/kg KG DIP-2(PEG5kD) in An- und Abwesenheit von Antikörpern gegen DIP bzw. DIP-2(PEG5kD) in Ratten.....	50
Abb. 15	Kumulative Ausscheidung von DIP im Urin von Ratten.....	52
Abb. 16	Kumulative Ausscheidung von DIP-2(PEG5kD) im Urin von Ratten.....	53

2.2.2.1	PEGylierung	30
2.2.2.2	Reinigung des PEGylierten Proteins	31
2.2.3	Biochemische Charakterisierung	31
2.2.3.1	Ecarin Clotting Time (ECT)	31
2.2.3.2	Bicinchoninic acid (BCA)	31
2.2.3.3	Bestimmung des Molekulargewichtes mittels <i>Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight</i> (MALDI-TOF)	32
2.2.4	Untersuchungen zur Immunogenität	32
2.2.4.1	Immunisierung von Legehennen	32
2.2.4.2	Aufreinigung der IgY	33
2.2.4.3	Antikörpernachweis (IgY aus den Hühnereiern)	33
2.2.4.4	Immunpharmakologische Untersuchungen am Ratten-modell	34
2.2.4.4.1	Konfektionierung von Ratten	34
2.2.4.4.2	Tierexperimentelle Vorgehensweise	34
2.2.4.4.3	Gewinnung der Blut- und Urinproben	35
2.2.4.4.4	Bestimmung der Inhibitorkonzentrationen	35
2.2.4.4.5	Pharmakokinetische Berechnungen	35
2.2.4.4.6	Antikörpernachweis im Rattenplasma	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Darstellung und Reinigung des Dipetarudins	38
3.1.1	Expression von rekombinantem Dipetarudin in <i>Pichia pastoris</i> ...	38
3.1.2	Proteinfällung	38
3.1.3	Anionenaustauschchromatographie	38
3.1.4	RP-HPLC	39
3.1.5	MALDI-TOF des Dipetarudins	40
3.1.6	Konzentrationsbestimmung des Dipetarudins	40
3.2	PEGylierung des Dipetarudins	41
3.2.1	Reinigung des PEGylierten Dipetarudins	41
3.2.2	Bestimmung des Molekulargewichts und der Konzentration des PEGylierten Dipetarudins	41
3.3	Untersuchungen zur Immunogenität	42
3.3.1	Aufreinigung der IgY	42
3.3.2	Antikörperbildung (Legehenne)	43
3.3.3	Antikörperbildung (Ratte)	45
3.3.4	(Immun)pharmakokinetik	46

3.3.4.1	Veränderung der pharmakokinetischen Parameter durch die Molekulargewichtserweiterung des DIPs	46
3.3.4.2	Pharmakokinetik des DIPs in An- und Abwesenheit von AK gegen das DIP	47
3.3.4.3	Pharmakokinetik des DIP-2(PEG5kD)s in An- und Abwesenheit von AK gegen DIP bzw. DIP-2(PEG5kD)	50
3.3.4.4	Antikörper-Bildung in An- und Abwesenheit von Freund'schem Adjuvans.....	51
3.3.4.5	Nachweis der Inhibitoren im Urin	52
3.3.4.6	Vergleich der direkten und indirekten Nachweismethode zur Antikörperbestimmung	53
4	Diskussion	54
5	Literatur	60
6	Anhang.....	70

1 Einleitung

1.1 Blutgerinnung und das plasmatische Gerinnungssystem

Eines der wichtigsten Organe des menschlichen Körpers ist das Blut. Das komplexe System, bestehend aus Flüssigkeits- und Zellbestandteilen, ist unter anderem für den Schutz (Abwehrfunktion, Blutgerinnung und Fibrinolyse) des Gesamtorganismus verantwortlich.

Die Ausübung dieser schützenden Funktion erfolgt über ineinander greifende Schritte, die z.B. den Blutverlust nach einer mechanischen Verletzung schnellstmöglich stoppen und so gering wie möglich halten. Der erste dieser Schritte ist die primäre Hämostase. Die Verletzung von Gefäßen führt zur Freisetzung von Serotonin und Thromboxan A₂ (Seré *et al.* 2003) gefolgt von der Vasoconstriktion des beschädigten Gefäßes und einem gedrosselten Blutstrom. Die verlangsamte Fließgeschwindigkeit des Blutes unterstützt die Anlagerung und Aktivierung der Thrombozyten. Die Aktivierung kann durch Fremdoberflächen oder durch bestimmte Agonisten, wie Thrombin, ADP, Kollagen, Arachidonsäure und Adrenalin erfolgen (Colman *et al.* 2001). Der zweite Schritt ist die Blutgerinnung (Abb.1), bei der der verletzte Gefäßabschnitt mit einem Aggregat aus Fibrinpolymeren und im Fibrinnetz eingebetteten Thrombozyten und Erythrozyten verschlossen wird. Dieses FibrinGrundgerüst des Thrombus entsteht aber erst als Endprodukt der plasmatischen Koagulation.

Die Blutgerinnung wird aus rein pragmatischen Gesichtspunkten in einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg unterteilt, wobei *in vivo* die Trennung beider Systeme wegen Überlappungen unmöglich ist. Der Hauptinitiierungsweg der Blutgerinnung *in vivo* ist der extrinsische oder „*tissue Factor*“-Signalweg. Der Gewebefaktor (*tissue Factor*, TF) ist unter normalen Bedingungen nicht im Blutstrom vorhanden. Dieses integrale Membranprotein wird konstitutiv auf der Zelloberfläche von extravaskulären Zellen exprimiert und gelangt so nicht in den Kontakt mit dem fließenden Blut (Jenny & Mann 2001; Schenone *et al.* 2004). Als Antwort auf Entzündungsreize (Coleman *et al.* 2001) oder durch mechanische Verletzung von Gefäßen kommt das zirkulierende Blut mit dem TF in Kontakt, der im Komplex mit dem Faktor VII in seine aktive Form übergeht. Alle Aktivierungsreaktionen erfolgen „festphasenartig“, an Oberflächen gebunden (Nowak im Druck). Die Fixierung der Zymogene an die negativ geladenen Phospholipidoberflächen er-

folgt über Ca^{2+} -Brücken und γ -Carboxylanker. Der aktive FVII_a -TF-Komplex wandelt die Faktoren IX und X in ihre aktiven Formen FIX_a und FX_a um.

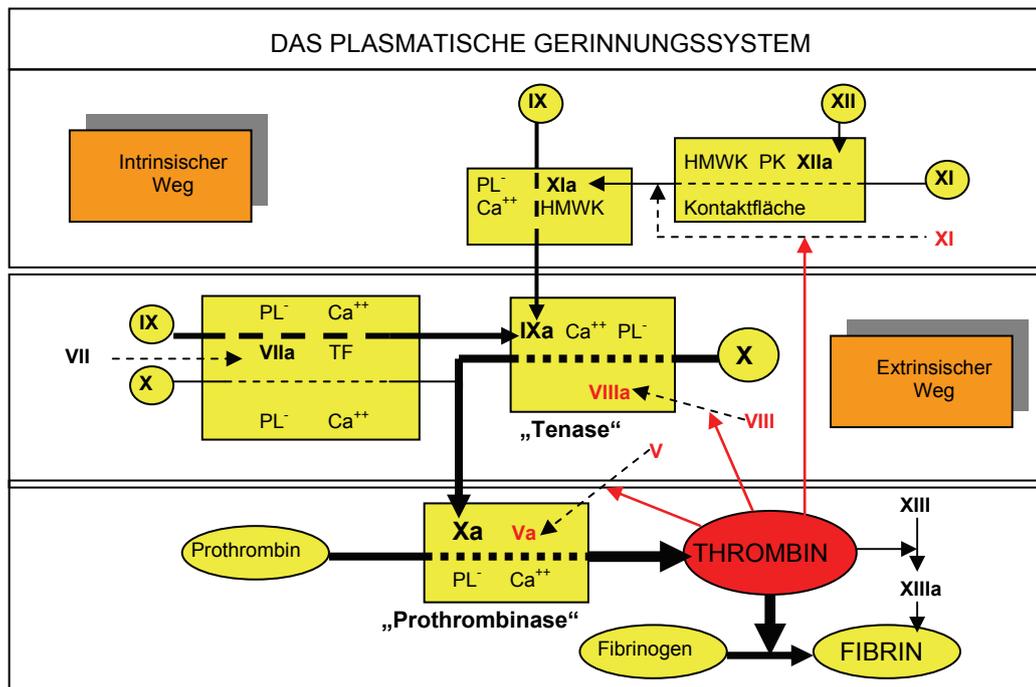


Abb. 1 Das plasmatische Gerinnungssystem (nach Nowak)

Die Gerinnungsfaktoren sind mit römischen Ziffern dargestellt. Die aktivierte Form hat im Vergleich zur inaktiven Form ein „a“ im Namen stehen. Die Aktivierung der Faktoren erfolgt an negative Phospholipidoberflächen gebunden. Die im N-terminalen Bereich der Peptidketten vorhandenen γ -Carboxylgruppen fixieren über Ca^{2+} -Brücken die Gerinnungsfaktoren an die Oberflächen, an denen die Proteolyse der Zymogene in ihre aktiven Formen erfolgt. HMWK = high molecular weight kininogen, PK = Präkallikrein und PL^- = negativ geladene Phospholipide.

Parallel dazu erfolgt die Blutgerinnung auch über den intrinsischen oder Koagulation-initiierten Weg. Alle nötigen Komponenten sind im vaskulären System vorhanden und werden über unphysiologische Oberflächen, z.B. Glas, aktiviert. Der erste Faktor dieser Aktivierungsabfolge, FXII , versetzt sich durch die starke Erhöhung der lokalen Konzentration an der Oberfläche mittels Autoaktivierung in den aktiven Zustand. FXII_a ist dann in der Lage, seine Substrate Präkallikrein und FXI in die aktiven Formen Kallikrein und FXI_a zu prozessieren. Der FIX_a wird vom FXI_a durch limitierte Proteolyse aus seinem Zymogen geschnitten. FVIII wird von Thrombin aktiviert und bildet mit dem FIX_a einen Komplex. Der FIX_a - FVIII_a -Komplex formt die intrinsische „Tenase“, die den FX in den FX_a überführen kann (Davie *et al.* 1991; Jenny & Mann 2001; Schenone *et al.* 2004).

Ab der Bildung von FX_a vereinigen sich beide Signalwege und führen in der Anwesenheit des Kofaktors FVa , Ca^{2+} und Phospholipiden zur Bildung des „Prothrombinase“-Komplexes. Die „Prothrombinase“ schneidet aus dem Prothrombin das Thrombin. Dieses Schlüsselenzym ist im Stande, aus dem lösli-

chen Fibrinogen das Fibrin freizusetzen, zu polymerisieren, und das quervernetzende Enzym FXIII in seine aktive Form zu überführen, sodass ein Fasernetz aus Fibrin entstehen kann.

Ferner katalysiert Thrombin auch die Aktivierung anderer Faktoren z.B. V, VII, VIII, XI und Protein C, die dann die Blutgerinnung durch einen positiven bzw. negativen Feedback-Mechanismus verändern (Colman *et al.* 2001). Die FV_a und FVIII_a können als Kofaktoren des „Tenase“- bzw. des „Prothrombinase“-Komplexes indirekt die Thrombingenerierung steigern, wohingegen aktives Protein C seine negative Wirkung auf die Entstehung des Thrombin über die Inaktivierung der Faktoren V_a und VIII_a ausübt. Thrombin ist auch an der Modulierung zwischen Gerinnung und Fibrinolyse beteiligt.

1.2 Zelluläre Effekte des α -Thrombins

Das Thrombin hat neben seiner primären Rolle bei der Hämostase weitere physiologische und pathologische Effekte. Es ist unter anderem an der Wundheilung, im Besonderen an der Wiederherstellung der geschädigten Gefäßwand, beteiligt. α -Thrombin ist weiterhin ein potenter Wachstumsfaktor (*growth Factor*, GF) und wirkt als Chemo-attraktant auf Fibroblasten, Makrophagen und glatte Muskelzellen. Die Thrombozyten-aktivierende Eigenschaft des Thrombins führt zur Freisetzung von vasoaktiven Komponenten (Serotonin und Thromboxan) und spezifischen Wachstumsfaktoren (*transforming growth Factor- β* (TGF- β), *Platelet derived Growth Factor* (PDGF) und *epidermal growth Factor*) (Jenny & Mann 2001). Diese hormonähnlichen Effekte des Thrombins werden über Proteinase aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelt, die zur Familie der sieben transmembranalen Helix besitzenden, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Der Ligand, der an den Rezeptor bindet und die Signalübertragung initiiert, liegt maskiert im extrazellulären N-terminalen Bereich des Rezeptors vor und wird durch die Serinprotease Thrombin mittels limitierter Proteolyse freigesetzt (MacFarlane *et al.* 2001). Bisher konnten drei thrombinabhängige PARs identifiziert werden: PAR1 (Vu *et al.* 1991), PAR3 (Ishihara *et al.* 1997) und PAR4 (Xu *et al.* 1998).

Diese physiologischen Funktionen des Thrombins können jedoch bei Tumorzellen pathogene Wirkungen entfalten. Thrombin kann das Verhalten der malignen Zellen direkt durch die PARs modifizieren oder indirekt, indem es eine Matrix aus Fibrinmolekülen generiert oder die umgebenden Stromazellen beeinflusst (Shi *et*

al. 2004). Die auf die Rezeptoraktivierung folgenden Ereignisse führen zur Erhöhung der Tumorzellmotilität (Zhou *et al.* 1998; Shi *et al.* 2004), zur Verstärkung der Metastasierung (Nierodzik *et al.* 1998; Shi *et al.* 2004), zur Steigerung der Adhäsion der Tumorzellen an Thrombozyten, an das Endothel und an Komponenten der extrazellulären Matrix (Dardik *et al.* 1998; MacFarlane *et al.* 2001; Karpetkin 2003; Nierodzik & Karpatkin 2006) und unterstützen die Einwanderung von Tumorzellen (Even-Ram *et al.* 1998 und 2001; Wang *et al.* 2005).

In einigen (klinischen) Studien konnte gezeigt werden, dass die Antitumortherapie mittels Antikoagulantien erfolgreich das Wachstum und die Streuung der malignen Zellen verhindern kann (Letai & Kuter 1999; Wang *et al.* 2005). Die Entwicklung von sich im Extravasalraum verteilenden *tight-binding* Inhibitoren des Thrombins, die die Konzentration des Thrombins unter der notwendigen Menge zur Signalweiterleitung hält, könnte eine Erfolg versprechende Richtung in der Bekämpfung von Tumoren sein (Nowak *et al.* im Druck).

1.3 Struktur des α -Thrombins

Das α -Thrombin wird während der Blutgerinnung aus seinem Vorläufer, dem Prothrombin, freigesetzt. Das Zymogen ist ein Einzelketten-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 72 kDa. Die Aktivierung des humanen α -Thrombins erfolgt durch Spaltung zweier Peptidbindungen (Arg₂₇₁-Thr₂₇₂ und Arg₃₂₀-Ile₃₂₁) und durch intramolekulare Umlagerungen (Bode *et al.* 1992). Durch die Reihenfolge der Spaltreaktion entstehen unterschiedliche Zwischenprodukte (Abb. 2). Erfolgt das Aufbrechen der Bindung zwischen dem Arg₂₇₁ und dem Thr₂₇₂ als erstes (in Abwesenheit einer geeigneten Membranoberfläche), entsteht das Fragment 1.2 (F1.2) und das inaktive Prethrombin 2. Die darauf folgende Spaltung der Peptidbindung zwischen Arg₃₂₀ und Ile₃₂₁ führt zur Bildung von aktivem α -Thrombin. In Anwesenheit von geeigneten Membranoberflächen entsteht der Prothrombinase-Komplex (FX_a-FV_a gebunden über Ca²⁺ an Phospholipide), der die proteolytischen Spaltreaktionen in umgekehrter Reihenfolge durchführt. Als Zwischenprodukt entsteht das aktive Meizothrombin und als Endprodukt wieder das F1.2 und α -Thrombin (Krishnaswamy *et al.* 1987; Jenny & Mann 2001; Krishnaswamy 2005).

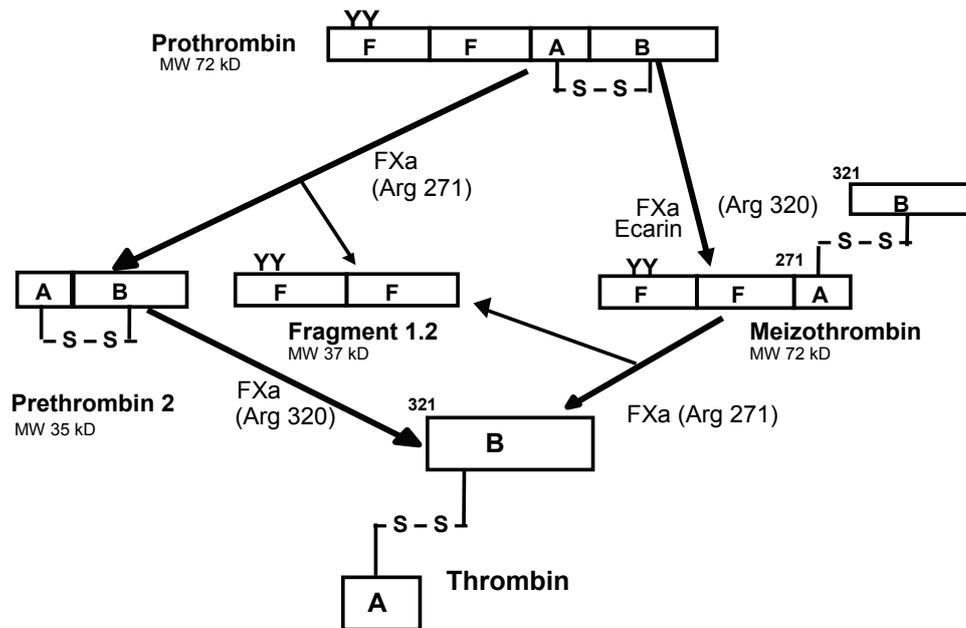


Abb. 2 Spaltung des α -Thrombins aus seinem Zymogen, dem Prothrombin (nach Nowak)
 Durch Spaltung zweier Peptidbindungen ($\text{Arg}_{271}\text{-Thr}_{272}$ und $\text{Arg}_{320}\text{-Ile}_{321}$) wird das α -Thrombin aus dem Prothrombin freigesetzt. Die Reihenfolge der Spaltungsreaktionen bestimmen die Zwischenprodukte: Fragment 1.2 und Prethrombin 2 bzw. Meizothrombin. Durch die Anwendung von Meizothrombininhibitoren kann nicht nur die Freisetzung von Fibrin, sondern auch die weitere Aktivierung der aktiven Thrombinformen unterbrochen werden, denn die Moleküle sind über die γ -Carboxylanker (YY) an den membranständigen Aktivierungskomplex gebunden.

Das Spaltendprodukt Thrombin ist ein ellipsoides Molekül (Abmessungen $45 \times 45 \times 50 \text{ \AA}$) mit einem Molekulargewicht von 36 kDa (Bode *et al.* 1989 und 1992). Das α -Thrombin besteht aus zwei Polypeptidketten. Die aus 36 AS bestehende A-Kette ist über eine Disulfidbrücke mit der katalytisch aktiven B-Kette (259 AS und drei intramolekulare Disulfidbrücken) verbunden (Bode *et al.* 1989). Thrombin zeigt eine hohe Homologie zu den Serinproteasen (z.B. Chymotrypsin) und besitzt wie diese im aktiven Zentrum einen Serinrest (Ser_{195}), der Bestandteil der katalytischen Triade (Ser_{195} , His_{57} und Asp_{102}) ist. Das aktive Zentrum liegt in einer tiefen, „canyonartigen“ Spalte, die u. a. von zwei substratspezifitätbestimmenden Schleifen (*60-insertion-loop* und *149-insertion-loop*) flankiert wird (Bode *et al.* 1992; Lane *et al.* 2005). Die Spezifität des α -Thrombins wird weiter durch verschiedene Taschen im aktiven Zentrum (Aspartatrest in Position 189) bestimmt. Der Asp_{189} -Rest ist in der Lage, über eine Salzbrücke an Substrate oder Inhibitoren zu binden und diese gegebenenfalls zu spalten, sofern sie in der P1-Position eine basische AS haben.

In der Struktur des α -Thrombins ist die Verteilung der geladenen AS nicht gleich; es ist die Bildung von Ladungsclustern zu beobachten. Auf der Oberfläche des

Thrombins gibt es zwei Areale, die stark positiv geladene Bereiche (reich an Arginin- und Lysinresten) bilden. Einerseits die *anion binding exosite I* (ABE I oder auch Fibrinogen-Erkennungsregion genannt), die mit Fibrinogen (Hofsteenge & Stone 1987), Fibrin (Liu *et al.* 1979), Thrombomodulin (Hofsteenge & Stone 1987), Thrombinrezeptoren (Liu *et al.* 1991), Heparin-Kofaktor II (Sheehan *et al.* 1993), dem C-Terminus des Hirudins (Maraganore *et al.* 1989) und anionischen Oberflächen (Fenton *et al.* 1988 und 1989) interagiert. Andererseits die ABE II (oder Heparinbindungsstelle genannt), die mit Heparin, glycosaminoglykan-gebundenen Serpinen, z.B. Antithrombin III (Sheehan & Sadler 1994; Gan *et al.* 1994), dem Chondroitinsulfatanteil des Thrombomodulins (Di Cera *et al.* 1997) und dem Prothrombinfragment F2 (Arni *et al.* 1993) Interaktionen eingehen kann. Beide positiv geladenen Bereiche spielen wichtige Rollen im Positionieren und Binden der Substrate und Inhibitoren.

1.4. Inhibitoren des Thrombins

Die multifunktionelle Serinprotease Thrombin spielt eine zentrale Rolle im hämostatischen Gleichgewicht des Körpers. Dieses kann aber nur aufrecht erhalten werden, wenn die Generierung von neuem Thrombin gestoppt oder vorhandenes Thrombin inaktiviert wird. Sonst würde ein einmal in Gang gesetzter Vorgang der Blutgerinnung fatale Folgen haben (z.B. Herzinfarkt, Schlaganfall oder Lungenembolie). Um die Gerinnung auf den Ort der Verletzung zu beschränken, sind im Blut auch negative Regulatoren, so genannte Inhibitoren vorhanden.

Zu den endogenen, im Körper vorkommenden Inhibitoren zählt das Antithrombin III (AT III oder auch Heparinkofaktor I (HF I) genannt). Der in der Leber synthetisierte Inhibitor gehört wie der *Back-up-Inhibitor* Heparinkofaktor II (HF II) zu der Superfamilie der Serpine (*Serine Proteinase Inhibitors*). Diese Inhibitoren hemmen Enzyme irreversibel, indem sie sog. „Suizid-Substrate“ für das aktive Zentrum der Enzyme, z.B. Thrombin, darstellen (Bock 2001). Die Enzyminaktivierung erfolgt in Abwesenheit von Heparin progressiv. Erfolgt nun die Bindung von Heparin – ein aus Schweinedarmmukosa gewonnenes sulfatiertes Glykosaminoglykan – an Antithrombin, wird durch eine Konformationsänderung das reaktive Zentrum des AT für die Serinprotease freigelegt und die AT-Wirkung konzentrationsabhängig bis auf das 1000fache beschleunigt (Rosenberg 1975). Der Mechanismus der Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit ist bei der Interaktion

des HF II mit dem Polyanion Heparin ähnlich. Hier führt die Bindung zu einer intramolekularen Umlagerung des negativ geladenen Molekülteils des HF II, so dass dieser an die ABE I des Thrombins binden kann und die Inaktivierung des Thrombins erfolgt.

Die Inhibierung des Thrombins kann nicht nur über die Inaktivierung der Serinprotease-Aktivität erfolgen, sondern auch über die Elimination des aktiven Enzyms aus der Zirkulation. Das Glykoprotein α_2 -Makroglobulin ist in der Lage, mittels Ausbildung einer kovalenten Thioester-Bindung irreversibel an die Protease zu binden und diese in ihrem „Molekular-Käfig“ gefangen zu halten. Der Enzym-Inhibitor-Komplex wird dann aus dem Blutstrom entfernt und steht nicht mehr zur Aktivierung anderer Proteasen zur Verfügung.

Außer den endogenen Thrombin hemmenden Serpinen gibt es auch exogene Inhibitoren des Thrombins. Diese lassen sich in direkte bzw. indirekte Thrombininhibitoren einteilen. Indirekt wirkende Inhibitoren (z.B. Heparin oder Vitamin K-Antagonisten) verhindern die Generierung bzw. die Aktivität des Thrombins. Der Wirkmechanismus des Heparins wurde oben schon erläutert. Durch den Einsatz von Cumarinen (Vitamin K-Antagonisten) entstehen in der Leber physiologisch unvollständige Proenzyme (z. B. A-carboxyl-Prothombin). Diesen Präkursoren ist es unmöglich, die zur Aktivierung notwendige Calciumbindung einzugehen, da während ihrer Synthese keine γ -Carboxylierung der N-terminalen Glutaminsäuren stattgefunden hat. Diese Moleküle tragen statt der für die Bindung benötigten γ -Carboxyglutaminsäure die unmodifizierte Glutaminsäure und führen so zur Produktion von funktionslosen Proteinketten. In der klinischen Anwendung sind diese Medikamente mit Bedacht zu verwenden, da die Wirkung und die Aufhebung der selbigen zeitversetzt geschieht. Für eine schnelle Anwendung sind reversible, direkte Thrombininhibitoren besser geeignet.

Im Gegensatz zu den indirekten Inhibitoren üben die direkten Thrombininhibitoren ihren antikoagulatorischen Effekt über die direkte Bindung des Inhibitors an das Zielprotein aus. Dadurch wird verhindert, dass das Enzym mit seinem Substrat interagieren kann. Abhängig von der Interaktionstelle des Thrombins mit dem Inhibitor kann man die direkten Thrombininhibitoren in drei Klassen aufteilen:

- 1) *active-site* Inhibitoren: blockieren ausschließlich das aktive Zentrum des Enzyms (z. B. Argatroban: Okamoto *et al.* 1981)
- 2) *exo site* Inhibitoren: sind nur gegen die ABE I gerichtet (z.B. Triabin: Fuentes-Prior *et al.* 1997; Hirugen: Naski *et al.* 1990)

- 3) bivalente Inhibitoren: binden sowohl ans aktive Zentrum des Enzyms als auch an die ABE I (Hirudin; Dipetarudin; Hirulog)

Die (bio)synthetisch hergestellten oder aus natürlichen Quellen isolierten direkten Inhibitoren sind in Tab. 1 anhand ihrer inhibitorischen Eigenschaften exemplarisch dargestellt.

nicht bekannt	N	active-site
Argatroban (Okamoto <i>et al.</i> 1981) (Banner & Hadváry 1991)	S	
Melagatran (Weitz 2003)		
Triabin aus <i>Triatoma pallidipennis</i> (Fuentes-Prior <i>et al.</i> 1997)	N	exo-site
Hirugen (Naski <i>et al.</i> 1990)	S	
1) Hirudin aus <i>Hirudo medicinalis</i> (Markwardt 1957) 2) Rhodniin aus <i>Rhodnius prolixus</i> (Friedrich <i>et al.</i> 1993) 3) Dipetalogastin aus <i>Dipetalogaster maximus</i> (Mende <i>et al.</i> 1999)	N	bivalente Inhibitoren
1) Dipetarudin (López <i>et al.</i> 2003) 2) r-Hirudin 3) Hirutonin (DiMaio <i>et al.</i> 1992) 4) Hirulog (Maraganore <i>et al.</i> 1990) 5) Hirunorm (Lombardi <i>et al.</i> 1996) (Cappiello <i>et al.</i> 1998)	(bio)synthetische	

Tab. 1 Einteilung der direkten, exogenen Thrombininhibitoren (nicht vollständig)

Die Einteilung erfolgt anhand der inhibitorischen Eigenschaften gegenüber der Protease Thrombin und nach dem Vorkommen des Inhibitors. Danach können die Inhibitoren natürlich (N) vorhanden sein, im Reagenzglas (S) oder in anderen Produzenten (biosynthetisch) hergestellt worden sein.

Eine der wichtigsten Feststellungen der Thrombininhibitor-Forschung ist, dass Tiere, die sich vom Blut anderer ernähren, spezielle antikoagulatorische Substanzen besitzen, die das Gerinnen der Blutmahlzeit verhindern. Zu dieser Gruppe gehört das Hirudin des medizinischen Blutegels *Hirudo medicinalis*, das Rhodniin aus *Rhodnius prolixus* oder das Dipetalogastin aus der Raubwanze *Dipetalogaster maximus*. Diese Peptide liefern die strukturelle Basis für andere, neue Thrombininhibitoren. Die neuesten Thrombininhibitoren sind chemische oder biosynthetische Abwandlungen dieser biologischen Leitstrukturen.

1.5 Dipetarudin

Dipetarudin ist wie die meisten seiner bisher bekannten natürlichen „Strukturparten“ ein bivalenter Inhibitor des Thrombins (López *et al.* 2005). Das Protein ist eine Chimäre aus dem N-Terminus (AS 1-48) des Dipetalogastin II, des potentesten Thrombininhibitors der Raubwanze *Dipetalogaster maximus*, und des anionischen C-Terminus des Hirudins aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* (⁵⁵DFEEIPEEYLQ⁶⁵). Beide Aminosäure-Ketten sind über einen Linker aus fünf Glycinresten miteinander verbunden (Abb. 3). Das so konstruierte Fusionsprotein hat ein Molekulargewicht von 7450 Da und einen K_i-Wert von 399 ± 83 fM (López *et al.* im Druck).

Untersuchungen zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen weisen auf das mögliche Wirkungsprinzip des bivalenten Thrombininhibitors hin. In einem ersten Schritt soll die aus dem Hirudin stammende anionische Aminosäure-Region über ionische Wechselwirkungen an die kationischen Bindungsstellen der Fibrinerkennungsregion (*anion-binding exosite I*, ABE I) binden und so die Interaktion des unpolaren N-terminalen Bereichs des Dipetarudins mit der Umgebung des aktiven Zentrums des Thrombins fördern. Die Blockierung des aktiven Zentrums und die Hemmung der Proteaseaktivität des Enzyms erfolgt über die Ausbildung einer Salzbrücke zwischen Asp₁₈₉ des Thrombins und der P1 Aminosäure Arg₁₀ des Dipetarudins.

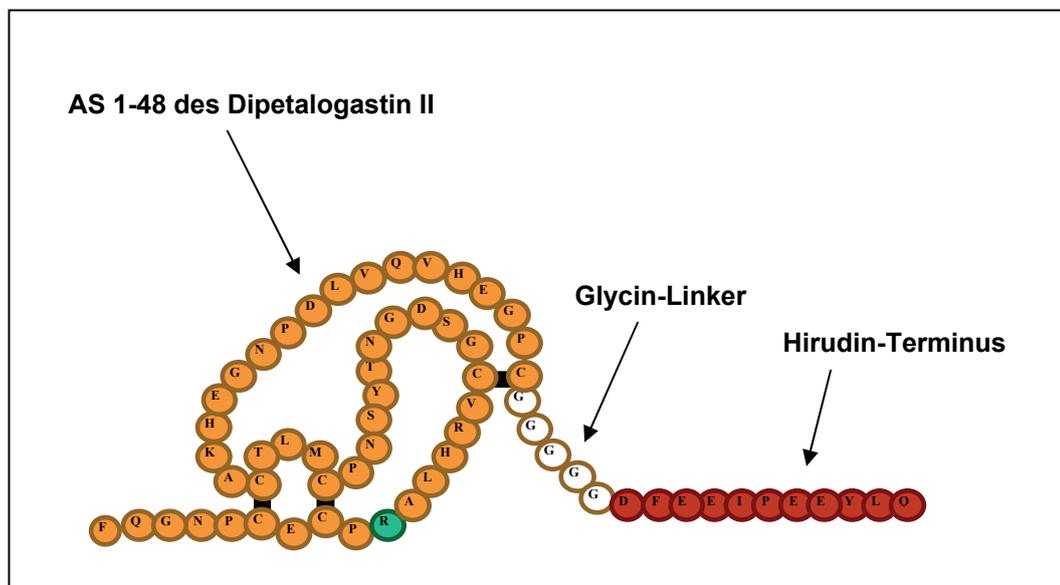


Abb. 3 Strukturmodell des Fusionsproteins Dipetarudin (nach López)

Die aus dem N-terminalen Bereich des Dipetalogastin II stammenden AS sind orange, der vom Hirudin stammende C-Terminus ist rot und der die beiden Peptidketten verbindende Glycin-Linker ist weiß dargestellt. Das türkis markierte Arg bezeichnet die AS, die sich in P1 Position befindet und die thrombininhibitorische Wirkung initiiert.

Pharmakokinetische Untersuchungen zeigen eine schnelle Verteilung des Dipetarudins im extravaskulären Raum und eine langsame Elimination aus ihm. Diese Eigenschaft fördert die Anwendung des Dipetarudins in der Therapie anderer „Thrombin-abhängiger“ Erkrankungen (z.B. Antitumorthherapie) (López *et al.* 2004).

Weitere aus *in-vivo*-Versuchen gewonnene Pharmakokinetik-Informationen zeigen ein offenes Zwei-Kompartiment-System mit Elimination erster Ordnung. Versuche an nephrektomierten Ratten weisen auf eine ausschließlich über die Nieren erfolgende Elimination des Inhibitors hin. Dieser wird während der Ausscheidung von Proteasen (z. B. der Metalloprotease Meprin), die im proximalen Tubulus der Rattennieren lokalisiert sind, degradiert, sodass im Rattenurin nahezu kein unmetabolisiertes Dipetarudin nachzuweisen ist (López *et al.* 2005).

1.6 PEGylierung und das PEG-Dipetarudin

Die Wirksamkeit einiger Therapeutika kann durch die Modifizierung der Pharmakokinetik und -dynamik erhöht werden und so zu einem geeigneteren Anwendungsprofil führen. Bisher wurde die Manipulation der Aminosäuresequenz benutzt, um die Immunogenität (Mateo *et al.* 2000) bzw. den proteolytischen Abbau des Fremdproteins zu verringern. Auch wurde versucht, die Therapeutika durch Einschleusen in „drug delivery vehicles“ vor dem Abbau zu schützen und langsamer aus diesem Depot freizusetzen (Cohen *et al.* 1991). Eine viel versprechende Methode ist auch die Fusion mit Immunglobulinen oder Serumproteinen wie Albumin oder die Kopplung an natürliche oder synthetische Polymere (Roberts *et al.* 2002). Eine solche Substanz ist das Polyethylenglykol (PEG), welches ein polydisperses (Veronese & Pasut 2005), nicht-toxisches (Veronese & Harris 2002; Veronese & Pasut 2005), nicht-immunogenes (Veronese & Harris 2002; Veronese & Pasut 2005) und gut in polaren und apolaren Lösungsmitteln lösliches Polymer darstellt. Die chemische Verknüpfung der PEG-Ketten mit den funktionellen Gruppen der AS der Proteine (PEGylierung) führt zu positiven Veränderungen ihrer biochemischen und pharmakokinetischen Eigenschaften. Die Größenzunahme des Pharmakons bewirkt eine Abnahme der Ausscheidung über die Nieren und führt so zu einer verlängerten Aufenthaltszeit im Körper (Roberts *et al.* 2002; Veronese & Pasut 2005). Die Wirkungen der PEGylierten Proteine sind im Vergleich zu denen der unmodifizierten Moleküle

wegen einer höheren Wasserlöslichkeit (Veronese & Pasut 2005), einer gesteigerten Stabilität (Veronese & Harris 2002), einem verlangsamten metabolischen (Veronese & Pasut 2005) und proteolytischen Abbau (Roberts *et al.* 2002), sowie der Reduktion bzw. Elimination der Immunogenität (Veronese & Pasut 2005) verbessert. Die Immunogenität der verwendeten Substanzen ist in der klinischen Anwendung durch ihren Peptidcharakter und häufige Applikationen von hoher Bedeutung. Einige durch die PEGylierung modifizierte Proteine werden zur Zeit schon in der Medizin verwendet (z.B. PEG-Interferon 2 α bei Hepatitis C-Therapie, Veronese & Pasut 2005).

Erfolgt die Kopplung von PEG5kD-Ketten an den *slow tight-binding* Thrombininhibitor Dipetarudin, entstehen zwei PEGylierte Formen (zwei PEGylierungsstellen: α -Aminogruppe des N-Terminus und ϵ -Aminogruppe der AS Lysin in Position 33) des Inhibitors. Mono-PEGyliertes (DIP-PEG5kD: 13.271 kDa) und di-PEGyliertes (DIP-2(PEG5kD): 18710 kDa) Dipetarudin zeigen im Vergleich zu dem unmodifizierten Protein Veränderungen in den pharmakokinetischen Parametern, d.h. nicht nur eine Steigerung des *AUC*-Wertes, sondern auch die Verlängerung der Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten (López *et al.* 2004b).

1.7 Zielstellung

Ziel der Arbeit ist die Expression, Reinigung und chemische Modifizierung (PEGylierung) des Dipetarudins, eines chimären Thrombininhibitors, sowie die Bestimmung der Immunogenität der unveränderten bzw. der modifizierten Form. Durch die PEGylierung kann die Halbwertszeit des Pharmakons verlängert und die Erkennung durch das Immunsystem verringert werden. Dies wird das pharmakologische Profil des Thrombininhibitors verändern und ihn so geeigneter für mögliche Einsatzgebiete machen.

Das adaptive Immunsystem schützt sowohl Menschen als auch Tiere vor den fatalen Folgen einer Infektion mit Viren, Pilzen, Parasiten oder Bakterien. Gelangt ein Krankheitserreger in den Körper, werden verschiedene Schutzmaßnahmen aktiviert, darunter auch die Bildung von Antikörpern. Die Antikörper sind in der Lage, das Antigen (Antikörper-generans) zu binden und zu neutralisieren. Manchmal wird dieser Schutzmechanismus auch in Gegenwart von harmlosen oder sogar nützlichen Molekülen in Gang gesetzt. Ob das Immunsystem auch bei der Verabreichung von Proteinketten aus fremden Spezies aktiviert wird und die

Wirkung des Therapeutikums so verändert bzw. ganz neutralisiert wird, ist vor der Anwendung am Menschen zu bestimmen. Die immunogenen Eigenschaften des Thrombininhibitors Dipetarudin und seiner PEGylierten Form sollen am Tiermodell untersucht werden.

Als ein immunogener Modellorganismus kann die Legehenne dienen. Das auf diesem Modell aufgebaute Testverfahren ist eine für das Tier schonende Möglichkeit, die Immunogenität von Substanzen zu untersuchen. Am Huhn werden nach den immunisierenden Impfungen keine weiteren Eingriffe mehr durchgeführt. Das Tier wird bei dieser Verfahrensweise vergleichsweise wenig gestresst, denn zum Antikörpernachweis bzw. zur Antikörpergewinnung ist keine Blutentnahme erforderlich, sondern es werden ausschließlich die Eier der immunisierten Hennen gesammelt und aus dem Eigelb die Antikörper aufgereinigt. Die aviären Antikörper werden im Dotter angereichert (IgY; Y steht für *yolk* = Dotter) und können daraus isoliert werden. Ein weiterer Vorteil bei der Wahl des Modellorganismus Henne ist die kostengünstige Haltung der Tiere.

Die Antikörperbildung gegen Fremdproteine kann durch eine große evolutionäre Distanz zwischen dem „Spender des Proteins“ und dem „Empfänger des Proteins“ gefördert werden. Um aus den Ergebnissen der Immunisierungen Schlussfolgerungen für den Einsatz am Menschen zu ziehen, ist daher eine fortführende Untersuchung an Säugetieren angebracht. Das Modellsystem Ratte scheint für diese Untersuchung geeignet. An den Tieren kann neben dem direkten Nachweis der AK (*Dot Blot*) auch eine indirekte Bestimmung der Antikörperpräsenz mittels Immunpharmakokinetik durchgeführt werden. Die von der Spezies Ratte generierten Antikörper gegen Epitope des Dipetarudins können sowohl neutralisierend als auch nur bindend wirken. Bei den immunopharmakologischen Untersuchungen wird beobachtet, wie sich die Pharmakokinetik des zu untersuchenden Dipetarudins und seiner modifizierten Form bei einer Antikörperpräsenz im Blut verändert (Immunpharmakokinetik). Es ist so möglich, anhand der pharmakokinetischen Daten die speziellen Eigenschaften der generierten AK näher zu untersuchen.

1.8 Ausgangssituation

Die Sequenz des Thrombininhibitors Dipetarudin wurde bereits in den Vektor pPIC9 des Expressionssystems *Pichia pastoris* kloniert und die Bedingungen (Auswahl des bestens Klons, Bestimmung der optimalen Methanolkonzentration und Kultivierdauer) für die Synthese des Proteins in diesem Produzenten optimiert (López *et al.* 2007).

Gegeben waren auch die Methoden der Reinigung des Inhibitors aus dem Proteingemisch des Kulturüberstandes und die Bestimmung einiger biochemischer Eckdaten (z.B. Molekulargewicht und Pharmakokinetik).

2 Experimentelle Vorgehensweise

2.1 Materialien

2.1.1 Medien

BMGY-Medium 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Pepton; 100 mM Kaliumphosphat (pH 6,0); 1,34 % (w/v) *Yeast Nitrogen Base* (YNB); 4×10^{-5} % (v/v) Biotin; 1 % (v/v) Glycerol

BMMY-Medium 1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 % (w/v) Pepton; 100 mM Kaliumphosphat (pH 6,0); 1,34 % (w/v) YNB; 4×10^{-5} % (v/v) Biotin; 0,5 % (v/v) Methanol

MD-Platten 1,34 % (w/v) YNB; 4×10^{-5} % (v/v) Biotin; 2 % (v/v) Dextrose; 1,5 % (w/v) Agar

2.1.2 Lösungen und Puffer

Binding-Puffer 20 mM Na_2HPO_4 ; 0,5 M K_2SO_4 ; pH 7,5

Cleaning-Puffer 20 mM Na_2HPO_4 ; 30 % (v/v) Isopropanol; pH 7,5

ECT-Puffer 50 mM Tris-HCl; 154 mM NaCl; pH 7,5

Elution-Puffer 20 mM Na_2HPO_4 ; pH 7,5

1 M Kaliumphosphat 132 ml 1M K_2HPO_4 ; 868 ml 1M KH_2PO_4 ; pH 6,0

TBST 20 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20; pH 7,5

2.1.3 Enzym

Ecarin 20 U/ml in 154 mM NaCl
Pentapharm, Basel, Schweiz

2.1.4 Kopplungsreagenz

SPA-PEG5KD Nektar™, Huntsville, USA

2.1.5 Adjuvans, Antikörper und Nachweisreagenzien

Anti-Chicken IgY, AP-gekoppelt Promega Corporation, Madison, USA
Anti-Rat IgG, AP-gekoppelt Promega Corporation, Madison, USA
Freund'sches Adjuvans, inkompl. Sigma Aldrich, INC., Saint Louis, USA
Freund'sches Adjuvans, kompl. Sigma Aldrich, INC., Saint Louis, USA
Western Blue® Stabilized Substrate Promega Corporation, Madison, USA
für AP

2.1.6 Humanplasma

Gefrorenes Frischplasma (jeweils 250 ml, Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Gera) von 10 gesunden Spendern wurde nach dem Auftauen vereinigt und das gepoolte Plasma nach Aliquotierung bei -20°C gelagert.

2.1.7 Kits

Bicinchoninic Acid Kit zur Proteinbestimmung von Sigma, Taufkirchen, D
Pichia pastoris Expression Kit von Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.8 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien (wenn möglich in p.a. Qualität) wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem GmbH (Darmstadt), B. Braun Melsungen AG (Melsungen), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Fluka Chemie AG (Buchs, CH), Philopharm GmbH (Quedlinburg) und Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim).

2.1.9 Tiere

Zur immunologischen Untersuchung des Dipetarudins und seiner PEG-Derivate *in vivo* wurden Legehennen verwendet. Die Legehennen wurden in Einzelkäfigen gehalten, bekamen Körnerfutter und Wasser *ad libitum*. Die Immunisierung der Tiere wurde frühestens eine Woche nach kontinuierlicher Eiablage begonnen.

Die (immun)pharmakokinetischen Untersuchungen erfolgten an weiblichen Wistar-Ratten des Stammes JEN-WIST (Institut für Versuchstierkunde, Jena), die ein Körpergewicht von 200-260 g erreicht hatten. Die Ratten erhielten Standardfutter und Wasser *ad libitum*. Die Experimente wurden frühestens nach einer Woche Habituation durchgeführt.

2.1.10 Ausstattung

Biochrom 4060 Spektrophotometer	Pharmacia LKB, Erlangen, D
Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau, D
BIO-Kinetics Reader EL 312e	BIO-TEK Instruments, Burlington, USA
Microplate	
C18-Säule Phenomenex®	Phenomenex, Aschenffenburg, D
CL4 Coagulometer	Behnk-Elektronik, Norderstedt, D
nano FPLC-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
HiLoad™ 16/60 Superdex™ 75	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
HiTrap IgY Purification HP 5 ml	Amersham Biosciences, München, D
LC-8A HPLC-System	Shimadzu, Dortmund, D
Lyophilisator	Christ AG, Osterode, D
Massenspektrometer Kompact	
Probe MALDI-TOF	Kratos Analytical, Manchester, GB
Magnetic Stirrer HI 200 M	HANNA Instruments, Kehl, D
Mikroplatten Reader 3550-UV	BioRad Laboratories GmbH, München, D
NOWApure select	KSN Wassertechnik, Nistertal, D
PD-10 Entsalzungssäulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Pumpe ECONO	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Pumpe Ismatec® IPC	ISMATEC SA, Glattburg, CH
Pumpe Precidor	INFORS AG Basel, Basel, CH
Resource™ Q 6 ml-Säule	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
S10 Specord Spectrophotometer	Carl Zeiss Jena, Jena, D
Spektrophotometer	
Beckman DU® 640	Beckmann, USA
Schüttelinkubator 3032	GFL, Burgwedel, D
Schüttler Desaga CM9	Sarstedt, Nümbrecht, D
Speed-Vac System	Savant Instruments, Farmingdale, USA
VARIMAG® Maxi HP 1P	H+P Labortechnik AG, Oberschleissheim, D
VARIMAG® Mono	H+P Labortechnik AG, Oberschleissheim, D
Waage MC1 Laboratory LC 620 P	Sartorius AG Mechatronik, Göttingen, D

Waage Mettler AE 240	E. Mettler, Zürich, CH
Wasserbad 7P	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Wasserbad Haake 5P	Haake, Karlsruhe, D
Wasserbad Polytherma	Bench Scale Equipment Co., USA
Zentrifuge Sigma 3K12	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Zentrifuge Sigma 3K30	B. Braun Biotech International
Zentrifuge Sorvall®	
RT6000B DuPont	Du Pont Instruments, Newtron, USA
Zentrifuge Sorvall® RC-5B	Du Pont Instruments, Newton, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins

2.2.1.1 Expression von rekombinantem Dipetarudin in *Pichia pastoris*

Die Expression des Thrombininhibitors Dipetarudin erfolgte in der methylotrophen Hefe *Pichia pastoris*. Dazu wurde eine Kolonie der Hefe von einer MD-Platte in 50 ml BMGY-Medium inokuliert und im Brutschrank bei 28-30 °C und 210 rpm angezogen. War nun ein OD₆₀₀-Wert >2 erreicht, wurden die Zellen durch Zentrifugation (1500x g, RT, 5 min) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in methanolhaltigem Medium (BMMY) resuspendiert, bis ein OD₆₀₀-Wert von eins eingestellt war. Die Hefen wurden im Brutschrank bei 28-30°C und 210 rpm kultiviert. Während dieser Zeit erfolgte alle acht Stunden ausschließlich die Zugabe von 500 µl 100%igem Methanol (dient als Induktor), bis eine Endkonzentration von 0,5 % Methanol erreicht war. Die Expression des Dipetarudins wurde nach 4 Tagen durch Zentrifugation (1500x g, RT, 5 min) der Zellsuspension abgebrochen. Von den Überständen wurden 50 µl abgenommen. Diese wurden mittels ECT-Messung zur Kontrolle der Effektivität der Expression und des Aktivitätsnachweises des exprimierten Proteins benutzt. Die restlichen Überstände wurden bis zur Proteinaufreinigung bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Proteinfällung und Umpufferung

Das von *Pichia pastoris* ins Medium sezernierte Dipetarudin wurde mittels Ammoniumsulfat-Fällung aus dem Medium folgendermaßen gewonnen:

Die bei -80 °C gelagerten Kulturüberstände wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, zentrifugiert (1500x g, 4 °C, 5 min) und mit den so erhaltenen Überständen wurde weitergearbeitet. Zum Überstand wurde in zehnminütigen Abständen unter ständigem Rühren Ammoniumsulfat zugegeben, bis eine Endkonzentration von 40 % erreicht war. Nach der Zugabe der gesamten Salzmenge wurde die nun trübe Lösung noch eine Stunde auf dem Rührer belassen und die ausgefallenen Proteine vom Medium mittels Zentrifugation (10000x g, 4°C, 30 min) getrennt. Es wurden 2,5 ml der Überstände entsalzt und als Kontrolle einer erfolgreichen Fällung der Proteine aus dem Medium verwendet. Das Pellet wurde in 20 mM Tris Base 0,1 M NaCl gelöst und mittels PD-10 Entsalzungssäulen in dem gleichen Puffer nach Vorschrift des Herstellers entsalzt. Das Eluat wurde

nach Entnahme von 25 µl für ECT-Messungen bei –80 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.2.1.3 Anionenaustauschchromatographie

Zur weiteren Aufreinigung des Dipetarudins aus dem Proteingemisch schloss sich eine Chromatographie an. Dazu wurde eine Resource™ Q 6 ml Säule und ein FPLC System verwendet.

Die Säule wurde mit 20 mM Tris Base 0,1 M NaCl äquilibriert, bei einem Fluss von 1 ml/min beladen und das Protein mit einem steigenden Salzgradienten von 0,1 bis 0,4 M NaCl und 20 mM Tris Base und einem Fluss von 6 ml/min in 215 ml eluiert. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm. Das Eluat wurde auf seine biologische Aktivität mittels ECT untersucht und die Fraktionen, die eine verlängerte Gerinnungszeit bei der ECT zeigten, wurden vereinigt, bei –80 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

2.2.1.4 Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Die nach der Anionenaustauschchromatographie lyophilisierten Proteine wurden in A. bidest gelöst und auf einer Phenomenex® C18-Säule in einem HPLC System aufgetragen. Die Trennung erfolgte durch einen linearen Gradienten von 5 % Acetonitril mit 0,1 % TFA auf 50 % Acetonitril mit 0,1 % TFA in 120 min. Die verwendete Flussrate betrug 10 ml/min und die Detektion der Proteine erfolgte bei 220 nm. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels MALDI-TOF untersucht. Die Fraktionen, deren Proteine das gleiche Molekulargewicht aufwiesen, wurden vereinigt, durch ein Speed-Vac-System vom Acetonitril befreit und gefriergetrocknet.

2.2.2 Modifizierung des Proteins mit PEG

2.2.2.1 PEGylierung

Zu 12 mg Dipetarudin wurden in einem Molaritätsverhältnis 1:10 (Protein zu SPA-PEG5KD) 80 mg SPA-PEG5KD in 50 mM Borat-Puffer gegeben und für 90 min bei RT gemischt .

2.2.2.2 Reinigung des PEGylierten Proteins

Zur Trennung der einzelnen PEGylierungs-Zustände (unPEGyliert, einfach und zweifach-PEGyliert) wurde eine Gelfiltration an einer Superdex™ 75 HiLoad™ 16/60 Säule durchgeführt. Als Elutionspuffer wurde 154 mM NaCl-Lösung bei einem Fluss von 1 ml/min verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte bei 280 nm. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels MALDI-TOF auf die Anzahl der gekoppelten PEG-Ketten untersucht und die Fraktionen mit der gleichen Anzahl von angehangenen PEG-Ketten vereinigt, in einer PD-10 Säule entsalzt und gefriergetrocknet.

2.2.3 Biochemische Charakterisierung

2.2.3.1 Ecarin Clotting Time (ECT)

Die ECT ist eine Messmethode zur Bestimmung der Quantität von direkten Thrombininhibitoren und somit sehr gut geeignet, um die vorhandene biologische Aktivität und Menge des Dipetarudins in den einzelnen Aufarbeitungsschritten zu verfolgen (Nowak & Bucha 1996). Die Messung wurde an einem mechanischen Koagulometer durchgeführt. Dazu wurden 200 µl gepooltes Humanplasma, 60 µl ECT-Puffer und 20 µl der zu testenden Probe bei 37 °C für 2 min vorinkubiert. Die Zeitmessung wurde mit der Zugabe von 20 µl Ecarin (5 U/ml) in 50 mM CaCl₂ gestartet und die Zeit bis zur Gerinnung gemessen. Die dazugehörigen Kalibrierungskurven wurden mit definierten Mengen der Proteine erstellt.

2.2.3.2 Bicinchoninic acid (BCA)

Zur Bestimmung der einzelnen Proteinmengen wurde die BCA-Methode (Smith *et al.* 1985) gewählt und nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Als Proteinstandard wurde BSA verwendet.

2.2.3.3 Bestimmung des Molekulargewichtes mittels *Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight* (MALDI-TOF)

Die Bestimmung des Molekulargewichtes des Dipetarudins bzw. der PEG-Derivate erfolgte mittels MALDI-TOF. Als Matrix wurden gesättigte Lösungen der α -Cyano-p-Hydroxyzimtsäure bzw. der Sinapinsäure verwendet. 18 mg α -Cyano-p-Hydroxyzimtsäure und 18 mg Sinapinsäure wurden jeweils in 1 ml 50 % Acetonitril mit 0,1 % TFA gelöst. Die zu messenden Proteinlösungen wurden zwischen die Trägermatrix auf den Probenschlitten aufgebracht, getrocknet und gemessen. Zur Kalibrierung des System wurden die Molekularmassen von Rinderinsulin (MW = 5733,5 Da), Cytochrom C (MW = 12361 Da) und Myoglobin (MW = 16952 Da) verwendet.

2.2.4 Untersuchungen zur Immunogenität

2.2.4.1 Immunisierung von Legehennen

Zur Untersuchung der antigenen Wirkung des Dipetarudins und des PEG-gekoppelten Dipetarudins wurden Dosen von 50 μ g oder 400 μ g Protein s.c. in den Rücken der Legehennen gespritzt. Ebenfalls wurde hydrolysiertes PEG5kD auf seine immunogene Eigenschaft getestet. Zum Protein, welches in 500 μ l A. bidest gelöst war, wurden die gleichen Mengen Freund'sches Adjuvans tropfenweise zugegeben, wobei unter ständigem Vortexen eine Emulsion entstand. Vor dem Start der Immunisierung wurden Eier gesammelt, diese dienten später als Negativkontrolle. Am Tag 1 erfolgte die Initiations-Injektion. Zur Emulsionsbildung und zur Aktivierung des Immunsystems wurde bei der ersten Applikation komplettes Freund'sches Adjuvans (FCA) verwendet. Die Emulsionslösungen der Auffrischungen (1 ml) wurden am Tag 8, 15, 22 und 29 mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans (FIA) gespritzt. Ab Tag 30 wurden die Eier für die Aufreinigung der IgY gesammelt. Acht Wochen nach dem Immunisierungs-Beginn wurde den Tieren eine Booster-Injektion mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans verabreicht. Diese Auffrischung sorgte für das Aufrechterhalten der vorhandenen Antikörperspiegel.

2.2.4.2 Aufreinigung der IgY

Nach Trennung des Eigelbs vom Eiweiß wurden zu einem Anteil Eigelb langsam 9 Anteile 4 °C kaltes A. bidest gegeben und über Nacht langsam bei 4 °C gerührt. Die Präzipitierung der Lipide erfolgte durch Zentrifugation (10000x g, 4 °C, 25 min). Der Überstand wurde abgenommen, eine Endkonzentration von 0,5 M K₂SO₄ und pH 7,5 eingestellt (Akita & Nakai 1993). Die IgY-haltige Lösung wurde durch einen 0,22 µm-Filter steril filtriert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 °C gelagert. Die weitere Aufreinigung der Antikörper erfolgte an einer HiTrap IgY Purification HP 5 ml (Bergenströhle & Heijbel 1999). Die Säule wurde nach den Vorschriften des Herstellers gewaschen und mit 25 ml Bindungspuffer äquilibriert. Mit einer Flussrate von 3,33 ml/min wurden 15-30 ml der Probe aufgetragen, mit 150 ml Bindungspuffer gewaschen und mit 50 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Von den einzelnen Fraktionen wurden jeweils Proben entnommen und diese separat in einem Spektrophotometer bei 280 nm gegen A. bidest (Detektionshilfe) gemessen. Die gereinigten IgY wurden durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.4.3 Antikörpernachweis (IgY aus den Hühnereiern)

Die Bestimmung der Antigen-Antikörper-Erkennung erfolgte mittels *Dot Blot*. Es wurden je 0,5 µg der putativen Antigene (DIP, 5 min bei 100 °C denaturiertes DIP, DIP-(PEG5kD) und DIP-2(PEG5kD)), der primären Antikörper oder des sekundären Antikörpers auf eine Nitrocellulose-Membran pipettiert. Nach dem Eintrocknen der Proben wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Nitrocellulose-Membran mit 5 % Milchpulver in 50 ml TBST über Nacht bei 4 °C und 75 rpm blockiert. Die aufgereinigten IgY wurden in einer 1:100-Verdünnung mit 5 % Milchpulver in TBST für 1 h bei RT und 90 rpm auf die Membran gegeben. Nach der Inkubation wurde die Membran viermal für 3 min mit TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Ziege-Anti-Huhn IgY) wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in 5 % Milchpulver in TBST hergestellt. Das verdünnte *Anti-Chicken IgY, AP conjugate* wurde für 1 h bei RT und 90 rpm mit der Membran inkubiert, gefolgt von erneuten Waschschritten wie oben beschrieben. Es wurde 1 ml des Substrates *Western Blue® Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase* auf die Membran gegeben und es entwickelte sich ein blau-violetter Punkt. Die Reaktion wurde mit A. bidest gestoppt.

2.2.4.4 Immunpharmakologische Untersuchungen am Rattenmodell

2.2.4.4.1 Konfektionierung von Ratten

Den Versuchstieren wurde unter Ethernarkose an den Tagen 1, 8, 15, 22 und 29 jeweils 0,5 mg/kg KG Dipetarudin bzw. DIP-2(PEG5kD) als Wasser-Öl-Emulsion in einem Maximalvolumen von 120 µl intrakutan in den rasierten Nacken appliziert. Die zu injizierende Proteinmenge wurde in A. bidest gelöst und tropfenweise die gleiche Menge Freund'sches Adjuvans zugegeben, wobei unter ständigem Vortexen eine Emulsion entstand. Beim Start der Konfektionierung wurde komplettes Freund'sches Adjuvans verwendet. Die wöchentlichen Auffrischungen erfolgten mit inkomplettem Freund'schen Adjuvans. Die pharmakologischen Untersuchungen erfolgten ab dem Tag 42.

Untersucht wurden auch Negativkontrollen (anstatt der Inhibitoren wurde A. bidest verwendet oder es erfolgte keine Konfektionierung der Tiere) und Thrombininhibitoren ohne die gleichzeitige Verabreichung eines Adjuvans.

2.2.4.4.2 Tierexperimentelle Vorgehensweise

Wistar-Ratten wurden durch die intraperitoneale Gabe einer 25%igen Ethylurethan-Lösung (1,5-2,0 g/kg KG) narkotisiert und zwei venöse Zugänge gelegt. Es wurde jeweils ein silikonisierter Katheter in die linke bzw. rechte *V. jugularis externa* platziert. Der linksseitige Katheter wurde zur Entnahme des Blutes verwendet, wohingegen über den rechten Katheter die Ratte mit der Infusion der Diureselösung (5 % BSA in 10 % Mannitol) versorgt wurde und die i.v. Applikation der Thrombininhibitoren erfolgte. Die Gabe der Thrombininhibitoren bei der pharmakologischen Untersuchung erfolgte ausschließlich intravenös, wobei die Dosis 0,5 mg/kg KG bei den modifizierten Formen und 0,5 mg/kg Kg bzw. 1 mg/kg KG beim Dipetarudin betrug.

Die Ratten wurden über einen Zeitraum von 24 h untersucht, wobei die Applikation des zu testenden Thrombininhibitors frühestens eine Stunde nach der Operation gestartet wurde. Unmittelbar nach Operationsende wurde den Ratten eine Diurese-fördernde Lösung (5 % BSA in 10 % Mannitol) bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 3 ml/h verabreicht. Die Applikation dieser Lösung erfolgte bis zum Erreichen des Nullwertes im Blut und stellte die ausreichende Diurese der Ratten für die Urinuntersuchungen sicher.

2.2.4.4.3 Gewinnung der Blut- und Urinproben

Die Blutentnahme zur Konzentrationsbestimmung der Inhibitoren im Blut erfolgte über einen Katheter in der linken *V. jugularis externa*. Mittels einer Feindosierungsspritze, die einen Anteil 3,13%iges Natriumcitrat auf neun Anteile Blut enthielt, wurden 400 µl Citratblut zur Nullwertbestimmung bzw. 150 µl Citratblut für die Konzentrationsbestimmung entnommen. Der Zeitpunkt der Blutentnahmen richtete sich nach den applizierten Thrombininhibitoren. Bei Dipetarudin erfolgten sie bei 2, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 Minuten sowie 24 Stunden nach Bolusgabe des Inhibitors. Die Spiegel der PEGylierten Thrombininhibitoren wurden nach 2, 20, 30, 45, 60, 90 Minuten sowie nach 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 und 24 Stunden bestimmt.

Der Urin wurde zu den Zeiten 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16 und 24 Stunden nach dem Applikationsstart gesammelt und für weitere Untersuchungen bei -20°C gelagert.

2.2.4.4.4 Bestimmung der Inhibitorkonzentrationen

Die Spiegel der Inhibitoren und die Inhibitoraktivität im Urin und damit die Elimination durch die Nieren wurden mittels *Ecarin Clotting Time* bestimmt. Die Messungen der Inhibitoren im Urin erfolgte wie in der Literatur (Nowak und Bucha 1996) beschrieben. Für die Bestimmung der Inhibitorkonzentrationen im Blut erfolgte eine Modifizierung der Methode. Hierfür wurden 50 µl Citratblut für 2 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl Ecarin-Lösung (1 U/ml in 0,9 % NaCl mit 5 mM CaCl_2) gestartet und die Zeit bis zur Gerinnung in einem mechanischen Koagulometer gemessen. Kalibrierungskurven der verwendeten Thrombininhibitoren dienten zur letztendlichen Bestimmung der Konzentrationen der applizierten Substanzen.

2.2.4.4.5 Pharmakokinetische Berechnungen

Die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte aus dem zeitlichen Verlauf der Inhibitorkonzentration im Blut nach i.v. Gabe. Die Auswertung der Daten erfolgte für ein Zwei-Kompartimentmodell (Abb. 4). Dies wird durch die Gleichung $C(t) = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$ beschrieben.

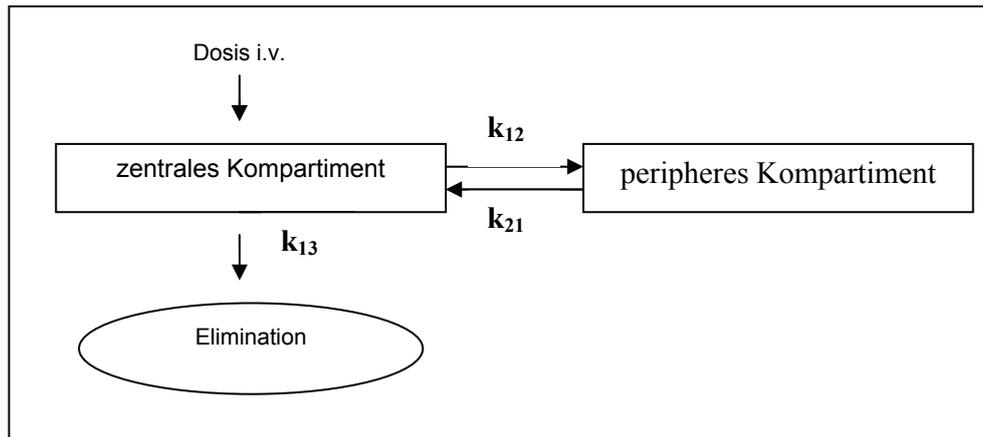


Abb. 4 Darstellung des Zwei-Kompartimentmodells

Aus den Graphen (log Inhibitorblutspiegel gegen die Zeit aufgetragen) konnten die Verteilungskonstante α , Eliminationskonstante β und die Schnittpunkte der Regressionsgeraden mit der Ordinate (A und B) bestimmt werden. Diese Werte dienten der Berechnung der Verteilungshalbwertszeit $t_{1/2\alpha}$ (Gleichung 1a) und der Eliminationshalbwertszeit $t_{1/2\beta}$ (Gleichung 1b). Weiterhin ermöglicht die Kenntnis dieser Daten die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k_{12} (Verteilung vom zentralen zum peripheren Kompartiment), k_{21} (Verteilung vom peripheren zum zentralen Kompartiment) und k_{13} (Eliminationsgeschwindigkeit aus dem zentralen Kompartiment) (Gleichung 2-4).

Zusätzlich wurden das Volumen des zentralen Kompartiments V_C (Gleichung 5), die applizierte Dosis D , die Inhibitorkonzentration zum Zeitpunkt 0 C_0 , das Verteilungsvolumen im *steady state* V_{dss} (Gleichung 6), die Gesamtclearance Cl_{tot} (Gleichung 7) und die Gesamtfläche unter der Blutspiegelverlaufskurve $AUC_{0-\infty}$ (Gleichung 8) bestimmt. Die AUC_{0-last} wurde nach der Trapezoidal-Regel berechnet und durch Addition des Quotienten C_{last}/β (C_{last} letzter messbarer Blutspiegel) $AUC_{0-\infty}$ ermittelt.

Gleichung 1a	$t_{1/2\alpha} = \ln 2 / \alpha$
Gleichung 1b	$t_{1/2\beta} = \ln 2 / \beta$
Gleichung 2	$k_{12} = AB(\beta - \alpha)^2 / C_0(A\beta + B\alpha)$
Gleichung 3	$k_{21} = (A\beta + B\alpha) / C_0$
Gleichung 4	$k_{13} = C_0 / (A/\alpha + B/\beta)$
Gleichung 5	$V_C = D / C_0$
Gleichung 6	$V_{dss} = V_C (k_{12} + k_{21}) / k_{21}$
Gleichung 7	$Cl_{tot} = D / AUC_{0-\infty}$
Gleichung 8	$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-last} + C_{last}/\beta$

2.2.4.4.6 Antikörpernachweis im Rattenplasma

Der Nachweis der Antikörperbildung erfolgte wieder mittels Dot Blot. In der Wahl des sekundären Antikörpers und seiner Verdünnung (Ziege-Anti-Ratte; 1:2500 anstatt 1:5000) wurde das bereits verwendete Protokoll leicht modifiziert. Die weitere Handhabung entspricht 2.2.4.3.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung und Reinigung des Dipetarudins

3.1.1 Expression von rekombinantem Dipetarudin in *Pichia pastoris*

Die Darstellung des Thrombininhibitors Dipetarudin erfolgte in der Hefe *Pichia pastoris*. Das Protein wurde nach Zugabe des Induktors Methanol in das umgebende Medium sezerniert. Die Expression wurde nach vier Tagen beendet und der Thrombininhibitor über die verlängerte ECT quantitativ nachgewiesen.

3.1.2 Proteinfällung

Um die Vollständigkeit der Proteinfällung durch Ammoniumsulfat zu überprüfen, wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren mittels ECT auf Antithrombinaktivität getestet. Während dieser Messungen konnte keine ECT-verlängernde Substanz im Überstand nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine vollständige Fällung des Dipetarudins aus dem Medium hin.

3.1.3 Anionenaustauschchromatographie

Das ins Medium sezernierte Dipetarudin wurde von weiteren Proteinen und den restlichen Bestandteilen des Mediums getrennt. Die Separation wurde mittels einer Anionenaustauschchromatographie an einer Resource™ Q 6-ml-Säule durchgeführt (Abb. 7). Die gesammelten Fraktionen wurden mittels ECT auf Antithrombinaktivität getestet. Die Fraktionen, die eine erhöhte Antithrombinaktivität aufwiesen, sind in Abb. 5 dargestellt. Nach MALDI-TOF-Untersuchungen konnte der 2. Peak als dem Dipetarudin zugehörig identifiziert werden. Beim 3. Peak handelte es sich um eine verkürzte Variante (Abbauprodukt) des Dipetarudins. Die ECT-aktiven Substanzen eluierten bei einer Konzentration von 15-22 % Puffer B. Die restlichen Peaks enthielten andere Proteine oder Bestandteile des Mediums.

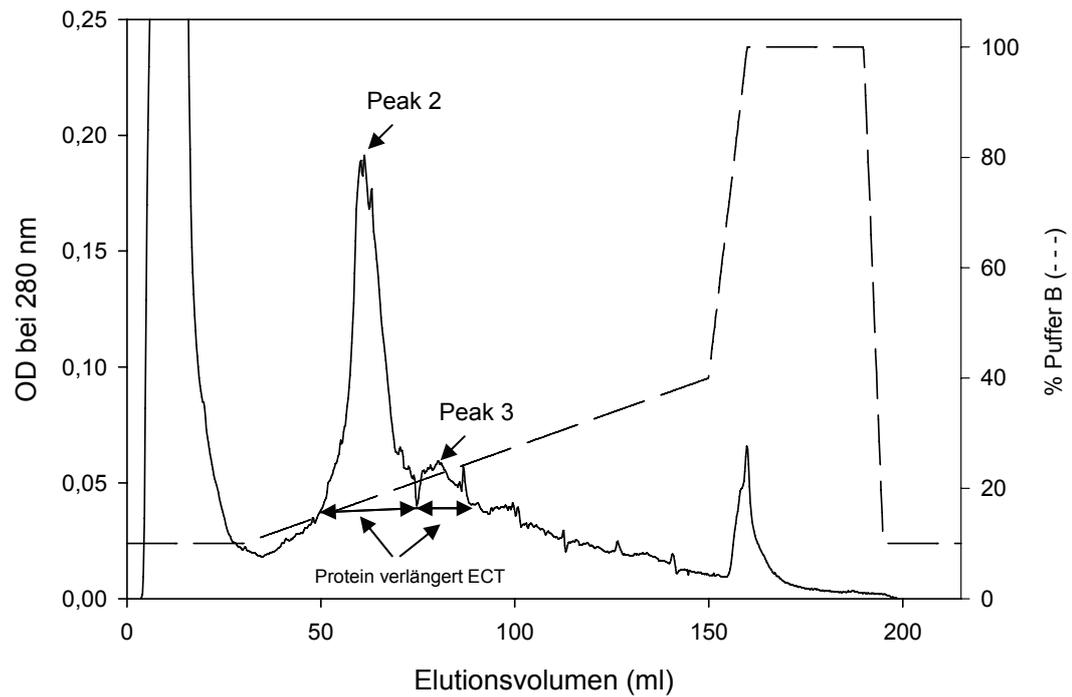


Abb. 5 Anionenaustauschchromatographie von Dipetarudin mit einer Resource™ Q 6-ml-Säule

3.1.4 RP-HPLC

Das nach der Anionenaustauschchromatographie lyophilisierte und in A. bidest gelöste Dipetarudin wurde auf eine Phenomenex® C18-Säule geladen und mit

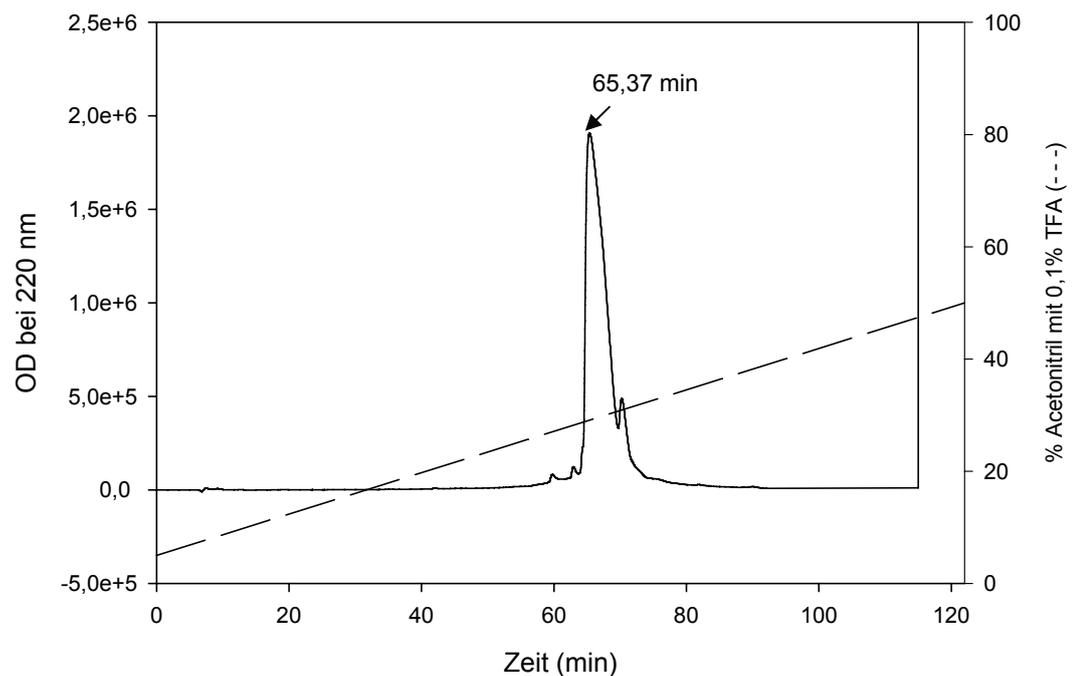


Abb. 6 Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography von Dipetarudin

einem linearen Gradienten von 5-50 % Acetonitril in 0,1 % TFA in 122 min bei einem Fluss von 10 ml/min von der Säule eluiert (Abb. 6). Unter diesen Bedingungen wurde das Dipetarudin bei der Retentionszeit von 65,37 min von der Säulenmatrix getrennt.

3.1.5 MALDI-TOF des Dipetarudins

Das Molekulargewicht des Dipetarudins wurde aus der bekannten AS-Sequenz des Proteins berechnet (7454 Da) und an einem MALDI-TOF-System gemessen. Das mittels MALDI-TOF bestimmte Molekulargewicht des Dipetarudins von 7459,14 Da (Abb. 7) entspricht dem berechneten Wert und dem Literaturwert von 7450 Da (López *et al.* 2007).

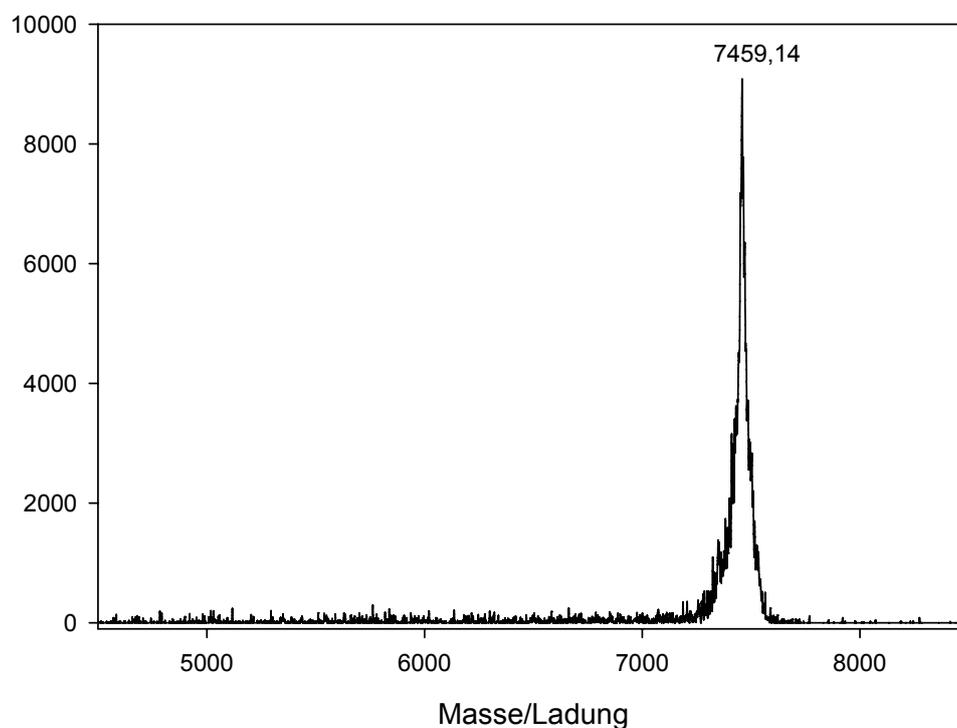


Abb. 7 MALDI-TOF-Spektrum des Dipetarudins

3.1.6 Konzentrationsbestimmung des Dipetarudins

Das nach den Chromatographie-Verfahren gereinigte Dipetarudin wurde von Acetonitril befreit, gefriergetrocknet und in A. bidest resuspendiert. Die Konzentrationen der Proteinlösungen wurden mittels BCA-Methode bestimmt. Das Dipetarudin wurde einerseits PEGyliert und andererseits für die pharmakokinetischen Untersuchungen verwendet. Dazu wurden eine Stammlösung von 2 mg/ml und Gebrauchslösungen von 0,5 mg/ml und 1 mg/ml in A. bidest hergestellt.

3.2 PEGylierung des Dipetarudins

3.2.1 Reinigung des PEGylierten Dipetarudins

Nach der PEGylierung wurden die Endprodukte mittels anschließender Gelfiltration voneinander getrennt (Abb. 8). Bei dieser Trennmethode werden die Proteine nach sinkender Molekulargröße fraktioniert. Bei einer Elutionszeit von 13-23 min erschien die zweifach PEGylierte Form des Proteins. Die einfache bzw. die unmodifizierte Form wurden bei einer Elutionszeit von 23-30 min von der Säule gewaschen. Das Spaltprodukt des SPA-PEG5KD eluierte später von der Säule.

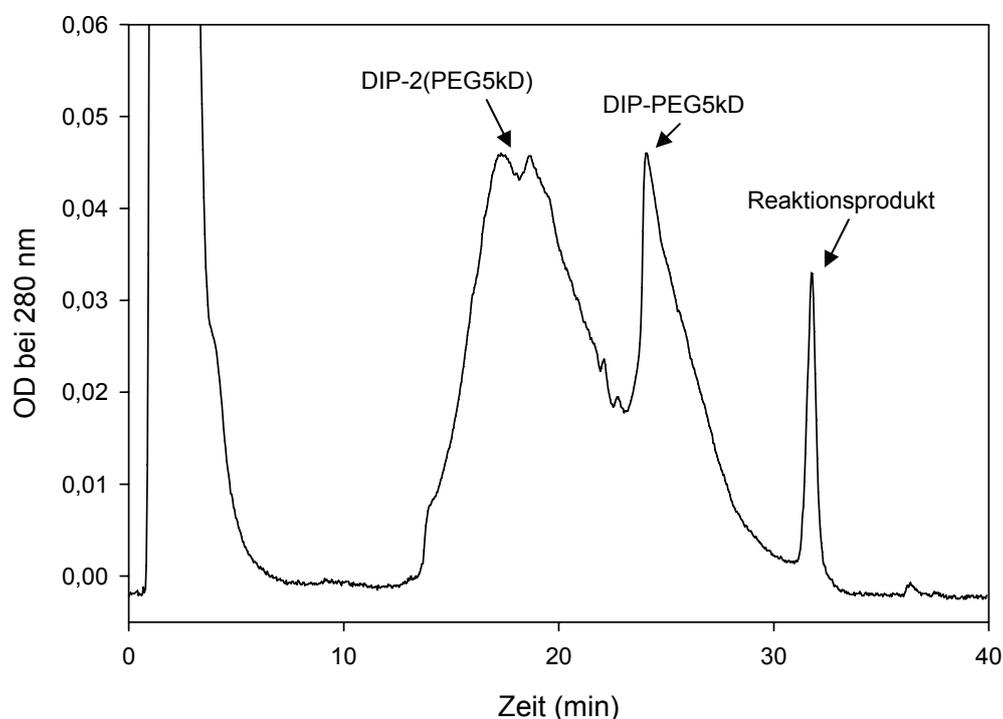


Abb. 8 Trennung der PEGylierungsprodukte des Dipetarudins

3.2.2 Bestimmung des Molekulargewichts und der Konzentration des PEGylierten Dipetarudins

Die Bestimmung des Molekulargewichts und der Konzentration des zweifach PEGylierten Proteins wurden wie bei der unmodifizierten Form durchgeführt (siehe 2.2.3.2 und 2.2.3.3). Die Größe des Moleküls ist durch die zweimalige Kopplung des PEG5KD bei ca. 18 kDa zu erwarten. Der Peak im MALDI-TOF-Spektrum hat die Form einer Gauß'schen Verteilung und deckt sich mit dem angenommenen Molekulargewicht (Abb. 9).

Die Mengen an DIP-2(PEG5kD) wurden mittels BCA bestimmt und mit A. bidest auf 0,5 mg/ml Gebrauchslösung eingestellt. Die erhaltenen Ergebnisse beziehen

sich aber nur auf den Proteinanteil des Moleküls und im Weiterem sind die Konzentrationen des zweifach PEGylierten Dipetarudin auch nur auf diesen Anteil bezogen.

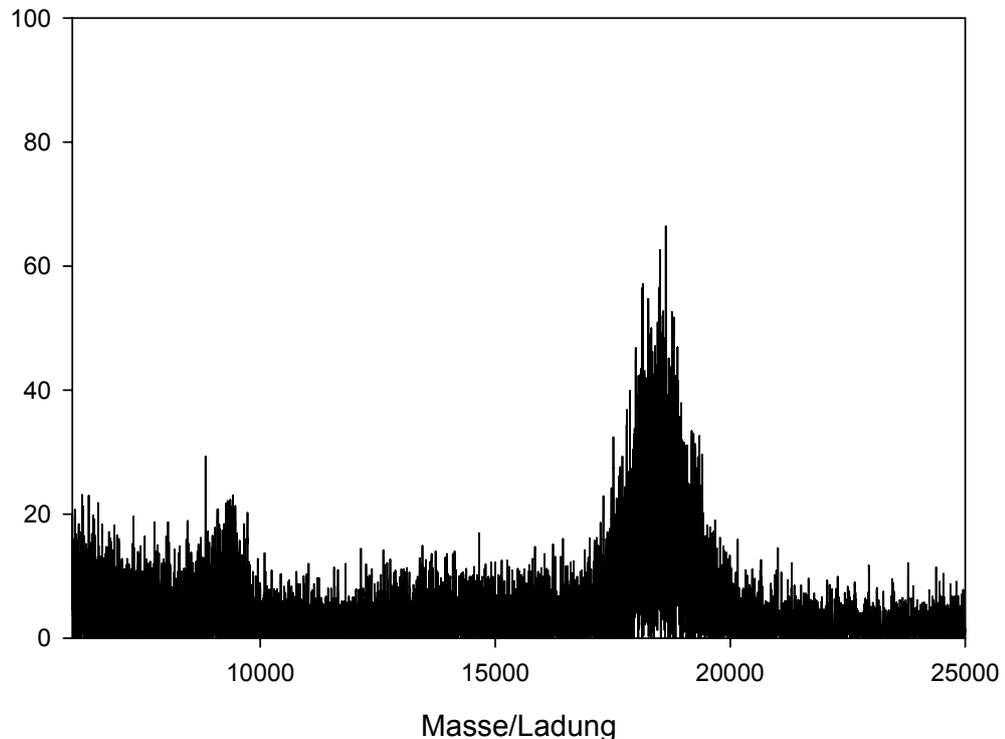


Abb. 9 MALDI-TOF-Spektrum des zweifach PEGylierten Dipetarudin

3.3 Untersuchungen zur Immunogenität

3.3.1 Aufreinigung der IgY

Die Aufreinigung der aviären Antikörper erfolgte an einer HiTrap IgY Purification HP 5-ml. Die Bindung und die Elution der Antikörper wurde separat an einzelnen Fraktionen verfolgt. Die bei 280 nm gegen A. bidest gemessenen Proben ergaben ein „typisches Spektrum“. Nach der Beladung der Säule nahm der OD-Wert der über die Säule gelaufenen Probe ab (nicht gezeigt). Während der Waschvorgänge wurden die nicht gebundenen Proteine von der Säule entfernt, bis die OD einen Wert $<0,5$ erreicht hatte. Die an die Matrix gebundenen IgY wurden mittels Elutionspuffer von der Säule getrennt. Dies konnte mit der Zunahme des OD-Wertes verfolgt werden. Die hier beschriebenen Vorgänge sind in Tab. 2 zu sehen.

Die jeweils zu einem Ei gehörenden 10 ml des ersten Elutionsvorganges wurden vereinigt und sterilfiltriert. Diese Proteinlösungen wurden für die Untersuchungen zur Antikörperbildung benutzt.

Puffer	Vorgang	OD-Wert _{280nm}
25 ml BP	Äquilibrierung	0,0025
15 ml Probe	Säulenbeladung	2,9547
50 ml BP	Waschen I	0,0928
50 ml BP	Waschen II	0,0424
10 ml EP	Elution I	0,8624
40 ml EP	Elution II	0,1251
40 ml CP	Säulenreinigung	0,0569

Tab. 2 Übersicht über den Verlauf der Aufreinigung der IgY

Die bei 280 nm gemessenen Werte sind jeweils die optischen Dichten der letzten ml der einzelnen Abschnitte. Die Probenvorbereitung ist im Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben.

3.3.2 Antikörperbildung (Legehennen)

Die Antigenität des Dipetarudins (DIP), des zweifach PEGylierten Dipetarudins (PEG-2(PEG5kD)) und des hydrolysierten PEG5KD wurden getestet. Dazu wurden Legehennen mit 50 µg oder 400 µg putativem Antigen s.c. immunisiert. Die Präsenz von AK gegen die applizierten AG wurde mittels Dot-Blot-Methode nachgewiesen. Auf eine Nitrocellulose-Membran wurden jeweils 0,5 µg der putativen AK, 1 µl primärer AK, 0,5 µl sekundärer AK und A. bidest pipettiert. Die Ergebnisse der Dot Blots sind in Abb. 10 zusammengefasst. Die Erkennung und Bindung des AK an das AG ist durch einen blau-violetten Fleck (in Abb. 10 als dunkler Fleck zu sehen) auf der Membran zu beobachten. Um im Blut schon vorhandenen AK bzw. Kreuzreaktionen auszuschließen, wurden die Untersuchungen auch mit Eiern vor der Immunisierung (Prä-Immune; Abb. 10 A) vorgenommen. Diese zeigten eine Blauverfärbung der primären und sekundären AK (Positivkontrollen), aber keine der übrigen Positionen. Ein ähnliches Erkennungsmuster ist auch bei den IgY aus den Eiern der Legehennen zu beobachten, die das hydrolysierte PEG5KD als AG appliziert bekamen (Abb. 10 B). In beiden Versuchen wurden keine AK gegen die zu untersuchenden Proteine nachgewiesen. In den Eiern der Hennen, die Dipetarudin und dessen zweifach PEGylierte Form injiziert bekamen, ist die Erkennung der AG durch die AK zu beobachten. In beiden Fällen wird nicht nur das verabreichte AG vom AK erkannt, sondern auch die anderen modifizierten Formen des Proteins (Abb. 10 C und 10 D). Das DIP z.B. wird nicht nur von Anti-DIP AK, sondern auch von Anti-DIP-2(PEG5kD) AK erkannt. Die Bildung von AK war von der verabreichten Menge an AG unabhängig. Schon 50 µg der Proteine waren ausreichend, um

das Immunsystem zur Produktion der AK zu veranlassen. Die Bindung der AK an das unmodifizierte DIP ist in dessen nativer Form nicht zu beobachten. Wird das DIP für 5 min bei 100 °C denaturiert, folgt die Bindung des AK und dessen Nachweis. In diesem Modellsystem konnte keine veränderte Immunogenität nach der PEGylierung des Proteins beobachtet werden.

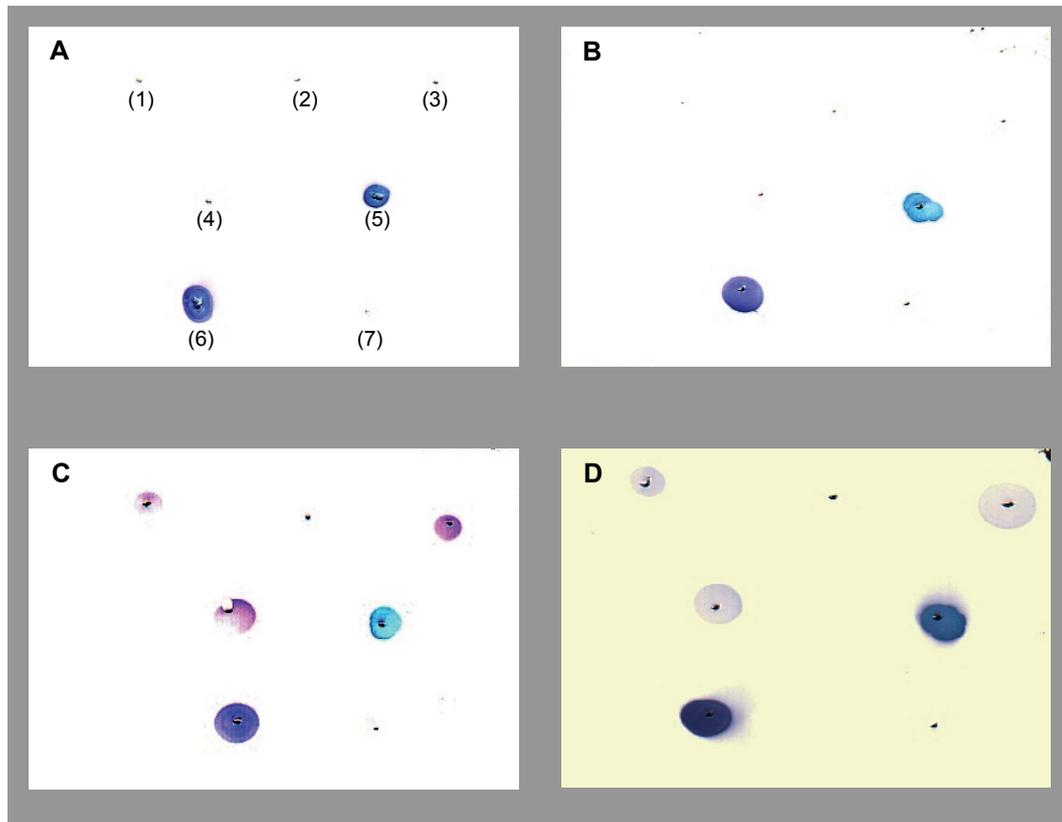


Abb. 10 Nachweis der IgY mittels Dot Blot

Das Auftragsschema ist in jedem Blot gleich: (1) 0,5 µg DIP denaturiert, (2) 0,5 µg DIP, (3) 0,5 µg DIP-PEG5kD, (4) 0,5 µg DIP-2(PEG5kD), (5) 1 µl primärer AK (aufgereinigtes IgY), (6) 0,5 µl sekundärer AK und (7) 1 µl A. bidest.

Als primäre AK wurden die aufgereinigten IgY der immunisierten Hennen verwendet. Als Kontrolle wurden Eier verwendet, die vor der Immunisierung der Hennen gelegt wurden (A) vor der Behandlung (Prä-Immun). Die Tiere wurden jeweils mit B) hydrolysiertem PEG5kD, C) 50 µg DIP und D) 50 µg DIP-2(PEG5kD) behandelt.

3.3.3 Antikörperbildung (Ratte)

Die Antikörperbildung bei Ratten wurde direkt oder indirekt (siehe 3.3.4) bestimmt. Zum direkten Nachweis wurde auch hier wieder das Dot-Blot-System verwendet. Auf die Nitrocellulose-Membran wurden jeweils 0,5 µg des nativen oder denaturierten DIP und DIP-2(PEG5kD) gebracht. Zur Kontrolle des Tests wurden zusätzlich noch 1 µl des zu testenden primären AK, 0,5 µl des sekundären AK und 1 µl A. bidest pipettiert. Die Ergebnisse der Dot Blots sind in Tab. 3 dargestellt.

putatives AG	Adjuvans	erkennt	AK-Bildung
keine Konfektionierung	keine Konfektionierung	nichts	keine AK vorhanden
A. bidest	Freund'sches	nichts	keine AK vorhanden
0,5 mg/ml DIP	Freund'sches	DIP und DIP-2(PEG5kD)	AK-Bildung gegen DIP
0,5 mg/ml DIP	kein	nichts	keine AK-Bildung
0,5 mg/ml DIP-2(PEG5kD)	Freund'sches	DIP-2(PEG5kD)	AK-Bildung gegen DIP-2(PEG5kD)

Tab. 3 Direkter Nachweis der IgG gegen DIP und DIP-2(PEG5kD)

Die zu testenden AK stammen aus Ratten, die unterschiedlich konfektioniert wurden. Demnach lassen sie sich in fünf Gruppen einteilen:

Gruppe 1: keine Konfektionierung

Gruppe 2: Konfektionierung mit A. bidest und Freund'schem Adjuvans

Gruppe 3: Konfektionierung mit 0,5 mg/ml DIP und Freund'schem Adjuvans

Gruppe 4: Konfektionierung mit 0,5 mg/ml DIP (ohne Adjuvans)

Gruppe 5: Konfektionierung mit 0,5 mg/ml DIP-2(PEG5kD) und Freund'schem Adjuvans

Die Tiere, die keiner Konfektionierung unterzogen worden sind, dienten als Kontrollgruppe. Im Plasma dieser Ratten waren keine AK gegen das DIP bzw. DIP-2(PEG5kD) zu finden. Ähnlich verhielt es sich bei Ratten der Gruppe 2. Die mit 0,5 mg/ml DIP und Freund'schem Adjuvans konfektionierten Ratten zeigten eine Erkennung aller auf der Membran vorhandenen Formen des DIPs. Erfolgte die Konfektionierung unter gleichen Bedingungen ohne Adjuvans, war keine AK-Bildung zu beobachten. Wurde den Tieren über den Immunisierungszeitraum jeweils 0,5 mg/ml DIP-2(PEG5kD) und Freund'sches Adjuvans gespritzt, wurden AK gebildet. Diese AK gingen mit dem injizierten AG einen Komplex ein, aber die Bindung an das unmodifizierte DIP unterblieb.

Ein Verschwinden der Antigenität nach der Kopplung des PEG an das Protein war nicht zu beobachten. Ob jedoch eine Reduktion der Erkennung des Antikörpers erfolgt, soll mit der indirekten Methode (siehe 3.3.4) nachgewiesen werden.

3.3.4 (Immun)pharmakokinetik

Die pharmakokinetische Charakterisierung und die Untersuchung des Einflusses der AK auf die Pharmakokinetik des DIP und DIP-2(PEG5kD) erfolgten tierexperimentell am Rattenmodell. Die Applikation der Inhibitoren erfolgte i.v. als Bolus von 0,5 mg/kg KG bzw. 1 mg/kg KG. Die pharmakokinetischen Parameter wurden aus dem Verlauf des Blutspiegels nach der Applikation berechnet. Als Berechnungsgrundlage diente ein offenes Zwei-Kompartiment-System mit einer Eliminationskinetik erster Ordnung. Beschrieben wird dies durch die Gleichung $C(t) = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$.

3.3.4.1 Veränderung der pharmakokinetischen Parameter durch die Molekulargewichtserweiterung des DIPs

Vergleicht man die Blutspiegelkurven des modifizierten und des unveränderten DIPs miteinander, dann ist eine deutliche Verlängerung der Aufenthaltszeit des DIP-2(PEG5kD) im Blut zu beobachten (Abb. 11). Das DIP verteilt sich mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2\alpha} = 2,5$ min (Tab. 4). Die Verteilungshalbwertszeit des zweifach PEGylierten DIP ist mit 17,5 min (Tab. 6) auf das siebenfache erhöht. Die Eliminationshalbwertszeit steigt von $0,60 \pm 0,32$ h bei DIP auf $2,36 \pm 0,44$ h bei DIP-2(PEG5kD) an. Eine Steigerung um das fünffache ist beim Vergleich der AUC in den ersten 3 h zu beobachten. Berechnet man die $AUC_{0-\infty}$, dann vervielfacht sich der Wert sogar auf das neunfache ($0,87 \pm 0,25$ $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ bei DIP vs. $7,96 \pm 1,12$ $\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$ bei DIP-2(PEG5kD)).

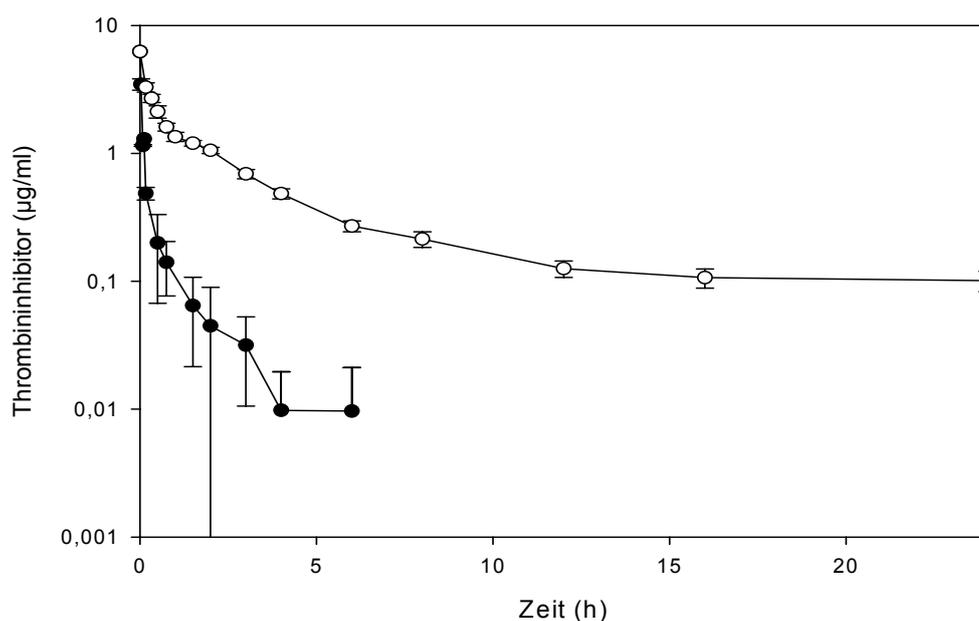


Abb. 11 Blutspiegelverlauf des DIP (-●- n=3) und des DIP-2(PEG5kD) (-○- n=5) in unbehandelten Ratten nach Applikation von 0,5 mg/kg KG des Thrombininhibitors

3.3.4.2 Pharmakokinetik des DIPs in An- und Abwesenheit von AK gegen das DIP

Die pharmakokinetischen Untersuchungen wurden mit den Dosen 0,5 mg/kg KG und 1 mg/kg KG DIP durchgeführt. Den Ratten wurden unterschiedliche AG intracutan in die Nackenhaut injiziert (Konfektionierung) oder es fand vor Aufnahme der Pharmakokinetik keine Behandlung statt. Die Ratten, die 0,5 mg/kg KG DIP i.v. appliziert bekamen, wurden entweder vorher über fünf Wochen mit 0,5 mg/ml DIP und FA konfektioniert, oder es wurden unbehandelte Ratten zum Versuch verwendet (Abb. 12).

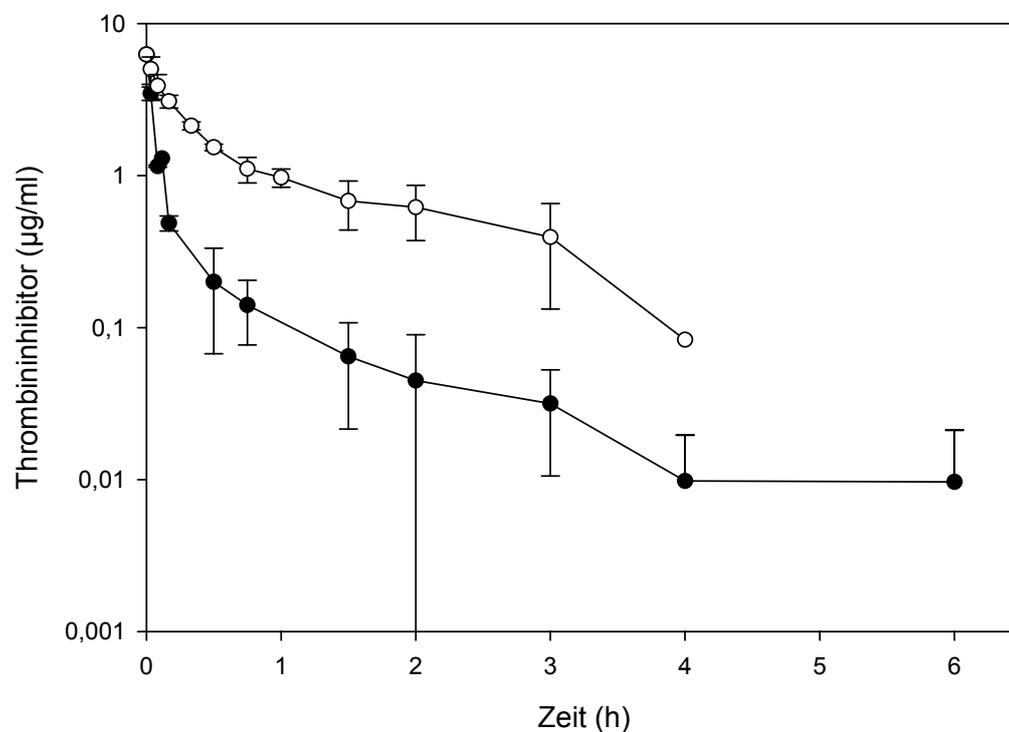


Abb. 12 Vergleich der Blutspiegelverläufe von 0,5 mg/kg KG DIP in An- und Abwesenheit von Antikörpern gegen DIP in Ratten

Die Tiere wurden vor der pharmakokinetischen Untersuchung entweder nicht konfektioniert (-●- n=3, keine AK) oder mit 0,5 mg/ml DIP und FA immunisiert (-○- n=2, Anwesenheit von AK gegen DIP).

Bei allen Blutspiegelverläufen ist eine anfängliche Verteilungsphase, gefolgt von einer Eliminationsphase zu beobachten. In der Verteilungsphase nimmt die Inhibitorkonzentration im Blut rasch ab. In den ersten 10 min nach i.v. Applikation von 0,5 mg/kg KG DIP sinkt die im Blut vorhandene Konzentration des DIPs von 6,25 mg/ml auf $0,49 \pm 0,06$ mg/ml in unbehandelten Tieren und auf $3,08 \pm 0,3$ in den immunisierten Ratten.

Nach i.v. Applikation von 1 mg/kg KG DIP sinkt der im Blut nachweisbare Spiegel des Inhibitors in den ersten 10 min von 12,5 mg/ml auf $1,09 \pm 0,07$ mg/ml bei

unbehandelten Ratten. Bei Ratten, die mit A. bidest und FA konfektioniert wurden, fällt der Wert auf $1,16 \pm 0,19$ mg/ml. Ein langsamerer Abfall auf $4,04 \pm 0,82$ mg DIP pro ml Blut in den ersten 10 min nach Bolusinjektion tritt bei den mit 0,5 mg/ml DIP und FA immunisierten Ratten auf (Abb. 13).

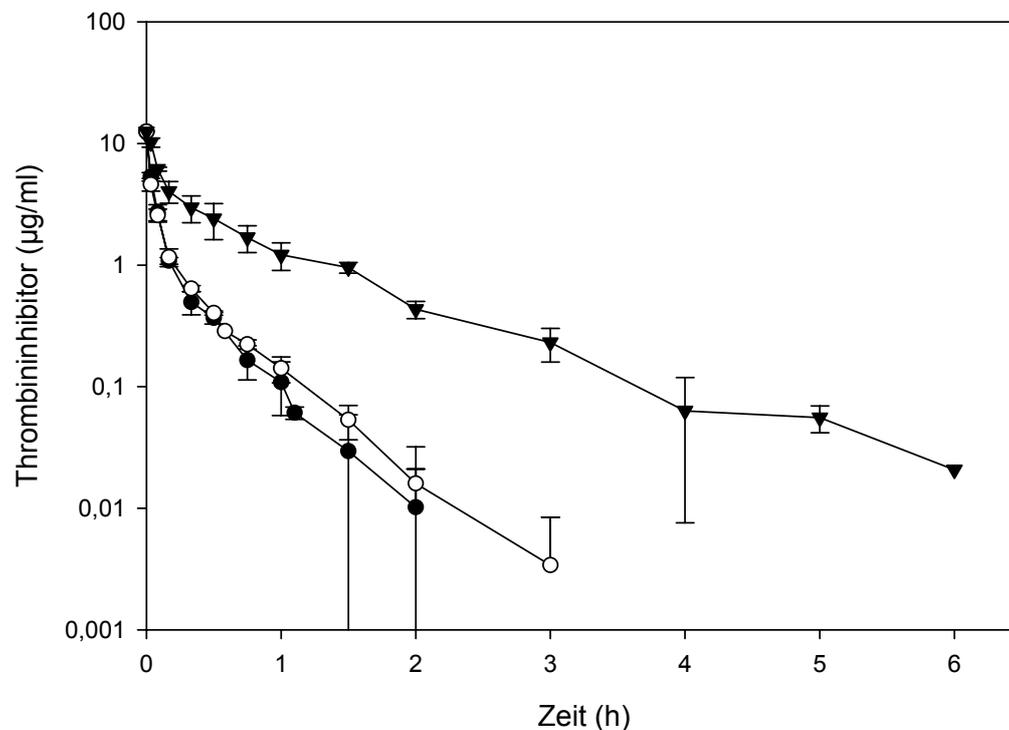


Abb. 13 Vergleich der Blutspiegelverläufe nach Applikation von 1 mg/kg KG DIP in An- und Abwesenheit von Antikörpern gegen DIP in Ratten

Die Tiere wurden vor der pharmakokinetischen Untersuchung entweder nicht konfektioniert (-●- n=5, keine AK), mit A. bidest und FA behandelt (-○- n=4, keine AK) oder mit 0,5 mg/ml DIP und FA immunisiert (-▼- n=4, Anwesenheit von AK gegen DIP).

Die Anwesenheit der AK verändert die Pharmakokinetik. Bei beiden untersuchten Dosen steigt die Verteilungshalbwertszeit auf das 2- bis 3,2-Fache von 2,5-3 min auf 6-8 min. Die Verdopplung der Eliminationshalbwertszeiten und eine Zunahme um den Faktor 2,3-3,7 ist bei den $AUC_{0-\infty}$ -Werten zu beobachten. Der Mikroparameter k_{12} sinkt auf einen Wert von $3,42 \pm 1,42$ h⁻¹ bzw. $3,28 \pm 0,8$ h⁻¹, wobei der k_{21} -Wert konstant bleibt. Dies führt zu einer Abnahme des Wertes des Quotienten, d.h. das Verhältnis der Konzentration im peripheren Kompartiment zu der im zentralen Kompartiment nimmt ab. Die Eliminationsgeschwindigkeit aus dem zentralen Kompartiment sinkt auf ein Viertel bzw. ein Fünftel des Vergleichswertes in Tieren, die keine AK gegen das DIP gebildet haben. Die veränderten pharmakokinetischen Parameter sind in Tab. 4 und Tab. 5 im Vergleich zu den Daten aus Ratten ohne AK gegen das DIP dargestellt.

	ohne Behandlung	0,5 mg/ml DIP (AK-Bildung)
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,0419 ± 0,0075	0,1330 ± 0,0631
$t_{1/2\beta}$ (h)	0,6041 ± 0,3189	1,2422 ± 0,6606
α (h^{-1})	16,9108 ± 2,9222	5,8732 ± 2,7876
β (h^{-1})	1,5631 ± 1,1824	0,6499 ± 0,3456
A ($\mu\text{g/ml}$)	6,0536 ± 0,2794	6,151 ± 0,4706
B ($\mu\text{g/ml}$)	0,4451 ± 0,0763	2,1064 ± 0,2164
k_{12} (h^{-1})	6,9431 ± 4,5977	3,4244 ± 1,4247
k_{21} (h^{-1})	2,6419 ± 0,8532	2,6543 ± 1,4341
k_{13} (h^{-1})	8,9853 ± 3,8469	1,4385 ± 0,6701
AUC(0-3) ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	0,7984 ± 0,1043	3,2704 ± 0,9907
AUC(0- ∞) ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	0,8737 ± 0,2452	4,1770 ± 1,9890
V_c (l/kg)	0,08	0,08
V_{dss} (l/kg)	0,3202 ± 0,1744	0,1873 ± 0,0150
Cl_{tot} (ml/h/kg)	576,55 ± 286,3184	135,0120 ± 64,2913

Tab. 4 Pharmakokinetische Parameter des DIP (0,5 mg/kg KG)

Verwendet wurden unbehandelte (n=3) und mit 0,5 mg/ml DIP und FA konfektionierte (n=2) Ratten.

	keine AK im Blut vorhanden		
	keine Behandlung	konf. mit A. bidest und FA	konf. mit 0,5 mg/ml DIP und FA
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,0439 ± 0,0123	0,0540 ± 0,0196	0,1034 ± 0,0234
$t_{1/2\beta}$ (h)	0,3066 ± 0,1247	0,4088 ± 0,1292	0,7646 ± 0,1683
α (h^{-1})	16,6493 ± 3,7556	14,1600 ± 4,8469	6,9274 ± 1,3203
β (h^{-1})	2,6855 ± 1,3574	1,8269 ± 0,5198	0,9489 ± 0,2575
A ($\mu\text{g/ml}$)	11,4158 ± 0,4527	10,7659 ± 1,2327	11,7718 ± 0,6364
B ($\mu\text{g/ml}$)	1,4921 ± 0,9181	1,2102 ± 0,3861	3,4705 ± 1,0343
k_{12} (h^{-1})	4,6638 ± 1,6932	4,4719 ± 2,7223	3,2814 ± 0,7965
k_{21} (h^{-1})	4,4529 ± 2,5246	2,9448 ± 0,8775	2,7532 ± 0,6557
k_{13} (h^{-1})	10,2704 ± 2,5099	8,7430 ± 2,7289	2,3987 ± 0,5687
AUC(0-3) ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	nicht bestimmt	1,2876 ± 0,3656	4,2555 ± 1,0999
AUC(0- ∞) ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	1,1084 ± 0,3063	1,3232 ± 0,4002	4,5446 ± 1,2807
V_c (l/kg)	0,08	0,08	0,08
V_{dss} (l/kg)	0,1808 ± 0,0485	0,2042 ± 0,0676	0,1801 ± 0,0373
Cl_{tot} (ml/h/kg)	949,1879 ± 209,3662	806,9039 ± 214,7716	230,7922 ± 50,8930

Tab. 5 Pharmakokinetische Parameter des DIP (1 mg/kg KG)

Die Untersuchungen wurden an unbehandelten (n=5), mit A. bidest und FA konfektionierten (n=4) und mit 0,5 mg/ml DIP und FA behandelten (n=4) Ratten durchgeführt.

3.3.4.3 Pharmakokinetik des DIP-2(PEG5kD)s in An- und Abwesenheit von AK gegen DIP bzw. DIP-2(PEG5kD)

In Abb. 14 ist die Konzentration des zweifach PEGylierten DIPs als Funktion der Zeit halblogarithmisch dargestellt. Das DIP-2(PEG5kD) (Dosis: 0,5 mg/kg KG) wurde an vier Gruppen von Ratten untersucht:

Gruppe 1: ohne Konfektionierung

Gruppe 2: Konfektionierung mit A. bidest und Freund'schem Adjuvans

Gruppe 3: Konfektionierung mit 0,5 mg/ml DIP und Freund'schem Adjuvans

Gruppe 4: Konfektionierung mit 0,5 mg/ml DIP-2(PEG5kD) und Freund'schem Adjuvans

Den Ratten der Gruppe 1 und 2 ist gemeinsam, dass sie keine AK gegen DIP oder DIP-2(PEG5kD) in ihrem Blut haben. Die pharmakokinetischen Parameter beider Gruppen sind sehr ähnlich (Tab. 6), und auch in der graphischen Darstellung des Inhibitorblutspiegels ist eine Übereinstimmung zu beobachten.

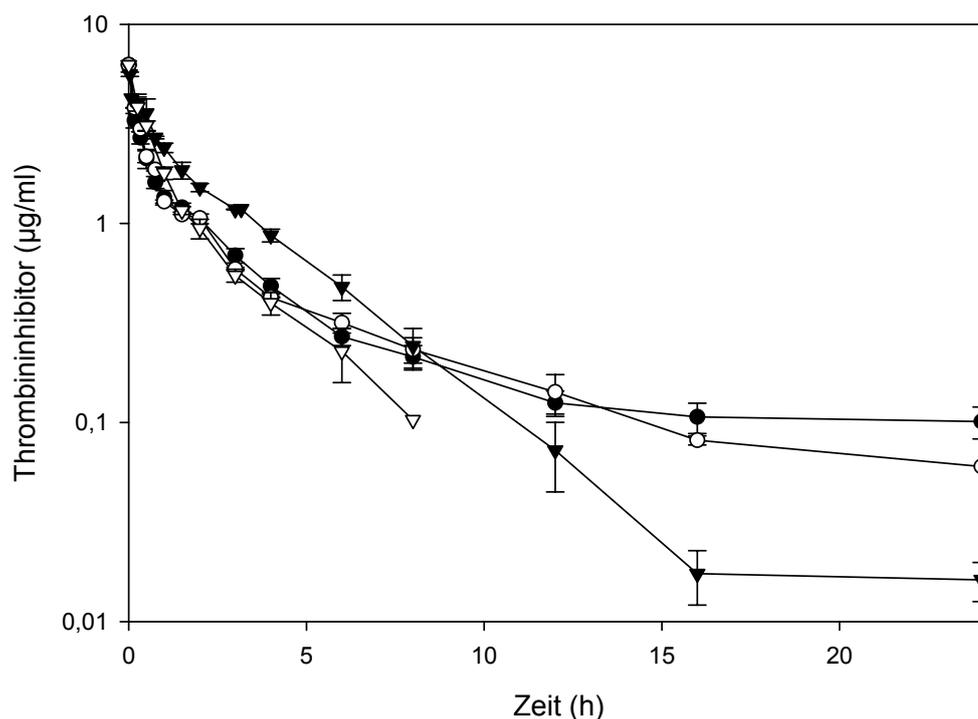


Abb. 14 Vergleich der Blutspiegelverläufe von 0,5 mg/kg KG DIP-2(PEG5kD) in An- und Abwesenheit von Antikörpern gegen DIP bzw. DIP-2(PEG5kD) in Ratten

Die Tiere wurden vor der pharmakokinetischen Untersuchung entweder nicht konfektioniert (-●- n=5, keine AK), mit A. bidest und FA behandelt (-○- n=2, keine AK), mit 0,5 mg/ml DIP und FA immunisiert (-▼- n=3, Anwesenheit von AK gegen DIP) oder mit 0,5 mg/kg KG DIP-2(PEG5kD) und FA konfektioniert (-▽- n=3, Anwesenheit von AK gegen DIP-2(PEG5kD)).

In Gegenwart der AK gegen DIP (Gruppe 3) und AK gegen DIP-2(PEG5kD) (Gruppe 4) erhöht sich die anfängliche Verteilungshalbwertszeit von ca. 0,3 h auf

0,46 ± 0,16 h bei den Tieren der Gruppe 3 bzw. auf 0,51 ± 0,06 h bei den Ratten, die mit 0,5 mg/ml DIP-2(PEG5kD) und FA immunisiert wurden. Die Eliminationshalbwertszeit des Pharmakons ist in Ratten mit AK im Blut im Vergleich zu den Tieren ohne AK kleiner. Die Bindung der AK an das DIP-2(PEG5kD) erschwert den Übergang vom zentralen in das periphere Kompartiment. Dies belegt die um den Faktor 1,4-1,7 (bei Gruppe 3) bzw. 2,7-3,3 (bei Gruppe 4) kleinere Geschwindigkeitskonstante k_{12} . Weitere Einflüsse der AK auf die Kinetik des Inhibitors zeigt sich auch in der gesunkenen Eliminationsgeschwindigkeit aus dem zentralen Kompartiment.

	keine AK-Bildung		AK gegen DIP	AK gegen DIP-2(PEG5kD)
	ohne Behandlung	konf. mit A. bidest und FA	konf. mit 0,5 mg/ml DIP und FA	konf. mit 0,5 mg/ml DIP-2(PEG5kD) und FA
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0,2918 ± 0,0274	0,3383 ± 0,0324	0,4591 ± 0,1642	0,5051 ± 0,0568
$t_{1/2\beta}$ (h)	2,3557 ± 0,4449	2,8689 ± 0,5298	2,2688 ± 0,3424	1,6459 ± 0,1019
α (h^{-1})	2,3907 ± 0,2071	2,0583 ± 0,1969	1,6335 ± 0,5259	1,3843 ± 0,1587
β (h^{-1})	0,3041 ± 0,0663	0,2458 ± 0,0454	0,3108 ± 0,0468	0,4222 ± 0,0257
A ($\mu\text{g/ml}$)	5,9604 ± 0,3663	5,8843 ± 0,0739	5,9858 ± 0,3551	6,0164 ± 0,2733
B ($\mu\text{g/ml}$)	1,8576 ± 0,3670	1,4299 ± 0,2237	3,1423 ± 0,2752	2,4507 ± 0,0906
k_{12} (h^{-1})	1,2306 ± 0,1220	1,0088 ± 0,1028	0,7361 ± 0,3097	0,3673 ± 0,0704
k_{21} (h^{-1})	1,0052 ± 0,2371	0,7061 ± 0,1643	1,1394 ± 0,3594	0,9475 ± 0,0462
k_{13} (h^{-1})	0,7244 ± 0,0487	0,7189 ± 0,0335	0,4578 ± 0,0793	0,6163 ± 0,0666
AUC(0-3) ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	4,6966 ± 0,1642	4,6234 ± 0,0509	6,8159 ± 0,1745	5,4211 ± 0,3719
AUC(0-∞) ($\mu\text{g/ml}\cdot\text{h}$)	7,9557 ± 1,1245	7,9541 ± 0,4885	10,6996 ± 1,1498	7,0773 ± 0,6777
V_c (l/kg)	0,08	0,0800	0,08	0,08
V_{dss} (l/kg)	0,1812 ± 0,0188	0,1961 ± 0,0154	0,1303 ± 0,0066	0,1109 ± 0,0051
Cl_{tot} (ml/h/kg)	63,7688 ± 8,2003	62,9799 ± 3,8682	47,0885 ± 5,0026	71,0765 ± 6,7105

Tab. 6 Pharmakokinetische Parameter des DIP-2(PEG5kD) (0,5 mg/kg KG)

Die Tiere wurden mit A. bidest und FA (n=2), mit 0,5 mg/ml DIP und FA (n=3), mit 0,5 mg/ml DIP-2(PEG5kD) und FA (n=3) konfektioniert oder keiner Behandlung (n=5) unterzogen.

3.3.4.4 Antikörper-Bildung in An- und Abwesenheit von Freund'schem Adjuvans

In Voruntersuchungen wurde der Einfluss des Adjuvans auf die Antikörperbildung bestimmt. Die Ergebnisse (nicht gezeigt) zeigen, dass sowohl das Antigen als auch das Adjuvans den Tieren appliziert werden müssen, um die Körper zur AK-Bildung zu veranlassen. Wurde den Ratten der Inhibitor ohne das Freund'sche Adjuvans über den Konfektionierungszeitraum wöchentlich intracutan in den Nacken appliziert, waren die Ergebnisse der anschließenden pharmakologischen Untersuchungen mit denen von unbehandelten bzw. mit denen mit A. bidest und FA immunisierten Ratten gleich und unterschieden sich von den Ergebnissen der Tiere, die neben dem AG das Adjuvans verabreicht bekamen.

3.3.4.5 Nachweis der Inhibitoren im Urin

Während der pharmakokinetischen Untersuchungen wurde nicht nur der Blutspiegelverlauf der Inhibitoren verfolgt, sondern auch die in den gesammelten Urinproben auftretende Inhibitormenge. Die Ratten wurden bis zur letzten messbaren Inhibitormenge im Blut mit Diureselösung behandelt. Das Sammeln der Urinproben wurde zwei Stunden nach Diurese-Stopp eingestellt. Der Nachweis der Inhibitoren wurde mittels ECT durchgeführt (und in Proteinkonzentrationen umgerechnet). Die erhaltenen Werte wurden als kumulative renale Elimination als Funktion der Zeit graphisch dargestellt (Abb. 15 und Abb. 16).

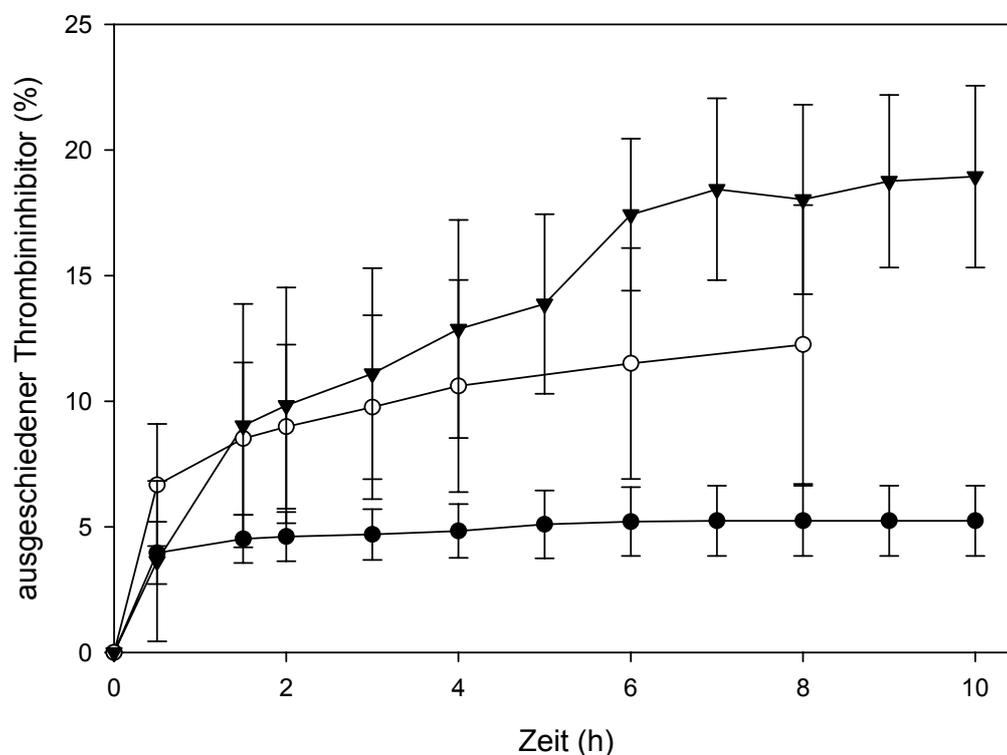


Abb. 15 Kumulative Ausscheidung von DIP im Urin von Ratten

Vor der Applikation des Thrombininhibitors wurden die Ratten entweder keiner Konfektionierung unterzogen (-●- n=5), mit A. bidest und FA (-○- n=4) oder mit 0,5 mg/kg KG DIP und FA konfektioniert (-▼- n=4).

In Abb. 15 ist der Verlauf der im Urin nachgewiesenen DIP-Menge kumulativ dargestellt. In Abwesenheit von AK gegen DIP können 5-12 % der applizierten Antithrombinaktivität im Urin nachgewiesen werden. Sind Antikörper im Blut vorhanden, dann steigt der aktive Anteil des renal ausgeschiedenen Antithrombins bis zu 18 % an.

Im Falle des DIP-2(PEG5kD) sind in unbehandelten Tieren $25,77 \pm 7,72$ % und in mit A. bidest und FA konfektionierten Ratten $26,39 \pm 11,58$ % der applizierten Antithrombin-Dosis im Urin wieder gefunden worden (Abb. 16). Die Präsenz von AK gegen DIP führt zu keinem veränderten Ausscheidungsprofil des DIP-

2(PEG5kD)s. $23,75 \pm 6,55$ % kumulativ über die Nieren ausgeschiedenes DIP-2(PEG5kD) entspricht den Werten der Ratten, die keine AK gegen den Inhibitor hatten und 0,5 mg/kg KG DIP-2(PEG5kD) appliziert bekamen. Die nachweisbare Menge an Inhibitor nimmt mit dem Vorhandensein der AK gegen DIP-2(PEG5kD) auf bis zu 60 % zu.

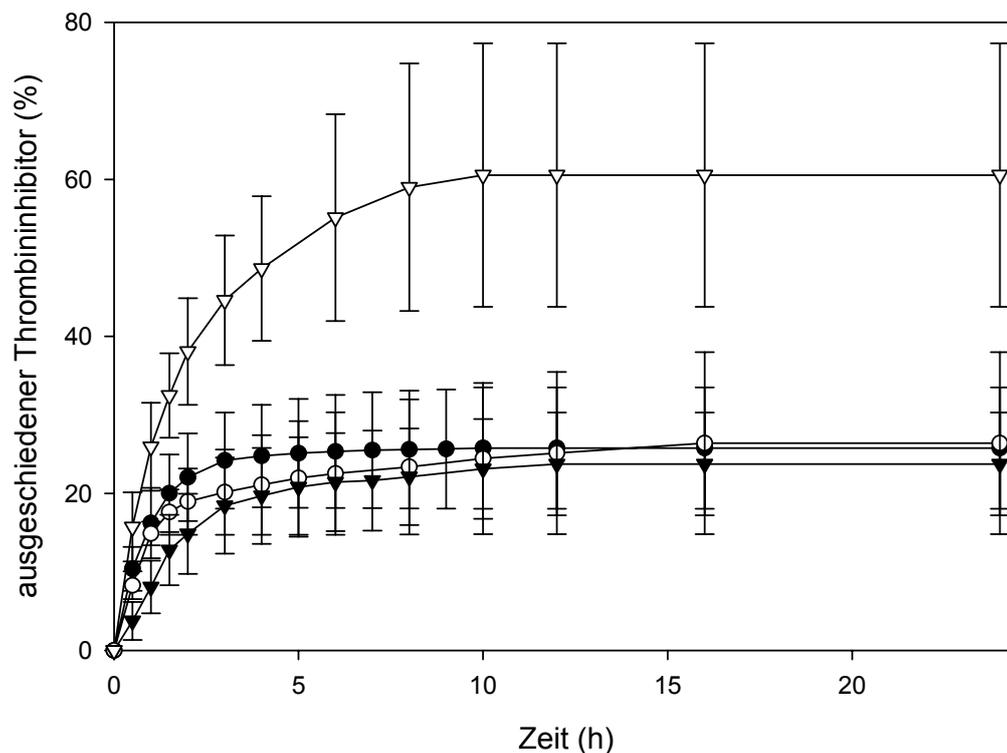


Abb. 16 Kumulative Ausscheidung von DIP-2(PEG5kD) im Urin von Ratten

Vor der Applikation des Thrombininhibitors wurden die Ratten entweder keiner Konfektionierung unterzogen (-●- n=5), mit A. bidest und FA (-○- n=2), mit 0,5 mg/kg KG DIP und FA (-▼- n=3) oder mit 0,5 mg/kg KG DIP-2(PEG5kD) und FA konfektioniert (-▽- n=3).

3.3.4.6 Vergleich der direkten und indirekten Nachweismethode zur Antikörperbestimmung

Aus den Ergebnissen beider Methoden den Nachweis zu erbringen, dass eine AK-Bildung stattgefunden hat oder nicht, ist ohne weiteres möglich. Betrachtet man die Methoden einzeln, ist zu beachten, dass der direkte Nachweis mittels Dot Blot keine quantitative Aussage über die AK-Spiegel zulässt. Die indirekte Methode über die Änderung der pharmakokinetischen Parameter und das Ausscheidungsverhalten (Immunpharmakokinetik) zur Beantwortung einer möglichen Immunreaktion setzt immer eine vorherige Bestimmung der pharmakokinetischen Daten in Abwesenheit der AK voraus.

4 Diskussion

Thrombin, das Schlüsselenzym der Hämostase, ist ein Hauptziel in der medikamentösen Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Erkrankungen. Mit den bisher vorrangig eingesetzten Pharmaka (Heparine und Cumarinderivate) wird die Aktivität des Thrombins indirekt gehemmt. Der Einsatz der indirekten Antikoagulantien ist mit verschiedenen Nachteilen verbunden, die die Anwendung limitieren. Die Wirkung der Cumarinderivate erfolgt über die unvollkommene Synthese der Gerinnungsfaktoren. Hierbei tritt die Hemmung der Gerinnung nicht gleich ein. Zur erfolgreichen Anwendung des Heparins ist die Gegenwart von körpereigenen Kofaktoren, vor allem Antithrombin III, nötig. Im Vergleich dazu führt der Einsatz von direkten Inhibitoren zu einer raschen Hemmwirkung des Thrombins, ist zudem unabhängig von Kofaktoren und hat dadurch einen „Spareffekt“ auf die natürlichen antithrombotischen Mechanismen.

Im Laufe der Evolution spezialisierten sich einige Tierarten auf den Verzehr von frischem Blut. Die vor allem aus Insekten, Würmern und niederen Invertebraten bestehende Gruppe der blutsaugenden Organismen setzt dem Blut gerinnungshemmende Substanzen zu. Unter diesen Hemmstoffen sind die stärksten direkten Thrombininhibitoren zu finden.

Der am meisten untersuchte natürlich vorkommende Thrombininhibitor ist das Hirudin aus dem medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis*. Das Protein mit einem Molekulargewicht von 7 kD wurde 1957 von F. Markwardt sehr aufwändig aus Blutegel-Kopfextrakten gereinigt. Hirudin ist ein spezifischer *slow, tight-binding* Inhibitor der Serinprotease Thrombin. Der Einsatz moderner gentechnologischer Methoden machte die Produktion von rekombinantem Hirudin (r-Hirudin) in größeren Mengen möglich, was eine Voraussetzung zur Anwendung in der Therapie war.

Eine rekombinante Form des aus der blutsaugenden Raubwanze *Dipetalogaster maximus* stammenden Thrombininhibitors, r-Dipetalogastin II, erreichte in pharmakokinetischen Studien einen K_i -Wert von 49 fM (Mende *et al.* 1999). Vergleicht man die Aktivität mit der von r-Hirudin (217 fM), ist das r-Dipetalogastin II ein stärkerer Inhibitor des Thrombins, allerdings hat es einige Einschränkungen. In hohen Konzentrationen inhibiert das Protein auch die Serinproteasen Plasmin und Trypsin und hat ein höheres Molekulargewicht von 12,9 kD (Mende *et al.* 1999). Der Inhibitor gehört strukturell zu den Kazal-Typ Inhibitoren, die zwei Krin-

gel-Domänen besitzen. Diese doppelt glomeruläre Struktur des Dipetalogastin II zeigt eine hoch immunogene Form, die die Produktion von AK induzieren könnte.

Um die Schwachstellen der Proteinketten zu umgehen, wurde ein chimärer Thrombininhibitor aus dem N-Terminus des r-Dipetalogastin II und dem C-terminalen Bereich des Hirudins konstruiert. Beide Proteinketten sind über einen Glycin-Linker miteinander verbunden. Das entstandene Produkt Dipetarudin hat ein Molekulargewicht von 7450 Da und einen K_i -Wert von 399 fM (López *et al.* 2007). Das Dipetarudin ist, wie seine „Eltern“, ein bivalenter Thrombininhibitor. Es bindet mit dem C-Terminus (Hirudin-Anteil) an die ABE I und mit dem N-Terminus (Dipetalogastin II-Anteil) an das aktive Zentrum des Thrombins, wodurch dieses sehr effektiv gehemmt wird. In pharmakokinetischen Experimenten an Ratten konnte die Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeit des Dipetarudins bestimmt werden. Nach einer anfänglichen Verteilungsphase ($t_{1/2\alpha} = 3-4$ min) geht die Inhibitor-Blutspiegelkurve in die Eliminationsphase über. Während dieser Zeit wird das Protein mit einer Eliminationshalbwertszeit von 35 min aus dem Körper entfernt (López *et al.* 2004). Zur Verlängerung der Eliminationshalbwertszeit wurde das DIP an das Polymer PEG gekoppelt. Die Größenzunahme des Proteins führte wie erwartet zu einer Veränderung der Halbwertszeiten. Die $t_{1/2\alpha}$ stieg auf 0,3 h an, während sich die $t_{1/2\beta}$ um das 4- bis 5-fache erhöhte. López *et al.* veröffentlichten 2004, dass das Verhältnis k_{12}/k_{21} beim Dipetarudin 2 beträgt. Durch einen schnelleren Transport des Inhibitors aus dem zentralen Kompartiment in das periphere Kompartiment als andersherum entsteht ein Depot des DIP im peripheren Kompartiment. Das Verteilungsverhältnis des DIP-2(PEG5kD) zwischen den beiden Kompartimenten unterscheidet sich von DIP. Durch eine Abnahme des Quotienten k_{12}/k_{21} von 2 auf 0,2-1 ist die Konzentration des Thrombininhibitors im zentralen Kompartiment gleich bzw. höher als im peripheren Kompartiment.

Aus früheren Untersuchungen an nephrektomierten Ratten ist bekannt, dass das DIP ausschließlich über die Nieren aus dem Körper ausgeschieden wird (López *et al.* 2005). Im Urin der Ratten finden sich nur bis zu 10 % der applizierten Antithrombinmenge wieder. Im proximalen Tubulus der Rattennieren sind Metalloproteasen (z.B. Meprin) lokalisiert. Diese Proteasen degradieren, während der Urin die Tubuluszellen passiert, den Inhibitor, sodass nur noch eine geringe Menge von Antithrombin im Urin nachzuweisen ist.

Eine der wesentlichen Aufgaben dieser Arbeit war die *in-vivo*-Untersuchung der Immunogenität des DIP und einer modifizierten Form, des DIP-2(PEG5kD). Nach

erfolgreicher Darstellung und Aufreinigung des DIP wurde dieses PEGyliert und gereinigt und dieses ebenso für die immunpharmakokinetischen und immunologischen Untersuchungen verwendet.

Die immunogenen Eigenschaften des DIP nach der Kopplung zweier PEG5kD-Moleküle an das Protein wurde im Modellsystem Legehennen getestet. Kommt der aviäre Organismus mit Antigenen in Kontakt, bildet sich IgY, das Funktionshomologon des Säuger-IgG (Warr *et al.* 1995). Vor dem Kontakt der Legehennen mit dem zu untersuchenden AG waren keine AK gegen die AG in den Eiern der Tiere vorhanden. Nach der Immunisierung (mittels Freund'schem Adjuvans) konnte die AK-Bildung sowohl gegen das DIP als auch gegen das DIP-2(PEG5kD) beobachtet werden. Die AK erkannten nicht nur das verabreichte AG, sondern alle Formen des DIPs. Daraus lässt sich schließen, dass die AG-sensiblen Epitope in beiden Molekülen unverändert vorhanden sind und durch die PEGylierung nicht maskiert werden. Eine Eigenwirkung des PEG-Moleküls als Antigen konnte durch die Applikation von hydrolysiertem PEG5kD ausgeschlossen werden.

Eine Aussagekraft über eine mögliche Beeinflussung der Immunantwort nach der PEGylierung ist somit bei diesem Modellsystem nicht gegeben. Ein Grund für die AK-Bildung trotz PEGylierung könnte die evolutionäre Distanz zwischen der Raubwanze, dem Blutegel und der Legehennen sein. Je weiter die Spezies phylogenetisch voneinander entfernt sind, desto eher entwickeln sich AK gegen die Fremdproteine (Cook *et al.* 2001). Anwendung findet dieses Wissen bei der Produktion von AK in Legehennen gegen hoch-konservierte Säuger-AG. AK gegen weit verbreitete AG aus Säugern in Säugern bilden zu lassen, hat sich als schwierig herausgestellt (Gassmann *et al.* 1990), und so werden die AK in verwandtschaftlich weiter entfernten Arten produziert. Nach der Immunisierung stellt die Eiablage der Legehennen eine kontinuierliche, effektive, nicht-invasive Methode der Probensammlung dar (Schade *et al.* 1992 und 2005).

Die von den immunisierten Hennen produzierten und aus den Eiern aufgereinigten IgY könnten allerdings im Labor Verwendung finden. Immobilisierte AK könnten an das DIP oder das DIP-2(PEG5kD) binden und so die Thrombininhibitoren aus Lösungen isolieren. Außerdem bietet diese Vorgehensweise eine einfache Möglichkeit, AK gegen PEGylierte Proteine zu bilden. Dies kann normalerweise durch die Herabsetzung der Immunogenität durch das PEG erschwert bzw. verhindert sein (Abuchowski *et al.* 1977).

Die Hypothese, dass durch die Kopplung von PEG-Ketten an das DIP dessen Immunogenität herabgesetzt wird oder sogar verschwindet, wurde zusätzlich an

Wistar-Ratten untersucht. Der Nachweis der AK-Präsenz im Blut erfolgte durch zwei Methoden.

Das direkte Nachweissystem mittels Dot Blot zeigte die Bildung von AK gegen das DIP und das DIP-2(PEG5kD), wenn während der Konfektionierung simultan mit dem AG Freund'sches Adjuvans injiziert wurde. Die Anti-DIP AK erkannten nicht nur das DIP, sondern auch seine zweifach PEGylierte Form. Die Epitope sind durch die PEGylierung nicht maskiert und werden von den AK erkannt und gebunden. Nach Abuchowski *et al.* (1977) unterdrückt die Kopplung der PEG-Ketten die Immunogenität des Proteins. In der vorliegenden Untersuchung sind Anti-DIP-2(PEG5kD) AK nachzuweisen, die aber nicht an das DIP binden. Dieses Phänomen wurde bereits von Tsuji *et al.* 1985 beschrieben. Nach der PEGylierung verschwindet die ursprüngliche Immunogenität gegen das native Protein, aber eine neue Immunogenität entsteht. Diese ist gegen neu entstandene Epitope gerichtet (partielle Denaturierung des Proteins oder chemische Spacer zwischen dem Protein und dem Polymer), die sich von denen im nativen Protein unterscheiden. Diese Resultate zeigen, dass die PEGylierung die Immunogenität des DIP herabsetzt, aber gleichzeitig ein neue Immunogenität gegen die PEGylierte Form induziert. Dieser Umstand könnte eventuell durch einen anderen Syntheseweg beseitigt werden. Die Wahl der Kopplungsreagenzien und Syntheseschritte beeinflusst die immunogenen Eigenschaften des entstehenden Protein-Polymer-Konjugates dramatisch (Francis *et al.* 1998).

Wurden die Tiere unter den gleichen Bedingungen, aber ohne das FA konfektioniert, war die Bildung von AK gegen Dipetarudin nicht zu beobachten. Aus diesen Befunden ergibt sich, dass die Präsenz des putativen AG alleine nicht ausreicht, um in Wistar-Ratten AK zu produzieren.

Die Untersuchung der Veränderung der Pharmakokinetik der Thrombininhibitoren in konfektionierten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Ratten (Immunpharmakokinetik) stellt eine indirekte Nachweismethode für AK dar. Die im Blut vorhandenen AK zeigten keine neutralisierenden Eigenschaften, aber erhöhten die Verweildauer der im Blut vorhandenen aktiven DIP-Varianten. Die Präsenz der AK führte zu einer Verlängerung der Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten, zur Abnahme der Mikroparameter k_{12} und k_{13} , zur Erhöhung der AUC-Werte und zur Abnahme der "total Clearance". Dies erfolgte sowohl bei DIP als auch bei DIP-2(PEG5kD). Die an die AK-gebundenen aktiven DIP bzw. DIP-2(PEG5kD)-Moleküle stellen eine Form von „Depot im Intravasalraum“ dar und zeigen damit eine verlängerte Effektivität bei der Anwendung als Antithrombotika. Dieses Phänomen wurde bereits in einem klinischen Fallbericht von Harenberg *et*

al. 2000 beschrieben. Ein HIT-Patient, der zur Therapie r-Hirudin bekam, entwickelte gegen das r-Hirudin Antikörper. Wegen Unverträglichkeitsreaktionen musste das r-Hirudin abgesetzt und durch PEG-Hirudin ersetzt werden. Nach Applikation des PEG-Hirudins war eine höhere Plasmakonzentration als erwartet zu beobachten. Das PEG-Hirudin ist mit den Anti-Hirudin-AK eine Bindung eingegangen und war so länger im Organismus vorhanden.

Zusätzlich zum Einfluss auf die immunologischen Eigenschaften des DIP konnten auch andere Effekte der PEGylierung beobachtet werden, wie z.B. Abbauschutz und längere Aufenthaltszeit des Inhibitors im Körper. Die Kopplung der zwei PEG5kD-Ketten an das DIP beeinflusste die pharmakokinetischen Eigenschaften des Thrombininhibitors positiv. Die Verteilungshalbwertszeit erhöhte sich auf das siebenfache, die Eliminationshalbwertszeit stieg von $0,6 \pm 0,32$ h auf $2,35 \pm 0,45$ h an. Die Inhibitorkonzentration im zentralen und im peripheren Kompartiment ist gleich bzw. im zentralen Kompartiment höher als in der Peripherie. Der amphiphile Charakter der PEG-Moleküle erlaubt die Translokation aus dem Blut ins periphere Kompartiment und die Rückdiffusion ins Blut (Yamaoka *et al.* 1994). Die verlängerte Verweildauer der PEGylierten Form (neunfacher AUC-Wert) im Körper ist auch durch die verringerte Elimination aus dem zentralen Kompartiment (k_{13}) bedingt. Die Ausscheidung des Inhibitors erfolgt weiterhin ausschließlich über die Nieren. Die effektive Größe des DIP-2(PEG5kD) ist unter der Ausschlussgröße (unter 70 kD) (Knauf *et al.* 1988) und die molekularen Parameter scheinen auch unter der Porengröße der „glomerular basement membrane“ (3-5 nm) zu liegen (Ota 1980; Nakaoka *et al.* 1997). Der im Urin nachzuweisende Inhibitoranteil nimmt nach der PEGylierung zu. Die das Protein umgebende Hydrathülle hat demnach auch einen Einfluss auf die degradierenden Metalloproteasen im proximalen Tubulus. Die sterische Hinderung unterbindet, dass die Proteasen (z.B. Meprin) das DIP-2(PEG5kD) abbauen, was den höheren Anteil von Antithrombinaktivität im Urin erklärt.

Die PEGylierung stellt eine geeignete Methode zur Veränderung von pharmakokinetischen Parametern und immunologischen Eigenschaften von Proteinmolekülen dar. Die Aufenthaltsdauer des untersuchten Thrombininhibitors im Körper wird verlängert, wodurch die Anzahl der Applikationen verringert werden könnte. Die ursprüngliche Immunogenität des DIP konnte durch die PEGylierung herabgesetzt werden, wurde aber durch eine neue Immunogenität ersetzt. Die im Blut vorhandenen Antikörper zeigen keine negativen Eigenschaften (wie z.B. Neutralisierung des Pharmakons, Unverträglichkeit oder allergische Reaktio-

nen) im Hinblick auf die Anwendbarkeit beim Menschen. Die bei den Tieren erhaltene Immunogenität gegen das DIP und das DIP-2(PEG5kD) ist immer an die simultane Applikation von Freund'schem Adjuvans gekoppelt. In Abwesenheit des FA unterbleibt die Bildung der Antikörper. Richter & Åkerblom (1983) konnten in Studien auch die Bildung von AK nach der Applikation von PEG-Protein-Konjugaten in Mäusen ohne die Gabe von FCA beobachten. In einer anderen Untersuchung konnten sie zeigen, dass 0,2 % von unbehandelten menschlichen Individuen Anti-PEG AK im Blut haben. Bei Allergikern betrug dieser Wert sogar 3,3 % (Richter & Åkerblom 1984). Eine mögliche Erklärung der AK-Bildung könnte der Kontakt mit PEG oder eine Kreuzreaktion mit AK, die gegen andere Stimuli gerichtet sind, sein.

Die erhaltenen Daten schließen damit die Anwendbarkeit des DIP-2(PEG5kD) am Menschen als (Tumor)therapeutikum nicht aus. In Anwesenheit von AK wird ein großer Teil des Inhibitors in das periphere Kompartiment transloziert. Die Menge des aus dem zentralen in das periphere Kompartiment übergetretenen Thrombininhibitors ist im Vergleich zum DIP oder in Abwesenheit von AK stark gesenkt.

Edwards konnte 1999 zeigen, dass das Verteilungsvolumen und die Plasmaclearance / KG in unterschiedlichen Spezies (Maus, Ratte, Pavian und Chimpanze) sehr ähnlich sind. Die bei den Untersuchungen am Tier verwendeten Protokolle sind laut Edwards für klinische Studien am Menschen übertragbar (Edwards 1999).

5 Literatur

Abuchowski A., van Es T., Palczuk N. C., Davis F. F. (1976) Alteration of Immunological Properties of Bovine Serum Albumin by Covalent Attachment of Polyethylene Glycol. *J Biol Chem.* 252: 3578-3581

Akita E. M., Nakai S. (1993) Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods* 160: 207-214

Arni R. K., Padmanabhan K., Padmanabhan K. P., Wu T. P., Tulinsky A. (1993) Structure of the noncovalent complexes of human and bovine prothrombin fragment 2 with human PPACK-thrombin. *Biochemistry* 32: 4727-4737

Banner D. W., Hadváry P. (1991) Crystallographic Analysis at 3.0- Å Resolution of the Binding to Human Thrombin of Four Active Site-directed Inhibitors. *J Biol Chem.* 266: 20085-20093

Bergenströhle A., Heijbel A. (1999) One-step purification of IgM and IgY with HiTrap Purification columns. *Life Science News 3 Amersham Pharmacia Biotech*

Bock S. C. (2001) Antithrombin and Heparin Cofactor II. 321-333 in Colman R. W., Hirsh J., Marder V. J., Clowes A. W., George J. N., Hemostasis and thrombosis. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Bode W., Mayr I., Baumann U., Huber R., Stone S. R., Hofsteenge J. (1989) The refined 1.9-Å crystal structure of human α -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J* 8: 3467-3475

Bode W., Turk D., Karshikov A. (1992) The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human α -thrombin: Structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-funktion relationships. *Protein Sci* 1: 426-471

Cappiello M., Vilardo P. G., Del Corso A., Mura U. (1998) Hirunorms, Novel Hirudin-like Direct Thrombin Inhibitors. *Gen Pharmacol.* 30: 565-568

Cohen S., Yoshioka T., Lucarelli M., Hwang L. H., Langer R. (1991) Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres. *Pharm Res.* 8: 713-720

Colman R. W., Clones A. W., George J. N., Hirsh J., Marder V. J. (2001) Overview of Hemostasis. 3-16 in Colman *et al.*, Hemostasis and Thrombosis Basic principles and clinical practice. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Cook C. L., Pao W., Firca J. R., Anderson B. E., Fryer J. P. (2001) Simple Purification Methods for an α Galactose-Specific Antibody from Chicken Eggs. *J Biosci Bioeng* 91: 305-310

Dardik R., Savion N., Kaufmann Y., Varon D. (1998) Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. *Br J Cancer* 77: 2069-2075

Davie E. W., Fujikawa K., Kisiel W. (1991) The Coagulation Cascade: Initiation, Maintenance, and Regulation. *Biochemistry* 30: 10363-10370

Di Cera E., Dang Q. D., Ayala Y. M. (1997) Molecular mechanisms of thrombin function. *Cell Mol Life Sci.* 53: 701-730

DiMaio J., Gibbs B., Lefebvre J., Konishi Y., Munn D., Yue S. Y., Hornberger W. (1992) Synthesis of a homologous series of ketomethylene arginyl pseudodipeptides and application to low molecular weight hirudin-like thrombin inhibitors. *J Med Chem* 35: 3331-3341

Edwards C. K. 3rd (1999) PEGylated recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I (r-Hu-sTNF-RI): novel high affinity TNF receptor designed for chronic inflammatory diseases. *Ann Rheum Dis* 58: 73-81

Even-Ram S., Uziely B., Cohen P., Grisaru-Granovsky S., Maoz M., Ginzburg Y., Reich R., Vlodavsky I., Bar-Shavit R. (1998) Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med.* 4: 909-914

Even-Ram S., Maoz M., Pokroy E., Reich R., Katz B., Gutwein P., Altevogt P., Bar-Shavit R. (2001) Tumor Cell Invasion Is Promoted by Activation of Protease Activated Receptor-1 in Cooperation with the $\alpha_v\beta_5$ Integrin. *J Biol Chem.* 276: 10952-10962

Fenton J. W. 2nd, Olson T. A., Zabinski M. P., Wilner G. D. (1988) Anion-binding exosite of human alpha-thrombin and fibrin(ogen) recognition. *Biochemistry* 27: 7106-7112

Fenton J. W. 2nd, Witting J. I., Pouliott C., Fareed J. (1989) Thrombin anion-binding exosite interaction with heparin and various polyanions. *Ann N Y Acad Sci.* 556: 158-165

Francis G. E., Fisher D., Delgado C., Malik F., Gardiner A., Neale G. (1998) PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques. *Int J Hematol.* 68: 1-18

Friedrich T., Kröger B., Bialojan S., Lemaire H. G., Höffken H. W., Reuschenbach P., Otte M., Dodt J. (1993) A Kazal-type Inhibitor with Thrombin Specificity from *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem.* 268: 16216-16222

Fuentes-Prior P., Noeske-Jungblut C., Donner P., Schleuning W., Huber R., Bode W. (1997) Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Biochemistry* 94: 11845-11850

Gan Z., Li Y., Chen Z., Lewis S. D., Shafer J. A. (1994) Identification of Basic Amino Acid Residues in Thrombin Essential for Heparin-catalyzed Inactivation by Antithrombin III. *J Biol Chem.* 269: 1301-1305

Gassmann M., Thömmes P., Weiser T., Hübscher U. (1990) Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4: 2528-2532

Harenberg J., Hoffmann U., Huhle G., Song X. H., Wang L. C. (2000) Treatment of an acute flush reaction caused by subcutaneous r-Hirudin with pegylated hirudin. *Brit J Haematol* 108: 528-530

Hofsteenge J., Stone S. R. (1987) The effect of thrombomodulin on the cleavage of fibrinogen and fibrinogen fragments by thrombin. *Eur J Biochem.* 168: 49-56

Ishihara H., Connolly A. J., Zeng D., Kahn M. L., Zheng Y. W., Timmons C., Tram T., Coughlin S. R. (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502-506

Jenny N. S., Mann K. G. (2001) Coagulation Cascade: an Overview: 3-25 in Loscalzo *et al.*, Thrombosis and Hemorrhage. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Karpatkin S. (2003) Role of Thrombin in Tumor Angiogenesis, Implantation, and Metastasis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 33: 54-55

Knauf M. J., Bell D. P., Hirtzer P., Luo Z., Young J. D., Katre N. V. (1988) Relationship of Effective Molecular Size to Systemic Clearance in Rats of Recombinant Interleukin-2 Chemically Modified with Water-soluble Polymers. *J Biol Chem.* 263: 15064-15070

Krishnaswamy S., Church W. R., Nesheim M. E., Mann K. G. (1987) Activation of Human Prothrombin by Human Prothrombinase. *J Biol Chem.* 262: 3291-3299

Krishnaswamy S. (2005) Exosite-driven substrate specificity and function in coagulation. *J Thromb Haemost* 3: 54-67

Lane D. A., Philippou H., Huntington J. A. (2005) Directing thrombin. *Blood* 106: 2605-2612

Liu C. Y., Nossel H. L., Kaplan K. L. (1979) The binding of thrombin by fibrin. *J Biol Chem.* 254: 10421-10425

Liu L., Vu T. H., Esmon C. T., Coughlin S. R. (1991) The Region of the Thrombin Receptor Resembling Hirudin Binds to Thrombin and Alters Enzyme Specificity. *J Biol Chem.* 266: 16977-16980

Letai A., Kuter D. J. (1999) Cancer, Coagulation, and Anticoagulation. *Oncologist* 4: 443-449

Lombardi A., Nastri F., Morte R. D., Rossi A., De Rosa A., Staiano N., Pedone C., Pavone V. (1996) Rational Design of True Hirudin Mimetics: Synthesis and Characterization of Multisite-Directed α -Thrombin Inhibitors. *J Med Chem* 39: 2008-2017

López M., Mende K., Steinmetzer T., Nowak G. (2003) Cloning, purification and biochemical characterization of dipetarudin, a new chimeric thrombin inhibitor. *J Chromatogr B* 786: 73-80

López M., Nowak G. (2004) Special pharmacokinetics of dipetarudin suggests a potential antitumor activity of this thrombin inhibitor. *Anti-Cancer Drugs* 15: 145-149

López M. (2004) Biochemical and pharmacokinetic characterization of PEGylated forms of Dipetarudin. *Hämostaseologie* 24:

López M., Nowak G. (2005) Characterization of the urinary metabolites of dipetarudin. *J Chromatogr B* 821: 210-214

López M., Koehler A., Nowak G. (2007) High-level secretion of dipetarudin, a chimeric thrombin inhibitor, by *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 52: 8-13

MacFarlane S. R., Seatter M. J., Kanke T., Hunter G. D., Plevin R. (2001) Proteinase-Activated Receptors. *Pharmacol Rev* 53: 245-282

Maraganore J. M., Chao B., Joseph M. L., Jablonski J., Ramachandran K. L. (1989) Anticoagulant Activity of Synthetic Hirudin Peptides. *J Biol Chem.* 264: 8692-8698

Maraganore J. M., Bourdon P., Jablonski J., Ramachandran K. L., Fenton J. W. 2nd (1990) Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry* 29: 7095-7101

Markwardt F. (1975) Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. *Z Physiol Chem* 312: 85-89

Mateo C., Lombardero J., Moreno E., Morales A., Bombino G., Coloma J., Wims L., Morrison S. L., Perez R. (2000) Removal of amphipathic epitopes from genetically engineered antibodies: production of modified immunoglobulins with reduced immunogenicity. *Hybridoma* 19: 463-471

Mende K., Petoukhova O., Koulitchkova V., Schaub G. A., Lange U., Kaufmann R., Nowak G. (1999) Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect *Dipetalogaster maximus*. *Eur J Biochem* 266: 583-590

Nakaoka R., Tabata Y., Yamaoka T., Ikada Y. (1997) Prolongation of serum half-life period of superoxide dismutase by poly(ethylene glycol) modification. *J Control Release* 46: 253-262

Naski M. C., Fenton J. W., Maraganore J. M., Olson S. T., Shafer J. A. (1990) The COOH-terminal Domain of Hirudin an exosite-directed competitive inhibitor of the action of α -thrombin on fibrinogen. *J Biol Chem.* 265: 13484-13489

Nesheim M. (2006) Thrombin and Fibrinolysis. *Chest* 124: 33-39

Nierodzik M. L., Chen K., Takeshita K., Li J., Huang Y., Feng X., D'Andrea M. R., Andrade-Gordon P., Karpatkin S. (1998) Protease-Activated Receptor 1 (PAR-1) Is Required and Rate-Limiting for Thrombin-Enhanced Experimental Pulmonary Metastasis. *Blood* 92: 3694-3700

Nierodzik M. L., Karpatkin S. (2006) Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 10: 355-362

Nowak G., Bucha E. (1996) Quantitative Determination of Hirudin in Blood and Body Fluids. *Semin Thromb Hemost* 22: 197-202

Nowak G., López M., Zieger M. (2007) Thrombininduziertes Tumorwachstum. Pharmakologische Kontrolle. Hämostaseologie 27:

Okamoto S., Hijikata A. (1981) Potent inhibition of thrombin by the newly synthesized arginine derivative No. 805. The importance of stereostructure of its hydrophobic carboxamide portion. Biochem Biophys Res Commun 1012: 440-446

Ota Z., Makino H., Takaya Y., Ofuji T. (1980) molecular sieve in renal glomerular and tubular basement membranes as revealed by electron microscopy. Ren Physiol. 3: 317-323

Richter A. W., Åkerblom E. (1983) Antibodies against Polyethylene Glycol Produced in Animals by Immunization with Monomethoxy Polyethylene Glycol Modified Proteins. Int. Arch Allergy Immun. 70: 124-131

Richter A. W., Åkerblom E. (1984) Polyethylene Glycol Reactive Antibodies in Man: Titer Distribution in Allergic Patient Treated with Monomethoxy Polyethylene Glycol Modified Allergens or Placebo, and in Healthy Blood Donors. Int. Arch Allergy Immun. 74: 36-39

Roberts M. J., Bentley M. D., Harris J. M. (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. Adv Drug Deliver Rev. 54: 459-476

Rosenberg R. D. (1975) Action and interactions of antithrombin and heparin. N Engl J Med. 292: 146-151

Schade R., Schniering A., Hlinak A. (1992) Polyclonal avian antibodies extracted from egg yolk as an alternative to the production of antibodies in mammals – a review. ALTEX 9: 43-56

Schade R., Calzado E. G., Sarmiento R., Chacana P. A., Porankiewicz-Asplund J., Terzolo H. R. (2005) Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. Altern Lab Anim. 33: 129-154

Schenone M., Furie B. C., Furie B. (2004) The blood coagulation cascade. *Curr Opin Hematol* 11: 272-277

Seré K. M., Hackeng T. M. (2003) Basic Mechanisms of Hemostasis. *Semin Vasc Med* 3: 3-11

Sheehan J. P., Wu Q., Tollefsen D. M., Sadler J. E. (1993) Mutagenesis of Thrombin Selectively Modulates Inhibition by Serpins Heparin Cofactor II and Antithrombin III. *J Biol Chem.* 268: 3639-3645

Sheehan J. P., Sadler E. (1994) Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Biochemistry* 91: 5518-5522

Shi X., Gangadharan B., Brass L. F., Ruf W., Mueller B. M. (2004) Protease-Activated Receptors (PAR1 and PAR2) Contribute to Tumor Cell Motility and Metastasis. *Mol Cancer Res* 2: 395-402

Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J., Klenk D. C. (1985) Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 150: 76-85

Tsuji J., Hirose K., Kasahara E., Naitoh M., Yamamoto I. (1985) Studies on antigenicity of the polyethylene glycol (PEG)-modified uricase. *Int J Immunopharmacol.* 7: 725-730

Veronese F. M., Harris J. M. (2002) Introduction and overview of peptide and protein pegylation. *Adv Drug Deliver Rev.* 54: 453-456

Veronese F. M., Pasut G. (2005) PEGylation, successful approach to drug delivery. *DDT* 10: 1451-1457

Vu T. K., Hung D. T., Wheaton V. I., Coughlin S. R. (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64: 1057-1068

Wang X., Wang E., Kavanagh J. J., Freedman R. S. (2005) Ovarian cancer, the coagulation pathway, and inflammation. *J Transl Med.* 3:25 :1-20

Warr G. W., Magor K. E., Higgins D. A. (1995) IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol Today* 16: 392-398

Weitz J. I. (2003) A novel approach to thrombin inhibition. *Thromb Res* 109: 17-22

Wells C. M., Di Cera E. (1992) Thrombin is a Na⁺-activated enzyme. *Biochemistry* 31: 11721-11730

Xu W., Andersen H., Whitmore T. E., Presnell S. R., Yee D. P., Ching A., Gilbert T., Davie E. W., Foster D. C. (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Biochemistry* 95 : 6642-6646

Yamaoka T., Tabata Y., Ikada Y. (1994) Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci.* 83: 601-606

Zhou H., Gabazza E. C., Takeya H., Deguchi H., Urano H., Adachi Y., Suzuki K. (1998) Prothrombin and its derivatives stimulate motility of melanoma cells. *Thromb Haemost.* 80: 407-412

Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Nowak für seine umfassende Betreuung meiner Diplomarbeit und seine Hilfe bei den tierexperimentellen Untersuchungen ganz herzlich bedanken.

Weiterhin danke ich Prof. Liebmann für seine Arbeit als Zweitgutachter.

Dr. Mercedes López gebührt neben ihrer fachlichen Betreuung vor allem für die Unterstützung, die sie mir nicht nur während meines Aufenthalts in Venezuela gegeben hat, mein großer Dank.

Dazu möchte ich der ganzen Arbeitsgruppe „Pharmakologische Hämostaseologie“ für die zahlreiche Unterstützung und die freundschaftliche Atmosphäre meinen Dank ausdrücken. Vor allem Anne Köhler bei der Beantwortung fachlicher Fragen war eine große Hilfe.

Bei Dr. Bien und Dr. Koch von der Haemosys GmbH bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Bedienung der HPLC- und MALDI-TOF-Anlagen und für anregende fachliche Gespräche.

Verena Wolf, Andreas Licht und Robert Geib waren während des gesamten Schaffensprozesses eine stetige Quelle emotionaler und intellektueller Unterstützung.

Mein Dank gilt auch dem DAAD, der mir die finanzielle Unterstützung bot, einige meiner Untersuchungen in Venezuela durchzuführen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die die Fertigstellung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Jena, den 23.04.2007

Gabriella Rimkus