

**Biochemische und pharmakokinetische Charakterisierung  
zweier Varianten eines neuen, auf Dipetalogastin II  
basierenden, chimären Thrombininhibitors**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Thomas Bitter

geboren am 14. April 1979 in Leipzig

16. Oktober 2005

Gutachter

1. Prof. Dr. med. habil. Götz Nowak, Jena
2. Prof. Dr. med. habil. Dagmar Barz, Jena
3. Prof. Dr. med. habil. Job Harenberg, Mannheim

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.10.2005

# 1 Abkürzungen

[I]	Inhibitorkonzentration
[S]	Substratkonzentration
2xYT-Medium	Hefe-Trypton-Medium, doppelt konzentriert
Å	Ångström ( $10^{-10}$ Meter)
ABE I	Anion binding exosite I („Fibrinogen-Erkennungsregion“)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
Aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser (Aqua bidestillata)
ASS	Acetylsalicylsäure
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CS	chromogenes Substrat
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECT	Ecarin Clotting Time
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU	Ecarin units
FFP	Fresh frozen plasma
FXa	Faktor Xa
GST	Glutathion-S-Transferase
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
i.v.	intravenös
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$k_{12}$	Geschwindigkeitskonstante für die Verteilung vom zentralen zum peripheren Kompartiment
$k_{13}$	Geschwindigkeitskonstante der Elimination vom zentralen Kompartiment
$k_{21}$	Geschwindigkeitskonstante für die Verteilung vom peripheren zum zentralen Kompartiment
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht

$K_i$	Inhibitionskonstante
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
$k_{obs}$	Geschwindigkeitskonstante pseudoerster Ordnung
$k_{off}$	Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation
$k_{on}$	Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight
MW	Molekulargewicht
n.u.	nicht untersucht
$OD_{600}$	Optische Dichte bei 600 nm
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PT	Prothrombinzeit
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
Var-1	Variante 1 des chimären Thrombininhibitors
Var-2	Variante 2 des chimären Thrombininhibitors
w/v	Masse pro Volumen

### 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
Glutamin	Q	Gln	Serin	S	Ser
Glutamat	E	Glu	Threonin	T	Thr
Glycin	G	Gly	Tryptophan	W	Trp
Histidin	H	His	Tyrosin	Y	Tyr
Isoleucin	I	Ile	Valin	V	Val

## 2 Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>I</b>
<b>2</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>3</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
4.1	Thrombin.....	3
4.1.1	Strukturelle Eigenschaften .....	3
4.1.2	Hämostatische Funktionen von Thrombin .....	4
4.1.3	Zelluläre Effekte von Thrombin.....	6
4.2	Direkte Thrombininhibitoren .....	8
4.2.1	Thrombininhibitoren aus blutsaugenden Tieren .....	9
4.2.2	Bifunktionelle, auf der C-terminalen Hirudinsequenz basierende Thrombininhibitoren .....	13
<b>5</b>	<b>ZIELE DER ARBEIT .....</b>	<b>14</b>
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>15</b>
6.1	Material .....	15
6.1.1	Bakterien .....	15
6.1.2	Nukleinsäuren und Nukleotide.....	15
6.1.3	Enzyme.....	16
6.1.4	Chromogene Substrate .....	16
6.1.5	Standard-Plasma.....	16
6.1.6	Lösungen und Puffer .....	17
6.1.7	Medien.....	17
6.1.8	Kits und gebrauchsfertige Komponenten.....	18
6.1.9	Chemikalien .....	18
6.1.10	Versuchstiere .....	19
6.1.11	Geräte .....	19
6.2	Methoden.....	20
6.2.1	Allgemeine Techniken .....	20
6.2.2	Mikrobiologische Techniken.....	20
6.2.3	Molekularbiologische Techniken.....	21
6.2.4	Herstellung der rekombinanten Thrombininhibitoren.....	24
6.2.5	Biochemische Techniken .....	25
6.2.6	Koagulometrische Methoden .....	29
6.2.7	Pharmakokinetische Untersuchungen am Rattenmodell.....	30
<b>7</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>35</b>
7.1	Etablierung eines Expressionssystems für Dipetalogastin II .....	35
7.2	Proteinexpression und Proteinreinigung .....	35
7.3	Biochemische Charakterisierung.....	37
7.4	Pharmakokinetische Charakterisierung.....	44

---

<b>8</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>48</b>
<b>9</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>58</b>
<b>10</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>68</b>
11.1	Danksagung .....	68
11.2	Ehrenwörtliche Erklärung .....	69

### 3 Zusammenfassung

Die Grundlage für die Prophylaxe und die Therapie thromboembolischer Erkrankungen bilden Heparin, Cumarin-Derivate und Acetylsalicylsäure. Aufgrund der zahlreichen Einschränkungen dieser Wirkstoffe wird intensiv nach neuen antithrombotischen Strategien gesucht. Die Entwicklung direkter Thrombininhibitoren ist dabei ein besonders vielversprechender Ansatz. Hirudin, ein Polypeptid aus dem medizinischen Blutegel *Hirudo medicinalis*, ist der stärkste bisher bekannte direkte Thrombininhibitor. Die Überlegenheit von rekombinant hergestelltem Hirudin über das Standardpräparat Heparin konnte in klinischen Studien gezeigt werden. Dipetalogastin II ist ein weiterer direkter Thrombininhibitor, welcher aus der Raubwanze *Dipetalogaster maximus* isoliert wurde. Rekombinantes Dipetalogastin II zeigt eine stärkere Thrombinhemmung als rekombinantes Hirudin. Allerdings hat es ein bedeutend höheres Molekulargewicht und ist nicht spezifisch, da es in sehr hohen Konzentrationen auch Plasmin und Trypsin inhibiert.

Diese Einschränkungen können durch das zielgerichtete Design neuer Thrombininhibitoren, auf der Basis der Dipetalogastin II-Struktur, umgangen werden. Eine Möglichkeit, um eine deutliche Molekulargewichtsreduktion von Dipetalogastin II zu erzielen, ist der Ersatz der großen C-terminalen Dipetalogastin II-Domäne mit dem deutlich kleineren Hirudin<sup>55-65</sup>-Fragment. Durch Modifikation des P1-Aminosäurerestes kann ferner die Spezifität dieser Inhibitoren beeinflusst werden.

Ziel dieser Arbeit war die biochemische und pharmakokinetische Charakterisierung zweier Varianten (Var-1 und Var-2) eines solchen chimären Thrombininhibitors. Der N-terminale Anteil der beiden Inhibitorvarianten entsprach dem Dipetalogastin II<sup>1-58</sup>-Fragment und der C-terminale Anteil dem Hirudin<sup>55-65</sup>-Fragment. Var-1 und Var-2 unterschieden sich lediglich im P1-Aminosäurerest, welcher bei Var-1 ein Argininrest und bei Var-2 ein Histidinrest war.

Um die Eigenschaften der beiden Inhibitorvarianten mit denen von Dipetalogastin II vergleichen zu können, wurde ein neues Expressionssystem für Dipetalogastin II etabliert. Alle Inhibitoren wurden in *E.coli* exprimiert und mittels Affinitätschromatographie und *reversed phase* HPLC rein dargestellt.

Die biochemischen Untersuchungen zeigten, dass Var-1 und Dipetalogastin II slow, tight-binding Inhibitoren des Thrombins waren. Var-2 wies hingegen eine klassisch kompetitive Kinetik auf. Die Inhibitionskonstante ( $K_i$ ) von Var-1 betrug 402 fM, die von Var-2 17,1 pM und die von Dipetalogastin II 137 fM. Var-2 war, aufgrund seines

P1-Histidinrestes, ein spezifischer Thrombininhibitor, während Var-1 und Dipetalogastin II, bedingt durch den P1-Argininrest, auch eine Hemmung von Plasmin und Trypsin aufwiesen. Diese Hemmung trat allerdings nur bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen auf.

Die antikoagulatorischen Aktivitäten der Inhibitoren wurden koagulometrisch mit der Prothrombinzeit (PT), der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT), der Ecarin Clotting Time (ECT) und dem Ecarin Chromogenic Assay (ECA) untersucht. Obwohl Var-2 in den biochemischen Untersuchungen eine 43fach geringere Thrombinaffinität als Var-1 zeigte, unterschieden sich die antikoagulatorischen Aktivitäten von Var-1 und Var-2 nicht signifikant voneinander. Auch für Dipetalogastin II und rekombinantes Hirudin wurden vergleichbare antikoagulatorische Aktivitäten ermittelt.

Die pharmakokinetischen Eigenschaften wurden tierexperimentell im Rattenmodell bestimmt. Die Blutspiegelverläufe nach intravenöser Applikation von Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II zeigten eine sehr ähnliche Kinetik und konnten am besten durch ein offenes Zweikompartimentmodell mit einer Eliminationskinetik erster Ordnung beschrieben werden. Die Verteilung der Inhibitoren erfolgte in den gesamten Extrazellulärraum. Nach 3 Stunden war kein Inhibitor im Blut mehr nachweisbar. Nach subkutaner Applikation der Inhibitoren kam es zu einem raschen Anstieg des Blutspiegels, wobei das Maximum nach 30 Minuten gemessen wurde. Die Inhibitoren blieben hier bis zu 6 Stunden im Blut nachweisbar. Bei bilateral nephrektomierten Ratten wurde nach intravenöser Applikation der Inhibitoren eine kurze Verteilungsphase mit schnell abfallenden Blutspiegeln beobachtet. Danach blieb der Blutspiegel über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant. Eine signifikante extrarenale Elimination und Metabolisierung konnte somit ausgeschlossen werden. Wie beim Hirudin erfolgte die Ausscheidung der Inhibitoren ausschließlich über die Nieren.

Sowohl Var-1 als auch Var-2 sind potentielle Wirkstoffe in der Therapie thromboembolischer Erkrankungen. Var-1 besitzt eine dem rekombinanten Hirudin vergleichbar starke Thrombinhemmung und auch ein vergleichbares Molekulargewicht. Wegen seiner zuverlässigen und nahezu irreversiblen Thrombinaktivierung könnte Var-1 aber auch für die therapeutische Hemmung zellulärer Thrombineffekte eingesetzt werden, welche u.a. für Tumoren, entzündliche Erkrankungen und zentralnervöse Krankheitsbilder verantwortlich gemacht werden. Ein Vorteil von Var-2 ist die hohe Thrombinspezifität. So tritt keine Hemmung von Plasmin, der wichtigsten Protease der Antikoagulation, auf. Welcher Inhibitor letztlich das bessere therapeutische Profil besitzt, muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

## 4 Einleitung

Thromboembolische Erkrankungen, wie z.B. Myokardinfarkt, ischämischer Insult und Lungenembolie infolge tiefer Beinvenenthrombose, stellen die häufigste Todesursache in den Industrienationen dar (Murray und Lopez 1997). Die in der antithrombotischen Therapie etablierten Medikamente, wie Heparine, Cumarin-Derivate und Acetylsalicylsäure (ASS), sind sehr effektiv, haben aber auch deutliche Einschränkungen. Heparine können beispielsweise kein fibrin gebundenes Thrombin inaktivieren, führen in der Langzeitbehandlung zu Osteoporose und können die lebensbedrohliche Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II) auslösen. Cumarin-Derivate besitzen eine geringe therapeutische Breite und benötigen deshalb ein sorgfältiges therapeutisches Monitoring. Infolge ihrer hohen Eiweißbindung und der Interferenz mit dem hepatischen Metabolismus zeigen sie vielfältige Interaktionen mit anderen Medikamenten. Der langsame Beginn und das langsame Ende der Wirkung, der initial prokoagulatorische Effekt sowie die extrem lange Halbwertszeit sind weitere Einschränkungen. ASS ist weder selektiv für Thrombozyten noch wirksam gegen vorbestehende Blutgerinnsel. Ferner besteht ein erhöhtes Risiko für Magen-Darm-Ulcera und es gibt Hinweise, dass 5 bis 45 % der Bevölkerung eine Aspirinresistenz aufweisen (Mason *et al.* 2004). Aufgrund dieser Einschränkungen der Standardtherapeutika wird intensiv nach neuen antithrombotischen Strategien gesucht. Die Entwicklung direkter Thrombininhibitoren ist hierbei ein besonders vielversprechender Ansatz (Colman *et al.* 2001).

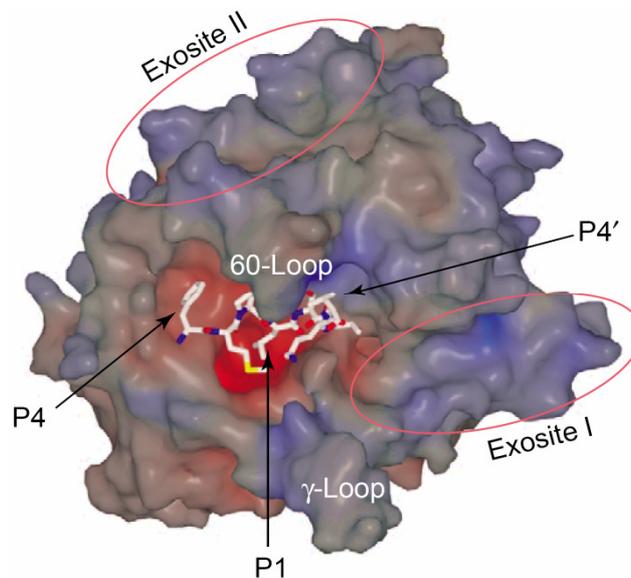
### 4.1 Thrombin

#### 4.1.1 Strukturelle Eigenschaften

Thrombin ist eine trypsinartige Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 39 kDa. Das ellipsoide Molekül besteht aus zwei Polypeptidketten, einer kleineren A-Kette und einer katalytischen B-Kette, die kovalent durch eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das aktive Zentrum liegt in einer tiefen, canyonartigen Spalte, welche durch zwei große Peptidkettenschleifen für die meisten makromolekularen Substrate schwer zugänglich ist. Hierauf beruht die hohe Substratspezifität von Thrombin (Bode *et al.* 1992).

Das Thrombinmolekül besitzt besondere elektrostatische Eigenschaften. Die negativ und positiv geladenen Aminosäurereste der Moleküloberfläche sind nicht gleichförmig verteilt, sondern zu Ladungscustern zusammengefasst. Daraus resultieren starke äußere elektrostatische Felder, die für die Interaktion von Thrombin mit externen Liganden eine herausragende Rolle spielen. Besonders zwei Areale mit einer stark positiven Ladung sind hierbei von Bedeutung (Abb. 4-1). Eines ist die *anion binding exosite I* (ABE I), welche auch

als „Fibrinogen-Erkennungsregion“ bezeichnet wird. Sie ist nicht nur maßgeblich an der Bindung von Fibrinogen an Thrombin beteiligt, sondern interagiert u.a. auch mit den Thrombinrezeptoren, dem Thrombomodulin, dem Heparin-Cofaktor II und dem C-terminalen Segment des Hirudins. Das zweite Areal ist die *anion binding exosite II* (ABE II). Da die Interaktion von Thrombin mit Heparin hier stattfindet, wird sie auch als „Heparin-Bindungsstelle“ bezeichnet. Aber auch andere polyanionische Liganden, wie z.B. der Chondroitinsulfatanteil des Thrombomodulins, binden über die ABE II an Thrombin (Stubbs und Bode 1995, Di Cera *et al.* 1997).

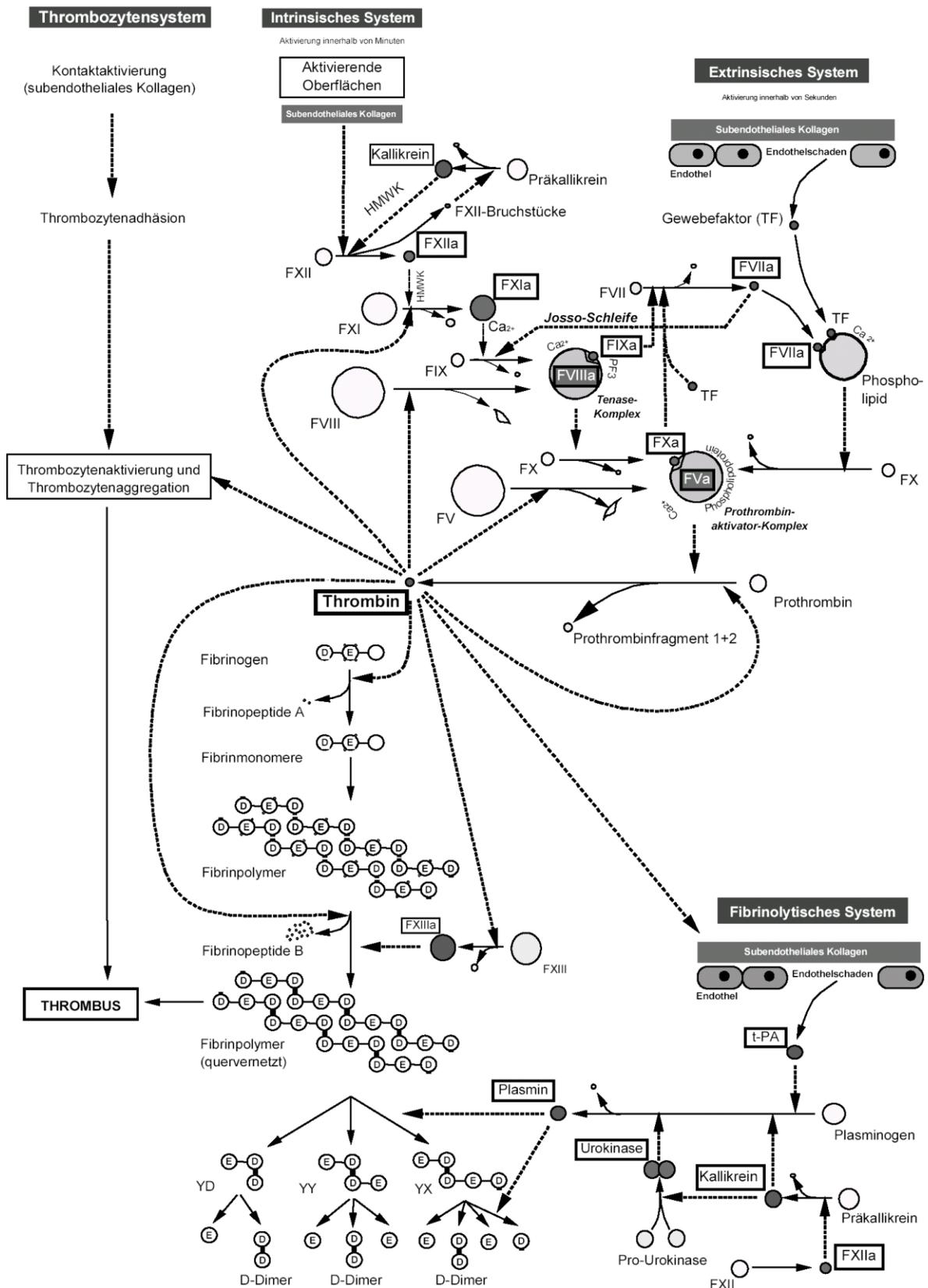


**Abbildung 4-1: Oberflächendarstellung von Thrombin (modifiziert nach Huntington und Baglin (2003)).** Negative Potentiale sind rot, positive Potentiale sind blau dargestellt. Das aktive Zentrum besitzt ein vorwiegend negatives Potential und bevorzugt Substrate mit einem P1-Argininrest (Nomenklatur der Aminosäurereste des Substrates nach Schechter und Berger (1968)). Die *anion binding exosite I* (ABE I) und die *anion binding exosite II* (ABE II) sind Areale mit einer stark positiven Ladung. Das zur Veranschaulichung dargestellte Substratpeptid ist Bestandteil des Heparin-Cofaktor II.

### 4.1.2 Hämostatische Funktionen von Thrombin

Thrombin steht an zentraler Stelle der Gerinnungskaskade (Abb. 4-2). Sowohl das extrinsische als auch das intrinsische System münden in der Umsetzung von Prothrombin in Thrombin. Durch thrombinvermittelte Spaltung von Fibrinogen entsteht Fibrin, welches nach Polymerisierung und Quervernetzung durch den Faktor XIII ein unlösliches Fibringerinnsel bildet. Durch Aktivierung der Faktoren V, VIII und XI verstärkt Thrombin seine eigene Bildung im Sinne einer positiven Rückkopplung (Davie *et al.* 1991).

Thrombin ist nicht nur das Schlüsselenzym der plasmatischen Hämostase, es ist auch der stärkste bekannte Thrombozytenaktivator und somit ein wichtiger Regulator der Plättchenfunktion (Eidt *et al.* 1988). Ferner trägt Thrombin im Rahmen der primären Hämostase zur Vasokonstriktion im Bereich der Gefäßschädigung bei (Ku 1982).



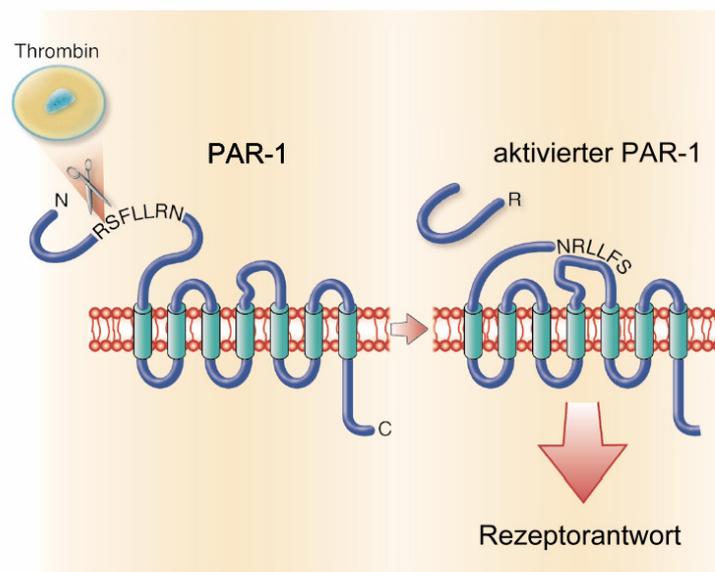
**Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Hämostase (modifiziert nach Schmidt und Thews (1997)).**  
 X, Y, D, E – Fibrinfragmente, t-PA – tissue-type plasminogen activator, TF – tissue factor, HMWK – high molecular weight kinogen.

Thrombin hat neben seinen prokoagulatorischen auch gerinnungshemmende Eigenschaften. Nach Bindung an das Oberflächenprotein Thrombomodulin wird seine Spezifität so verändert, dass es vorrangig Protein C aktiviert. Dieses inaktiviert mit seinem Kofaktor Protein S die Faktoren Va und VIIIa. Hierbei handelt es sich um einen wichtigen negativen Rückkopplungsmechanismus von Thrombin. Ferner setzen Endothelzellen nach Thrombineinwirkung den t-Plasminogenaktivator sowie lokal-antiaggregatorische Vasodilatoren wie Prostazyklin, Stickstoffmonoxid und *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) frei (Maffrand 1992).

Die Thrombinaktivität wird von einigen wenigen endogenen Inhibitoren kontrolliert. Neben dem Antithrombin III (AT III) sind dies der Heparin-Cofaktor II, die Proteinase Nexin I sowie der  $\alpha$ 1-Proteinaseinhibitor und das  $\alpha$ 2-Makroglobulin (Colman *et al.* 2001).

### 4.1.3 Zelluläre Effekte von Thrombin

Thrombin hat auch außerhalb der Hämostase wichtige physiologische sowie pathologische Effekte in einer Vielzahl von Geweben und Organen. Es beeinflusst das Verhalten von verschiedenen Zellen auf eine hormonähnliche Weise. Diese Wirkungen werden vor allem über Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR) vermittelt. Obwohl spezifische Rezeptoren für Thrombin bereits 1978 nachgewiesen wurden (Carney und Cunningham 1978), konnte der bislang einzigartige Rezeptormechanismus (Abb. 4-3) erst 1991, nach Klonierung des ersten Thrombinrezeptors (PAR-1), beschrieben werden (Vu *et al.* 1991). Neben PAR-1 sind inzwischen PAR-3 (Ishihara *et al.* 1997) und PAR-4 (Xu *et al.* 1998) als Thrombinrezeptoren identifiziert worden.



**Abbildung 4-3: Mechanismus der Thrombinrezeptor-Aktivierung am Beispiel von PAR-1 (modifiziert nach Coughlin und Camerer (2003)).** Thrombin bindet an einer hirudinähnliche Sequenz am Rezeptor und spaltet durch limitierte Proteolyse die N-terminale Exodomäne. Dabei wird ein neuer N-Terminus demaskiert. Dieser sogenannte „tethered ligand“ bindet intramolekular an den Rezeptor und initiiert somit die Signaltransduktion.

Thrombin ist über die Aktivierung seiner Rezeptoren wesentlich an den physiologischen Folgeprozessen der Gerinnung, nämlich Entzündung, Angiogenese und Zellproliferation beteiligt (Macfarlane *et al.* 2001). Diese Prozesse tragen nach einer Gewebeschädigung zur Wundheilung und Gewebereparatur bei (Strukova 2001).

#### 4.1.3.1 Atherosklerose

Die durch Thrombin ausgelöste Aktivierung des Thrombinrezeptors scheint eine zentrale Rolle in der Atherosklerose zu spielen (Libby 2002). Es konnte gezeigt werden, dass der Thrombinrezeptor in atherosklerotischen Plaques, aber nicht in der normalen Arterienwand exprimiert wird (Nelken *et al.* 1992). Aktives Thrombin könnte eine atherogene Wirkung einerseits über seine stark mitogene Wirkung auf die glatten Gefäßmuskelzellen und andererseits über die Verursachung von Fibrinablagerungen in der Intima entfalten (Smith *et al.* 1996). Neben seinem Beitrag zum langsamen Progress atherosklerotischer Plaques ist Thrombin auch bei der Thrombusbildung infolge der Plaqueruptur, z.B. im Rahmen der akuten Koronarsyndrome, entscheidend (Gotoh *et al.* 1988).

#### 4.1.3.2 Tumoren

Auch bei malignen Erkrankungen scheinen zelluläre Thrombinwirkungen eine wichtige Rolle zu spielen. Die meisten Tumoren exprimieren konstitutiv *tissue factor*, was eine Thrombingeneration im Tumorgewebe zur Folge hat (Rao 1992). Eine Bedeutung von Thrombin und seinen Rezeptoren wurde unter anderem für verschiedene Hirntumoren (Kaufmann *et al.* 2000, Kaufmann *et al.* 1998), das Pankreaskarzinom (Rudroff *et al.* 1998), das Adenokarzinom der Lunge, das Magenkarzinom (D'Andrea *et al.* 2001), das Larynxkarzinom (Kaufmann *et al.* 1997), das Nierenzellkarzinom (Kaufmann *et al.* 2002), das maligne Melanom (Zacharski *et al.* 1995), das Mammakarzinom (Henrikson *et al.* 1999) sowie für das Kolonkarzinom (Darmoul 2003) postuliert.

Thrombin kann das Verhalten von Tumorzellen direkt, z.B. über eine Verstärkung der Adhäsion an das Endothel bzw. an Komponenten der extrazelluläre Matrix (Dardik *et al.* 1998, Even-Ram *et al.* 2001) und über eine Erhöhung der Tumorzellmotilität (Zhou *et al.* 1998), beeinflussen. Die Höhe der Thrombinrezeptor-Expression (PAR-1) korreliert dabei mit dem Grad der Tumorinvasivität (Even-Ram *et al.* 1998). Thrombin kann das Tumorzellverhalten aber auch indirekt modifizieren, z.B. über Beeinflussung der umgebenden Stromazellen und über die Bildung einer Fibrinmatrix (Shi *et al.* 2004). Vermutlich erschweren thrombininduzierte Fibrinablagerungen auch die Tumorerkennung durch das Immunsystem (Letai und Kuter 1999). Weiterhin verstärkte Thrombin im Tierexperiment die

Metastasierung verschiedener Tumorzellarten (Nierodzik *et al.* 1998), und es konnte die Bedeutung von Thrombin für die Tumorangio-genese, einer Grundvoraussetzung für Tumorwachstum und -metastasierung, gezeigt werden (Karpatkin 2003).

#### 4.1.3.3 Thrombinwirkungen im zentralen Nervensystem

Die Thrombinrezeptoren sind im zentralen Nervensystem (ZNS) weit verbreitet. Thrombin wird sowohl lokal gebildet und gelangt auch nach Schädigung der Blut-Hirn-Schranke durch Trauma oder Ischämie ins ZNS (Noorbakhsh *et al.* 2003).

Thrombin scheint im ZNS duale, konzentrationsabhängige Effekte zu besitzen. Einerseits zeigt es in niedrigen Konzentrationen (50 bis 100 pM) neuroprotektive Eigenschaften. In höheren Konzentrationen (über 500 nM) wirkt es u.a. über Induktion von Apoptose und Entzündung neurotoxisch (Xi *et al.* 2003). Es gibt zunehmende Hinweise, dass Thrombin entscheidend an den pathologischen Veränderungen nach zerebraler Ischämie und intrazerebraler Blutung beteiligt ist (Xi *et al.* 2002, Wang und Reiser 2003).

Auch bei neurodegenerativen Prozessen wie dem Morbus Alzheimer könnte Thrombin beteiligt sein. Bei Alzheimer-Patienten wurden in senilen Plaques hohe Thrombin-konzentrationen nachgewiesen (Turgeon und Houenou 1997). Weiterhin wird bei Alzheimer-Patienten eine gesteigerte Thrombinaktivität infolge eines Ungleichgewichts zwischen Thrombin und seinem Inhibitor Protease Nexin-1 postuliert (Vaughan *et al.* 1994).

Über thrombininduzierte Formveränderung von neuronalen Zellen, die thrombininduzierte Elimination polyneuronaler Synapsen und die Induktion des *nerve growth factor* (NGF) könnte Thrombin in Zusammenarbeit mit der Protease Nexin-1 bei der Gehirnentwicklung und -differenzierung sowie an der synaptischen Plastizität beteiligt sein (Festoff *et al.* 1996, Niclou *et al.* 1998). Aber auch außerhalb der Gehirnentwicklung scheint Thrombin eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung innezuhaben (Connolly *et al.* 1996, Darrow *et al.* 1996).

## 4.2 Direkte Thrombininhibitoren

Aufgrund seiner vielfältigen physiologischen als auch pathologischen Effekte ist Thrombin ein wichtiges Ziel für die pharmakologische Intervention. Über eine direkte Hemmung von Thrombin kann therapeutisch die Blutgerinnung beeinflusst werden, aber auch modulierend in die multiplen bioregulatorischen Effekte des Enzyms eingegriffen werden.

Direkte Thrombininhibitoren können in monovalente und bivalente Inhibitoren eingeteilt werden. Monovalente Inhibitoren binden nur an das aktive Zentrum des Thrombins, ohne es dabei vom Fibrin zu verdrängen. Die bivalenten Inhibitoren binden hingegen sowohl an die

ABE I und das aktive Zentrum, was mit einer Verdrängung des Thrombins vom Fibrin einhergeht. Bivalente Inhibitoren haben daher eine höhere Thrombinaffinität und -spezifität (Weitz und Buller 2002).

Klinische Anwendungen direkter Thrombininhibitoren ergeben sich vor allem in der antithrombotischen Therapie. Sie können bereits bei einer aPTT-Verlängerung um weniger als 50% die Entwicklung venöser Thromben verhindern und sind somit interessant für die Prophylaxe und die Therapie tiefer Beinvenenthrombosen und der Lungenembolien (Menear 1999). Aber auch arterielle thrombotische Prozesse wie Myokardinfarkt, ischämischer Insult und Restenose nach PTCA sind weitere erfolgsversprechende Anwendungsmöglichkeiten (Harker 1994). Einen eindeutigen Vorteil besitzen direkte Thrombininhibitoren in der Antikoagulation von Patienten mit HIT II und hereditärem bzw. erworbenem AT III-Mangel (Steinmetzer *et al.* 2001).

Außerhalb der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen gibt es weitere potentielle Einsatzgebiete direkter Thrombininhibitoren (Goldsack *et al.* 1998). Eines ist die supportive Behandlung von Tumoren. Eine Antikoagulation senkt nicht nur das höhere Thromboserisiko von Tumorpatienten, sondern könnte auch das Wachstum und die Metastasierung bestimmter Tumoren hemmen. Für den direkten Thrombininhibitor Hirudin (4.2.1.1) konnte tierexperimentell eine Wirksamkeit gegen Melanom-Metastasen gezeigt werden (Esumi *et al.* 1991). Da ein Tumor ohne adäquate Angiogenese nicht größer als 1-2 mm<sup>3</sup> werden kann, könnten direkte Thrombininhibitoren auch über die Hemmung der thrombininduzierten Angiogenese eine Antitumorwirkung entfalten (Maragoudakis *et al.* 2000).

In neuerer Zeit gibt es Anzeichen, dass eine direkte Thrombininhibition auch bei entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise der Arthritis (Marty *et al.* 2001), der Glomerulonephritis (Cunningham *et al.* 2000) oder der Sepsis (Esmon 2001), als auch bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie dem ischämischen Insult (Morris *et al.* 2001) und der Ödembildung infolge intracerebraler Blutung (Hamada *et al.* 2000), eine therapeutische Option darstellen könnte.

#### **4.2.1 Thrombininhibitoren aus blutsaugenden Tieren**

Blutsaugende Tiere haben in der Evolution die stärksten heute bekannten Thrombininhibitoren hervorgebracht (Tab. 4-1). Einige dieser Thrombininhibitoren sind mittels rekombinanter DNA-Technologie verfügbar. Gemeinsam ist ihnen eine Hemmung von Thrombin mit einer Inhibitionskonstanten ( $K_i$ ) im pico- oder sogar im femtomolaren Bereich, womit sie den heute verfügbaren synthetischen Inhibitoren (z.B. Argatroban, Melagatran) weit überlegen sind (Nowak *et al.* 1999, Nutescu und Wittkowsky 2004).

**Tabelle 4-1: Natürliche Thrombininhibitoren (modifiziert und erweitert nach Markwardt (1994)).**  
 MW – Molekulargewicht,  $K_i$  – Inhibitionskonstante, k.A. – keine Angabe.

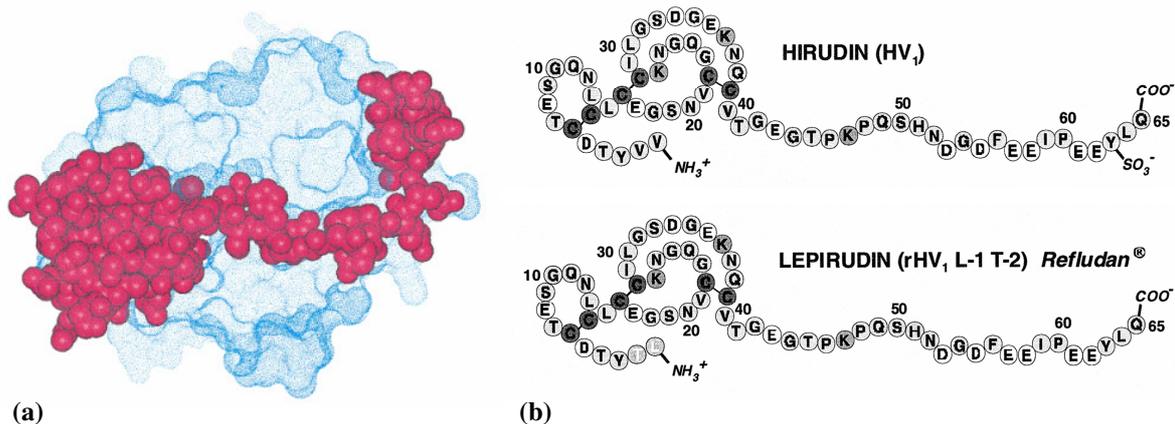
Ursprung	Thrombininhibitor	MW	$K_i$
<b>Raubwanzen (Reduviidae)</b>			
<i>Dipetalogaster maximus</i>	Dipetalogastin	11,9 kDa	125 fM
<i>Rhodnius prolixus</i>	Rhodniin	11,0 kDa	203 fM
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Triabin	17,0 kDa	3 pM
<i>Eutriatoma maculata</i>	Maculatin	k.A.	k.A.
<i>Triatoma infestans</i>	Reduviin	k.A.	k.A.
	Triatomin	k.A.	k.A.
<b>Zecken (Ixodida)</b>			
<i>Amblyomma americanum</i>	Americanin	12,0 kDa	73 pM
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Savignin	12,4 kDa	5 pM
<i>Ixodes ricinus</i>	Ixin	7,0 kDa	k.A.
<i>Ornithodoros moubata</i>	Ornithodorin	k.A.	1 pM
<b>Egel (Hirudinea)</b>			
<i>Haemadipsa sylvestris</i>	Haemadin	5,0 kDa	99 fM
<i>Hirudo medicinalis</i>	Hirudin	7,0 kDa	27 fM
<i>Theromyzon tessulatum</i>	Theromin	7,2 kDa	12 fM
<i>Hirudinaria manillensis</i>	Hirullin P18	7,2 kDa	8 pM
	Bufrudin	7,0 kDa	k.A.
<i>Hirudo nipponia</i>	Granulin	6,0 kDa	k.A.
<b>Zweiflügler (Diptera)</b>			
<i>Anopheles albimanus</i>	Anophelin	6,5 kDa	6 pM
<i>Glossina morsitans morsitans</i>	Tsetse thrombin inhibitor (TTI)	3,5 kDa	584 fM
<i>Simulium vittatum</i>	Simulidin	11,3 kDa	k.A.
<i>Tabanus bovinus</i>	Tabanin	5,0 kDa	k.A.
<b>Schlangen (Squamata)</b>			
<i>Bothrops jararaca</i>	Bothrojaracin	27,0 kDa	600 pM

#### 4.2.1.1 Hirudin

Hirudin ist ein aus 65 Aminosäureresten bestehendes Polypeptid, welches aus den Speicheldrüsen des medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis*) isoliert wurde (Haycraft 1894, Markwardt 1957). Es ist ein hochwirksamer und spezifischer Inhibitor des Thrombins, mit welchem es praktisch irreversible stöchiometrische Komplexe im Verhältnis 1:1 bildet. Hirudin wurde bereits 1909 als erstes Medikament zur parenteralen Antikoagulation eingesetzt (Engelmann und Stade 1909). Später diente es bei der ersten Hämodialyse am Menschen als Antikoagulanz (Haas 1926).

Drei strukturell verschiedene Regionen des Hirudins sind für die Thrombinhemmung von Bedeutung. Die drei apolaren N-terminalen Aminosäurereste des Hirudins binden am aktiven Zentrum des Thrombins, ohne jedoch die S1-Spezifitätstasche zu besetzen. Die N-terminale Hirudindomäne, welche bedingt durch drei Disulfidbrücken globulär und sehr kompakt ist, hat hingegen nur geringen Kontakt mit der Thrombinoberfläche. Dennoch verhindert sie den Zugang von makromolekularen Inhibitoren und Substraten zum aktiven Zentrum. Der C-Terminus des Hirudins besteht aus zahlreichen negativ geladenen Aminosäureresten und interagiert mit der ABE I (Abb. 4-4a) (Grütter *et al.* 1990).

Kinetische Studien haben gezeigt, dass Hirudin in einem Drei-Schritt-Mechanismus an Thrombin bindet. Initial lagert sich der anionische C-Terminus an die positiv geladene ABE I. Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Thrombins (*induced fit*), so dass in einem letzten Schritt Hirudin über hydrophobe Wechselwirkungen an die Region des aktiven Zentrums bindet (Ayala und Di Cera 1994).



**Abbildung 4-4: (a) Modell des Hirudin-Thrombinkomplexes und (b) Darstellung der Aminosäuresequenz von nativem und rekombinanten Hirudin (Refludan®).** Nach Lombardi *et al.* (1996) und Markwardt (2001).

Rekombinantes Hirudin ist im Gegensatz zum nativen Hirudin nicht am Tyr<sub>63</sub> sulfatiert (Abb. 4-4b), was in einer 10fachen Abnahme der Thrombinaffinität ( $K_i = 217$  fM vs. 21 fM) resultiert. Zwei rekombinant hergestellte Hirudinpräparate, Desirudin (Revasc®) und Lepirudin (Refludan®), sind kommerziell verfügbar und für die postoperative Thromboseprophylaxe bzw. die alternative Antikoagulation bei Patienten mit HIT zugelassen.

Die Wirksamkeit des Hirudins wurde in großen multizentrischen Doppelblindstudien bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt, instabiler Angina pectoris und zur Prophylaxe der tiefen Beinvenenthrombose bei Hüftgelenkersatzoperationen untersucht.

In der Prophylaxe der tiefen Beinvenenthrombose war Hirudin signifikant effektiver als unfraktioniertes oder niedermolekulares Heparin (Eriksson *et al.* 1997). Weniger eindeutige

Ergebnisse ergaben die Untersuchungen bei der Therapie akuter Koronarsyndrome. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt konnten zwei klinische Studien (GUSTO IIB, TIMI 9B) keinen signifikanten Unterschied im 30 Tage-Überleben der Heparin- und Hirudingruppe zeigen. In der größeren GUSTO IIB-Studie zeigte sich Hirudin jedoch dem Heparin in der Prävention kardiovaskulärer Todesfälle in den ersten 24 Stunden überlegen. Patienten, die Hirudin bei instabiler Angina pectoris erhielten, hatten in der GUSTO IIB-Studie ebenfalls eine geringere Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse in den ersten 24 Stunden bei allerdings gleichem 30 Tage-Überleben im Vergleich zur Heparin-Gruppe.

In der HELVETICA-Studie wurde die Prävention der Restenose nach Koronarangioplastie (PTCA) bei Patienten mit instabiler Angina pectoris untersucht. In der Hirudin-Gruppe waren kardiale Ereignisse in den ersten 96 Stunden signifikant erniedrigt, aber nach 30 Wochen war kein Unterschied zur Heparin-Gruppe mehr nachweisbar (Serruys *et al.* 1995).

#### 4.2.1.2 Dipetalogastin

Dipetalogastin ist ein aus dem Magen-Darm-Trakt der Raubwanze *Dipetalogaster maximus* isolierter Thrombininhibitor (Gührs *et al.* 1996, Lange *et al.* 1999). Die cDNA des Dipetalogastins kodiert für drei Inhibitoren, welche als Dipetalogastin I, II und III bezeichnet wurden. Dipetalogastin II erwies sich in biochemischen Studien als der stärkste der drei Inhibitoren. Mit einem  $K_i$ -Wert von 49 fM hat es eine deutlich höhere Thrombinaffinität als natives Dipetalogastin (125 fM) (Mende *et al.* 1999).

Die Aminosäuresequenz des Dipetalogastin II zeigt eine 74 %ige Homologie zu der von Rhodniin, einem aus der Raubwanze *Rhodnius prolixus* isoliertem Thrombininhibitor (Friedrich *et al.* 1993). Beide enthalten das für Kazal-Typ-Inhibitoren typische Motiv VCGxD (Laskowski und Kato 1980), so dass sie vermutlich eine sehr ähnliche Tertiärstruktur besitzen. Wahrscheinlich besitzt Dipetalogastin II, wie das Rhodniin, eine „double-head“-Struktur. Es besteht also mutmaßlich aus zwei Domänen mit interner Sequenzhomologie, wobei die N-terminale Domäne genau in die Spalte des aktiven Zentrums des Thrombins passt und die C-terminale Domäne mit der ABE I interagiert (van de Locht *et al.* 1995). Durch NMR-Spektroskopie gewonnene Erkenntnisse über die Struktur des N-terminalen Domäne des Dipetalogastin II unterstützen diese Annahmen (Schlott *et al.* 2002).

Bemerkenswert ist, dass Dipetalogastin II, im Gegensatz zum Rhodniin, in hohem molaren Überschuss auch die Serinproteasen Trypsin und Plasmin hemmt. Verantwortlich für die unterschiedliche Spezifität von Rhodniin und Dipetalogastin II ist vermutlich der unterschiedliche P1-Aminosäurerest (Nomenklatur nach Schechter und Berger (1968)). Dieser ist bei Rhodniin ein Histidinrest und bei Dipetalogastin II ein Argininrest (Mende *et al.* 1999).

### 4.2.2 Bifunktionelle, auf der C-terminalen Hirudinsequenz basierende Thrombininhibitoren

Die Aufklärung der Thrombinstruktur sowie das Verständnis der molekularen Interaktionen von Thrombin mit seinen Inhibitoren ermöglichten die zielgerichtete Konstruktion bifunktionaler, chimärer Thrombininhibitoren. Diese bestehen aus einem mit dem aktiven Zentrum des Thrombins interagierenden Anteil, einem an die ABE I bindenden Anteil sowie einem diese beiden Segmente verbindenden Linker. Als ABE I-bindender Anteil ist der C-Terminus des Hirudins besonders geeignet.

Bei bifunktionalen Inhibitoren ist die initiale elektrostatische Interaktion mit der ABE I des Thrombins die treibende Kraft für die sekundäre Bindung an das aktive Zentrum. Die Länge des Linkers ist dabei für eine effektive Thrombininhibition entscheidend (DiMaio *et al.* 1990, Maraganore *et al.* 1990). Beispiele für bifunktionelle, auf der C-terminalen Hirudinsequenz basierende Inhibitoren sind Hirutonin (DiMaio *et al.* 1992), Hirunorm (Lombardi *et al.* 1996) und Hirulog (Maraganore *et al.* 1990).

Hirulog-1, welches neuerdings als Bivalirudin (Angiomax<sup>®</sup>) bezeichnet wird, ist der bislang am besten untersuchte Thrombininhibitor dieser Klasse. Es besteht aus dem Tripeptid D-Phe-Pro-Arg und dem C-terminalen Dodekapeptid des Hirudins, welche mittels eines Glycyltetramers als Linker verbunden sind. Die Sequenz D-Phe-Pro-Arg blockiert das aktive Zentrum des Thrombins, während das C-terminale Dodekapeptid des Hirudins an die ABE I bindet. Thrombin kann die Arg-Pro Bindung des Bivalirudins spalten, wobei das aktive Zentrum wieder reaktiviert wird und die Thrombinhemmung nur über die Besetzung der ABE I stattfindet. Der  $K_i$ -Wert für Thrombin beträgt 2,3 nM.

Bivalirudin wurde in mehreren klinischen Studien zur Restenoseprophylaxe bei der PTCA sowie beim akuten Koronarsyndrom eingesetzt (HERO 2, REPLACE und CACHET). Es zeigte in beiden Indikationen ein signifikant geringeres Blutungsrisiko bei gleicher Effektivität im Vergleich mit unfraktioniertem Heparin (Steinmetzer *et al.* 2001). Von Vorteil ist ferner, dass kein Monitoring benötigt wird (Bates und Weitz 1998). Die Elimination erfolgt vorwiegend extrarenal, was sich bei Patienten mit Niereninsuffizienz als nützlich erweisen könnte (Robson 2000).

Ein weiterer Thrombininhibitor dieser Klasse ist Dipetarudin. Es besteht aus der N-terminalen Dipetalogastin II<sup>1-48</sup>-Domäne und einem Hirudin<sup>55-65</sup>-Peptid, die durch einen aus fünf Glycinresten bestehenden Linker verbunden sind. Dipetarudin besitzt ein Molekulargewicht von 7,6 kDa und eine Inhibitionskonstante von 446 fM (Lopez *et al.* 2003). Aufgrund seiner vielversprechenden pharmakokinetischen Eigenschaften könnte es supportiv in der Therapie thrombinsensitiver Tumoren zum Einsatz kommen (Lopez und Nowak 2004).

## 5 Ziele der Arbeit

Dipetalogastin II ist ein direkter Thrombininhibitor mit einer höheren Thrombinaffinität als rekombinantes Hirudin. Allerdings hat es mit 12,9 kDa ein bedeutend höheres Molekulargewicht als Hirudin (7,0 kDa) und ist nicht spezifisch, da es in hohen Konzentrationen auch eine Hemmung von Plasmin und Trypsin zeigt. Eine deutliche Molekulargewichtsreduktion kann durch den Ersatz der vermutlich ABE I-bindenden C-terminalen Dipetalogastin II-Domäne durch ein kleineres, ABE I-bindendes Hirudin-Segment erzielt werden. Damit kann das antigene Potential reduziert und somit das therapeutische Profil verbessert werden. Die Spezifität kann hingegen durch Modifikation des P1-Aminosäurerestes erhöht werden (Lopez 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen zwei Varianten (Var-1 und Var-2) eines neuen chimären Thrombininhibitors, bestehend aus dem Dipetalogastin II<sup>1-58</sup>- und dem Hirudin<sup>55-65</sup>-Segment, charakterisiert werden. Der Unterschied zwischen den beiden Inhibitorvarianten besteht im P1-Aminosäurerest, welcher bei Var-1 ein Argininrest und bei Var-2 ein Histidinrest ist. Weiterhin soll ein neues Expressionssystem für Dipetalogastin II etabliert werden.

Nach Expression und Reinigung sollen die rekombinanten Inhibitoren Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II biochemisch charakterisiert, der Einfluss der unterschiedlichen P1-Aminosäurereste auf die Inhibitorspezifität evaluiert und die antikoagulatorische Aktivität in verschiedenen Gerinnungstests untersucht werden. Die pharmakokinetischen Eigenschaften der Inhibitoren sollen schließlich im Tierexperiment ermittelt werden.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Material

#### 6.1.1 Bakterien

Der Bakterienstamm *E.coli* JM105 (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) mit dem Genotyp *thi, rpsL, endA, sbcB15, hsdR4, SupE, Δ(lac-proAB)/F'* [*traD36, proAB*<sup>+</sup>, *Lacβ LacZΔM15*] wurde zur Herstellung von kompetenten Zellen für die Transformation verwendet.

Die bereits mit dem Expressionsplasmid für Variante 1 (Var-1) und Variante 2 (Var-2) transformierten Bakterien wurden freundlicherweise von Dr. M. López (Arbeitsgruppe „Pharmakologische Hämostaseologie“, Friedrich-Schiller-Universität Jena) zur Verfügung gestellt.

#### 6.1.2 Nukleinsäuren und Nukleotide

##### Plasmide

pDipV/6	pBluescript II KS (+/-) Phagemid mit Dipetalogastin-cDNA (Mende <i>et al.</i> 1999)
pGEX-5X-1	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

##### PCR-Primer

EXP1	<i>EcoRI</i> 5'-CTC <b>GAA TTC</b> CAG GGG AAT CCT TGT-3'
EXPR5	<i>NotI</i> 5'-GCG ATA <b>GCG GCC GCC</b> TTG GTT TCC GGA TGA-3'

Beide PCR-Primer wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg) synthetisiert.

##### Sequenzierungs-Primer

pGEX5'-Seq-Primer	5'-GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG-3'
pGEX3'-Seq-Primer	5'-CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG-3'

Die Sequenzierungsprimer wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg) hergestellt. Sie sind mit dem Fluoreszenzfarbstoff 5'IRDye<sup>TM</sup> 800 markiert.

##### Marker-DNA

Lambda-DNA	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
------------	--

## Nukleotide

ATP	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Deoxynucleotide Solution Set	New England Biolabs Inc., Beverly, USA

### 6.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
$\alpha$ -Chymotrypsin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ecarin	Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz
<i>EcoRI</i>	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Faktor Xa	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
<i>HindIII</i>	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
<i>NotI</i>	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Plasmin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ribonuklease A	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Taq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
$\alpha$ -Thrombin	Kordia Laboratory Supplies, Leiden, Niederlande
Trypsin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Die Lösung und Verdünnung von Thrombin erfolgte in einem Puffer mit 250 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  und 0,05 % BSA, die von Ecarin in 0,154 M NaCl. Die restlichen Enzyme wurden, wenn nicht bereits in gelöster Form bezogen, in Aqua bidest gelöst. Die Lagerung gelöster Enzyme erfolgte grundsätzlich bei  $-80^\circ\text{C}$ .

### 6.1.4 Chromogene Substrate

Chromogenes Substrat	Hersteller
Pefachrom TH	Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz
S-2238	Chromogenix Instrumentation Laboratory, Mölndal, Schweden
S-2251	Chromogenix Instrumentation Laboratory, Mölndal, Schweden
S-2586	Chromogenix Instrumentation Laboratory, Mölndal, Schweden
S-2765	Chromogenix Instrumentation Laboratory, Mölndal, Schweden

### 6.1.5 Standard-Plasma

Gefrorenes Frischplasma (FFP) wurde vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes, Gera bezogen. Plasmen von zehn gesunden Spendern (jeweils 250 ml) wurden nach dem Auftauen zu einem Pool vereinigt und nach Aliquotierung bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

### 6.1.6 Lösungen und Puffer

Puffer / Lösung	Zusammensetzung (bzw. Hersteller)	pH
Coomassie Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig	
Coomassie Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig	
Faktor Xa Spaltungspuffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl <sub>2</sub>	7,5
Glutathion-Elutionspuffer	10 mM reduziertes Glutathion, 50 mM Tris-HCl	8,0
Ladepuffer (Agarose-Gele)	2,5 g/l Bromphenolblau, 400 g/l Saccharose	
Ladepuffer (SDS-PAGE)	350 mM Tris-HCl, 600 mM Dithiothreitol, 102,8 g/l SDS, 0,12 g/l Bromphenolblau, 36 % (v/v) Glycerol	
10x PBS	1,4 M NaCl, 27 mM KCl, 101 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,3
Puffer A	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 0.1 % (w/v) PEG 6000	8,0
Puffer B	50 mM Tris-HCl, 0,154 M NaCl	7,5
STET	235 mM Saccharose, 50 mM Tris, 50 mM EDTA, 5 % (v/v) Triton X-100	8,0
50x TAE	2 M Tris, 57,1 ml/l Eisessig, 50 mM EDTA	8,0
10x TBE long-run buffer	1,34 M Tris, 450 mM Borsäure, 25 mM EDTA	8,3 – 8,7 (bei 50°C)
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA	8,0
10x Tris/Glycine/SDS buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München	

### 6.1.7 Medien

Medium	Zusammensetzung	pH
LB	10 g/l Pepton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl	7,0
LBA	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin	7,0
2xYT	16 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl	7,0
2xYTA	2xYT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin	7,0

Die Sterilisation der Medien erfolgte durch Autoklavieren. Zur Herstellung von Platten mit Festmedium wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) hinzugefügt. Ampicillin wurde erst nach Abkühlung des Mediums auf 50°C zugegeben.

### 6.1.8 Kits und gebrauchsfertige Komponenten

Bezeichnung	Hersteller
Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bradford reagent	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bulk GST Purification Module	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
PD-10 Desalting columns	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England BioLabs Inc., Beverly, USA
Prionex	Pentapharm Ltd., Basel, Schweiz
QiaexII Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tygon S-54-HL Katheter	Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, USA
T4-DNA-Ligations-Kit	Life Technologies GmbH, Eggenstein
Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

### 6.1.9 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethylurethane	Philopharm GmbH, Quedlinburg
Glutathion, reduziert	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
Hirudin (Refludan <sup>®</sup> )	Schering AG, Berlin
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat 3,13%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Triton X-100	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Alle anderen Chemikalien wurden, wo immer möglich in p.a. Qualität, von folgenden Firmen bezogen: BioRad Laboratories GmbH (München), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) sowie der SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg).

### 6.1.10 Versuchstiere

Die Zulassung der Tierversuche erfolgte durch das Thüringer Landesverwaltungsamt (Reg.-Nr. 02-65/94). Für die pharmakokinetischen Untersuchungen wurden ausschließlich weibliche Ratten des Wistar-Stammes JEN-WIST (Institut für Versuchstierkunde, Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena) mit einem Körpergewicht von 200 bis 250 g verwendet. Die Tiere erhielten Standardfutter und Wasser ad libitum. Sie wurden frühestens nach 4 Tagen Habituation dem Experiment zugeführt.

### 6.1.11 Geräte

Gerät	Hersteller
476 A Protein sequencer	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Branson Sonifier 250	G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Cell-Dyn 1600	Abbott Laboratories, Abbott Park, USA
Christ LOC-1m, Alpha 2-4	Christ AG, Osterode
CL4 Koagulometer	Behnk-Elektronik, Norderstedt
Coatron M2	TECO GmbH, Neufahrn
GFL 3032 Schüttelinkubator	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
KC4A Koagulometer	H. Amelung GmbH, Lemgo
Kelvitron t Brutschrank	Heraeus, Hanau
Kompact Probe MALDI-TOF	Kratos Analytical, Manchester, UK
LI-COR DNA analyzer Gene ReadIR 4200	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Micromax Mikrozentrifuge	International Equipment Company, Needham Heights, USA
Precidor Infusionspumpe	Infors AG, Bottmingen-Basel, Schweiz
REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Shimadzu LC-10A	Shimadzu, Dortmund
Shimadzu LC-8A	Shimadzu, Dortmund
Sigma 3K12 Kühlzentrifuge	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Specord M400 Photometer	Carl Zeiss GmbH, Jena
Specord S10 Photometer	Carl Zeiss GmbH, Jena
Speed Vac Plus SC110A	Savant Instruments Inc., Farmingdale, USA
TI3 Transilluminator	Biometra, Göttingen
Trio-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Wasserbad	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

## **6.2 Methoden**

### **6.2.1 Allgemeine Techniken**

#### 6.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Hierfür wurden horizontale 1 %ige (w/v) Agarose-Gele verwendet. Zu deren Herstellung wurde Agarose in 1X TAE Puffer gegeben und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung erhitzt. Nach Abkühlung auf 60°C wurde die Lösung in eine Gelform gegossen und nach dem Erhärten in die mit 1X TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt.

Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden, nach Zugabe von 0,1 Volumenanteilen Ladepuffer, auf das Gel aufgetragen. Ebenso *HindIII* geschnittene Lambda-DNA, welche als Größenstandard diente. Die Auftrennung erfolgte bei 75 Volt über 60 Minuten. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid (0,3 µg/ml in 1X TAE-Puffer) 15 Minuten gefärbt und nach Abspülen mit Wasser unter UV-Licht (254 nm) analysiert. Die Dokumentation erfolgte mittels Photographie.

#### 6.2.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Es wurden 12 %ige Gele verwendet. Zu 10 µl Probe wurden 5 µl Ladepuffer gegeben und anschließend der Ansatz bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Nach dem Auftragen der Proben sowie eines Proteinstandards erfolgte die Auftrennung bei 200 Volt für 40 Minuten. Gefärbt wurde mit der Coomassie-Färbelösung für 20 Minuten, entfärbt mit der Coomassie-Entfärbelösung für mindestens 30 Minuten. Zur Dokumentation wurden die Gele in Cellophan-Folie (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

### **6.2.2 Mikrobiologische Techniken**

#### 6.2.2.1 Herstellung bakterieller Dauerkulturen

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden 0,2 ml steriles Glycerol zu 0,8 ml einer Übernachtskultur der Bakterien hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen erfolgte die Aufbewahrung bei -80°C.

### 6.2.2.2 Kultivierung von Bakterien auf Festmedium

Bakterien aus Dauerkulturen wurden vor ihrer weiteren Verwendung mittels einer sterilen Platin-Impföse auf Agarplatten mit geeignetem Festmedium ausgestrichen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Platten für maximal 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

### 6.2.2.3 Kultivierung von Bakterien in Flüssigmedium

Flüssigkulturen wurden bei der Plasmidisolation, der Proteinexpression, sowie der Herstellung kompetenter Zellen verwendet. Wenn bei den entsprechenden Methoden nicht anders angegeben, erfolgte die Anzucht bei 37°C und 220 rpm.

Das Flüssigmedium wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie von der Oberfläche einer Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher angeimpft. Bei Verwendung einer Vorkultur wurde diese nach adäquater Anzucht im Schüttelinkubator 1:100 bzw. 1:500 in die Hauptkultur verdünnt. Plasmidtragende Bakterien wurden generell in ampicillinhaltigen Selektivmedien (100 µg/ml) kultiviert.

## 6.2.3 Molekularbiologische Techniken

### 6.2.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Für die Reinigung kleinerer Plasmidmengen aus *E.coli* wurde eine Modifikation der „Boil-Lysis“-Methode (Holmes und Quigley 1981) verwendet. Da mit dieser eine einfache und schnelle Präparation von Plasmiden aus einer großen Zahl von Bakterienkulturansätzen möglich ist, kam sie bei der Überprüfung von DNA-Klonierungen zum Einsatz.

Eine Übernachtskultur (1,9 ml) wurde bei 10.000g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 140 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozym (10 mg/ml in TE-Puffer) und gründlicher Durchmischung der Proben mit dem Vortexer wurde für exakt 2 Minuten bei 95°C inkubiert. Es folgte eine sofortige Zentrifugation bei 4°C. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und 1,5 µl RNase (2 mg/ml) zum verbliebenen Überstand gegeben. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 Minuten erfolgte die Fällung der DNA mit Isopropanol wie in 6.2.3.4 beschrieben. Die Analyse der DNA erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

### 6.2.3.2 Plasmidisolation mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit

Zur Isolation größerer Plasmidmengen wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet. Die Reinigung der Plasmide erfolgte aus einer 100 ml Übernachtskultur gemäß den Angaben des Herstellers. Ausbeute und Reinheit der Präparation wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### 6.2.3.3 Restriktionsverdau von DNA

Das Schneiden von DNA mit Typ II Restriktionsendonukleasen kam bei der Vorbereitung von Vektor und Insert für die Ligation sowie bei der Überprüfung des Erfolgs von Ligationen und Transformationen zum Einsatz. Die Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 3 Stunden beim Temperaturoptimum des Enzyms. Nach Fällung mit Ethanol (6.2.3.4) wurde die DNA in Aqua bidest gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 6.2.3.4 Fällung von DNA

Um DNA zu konzentrieren, wurde diese entweder mit Ethanol oder mit Isopropanol gefällt. Bei der Fällung mit Ethanol wurden 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2 Volumina 100 %iges Ethanol der Probe hinzugegeben und diese danach für mindestens 2 Stunden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Fällung mit Isopropanol erfolgte hingegen durch Zugabe von 2 Volumina Isopropanol und einer mindestens einstündigen Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die gefällte DNA wurde 25 Minuten mit 12.000 g bei  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und das resultierende Pellet mit kaltem 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen. Das trockene Pellet wurde schließlich in Aqua bidest gelöst.

### 6.2.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die für Dipetalogastin II kodierende cDNA wurde mittels PCR vor ihrer Klonierung amplifiziert. Als Template diente das *Hind*III-linearisierte Plasmid pDipV/6 und als Primer EXP1 und EXP5 (6.1.2). Die PCR wurde mit dem Taq DNA Polymerase Kit nach den Herstellerangaben bei einer  $\text{MgCl}_2$  Konzentration von 4 mM durchgeführt. Die Denaturierung fand für 60 Sekunden bei  $94^{\circ}\text{C}$ , das Annealing für 90 Sekunden bei  $60^{\circ}\text{C}$  und die Extension für 150 Sekunden bei  $72^{\circ}\text{C}$  statt. Dieser Zyklus wurde insgesamt 29-mal wiederholt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem QiaexII Gel Extraction Kit (6.2.3.6) aus dem Gel isoliert.

### 6.2.3.6 DNA-Isolation aus Agarose-Gelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des QiaexII Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers.

### 6.2.3.7 Ligation

Ligationen wurden mit dem T4-DNA-Ligations-Kit entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierbei wurden die mit *Eco*RI und *Not*I restringierten PCR-Produkte und der

ebenso restringierte Vektor pGEX-5X-1 im Verhältnis 3 zu 1 eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde direkt für die Transformation verwendet (6.2.3.9).

#### 6.2.3.8 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurden 2 ml 2xYT-Medium mit einer Einzelkolonie von *E.coli* JM105 angeimpft und bei 37°C für 16 Stunden kultiviert. 0,5 ml dieser Vorkultur wurden in 50 ml 2xYT-Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,25-0,3 weiterkultiviert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (8 Minuten bei 2500 rpm, 4°C) und das Pellet in 20 ml 0,1M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Es folgte eine 45-minütige Lagerung auf Eis. Nach Zentrifugation (10 Minuten bei 2500 rpm, 4°C) wurde das Pellet in 4 ml einer 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 30 % (v/v) Glycerol resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Je 100 µl der kompetenten Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und danach sofort bei -80°C gelagert.

#### 6.2.3.9 Transformation

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 10 µl des Ligationsansatzes (6.2.3.7) hinzugefügt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte für exakt 90 Sekunden eine Erhitzung auf 42°C im Wasserbad. Sofort nach diesem Hitzeschock wurden die Zellen für 2 Minuten wieder auf Eis gelagert und danach in 900 µl 2xYT-Medium für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt, um eine Regeneration der Zellen und die Ausbildung des plasmidkodierten Resistenzmarkers zu ermöglichen. Aliquots von 50 bis 200 µl wurden anschließend auf vorgewärmte 2xYTA-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Minipräparation der Plasmid-DNA (6.2.3.1) und anschließender Restriktionsanalyse mit *EcoRI* und *NotI* überprüft. Die Plasmide der positiven Klone wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit isoliert und die DNA-Sequenz des Inserts anschließend, wie unter 6.2.3.10 beschrieben, bestimmt.

#### 6.2.3.10 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen erfolgten mit der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.* 1977). Die Sequenzierungs-PCR wurde mit dem Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kit nach den Herstellerangaben unter Verwendung der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primer pGEX5'-Seq und pGEX3'-Seq durchgeführt. Die Denaturierung erfolgte 15 Sekunden bei 95°C, das Annealing 30 Sekunden bei 68°C und die Extension 30 Sekunden bei 70°C. Dieser Zyklus wurde 29-mal wiederholt. Anschließend wurde 1 µl der Ansätze auf ein 6 %iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mit einem LI-COR DNA Sequencer 4200 analysiert.

## 6.2.4 Herstellung der rekombinanten Thrombininhibitoren

### 6.2.4.1 Expression

Die rekombinanten Proteine wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert. Eine Übernacht-Vorkultur des benötigten *E. coli* Expressionsstammes wurde 1:100 in 2xYTA Medium verdünnt. Nach Kultivierung der Hauptkultur (30°C, 220 rpm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 wurde durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) die Expression induziert. Nach weiteren 4 bis 5 Stunden Inkubation wurden die Bakterien abzentrifugiert (5500 rpm für 20 Minuten bei 4°C) und das Bakterienpellet in PBS-Puffer gelöst.

### 6.2.4.2 Reinigung der GST-Fusionsproteine

Die Bakterien wurden durch Ultraschallbehandlung mit einem Branson Sonifier 250 aufgeschlossen. Um die Lösung der Proteine zu unterstützen, wurde Triton X-100 dem Lysat hinzugegeben (Endkonzentration 1% v/v) und dieser Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Danach wurden die Zelltrümmer und unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (5500 rpm für 20 Minuten bei 4°C) abgetrennt und der Überstand affinitätschromatographisch mit dem GST Gene Fusion System nach den Herstellerangaben gereinigt. Als Elutionspuffer diente hierbei 10 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0). Der Erfolg der Reinigung wurde regelmäßig mittels SDS-PAGE überprüft. Das Eluat wurde mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert und anschließend lyophilisiert. Nach Lösung in Aqua bidest wurde die Proteinausbeute mit der Bradford-Methode bestimmt, da diese auch in Anwesenheit von Glutathion anwendbar ist (Bradford 1976).

### 6.2.4.3 Faktor Xa Spaltung

Zur Entfernung des GST-Anteils der Fusionsproteine erfolgte eine Spaltung mit Faktor Xa (FXa). Da Glutathion die Effizienz der FXa-Spaltung herabsetzt, wurden sämtliche Proben vorher mittels Größenausschlusschromatographie mit PD-10 Desalting columns vom Glutathion befreit und in den FXa-Spaltungspuffer überführt. In Pilotexperimenten wurde für jedes Protein diejenige FXa-Aktivität bestimmt, mit welcher eine optimale Spaltung erzielt wurde. Diese lag zwischen 3 und 6 Einheiten FXa pro Milligramm Fusionsprotein. Die Spaltung mit FXa erfolgte für 16 Stunden bei Raumtemperatur.

### 6.2.4.4 Reinigung der rekombinanten Proteine

Die Hochreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte durch *reversed phase* HPLC mit einem Shimadzu LC-8A HPLC System und einer Vydac C<sub>18</sub> Säule (25,0 x 2,2 cm). Ein linearer Gradient wechselte in 122 Minuten von 5 % auf 60 % Acetonitril in Wasser (mit

0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)) bei einer Flußrate von 10 ml/min. Der betreffende Peak wurde gesammelt und das Acetonitril mit einer Speed Vac Plus SC110A über 90 Minuten abgedampft. Nach einer mindestens 24stündigen Lagerung bei -80°C wurden die Proben lyophilisiert. Die Resuspension der Proteine erfolgte in Aqua bidest.

## 6.2.5 Biochemische Techniken

### 6.2.5.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

#### 6.2.5.1.1 BCA

Proteinkonzentrationen wurden mit der BCA-Methode (Smith *et al.* 1985) nach dem Sigma Protokoll TPRO-562 bestimmt. BSA diente hierbei als Proteinstandard.

#### 6.2.5.1.2 Active Site Titration

Die Konzentration von slow, tight-binding Inhibitoren (6.2.5.4) wurde mittels Active Site Titration bestimmt (Dang und Di Cera 1994). Inhibitor und Thrombin wurden hierfür in Puffer A verdünnt, wobei die Konzentration des Inhibitors konstant gehalten und die Thrombinkonzentration zwischen 175 und 375 pM variiert wurde. Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 25°C inkubiert um eine Gleichgewichtseinstellung zu ermöglichen. Die Reaktion wurde durch Zugabe des chromogenen Thrombin-Substrats S-2238 (Endkonzentration 50 µM) gestartet und die Zunahme der optischen Dichte bei 405 nm über 8,5 Minuten mit einem Specord S 10 Spektrophotometer gemessen. Die Temperatur des Reaktionsansatzes wurde während der Messung konstant bei 25°C gehalten. Die Auswertung erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Dang und Di Cera 1994).

Die Konzentration des verwendeten Thrombins wurde vorher ebenfalls mittels Active Site Titration bestimmt. Hierfür wurde die Thrombinkonzentration im Ansatz konstant gehalten und gegen Hirudin bekannter Konzentration titriert (Endkonzentration 0 bis 225 pM).

### 6.2.5.2 N-terminale Proteinsequenzierung

Die N-terminale Aminosäuresequenz der Inhibitoren wurde mit einem Proteinsequenzer Modell 476A durch automatisierte Edman-Degradation nach den Vorschriften des Herstellers bestimmt.

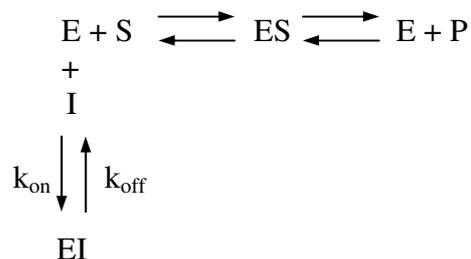
### 6.2.5.3 Massenspektrometrie

Die Molekularmassen der rekombinanten Proteine wurden mittels MALDI-TOF auf einem Kompact Probe Massenspektrometer bestimmt. Als Trägermatrix diente eine gesättigte Lösung von  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure in 50 % Acetonitril mit 0,1% TFA. 1 µl Matrix wurde auf der Probenplatte getrocknet und mit 1 µl Probe überschichtet und nochmals

getrocknet. Nach erneuter Überschichtung mit 1  $\mu$ l Matrix und Trocknung erfolgte die Messung. Als Proteinstandards für die Kalibrierung dienten Rinderinsulin (MW = 5.733,5 Da) und Myoglobin (MW = 16.951,5 Da).

#### 6.2.5.4 Bestimmung der Inhibitionskonstanten

Enzyminhibitoren vermindern durch Interaktion mit Enzymen deren katalytische Aktivität. Abhängig von der Bindungsstelle am Enzymmolekül werden dabei kompetitive von nichtkompetitiven Inhibitoren unterschieden. Kompetitive Inhibitoren (I) binden an das aktive Zentrum des Enzyms (E) und treten somit in direkte Konkurrenz zum Substrat (S):



P repräsentiert das Produkt,  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  die Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation bzw. Dissoziation. Bei nichtkovalenter Bindung des Inhibormoleküls an das Enzym ist die Enzyminhibition reversibel. Es stellt sich zwischen freiem Enzym, ungebundenem Inhibitor und Enzym-Inhibitor-Komplex (EI) ein Gleichgewicht ein, welches durch die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes  $K_i$  (Inhibitionskonstante) charakterisiert ist. Nach Morrison können reversible Enzyminhibitoren, wie in Tabelle 6-1 dargestellt, in 4 Klassen eingeteilt werden (Morrison 1982):

**Tabelle 6-1: Klassifikation reversibler Enzyminhibitoren (Morrison 1982).**  $[I_t]$  und  $[E_t]$  entsprechen den Gesamtkonzentrationen an freiem und gebundenem Inhibitor bzw. Enzym.

Inhibitor-Typ	Verhältnis $[I_t]$ zu $[E_t]$	Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung $\text{E} + \text{I} \rightleftharpoons \text{EI}$
klassisch kompetitiv	$[I_t] \gg [E_t]$	Schnell
tight-binding	$[I_t] \cong [E_t]$	Schnell
slow-binding <sup>1</sup>	$[I_t] \gg [E_t]$	Langsam
slow, tight-binding	$[I_t] \cong [E_t]$	Langsam

<sup>1</sup>) werden auch als zeitabhängige Inhibitoren bezeichnet

Die Berechnung der Inhibitionskonstanten ( $K_i$ ) erfolgte in Abhängigkeit vom jeweiligen Inhibitor-Typ. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren folgten entweder einer klassisch kompetitiven bzw. einer slow, tight-binding Kinetik.

#### 6.2.5.4.1 Slow, tight-binding Inhibition

Zur Bestimmung des  $K_i$ -Wertes von slow, tight-binding Inhibitoren wurde eine, in der Literatur für Hirudin beschriebene, amidolytische Methode modifiziert (Stone und Hofsteenge 1986). Der zu untersuchende Inhibitor (Endkonzentration 0 - 300 pM) und das chromogene Substrat S-2238 (Endkonzentration 30  $\mu$ M) wurden in Puffer A verdünnt und die Reaktion durch Zugabe von Thrombin (Endkonzentration 77,5 pM) gestartet. Die Spaltung von S-2238 wurde mit einem S10 Spektrophotometer bei 405 nm über 10 Minuten gemessen und die Verlaufskurve zur weiteren Auswertung aufgezeichnet. Die Temperatur des Ansatzes wurde während der Messung konstant bei 25°C gehalten.

Verlaufskurven für mindestens 5 verschiedene Inhibitorkonzentrationen wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse nach der Theorie für slow, tight-binding Inhibitoren ausgewertet (Morrison und Stone 1985):

$$\text{Gleichung 1:} \quad [P] = v_s t + \frac{(v_0 - v_s)(1 - \gamma)}{k_{\text{obs}} \gamma} \ln \frac{1 - \gamma e^{-k_{\text{obs}} t}}{1 - \gamma}$$

$v_0$  ist hierbei die initiale Reaktionsgeschwindigkeit, welche der Reaktionsgeschwindigkeit ohne Inhibitorzugabe entspricht.  $v_s$  ist die Reaktionsgeschwindigkeit nach Gleichgewichtseinstellung,  $k_{\text{obs}}$  die Geschwindigkeitskonstante pseudoerster Ordnung, sowie  $P$  die Produktkonzentration zum Zeitpunkt  $t$ .

Der Faktor  $\gamma$  korreliert mit dem scheinbaren  $K_i$  ( $K_i'$ ), der Gesamtzymkonzentration ( $E_t$ ) und der Gesamtinhibitorkonzentration ( $I_t$ ) wie in Gleichung 2 dargestellt. Er berücksichtigt die Abnahme des freien Inhibitors infolge der Bindung an Thrombin.

$$\text{Gleichung 2:} \quad \gamma = \frac{K_i' + E_t + I_t - \sqrt{(K_i' + E_t + I_t)^2 - 4E_t I_t}}{K_i' + E_t + I_t + \sqrt{(K_i' + E_t + I_t)^2 - 4E_t I_t}}$$

Die Werte von  $v_s$  (ermittelt nach Gleichung 1) wurden in Gleichung 3 eingesetzt um  $K_i'$  zu erhalten.

$$\text{Gleichung 3:} \quad v_s = \frac{v_0}{2E_t} \left[ \sqrt{(K_i' + I_t - E_t)^2 + 4K_i' E_t} - (K_i' + I_t - E_t) \right]$$

Aus  $K_i'$  konnte dann der wahre  $K_i$ -Wert anhand der in Gleichung 4 dargestellten Beziehung ermittelt werden, wobei  $S$  für die Substratkonzentration im Reaktionsansatz steht.

$$\text{Gleichung 4:} \quad K_i' = K_i \left[ 1 + \frac{S}{K_m} \right]$$

$k_{\text{on}}$  wurde, unter Verwendung der mit Gleichung 1 ermittelten Werte für  $k_{\text{obs}}$ , nach Gleichung 5 berechnet.

$$\text{Gleichung 5: } k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{on}} K_m \sqrt{(K_i + E_t + I_t)^2 - 4E_t I_t}}{K_m + S}$$

$k_{\text{off}}$  ergab sich aus dem in Gleichung 6 dargestellten Zusammenhang.

$$\text{Gleichung 6: } K_i = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$$

#### 6.2.5.4.2 Klassisch kompetitive Inhibition

Drei verschiedene Konzentrationen von S-2238 (Endkonzentration 15, 24 und 75  $\mu\text{M}$ ) wurden mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (Endkonzentration 0, 100, 200, 300 und 400 pM) in Puffer A kombiniert. Durch Zugabe von Thrombin (Endkonzentration 155 pM) wurde die Reaktion gestartet und die Verlaufskurve über 8,5 Minuten mit dem Specord S10 Spektrophotometer bei 405 nm aufgezeichnet, wobei die Temperatur des Ansatzes konstant bei 25°C gehalten wurde. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Thrombin-katalysierten Hydrolyse von S-2238 wurden bestimmt, und der  $K_i$ -Wert mittels linearer Regression über den Dixon-Plot berechnet (Dixon 1953). Um das Vorliegen einer kompetitiven Inhibition nachzuweisen, erfolgte auch die Darstellung im Lineweaver-Burk-Diagramm (Lineweaver und Burk 1934).

#### 6.2.5.5 Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante für S-2238

Zur Berechnung der Inhibitionskonstanten für slow, tight-binding Inhibitoren wurde die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) des Thrombin-Substrates S-2238 benötigt (6.2.5.4.1). S-2238 wurde hierfür in verschiedenen Konzentrationen (Endkonzentration 1,5; 3; 6; 9; 18 und 30  $\mu\text{M}$ ) in Puffer A verdünnt und die Reaktion durch Zugabe von Thrombin (Endkonzentration 77,5 pM) gestartet. Die Extinktionszunahme wurde photometrisch mit dem Specord S10 bei 405 nm gemessen. Die Reaktionstemperatur betrug während der gesamten Messung konstant 25°C.

Die ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten ( $v_0$ ) wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen und der  $K_m$ -Wert sowie die Maximalgeschwindigkeit ( $v_{\text{max}}$ ) mittels nichtlinearer Regressionsanalyse nach Gleichung 7 bestimmt. Der  $K_m$ -Wert wurde für jede S-2238-Verdünnung neu ermittelt.

$$\text{Gleichung 7: } v_0 = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

### 6.2.5.6 Untersuchung der Spezifität der Proteaseinhibition

Die Hemmwirkung der rekombinanten Inhibitoren auf die Serinproteasen Thrombin, Faktor Xa, Plasmin, Trypsin und Chymotrypsin wurde über die Messung der amidolytischen Aktivität bestimmt. Hierfür wurden verschiedene Inhibitorkonzentrationen mit dem zu untersuchenden Enzym im Puffer A für 5 Minuten bei 37°C inkubiert (Tab. 6-2). Die Reaktion wurde durch die Zugabe des chromogenen Substrates (CS) gestartet und das durch dessen Spaltung freiwerdende p-Nitroanilin photometrisch bei 405 nm für 10 Minuten mit einem Specord S10 Spektrophotometer gemessen. Die Temperatur des Reaktionsansatzes betrug während der Messung konstant 37°C. Über den Anstieg des resultierenden Graphen konnte die Enzymaktivität in Prozent mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt werden.

**Tabelle 6-2: Eingesetzte Enzym- und Substratkonzentrationen für die Spezifitätsbestimmungen.** Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf den Reaktionsansatz. CS - Chromogenes Substrat

Enzym	Enzymkonzentration	Zugehöriges CS	Konzentration CS
Chymotrypsin	125 pM	S-2586	0,5 mM
Faktor Xa	360 pM	S-2765	0,5 mM
Plasmin	1,3 nM	S-2251	1,0 mM
Thrombin	77,5 pM	S-2238	0,1 mM
Trypsin	500 pM	Pefachrome TH	0,1 mM

## 6.2.6 Koagulometrische Methoden

Die antikoagulatorische Aktivität der Inhibitoren wurde in verschiedenen Gerinnungstests untersucht. Die Messungen erfolgten, mit Ausnahme des Ecarin Chromogenic Assay (6.2.6.4), bei 37°C mit einem KC4A Koagulometer.

### 6.2.6.1 Prothrombinzeit

Die Prothrombinzeit (PT) ist ein Globaltest zur Erfassung des extrinsischen Gerinnungsweges. Als Aktivatorreagenz wurde Thromborel S (Dade Behring GmbH, Marburg) verwendet. Das lyophilisierte Thromborel S wurde nach Herstellerangaben in A. bidest gelöst und anschließend in 10 mM CaCl<sub>2</sub> 1:10 zur Gebrauchslösung verdünnt. 100 µl verschiedener Inhibitorkonzentrationen in Standardplasma wurden 2 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Gebrauchslösung gestartet.

### 6.2.6.2 Aktivierte partielle Thromboplastinzeit

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) dient der Erfassung des intrinsischen Gerinnungsweges. Für verschiedene Inhibitorkonzentrationen in Standardplasma wurden die

Gerinnungszeitverlängerungen mit Actin FS (Dade Behring Vertriebs GmbH, Schwalbach) gemäß den Herstellerangaben gemessen. Die Gerinnung wurde mit 25 mM CaCl<sub>2</sub> initiiert.

#### 6.2.6.3 Ecarin Clotting time

Die Ecarin Clotting Time (ECT) ist eine Methode für das Monitoring direkter Thrombininhibitoren (Nowak und Bucha 1996). 80 µl Inhibitorverdünnung in Plasma wurden zu 200 µl Standard-Plasma gegeben und für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl Ecarin-Lösung (5 EU/ml in 0.154 M NaCl/0.05 M CaCl<sub>2</sub>) gestartet und die Zeit bis zur Gerinnung gemessen.

#### 6.2.6.4 Ecarin Chromogenic Assay

Der Ecarin Chromogenic Assay (ECA) ist ein chromogener Test zur Blutspiegelbestimmung von direkten Thrombininhibitoren (Lange *et al.* 2002). Er ist in zwei Varianten, als ECA-H (zum Monitoring von Hirudin) und als ECA-T (zum Monitoring von direkten Thrombininhibitoren wie Melagatran und Argatroban) kommerziell verfügbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ECA-H Test (Haemochrom Diagnostica, Essen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Messung erfolgte mit einem Coatron M2 Koagulometer.

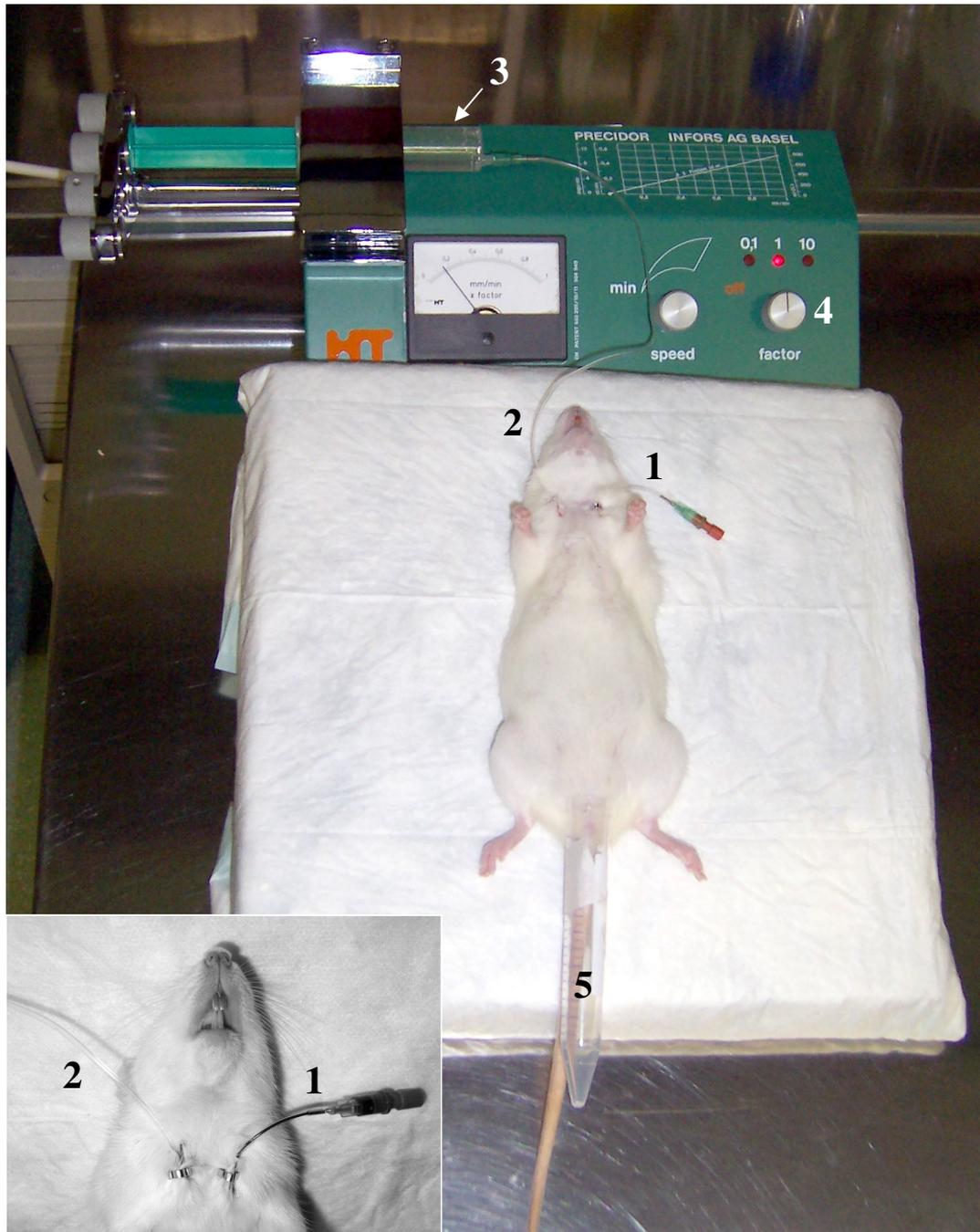
### 6.2.7 Pharmakokinetische Untersuchungen am Rattenmodell

#### 6.2.7.1 Tierexperimentelles Vorgehen

Die Ratten wurden durch intraperitoneale Applikation einer 25 %igen Ethylurethan-Lösung (1,5 g/kg KG) narkotisiert. Für die Gewinnung von Blutproben, die Infusion der Diureselösungen und die i.v. Applikation der Thrombininhibitoren wurden zwei venöse Zugänge angelegt. Dies erfolgte durch Platzierung eines Katheters in die rechte und linke V. jugularis interna (Abb. 6-1). Der linksseitige Katheter wurde ausschließlich für Blutentnahmen verwendet. Die Applikation der Thrombininhibitoren erfolgte entweder intravenös oder subkutan, wobei die Dosis generell 1 mg/kg KG betrug.

Zur Untersuchung der renalen Elimination der Inhibitoren wurde bei einigen Ratten eine bilaterale funktionelle Nephrektomie durchgeführt. Hierfür wurde das Retroperitoneum von dorsal eröffnet und die Nieren freipräpariert. Die Ausschaltung der Nierenfunktion erfolgte durch Ligation des Nierenstiels mit einem chirurgischen Faden. Die Nieren wurden *in situ* belassen und die Wunde mit Clips verschlossen. Damit die Ratten genügend Zeit zur Erholung von diesem Eingriff hatten, wurde das Experiment frühestens nach 2 Stunden gestartet.

Um eine ausreichende Diurese für die nachfolgenden Urinuntersuchungen sicherzustellen, erhielten alle nicht nephrektomierten Ratten eine kontinuierliche Infusion einer Diuresefördernden Lösung. Diese wurde spätestens 30 Minuten vor Inhibitorapplikation gestartet und bis zum Zeitpunkt der letzten Blutentnahme (6.2.7.2) fortgeführt. Die ersten 5 Minuten wurde 20 %iges Mannitol bei einer Infusionsgeschwindigkeit von 12 ml/h verabreicht, danach 5 % BSA in 10 % Mannitol bei 3 ml/min.



**Abbildung 6-1: Photographische Darstellung des Versuchsaufbaus.** 1 – Venenkatheter für Blutentnahme, 2 – Venenkatheter für Infusionen, 3 – Diureselösung, 4 – Infusionspumpe, 5 – Polycarbonatröhrchen zur Uringewinnung. Insert: Zur besseren Darstellung des Blutentnahmekatheters wurde ausnahmsweise Blut im Katheter belassen.

### 6.2.7.2 Gewinnung der Blut- und Urinproben

Blut zur Blutspiegelbestimmung der Inhibitoren wurde über den in der linken V. jugularis liegenden Katheter mit einer Feindosierungsspritze gewonnen. Die Gerinnung wurde durch die sofortige Zugabe von 1 Anteil 3,13 %igem Natriumcitrat auf 9 Anteile Blut gehemmt. Ein routinemäßiges Blutbild mit dem Cell-Dyn 1600 dokumentierte die korrekte Blutentnahme.

Der Zeitpunkt der Blutentnahmen richtete sich nach der Applikationsform der Inhibitoren. Bei i.v. Gabe erfolgten sie bei 2, 5, 10, 20, 30, 60, 120 sowie 180 Minuten nach Inhibitorapplikation, bei s.c. Gabe bei 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 300 und 360 Minuten. Das entnommene Blutvolumen wurde durch Gabe eines gleich großen Volumens Dextran 40 ersetzt.

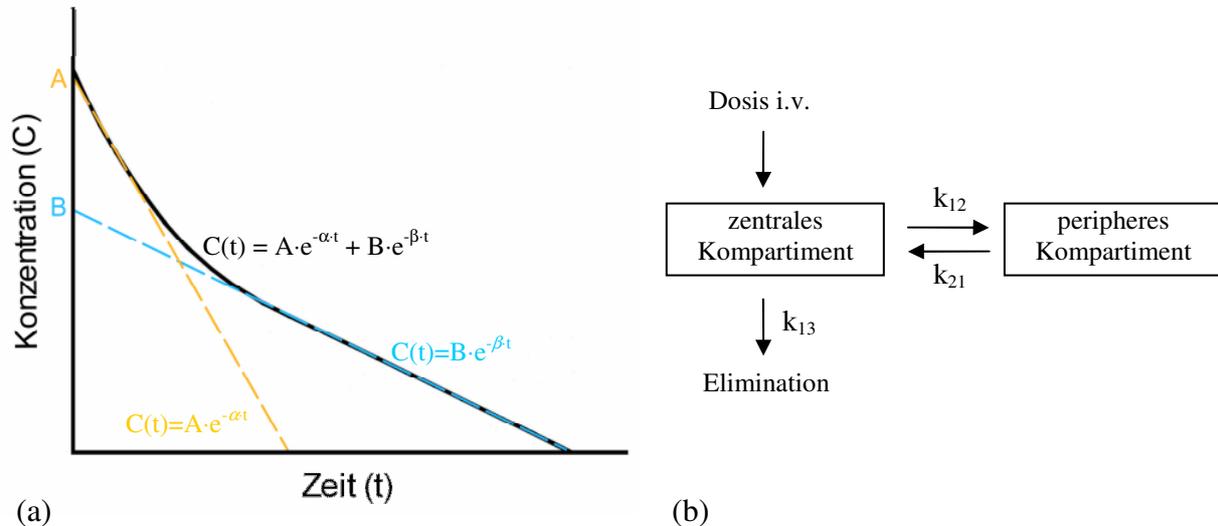
Der Urin wurde, solange Blutproben entnommen wurden, stündlich gesammelt. Danach erfolgte die Sammlung alle 24 Stunden nach Inhibitorapplikation. Der Urin wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für weitere Untersuchungen gelagert.

### 6.2.7.3 Bestimmung der Inhibitorkonzentration

Die Konzentration der Inhibitoren im Blut bzw. die Inhibitoraktivität im Urin wurde mit der Ecarin Clotting Time bestimmt. Für Urinproben wurde wie in der Literatur beschrieben vorgegangen (Nowak und Bucha 1996), für Blutproben wurde die Methode modifiziert. 50  $\mu\text{l}$  Zitratblut (6.2.7.2) wurden hierfür 2 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  Ecarin-Lösung (1 EU/ml in Puffer B mit 0,01 M  $\text{CaCl}_2$  [5mM] und 10% (v/v) Prionex) gestartet und die Zeit bis zur Gerinnung auf einem KC4A Koagulometer gemessen. Bei Gerinnungszeiten über 300 s wurde die Messung mit einer 1:5-Verdünnung der Blutprobe in Standardplasma wiederholt. Anhand von Eichkurven für Blut, Blutverdünnung und Urin konnte schließlich die Inhibitorkonzentration bzw. die Inhibitoraktivität in den entsprechenden Proben ermittelt werden.

### 6.2.7.4 Pharmakokinetische Berechnungen

Die pharmakokinetischen Parameter wurden aus dem zeitlichen Verlauf des Inhibitor-Blutspiegels nach i.v. Applikation bestimmt. Die Auswertung der Daten erfolgte für ein offenes Zweikompartimentmodell, welches durch die biexponentielle Gleichung  $C(t) = A \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t}$  beschrieben wird (Abb. 6-2).



**Abbildung 6-2:** (a) Halblogarithmische Darstellung eines schematisierten Blutspiegel-Verlaufes in einem offenen Zweikompartmentmodell. Die Regressionsgerade der Verteilungsphase ( $\alpha$ -Phase) ist orange, die der Eliminationsphase ( $\beta$ -Phase) blau dargestellt. A bzw. B entsprechen den Schnittpunkten der Regressionsgeraden mit der Ordinate. (b) Schematische Darstellung der Verteilungsvorgänge in einem offenen Zweikompartmentmodell. Die Definitionen der Mikrokonstanten  $k_{12}$ ,  $k_{21}$  und  $k_{13}$  sind im Text angegeben.

Die hierbei verwendeten Formeln (Ritschel 1992) sind im Folgenden aufgeführt:

Gleichung 8:  $C(0) = A + B$

Gleichung 9:  $k_{12} = \frac{A \cdot B \cdot (\beta - \alpha)^2}{C(0) \cdot (A \cdot \beta + B \cdot \alpha)}$

Gleichung 10:  $k_{21} = \frac{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}{C(0)}$

Gleichung 11:  $k_{13} = \frac{C(0)}{A/\alpha + B/\beta}$

Gleichung 12:  $t_{1/2\alpha} = \frac{\ln 2}{\alpha}$

Gleichung 13:  $t_{1/2\beta} = \frac{\ln 2}{\beta}$

Gleichung 14:  $V_c = \frac{D}{C(0)}$

Gleichung 15:  $V_{dss} = \frac{k_{12} + k_{21}}{k_{21}} \cdot V_c$

Gleichung 16:  $Cl_{tot} = \frac{D}{AUC_{0-\infty}}$

$C(0)$  entspricht der Inhibitorkonzentration zum Zeitpunkt 0,  $k_{12}$  der Geschwindigkeitskonstante für die Verteilung vom zentralen zum peripheren Kompartiment,  $k_{21}$  der Geschwindigkeitskonstante für die Verteilung vom peripheren zum zentralen Kompartiment und  $k_{13}$  der Eliminationsgeschwindigkeitskonstante des zentralen Kompartiment.  $t_{1/2\alpha}$  und  $t_{1/2\beta}$  sind die Halbwertszeiten der Verteilungs- bzw. Eliminationsphase. Das Volumen des zentralen Kompartiments ist mit  $V_c$ , die applizierte Dosis mit  $D$ , das Verteilungsvolumen im *steady state* mit  $V_{dss}$ , die Gesamclearance mit  $Cl_{tot}$  und die Gesamtfläche unter der Blutspiegelverlaufskurve mit  $AUC_{0-\infty}$  bezeichnet.

Die Fläche unter der Kurve vom Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt des letzten messbaren Blutspiegels ( $AUC_{0-t_{last}}$ ) wurde nach der Trapezregel berechnet (Ritschel 1992). Hieraus konnte die  $AUC_{0-\infty}$  durch Addition des Quotienten  $C_{last}/\beta$  ermittelt werden.  $C_{last}$  steht hierbei für den letzten messbaren Blutspiegel. Die  $AUC_{0-\infty}$  wurde separat für die i.v. und s.c. Blutspiegelverläufe bestimmt. Hieraus konnte die Bioverfügbarkeit (F) nach subkutaner Applikation wie in Gleichung 17 angegeben ermittelt werden.

Gleichung 17: 
$$F = \frac{AUC_{0-\infty, s.c.}}{AUC_{0-\infty, i.v.}} \times \frac{D_{i.v.}}{D_{s.c.}}$$

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Etablierung eines Expressionssystems für Dipetalogastin II

Die cDNA des Dipetalogastins wurde mit der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Als Matrize diente das *Hind*III-linearisierte Plasmid pDipV/6. Als Primer wurden EXP1 und EXPR5 eingesetzt. Nach Auftrennung des PCR-Produkts durch Agarose-Gelelektrophorese wurde die stärkste Bande mit dem QiaexII Gel Extraction Kit isoliert und anschließend mit *Eco*RI und *Not*I restringiert. Die Klonierung erfolgte in die *Eco*RI/*Not*I-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Expressionsvektors pGEX-5X-1. Das so konstruierte Expressionsplasmid wurde in den *E.coli*-Stamm JM105 transformiert und die korrekte Nukleotidsequenz des Inserts durch DNA-Sequenzierung überprüft.

### 7.2 Proteinexpression und Proteinreinigung

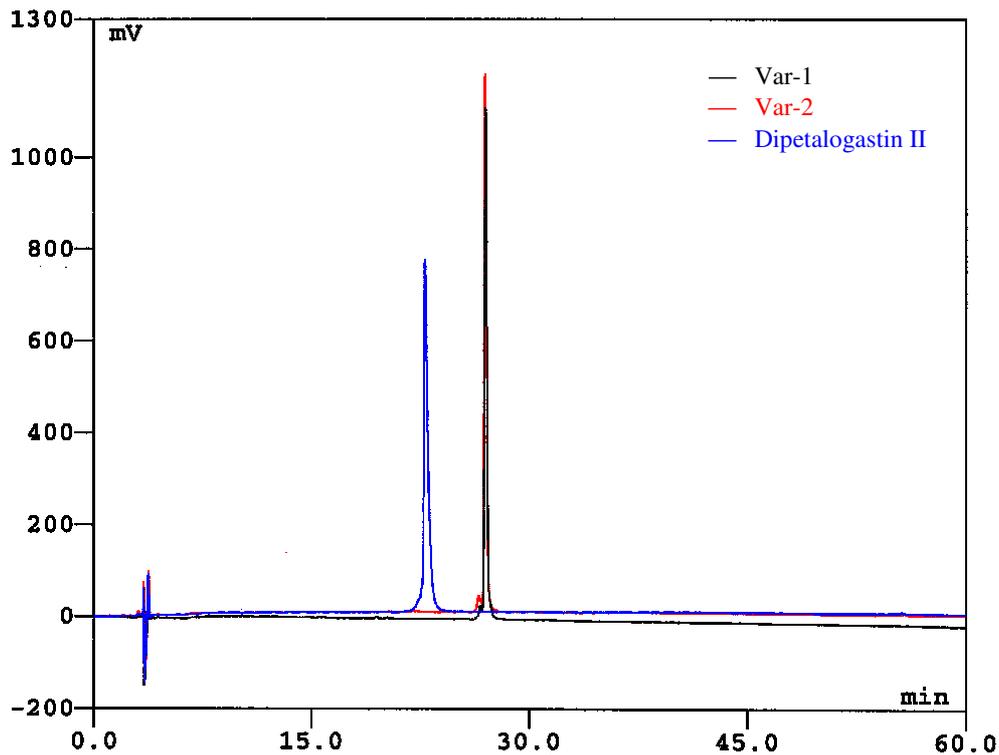
Dipetalogastin II sowie die beiden chimären Thrombininhibitoren Var-1 und Var-2 wurden, wie in 6.2.4 beschrieben, exprimiert und gereinigt. Es konnten insgesamt 20,9 mg Dipetalogastin II, 14,1 mg Var-1 sowie 32,2 mg Var-2 hergestellt werden.

In Abbildung 7-1 sind die von der cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine sowie die Positionen der Disulfidbrücken dargestellt. Var-1 ist ein chimärer Thrombininhibitor, dessen N-terminaler Anteil den ersten 58 Aminosäuren des Dipetalogastin II und dessen C-Terminus dem ABE I-bindenden Hirudin<sup>55-65</sup>-Fragment entspricht. Die Aminosäuresequenz von Var-2 entspricht der von Var-1. Lediglich der Argininrest in der P1-Position (Nomenklatur nach Schechter und Berger (1968)), ist durch einen Histidinrest ersetzt. Alle drei Inhibitoren enthalten das für Kazal-Typ-Inhibitoren typische Motiv VCGxD (Laskowski und Kato 1980).

Die Reinheit der Proteinpräparationen wurde mittels analytischer *reversed phase* HPLC überprüft. Die Reinheit der Proteinpräparationen betrug immer über 97 % (Abb 7-2).

Die korrekte Expression der rekombinanten Inhibitoren wurde durch N-terminale Proteinsequenzierung und Bestimmung des Molekulargewichts nachgewiesen. Erwartungsgemäß waren die rekombinanten Proteine, bedingt durch den Polylinker des Expressionsvektors, N-terminal um die vier Aminosäurereste GIPE und C-terminal um AAAS vergrößert. Die anhand der Aminosäuresequenz berechneten Molekulargewichte korrelierten gut mit den Ergebnissen der MALDI-TOF-Untersuchung (Tab. 7-1).





**Abbildung 7-2: Reversed phase HPLC von gereinigtem Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II.** Die Reinheit der Proteinpräparationen wurde mittels analytischer *reversed phase* HPLC auf einer Machery-Nagel C<sub>18</sub>-Säule (EC 250/4,6 Nucleosil 300-5) überprüft. Die Trennung erfolgte mit einem linearen Gradienten (10 % - 70 % Acetonitril in Wasser mit 0,1% TFA) über 60 Minuten und einem Fluß von 1 ml/min. Die Retentionszeit von Var-1 betrug 26,99 min, von Var-2 26,96 min und von Dipetalogastin II 22,85 min.

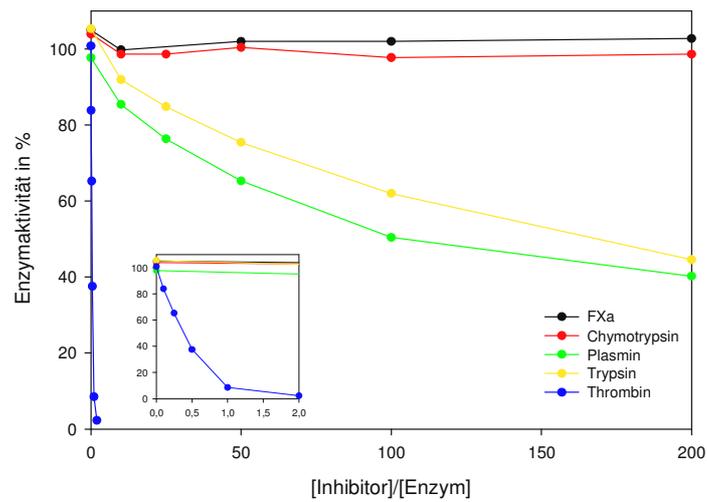
## 7.3 Biochemische Charakterisierung

### 7.3.1.1 Spezifität der Proteaseinhibition

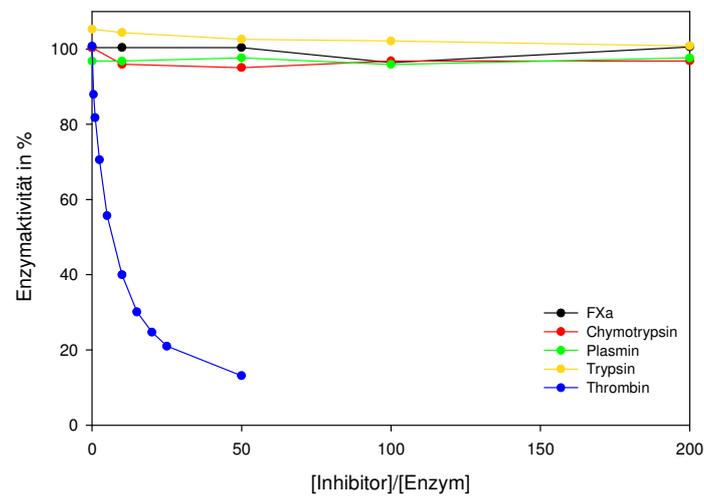
Die Spezifität der Inhibitoren wurde über die Messung der amidolytischen Aktivität verschiedener Serinproteasen in Gegenwart definierter Inhibitorkonzentrationen untersucht (Abb. 7-3).

Var-2 erwies sich als spezifischer Inhibitor von Thrombin. In 200fachem molarem Überschuss von Var-2 über Faktor Xa, Chymotrypsin, Plasmin und Trypsin wurde keine Hemmung dieser Enzyme beobachtet. Bei äquimolaren Konzentrationen von Var-2 und Thrombin wurde eine Thrombinaktivität von 82 % gemessen, bei 50fachem Inhibitorüberschuss betrug die Thrombinaktivität nur noch 13 % (Abb. 7.3 b).

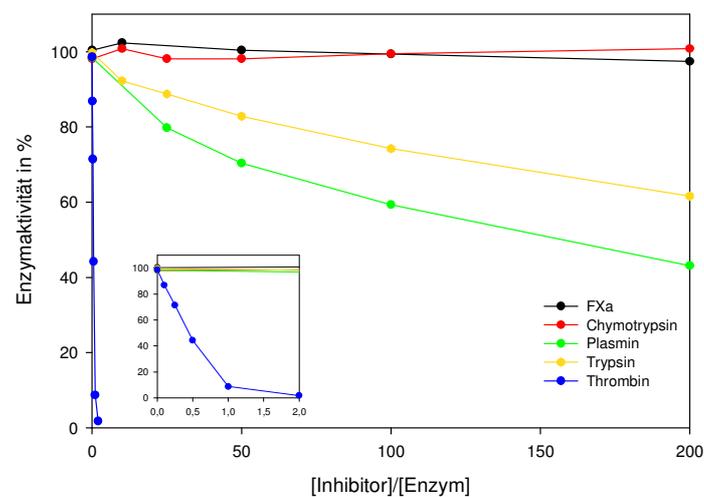
Im Gegensatz zu Var-2 wiesen Var-1 und Dipetalogastin II in sehr hohen Konzentrationen auch eine Hemmung von Plasmin und Trypsin auf, ohne jedoch bei 200fachem molarem Überschuss eine Inhibition um mehr als 60 % zu erzielen. Eine Hemmung von Chymotrypsin oder Faktor Xa trat nicht auf. Var-1 und Dipetalogastin II zeigten weiterhin eine sehr effektive Thrombininhibition, so konnte bereits bei äquimolaren Konzentrationen mit Thrombin eine fast vollständige Hemmung der Thrombinaktivität beobachtet werden (Abb. 7.3 a, c).



(a) Var-1



(b) Var-2



(c) Dipetalogastin II

**Abbildung 7-3: Einfluss der rekombinanten Inhibitoren auf die amidolytische Aktivität verschiedener Serinproteasen.** Im Insert von (a) und (c) ist eine fast vollständige Hemmung der Thrombinaktivität bei äquimolaren Konzentrationen von Var-1 bzw. Dipetalogastin II mit Thrombin zu erkennen.

### 7.3.1.2 Bestimmung der Inhibitionskonstanten

Die Verlaufskurven der thrombinkatalysierten Hydrolyse von S-2238 wurden in Anwesenheit unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen spektrophotometrisch aufgezeichnet. Die für Var-1 und Dipetalogastin II ermittelten Verlaufskurven zeigten initial einen steilen Anstieg. Dieser flachte innerhalb von 300 Sekunden deutlich ab und stabilisierte sich schließlich, in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration, auf einem niedrigeren Niveau. Die hieraus resultierenden konkaven Kurvenformen (Abb. 7.4, 7.5) weisen eine zeitabhängige (sog. slow-binding) Inhibition von Thrombin durch Var-1 und Dipetalogastin II nach.

Weiterhin lag eine tight-binding Kinetik vor, da die Thrombinhemmung bereits bei äquimolaren Konzentrationen von Inhibitor und Enzym auftrat. Var-1 und Dipetalogastin II wurden entsprechend als slow, tight-binding Inhibitoren von Thrombin klassifiziert (Tab. 6-1). Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte nach der Theorie für slow, tight-binding Inhibitoren, wie in 6.2.5.4.1 beschrieben. Die Inhibitionskonstante von Var-1 wurde mit 402 fM und die von Dipetalogastin II mit 137 fM bestimmt (Tab. 7-2).

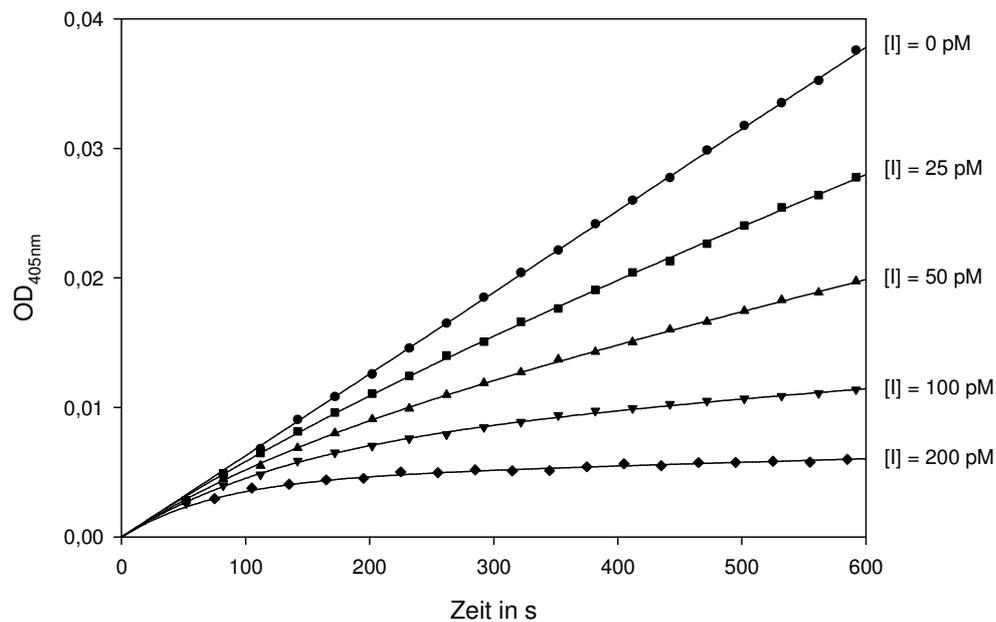
Die Verlaufskurven von Var-2 stellten sich hingegen als Geraden dar. Dies entspricht einer zeitunabhängigen Hemmung von Thrombin durch Var-2 (Abb. 7-6a). Eine signifikante Hemmung der Thrombinaktivität trat, im Gegensatz zu Var-1 und Dipetalogastin II, erst in mehrfachem molarem Überschuss über Thrombin auf. Eine tight-binding Kinetik konnte somit ausgeschlossen werden.

Im Lineweaver-Burk-Diagramm lag der Schnittpunkt der Geraden auf der Ordinate, was einen kompetitiven Hemmmodus nachweist (Abb. 7-6b). Var-2 ist somit ein klassisch kompetitiver Inhibitor von Thrombin. Die Inhibitionskonstante wurde aus dem Dixon-Plot mit einem linearen Regressionsverfahren ermittelt und betrug 17,1 pM (Abb. 7-6c).

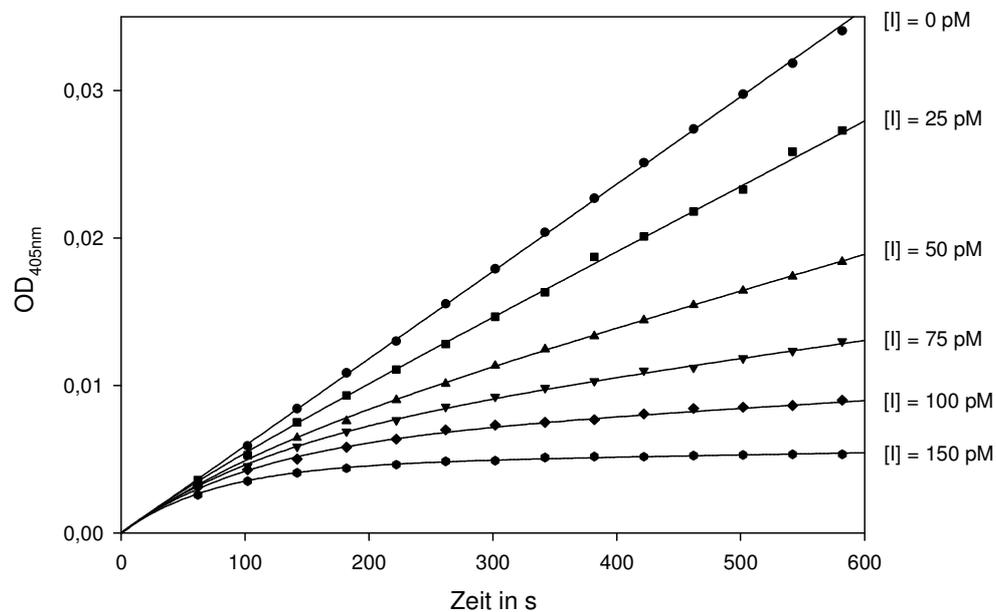
Die kinetischen Parameter aller Inhibitoren sind in Tabelle 7-2 zusammengefasst.

**Tabelle 7-2: Kinetische Parameter der Inhibitoren.** Die Angaben sind Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen. Die Messungen erfolgten bei 25°C. n.u. – nicht untersucht.

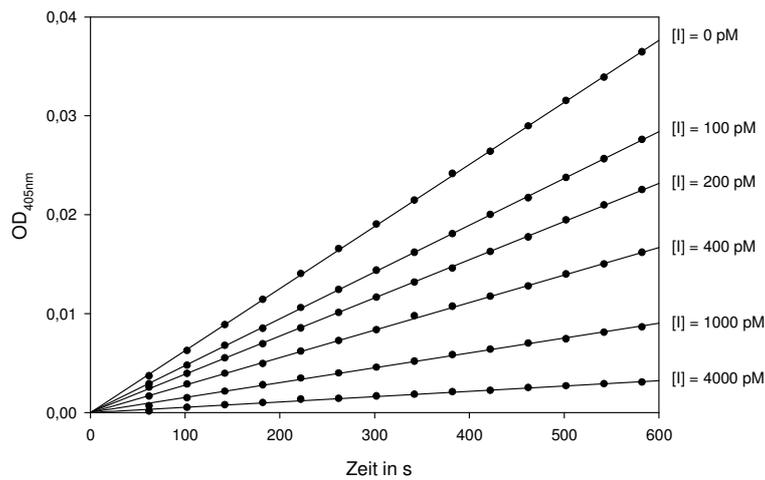
	<b>Inhibitionsmodus</b>	<b>K<sub>i</sub> (10<sup>-12</sup> M)</b>	<b>k<sub>on</sub> (10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	<b>k<sub>off</sub> (10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>)</b>
<b>Var-1</b>	slow, tight-binding	0,402 ± 0,037	13,1 ± 1,3	5,3 ± 0,5
<b>Var-2</b>	klassisch kompetitiv	17,1 ± 0,8	n.u.	n.u.
<b>Dipetalogastin II</b>	slow, tight-binding	0,137 ± 0,038	24,4 ± 2,9	3,3 ± 0,6



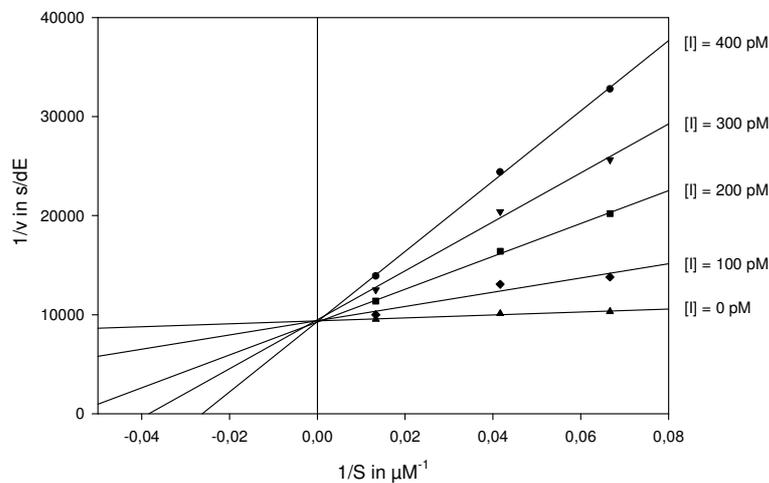
**Abbildung 7-4: Verlaufskurven der Thrombin-katalysierten Hydrolyse von S-2238 in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Var-1.** Repräsentative Daten eines von drei Experimenten. Es wurde ein Messpunkt pro Sekunde aufgezeichnet. Zur besseren Darstellung ist im Diagramm nur jeder 30. Messpunkt dargestellt. Die durchgezogenen Linien entsprechen den nach Gleichung 1 ermittelten Regressionsgeraden. Die Substratkonzentration betrug im Reaktionsansatz  $30 \mu\text{M}$  und die Thrombinkonzentration  $77,5 \text{ pM}$ . [I] – InhibitorKonzentration.



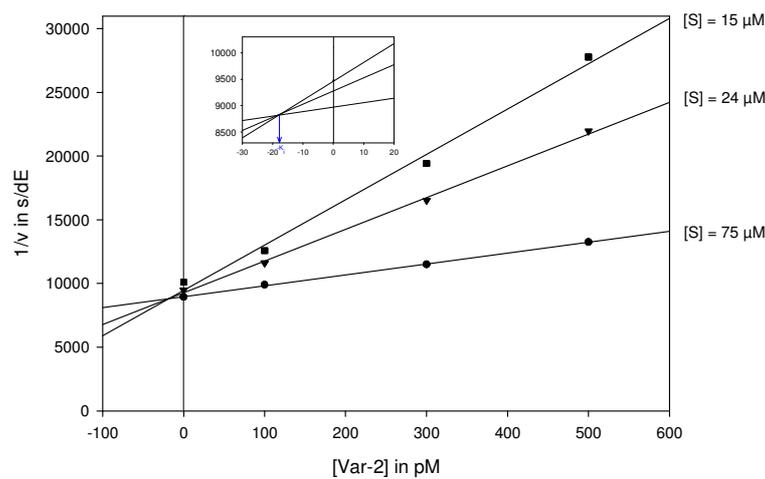
**Abbildung 7-5: Verlaufskurven der Thrombin-katalysierten Hydrolyse von S-2238 in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von Dipetalogastin II.** Repräsentative Daten eines von drei Experimenten. Es wurde ein Messpunkt pro Sekunde aufgezeichnet. Zur besseren Darstellung ist im Diagramm nur jeder 30. Messpunkt dargestellt. Die durchgezogenen Linien entsprechen den nach Gleichung 1 ermittelten Regressionsgeraden. Die Substratkonzentration betrug im Reaktionsansatz  $30 \mu\text{M}$  und die Thrombinkonzentration  $77,5 \text{ pM}$ . [I] – InhibitorKonzentration.



(a) Verlaufskurven



(b) Lineweaver-Burk-Plot



(c) Dixon-Plot

**Abbildung 7-6:** (a) Verlaufskurven der Thrombin-katalysierten Hydrolyse von S-2238 bei unterschiedlichen Konzentrationen von Var-2. (b) Lineweaver-Burk-Plot von Var-2. Der Schnittpunkt der Geraden liegt auf der Ordinate, was einen kompetitiven Inhibitionsmodus nachweist. (c) Dixon-Plot von Var-2. Im Insert wird das Diagramm in einer veränderten Skalierung gezeigt, um die gemeinsamen Schnittpunkte der Regressionsgeraden besser darstellen zu können. Der gemittelte x-Wert der Schnittpunkte entspricht dem negativen  $K_i$  (-17,1 pM). [I] – Inhibitorkonzentration, [S] – Substratkonzentration.

### 7.3.1.3 Antikoagulatorische Aktivität der Inhibitoren

Die antikoagulatorischen Aktivitäten von Var-1, Var-2, Dipetalogastin II und Hirudin (Refludan<sup>®</sup>) wurden *in vitro* mit verschiedenen Gerinnungsassays bestimmt. Es wurde sowohl der Einfluss unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen auf die beiden Globalteste Prothrombinzeit (PT) und aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), als auch der Einfluss auf die für den Nachweis direkter Thrombininhibitoren entwickelten Teste, Ecarin Clotting Time (ECT) und Ecarin Chromogenic Assay (ECA), untersucht.

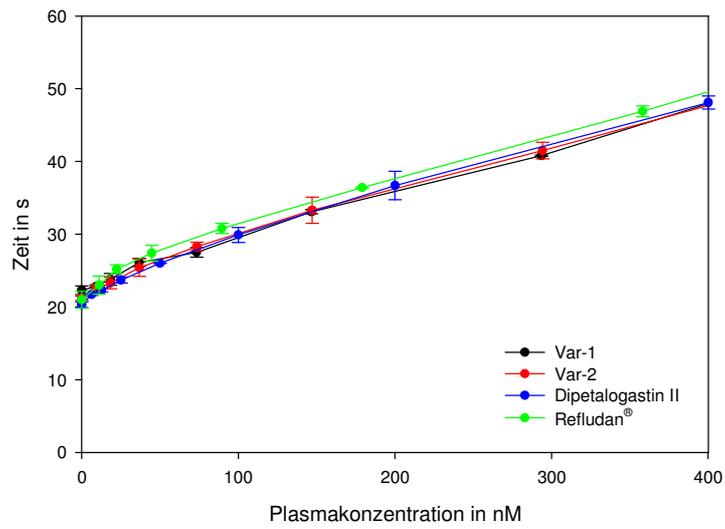
Um die mit diesen Methoden ermittelten antikoagulatorischen Aktivitäten vergleichen zu können, wurde diejenige Inhibitorkonzentration bestimmt, welche eine Verdoppelung des Gerinnungszeitnullwertes (Gerinnungszeit ohne Inhibitor) auslöste. Sie betrug bei der Prothrombinzeit für Var-1 317,4 nM, für Var-2 309,4 nM, für Dipetalogastin II 300,0 nM und für Hirudin 281,6 nM (Abb. 7-7a).

Die aPTT verdoppelte sich bei einer Var-1-Konzentration von 58,9 nM, bei einer Var-2-Konzentration von 51,9 nM, bei einer Dipetalogastin II-Konzentration von 57,6 nM und bei einer Hirudinkonzentration von 60,4 nM (Abb. 7-7b).

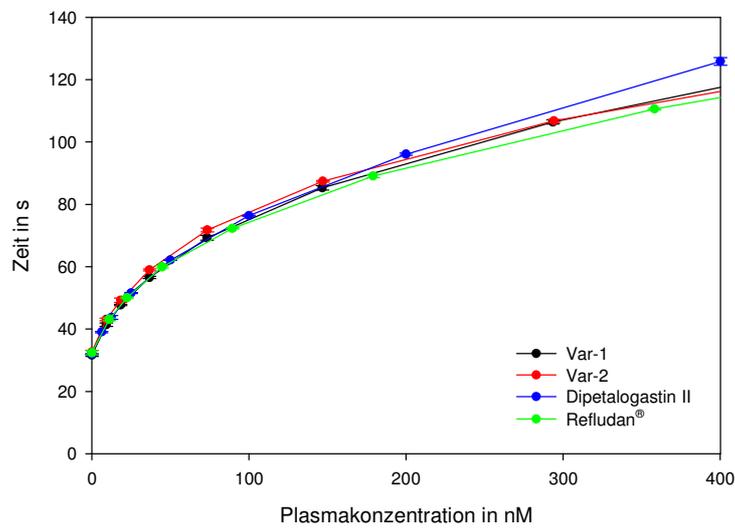
Bei der ECT konnte, im Gegensatz zur PT und aPTT, ein linearer Zusammenhang zwischen der Inhibitorkonzentration und der Verlängerung der Gerinnungszeit beobachtet werden. Die ECT verdoppelte sich bei einer Var-1-Konzentration von 103,8 nM, einer Var-2-Konzentration von 116,8 nM, einer Dipetalogastin II-Konzentration von 107,0 nM und einer Hirudinkonzentration von 96,8 nM (Abb. 7-7c).

Auch im ECA zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen Inhibitorkonzentration und Verlängerung der Messzeiten. Eine Verdoppelung des Nullwertes trat hier bei einer Var-1-Konzentration von 50,8 nM, bei einer Dipetalogastin II-Konzentration von 43,2 nM und bei einer Hirudinkonzentration von 44,5 nM auf. Lediglich bei Var-2 bestand dieser lineare Zusammenhang nicht. Im Vergleich mit den anderen Inhibitoren induzierte Var-2 außerdem eine deutlich geringere Messzeitverlängerung, wobei eine Verdopplung des Nullwertes erst bei 132 nM auftrat (Abb. 7-7d).

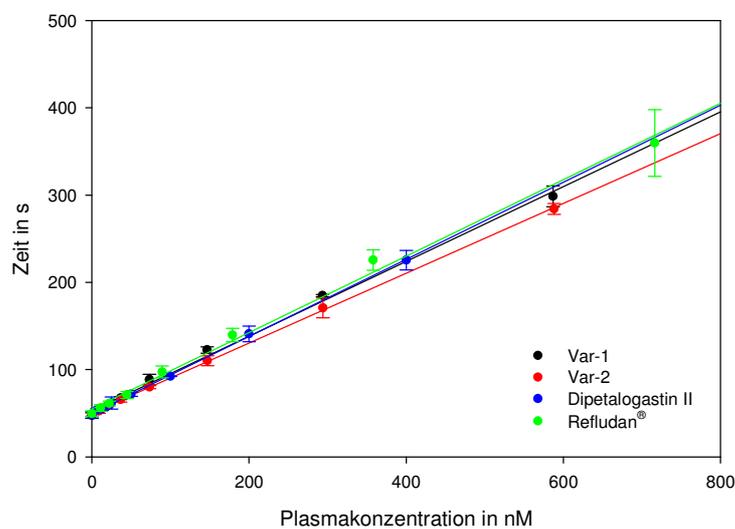
Zusammenfassend zeigten die Inhibitoren in allen Gerinnungsassays, mit Ausnahme von Var-2 im ECA, eine ähnliche antikoagulatorische Aktivität. Die ECT war weiterhin die einzige Methode, die für alle Inhibitoren einen linearen Zusammenhang zwischen Inhibitorplasmakonzentration und Messzeitverlängerung ergab.



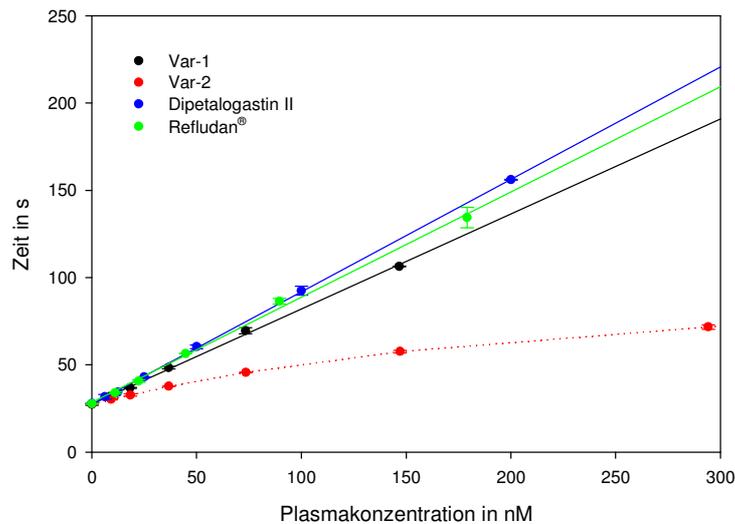
(a) Prothrombinzeit



(b) aktivierte partielle Thromboplastinzeit



(c) Ecarin Clotting Time



(d) Ecarin Chromogenic Assay

**Abbildung 7-7: Einfluss der Thrombininhibitoren auf die (a) Prothrombinzeit, (b) die aktivierte partielle Thromboplastinzeit, (c) die Ecarin Clotting Time und den (d) Ecarin Chromogenic Assay.** Alle Messpunkte, mit Ausnahme von (d), sind Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen. In (d) beruhen die Werte auf einer Doppelbestimmung. In (c) und (d) sind die mit linearer Regression ermittelten Regressionsgeraden ebenfalls dargestellt (nicht für Var-2 im ECA). Als Kontrolle diente in allen Gerinnungsassays das rekombinante Hirudin Refludan®.

## 7.4 Pharmakokinetische Charakterisierung

Die pharmakokinetischen Eigenschaften von Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II wurden tierexperimentell im Rattenmodell bestimmt. Die Inhibitorapplikation erfolgte entweder intravenös oder subkutan, wobei die Dosis immer 1 mg/kg KG betrug.

Die Berechnung der pharmakokinetischen Parameter erfolgte aus dem Verlauf des Blutspiegels nach i.v. Applikation. Dieser konnte für alle Inhibitoren am besten durch ein offenes Zweikompartimentmodell mit einer Eliminationskinetik 1. Ordnung beschrieben werden.

In Abbildung 7-8 ist die Kinetik der Blutspiegelverläufe für die drei Inhibitoren in den ersten zwei Stunden nach i.v. Applikation dargestellt. Die Graphen zeigen alle einen ähnlichen Verlauf: Die ersten 10 Minuten sind von einer Verteilungsphase dominiert, in welcher eine rasche Abnahme des Inhibitorblutspiegels von ungefähr 12,5 µg/ml auf Mittelwerte zwischen 1,7 (Var-1) und 1,9 µg/ml (Var-2) zu beobachten ist. Die Verteilungsphase geht anschließend in eine Eliminationsphase mit einer Kinetik 1. Ordnung über. Die mittlere Eliminationshalbwertszeit beträgt 25,6 Minuten für Var-1, 27,3 Minuten für Var-2 und 26,7 Minuten für Dipetalogastin II.

Nach s.c. Applikation kam es zu einem Anstieg des Inhibitorblutspiegels mit einem Maximum nach 30 Minuten (Abb. 7-9). Die Maximalkonzentration betrug bei Var-1

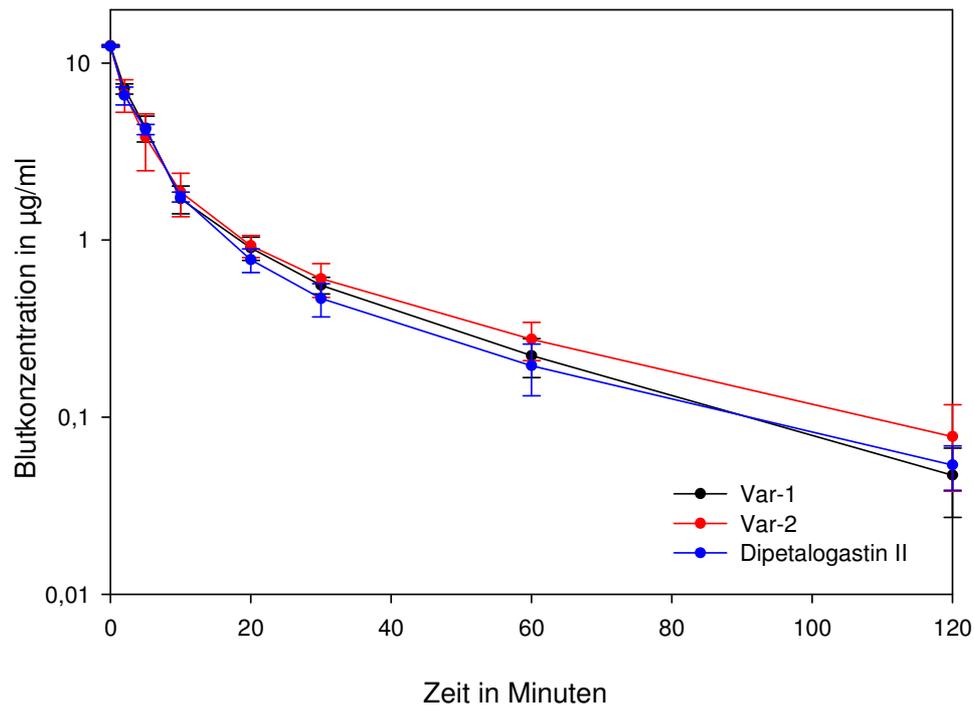
0,59 µg/ml, bei Var-2 0,62 µg/ml und bei Dipetalogastin II 0,54 µg/ml. Danach nahm der Blutspiegel mit einer Halbwertszeit von 73,0 Minuten für Var-1, 60,3 Minuten für Var-2 bzw. 65,4 Minuten für Dipetalogastin II ab. Nach 7 Stunden war kein Inhibitor mit der ECT-Methode mehr nachweisbar. Die Bioverfügbarkeit nach s.c. Applikation betrug 90,1% für Var-1, 99,4 % für Var-2 und 98,1 % für Dipetalogastin II. Alle pharmakokinetischen Parameter sind in Tabelle 7-3 zusammengefasst.

Um eine eventuelle Inaktivierung der Inhibitoren durch extrarenale Metabolisierung zu untersuchen, wurde der Blutspiegelverlauf bei funktionell nephrektomierten Ratten gemessen (Abb. 7-10). Nach i.v. Applikation kam es hier zu einem Abfall des Inhibitorblutspiegels, welcher initial am stärksten ausgeprägt war. Nach zwei Stunden stabilisierte er sich schließlich auf einem Plateau mit einem Mittelwert von 2,59 µg/ml bei Var-1, 2,45 µg/ml bei Var-2 und 2,63 µg/ml bei Dipetalogastin II.

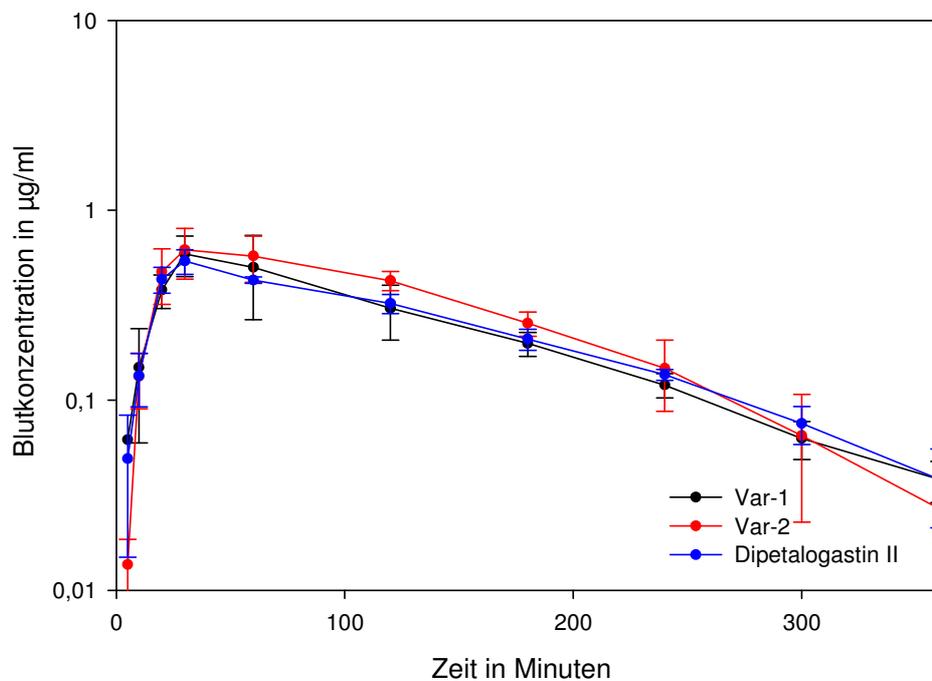
Nach s.c. Applikation der Inhibitoren kam es bei den nephrektomierten Ratten zu einem Anstieg des Inhibitorblutspiegels, welcher ebenfalls initial am stärksten war. Auch hier bildete sich nach drei Stunden ein Plateau mit einem Mittelwert von 2,28 µg/ml bei Var-1, 2,33 µg/ml bei Var-2 und 2,44 µg/ml bei Dipetalogastin II.

Die antikoagulatorische Aktivität der gesammelten Urinproben wurde mit der Ecarin Clotting Time bestimmt. Diese Methode lies sich nur bei denjenigen Urinproben zuverlässig anwenden, die während der Infusion von Diureselösungen gewonnen wurden. Entsprechend wurden nur die Proben berücksichtigt, welche innerhalb der ersten 6 Stunden (nach s.c. Inhibitorapplikation) bzw. innerhalb der ersten 3 Stunden (nach i.v. Inhibitorapplikation) gesammelt wurden. Dies entsprach genau dem Zeitraum, in welchem die Inhibitoren auch im Blut nachweisbar waren.

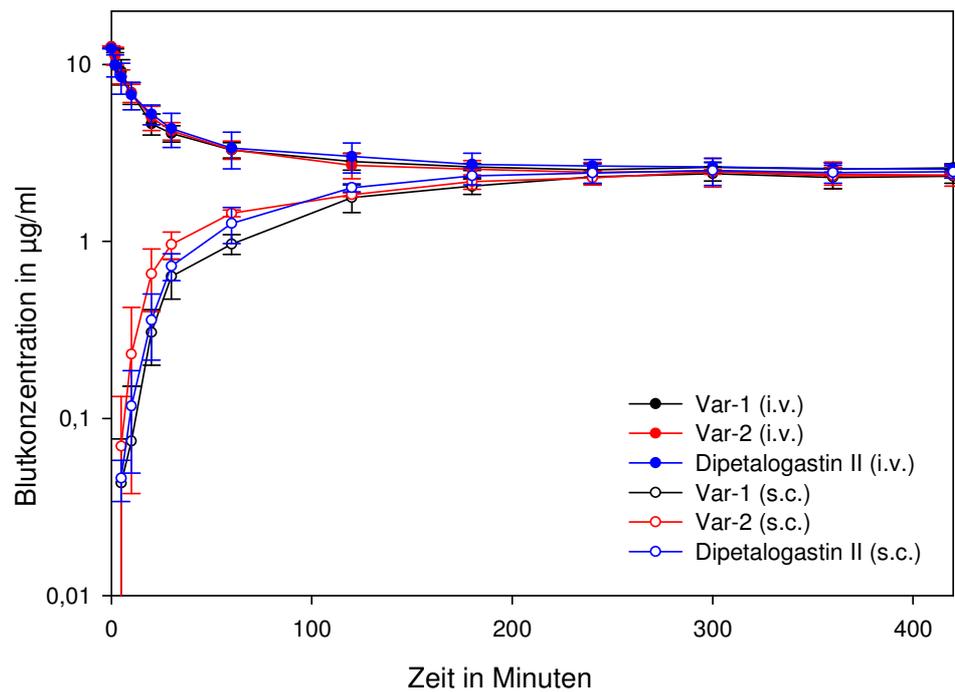
Nach s.c. Inhibitorapplikation wurden in den ersten 6 Stunden bei Var-1 14,03 % ± 2,06 %, bei Var-2 4,62 % ± 1,43 % und bei Dipetalogastin II 15,24 % ± 3,31 % der applizierten Inhibitoraktivität im Urin wiedergefunden. Ähnliches zeigte sich auch bei den Ratten, die den Inhibitor intravenös erhielten. Hier wurden innerhalb von 3 Stunden bei Var-1 15,86 % ± 5,57 %, bei Var-2 3,06 % ± 2,12 % und bei Dipetalogastin II 17,37 % ± 3,95 % der applizierten Inhibitoraktivität im Urin wiedergefunden. Ein Großteil der Aktivität wurde dabei bereits in der ersten Urinprobe gemessen, welche 1 h nach Inhibitorgabe gewonnen wurde. Sie betrug bei Var-1 14,12 % ± 4,27, bei Var-2 1,78 % ± 1,39 % und bei Dipetalogastin II 15,18 % ± 4,51 % der applizierten antikoagulatorischen Aktivität.



**Abbildung 7-8: Blutspiegelverläufe nach i.v. Applikation.** Halblogarithmische Darstellung. Die Kurven sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen. Die Dosis betrug 1 mg/kg KG.



**Abbildung 7-9: Blutspiegelverläufe nach s.c. Applikation.** Halblogarithmische Darstellung. Die Kurven sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen. Die Dosis betrug 1 mg/kg KG.



**Abbildung 7-10: Blutspiegelverläufe bei nephrektomierten Ratten nach i.v. bzw. s.c. Applikation.** Halblogarithmische Darstellung. Die Kurven sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Messungen. Die Dosis betrug 1 mg/kg KG.

**Tabelle 7-3: Pharmakokinetische Parameter.** Grundlage der Berechnungen waren jeweils vier Blutspiegelverläufe nach i.v. Applikation. Die einzelnen Parameter werden im Kapitel 6.2.7.4 erläutert.

	Var-1	Var-2	Dipetalogastin II
<b>A</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	11,54 $\pm$ 0,60	10,66 $\pm$ 1,12	10,98 $\pm$ 0,82
<b>B</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	1,35 $\pm$ 0,14	1,39 $\pm$ 0,33	1,12 $\pm$ 0,20
<b><math>\alpha</math></b> ( $\text{h}^{-1}$ )	11,69 $\pm$ 1,04	11,14 $\pm$ 1,41	11,23 $\pm$ 0,59
<b><math>\beta</math></b> ( $\text{h}^{-1}$ )	1,63 $\pm$ 0,08	1,55 $\pm$ 0,21	1,56 $\pm$ 0,11
<b><math>t_{1/2\alpha}</math></b> (h)	0,060 $\pm$ 0,005	0,063 $\pm$ 0,008	0,062 $\pm$ 0,003
<b><math>t_{1/2\beta}</math></b> (h)	0,427 $\pm$ 0,023	0,455 $\pm$ 0,064	0,445 $\pm$ 0,033
<b><math>k_{12}</math></b> ( $\text{h}^{-1}$ )	3,54 $\pm$ 0,42	3,52 $\pm$ 0,65	3,16 $\pm$ 0,24
<b><math>k_{21}</math></b> ( $\text{h}^{-1}$ )	2,68 $\pm$ 0,17	2,64 $\pm$ 0,43	2,46 $\pm$ 0,16
<b><math>k_{13}</math></b> ( $\text{h}^{-1}$ )	7,10 $\pm$ 0,58	6,52 $\pm$ 0,66	7,18 $\pm$ 0,90
<b>AUC<sub>0-2</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	1,549 $\pm$ 0,142	1,559 $\pm$ 0,314	1,447 $\pm$ 0,056
<b>AUC<sub>0-\infty</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	1,584 $\pm$ 0,146	1,608 $\pm$ 0,341	1,482 $\pm$ 0,064
<b><math>V_c</math></b> ( $\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	0,078 $\pm$ 0,004	0,083 $\pm$ 0,009	0,082 $\pm$ 0,004
<b><math>V_{\text{dss}}</math></b> ( $\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	0,181 $\pm$ 0,014	0,197 $\pm$ 0,040	0,188 $\pm$ 0,017
<b><math>\text{Cl}_{\text{tot}}</math></b> ( $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	636,6 $\pm$ 51,9	639,1 $\pm$ 126,7	671,3 $\pm$ 35,6

## 8 Diskussion

Thrombin ist, aufgrund seiner zentralen Rolle in der Hämostase, das primäre Ziel in der medikamentösen Therapie thromboembolischer Erkrankungen (Badimon *et al.* 1994). Die konventionellen Antikoagulanzen, wie Cumarinderivate und Heparine, hemmen die Thrombinaktivität auf eine indirekte Weise. Trotz hoher Effektivität ist ihr Einsatz jedoch mit verschiedenen Nachteilen verbunden (Colman *et al.* 2001).

Vorteile von direkten Thrombininhibitoren sind demgegenüber der schnelle Eintritt der gerinnungshemmenden Wirkung, die hohe Thrombinspezifität in therapeutischer Dosierung und die Unabhängigkeit von Kofaktoren. Letzteres ist vor allem bei Patienten mit AT III-Defizienz oder Verbrauchskoagulopathie von Bedeutung. Weiterhin inaktivieren direkte Thrombininhibitoren auch fibrin gebundenes Thrombin, was u.a. für die Antikoagulation im Rahmen der medikamentösen Thrombolyse von Bedeutung ist. Hier kann eine Retrombosierung, durch Ausschaltung der persistierenden Gerinnungsaktivierung am sich auflösenden Thrombus, verhindert werden. Schließlich interagieren direkte Thrombininhibitoren im Gegensatz zu Heparin nicht mit Plasmaproteinen und erzeugen daher eine vorhersagbarere antikoagulatorische Wirkung (Steinmetzer *et al.* 2001).

Blutsaugende Tiere haben im Laufe der Evolution die stärksten direkten Thrombininhibitoren hervorgebracht. Dipetalogastin II ist ein solcher Thrombininhibitor aus der blutsaugenden Raubwanze *Dipetalogaster maximus*. In kinetischen Studien konnte gezeigt werden, dass rekombinantes Dipetalogastin II ein stärkerer Thrombininhibitor als rekombinantes Hirudin ist. Allerdings besitzt es im Vergleich zum Hirudin ein bedeutend höheres Molekulargewicht und weist in hohen Konzentrationen auch eine Inhibition der Serinproteasen Trypsin und Plasmin auf (Mende *et al.* 1999).

Diese Einschränkungen können durch das zielgerichtete Design neuer, von der Dipetalogastin II-Struktur abgeleiteter Thrombininhibitoren umgangen werden. Ein interessanter Ansatz, um eine Molekulargewichtsreduktion des Dipetalogastin II zu erzielen, ist der Ersatz seiner großen C-terminalen Domäne mit einem an die ABE I des Thrombins bindenden Hirudinfragment (Abb 8-1). Das Hirudin<sup>55-65</sup>-Segment scheint dabei das minimale Hirudinfragment darzustellen, welches für eine ausreichende Bindung an die ABE I benötigt wird (Krstenansky *et al.* 1988). Der erste mit diesem Ansatz entwickelte Thrombininhibitor war das Dipetarudin (Lopez *et al.* 2003).

Das Problem der Spezifität kann ferner durch die Modifikation des P1-Aminosäurerestes gelöst werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Einführung eines P1-Histidinrestes

die Spezifität der von Dipetalogastin II abgeleiteten Thrombininhibitoren deutlich erhöht werden kann (Lopez 2002).

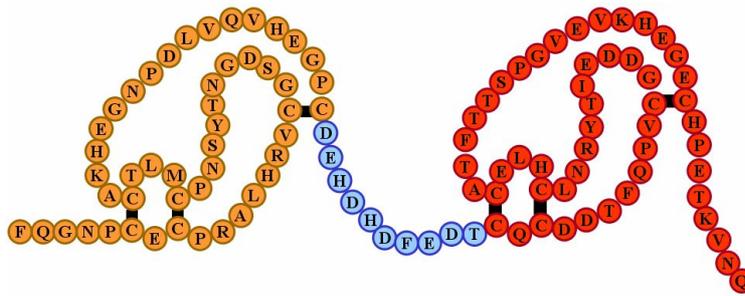
Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Thrombininhibitoren Var-1 und Var-2 basieren ebenfalls auf diesem Ansatz. Sie bestehen aus zwei funktionellen Anteilen, nämlich dem am aktiven Zentrum des Thrombins bindenden Dipetalogastin II<sup>1-48</sup>-Fragment und dem mit der ABE I des Thrombins interagierenden Hirudin<sup>55-65</sup>-Fragment. Im Gegensatz zum Dipetarudin werden diese beiden Anteile nicht durch einen Glycinlinker, sondern durch das Dipetalogastin II<sup>49-58</sup>-Fragment verbunden, welches beim Dipetalogastin II als Interdomänenlinker fungiert. Var-2 besitzt, im Gegensatz zu Var-1 und Dipetalogastin II, einen P1-Histidinrest (Abb. 8-1).

Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II wurden in *E. coli* exprimiert und in hoher Reinheit dargestellt. Erwartungsgemäß betrug das Molekulargewicht von Var-1 und Var-2 mit 8,5 kDa nur 68 % vom Molekulargewicht des Dipetalogastin II. Beide Inhibitoren sind damit lediglich 1,5 kDa größer als Hirudin.

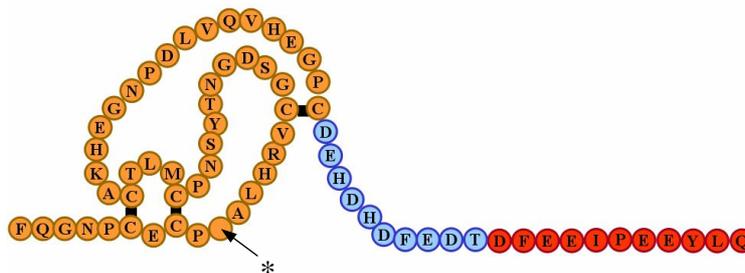
Klonierungsbedingt ist das im Rahmen dieser Arbeit exprimierte Dipetalogastin II, ebenso wie Var-1 und Var-2, N-terminal um die vier Aminosäurereste GIPE und C-terminal um die vier Aminosäurereste AAAS vergrößert. Das in der Literatur beschriebene rekombinante Dipetalogastin II (Mende *et al.* 1999) ist dagegen N-terminal um acht Aminosäurereste (GIPEFPGL) vergrößert. Entsprechend hat es ein um 414 Dalton höheres Molekulargewicht.

Es ist bekannt, dass der P1-Aminosäurerest entscheidend zur Spezifität von Serinprotease-Inhibitoren beiträgt (Laskowski und Kato 1980). Für die Interaktion mit Thrombin wird ein basischer P1-Aminosäurerest präferiert, da dieser über ionische Wechselwirkungen an das Asp<sub>189</sub> der S1-Spezifitätstasche binden kann (Vu *et al.* 1991). Entsprechend haben die meisten Thrombininhibitoren, wie auch die meisten Thrombinsubstrate, einen Arginin- bzw. Lysinrest an dieser Position (Colman *et al.* 2001).

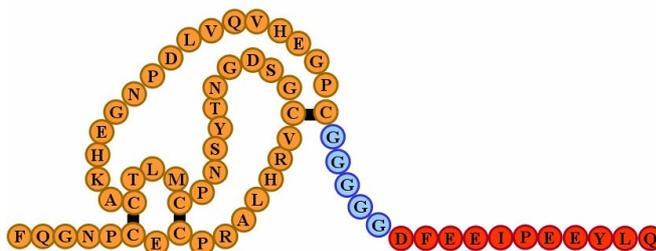
Eine Ausnahme bildet Rhodniin, ein Thrombininhibitor aus der blutsaugenden Raubwanze *Rhodnius prolixus*. Es ist der bisher einzige natürliche Thrombininhibitor mit einem P1-Histidinrest. Seine Röntgenstruktur im Komplex mit Thrombin zeigte, dass die Histidinseitenkette, über ein an ihre Imidazolgruppe gebundenes Wassermolekül, mit dem Asp<sub>189</sub> interagiert (van de Locht *et al.* 1995).



(a) Dipetalogastin II



(b) Var-1 bzw. Var-2



(c) Dipetarudin

**Abbildung 8-1: Darstellung der funktionellen Anteile von (a) Dipetalogastin II, (b) Var-1 bzw. Var-2 und (c) Dipetarudin.** Das mit dem aktiven Zentrum des Thrombins interagierende Dipetalogastin II<sup>1-48</sup>-Fragment ist orange, der Linker blau und der ABE I-bindende Anteil rot dargestellt. Durch das Ersetzen der C-terminalen Dipetalogastin II-Domäne mit dem Hirudin<sup>55-65</sup>-Fragment konnte eine deutliche Molekulargewichtsreduktion erzielt werden (a, b). Der Linker von Var-1 und Var-2 entspricht dem Interdomänen-Linker von Dipetalogastin II und ist fünf Aminosäurereste größer als der Glycinlinker von Dipetarudin (b, c). Da dieses Linkersegment reich an sauren Aminosäureresten ist, könnte es zur Bindung an die ABE I beitragen. Der in (b) mit \* markierte Aminosäurerest ist bei Var-1 ein Arginin- und bei Var-2 ein Histidinrest. Zusätzlich zur dargestellten Sequenz enthalten die Inhibitoren, bedingt durch den Polylinker des Expressionsvektor, je 4 Aminosäurereste N- und C-terminal (GIPE bzw. AAAS). Siehe auch Abb. 7-1.

Ebenso wie Thrombin besitzen auch die beiden Serinproteasen Trypsin und Plasmin eine Präferenz für Arginin- bzw. Lysinreste an der P1-Position (Moser *et al.* 1998, Backes *et al.* 2000). Im Gegensatz zum Dipetalogastin II weist Rhodniin aber keine Hemmung dieser Enzyme auf. Dieser Spezifitätsunterschied zwischen Dipetalogastin II und Rhodniin kann wahrscheinlich auf den Unterschied im P1-Aminosäurerest zurückgeführt werden (Mende *et al.* 1999).

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese Annahme. Dipetalogastin II und Var-1, welche beide einen P1-Argininrest besitzen, inhibieren in hohem molarem Überschuss auch Plasmin und Trypsin. Var-2, mit einem dem Rhodniin analogen P1-Histidinrest, ist hingegen ein spezifischer Thrombininhibitor der keine Hemmung von Plasmin, Trypsin, Chymotrypsin oder Faktor Xa zeigte.

Generell ist es wünschenswert, dass antithrombotische Medikamente keine signifikante Hemmung der Enzyme der Fibrinolyse (wie z.B. Plasmin) aufweisen. Es ist jedoch fraglich, ob die *in vitro* gemessene Plasminhemmung von Dipetalogastin II und Var-1 *in vivo* relevant ist, da sie nur bei sehr hohen Inhibitorkonzentrationen auftrat. So waren bei 200fachem molarem Überschuss dieser Inhibitoren über Plasmin noch über 40 % der Plasminausgangsaktivität messbar.

Die enzymkinetischen Untersuchungen zeigten, dass Var-1 und Dipetalogastin II slow, tight-binding Inhibitoren des Thrombins sind (Tab. 6-1, Tab. 8-1). Die Inhibitionskonstante von Dipetalogastin II wurde mit 137 fM bestimmt. Sie liegt damit höher als der in der Literatur für rekombinantes Dipetalogastin II angegebene Wert (49 fM), stimmt aber sehr gut mit dem für natives Dipetalogastin publiziertem Wert (125 fM) überein (Mende *et al.* 1999, Lange *et al.* 1999). Der Unterschied zwischen den beiden rekombinanten Dipetalogastin II-Proteinen könnte möglicherweise in der unterschiedlichen Klonierung begründet sein. So ist das in der Literatur beschriebene Dipetalogastin II klonierungsbedingt vier Aminosäurereste größer als das in dieser Arbeit verwendete Dipetalogastin II.

Die Inhibitionskonstante von Var-1 wurde mit 402 fM bestimmt. Var-1 hat somit eine vergleichbare Antithrombinwirkung wie Dipetalogastin II, bei jedoch deutlich geringerem Molekulargewicht. Die im Vergleich zum Dipetalogastin II etwas geringere Thrombinaffinität beruht hauptsächlich auf der Abnahme von  $k_{on}$  (Tab. 8-1).

Var-1 ist neben Dipetarudin ( $K_i = 446$  fM) der stärkste bisher beschriebene chimäre Thrombininhibitor. Weder Bivalirudin ( $K_i = 2,3$  nM), Hirunorm IV ( $K_i = 0,09$  nM) noch Hirutonin-4 ( $K_i = 0,14$  nM) besitzen eine vergleichbar hohe Thrombinaffinität (Maraganore *et al.* 1990, Lombardi *et al.* 1996, DiMaio *et al.* 1992).

Var-1 und Dipetarudin unterscheiden sich lediglich in ihrem Linkerbereich (Abb. 8-1). Der Linker von Var-1 ist fünf Aminosäurereste größer als der von Dipetarudin. Diese Verlängerung hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf die Thrombinaffinität (Tab. 8-1). In der Literatur beschriebene Untersuchungen bestätigen diese Beobachtung. Maraganore *et al.* zeigten, dass Linker von bifunktionellen Thrombininhibitoren zwar eine Mindestlänge von

vier Aminosäureresten besitzen müssen, um die Distanz von ungefähr 18 Å zwischen den beiden Bindungsstellen des Thrombins effektiv überbrücken zu können. Eine Verlängerung auf maximal acht Aminosäurereste hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Inhibitoraktivität (Maraganore *et al.* 1990). Der Linker von Var-1 besteht ferner zu 60 % aus sauren Aminosäureresten. Damit könnte er über eine Interaktion mit der positiv geladenen ABE I zusätzlich zur Thrombininhibition beitragen. Die um 10 % höhere Thrombinaffinität von Var-1 gegenüber Dipetarudin könnte hiermit erklärt werden.

Die Inhibitionskonstante von Var-2 betrug 17,1 pM und war damit 43fach höher als die von Var-1 (Tab. 8-1). Ursache hierfür war allein der Unterschied im P1-Aminosäurerest. Der Histidinrest in der P1-Position von Var-2 erhöhte zwar deutlich die Thrombinspezifität, es resultierte im Gegenzug aber auch eine deutlich geringere Thrombinaffinität. Trotzdem zeigte Var-2, mit einem  $K_i$ -Wert im unteren pikomolaren Bereich, eine deutlich stärkere Thrombinhemmung als andere bisher in der Literatur beschriebene chimäre Thrombininhibitoren (z.B. Bivalirudin, Hirunorm IV, Hirutonin-4). Interessanterweise folgte die Thrombininhibition durch Var-2 einer klassisch-kompetitiven Kinetik. Dies ist bemerkenswert, da alle auf Dipetalogastin II basierenden Thrombininhibitoren mit einem P1-Histidinrest bisher eine slow-binding Kinetik aufwiesen (Lopez 2002).

In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben darüber, welche kinetischen Eigenschaften ein Thrombininhibitor besitzen sollte. Es gibt Arbeiten, die Thrombininhibitoren mit einer slow, tight-binding Kinetik (wie sie z.B. beim Hirudin auftritt) als vorteilhaft beschreiben unter der Voraussetzung, dass die Inaktivierung des Thrombins sehr schnell stattfindet. Dies ist bei einer hohen Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten ( $k_{on}$ ) von über  $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  gegeben (Stone und Tapparelli 1995). Die in dieser Arbeit untersuchten Thrombininhibitoren Var-1 und Dipetalogastin II sind slow, tight-binding Inhibitoren des Thrombins, die einen  $k_{on}$  in der geforderten Höhe besitzen. Die slow, tight-binding Kinetik garantiert ferner eine nahezu irreversible Inaktivierung des aktiven Thrombins. Somit werden auch diejenigen zellulären Thrombineffekte zuverlässig ausgeschaltet, die u.a. für Tumoren, entzündliche Erkrankungen und zentralnervöse Krankheitsbilder verantwortlich gemacht werden (4.1.3, 4.2).

Andere Untersuchungen kamen hingegen zu dem Schluss, dass eine ausgeprägte slow-binding Kinetik von Thrombininhibitoren eine geringere therapeutische Breite zur Folge haben könnte (Elg *et al.* 1997). Entsprechend wäre dann ein klassisch-kompetitiver Inhibitionsmodus, wie er bei Var-2 zu beobachten ist, vorteilhafter.

**Tabelle 8-1: Vergleich der kinetischen Parameter von Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II mit verschiedenen Thrombininhibitoren.** Im oberen Teil der Tabelle sind die eigenen Messergebnisse aufgeführt. Zum Vergleich sind die in der Literatur angegebenen Werte für natives Dipetalogastin, Dipetalogastin II, Dipetarudin, rekombinantes Hirudin und Hirugen ebenfalls aufgeführt. Hirugen (Ac-NGDFEEIPEEY(SO<sub>3</sub>)L) entspricht dem acetylierten und sulfatierten C-terminalen Dodekapeptid des Hirudins und ist ein reiner ABE I-Inhibitor des Thrombins. n.u. – nicht untersucht.

	<b>Inhibitionsmodus</b>	<b>K<sub>i</sub> (10<sup>-12</sup> M)</b>	<b>k<sub>on</sub> (10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>)</b>	<b>k<sub>off</sub> (10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>)</b>
<b>Var-1</b>	slow, tight-binding	0,402 ± 0,037	13,1 ± 1,3	5,3 ± 0,5
<b>Var-2</b>	klassisch kompetitiv	17,1 ± 0,8	n.u.	n.u.
<b>Dipetalogastin II</b>	slow, tight-binding	0,137 ± 0,038	24,4 ± 2,9	3,3 ± 0,6
<b>Dipetalogastin<sup>1</sup></b>	slow, tight-binding	0,125 ± 0,035	16,4 ± 4,0	n.u.
<b>Dipetalogastin II<sup>2</sup></b>	slow, tight-binding	0,049 ± 0,022	n.u.	n.u.
<b>Dipetarudin<sup>3</sup></b>	slow, tight-binding	0,446 ± 0,085	8,4 ± 1,8	3,7 ± 0,5
<b>r-Hirudin<sup>4</sup></b>	slow, tight-binding	0,237 ± 0,006	1,37 ± 0,03	0,317 ± 0,011
<b>Hirugen<sup>5</sup></b>	klassisch kompetitiv	540.000 ± 20.000	n.u.	n.u.

<sup>1</sup>Lange *et al.* 1999, <sup>2</sup>Mende *et al.* 1999, <sup>3</sup>Lopez *et al.* 2003, <sup>4</sup>Braun *et al.* 1988, <sup>5</sup>Naski *et al.* 1990

Die antikoagulatorische Aktivität von Var-1, Var-2, Hirudin (Refludan<sup>®</sup>) und Dipetalogastin II wurde in den Gerinnungsassays Prothrombinzeit (PT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Ecarin Clotting Time (ECT) und Ecarin Chromogenic Assay (ECA) untersucht. Die Inhibitoren induzierten in allen Tests vergleichbare Messzeitverlängerungen und unterschieden sich somit nicht signifikant in ihrer antikoagulatorischen Potenz.

Eine Ausnahme zeigte sich nur im ECA. Die für Var-2 ermittelten Messzeiten waren hier deutlich kürzer als die der anderen Inhibitoren. Außerdem wurde für Var-2, im Gegensatz zu den anderen Inhibitoren, kein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Var-2-Konzentration und der induzierten Messzeitverlängerung beobachtet (Abb. 7-7d). Eine mögliche Ursache hierfür sind die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der Inhibitoren. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte ECA-H Version des ECA-Assays ist vom Hersteller für Hirudin, also einen slow, tight-binding Inhibitor von Thrombin, entwickelt und optimiert worden. Für klassisch kompetitive Inhibitoren, wie Var-2, ist vermutlich die ECA-T Variante des ECA-Assays, bei welcher deutlich geringere Konzentrationen des chromogenen Thrombinsubstrates S-2238 eingesetzt werden, geeigneter. Diese wurde speziell für synthetische direkte Thrombininhibitoren (wie z.B. Argatroban, Melagatran) entwickelt, welche Thrombin mit einer klassisch-kompetitiven Kinetik inhibieren. Um die Vergleichbarkeit der Messergebnisse zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit jedoch ausschließlich die ECA-H Version verwendet.

Aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen Inhibitorkonzentration und Gerinnungszeitverlängerung erscheint die ECT als die am besten geeignete Methode für das Monitoring der in dieser Arbeit untersuchten Thrombininhibitoren.

Die in den Gerinnungsuntersuchungen ermittelten Ergebnisse korrelierten nicht mit denen der kinetischen Untersuchungen. So unterschieden sich die antikoagulatorischen Aktivitäten von Var-1 und Var-2 nicht signifikant voneinander, obwohl der  $K_i$ -Wert von Var-2 43fach höher war als der von Var-1. Es kann vermutet werden, dass nicht nur der  $K_i$ -Wert der Inhibitoren, sondern auch andere kinetische Eigenschaften, wie z.B. der Inhibitionsmodus und die Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation und Dissoziation des Thrombin-Inhibitor-Komplexes, einen entscheidenden Einfluss auf die antikoagulatorische Aktivität besitzen.

Ähnliche Beobachtungen wurden in der Literatur auch für die antithrombotische Aktivität in einem arteriellen *in vivo* Thrombosemodell beschrieben (Elg *et al.* 1997). Die Stärke des antithrombotischen Effektes von verschiedenen Thrombininhibitoren korrelierte hier nur bedingt mit den  $K_i$ -Werten. Der klassisch-kompetitive Thrombininhibitor Melagatran zeigte sogar eine gleiche antithrombotische Aktivität wie der slow, tight-binding Inhibitor Hirudin, obwohl sich die Inhibitionskonstanten um den Faktor 50.000 unterschieden.

Die Ergebnisse der pharmakokinetischen Untersuchungen zeigten, dass die Blutspiegelverläufe nach i.v. Applikation für alle drei Inhibitoren am besten durch ein offenes Zweikompartimentmodell mit einer Eliminationskinetik erster Ordnung beschrieben werden können. In der Literatur war dieses Modell bereits Grundlage für die pharmakokinetische Charakterisierung von Hirudin (Markwardt 1992, Nowak 2002) und Dipetarudin (Lopez und Nowak 2004).

Die Blutspiegelverläufe von Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abb. 7-8). Gleich nach intravenöser Applikation kam es bei allen Inhibitoren zu einer sehr schnellen Verteilung in den extrazellulären Raum. Diese Verteilungsphase ging in eine Eliminationsphase mit einer deutlich längeren Halbwertszeit über (Tab. 8-2). Nach 3 Stunden war kein Inhibitor mit der Ecarin Clotting Time mehr nachweisbar. Das höhere Molekulargewicht von Dipetalogastin II hatte keine Verlängerung der Eliminationshalbwertszeit, verglichen mit Var-1 und Var-2, zur Folge. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu vorhergehenden Untersuchungen (Lopez 2002).

Dipetarudin zeigt ein ähnliches pharmakokinetisches Profil wie die in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren. Es besitzt lediglich eine geringfügig verlängerte Eliminations-

Halbwertszeit und ist daher bis zu 3 Stunden nach Applikation im Blut nachweisbar (Tab. 8-2) (Lopez und Nowak 2004). Hirudin hingegen weist sowohl eine deutlich längere Verteilungs- als auch Eliminationshalbwertszeit auf (Tab. 8-2) (Markwardt 1992, Nowak 2002).

Die kurzen Halbwertszeiten der in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren garantieren eine schnelle Inhibitorelimination und somit eine gute Steuerbarkeit. Für die antithrombotische Langzeittherapie sind längere Halbwertszeiten jedoch praktikabler. Eine Kopplung der Inhibitorpeptide an makromolekulare Träger wie Polyethylenglykole oder Dextrane könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um die Halbwertszeiten zu verlängern. Für Hirudin konnte mit diesen Methoden bereits eine deutliche Halbwertszeitverlängerung erzielt werden (Fareed *et al.* 1991, Richter *et al.* 1989).

Die für die Inhibitoren errechneten Verteilungsvolumina betragen zwischen 18,1 % (Var-1) und 19,7 % (Var-2) des Körpergewichtes. Die Verteilung erfolgte demzufolge, wie bei Dipetarudin und Hirudin, ausschließlich in die extrazelluläre Flüssigkeit (Tab. 8-2).

**Tabelle 8-2: Gegenüberstellung der pharmakokinetischen Parameter von Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II mit denen von Dipetarudin und Hirudin.** Die in der Literatur angegebenen pharmakokinetischen Daten von Dipetarudin und Hirudin wurden, ebenso wie in dieser Arbeit, aus dem Blutspiegelverlauf im Rattenmodell nach intravenöser Applikation von 1 mg/kg KG berechnet.

	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	AUC ( $\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$V_{\text{dss}}$ ( $\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
<b>Var-1</b>	0,060	0,427	1,584	0,181
<b>Var-2</b>	0,063	0,455	1,608	0,197
<b>Dipetalogastin II</b>	0,062	0,445	1,482	0,188
<b>Dipetarudin<sup>1</sup></b>	0,062	0,578	1,922	0,223
<b>Hirudin<sup>2</sup></b>	0,15	1,10	1,60	0,25

<sup>1</sup>Lopez und Nowak 2004, <sup>2</sup>Markwardt 1992

Die Mikrokonstanten  $k_{12}$ ,  $k_{21}$  und  $k_{13}$  belegen einen schnellen Transfer zwischen den Kompartimenten. Dabei war die Geschwindigkeitskonstante für die Verteilung vom zentralen in das periphere Kompartiment ( $k_{12}$ ) bei Var-1 1,32fach, bei Var-2 1,33fach und bei Dipetalogastin II 1,28fach höher als die für die Verteilung vom peripheren in das zentrale Kompartiment ( $k_{21}$ ). Ein ähnliches Verhalten wurde in der Literatur auch für Dipetarudin beschrieben. Hier betrug  $k_{12}$  sogar das 1,79fache von  $k_{21}$  (Lopez und Nowak 2004).

Die subkutane Injektion der Inhibitoren erwies sich als geeigneter Applikationsweg. Gegenüber der intravenösen Applikation wurden eine deutlich längere Halbwertszeit und das Auftreten weniger hoher Blutspiegelspitzen beobachtet. Die Bioverfügbarkeit betrug für alle Inhibitoren nahezu 100 %. Wie beim Dipetarudin wurde die maximale Inhibitorkonzentration

im Blut 30 Minuten nach der Applikation gemessen (Lopez und Nowak 2004). Beim Hirudin hingegen tritt der maximale Blutspiegel nach subkutaner Applikation erst nach 90 bis 120 Minuten auf (Nowak 2002). Eine orale Applikation erschien aufgrund der Proteinstruktur der Inhibitoren nicht sinnvoll und wurde in dieser Arbeit daher nicht untersucht.

Der zeitliche Verlauf des Blutspiegels wurde auch bei funktionell nephrektomierten Ratten gemessen. Nach intravenöser Applikation sank der Inhibitorblutspiegel bedingt durch Verteilungsvorgänge innerhalb von 2 Stunden auf ein Niveau zwischen 2,45 µg/ml (Var-2) und 2,63 µg/ml (Dipetalogastin II) und blieb während des gesamten Beobachtungszeitraums konstant. Nach subkutaner Applikation stabilisierte sich der Blutspiegel nach einer ungefähr dreistündigen Resorptionsphase ebenfalls auf einem Plateau zwischen 2,28 µg/ml (Var-1) und 2,44 µg/ml (Dipetalogastin II). Dieser konstante Blutspiegel zeigt, dass nach Ausschaltung der Nierenfunktion keine messbare Elimination mehr stattfindet. Damit wurde für Var-1, Var-2 und Dipetalogastin II eine ausschließlich renale Elimination nachgewiesen und eine signifikante extrarenale Metabolisierung ausgeschlossen. Auch Hirudin und Dipetarudin werden ausschließlich über die Nieren ausgeschieden (Markwardt *et al.* 1991, Lopez und Nowak 2004).

Die nach Abschluss der Verteilungs- bzw. Resorptionsphase gemessene Inhibitorkonzentration von ungefähr 2,5 µg/ml entspricht 20 % der maximalen Inhibitorkonzentration. Da keine Elimination stattfindet, befinden sich somit nach der Verteilung 4/5 der applizierten Dosis extravasal und lediglich 1/5 intravasal. Dieses Ergebnis kann auch auf Ratten mit intakter Nierenfunktion übertragen werden. Zu jedem Zeitpunkt der Eliminationsphase befinden sich bei diesen entsprechend 4/5 des Inhibitors im extravasalen Raum.

Die Inhibitorkonzentration nach Abschluss der Verteilungs- bzw. Resorptionsphase war bei den nephrektomierten Ratten unabhängig vom Applikationsweg (i.v. bzw. s.c.). Daraus kann eine Bioverfügbarkeit für die subkutane Applikation von nahezu 100% abgeleitet werden. Dieses Ergebnis zeigt eine gute Übereinstimmung mit den bei nicht nephrektomierten Ratten errechneten s.c. Bioverfügbarkeiten.

Die im Urin wiedergefundene antikoagulatorische Aktivität wurde für jeden Inhibitor mit der ECT-Methode bestimmt. Sowohl nach i.v. als auch nach s.c. Applikation wurden im Urin ähnlich hohe Aktivitäten ausgeschieden. Nach i.v. Applikation wurde jedoch ein Großteil der antikoagulatorischen Aktivität bereits in der ersten Stunde nach Applikation nachgewiesen.

Während sich die für Var-1 und Dipetalogastin II ermittelten Werte nicht deutlich voneinander unterscheiden (~ 15 % der applizierten Aktivität), war die für Var-2 ermittelte antikoagulatorische Aktivität (~ 4 % der applizierten Aktivität) bedeutend geringer. Da alle drei Substanzen eine ähnliche Pharmakokinetik aufweisen, kann geschlussfolgert werden, dass Var-2 zu weniger gerinnungsaktiven Metaboliten im Vergleich zu Var-1 und Dipetalogastin II abgebaut wird. Verschiedene Endo- und Exopeptidasen werden für die Degradation von Proteinen in der Niere der Ratte verantwortlich gemacht und könnten daher an der Metabolisierung der untersuchten Substanzen beteiligt sein (Kudo *et al.* 1990, Beynon und Bond 1983).

Für Dipetarudin, welches eine sehr große strukturelle Ähnlichkeit mit den in dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren besitzt, konnte gezeigt werden, dass es nur in metabolisierter Form im Urin ausgeschieden wird. Es besaß eine lineare Ausscheidungskinetik, wobei nach 5 Tagen bis zu 80 % der applizierten antikoagulatorischen Aktivität im Urin gefunden werden konnten (Lopez und Nowak 2004). Beim Hirudin hingegen werden bereits in der ersten Stunde nach intravenöser Applikation 70 % der Inhibitorosis in biologisch aktiver Form ausgeschieden. Danach sind nur noch geringe Mengen des Hirudins im Urin nachweisbar (Markwardt *et al.* 1982).

Ob die im Urin gemessene antikoagulatorische Aktivität durch die Inhibitoren oder durch ihre Metaboliten bedingt war, und ob gerinnungsaktive Inhibitoren bzw. Metaboliten auch nach Abfall des Inhibitorblutspiegels unter die Nachweisgrenze ausgeschieden werden, konnte mit der ECT-Methode nicht geklärt werden. Diese Fragen müssen daher in weiterführenden Untersuchungen beantwortet werden.

## 9 Schlussfolgerungen

Nach van Aken *et al.* (2001) sollte ein „ideales Antikoagulant“ folgende Eigenschaften besitzen: eine hohe Thrombinaffinität und Thrombinspezifität, einen schnellen Wirkungseintritt, eine vorhersagbare und verlässliche Pharmakokinetik sowie eine große therapeutische Breite. Ferner sollte es eine Hemmung von freiem und fibrin gebundenem Thrombin aufweisen, ein einfaches Monitoring sollte verfügbar und die Möglichkeit der oralen Applikation gegeben sein. Bisher gibt es keinen Wirkstoff, der alle diese Kriterien erfüllt.

In dieser Arbeit wurden zwei Varianten (Var-1 und Var-2) eines neuen, über *rational drug design* hergestellten, direkten Thrombininhibitors charakterisiert. Beide Varianten erfüllen, im Gegensatz zu den konventionellen Antikoagulantien, eine Vielzahl dieser Forderungen.

Var-1 und Var-2 besitzen eine deutlich höhere Thrombinaffinität als andere bisher in der Literatur beschriebene chimäre Thrombininhibitoren (z.B. Bivalirudin, Hirunorm IV und Hirutonin-4). Der  $K_i$ -Wert von Var-1 liegt dabei in derselben Größenordnung wie der von Dipetalogastin II und der von rekombinantem Hirudin.

Obwohl Var-1 in den biochemischen Untersuchungen eine stärkere Thrombininhibition als Var-2 zeigte, wies es ihm gegenüber in den Gerinnungsuntersuchungen keine Überlegenheit auf. Var-2 zeigte sich außerdem als der spezifischere Inhibitor, da er im Gegensatz zu Var-1 auch in sehr hohen Konzentrationen keine Inhibition von Plasmin und Trypsin zeigte.

Ein weiterer Unterschied zwischen Var-1 und Var-2 war ihr kinetisches Profil. Var-1 erwies sich als ein slow, tight-binding Inhibitor und Var-2 als ein klassisch kompetitiver Inhibitor des Thrombins. Möglicherweise ist das kinetische Profil von Var-1 vorteilhaft, da es schnell praktisch irreversible Enzym-Inhibitor Komplexe mit einem hohen  $k_{on}$  von über  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  bildet. Die feste Bindung an Thrombin könnte auch für eine effektive Hemmung der thrombinrezeptorvermittelten zellulären Effekte sinnvoll sein, die u.a. für Tumoren, entzündliche Erkrankungen und zentralnervöse Krankheitsbilder verantwortlich gemacht werden.

Die bei beiden Inhibitorvarianten nach intravenöser Applikation beobachtete kurze Halbwertszeit garantiert eine schnelle Inhibitorrelimination und somit eine gute Steuerbarkeit. Für die antithrombotische Langzeittherapie könnte eine kovalente Kopplung der Inhibitoren an makromolekulare Substanzen, wie Polyethylenglykol oder Dextran, die Halbwertszeit verlängern.

Ob die in dieser Arbeit untersuchten Thrombininhibitoren erfolgreich in der antithrombotischen Therapie eingesetzt werden können und welche Inhibitorvariante hierfür geeigneter ist, muss in weiterführenden *in vivo* Studien geprüft werden.

## 10 Literaturverzeichnis

- Ayala Y, Di Cera E. 1994. Molecular recognition by thrombin. Role of the slow-->fast transition, site-specific ion binding energetics and thermodynamic mapping of structural components. *J Mol Biol*, 235 (2):733-746.
- Backes BJ, Harris JL, Leonetti F, Craik CS, Ellman JA. 2000. Synthesis of positional-scanning libraries of fluorogenic peptide substrates to define the extended substrate specificity of plasmin and thrombin. *Nat Biotechnol*, 18 (2):187-193.
- Badimon L, Meyer BJ, Badimon JJ. 1994. Thrombin in arterial thrombosis. *Haemostasis*, 24 (2):69-80.
- Bates SM, Weitz JI. 1998. Direct thrombin inhibitors for treatment of arterial thrombosis: potential differences between bivalirudin and hirudin. *Am J Cardiol*, 82 (8B):12P-18P.
- Beynon RJ, Bond JS. 1983. Deficiency of a kidney metalloproteinase activity in inbred mouse strains. *Science*, 219 (4590):1351-1353.
- Bode W, Turk D, Karshikov A. 1992. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci*, 1 (4):426-471.
- Bradford MM. 1976. A refined and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254.
- Braun PJ, Dennis S, Hofsteenge J, Stone SR. 1988. Use of site-directed mutagenesis to investigate the basis for the specificity of hirudin. *Biochemistry*, 27 (17):6517-6522.
- Carney DH, Cunningham DD. 1978. Role of specific cell surface receptors in thrombin-stimulated cell division. *Cell*, 15 (4):1341-1349.
- Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN. 2001. Hemostasis and thrombosis: Basic principles and clinical practice. Vierte Aufl. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokio: Lippincott Williams & Wilkins.
- Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese Jr. RV, Coughlin SR. 1996. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature*, 381 (6582):516-519.
- Coughlin SR, Camerer E. 2003. PARTICIPATION in inflammation. *J Clin Invest*, 111 (1):25-27.
- Cunningham MA, Rondeau E, Chen X, Coughlin SR, Holdsworth SR, Tipping PG. 2000. Protease-activated receptor 1 mediates thrombin-dependent, cell-mediated renal inflammation in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med*, 191 (3):455-462.
- D'Andrea MR, Derian CK, Santulli RJ, Andrade-Gordon P. 2001. Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues. *Am J Pathol*, 158 (6):2031-2041.

- Dang QD, Di Cera E. 1994. A simple activity assay for thrombin and hirudin. *J Protein Chem*, 13 (4):367-373.
- 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 (12):2069-2075.
- Darrow AL, Fung-Leung WP, Ye RD, Santulli RJ, Cheung WM, Derian CK, Burns CL, Damiano BP, Zhou L, Keenan CM, Peterson PA, Andrade-Gordon P. 1996. Biological consequences of thrombin receptor deficiency in mice. *Thromb Haemost*, 76 (6):860-866.
- Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. 1991. The coagulation cascade: Initiation, maintenance and regulation. *Biochemistry*, 30 (43):10363-10370.
- Di Cera E, Dang QD, Ayala YM. 1997. Molecular mechanisms of thrombin function. *Cell Mol Life Sci*, 53 (9):701-730.
- DiMaio J, Gibbs B, Munn D, Lefebvre J, Ni F, Konishi Y. 1990. Bifunctional thrombin inhibitors based on the sequence of hirudin45-65. *J Biol Chem*, 265 (35):21698-21703.
- DiMaio J, Gibbs B, Lefebvre J, Konishi Y, Munn D, Yue SY, 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 (18):3331-3341.
- Dixon M. 1953. The determination of enzyme inhibitor constants. *Biochem J*, 55 (1):170-171.
- Eidt JF, Allison P, Noble S, Ashton J, Golino P, McNatt J, Buja LM, Willerson JT. 1988. Thrombin is an important mediator of cyclic coronary blood flow variations due to platelet aggregation in stenosed canine coronary arteries. *Trans Assoc Am Physicians*, 101:125-136.
- Elg M, Gustafsson D, Deinum J. 1997. The importance of enzyme inhibition kinetics for the effect of thrombin inhibitors in a rat model of arterial thrombosis. *Thromb Haemost*, 78 (4):1286-1292.
- Engelmann F, Stade C. 1909. Über die Bedeutung des Blutegelextraktes für die Therapie der Eklampsie. *Münchener Medizinische Wochenschrift*, 43:2203-2207.
- Eriksson BI, Wille-Jorgensen P, Kalebo P, Mouret P, Rosencher N, Bosch P, Baur M, Ekman S, Bach D, Lindbratt S, Close P. 1997. A comparison of recombinant hirudin with a low-molecular-weight heparin to prevent thromboembolic complications after total hip replacement. *N Engl J Med*, 337 (19):1329-1335.
- Esmon CT. 2001. Role of coagulation inhibitors in inflammation. *Thromb Haemost*, 86 (1):51-56.
- Esumi N, Fan D, Fidler IJ. 1991. Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res*, 51 (17):4549-4556.

- 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 (8):909-914.
- Even-Ram SC, Maoz M, Pokroy E, Reich R, Katz BZ, 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 vbeta 5 integrin. *J Biol Chem*, 276 (14):10952-10962.
- Fareed J, Walenga JM, Hoppensteadt DA, Iobal O, Rübsamen K. 1991. Comparative pharmacodynamics of recombinant hirudin and its PEG-coupled derivatives in primates. *Abstract Thromb Haemost*, 65:1286.
- Festoff BW, Smirnova IV, Ma J, Citron BA. 1996. Thrombin, its receptor and protease nexin I, its potent serpin, in the nervous system. *Semin Thromb Hemost*, 22 (3):267-271.
- Friedrich T, Kroger B, Bialojan S, Lemaire HG, Hoffken HW, Reuschenbach P, Otte M, Dodt J. 1993. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem*, 268 (22):16216-16222.
- Goldsack NR, Chambers RC, Dabbagh K, Laurent GJ. 1998. Thrombin. *Int J Biochem Cell Biol*, 30 (6):641-646.
- Gotoh K, Minamino T, Katoh O, Hamano Y, Fukui S, Hori M, Kusuoka H, Mishima M, Inoue M, Kamada T. 1988. The role of intracoronary thrombus in unstable angina: angiographic assessment and thrombolytic therapy during ongoing anginal attacks. *Circulation*, 77 (3):526-534.
- Grütter MG, Priestle JP, Rahuel J, Grossenbacher H, Bode W, Hofsteenge J, Stone SR. 1990. Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *EMBO J*, 9 (8):2361-2365.
- Gührs K, Schlott B, Hartmann M, Vettermann S, Röcker A, Landmann H, Markwardt F, Schaub G. 1996. Neues Protein mit thrombinhemmender Wirkung aus der Raubwanze *Dipetalogaster maximus*. Patent-Offenlegungsschrift DE 19504776 A1.
- Haas G. 1926. Über Versuche der Blutauswaschung am Lebenden mit Hilfe der Dialyse. *Arch Pharmacol*, 116:158 -172.
- Hamada R, Matsuoka H, Wagner KR, Broderick JP, de Courten-Myers GM, Xi G, Keep RF, Hoff JT. 2000. Antithrombin Therapy for Intracerebral Hemorrhage. *Stroke*, 31 (3):791-c-799.
- Harker LA. 1994. Strategies for inhibiting the effects of thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 5 Suppl 1:S47-58; discussion S59-64.
- Haycraft JB. 1894. Über die Einwirkung eines Sekretes des officinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, 18:209-217.
- Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW, 2nd, Pentecost BT. 1999. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br J Cancer*, 79 (3-4):401-406.

- Holmes DS, Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114 (1):193-197.
- Huntington JA, Baglin TP. 2003. Targeting thrombin--rational drug design from natural mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*, 24 (11):589-595.
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR. 1997. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, 386:502-506.
- Karpatkin S. 2003. Role of thrombin in tumor angiogenesis, implantation, and metastasis. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33 Suppl 1:54-55.
- Kaufmann R, Schafberg H, Rudroff C, Nowak G. 1997. Thrombin receptor activation results in calcium signaling and protein kinase C-dependent stimulation of DNA synthesis in HEP-2g laryngeal carcinoma cells. *Cancer*, 80 (11):2068-2074.
- Kaufmann R, Patt S, Schafberg H, Kalff R, Neupert G, Nowak G. 1998. Functional thrombin receptor PAR1 in primary cultures of human glioblastoma cells. *Neuroreport*, 9 (4):709-712.
- Kaufmann R, Patt S, Zieger M, Kraft R, Tausch S, Henklein P, Nowak G. 2000. The two-receptor system PAR-1/PAR-4 mediates alpha-thrombin-induced  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization in human astrocytoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 126 (2):91-94.
- Kaufmann R, Junker U, Nuske K, Westermann M, Henklein P, Scheele J, Junker K. 2002. PAR-1- and PAR-3-type thrombin receptor expression in primary cultures of human renal cell carcinoma cells. *Int J Oncol*, 20 (1):177-180.
- Krstenansky JL, Owen TJ, Yates MT, Mao SJ. 1988. Design, synthesis and antithrombin activity for conformationally restricted analogs of peptide anticoagulants based on the C-terminal region of the leech peptide, hirudin. *Biochim Biophys Acta*, 957 (1):53-59.
- Ku DD. 1982. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science*, 218:576-578.
- Kudo S, Mizuno K, Hirai Y, Shimizu T. 1990. Clearance and tissue distribution of recombinant human interleukin 1 beta in rats. *Cancer Res*, 50 (18):5751-5755.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.
- Lange U, Keilholz W, Schaub GA, Landmann H, Markwardt F, Nowak G. 1999. Biochemical characterization of a thrombin inhibitor from the bloodsucking bug *Dipetalogaster maximus*. *Haemostasis*, 29 (4):204-211.
- Lange U, Wiesenburg A, Olschewski A, Steinmetzer T, Nowak G, Bucha E. 2002. Ecarin chromogenic assay (ECA) - A new chromogenic assay useful for clinical monitoring of direct thrombin inhibitors like hirudin. *Ann Hematol*, 81 (Suppl. 1):A49.
- Laskowski M, Jr., Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*, 49:593-626.

- Letai A, Kuter DJ. 1999. Cancer, coagulation, and anticoagulation. *Oncologist*, 4 (6):443-449.
- Libby P. 2002. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 420 (6917):868-874.
- Lineweaver H, Burk D. 1934. The determination of enzyme dissociation constants. *J Am Chem Soc*, 56:658-666.
- Lombardi A, Natri F, Della Morte R, Rossi A, De Rosa A, Staiano N, Pedone C, Pavone V. 1996. Rational design of true hirudin mimetics: synthesis and characterization of multisite-directed alpha-thrombin inhibitors. *J Med Chem*, 39 (10):2008-2017.
- Lopez ML. 2002. Design neuer bioaktiver Strukturen aus Dipetalogastin II, einem Thrombininhibitor aus der Raubwanze *Dipetalogaster maximus*. Klonierung, Reinigung, biochemische and pharmakokinetische Charakterisierung [Dissertation]. Friedrich-Schiller-Universität Jena.
- Lopez ML, Nowak G. 2004. Special pharmacokinetics of dipetarudin suggests a potential antitumor activity of this thrombin inhibitor. *Anticancer Drugs*, 15 (2):145-149.
- Lopez ML, Mende K, Steinmetzer T, Nowak G. 2003. Cloning, purification and biochemical characterization of dipetarudin, a new chimeric thrombin inhibitor. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 786 (1-2):73-80.
- Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 53 (2):245-282.
- Maffrand JP. 1992. Direct thrombin inhibitors. *Nouv Rev Fr Hematol*, 34 (6):405-419.
- Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton JW, 2nd. 1990. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry*, 29 (30):7095-7101.
- Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis MM. 2000. Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biol*, 19 (4):345-351.
- Markwardt F. 1957. Die Isolierung und chemische Charakterisierung des Hirudins. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 308 (2-4):147-156.
- Markwardt F. 1992. Hirudin: The promising antithrombotic. *Cardiovasc Drug Rev*, 10 (2):211-232.
- Markwardt F. 1994. Coagulation inhibitors from animals feeding on blood. *Rev Iberoamer Tromb Hemostasia*, 7:225-231.
- Markwardt F. 2001. Development of direct thrombin inhibitors in comparison with glycosaminoglycans. *Semin Thromb Hemost*, 27 (5):523-530.
- Markwardt F, Nowak G, Bucha E. 1991. Hirudin as anticoagulant in experimental hemodialysis. *Haemostasis*, 21 Suppl 1:149-155.

- Markwardt F, Hauptmann J, Nowak G, Klessen C, Walsmann P. 1982. Pharmacological studies on the antithrombotic action of hirudin in experimental animals. *Thromb Haemost*, 47 (3):226-229.
- Marty I, Peclat V, Kirdaite G, Salvi R, So A, Busso N. 2001. Amelioration of collagen-induced arthritis by thrombin inhibition. *J Clin Invest*, 107 (5):631-640.
- Mason PJ, Freedman JE, Jacobs AK. 2004. Aspirin resistance: current concepts. *Rev Cardiovasc Med*, 5 (3):156-163.
- Mende K, Petoukhova O, Koulitchkova V, Schaub GA, Lange U, Kaufmann R, Nowak G. 1999. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect *Dipetalogaster maximus*. cDNA cloning, expression and characterization. *Eur J Biochem*, 266 (2):583-590.
- Morris DC, Zhang L, Zhang ZG, Lu M, Berens KL, Brown PM, Chopp M. 2001. Extension of the therapeutic window for recombinant tissue plasminogen activator with argatroban in a rat model of embolic stroke. *Stroke*, 32 (11):2635-2640.
- Morrison JF. 1982. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme catalysed reactions. *Trends Biochem Sci*, 7:102-105.
- Morrison JF, Stone SR. 1985. Approaches to the study and analysis of the inhibition of enzymes by slow- and tight-binding inhibitors. *Comments Mol Cell Biophys*, 2 (6):347-368.
- Moser M, Auerswald E, Mentele R, Eckerskorn C, Fritz H, Fink E. 1998. Bdellastasin, a serine protease inhibitor of the antistasin family from the medical leech (*Hirudo medicinalis*)--primary structure, expression in yeast, and characterisation of native and recombinant inhibitor. *Eur J Biochem*, 253 (1):212-220.
- Murray CJ, Lopez AD. 1997. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, 349 (9061):1269-1276.
- Naski MC, Fenton JW, 2nd, Maraganore JM, Olson ST, Shafer JA. 1990. The COOH-terminal domain of hirudin. An exosite-directed competitive inhibitor of the action of alpha-thrombin on fibrinogen. *J Biol Chem*, 265 (23):13484-13489.
- Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu TK, Charo IF, Coughlin SR. 1992. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest*, 90 (4):1614-1621.
- Niclou SP, Suidan HS, Pavlik A, Vejsada R, Monard D. 1998. Changes in the expression of protease-activated receptor 1 and protease nexin-1 mRNA during rat nervous system development and after nerve lesion. *Eur J Neurosci*, 10 (5):1590-1607.
- Nierodzik ML, Chen K, Takeshita K, Li JJ, Huang YQ, Feng XS, D'Andrea MR, Andrade-Gordon P, Karparkin S. 1998. Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is required and rate-limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis. *Blood*, 92 (10):3694-3700.
- Noorbakhsh F, Vergnolle N, Hollenberg MD, Power C. 2003. Proteinase-activated receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 4 (12):981-990.

- Nowak G. 2002. Pharmacology of recombinant hirudin. *Semin Thromb Hemost*, 28 (5):415-424.
- Nowak G, Bucha E. 1996. Quantitative determination of hirudin in blood and body fluids. *Semin Thromb Hemost*, 22 (2):197-202.
- Nowak G, Lange U, Mende K, Bucha E. 1999. Thrombininhibitoren aus blutsaugenden Tieren. *Nova Acta Leopoldina N F*, 80 (311):37-59.
- Nutescu EA, Wittkowsky AK. 2004. Direct thrombin inhibitors for anticoagulation. *Ann Pharmacother*, 38 (1):99-109.
- Rao LV. 1992. Tissue factor as a tumor procoagulant. *Cancer Metastasis Rev*, 11 (3-4):249-266.
- Richter M, Walsmann P, Markwardt F. 1989. Plasma level of dextran-r-hirudin. *Pharmazie*, 44 (1):73-74.
- Ritschel WA. 1992. Handbook of basic pharmacokinetics. 4te Aufl. Hamilton IL: Drug Intelligence Publications Inc.
- Robson R. 2000. The use of bivalirudin in patients with renal impairment. *J Invasive Cardiol*, 12 Suppl F:33F-36.
- Rudroff C, Schafberg H, Nowak G, Weinel R, Scheele J, Kaufmann R. 1998. Characterization of functional thrombin receptors in human pancreatic tumor cells (MIA PACA-2). *Pancreas*, 16 (2):189-194.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74:5463-5467.
- Schechter I, Berger A. 1968. On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 32 (5):898-902.
- Schlott B, Wohnert J, Icke C, Hartmann M, Ramachandran R, Guhrs KH, Glusa E, Flemming J, Gorlach M, Grosse F, Ohlenschlager O. 2002. Interaction of Kazal-type inhibitor domains with serine proteinases: biochemical and structural studies. *J Mol Biol*, 318 (2):533-546.
- Schmidt RF, Thews G. 1997. Physiologie des Menschen. 26te Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- Serruys PW, Herrman JP, Simon R, Rutsch W, Bode C, Laarman GJ, van Dijk R, van den Bos AA, Umans VA, Fox KA, et al. 1995. A comparison of hirudin with heparin in the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *Helvetica Investigators. N Engl J Med*, 333 (12):757-763.
- Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM. 2004. Protease-activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res*, 2 (7):395-402.

- Smith EB, Crosbie L, Carey S. 1996. Prothrombin-related antigens in human aortic intima. *Semin Thromb Hemost*, 22 (4):347-350.
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B, Klenk D. 1985. Measurement of protein using bicinchinonic acid. *Anal Biochem*, 150:76-85.
- Steinmetzer T, Hauptmann J, Sturzebecher J. 2001. Advances in the development of thrombin inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, 10 (5):845-864.
- Stone SR, Hofsteenge J. 1986. Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry*, 25:4622-4628.
- Stone SR, Tapparelli C. 1995. Thrombin inhibitors as antithrombotic agents: the importance of rapid inhibition. *J Enzyme Inhib*, 9 (1):3-15.
- Strukova SM. 2001. Thrombin as a regulator of inflammation and reparative processes in tissues. *Biochemistry (Mosc)*, 66 (1):8-18.
- Stubbs MT, Bode W. 1995. The clot thickens: clues provided by thrombin structure. *Trends Biochem Sci*, 20 (1):23-28.
- Turgeon VL, Houenou LJ. 1997. The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, 25 (1):85-95.
- van Aken H, Bode C, Darius H, Diehm C, Encke A, Gulba DC, Haas S, Hacke W, Puhl W, Quante M, Riess H, Scharf R, Schellong S, Schror T, Schulte KL, Tebbe U. 2001. Anticoagulation: the present and future. *Clin Appl Thromb Hemost*, 7 (3):195-204.
- van de Locht A, Lamba D, Bauer M, Huber R, Friedrich T, Kroger B, Hoffken W, Bode W. 1995. Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. *EMBO J*, 14 (21):5149-5157.
- Vaughan PJ, Su J, Cotman CW, Cunningham DD. 1994. Protease nexin-1, a potent thrombin inhibitor, is reduced around cerebral blood vessels in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 668 (1-2):160-170.
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64 (6):1057-1068.
- Wang H, Reiser G. 2003. Thrombin signaling in the brain: the role of protease-activated receptors. *Biol Chem*, 384 (2):193-202.
- Weitz JI, Buller HR. 2002. Direct thrombin inhibitors in acute coronary syndromes: present and future. *Circulation*, 105 (8):1004-1011.
- Xi G, Keep RF, Hoff JT. 2002. Pathophysiology of brain edema formation. *Neurosurg Clin N Am*, 13 (3):371-383.

- Xi G, Reiser G, Keep RF. 2003. The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: deleterious or protective? *J Neurochem*, 84 (1):3-9.
- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC. 1998. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95 (12):6642-6646.
- Zacharski LR, Memoli VA, Morain WD, Schlaeppli JM, Rousseau SM. 1995. Cellular localization of enzymatically active thrombin in intact human tissues by hirudin binding. *Thromb Haemost*, 73 (5):793-797.
- Zhou H, Gabazza EC, Takeya H, Deguchi H, Urano H, Adachi Y, Suzuki K. 1998. Prothrombin and its derivatives stimulate motility of melanoma cells. *Thromb Haemost*, 80 (3):407-412.

# 11 Anhang

## 11.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Götz Nowak, Leiter der Arbeitsgruppe „Pharmakologische Hämostaseologie“, für die Überlassung des Promotionsthemas und die kontinuierliche Unterstützung dieser Arbeit. Durch die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die großen Entfaltungsmöglichkeiten, die er mir geboten hat, ist die Arbeit in dieser Form erst möglich geworden. Auch für die freundliche Durchsicht des Manuskripts möchte ich mich bedanken.

Frau Dr. rer. nat. Mercedes López danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Ihr großes Wissen und Engagement haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch für die Präsentation des Vortrages in Hamburg möchte ich mich herzlich bei Ihr bedanken.

Bei Frau Dr. rer. nat. Katrin Mende bedanke ich mich für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Laborarbeit sowie für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Fragestellungen und den Gerinnungsuntersuchungen.

Mein Dank gilt außerdem den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Pharmakologische Hämostaseologie“, die mir stets mit fachlicher und praktischer Hilfe zur Seite standen. Frau Dipl.-Ing. Ines Neubauer sei an dieser Stelle für das Korrekturlesen gedankt.

Der Haemosys GmbH danke ich für die freundliche Überlassung der präparativen HPLC und der MALDI-TOF-Anlage. Insbesondere Herrn Dr. rer. nat. Frank Bien, Herrn Dr. rer. nat. Ronald Koch und Frau Jana Banzhoff danke ich für die vielen hilfreichen Gespräche und die praktische Unterstützung bei meinen Untersuchungen.

Frau Dipl.-Biol. Mareike Richter danke ich für ihre nie endende Unterstützung und dass sie immer für mich da war. Auch für das Korrekturlesen und die vielen hilfreichen Diskussionen möchte ich mich bei ihr bedanken.

Meinen Eltern, die mir durch ihre Unterstützung meine Ausbildung ermöglichten, möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Jena, 16. Oktober 2005

(Thomas Bitter)

## **11.2 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich keine Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule zur Dissertation eingereicht habe.

Jena, 16. Oktober 2005

(Thomas Bitter)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Bitter T, López M, Mende K, Nowak G: Biochemical characterization of two new chimeric thrombin inhibitors derived from dipetalogastin II. 48. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung 2004, Vortrag V131.