

## Antisense-Wirkstoffe

DOI: 10.1002/ange.200602346

### Ein Antikoagulans mit photoaktivierbarer Antidotaktivität\*\*

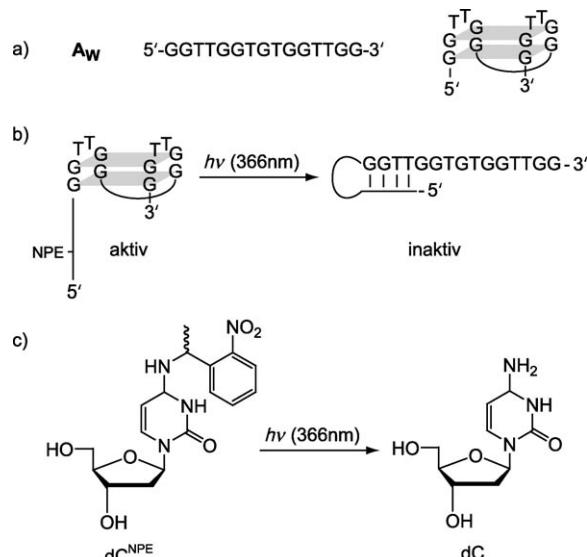
Alexander Heckel,\* Maximilian C. R. Buff,  
Marie-Sophie L. Raddatz, Jens Müller,  
Bernd Pötzsch und Günter Mayer\*

Gegen unerwünschte Nebenwirkungen einer Arzneimitteltherapie oder einer Überdosierung ist die Antagonisation eine wichtige Behandlungsoption. Dies ist insbesondere bei antikoagulatorisch (gerinnungshemmend) wirkenden Medikamenten wichtig, da hier relative oder absolute Überdosierungen zu lebensbedrohlichen Blutungen führen können. Von den zurzeit im klinischen Einsatz befindlichen Antikoagulantien ist unfraktioniertes Heparin das einzige, das die Bedingung einer schnellen und effektiven Antagonisierbarkeit erfüllt. Für alle neu entwickelten Antikoagulantien, wie z.B. synthetische Heparine, Faktor-Xa- und Thrombininhibitoren, ist kein spezifisches Antidot verfügbar. Dies limitiert ihren klinischen Einsatz, obwohl sie oft effektivere Antithrombotika sind und gegenüber unfraktioniertem Heparin weitere Vorteile aufweisen.<sup>[1]</sup> Daher ist unfraktioniertes Heparin weiterhin das Mittel der Wahl bei Patienten mit hohem Blutungsrisiko und in klinischen Anwendungen, die eine schnelle Aufhebung der antikoagulatorischen Wirkung erfordern, obwohl dessen Verwendung mit möglichen Nebenwirkungen wie Immunreaktionen einhergeht.

Ein alternatives Konzept zur Antagonisation von Antikoagulantien wurde kürzlich von Sullenger et al. vorgestellt.<sup>[2]</sup> Als Antikoagulans verwendeten sie Aptamere gegen den Gerinnungsfaktor IXa. Aptamere sind kurze einzelsträngige Nucleinsäuren, die definierte Konformationen ausbilden.<sup>[3]</sup> Sie binden mit hoher Affinität und Spezifität an ihre Zielmoleküle und können z.B. als potente Inhibitoren eingesetzt

werden. Zur Antagonisierung machten sich Sullenger et al. die intrinsischen Eigenschaften von Nucleinsäuren zunutze und verwendeten einen Gegenstrang als Antidot, der mit dem Aptamer zusammen einen Duplex bildet und so dessen inhibitorische Funktion beendet.

Ein weiteres Aptamer, das als Antikoagulans verwendet werden kann, ist das einzelsträngige DNA-15mer **A<sub>W</sub>** (Schema 1), das an Thrombin bindet und dieses inaktiviert.<sup>[4]</sup>



**Schema 1.** a) Das Aptamer **A<sub>W</sub>** bindet selektiv an Thrombin und wirkt als Antikoagulans. b) Unser Konzept eines Aptamers, das sein eigenes – vorübergehend inaktiviertes – Antidot mit sich führt; die Antidotaktivität wird durch Bestrahlung mit Licht freigesetzt. c) Dafür wurde der photoaktivierbare Nucleinsäurebaustein dC<sup>NPE</sup> hergestellt, der wie eine vorübergehende Fehlpaarung wirkt. NPE = 1-(2-Nitrophenyl)ethyl.

Thrombin ist ein Schlüsselprotein der Blutgerinnungskaskade. Das Antithrombinaptamer liegt unter physiologischen Bedingungen als stabiles G-Quartett vor und besteht aus sechs Thymidin- und neun Guanosineinheiten. In unseren Studien zur Entwicklung von Methoden für die örtlich und zeitlich aufgelöste Steuerung von biologischen Prozessen hatten wir bereits gezeigt, dass die Aktivität eines Aptamers mit Licht eingeschaltet werden kann, nachdem entweder dessen Bindungsstelle vorübergehend mit einer photolabilen Schutzgruppe blockiert<sup>[5]</sup> oder durch ebensolche Modifikation an einer Schlüsselstelle die Bildung der aktiven Konformation verhindert wurde.<sup>[6]</sup> Hier beschreiben wir die Entwicklung eines Oligonucleotids, das eine Aptamerdomäne und eine vorübergehend inaktivierte Gegenstrangdomäne in demselben Molekül vereint und daher sowohl als Antikoagulans als auch als dessen Antidot verwendet werden kann. Die Antidotaktivität wird dabei durch Lichtexposition generiert. Dazu nahmen wir an, dass Aptamervarianten mit einer am 5'- oder 3'-Ende verlängerten komplementären Region inaktiv sind, da sie die Nucleinsäure dazu zwingen, statt der aktiven G-Quartett-Struktur eine Haarnadelkonformation zu bilden (Schema 1b). Wenn diese komplementäre Region dann „vorübergehende Fehlpaarungen“ enthält,<sup>[7]</sup> wird die Haar-

[\*] Dr. A. Heckel, Dipl.-Chem. M. C. R. Buff, Dipl.-Chem. M.-S. Raddatz, Dr. G. Mayer  
Life and Medical Sciences (LIMES)  
Program Unit Chemical Biology and Medicinal Chemistry  
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie  
Universität Bonn, Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn  
(Deutschland)  
Fax: (+49) 228-734-809  
E-Mail: heckel@uni-bonn.de  
gmayer@uni-bonn.de

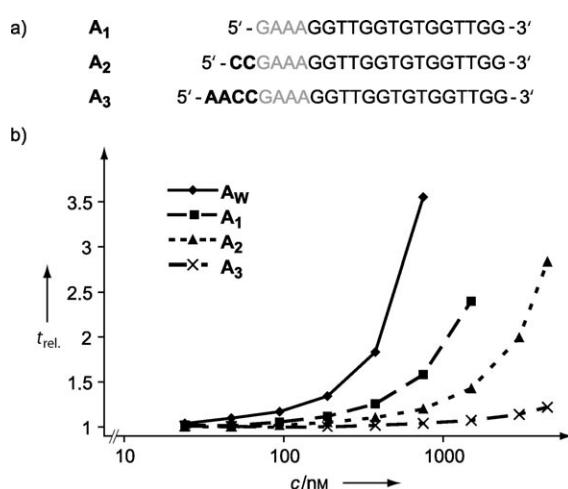
Dr. J. Müller, Prof. Dr. B. Pötzsch  
Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin  
Universitätsklinikum Bonn  
Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde durch Drittmittel des Verbandes der Chemischen Industrie (für A.H. und G.M.) sowie ein Emmy Noether-Stipendium (DFG) für A.H. ermöglicht. Wir danken Prof. M. Famulok für die großzügige Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

nadel erst gebildet, wenn das Molekül bestrahlt und die photolabile Gruppe entfernt wurde.

Um die ideale Länge der Gegenstrangregion herauszufinden, stellten wir die Aptamer-Varianten **A<sub>1</sub>**–**A<sub>3</sub>** her (Abbildung 1 a). Die jeweiligen komplementären Regionen sind



**Abbildung 1.** a) Die Sequenz der am 5'-Ende verlängerten Aptamere **A<sub>1</sub>**–**A<sub>3</sub>**. b) Ergebnisse von Gerinnungsstudien mit den Aptameren **A<sub>w</sub>** und **A<sub>1</sub>**–**A<sub>3</sub>** (relative Gerinnungszeit gegen Aptamerkonzentration, experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen).

an das 5'-Ende von **A<sub>w</sub>** über eine GAAA-Sequenz angehängt, die eine stabile GNRA-Schleife bildet. In Filterbindungsexperimenten wurde dann bestimmt, welche der Varianten noch an Thrombin binden können (Tabelle 1). Die Verlängerung

**Tabelle 1:** Dissoziationskonstanten (in nM) der Aptamervarianten, bestimmt in Filterbindungsexperimenten.

	ohne Bestrahlung	nach Bestrahlung <sup>[a]</sup>
<b>A<sub>w</sub></b>	124 ± 16	n.b.
<b>A<sub>1</sub></b>	155 ± 23	n.b.
<b>A<sub>2</sub></b>	333 ± 44	n.b.
<b>A<sub>3</sub></b>	> 5000	n.b.
<b>A<sub>4</sub></b>	166 ± 12	> 5000
<b>A<sub>5</sub></b>	297 ± 44	> 500

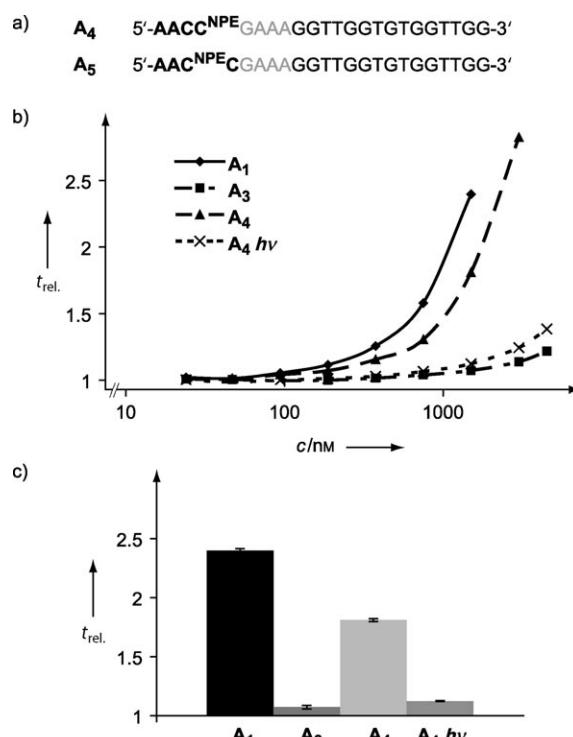
[a] n.d. = nicht bestimmt.

von **A<sub>w</sub>** mit dem schleifenbildenden Motiv (→**A<sub>1</sub>**) führt bereits zu einer gewissen Verringerung der Affinität. Fügt man zwei weitere dC-Nucleotide an (→**A<sub>2</sub>**), reduziert sich die Affinität drastisch. Fast keine Affinität wurde mehr festgestellt für das Aptamer **A<sub>3</sub>** mit zwei weiteren dA-Nucleotiden.<sup>[8]</sup> Daraus schließen wir, dass bereits das Aptamer **A<sub>3</sub>** in überwiegendem Maße als Haarnadel vorliegt und nicht als G-Quartett.

Ferner testeten wir die Aptamervarianten in der thrombinvermittelten Blutgerinnung im humanen Plasmasystem. Wie in Abbildung 1b zu sehen, ist das Aptamer **A<sub>1</sub>** noch aktiv. Jedoch konnte derselbe Effekt im Vergleich zu **A<sub>w</sub>** erst bei höheren Aptamerkonzentrationen erreicht werden. Dies ist

zur Beurteilung der lichtabschaltbaren Aptamere wichtig, die vor der Bestrahlung höchstens so aktiv sein können wie **A<sub>1</sub>**. Das Aptamer **A<sub>2</sub>** zeigte nur noch eine geringe Aktivität, während **A<sub>3</sub>** im Rahmen der Messgenauigkeit praktisch inaktiv war. Daher stimmen die Ergebnisse der Gerinnungsuntersuchungen gut mit denjenigen der Wechselwirkungsstudie überein.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse beschlossen wir, unser Set aus lichtaktivierbaren Desoxynucleotiden um dC<sup>NPE</sup> (siehe Schema 1c) zu erweitern.<sup>[9]</sup> Mit einem geschützten Phosphoramidit von dC<sup>NPE</sup> wurden die Aptamer-Antidot-Chimären **A<sub>4</sub>** und **A<sub>5</sub>** hergestellt (Abbildung 2a, zur Synthese siehe Hintergrundinformationen).



**Abbildung 2.** a) Die Sequenzen der photoaktivierbaren Aptamer-Antidot-Chimären **A<sub>4</sub>** und **A<sub>5</sub>**. b) Ergebnisse von Gerinnungsstudien mit den Aptameren **A<sub>1</sub>**, **A<sub>3</sub>** und **A<sub>4</sub>** (vor und nach Bestrahlung, relative Gerinnungszeit gegen Aptamerkonzentration, experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen). c) Zum besseren Vergleich zeigt dieses Diagramm die Werte des Graphen (b) bei einer Aptamerkonzentration von 1500 nM.

Als Nächstes wurden die Fähigkeiten von **A<sub>4</sub>** und **A<sub>5</sub>** untersucht, an Thrombin zu binden und die thrombinabhängige Fibrinbildung zu inhibieren. Wie in den Abbildungen 2b und c zu sehen, ist **A<sub>4</sub>** tatsächlich in der Lage, die Gerinnungszeit konzentrationsabhängig zu verlängern – mit nur unwesentlich geringerer Effizienz als **A<sub>1</sub>**. Wie erwartet, wird **A<sub>4</sub>** nach Bestrahlung inaktiv – außer bei sehr hohen Konzentrationen, bei denen noch Restaktivität detektiert werden konnte. Das Aptamer **A<sub>5</sub>** jedoch war sowohl vor als auch nach Bestrahlung inaktiv (Daten nicht gezeigt). CD-Spektren der Aptamere dieser Studie sind in den Hintergrundinformationen hinterlegt. Vom photochemischen Standpunkt aus war es interes-

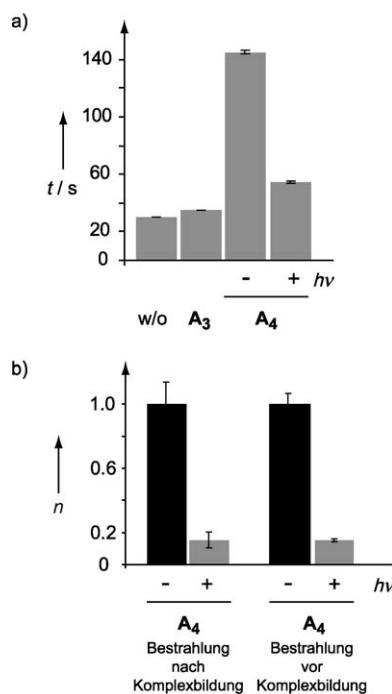
sant für uns zu sehen, wie gut sich DNA mit einem dC<sup>NPE</sup>-Nucleotid entschützen ließ. Nach der Literatur würde man eher erwarten, dass die Photoentschützung mehr Schwierigkeiten bereitet, da die photochemische Spaltung von C-N-Bindungen nicht unproblematisch sein kann.<sup>[10]</sup> Mit unserer Bestrahlungsapparatur (360 nm aus drei UV-LEDs mit je ca. 100 mW) wurden 100 pmol **A<sub>4</sub>** in 7 s entschützt, und die Entschützungsreaktion verlief erstaunlich sauber.

In den bisher beschriebenen Experimenten wurden alle Aptamere vor Beginn des Experiments entschützt. Noch ungeklärt war die Frage, inwieweit auch der gebildete Komplex aus **A<sub>4</sub>** und Thrombin durch Belichtung zerstört werden kann. Abbildung 3 zeigt die zugehörigen Gerinnungs- und

der photoaktivierbaren Gruppe (in diesem Fall an einem dC) von ausschlaggebender Wichtigkeit. Das hier vorgestellte neue Aptamer vereint die Vorteile eines hochspezifischen Antikoagulans mit einer schnellen und effektiven Inaktivierung. Aufgrund dieser Eigenschaften ist dieses neue Antikoagulan besonders gut zur Behandlung von Patienten geeignet, die durch die Schwere ihrer Erkrankung ein hohes Blutungsrisiko tragen. Eine weitere Indikation für ein Antikoagulan mit derartigen Eigenschaften sind extrakorporale Therapieverfahren, wie z.B. die Herz-Lungen-Maschine. In diesem Indikationsfeld muss zur Vermeidung von postoperativen Blutungen die antikoagulatorische Wirkung nach Beendigung des kardiochirurgischen Eingriffs schnell aufgehoben werden. Ferner ist dieser Ansatz generell anwendbar für die räumliche und zeitliche Kontrolle Nucleinsäure-basierter Modulatoren von Proteinfunktion.

Eingegangen am 12. Juni 2006  
Online veröffentlicht am 19. September 2006

**Stichwörter:** Antisense-Wirkstoffe · Aptamere · Blutgerinnung · DNA · Photoaktivierbare Verbindungen



**Abbildung 3.** a) Ergebnisse von Gerinnungsstudien, in denen der Komplex aus Thrombin und **A<sub>4</sub>** bestrahlt wurde, sowie Kontrollversuche mit **A<sub>3</sub>** und ohne Aptamer (Aptamerkonzentration 3 μM). b) Ergebnisse von Filterbindungsexperimenten, in denen entweder vor oder nach der Komplexbildung mit Thrombin bestrahlt wurde (y-Achse: relative Menge gebundenes **A<sub>4</sub>**, Thrombinkonzentration 150 nM).

Filterbindungsexperimente. Es ist klar zu sehen, dass die Photodesaktivierung auch dann noch funktioniert, wenn **A<sub>4</sub>** bereits an Thrombin gebunden hat – eine Tatsache, die für Anwendungen in vivo von großer Wichtigkeit sein wird.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass es möglich ist, ein Aptamer mit Licht anzuschalten,<sup>[5,6]</sup> haben wir nun nachgewiesen, dass es unter Verwendung einer photoaktivierbaren Gegenstrangdomäne auch möglich ist, Aptamere mit Licht auszuschalten. Vor der Lichtinaktivierung hatte das photoaktivierbare chimäre Molekül etwa die Hälfte der Aktivität des unmodifizierten Wildtyps, aber dies kann leicht durch eine Konzentrationserhöhung kompensiert werden. Viel wichtiger ist, dass durch Bestrahlung das Aptamer praktisch inaktiv wird. Wie zuvor<sup>[6]</sup> war auch hier wieder die Position

- [1] a) J. Hirsh, M. O'Donnell, J. I. Weitz, *Blood* **2005**, *105*, 453–463; b) Poetzsch, J. Müller, J. M. Rox, *Transfus. Med. Hemother.* **2006**, *33*, 200–204.
- [2] a) C. P. Rusconi, E. Scardino, J. Layzer, G. A. Pitoc, T. L. Ortel, D. Monroe, B. A. Sullenger, *Nature* **2002**, *419*, 90–94; b) C. P. Rusconi, J. D. Roberts, G. A. Pitoc, S. M. Nimjee, R. R. White, G. Quick, Jr., E. Scardino, W. P. Fay, B. A. Sullenger, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 1423–1428.
- [3] a) C. Tuerk, L. Gold, *Science* **1990**, *249*, 505–510; b) A. D. Ellington, J. W. Szostak, *Nature* **1990**, *346*, 816–820; c) M. Famulok, G. Mayer, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 19–26.
- [4] a) L. C. Bock, L. C. Griffin, J. A. Latham, E. H. Vermaas, J. J. Toole, *Nature* **1992**, *355*, 564–566; b) W. X. Li, A. V. Kaplan, G. W. Grant, J. J. Toole, L. L. K. Leung, *Blood* **1994**, *83*, 677–682.
- [5] A. Heckel, G. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 822–823.
- [6] G. Mayer, L. Kröck, V. Mikat, M. Engeser, A. Heckel, *Chem-BioChem* **2005**, *6*, 1966–1970.
- [7] L. Kröck, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 475–477; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 471–473.
- [8] Gleicher gilt für Aptamere mit weiteren zwei bis vier komplementären Nucleotiden (Daten nicht gezeigt).
- [9] Derartige lichtaktivierbare Verbindungen werden in der englischsprachigen Literatur als „caged compounds“ bezeichnet; für Literatur zu diesem Thema im Allgemeinen sowie zu lichtaktivierbaren Oligonucleotiden im Besonderen sei auf unseren kürzlich erschienenen Aufsatz verwiesen: G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020–5042; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900–4921.
- [10] R. O. Schoenleber, B. Giese, *Synlett* **2003**, 501–504.