

Gerinnungshemmende Wirkstoffe blutsaugender Tiere: von Hirudin zu Hirudinmimetica

Johannes Dodt*

Blutsaugende Tiere enthalten in ihrem Speichel Substanzen, die gezielt in das System der Blutgerinnung des Wirts eingreifen. Bei diesen Wirkstoffen handelt es sich zumeist um niedermolekulare Proteine mit Molekülmassen zwischen 4 und 50 kDa. Einige sind heute mit Hilfe von gentechnologischen Methoden in großer Menge zugänglich, so daß ihre Struktur und die Struktur-Wirkungs-Beziehungen untersucht und sie klinisch erprobt werden können. In Kenntnis der Wirkungsweise solcher Naturstoffe auf molekularer Ebene lassen sich neue Substanzen mit möglicher therapeutischer

Wirkung ableiten. Diese Vorgehensweise wurde in den letzten zehn Jahren an dem Proteinaseinhibitor Hirudin aus medizinischen Blutegeln und dem Thrombin/Hirudin-Komplex getestet. Die Serinprotease Thrombin spielt eine zentrale Rolle bei der komplex verlaufenden Blutgerinnung, und ihre pathophysiologische Wirkung ist letztendlich Ursache für die Entstehung von Thrombosen. Die Selektivität der Bildung von Komplexen aus Hirudin und Thrombin ist in der bivalenten Wechselwirkung des Inhibitors – sowohl mit dem aktiven Zentrum des Enzyms als auch mit einer

Substraterkennungsstelle außerhalb des aktiven Zentrums, der sogenannten Fibrin(ogen)bindungsstelle (FBS) – begründet. Die Kenntnis dieser Wirkungsweise ermöglichte die Synthese difunktioneller Thrombininhibitoren basierend auf Hirudinpeptiden. Hirudin und Hirudinmimetica erweisen sich in vivo als sehr potente Antikoagulantien zur Behandlung arterieller und venöser Thrombosen.

Stichworte: Arzneimittel · Blutgerinnung · Hirudin · Thrombin · Wirkstoffsuche

1. Antithrombotische und fibrinolytische Wirkstoffe blutsaugender Parasiten

Die Verwendung von Blutegeln als Heilmittel wurde bereits in Indien in den Sanskrit-Schriften empfohlen. Blutegeltherapien wurden erstmals von dem kleinasiatischen Arzt Nicandros von Colophon (200–130 vor Christus) beschrieben, doch als eigentlicher Begründer dieser Heilverfahren gilt Themison von Laodice (1. Jahrhundert vor Christus)^[1]. Ancyllus erwähnt um 140 nach Christus die Bdelotomie oder den Blutegelschnitt, ein Verfahren zum vermehrten Blutentzug. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts war die Blutegelbehandlung in Europa weit verbreitet. Insbesondere der napoleonische Armeechirurg Broissais und dessen Schüler Bouillaud sahen fast jede Erkrankung als Folge übermäßiger Reizungen an. Daher wurden Blutegel nicht nur zum Blutentzug und der damit verbundenen allgemeinen Erleichterung der Patienten eingesetzt, sondern auch zur Heilung so unterschiedlicher Erkrankungen wie Blutanhäufungen, Entzündungen, Infektionen, Drüsenfunktionsstörungen und Geisteskrankheiten^[1, 2]. Die gerinnungshemmende Wirkung des Speicheldrüsensekrets des Blutegels *Hirudo medicinalis* (Gat-

tung *Hirudinidae*) wurde 1884 erstmals von Haycraft^[3] beschrieben. Im Jahre 1957 gelang es Markwardt, ein Protein mit inhibitorischer Wirkung gegen Thrombin rein herzustellen^[4], das Hirudin genannt wurde. Neben diesem Inhibitor wurde in den vergangenen Jahren eine Reihe von niedermolekularen Proteinen aus blutsaugenden Parasiten isoliert, die spezifisch in die Reaktionkaskade der Blutgerinnung eingreifen. Wegen ihres potentiellen therapeutischen Nutzens wird dieses Gebiet der Antikoagulantien heute intensiv bearbeitet.

Dieser Beitrag wird zunächst einen Überblick über die Reaktionen bei der Blutgerinnung bieten, anschließend die Wirkungsweise der antithrombotischen und fibrinolytischen Inhaltsstoffe blutsaugender Parasiten darstellen sowie die Vor- und Nachteile der zugrundeliegenden Therapiekonzepte erörtern. Der Thrombin-spezifische Inhibitor Hirudin ist nicht nur wegen seines potentiellen pharmazeutischen Nutzens als Antithromboticum von Interesse, sondern auch wegen seines vermutlich neuartigen Reaktionsmechanismus^[5] und zur Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Die Wirkungsweise von Hirudin wurde mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen von Thrombin/r-Hirudin-Komplexen sowie proteinchemischen und enzymkinetischen Untersuchungen mit rekombinantem Hirudin (r-Hirudin) und Mutanten aufgeklärt. Diese Ergebnisse gaben Impulse zur Synthese von niedermolekularen, peptidischen Thrombininhibitoren. Die Entwicklung dieser

[*] Priv.-Doz. Dr. J. Dodt
Liebfrauenstraße 16
D-45665 Recklinghausen

Hirudinderivate zur Gewinnung neuer Wirkstoffe auf dem Gebiet der Antikoagulantien wird beispielhaft aufgezeigt und ihre mögliche therapeutische Anwendung erörtert.

1.1. Die Physiologie der Blutgerinnung

Die Blutgerinnung (Koagulation) muß, wenn das Blutgefäßsystem beschädigt wird, den Körper vor dem lebensbedrohlichen Blutverlust schützen. Einerseits sind Mechanismen vorhanden, die die Gerinnungsprozesse auf den Ort der Verletzung konzentrieren und zeitlich begrenzen^[6-8]. Andererseits sorgt das fibrinolytische System für den Abbau von Blutgerinnseln (Thromben) und gewährleistet, daß sie nicht zu lebensbedrohlichen Ereignissen wie einer Lungenembolie, einem Schlaganfall oder einen Herzinfarkt führen^[9].

Die Blutgerinnung ist ein komplexes System aus a) zellulären und humoralen Komponenten des fließenden Bluts, b) Komponenten der Gefäßwand und c) vasomotorischen Reaktionen, die in die Dynamik des Blutflusses eingreifen. Die zellulären Bestandteile sind Thrombozyten (Blutplättchen) und Leukozyten, zu den humoralen Komponenten zählen Gerinnungs- und Fibrinolysefaktoren. Störungen im Zusammenspiel der Komponenten können zu Komplikationen führen, bei denen das Gleichgewicht sowohl zu Gunsten der Blutung als auch der Thrombose verschoben werden kann.

Thrombozyten zirkulieren passiv durch die Blutgefäße, die mit einer Schicht von Endothelzellen ausgekleidet sind (Abb. 1). Als primäre Antwort auf eine Gefäßverletzung heften sich die Thrombozyten an den Ort der Verletzung, ändern ihr Aussehen, sekretieren den Inhalt ihrer Speichergranula und aggregieren. Der Status der Blutplättchenaktivierung wird durch eine Reihe von stimulierenden und inhibierenden Mediatoren moduliert^[10, 11]. Die Blutplättchen haben spezifische Rezeptoren auf ihrer Plasmamembran, die diese Stimuli aufnehmen und diesen Vorgang in eine physiologische Antwort umsetzen^[12]. Bei der Adhäsion lagern sich die Thrombozyten über Oberflächen-

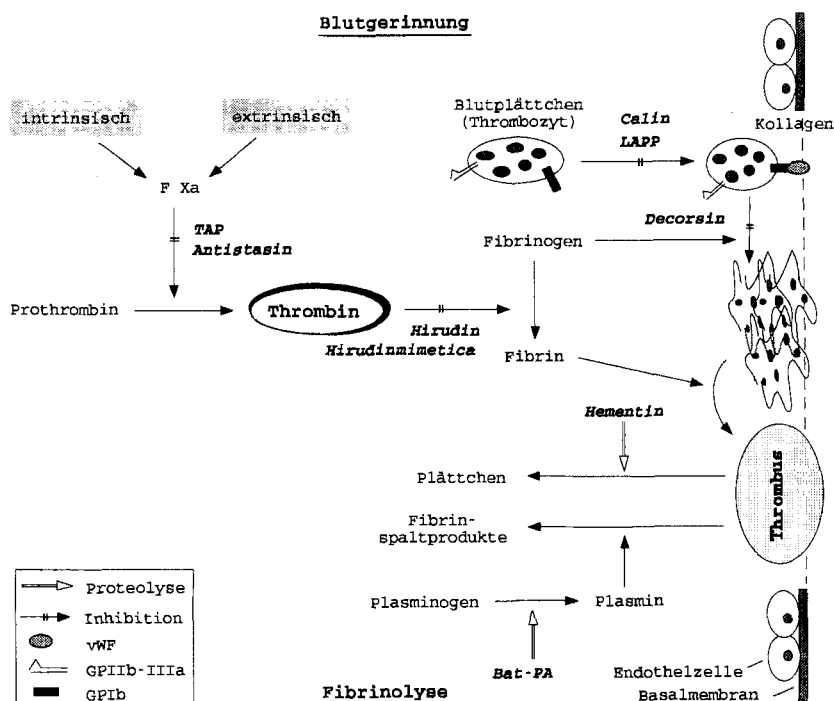


Abb. 1. Schematische Darstellung des Gerinnungs- und Fibrinolysegeschehens unter Berücksichtigung der Angriffspunkte von Wirkstoffen blutsaugender Parasiten; modifiziert nach Lit. [140].

rezeptoren an Proteine der extrazellulären Matrix an, die durch die Beschädigung der Endothelzellschicht freigelegt wurden^[13]. Dies führt zur Aktivierung der Blutplättchen, zur Amplifikation des auslösenden Signals und zur Vervollständigung des Plättchenverschlusses. Das Signal kann entweder durch die Freisetzung bereits gebildeter Bestandteile aus den Granula oder durch die Neusynthese von bestimmten Substanzen verstärkt werden. Granula-Inhaltsstoffe, die das Signal verstärken, sind Serotonin und Adenosindiphosphat (ADP), zu den Adhäsionsproteinen gehören der von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen und Thrombospondin. Der vWF unterstützt die Adhäsion der Plättchen an das Subendothel über das membranständige Glycoprotein Ib (GPIb) und bewirkt damit deren Aktivierung. Aus dieser resultiert die Änderung der Konformation des Glycoproteins IIb-IIIa (GPIIb-IIIa; ein Mitglied der Integrinfamilie), eine notwendige Voraussetzung für die Aggregation, bei der die Blutplättchen über Fibrinogenmoleküle des Plasmas direkt miteinander verbrückt werden.



Johannes Dodt, geboren 1954 in Recklinghausen, studierte Chemie an den Universitäten Münster und München. 1985 promovierte er bei Prof. H. Fritz mit Arbeiten, die in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie an der Chirurgischen und der Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität in München angefertigt wurden. Nach einer Postdoktorandenzeit bei Prof. H. G. Gassen am Institut für Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt wurde er 1988 wissenschaftlicher Mitarbeiter und 1993 Privatdozent an diesem Institut. 1994 arbeitete er an der Georgetown University in Washington, D.C. Seine Forschungsschwerpunkte sind Proteasen und Proteaseinhibitoren.

Gleichzeitig mit der Zusammenballung der Plättchen werden die löslichen Komponenten des Gerinnungssystems aktiviert, so daß sich ein Fibrinnetz unter Einschluß der Plättchen und anderer Plasmazellen am Ort der Verletzung bildet. Die Blutgerinnung entspricht einer Abfolge von Zymogenaktivierungen (Substrataktivierungen), in deren Verlauf die aktivierte Form eines Faktors die Aktivierung des nächsten katalysiert. Eine zentrale Eigenschaft der Blutgerinnungskaskade ist die Bildung von Komplexen aus Proteasen, regulatorischen Proteinen (Cofaktoren) und ihren Substraten (Zymogenen) an Membranoberflächen, beispielsweise an der Oberfläche der Plättchen^[6–8, 14]. Da die Aktivierung an Membranoberflächen abläuft, wird Thrombin nur am Ort der Verletzung gebildet. Schematisch wird das Geschehen je nach Stimulus dem intrinsischen oder extrinsischen Reaktionsweg zugeordnet, die in einen gemeinsamen Weg münden und die Aktivierung des Gerinnungsfaktors α -Thrombin bewirken. Das Schlüsselereignis für die Initiation der Blutgerinnung ist die Exposition von Thromboplastin (einer Komponente des extrinsischen Wegs), dem Cofaktor für die Faktor-VIIa-vermittelte Aktivierung von Faktor IX und Faktor X^[15–17]. Durch den Prothrombinasekomplex (Faktor Xa, Faktor Va, Phospholipide, Ca^{2+} -Ionen) aktiviertes Prothrombin reagiert an der Oberfläche aktivierter Blutplättchen zu Thrombin; dieser Schritt zählt zum gemeinsamen Reaktionsweg^[14].

Thrombin nimmt eine zentrale Stellung bei der Blutgerinnung ein. Es übt sowohl enzymatische als auch Hormon-ähnliche Funktionen aus, die die Blutgerinnung entweder verstärken oder abschwächen^[18, 19]. Aus der Spaltung des Fibrinogens durch Thrombin resultiert Fibrin^[20], das polymerisiert und die Grundlage für ein Blutgerinnsel (Thrombus) bildet. Faktor XIIIa, der Fibrinmoleküle kovalent miteinander vernetzt, wird durch Thrombin aktiviert^[21], ebenso wie in einer positiven Feedback-Reaktion die Cofaktor-Proteine V^[22] und VIII^[23]. Zusätzlich kann Thrombin den Faktor XI (intrinsischer Weg) in Gegenwart von negativ geladenen Phospholipiden (aktivierte Blutplättchen) aktivieren^[24]. Thrombin ist der stärkste Stimulator der Plättchenaggregation, die durch die Thrombin-vermittelte Spaltung des Thrombinrezeptors ausgelöst wird^[25, 26]. Thrombin ist jedoch auch in antithrombotische Prozesse regulatorisch eingebunden. Bindet es an den Endothelzellrezeptor Thrombomodulin, so wird seine proteolytische Aktivität verän-

dert: Thrombin wird zu einem potenten Aktivator des Proteins C^[27, 28]. Diese Protease inaktiviert die Cofaktor-Proteine Va und VIIIa, wodurch die Thrombinbildung gedrosselt wird. Die Wechselwirkung von Thrombin mit Endothelzellen führt zur erhöhten Freisetzung des Gewebeplasminogenaktivators (tPA), der die Fibrinolyse einleitet, oder zur Freisetzung von beispielsweise Prostaglandin I₂ (PGI₂) oder Stickstoffmonoxid (NO), die Einfluß auf die Plättchenaggregation haben^[29]. Die enzymatische Aktivität von Thrombin wird von endogenen Inhibitoren kontrolliert. Zu ihnen zählen α_2 -Makroglobulin^[30], die Serpine AT III^[31] und der Heparin-Cofaktor II^[32].

Im fibrinolytischen System wird das inaktive Zymogen Plasminogen durch Plasminogenaktivatoren zu Plasmin umgewandelt. Die aktivierte Protease löst Blutgerinnsel auf, indem sie Fibrin zu löslichen Fibrinospaltprodukten abbaut. In diesem Prozeß sorgt die Anlagerung des Plasminogenaktivators und von Plasminogen an der Fibrinoberfläche für die optimale Aktivierung des Plasminogens und für die notwendige Nähe zum Substrat Fibrin^[9]. Die Fibrinoberfläche schützt zusätzlich Plasmin vor der Inaktivierung durch α_2 -Antiplasmin^[33], denn mit dem Blutstrom fortgeführtes Plasmin wird rasch durch diesen Inhibitor inaktiviert. Hohe Konzentrationen von Plasmin im Blut führen zum Verbrauch von α_2 -Antiplasmin sowie – durch Abbau der Gerinnungsfaktoren V und VIII und des Fibrinogens – zu einer Blutungsneigung^[34].

1.2. Blutegel-Inhaltsstoffe: ein gezielter Eingriff in die Blutgerinnungskaskade

Die Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen sind ein wichtiger Angriffspunkt bei der Entwicklung antithrombotisch wirksamer Substanzen^[35, 36]. Die Blutegelwirkstoffe greifen in die unterschiedlichen Reaktionsschritte, an denen Blutplättchen beteiligt sind, ein. Das leech antiplatelet protein (LAPP) des Blutegels *Haementeria officinalis* (Tabelle 1) inhibiert die Adhäsion der Plättchen an Kollagen sowie die Kollagen-vermittelte Aggregation^[37, 38]. Das Protein Calin des Blutegels *Hirudo medicinalis* unterbindet hingegen die Adhäsion von Blutplättchen an subendotheliale Strukturen^[39], während das Protein Moubatin der Zecke *Ornithodoros moubata* spezifisch die Kollagen-

Tabelle 1. Übersicht über gerinnungshemmende und fibrinolytische Wirkstoffe blutsaugender Parasiten.

Wirkstoff	Herkunft	M/kDa	Aktivität	Wirksamkeit	Lit.
Hirudin	<i>Hirudo medicinalis</i>	7	Thrombininhibitor	$K_i = 27 \text{ fM}$	[61, 88]
Haemadin	<i>Haemadipsa sylvestris</i>	5.2	Thrombininhibitor	$K_i = 100 \text{ fM}$	[72]
Rhodniin	<i>Rhodnius prolixus</i>	11.1	Thrombininhibitor	$K_i = 203 \text{ fM}$	[73]
Antistasin	<i>Haementeria officinalis</i>	15	Faktor-Xa-Inhibitor	$K_i = 0.4 \text{ nM}$	[135]
Tick anticoagulant peptide (TAP)	<i>Ornithodoros moubata</i>	6.8	Faktor-Xa-Inhibitor	$K_i = 0.5 \text{ nM}$	[136]
Decorsin	<i>Macrobella decora</i>	4.4	Inhibition der ADP-induzierten Plättchenaggregation	$\text{IC}_{50} = 500 \text{ nM}$	[20]
Leech antiplatelet protein (LAPP)	<i>Haementeria officinalis</i>	16	Inhibition der Adhäsion von Plättchen an Kollagen sowie der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation	$\text{IC}_{50} = 60 \text{ nM}$	[12, 13]
Calin	<i>Hirudo medicinalis</i>	55	Inhibition der Plättchenadhäsion	[a]	[14]
Moubatin	<i>Ornithodoros moubata</i>	17	Inhibition der Kollagen-induzierten Plättchenaggregation	$\text{IC}_{50} = 50 \text{ nM}$	[15, 16]
Hementin	<i>Haementeria ghilianii</i>	120	Spaltung von Fibrinogen/Auflösung plättchenreicher Gerinnsel	$K_m = 1 \text{ }\mu\text{M}$	[54, 55]
Plasminogenaktivator der Vampirfledermaus (Bat-PA)	<i>Desmodus rotundus</i>	49	Aktivierung des Plasminogens/Einleiten der Fibrinolyse	$k_{\text{cat}}/K_m = 4 \text{ oder } 174\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ in Ab- bzw. Anwesenheit von Fibrin}$	[49, 51]

[a] Keine Angaben.

vermittelte Aggregation inhibiert^[40, 41]. Die bedeutende Rolle des Glycoproteins GPIIb-IIIa für die Aggregation zeigt sich bei Patienten mit dem Glanzmann-Syndrom^[42]. Als Folge eines angeborenen Defekts oder eines Mangels an funktionellem GPIIb-IIIa binden die Plättchen kein Fibrinogen und aggregieren nicht^[43]. Da diese Reaktion für alle Stimuli dem gemeinsamen Weg der Plättchenreaktion entspricht, werden GPIIb-IIIa-Antagonisten als vielversprechende antithrombotische Wirkstoffe angesehen^[44]. Der mexikanische Blutegel *Macrobella decora* verfügt über das Protein Decorsin, das als Antagonist von GPIIb-IIIa die Plättchenaggregation inhibiert^[45]. Die antagonistische Wirkung dieses Proteins wird über das Arg-Gly-Asp(RGD)-Sequenzmotiv vermittelt, wie es auch für Disintegrine aus Schlangengiften bekannt ist^[46]. Ursprünglich wurde die RGD-Sequenz als adhäsives Motiv von Fibronektin entdeckt^[47]; sie kommt auch in den im Plasma zirkulierenden Proteinen Fibrinogen, vWF und Vitronektin vor. Die Wirkstoffe, die in die Reaktionen der Plättchen eingreifen, könnten vielleicht bei der Behandlung von instabiler Angina, akutem Herzinfarkt, Schlaganfall und als unterstützende Maßnahme bei der Thrombolysetherapie angewendet werden^[44, 48]. Hinsichtlich der therapeutischen Verwendung solcher Proteine und Peptide bleibt allerdings die Frage offen, welche Wirkungen die frühen Phasen der Plättchenreaktionen, die nicht durch GPIIb-IIIa-Antagonisten gehemmt werden, auf die Gerinnung ausüben.

Das Ziel der therapeutischen Anwendung von Plasminogenaktivatoren ist das Wiederdurchgängigwerden (Rekanalisation) thrombosierter Gefäße, z.B. nach einem Herzinfarkt. Ein Problem dieser Therapie mit den heute verfügbaren Plasminogenaktivatoren (Gewebeplasminogenaktivator, einkettiger Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp, Streptokinase, Antistreptase) besteht darin, daß das fibrinolytische System gleichzeitig systemisch aktiviert wird, wodurch α_2 -Antiplasmin verbraucht wird und unerwünschte Reaktionen des Plasmins resultieren. Obwohl tPA seine Aktivität Fibrin-abhängig entfaltet, ist in diesem Falle nicht nur die therapeutisch notwendige Dosierung, sondern auch die zusätzliche Stimulierung der tPA-Aktivität durch Fibrinspaltprodukte für diese Effekte verantwortlich^[49]. Die Vampirfledermaus *Desmodus rotundus* hat Plasminogenaktivatoren (Bat-PA) (siehe Tabelle 1), die in vitro ihre Aktivität selektiv in Gegenwart von Fibrin entfalten^[50, 51]. Es wird daher erwartet, daß sich diese im Vergleich zu humanem tPA bis zu 600fach höhere Fibrinselektivität auch in den pharmakologischen Eigenschaften von Bat-PA bei der Thrombolysetherapie widerspiegelt^[52]. Der Vorteil der höheren Fibrinselektivität könnte jedoch durch den nicht humanen Ursprung dieser Proteinase und der damit verbundenen Gefahr von Immunreaktionen abgeschwächt werden. In einem Thrombosemodell wurden experimentell verschlossene Femoralarterien von Kaninchen durch Bat-PA rasch rekanalisiert, ohne systemische Effekte wie die Fibrinogenolyse oder den Plasminogenmangel auszulösen^[53]. Bat-PA könnte daher die Sicherheit und die Effektivität einer Thrombolysetherapie erhöhen, da die beim Menschen auftretenden, negativen Nebeneffekte bisher genutzter Thrombolytica im Tiermodell nicht ausgelöst werden. Diese Ergebnisse sollten jedoch zunächst nicht überbewertet werden, da sich die mit tPA in Tierversuchen erzielte Fibrinselektivität bei der Anwendung beim Menschen nicht bestätigte^[54]. Darüber hinaus ist die hohe Fibrinselektivität von Bat-PA noch keine Garantie

für ein vermindertes Blutungsrisiko, da es auch möglich sein könnte, daß die ausschließlich auf Gerinnsel ausgerichtete Selektivität den notwendigen hämostatischen Verschuß auflöst. Grundsätzlich besteht bei der Anwendung der Plasminogenaktivatoren die Gefahr der Freisetzung von Thrombusgebundenem Thrombin, die zu einem erneuten Einsetzen der Gerinnung und insbesondere die Aktivierung der Plättchen durch Spaltung des Thrombinrezeptors führen kann^[25, 26]. Begleitende antithrombotische Maßnahme wirken sich daher in jedem Falle positiv auf eine Thrombolyse aus^[55].

Je nachdem, wie ein Gerinnsel entsteht, bilden sich plättchenreiche oder erythrozytenreiche Gerinnsel. Das Enzym Hementin^[56] des im Amazonasgebiet vorkommenden Blutegels *Haementeria ghilianii* (siehe Tabelle 1) löst spezifisch und effektiv plättchenreiche Thromben auf^[57]. Da tPA in therapeutischer Dosis relativ ineffektiv gegenüber plättchenreichen Gerinnseln ist^[58], könnte Hementin aufgrund seiner Eigenschaft die heute eingesetzten Thrombolytica ergänzen.

Die Bildung von Thrombin in der Blutgerinnungskaskade ist Ursache jeder Gerinnselbildung. Eine Reihe von Blutegeln und Zecken haben sehr potente Inhibitoren (siehe Tabelle 1), um dieses Schlüsselenzym (Hirudin, Haemadin, Rhodniin) oder den Thrombinaktivator Faktor Xa (Antistasin, tick anticoagulant peptide (TAP)) zu kontrollieren. Diese Inhibitoren haben sich bereits in vivo in einer Reihe von arteriellen und venösen Thrombosemodellen bewährt^[59–62]. Nach einer ausführlichen Darstellung der Thrombin/Hirudin-Komplexbildung und der Entwicklung von Hirudinmimetica werden pharmakologische Aspekte dieser Inhibitoren besprochen (siehe Abschnitt 4).

2. Thrombin/Hirudin-Komplexe: Hirudin, das Basismolekül einer neuen Klasse von Serinproteaseinhibitoren

Basierend auf der Primärstruktur^[63–65] des aus 65 Aminosäureresten bestehenden Hirudins läßt sich das Molekül in zwei Bereiche einteilen: eine N-terminale, durch drei Disulfidbrücken verknüpfte Domäne und einen C-terminalen Bereich, der einen hohen Gehalt an sauren Aminosäureresten aufweist (Abb. 2A). Ein zusätzlicher saurer Rest wird durch die posttranslationale Bildung eines Tyrosinschwefelsäureesters γ an Position 63 erzeugt^[63, 66, 67]. Mehr als 20 Primärstrukturen von Hirudinformen wurden bislang aufgeklärt^[64, 67–70], die sich teilweise nur in wenigen Resten unterscheiden; die minimale Sequenzidentität beträgt 65% (Abb. 2B). In der Gattung der *Hirudinidae* wurden Inhibitoren vom Hirudintyp auch aus der Egelart *Hirudinaria* isoliert und kloniert^[71, 72]. Der Thrombininhibitor Haemadin aus *Haemadipsa sylvestris* (Gattung *Haemadipsidae*) ist mit 57 Aminosäureresten der bislang kürzeste, natürliche vorkommende Thrombininhibitor. Seine Sequenzidentität zu Hirudin ist zwar nur gering (Abb. 2B), er kann aber aufgrund gemeinsamer Strukturmerkmale demselben Inhibitor-typ zugerechnet werden^[73].

Die Aufklärung der Primärstruktur von Hirudinformen ließ die Klonierung einer cDNA von Hirudin zu^[74] sowie die chemische Synthese von entsprechenden Genen^[75, 76]. Die gentechnologische Gewinnung des Proteins ermöglichte Untersuchungen zur Struktur des Inhibitors in Lösung, die Aufklärung der

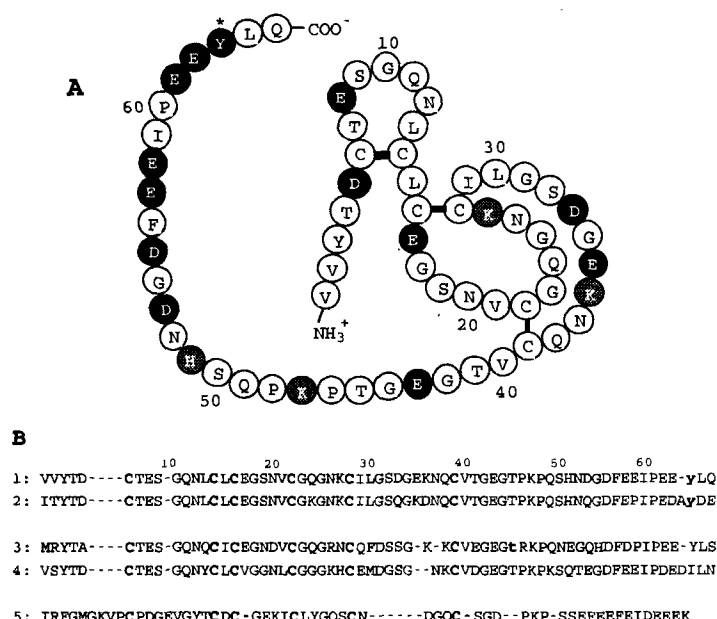


Abb. 2. Primärstrukturen von Thrombininhibitoren des Hirudintyps aus Blutegeln. A) Vollständige, kovalente Struktur von Hirudin [65]; *: der Aminosäurerest Tyr63 ist in den natürlich vorkommenden Hirudinen posttranslational mit einem Sulfat verestert. B) Vergleich der Sequenzen der Isoformen 1–5 des Hirudins aus *Hirudo medicinalis* (1, 2) [64, 67], *Hirudinaria manillensis* (3, 4) [71, 72] und *Haemadipsa sylvestris* (5) [73] (y: Tyrosinschwefelsäureester; t: O-Glycosylierung an Threonin). Das Haemadin (5) weist eine nur geringe Sequenzidentität gegenüber den anderen Inhibitoren auf. Es kann aber aufgrund gemeinsamer Strukturmerkmale den Inhibitoren vom Hirudintyp zugerechnet werden [73].

Struktur des Komplexes aus Thrombin und Hirudin durch Röntgenstrukturanalysen an Proteinkristallen und die kinetische Beschreibung der Thrombin/Hirudin-Komplexbildung mit Hilfe von Hirudinmutanten. Im folgenden werden Hirudinmutanten als XnY-Hirudin bezeichnet, wobei der Aminosäurerest X (Einbuchstaben-Nomenklatur) an Position n durch den Aminosäurerest Y ersetzt wurde.

2.1. Die dreidimensionale Struktur des Thrombin/r-Hirudin-Komplexes

Thrombin wird aufgrund seiner Homologie zu Trypsin und Chymotrypsin der Klasse der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen zugerechnet. Wie Trypsin weist Thrombin eine Spezifität gegenüber basischen Aminosäureresten in der P1-Position von Substraten auf. Es kann eine Reihe von kleinen Peptidsubstraten spalten, zeigt jedoch eine ausgeprägte Spezifität in bezug auf makromolekulare Substrate. Die strukturelle Grundlage für die Substratspezifität wurde bereits aus der dreidimensionalen Struktur von Thrombin im Komplex mit dem Inhibitor D-Phe-Pro-Arg-Chlormethylketon (PPACK-Thrombin) ersichtlich (Abb. 3) [77]. Das aktive Zentrum mit seinen katalytisch wirksamen Aminosäureresten verläuft (bezogen auf Abb. 3 und 4) in West-Ost-Richtung unter Bindung des Substrats vom N- zum C-Terminus. Nach Osten hin geht das aktive Zentrum in eine Furche über, die Fibrin(ogen)-Bindungsstelle (FBS). Die katalytische Triade Ser195-His57-Asp102 unterscheidet sich nicht von der anderer Trypsin-ähnlicher Serinproteasen, doch führen Insertionen, bezogen auf Trypsin, zur Vertiefung und Verengung der Struktur des aktiven Zentrums. Dieses wird nach Norden hin durch die (Tyr-Pro-Pro-Trp)-Schleife und nach Süden hin durch die Trp148-Schleife (Glu146 bis Gly149D^[*] auch γ -Loop genannt) begrenzt (Abb. 4). Diese zusätzlichen Strukturelemente determinieren zum Teil die Spezifität von Thrombin, in dem manche Proteinsubstrate – sterisch bedingt – ausgeschlossen werden. Aus Bindungsstudien an Modellen wurde ersichtlich, daß die „kanonischen Proteaseinhibitoren“ insbesondere mit der starren (Tyr-Pro-Pro-Trp)-

[*] Die Nomenklatur der Aminosäurereste erfolgt nach Lit. [77]. Die Numerierung gibt die topologisch äquivalenten Reste des Chymotrypsins an. Bei Insertionen bezüglich des Chymotrypsins wird von der entsprechenden Position ausgehend (z.B. Thr149) diese Nummer mit dem dazugehörigen Rest (hier: Gly) und einem angefügten A, B, C usw. (je nach Reihenfolge innerhalb der eingefügten Aminosäurereste; hier D) angegeben.

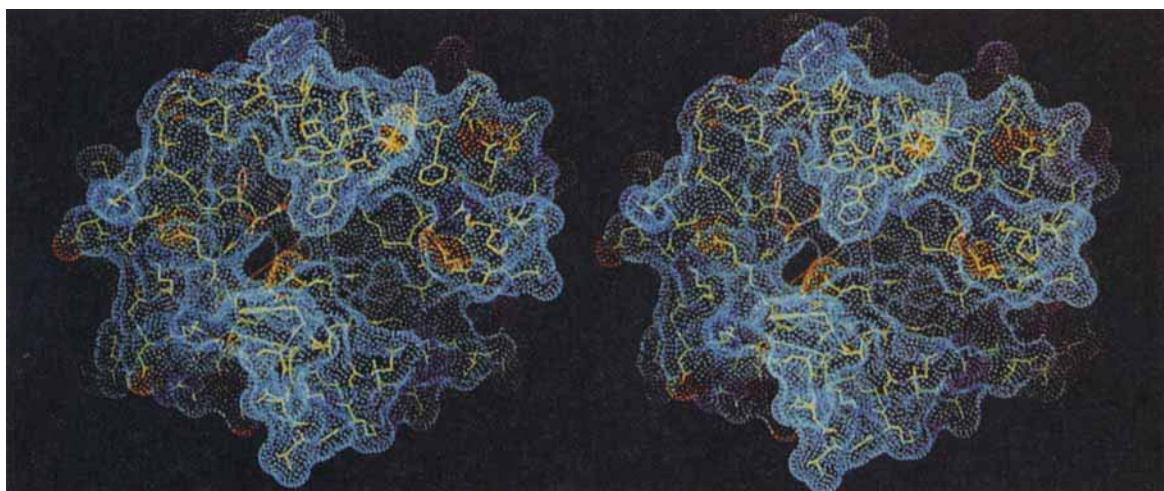


Abb. 3. Blick in das aktive Zentrum von humanem Thrombin; Stereodarstellung aus Lit. [77]. Die durch Punkte dargestellte Moleküloberfläche (dot surface) repräsentiert denjenigen Anteil an van-der-Waals-Radien von Oberflächenatomen, der mit Lösungsmittelmolekülen in Kontakt treten kann (Connolly-Oberfläche) [141]. Dunkelblaue, orangerote oder hellblaue Oberflächen geben basische, saure oder andere Aminosäurereste an. Der peptidische, irreversible Inhibitor D-Phe-Pro-Arg-Chlormethylketon (orangerot) ist im aktiven Zentrum gebunden. Die Seitenkette des Argininrests dieses Inhibitors dringt in die Spezifitätstasche S1 ein. Die Erkennung makromolekularer Substrate erfolgt über die Fibrin(ogen)-Bindungsstelle, einer Furche entlang der Thrombinoberfläche, die in Verlängerung des aktiven Zentrums in West-Ost-Richtung verläuft.

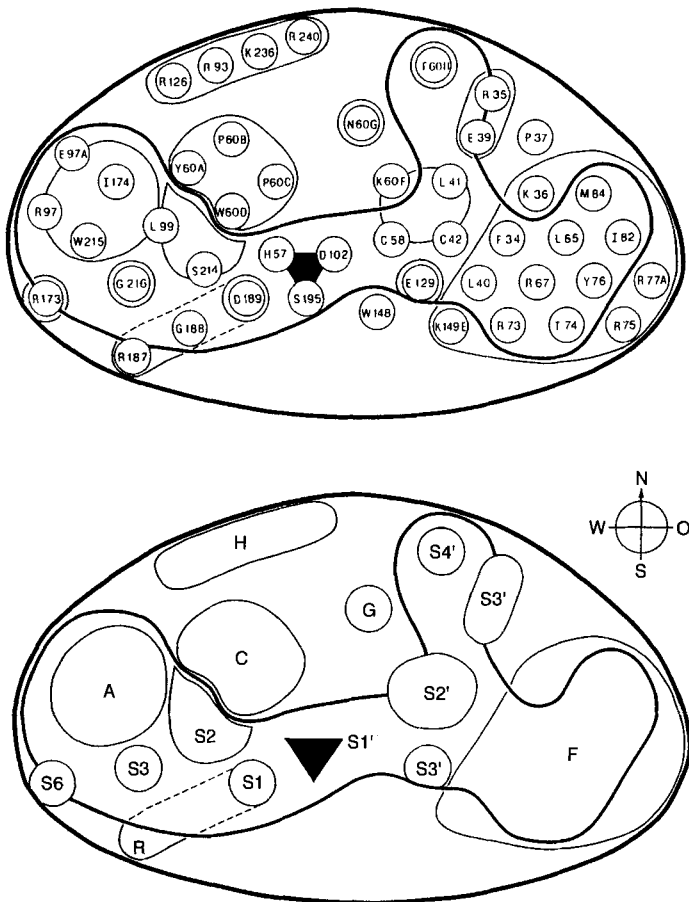


Abb. 4. Schematische Darstellung der Bindungsstellen auf der Thrombinoberfläche, aus Lit. [106]. Oben: Darstellung der Aminosäurereste, die an der Bildung der Bindungsstellen beteiligt sind; unten: Einteilung der Oberfläche in funktionelle Bereiche. \blacktriangledown = aktives Zentrum; S1–S6 = Spezifitätstaschen, die N-terminal zur Spaltstelle angeordnet sind; A = Aryl-Bindungsstelle; F = Fibrin(ogen)-Bindungsstelle; H = vermutliche Heparin-Bindungsstelle; G = Glycosylierung; S1'–S4' = vermutliche Spezifitätstaschen, die C-terminal zur Spaltstelle angeordnet sind; C = chemotaktisch wirkender Bereich; R = Arg-Gly-Asp-Sequenz. Der Kompaß definiert die Orientierung relativ zum aktiven Zentrum.

Schleife kollidieren würden, woraus sich ihre schwache Wechselwirkung mit Thrombin ableiten läßt^[78]. Die primäre Spezifitätstasche S1 weist an ihrem Boden einen Asparaginsäurerest

(t-Asp189)^[*] auf, der Salzbrücken mit den positiv geladenen Seitenketten basischer P1-Reste eingeht. Die hydrophobe S2-Tasche ist geeignet, um unpolare Reste mittlerer Größe (Pro, Ile, Ala, Val) aufzunehmen; sie geht über in eine weitere hydrophobe Tasche (Aryl-Bindungstasche A), die speziell mit aromatischen Resten Wechselwirkungen eingehen kann (Abb. 4). Für die Spaltung von makromolekularen Substraten wie dem Fibrinogen ist die ausschließliche Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum von Thrombin nicht ausreichend; sie bedarf zusätzlich der Erkennung über die FBS^[79–81]. Diese Bindungsstelle wird aus einer Anhäufung positiv geladener Aminosäurereste der Peptidketten t-Phe34–t-Leu41 und t-Lys70–t-Glu80 gebildet (Abb. 4).

In den Komplexen aus Serinproteasen und Inhibitoren, die nach einem „kanonischen Muster“ miteinander reagieren, bildet sich zwischen den Aminosäureresten einer an der Oberfläche des Inhibitors gelegenen Peptidschleife (reactive site loop) und dem aktiven Zentrum des Enzyms eine antiparallele β -Faltblattstruktur aus. Die Tertiärstruktur dieser Peptidschleife ist bei Inhibitoren einer Familie (z.B. Kazal, Kunitz etc.) konserviert. Die Konformation der an der Oberfläche liegenden Schleife ist sowohl in der freien als auch in der gebundenen Form nahezu identisch und man nimmt an, daß die Stabilisierung der Konformation über Wechselwirkungen mit dem Kernbereich des Inhibitors zu den stabilen Enzym/Inhibitor-Komplexen führt^[82]. Die Peptidschleife wird vom Zielenzym ähnlich wie ein Substrat koordiniert. Sie enthält eine hydrolysierbare Peptidbindung (P1–P1'), deren P1-Aminosäureseitenkette die primäre Spezifität eines Inhibitors für eine Protease bestimmt^[83], da die Seitenkette des P1-Aminosäurerests hierbei in die Spezifitätstasche (S1) der Zielprotease bindet^[82].

Die Struktur des Thrombin/r-Hirudin-Komplexes im Kristall zeigt, daß Hirudin im Gegensatz zu den kanonischen Inhibitoren von seiner Reaktionsweise her ein bivalenter Inhibitor ist^[84, 85]. Hirudin geht einerseits Kontakte mit dem aktiven Zentrum und andererseits mit der FBS von Thrombin ein (Abb. 5). Im Komplex liegt die disulfidverbrückte N-terminale Domäne (Reste 1–48) über dem aktiven Zentrum des Throm-

[*] Das vorangestellte t- kennzeichnet Aminosäurereste des Thrombins.

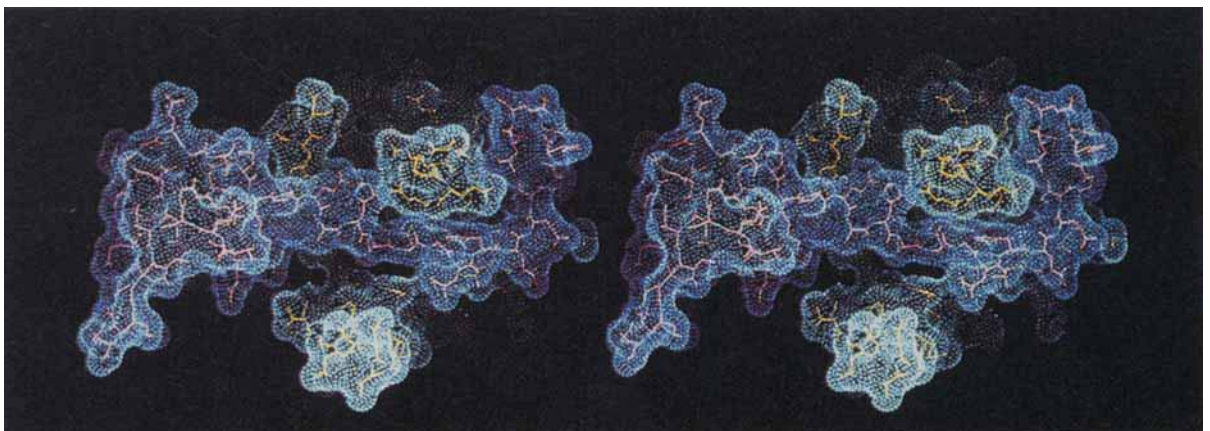


Abb. 5. Stereodarstellung der Struktur des Thrombin/r-Hirudin-Komplexes. Ein Ausschnitt der Thrombinstruktur ist grün, die Hirudinstruktur blau dargestellt. Der N-terminale Bereich des Inhibitors (h-Tyr3–h-Lys47) faltet zu einer globulären Domäne (links), während der C-Terminus des Hirudins in ausgestreckter Form entlang der FBS des Thrombins verläuft und in einer kurzen 3_{10} -Helix endet. Die Orientierung des Thrombins entspricht derjenigen in den Abbildungen 3 und 4.

bins und verhindert damit den Zugang von Substraten zum aktiven Zentrum. Die C-terminale Kette von r-Hirudin, die in Lösung völlig ungeordnet vorliegt^[86, 87], nimmt im Komplex eine gestreckte Konformation an und ist in einer langen Furche entlang der Oberfläche des Thrombins, positioniert, und zwar entlang der FBS.

Der N-Terminus des Inhibitors hat im Komplex im wesentlichen die gleiche Struktur wie in Lösung (NMR-spektroskopisch ermittelt)^[86, 87]. Die N-terminalen Reste h-Ile1^[*]–h-Thr4 dringen in das aktive Zentrum von Thrombin ein (Abb. 6), wobei die Reste von h-Ile1L-h-Tyr3 ein paralleles β -Faltblatt mit den

schen h-Asp5 und t-Arg221-A orientiert. Der größte Teil der N-terminalen Domäne wechselwirkt nicht mit α -Thrombin. Von den 48 N-terminalen Resten sind 15 direkt in 103 Kontakte kleiner 4 Å einbezogen, wobei 41 dieser intermolekularen Kontakte auf das N-terminale Tripeptid des Hirudins zurückzuführen sind^[78].

Der in einer gestreckten Konformation vorliegende, 3.7 nm lange, C-terminale Bereich des r-Hirudins besetzt mit den Positionen 48–65 die FBS (Abb. 5 und 7). Bedingt durch einen Knick in der Peptidkette bei h-Asp55 läßt er sich in zwei Einheiten von 1.8 nm und 1.9 nm Länge unterteilen. Die C-terminale Peptidkette beginnt mit einer Polypyrrolin-II-Helix von h-Pro46–h-Pro48, gefolgt von den Resten h-Glu49–h-His51, die Salz- und Wasserstoffbrücken mit Thrombin eingehen; die folgenden drei Reste können wegen der geringen Auflösung der Elektronendichtekarte nicht näher beschrieben werden. In diesem Peptidsegment kommt es zu 33 intermolekularen Kontakten kleiner 4 Å mit Thrombin. Die Konformation der Reste h-Asp55–h-Pro60 ist ebenfalls gestreckt (1.5 nm Länge). Der C-Terminus endet mit einer 3_{10} -Helix, die von den Aminosäureresten h-Glu61–h-Leu64 gebildet wird. Die Kontakte mit dem Enzym beruhen teils auf ionischen Wechselwirkungen zwischen den sauren (h-Asp55, h-Glu57, h-Glu58, h-Gln65) und basischen Resten der

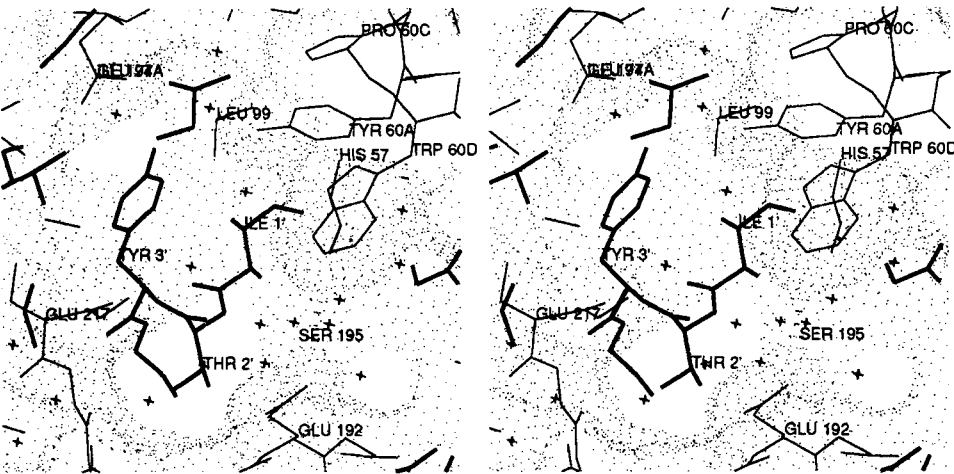


Abb. 6. Der Hirudinbereich h-Ile1–h-Thr4 (dicke Linien; Nomenklatur der Hirudinreste siehe Abb. 4), umgeben von Aminosäureresten des Thrombins (dünne Linien), die zusammen mit der Connolly-Oberfläche (siehe Abb. 3) und Wassermolekülen (Kreuze) dargestellt sind. Die weiße Fläche um h-Thr2 markiert den Eingang zur S1-Tasche, die im Thrombin/r-Hirudin-Komplex nicht durch eine Aminosäureseitenkette des Inhibitors ausgefüllt wird. Der Aminosäurerest h-Ile1 besetzt die hydrophobe S2-Tasche des Thrombins, seine α -Aminogruppe ist im Wasserstoffbrückenabstand zu t-His57 (Ne) und t-Ser195 (O_γ); Stereoabbildung aus Lit. [82].

Thrombinresten t-Ser214–t-Gly219 erzeugen. Die freie α -Aminogruppe des N-Terminus von r-Hirudin bildet Wasserstoffbrücken mit dem an der Katalyse beteiligten Hydroxysauerstoffatom des t-S195-Rests und weiterhin mit dem Carbonylsauerstoff der t-Ser214-Einheit. Die Seitenkette von h-Ile1 besetzt die hydrophobe S2-Tasche, und der Phenylring des h-Tyr3-Rests paßt sich in die Aryl-Bindungsstelle ein (Abb. 6). Bemerkenswerterweise bleibt die Spezifitätstasche S1 unbesetzt. h-Thr2 ist zwar am Eingang dieser Tasche lokalisiert, doch ist die Seitenkette zu klein, um deutlich in diese Tasche einzutauchen. Intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der ϵ -Aminogruppe des h-Lys47-Rests und h-Thr4 oder h-Asp5 könnten die Freiheitsgrade der N-terminalen fünf Aminosäurereste einschränken. Das N-terminale Tripeptid wird im Komplex in seiner Position durch eine Salzbrücke zwi-

FBS, teils auf nichtionischen (h-Phe56, h-Ile59, h-Pro60, h-Tyr63, h-Leu64). Von den C-terminalen elf Aminosäureresten gehen acht Reste 81 Kontakte kleiner 4 Å mit Thrombin ein.

Die Struktur des Thrombin/r-Hirudin-Komplexes ist einem vollkommen neuartigen, bivalenten Inhibitortyp zuzuordnen. Daher war es auch von biochemischem Interesse, den Mechanismus der Komplexbildung näher zu untersuchen.

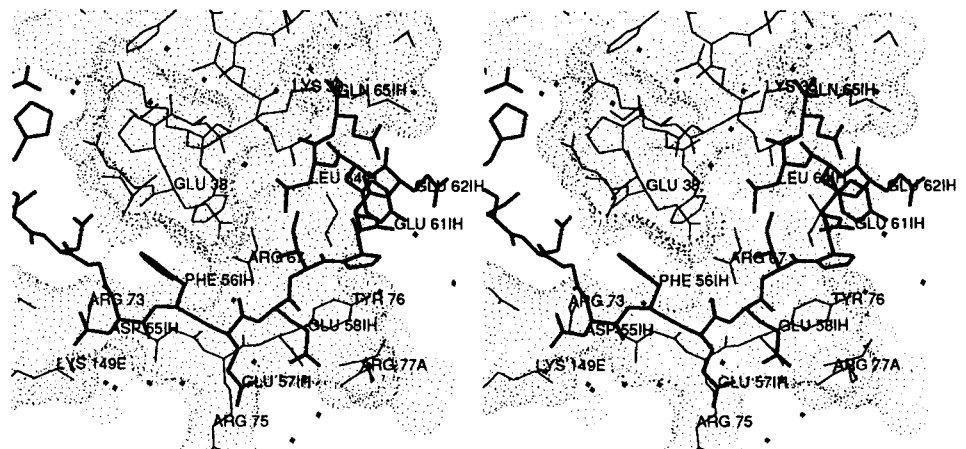


Abb. 7. Fibrin(ogen)-Bindungsstelle von Thrombin (dünne Linien) und C-terminaler Bereich des Hirudins (dicke Linien) im Thrombin/r-Hirudin-Komplex, Stereoabbildung aus Lit. [82]. Die Struktur des Thrombins ist zusammen mit der Connolly-Oberfläche dargestellt.

[*] Das vorangestellte h- kennzeichnet Aminosäurereste von Hirudin.

2.2. Die Bildung des Thrombin/Hirudin-Komplexes

Untersuchungen zur Rolle einzelner Aminosäurereste oder von Strukturbereichen der Moleküle in bezug auf die Komplexbildung wurden teilweise vor der Röntgenstrukturanalyse mit r-Hirudinmutanten und Hirudinfragmenten, chemisch oder enzymatisch modifizierten Thrombinformen, Peptidantikörpern gegen Bereiche des Thrombins und chemischen modifizierten Aminosäureresten von Enzym/Inhibitor-Komplexen durchgeführt. Sie vermittelten bereits ein schematisches Bild von der Bildung des Thrombin/Hirudin-Komplexes. Im folgenden sollen Untersuchungen im Kontext mit der Struktur des Komplexes diskutiert werden, die zum Verständnis des Bildungsmechanismus notwendig sind.

Natürliches Hirudin reagiert rasch mit α -Thrombin ($k_{\text{on}} = 4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zu äquimolaren 1:1-Komplexen ($K_i = 2.7 \times 10^{-14} \text{ M}$)^[88]. Hirudin ist als Thrombin-spezifischer Inhibitor anzusehen, auch wenn kürzlich das Gerinnungsenzym Faktor Xa mit einer Inhibitionskonstante K_i von ca. $3 \times 10^{-3} \text{ M}$ gehemmt wurde^[89].

Studien zur Kinetik der Thrombin/Hirudin-Komplexbildung zeigen, daß Hirudin ein kompetitiver Inhibitor ist^[88]. Dies ist in Einklang mit der Struktur des Komplexes im Kristall, die die gleichzeitige Bindung des Substrats und der drei N-terminalen Reste des Hirudins ausschließt (siehe Abb. 5)^[84]. Da die apparente Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{on} von der Ionenstärke, nicht aber von der Substratkonzentration abhängig ist, wurde ein Reaktionsmechanismus mit mindestens zwei Schritten postuliert^[88, 90]. Die Aufklärung der Reaktionsschritte gelang durch Stopped-Flow-Messungen mit r-Hirudin^[91]. Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt besteht in der Anlagerung des C-Terminus von Hirudin an Thrombin. Für diesen bimolekularen Schritt wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $2.9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt. Nach einer Konformationsänderung reagiert im dritten Schritt der N-Terminus mit dem aktiven Zentrum. Für den Zerfall des Komplexes ist die Dissoziation des N-Terminus geschwindigkeitsbestimmend.

Die freie Bindungsenthalpie der Reaktion zwischen r-Hirudin und α -Thrombin ($\Delta G_{\text{B}} = -75 \text{ kJ mol}^{-1}$) setzt sich nahezu aus der Summe der freien Bindungsenthalpien des N-terminalen ($\Delta G_{\text{B}} = -45.2 \text{ kJ mol}^{-1}$) und des C-terminalen ($\Delta G_{\text{B}} = -32.6 \text{ kJ mol}^{-1}$) Hirudinfragments (Hirudin(1-51) und Hirudin(52-65)) zusammen^[79, 81], d. h. die Bindung des einen Fragments übt keinen großen kooperativen Effekt auf die Bindung des anderen aus^[79, 81]. C-terminale Peptide modulieren jedoch die amidolytische Aktivität des Thrombins gegenüber Tripeptidylsubstraten^[79-81, 92]. Die Peptide wirken je nach Länge und Substrat als hyperbolische Inhibitoren oder Aktivatoren, d. h. es werden katalytisch aktive, ternäre Enzym/Substrat/Peptid-Komplexe gebildet. In Gegenwart des C-terminalen Peptids Hirudin(52-65) ist die Michaelis-Konstante für das Tripeptidylsubstrat zwei- bis vierfach niedriger und die Wechselwirkung mit dem N-terminalen Fragment um $2-3 \text{ kJ mol}^{-1}$ begünstigt^[79]. Die Bindung C-terminaler Hirudinpeptide führt zu Konformationsänderungen in der γ -Schleife von Thrombin, ebenso wie die Bindung von Inhibitoren, die auf das aktive Zentrum gerichtet sind^[93]. Daß die Kommunikation zwischen der FBS und dem aktiven Zentrum über Konformationsände-

rungen der γ -Schleife erfolgt, ist allerdings noch nachzuweisen^[93]. Bei der Spaltung des Fibrinogens verhalten sich die C-terminalen Peptide wie kompetitive Inhibitoren, was auf eine sich ausschließende Wechselwirkung mit der FBS hindeutet^[80, 81]. N-terminale Hirudinfragmente verhalten sich erwartungsgemäß als kompetitive Inhibitoren der Spaltung von Fibrinogen und von Tripeptidylsubstraten^[79, 81].

Experimente mit verkürzten Hirudinformen wiesen bereits auf die Bedeutung des intakten N-Terminus für die Komplexbildung hin^[94]. Der Beitrag der N-terminalen drei Aminosäurereste wurde durch gerichtete Mutagenese untersucht^[95-97]. Die zwei N-terminalen Positionen, die in allen natürlichen Hirudinen verzweigte, hydrophobe Aminosäurereste einnehmen, tolerieren den Austausch gegen andere Aminosäurereste in unterschiedlichem Maße. Ein Vergleich der freien Bindungsenthalpien der natürlichen Hirudine mit denen der entsprechenden Doppelmутanten weist auf keinen kooperativen Effekt bei der Bindung der beiden Reste hin^[97], den man im Falle einer Wechselwirkung der Reste untereinander oder bei einem veränderten Reaktionsmechanismus erwarten würde. Der Austausch der beiden N-terminalen Valinreste gegen Glycin bedingt die Erniedrigung der freien Bindungsenthalpie um 20.6 kJ mol^{-1} ; dies dürfte der maximale Beitrag zur Komplexbildung sein (Tabelle 2). Bemerkenswert ist die V2R-Mutante, die infolge der

Tabelle 2. Kinetische Parameter der Inhibition von α -Thrombin durch r-Hirudinmutanten mit substituierten N-Termini [a].

Inhibitor	$10^{-8} \times k_{\text{on}} / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$10^5 \times k_{\text{off}} / \text{s}^{-1}$	$10^{12} \times K_i / \text{M}$	$-\Delta G_{\text{B}} / \text{kJ mol}^{-1}$	$\Delta\Delta G_{\text{B}} / \text{kJ mol}^{-1}$	Lit.
Hirudin	4.7	0.98	0.021	81.0		[90]
r-Hirudin	1.37	3.17	0.237	75.0		[90]
V1G	1.43	38.2	2.67	68.8	6.2	[97]
V2G			141.0	58.5	16.5	[97]
V1, 2G			694.0	54.4	20.6	[95]
V2R	1.15	0.31	0.027	80.6	-5.6	[97]
Y3A			30.9	62.4	12.6	[97]
Y3F			0.03	76.9	-4.1	[96]
			(0.18) [b]	(72.8) [b]		

[a] Die Änderung der freien Enthalpie für die Bildung von Komplexen aus Thrombin und Hirudin (hier als freie Bindungsenthalpie ΔG_{B} bezeichnet) wurde nach der Gleichung $\Delta G_{\text{B}} = RT \ln K_i$ berechnet. Die Änderung von ΔG_{B} für eine bestimmte Mutante ($\Delta\Delta G_{\text{B}}$) wurde relativ zur freien Bindungsenthalpie von r-Hirudin definiert. Der Unterschied in der freien Bindungsenthalpie für eine Doppelmутante an den Positionen x und y kann über die Gleichung $\Delta\Delta G_{\text{B}(x,y)} = \Delta\Delta G_{\text{B}(x)} + \Delta\Delta G_{\text{B}(y)} + \Delta\Delta G_i$ mit denen der entsprechenden Einzelmутanten korreliert werden [142]. $\Delta\Delta G_i$ ist ein Maß für die Kooperativität zwischen den beiden Stellen und kann entweder positiv oder negativ sein. [b] Die Werte für r-Hirudin aus Lit. [96] sind in Klammern gesetzt.

kleineren Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation einen um eine Zehnerpotenz niedrigeren K_i -Wert als r-Hirudin aufweist. Nach Molecular-Modeling-Studien darf man annehmen, daß der Argininrest in die Spezifitätstasche eindringt und eine Salzbrücke zu t-Asp189 bildet^[97]. Diese Wechselwirkung sollte man aufgrund der Homologie auch für die natürlich vorkommenden Thrombininhibitoren aus *Hirudinaria manillensis* und *Haemadipsa sylvestris*^[73] (Abb. 2B) postulieren. Der Aminosäurerest h-Tyr3 geht Kontakte mit der Aryl-Bindungstasche ein, die aus den Resten t-Tyr60-A, t-Ile174, t-Trp60-D und t-Leu99 geformt wird. Desweiteren wird eine Wechselwirkung mit dem aromatischen Elektronensystem von t-Trp215 beobachtet,

das senkrecht zum h-Tyr3-Rest angeordnet ist. Die um 12.6 kJ mol⁻¹ verminderte freie Bindungsenthalpie der Y3A-Mutante (Tabelle 2) unterstreicht die Bedeutung dieses aromatischen Rests, der in fast allen bislang bekannten Hirudininformen enthalten ist. Y3W- und Y3F-Hirudine haben eine verbesserte Affinität gegenüber Thrombin^[96].

Die Rolle der sauren Aminosäurereste am C-Terminus von Hirudin wurde durch enzymkinetische Untersuchungen mit Hirudinmutanten aufgeklärt. Rekombinantes Hirudin fehlt der Schwefelsäureester an Position h-Tyr63, wodurch die Gleichgewichtsdissoziationskonstante um den Faktor zehn verkleinert wird (siehe Tabelle 2)^[88, 98]. Die enzymatische Phosphorylierung^[99] oder Sulfatierung^[100] von h-Tyr63 stellt die ursprünglichen Hemmeigenschaften wieder her. Die negativen Ladungen der Reste h-Glu57, h-Glu58, h-Glu61 und h-Glu62 wurden nacheinander durch gerichtete Mutagenese gegen Glutaminreste ausgetauscht. Aus der Abhängigkeit der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten von der Ionenstärke für jede der Mutanten wurde der Anteil der ionischen und nichtionischen Wechselwirkungen zur freien Bindungsenthalpie bestimmt. Der nichtionische Anteil ist für alle Mutanten nahezu gleich (62.2–64.1 kJ mol⁻¹), während der ionische Anteil linear mit der Verminderung der Zahl der Ladungen abnimmt (29.6–8.9 kJ mol⁻¹). Bei Ionenstärke Null macht er etwa ein Drittel der freien Bindungsenthalpie aus, unter physiologischen Bedingungen ca. ein Fünftel^[101]. Die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation für Bedingungen, unter denen nur nichtionische Wechselwirkungen einen Beitrag leisten sollten, wird durch den Wert $k_{on\infty}$ ausgedrückt. Er ist für die Hirudinmutanten nahezu konstant und deutet damit an, daß durch die Mutationen keine größeren Veränderungen in der Tertiärstruktur des Inhibitors stattgefunden haben sollten, die die Interaktion mit Thrombin beeinflussen würden (Tabelle 3)^[101]. Der Beitrag der ionischen

Tabelle 3. Effekt der Ionenstärke auf die freie Bindungsenthalpie [a] und die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation [b] der Thrombin/Hirudin-Komplexbildung.

Inhibitor	$\Delta G_{nlo}/$ kJ mol ⁻¹	$\Delta G_{lo}/$ kJ mol ⁻¹	$10^{-6} \times k_{on\infty}/$ M ⁻¹ s ⁻¹	$\Delta G_{io}/$ kJ mol ⁻¹
n-Hirudin	63.3	29.6	–	–
r-Hirudin	62.2	25.0	1.1	25.2
E62Q-Hirudin	65.7	22.8	2.3	20.5
E57,58Q-Hirudin	64.1	17.1	1.4	17.4
E57,58,62Q-Hirudin	63.6	10.9	2.3	13.4
E57,58,61,62Q-Hirudin	63.6	8.9	1.0	9.2

[a] Die freie Bindungsenthalpie (ΔG_n) setzt sich aus der Summe der freien Bindungsenthalpie für nichtionische (ΔG_{nlo}) und ionische (ΔG_{lo}) Wechselwirkungen zusammen. Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Inhibitoren wurden bei Ionenstärken *I* zwischen 0.05 und 0.65 ermittelt. Zur Auswertung der Daten siehe Lit. [101]. [b] Bei ionischen Wechselwirkungen ist auch die Geschwindigkeitskonstante der Assoziation (k_{on}) von der Ionenstärke abhängig. Zur Auswertung der Daten siehe Lit. [101].

Wechselwirkungen zur gesamten freien Bindungsenthalpie ist vermutlich von sekundärer Bedeutung. Kinetische Untersuchungen mit Hirudinmutanten, deren saure Aminosäurereste zwischen den Positionen 55–65 ausgetauscht wurden, belegen die Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten k_{on} von der Anzahl der Ladungen im Molekül, die man für ionische Wechselwirkungen erwartet (Tabelle 4)^[90, 102]. Die Abnahme der

Tabelle 4. Einfluß der Ladung des C-terminalen Hirudinfragments auf Parameter der Thrombin/Hirudin-Komplexbildung.

Inhibitor	$10^{-8} \times k_{on}/$ M ⁻¹ s ⁻¹	$10^5 \times k_{off}/$ s ⁻¹	$10^{12} \times K_i/$ M	$-\Delta G_n/$ kJ mol ⁻¹	$\Delta\Delta G_n/$ kJ mol ⁻¹	Lit.
r-Hirudin	1.37	3.2	0.24	75.0		[90]
E57Q	0.22	5.2	2.3	69.1	5.9	[102]
E58Q	1.1	19.9	1.8	69.7	5.3	[102]
E61Q	0.96	3.6	0.37	73.7	1.3	[90]
E62Q	0.67	3.7	0.55	72.2	2.8	[90]
E57,58Q	0.22	5.2	2.36	69.0	6.0	[90]
E61,62Q	0.45	3.9	0.87	71.5	3.5	[102]
E57,58,62Q	0.07	6.4	8.6	65.6	9.4	[90]
E57,58,61,62Q	0.04	6.3	14.1	64.4	10.6	[90]

freien Bindungsenthalpie liegt pro negativ geladener Gruppe zwischen 2.3 und 5.9 kJ mol⁻¹. Mutationen an den Positionen 61 und 62 führen zu additiven Effekten, was darauf hindeutet, daß diese beiden Reste nicht miteinander wechselwirken. Mutationen an den Positionen 57 und 58 ergeben jedoch einen nichtadditiven Effekt; dies kann mit einem abweichenden Reaktionsmechanismus oder einer größeren Konformationsänderungen von ca. 0.7 Å, die zur Bildung eines Ionenpaares zwischen h-Glu57 und t-Arg77A notwendig sind, erklärt werden^[102]. Diese Ergebnisse scheinen zunächst nicht in Einklang mit der Struktur im Kristall zu sein, aus der nur intermolekulare Wechselwirkungen zwischen h-Asp55, h-Glu57 und h-Glu58 erkennbar sind^[78, 84, 85, 103]. Berechnungen der elektrostatischen Feldstärken verdeutlichen jedoch, daß der C-Terminus des Hirudins und die FBS von Thrombin komplementäre elektrostatische Felder bilden, deren Wechselwirkung zur Bindungsenthalpie beiträgt, ohne daß notwendigerweise direkte ionische Kontakte vorhanden sein müssen^[82, 104]. In diesem Fall könnten die negativ geladenen Aminosäurereste des C-Terminus eine Art Anlagerungsfunktion ausüben, wodurch die Zahl der nicht zum Produkt führenden Zusammenstöße vermindert und die nahezu diffusionskontrollierte Geschwindigkeit der Komplexbildung ermöglicht wird^[101]. Trotz der dominanten Funktion der sauren Reste des C-Terminus für die Thrombin/Hirudin-Komplexbildung verdeutlicht die Erniedrigung der freien Bindungsenthalpie um insgesamt ca. 10 kJ mol⁻¹ bei Mutationen von h-Phe56, h-Pro60 und h-Tyr63 zu Alanin (siehe Tabelle 4) den Anteil unpolarer Wechselwirkungen des C-Terminus in bezug auf die gesamte freie Bindungsenthalpie^[105].

Aufgrund der beschriebenen, bislang einzigartigen Weise der Komplexbildung zwischen einem Inhibitor und einer Serinprotease und der Tatsache, daß Hirudin weder eine Sequenz- noch eine Topologiehomologie zu den anderen Inhibitoren der Serinproteasen aufweist, ist dieser Inhibitor als Basismolekül einer neuen Familie von Serinproteaseinhibitoren anzusehen^[65].

3. Die Entwicklung von Hirudinmimetika

Da die dreidimensionalen Strukturen von α-Thrombin und Komplexen aus α-Thrombin und Inhibitoren verfügbar sind und das Enzym im Gerinnungsgeschehen die zentrale Rolle spielt, ist diese Protease ein geeigneter Kandidat zur Entwicklung antithrombotischer Wirkstoffe. Inhibitoren von Thrombin lassen sich in peptidische, nichtpeptidische und in Verbindun-

gen, die auf das aktive Zentrum und/oder die Fibrin(ogen)-Bindungsstelle gerichtet sind, einteilen^[106]. Untersuchungen mit C-terminalen Peptiden des Hirudins, die mit der FBS reagieren, haben zur Synthese potenter, antithrombotischer Peptide geführt und die Entwicklung bivalenter Peptide, die sowohl mit dem aktiven Zentrum als auch der FBS wechselwirken, angeht.

3.1. C-terminale Peptide des Hirudins

Die Beteiligung der C-terminalen Aminosäurereste des Hirudins an der Thrombin/Hirudin-Wechselwirkung konnte bereits nachgewiesen werden, denn die inhibitorische Aktivität (unter Meßbedingungen) geht vollständig verloren, wenn man bis zu 22 der C-terminalen Aminosäurereste proteolytisch abbaut^[66, 94]. Das 21 Aminosäurereste lange, synthetische Peptid *N*²-Acetylhirudin(45–65) **3** (Tabelle 5) kann die Spaltung des Fibrinogens in einem Gerinnungstest inhibieren, ohne dabei das aktive Zentrum zu blockieren^[107]. Dieses Peptid wurde unter Erhaltung der gerinnungshemmenden Aktivität auf eine Länge von elf Aminosäureresten (Hirudin(55–65) **5a**) oder zwölf Aminosäureresten (Hirudin(53–64) **6**) verkürzt (Tabelle 5)^[108–110].

Tabelle 5. Inhibition von Human-Thrombin durch Hirudin und C-terminale Hirudinpeptide.

Inhibitor		IC ₅₀ [a]	Lit.	K _i	Lit.
<i>Hirudin</i>					
1	n-Hirudin	2.3 nM	[134]	27 fM	[88]
2	r-Hirudin	2.4 nM	[134]	237 fM	[90]
<i>C-terminale Peptide</i>					
3	<i>N</i> ² -Ac-Hirudin(45–65)	1.6 µM [b]	[107]	760 nM	[81]
		0.06 µM	[92]		
4	NH ₂ -Hirudin(45–64)	1.09 µM	[110]		
5a	NH ₂ -Hirudin(55–65)	7.1 µM [b]	[108]		
		0.35 µM	[92]		
5b	<i>N</i> ² -Ac-Hirudin(55–65)	3.5 µM [b]	[92]		
6	NH ₂ -Hirudin(53–64)	0.77 µM	[110]		
7	Hirugen	0.08 µM	[110]	560 nM	[80]
	(= NH ₂ -Hirudin(53–64), sulfatiert an Y63)				

[a] IC₅₀-Werte geben die Inhibitorkonzentration an, die die Gerinnungszeit verdoppeln. [b] Werte für α-Thrombin von Rindern.

Für die Aktivität des Peptids **5a** ist der aromatische Aminosäurerest Phe56 besonders wichtig^[108], obwohl dieser im Hirudin nur einen kleinen Beitrag von 1.9 kJ mol⁻¹ zur freien Bindungsenthalpie beisteuert^[105]. Die Sulfatierung des Tyrosinrests von **6** (das sulfatierte Peptid wird als Hirugen **7** bezeichnet) erhöht die gerinnungshemmende Wirkung um den Faktor zwölf^[110]. Mit Hirugen konnte erstmals die Wechselwirkung des Tyrosinschwefelsäureesters mit Thrombin aufgeklärt werden^[111]. Die Sauerstoffatome der Sulfatgruppe bilden überraschenderweise keine Ionenpaare mit den geladenen Gruppen, sondern es bestehen entweder direkte Wasserstoffbrücken zum t-Tyr76- oder t-Ile81-Rest oder indirekte, über Wassermoleküle vermittelte. Ansonsten ist die Struktur von Hirugen **7** mit derjenigen von Hirudin(53–64) **6** im Thrombin/r-Hirudin-Komplex nahezu identisch^[111].

Schränkt man die Konformation von Peptiden durch Cyclisierung ein, so kann aus entropischen Gründen ihre biologische

Aktivität gesteigert und sie vor dem proteolytischen Abbau geschützt werden. Nach Struktur-Wirkungs-Studien am Peptid **5a** haben die Aminosäurereste Asp55, Glu58, Glu61, Glu62, Tyr63, Leu64 und Gln65 bezüglich der Aktivität dieses Peptids keinen kritischen Einfluß^[108]. Die Reste 58 und 61 wurden aufgrund von Molecular-Modeling-Untersuchungen zur Cyclisierung unter Bildung eines Lactamrings ausgewählt^[112]. Der Aminosäurerest Glu61 wurde durch Lysin oder Ornithin ersetzt und der Rest 58 entweder durch Glutaminsäure oder Asparaginsäure. Diese Vorgehensweise ermöglichte es zu untersuchen, wie sich die antithrombotische Aktivität der cyclisierten Peptide in Abhängigkeit von der Ringgröße (18- bis 16gliedrige Lactamringe) verändert. Unter diesen Peptiden ist *cyclo*-(Glu58,Lys61)-[Hirudin(55–65)] mit einem 18gliedrigen Lactamring am aktivsten. Diese Ergebnisse bestätigten Berechnungen, wonach der 18gliedrige Ring bevorzugt eine Konformation einnimmt, die derjenigen des gebundenen Hirudins ähnlich ist^[112]. Die biologische Aktivität dieser Peptide ist allerdings nur um den Faktor zwei bis vier höher als die der entsprechenden linearen Peptide. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß C-terminale Peptide bereits in Lösung eine geordnete Struktur aufweisen, die derjenigen im gebundenen Zustand ähnelt^[113]. Die Stabilität der cyclischen Peptide in bezug auf den proteolytischen Abbau durch Plasmaproteasen sowie durch Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin ist deutlich erhöht. Dieser Schutz wirkt sich teilweise auch auf die exocyclischen Peptidbindungen der Inhibitoren aus^[112].

3.2. Bivalente Thrombininhibitoren basierend auf Hirudinpeptiden

Die C-terminalen Hirudinpeptide verfügen zwar über Struktureinheiten, die Thrombin spezifisch erkennen, doch sie können nicht mit dem aktiven Zentrum wechselwirken. Inhibitoren, die zusätzliche Bindungsstellen zum oder in Verbindung mit dem aktiven Zentrum nutzen, sollten eine erhöhte Spezifität und Aktivität haben. Es war daher das Ziel, durch die Verknüpfung von Peptiden, die a) eine Thrombin-spezifische Erkennungssequenz und b) eine auf das aktive Zentrum des Thrombins gerichtete Aktivität aufweisen, potente, bivalente Thrombininhibitoren zu synthetisieren.

Die Ähnlichkeit der Hirudinsequenz Thr(45)-Pro-Lys-Pro(48) zur Thrombinspaltstelle Thr(154)-Pro-Arg-Ser(157) im Prothrombinmolekül^[63] und das Vorkommen des Sequenzmotivs D-Phe-Pro-Arg-X in Thrombininhibitoren, die mit dem aktiven Zentrum wechselwirken (X entspricht einer nicht-spaltbaren Bindung), wurde zum Anlaß genommen, im Peptid **3** die Aminosäurereste Thr45 gegen D-Phe und Lys47 gegen Arg auszutauschen^[92]. Die Reste 55–65 sollten die erste Wechselwirkung dieses Inhibitors mit der FBS ermöglichen und die intramolekulare Reaktion mit dem aktiven Zentrum unterstützen. Die beiden separaten Bindungsstellen sind im substituierten Peptid durch vier Aminosäurereste getrennt. Während *N*²-Acetylhirudin(55–65) **5b** und D-Phe-Pro-Arg-Pro im Gerinnungstest mit Rinder-α-Thrombin IC₅₀-Werten von 3.5 (siehe Tabelle 5) bzw. 250 µM aufweisen, bewirkt die Verknüpfung der beiden Bindungsstellen über einen Spacer (Peptid **8**, Tabelle 6) die Erniedrigung des IC₅₀-Werts auf 70 nM (4.1 nM für das hu-

Tabelle 6. Inhibition von Human-Thrombin durch Peptide, die den Reaktionsmechanismus des Hirudins nachahmen. Die bivalenten Peptide desaktivieren das Enzym über Wechselwirkungen der N-terminalen Aminosäurereste (dargestellt im Dreibuchstaben-Code) mit dem aktiven Zentrum und die Belegung der FBS durch die sauren, C-terminalen Aminosäurereste (die Positionen des Hirudins sind angegeben). Diese Bereiche werden über einen geeigneten Abstandshalter (diese Aminosäurereste sind im Einbuchstaben-Code angegeben) miteinander verknüpft.

Inhibitor	IC ₅₀ /nM [a]	Lit.	K _i /nM	Lit.
Bivalente Peptide				
8 N ² -Ac-(D-Phe)-Pro-Arg-Pro-Q-S-	70 [b]	[92]	31	[92]
H-N-D-G-[Hirudin(55–65)]	4.1	[92]	2.8	[92]
9 NH ₂ -(D-Phe)-Pro-Arg-Pro-G-G-	3.9	[115]	2.3	[110]
G-G-[Hirudin(53–64)]				
Bivalente Peptide mit stabiler Arg-X-Bindung				
10 N ² -Ac-(D-Phe)-Pro-ArgΨ(COCH ₂)-			0.37	[92]
Gly-Q-S-H-N-D-G-[Hirudin(55–65)]				
11 NH ₂ -(D-Phe)-Pro-(β-Homo-Arg)-G-G-			7.4	[117]
G-G-G-[Hirudin(53–64)]				

[a], [b] siehe Tabelle 5.

mane Enzym)^[92]. Die freie Bindungsenthalpie der beiden Inhibitoren addiert sich bei der Verknüpfung, wie es bereits für die Hirudin-Teilpeptide beschrieben wurde (siehe Abschnitt 2.2). Das Peptid **8** ist ein kompetitiver Inhibitor der Thrombin-vermittelten Spaltung von Tripeptidylsubstraten mit K_i-Werten von 31 und 2.8 nM für bovines bzw. humanes α-Thrombin (Tabelle 6)^[92]. Peptide der allgemeinen Formel D-Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly)_n-[Hirudin(53–64)] (Hirulog **9**) sind vergleichbar inhibitorisch aktiv mit K_i-Werten im nM-Bereich^[114]. Die inhibitorische Wirkung ist abhängig von der Anzahl *n* der Glycinreste (*n* = 2, 4, 6, 8). Hirulogverbindungen mit *n* = 4–8 Glycyleinheiten weisen K_i-Werte von 2.3–3 nM auf, während der kürzere Abstandshalter (*n* = 2) eine Erhöhung des K_i-Werts auf 64 nM bewirkt. Die Spezifität von Hirulog-1 (*n* = 4) gegenüber Thrombin wurde durch Untersuchungen zur Inhibition der Enzyme Faktor Xa, Plasmin und Trypsin bestätigt, deren amidolytische Aktivität durch Hirulog-1 selbst mit einem 1000fachen molaren Überschuss kaum beeinflusst wird. Die Röntgenstrukturanalyse des Thrombin/Hirulog-1-Komplexes^[111] ergab, daß die Wechselwirkungen der einzelnen funktionellen Bereiche des bivalenten Inhibitors denen der Einzelkomponenten im Komplex entspricht.

Obwohl ein Iminoaminosäurerest die P1'-Aminosäure bildet, werden die Peptide **8** und **9** langsam durch Thrombin hydrolysiert^[92, 115]. Die Umkehr der Konfiguration am Prolinrest 48 bewirkt zwar die proteolytische Resistenz der Arg-D-Pro-Peptidbindung, jedoch werden auch der K_i-Wert (46 nM) und der IC₅₀-Wert (45 nM) erhöht^[92]. Konsequenterweise wurden daher Inhibitoren mit einer nichtspaltbaren Arg-X-Bindung entwickelt. Basierend auf dem Peptid **8** wurde das Peptid **10** (siehe Tabelle 6) synthetisiert^[116]; formal wurde in dieser Verbindung die Säureamidgruppe der Arg-X-Bindung gegen eine nichtspaltbare Ketomethylenfunktion ersetzt. Der P1'-Rest ist isosterisch zu einem Glycinrest. Peptid **10** ist ein kompetitiver Thrombininhibitor bezüglich der Spaltung von Tripeptidylsubstraten mit einem K_i-Wert von 370 pM (siehe Tabelle 6).

Ein ähnliches Vorgehen wurde bei der Herstellung von Hirulog-3 **11**, ausgehend von **9**, gewählt: Hier wurde ein β-Homoargininrest eingebaut, so daß sich die Peptidbindung um eine Methylengruppe verschiebt^[117]. Die dreidimensionale Struktur des Thrombin/Hirulog-3-Komplexes^[118] zeigt, daß die Wechselwir-

kungen der D-Phe-Pro-(β-Homo-Arg)-Einheit von Hirulog-3 denen der D-Phe-Pro-Arg-Sequenz der PPACK-Thrombin-Struktur ähneln (Abb. 8). Die Guanidinogruppe des β-Homoargininrests bildet ein vergleichbares Wasserstoffbrückenvermitteltes Ionenpaar mit t-Asp189 der S1-Tasche von Thrombin wie der entsprechende Argininrest. Die Methylengruppe des β-Homoargininrests bewirkt eine Verschiebung der

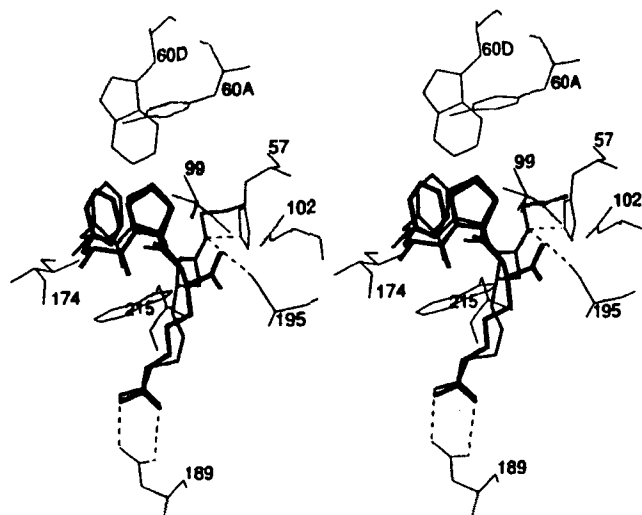


Abb. 8. Vergleich der Wechselwirkungen im aktiven Zentrum des Thrombins (dünne Linien) zwischen der D-Phe-Pro-(β-homoArg)-Gly-Sequenz im Thrombin/Hirulog-3-Komplex (mittelstarke Linien) und der D-Phe-Pro-Arg-Einheit im PPACK-Thrombin bzw. Thrombin/Hirulog-1-Komplex (dicke Linien); Stereabbildung aus Lit. [118]. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Numerierung der Aminosäurereste des Thrombins erfolgt wie in [*] auf Seite 952 erläutert.

Peptidkette um ca. eine C-C-Bindungslänge und schützt dadurch die Peptidbindung vor einem nucleophilen Angriff des t-Ser195-Rests. Die C-Termini von Hirulog-3 **11** und von r-Hirudin sind in ihren Komplexen mit Thrombin nahezu strukturgleich, während ein deutlicher Strukturunterschied von durchschnittlich 6 Å in der Verbindungssequenz besteht (Abb. 9). Die Kette der Pentaglycin-Verbindungssequenz von Hirulog-3 geht sehr viel engere Kontakte zum Thrombin ein als die entsprechende r-Hirudineinheit. Aus dieser Struktur wurden erstmals die S1'-S4'-Bindungsstellen von Thrombin identifiziert: Die Seitenkette der P1'-Aminosäure ist auf kleine Reste beschränkt. Der Austausch von Gly der P1'-Aminosäure im Hirulog-3 gegen den voluminöseren Val-Rest vermindert die freie Bindungsenthalpie um 8.6 kJ mol⁻¹ und unterstützt diesen Befund^[117]. Alanin-, Serin- und Threoninreste könnten vermutlich bessere Wechselwirkungen als Glycin eingehen, und kleine hydrophobe Reste wie Valin, Leucin und Isoleucin könnten gut die S2'-Tasche ausfüllen. Die S3'- und S4'-Taschen lassen sich nicht eindeutig beschreiben. Proteinsubstrate von Thrombin haben als P3'-Position entweder einen Argininrest, eine Aminosäure mit einer Amidfunktion in der Seitenkette oder mit einer kleinen Seitenkette (z.B. Ser, Ala, Gly). Allerdings bleibt die Frage offen, ob die natürlichen Thrombinsubstrate einen ähnlich engen Kontakt in der P1'-P2'-Region mit Thrombin eingehen wie die Pentaglycin-Verbindungssequenz von **11**. Da in Hirulog-3 die P1'-P4'-Reste alle Glycinreste sind, die nur sehr schwache Wechselwirkungen mit Thrombin eingehen können, ergeben sich aus

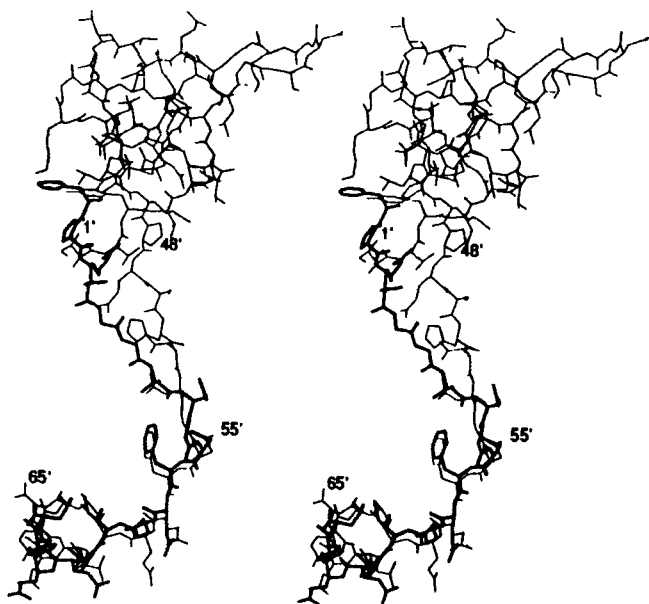


Abb. 9. Vergleich der Strukturen von r-Hirudin [84] (dünne Linien) und Hirulog-3 [118] (dicke Linien) in ihren Komplexen mit Thrombin (Stereoabbildung). Es sind nur die Strukturen der Inhibitoren dargestellt.

der Thrombin/Hirulog-3-Struktur wiederum neue Aspekte zur Optimierung der antithrombotischen Aktivität bivalenter Peptid-Inhibitoren.

In diesem Abschnitt wurde die Entwicklung selektiver, bivalenter Thrombininhibitoren auf der Basis von Hirudin besprochen. In vitro haben Hirudin und die Thrombin-spezifischen bivalenten Hirudin-Analoga vom Typ 9–11 vergleichbare gerinnungshemmende Eigenschaften (siehe Tabelle 6). Da diese Peptide, ebenso wie Hirudin, die Aktivität der Protease Thrombin inhibieren und vermutlich noch weniger antigen sind als Hirudin, erregten sie wegen ihrer klinischen Relevanz in den letzten zwei bis drei Jahren großes Interesse und brachten die Entwicklung und Erforschung der pharmakologischen Eigenschaften der Hirudinmimetica in Gang^[61].

4. Pharmakologische Eigenschaften direkt wirkender Thrombininhibitoren

Mit Hirudinen – natürlichen und rekombinanten – sowie Hirudin-Analoga lassen sich experimentell erzeugte Thromben zuverlässig verhindern. Dies gilt in vivo sowohl für venöse Thromben als auch für arterielle Verschlüsse^[60, 61, 119]. Welche Unterschiede machen Hirudin und Hirudinmimetica (d. h. direkt wirkende Thrombininhibitoren gegenüber Heparin, der gegenwärtig wichtigsten Stoffklasse auf dem Gebiet der Antikoagulantien, zu besonders vorteilhaften Antikoagulantien?

Wie in diesem Beitrag ausführlich dargelegt wurde, reagieren Hirudin und Hirudinmimetica direkt mit Thrombin. Im Gegensatz dazu wird der Effekt des Heparins über seine Wechselwirkung mit dem Plasmaproteaseinhibitor Antithrombin III (AT III) vermittelt. Heparin wirkt hierbei als Cofaktor und beschleunigt lediglich um einige Größenordnungen die Komplexbildung von AT III mit den Gerinnungsfaktoren IXa, Xa, XIa (a = aktivierter Faktor) oder Thrombin^[120–123]. Für die direkt

wirkenden Inhibitoren lassen sich folgende Vorteile anführen: 1) Da bei der Anwendung von Antikoagulantien prinzipiell in das Gerinnungsgeschehen eingegriffen wird, besteht auch immer das Risiko einer Blutung. Bei Untersuchungen an Menschen und Tieren wurde beim Einsatz von Hirudin und Hirudinmimetica die Verlängerung der Blutungszeit im therapeutischen Anwendungsbereich nicht beobachtet^[59–61]; darüber hinaus üben die direkten Thrombininhibitoren keinen Einfluß auf die Blutplättchen aus. Wendet man hingegen Heparin an, so sind Blutungen und die Verminderung der Zahl der Thrombozyten die wichtigsten und häufigsten Komplikationen^[124, 125]. 2) Heparin ist eine heterogene Präparation von Glucosaminoglycanen (eine Übersicht ist Lit. [126] zu entnehmen). Bedingt durch den indirekten Wirkungsmechanismus ist die Heparinaktivität an die Verfügbarkeit der Plasmaproteaseinhibitoren AT III und die des Heparin-Cofaktors II gekoppelt. Hirudin und Hirudinmimetica inaktivieren hingegen direkt die Thrombinaktivität. Sie lassen sich daher auch bei einem AT-III-Mangel (z. B. dissimierte, intravaskuläre Gerinnung) als wirkungsvolle Antikoagulantien einsetzen und verbrauchen keine körpereigenen Inhibitoren. 3) Bei der Bildung eines Gerinnsels wird ein Teil von α -Thrombin an Fibrin und wird dabei in das Gerinnsel eingeschlossen^[127]. Dieses Thrombin ist für Heparin/AT-III-Komplexe nicht zugänglich und somit nach der Freisetzung aus dem Gerinnsel weiterhin proteolytisch gegenüber niedermolekularen und makromolekularen Substraten (z. B. Fibrinogen) aktiv^[128, 129]. Die direkt wirkenden Thrombininhibitoren Hirudin und Hirulog hingegen inaktivieren das im Gerinnsel eingeschlossene Thrombin^[127, 129, 130]. 4) Die Neutralisation von Heparin durch Plättchenfaktor 4, Histidin-reiches Glycoprotein oder Vitronectin infolge des erhöhten Plasmaspiegels oder der erhöhten Konzentrationen am Ort des Gerinnungsgeschehens kann die limitierte Wirkung des Heparin erklären^[131]; die Wirkung der direkten Thrombininhibitoren ist hingegen unbeeinflusst von diesen Proteinen.

Obwohl Hirudin und r-Hirudin für Menschen und Tiere körperfremde Proteine sind, erwiesen sie sich als gut verträglich und führen zu keiner nachweisbaren Antikörperbildung^[132]. Hirudine haben eine hohe Bioverfügbarkeit bei einfacher Pharmakokinetik. Nach einer Bolus-Injektion beträgt die Verteilungsphase 10–15 Minuten, und die Halbwertszeit für die Eliminierung wurde zu 0.5–1.5 Stunden bestimmt^[60, 119, 133]. Hirudine werden im extrazellulären Raum verteilt und über die Niere ausgeschieden, wobei 75–95 % des Inhibitors in unveränderter, nicht metabolisierter Form im Urin wiedergefunden werden^[134]. Hirudine führen zu einer dosisabhängigen Verlängerung der Gerinnungsparameter bei intravenöser und subkutaner Applikation^[59, 60, 119]. Ähnlich sind auch die pharmakokinetischen Eigenschaften von Hirulog-1^[61]. Dieses bewirkt ebenfalls eine dosisabhängige Verlängerung der Gerinnungsparameter nach intravenöser oder subkutaner Applikation, und es wird mit einer Halbwertszeit von ca. 0.6 Stunden über die Niere ausgeschieden. Hirulog wird gut toleriert, und es wird keine Antikörperbildung beobachtet^[61].

Der Einsatz der direkten Thrombininhibitoren ist für folgende klinische Situationen vorgesehen und hat sich in Studien mit Tieren bewährt: 1) zur Prophylaxe und Behandlung postoperativer, venöser Thrombosen und diffuser Mikrothrombosen; 2) zur Vorbeugung vor arteriellen Thrombosen speziell in der

Herzchirurgie; 3) zum Schutz vor Reokklusion in der Fibrinolyse-therapie und Angioplastie; 4) zum Schutz vor thrombotischen Verschlüssen in der Mikrochirurgie; 5) zur Vermeidung der Proliferation der glatten Muskelzellen von beschädigten Gefäßwänden (Restenose-Prophylaxe) und 6) zur Thromboseprophylaxe während der Hämodialyse und anderen extrakorporalen Zirkulationen des Blutes (z.B. Herz-Lungen-Maschine).

Fragen in Verbindung mit dem klinischen Einsatz von Hirudin und der Hirudinmimetica sind in der Wahl des Tests zur Überwachung des Gerinnungsstatus und der Verfügbarkeit eines Hirudinantagonisten zu sehen. Es wird zu klären sein, ob die Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APPT), der aktivierten Gerinnungszeit (ACT), der Thrombinzeit (TT) oder der Thrombininhibition in einem chromogenen Test eine Korrelation zur Hirudinkonzentration oder zum Gerinnungsstatus ergeben. Diese Methoden müssen zu diesem Zweck validiert werden. Als Antagonisten der Thrombininhibitoren werden Prothrombinkomplexe, monoklonale Antikörper, Faktor VIIa oder VIIIa diskutiert, deren Anwendung gegenüber der schnellen Normalisierung der Gerinnungsparameter bei Absetzen der Inhibitorgabe abzuwägen bleibt. Um die möglichen Vorteile der klinischen Anwendung der direkten Thrombininhibitoren hervorzuheben, sollen die Ergebnisse einiger Thrombosemodelle dargestellt werden.

Die erfolgreiche koronare Thrombolysen hängt von der schnellen Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des Blutflusses in der vom Infarkt betroffenen Region ab. In einer tPA-induzierten Thrombolysen im Experiment mit Ratten wurde der Einfluss von Thrombininhibitoren auf die Zeit bis zur Gerinnselysen und die Zahl der Reokklusionen während der Infusion des Inhibitors bestimmt^[135]. Die Gerinnselbildung wurde durch Stenose (Verengung) der distalen Aorta nach Entfernen des Endothels hervorgerufen. Nach dem Einleiten der Thrombolysen mit r-tPA (1 mg kg^{-1} als Bolus-Injektion) und einer anschließenden r-tPA-Infusion ($1 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ für 30 Minuten) wurde den Tieren isotone Kochsalzlösung oder Inhibitorlösung (Heparin, r-Hirudin oder Hirulog-1) in solchen Konzentrationen verabreicht, die die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (APTT) um das dreis- bis vierfache erhöhen. Während die direkten Inhibitoren die Zeit bis zur Lyse deutlich reduzieren, hat Heparin keinen Effekt auf die Anzahl der Reokklusionen im Beobachtungszeitraum. Bei r-Hirudin und Hirulog treten nahezu keine Wiederverschlüsse auf. Es wird angenommen, daß die überlegene Wirkung der direkten Thrombininhibitoren auf die Inhibition des gerinnselgebundenen Thrombins zurückzuführen ist, während bei Heparin das aus Gerinnseln freigesetzte Thrombin die Aktivierung sowohl der Blutplättchen als auch des plasmatischen Gerinnungssystems hervorruft. Bei Hunden wurde in einem Thrombolysenmodell mit Streptokinase der Einfluss von Heparin und r-Hirudin auf die Reperfusion, Reokklusion und verbleibende Gerinnselmasse untersucht^[136]. Während in den Kontrolltieren keine Rekanalisation beobachtet wurde, unterstützen r-Hirudin und Heparin dosisabhängig die Streptokinasewirkung. Bei Verabreichung von r-Hirudin oder Heparin in Konzentrationen, die zu einer zweifachen Verlängerung der APTT führen, zeigt r-Hirudin gegenüber Heparin eine deutlich höhere Häufigkeit der Reperfusion (bei acht von acht Tieren (100%) gegenüber einem von acht Tieren (12%)), eine kürzere Zeit bis zur Reperfusion (33 min gegenüber 59 min), eine länger anhaltende Wirkung der

Reperfusion (106 zu 10 min) und eine geringere, verbleibende Gerinnselmasse. Diese Untersuchungen wurden unter Bedingungen durchgeführt, die nur leicht die Gerinnungszeit, aber nicht die Blutungszeit beeinflussen^[136]. Die klinische Relevanz dieser Befunde kann jedoch erst nach einer Anwendung der direkten Thrombininhibitoren beim Menschen beurteilt werden.

Die Vergrößerung von Gerinnsel bei Patienten mit venöser Thrombose erfolgt, indem sich Fibrin an bereits existierende Gerinnsel anlagert. Die Vergrößerung der Gerinnsel wird durch zirkulierendes und gerinnselgebundenes Thrombin unterstützt. Die Entwicklung solcher Thromben kann durch r-Hirudin vollständig inhibiert werden^[137]. In einer Studie an Kaninchen wurde nachgewiesen, daß r-Hirudin nicht nur die Vergrößerung von Thromben effektiv inhibiert, sondern dieser Effekt noch neun Stunden nach Ende der r-Hirudininfusion andauert, während die Gerinnungsparameter (APTT, TT) bereits 1.5 Stunden nach beendeter Inhibitorinfusion das normale Level erreichen^[138]. Zusätzlich durchgeführte in vitro Experimente lassen die Interpretation zu, daß die über die Plasmaeliminierung hinausreichende, langanhaltende Wirkung wiederum auf die Inhibition von gerinnselgebundenem Thrombin zurückzuführen ist.

Klinische Studien unterstützen die im Tierversuch erhaltenen Befunde, daß direkt wirkende Thrombininhibitoren eine verbesserte antithrombotische Wirkung als Heparin aufweisen^[48]. Vorteilhaft Anwendung und Dosierung beim Menschen sind in Zukunft durch weitere Studien und vorsichtige Analyse der Daten herauszuarbeiten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Im vorliegenden Aufsatz wurden hochspezifische Wirkstoffe blutsaugender Parasiten beschrieben, die gezielt in das komplexe Gerinnungs- und Fibrinolysegeschehen eingreifen. Zu diesen Naturstoffen zählt der selektive Thrombininhibitor Hirudin des Blutegels *Hirudo medicinalis*. Es wurden die Strukturdaten und die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Thrombin/Hirudin-Komplexbildung zusammengefaßt, die das Design und die Synthese neuer Hirudinderivate ermöglichten.

Diese Wirkstoffe blutsaugender Parasiten können dazu beitragen, unser Wissen über die Bedeutung einzelner Reaktionsschritte der Blutgerinnung und Fibrinolyse für die Hämostase und Thrombose zu vertiefen. So wurde beispielsweise die Thrombinabhängigkeit des arteriellen thrombotischen Verschlusses dokumentiert, als man Hirudin oder Hirulog-1 bei tiefen arteriellen Verletzungen einsetzte^[61]. Die Verwendung von Hirudin und des spezifischen Faktor-Xa-Inhibitors r-TAP in einem Thrombolysenmodell mit r-tPA deckte auf, daß sowohl gerinnselgebundenes Thrombin als auch aktive Prothrombinasekomplexe zur Thrombogenität plättchenreicher Gerinnsel beitragen^[62].

Die Kenntnis der Wirkungsweise der spezifischen Inhaltsstoffe blutsaugender Tiere kann uns darüber hinaus zur gezielten Veränderung körpereigener Proteine dienen. Die Thrombinspezifische Inhibitor Rhodniin aus der Raubwanze *Rhodnius prolixus* (siehe Tabelle 1) wird aufgrund seiner Primärstruktur der Klasse der kanonischen Proteinaseinhibitoren zugerechnet^[139]. Sollte sich diese Hypothese bestätigen, so könnten die

Ergebnisse von Struktur-Wirkungs-Beziehungen dieses Blutegelwirkstoffs eventuell zur zielgerichteten Veränderung körpereigener kanonischer Inhibitoren genutzt werden.

Die Erfolge in der Beschreibung des Hirudinmechanismus, die daraus resultierende Entwicklung der Hirudinmimetica und die offensichtlichen therapeutischen Vorteile der direkten Thrombininhibitoren sollten uns dazu ermutigen, die Forschung auf dem Gebiet der Naturstoffe aus blutsaugenden Parasiten zu intensivieren. Ein möglicher Nutzen dieser Forschung liegt in der Entdeckung neuer Wirkstoffe und der Aufklärung unerwarteter Wirkungsmechanismen. Solche Moleküle können uns als neue Leitstrukturen dienen und wie bei Hirudin und den Hirudinmimetica zur gezielten Entwicklung verbesserter und sicherer Antikoagulantien anregen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Bode (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der farbigen Abbildungen.

Eingegangen am 9. Dezember 1993 [A 41]

- [1] K. Herter, *Der medizinische Blutegel und seine Verwandten*, Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt, 1968, S. 164–190.
- [2] S. L. Adams, *Semin. Thromb. Hemostasis* 1989, 15, 261–268.
- [3] J. B. Haycraft, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1884, 18, 209–217.
- [4] F. Markwardt, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1957, 312, 85–89.
- [5] P. Walsmann, F. Markwardt, *Pharmazie* 1981, 36, 653–660.
- [6] E. W. Davie, K. Fujikawa, *Annu. Rev. Biochem.* 1975, 44, 799–829.
- [7] C. M. Jackson in *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. V (Hrsg.: H. U. Bergmeyer), 3. Aufl., VCH, Weinheim, 1984, S. 316–351.
- [8] P. B. Tracy, *Semin. Thromb. Hemostasis* 1988, 14, 227–233.
- [9] D. Collen, *Thromb. Haemostasis* 1980, 43, 77–89.
- [10] M. H. Kroll, A. I. Schafer, *Blood* 1989, 74, 1181–1195.
- [11] L. F. Brass, J. A. Hoxie, D. R. Manning, *Thromb. Haemostasis* 1993, 70, 217–223.
- [12] R. O. Hynes, *Cell* 1992, 69, 11–25.
- [13] R. O. Hynes, *Thromb. Haemostasis* 1991, 66, 40–43.
- [14] K. G. Mann, *Trends Biochem. Sci.* 1987, 12, 229–233.
- [15] G. J. Broze, Jr., *Trends Cardiovasc. Med.* 1992, 2, 72–77.
- [16] G. J. Broze, Jr., T. J. Girard, W. F. Novotny, *Biochemistry* 1990, 29, 7539–7546.
- [17] S. I. Rapaport, *Thromb. Haemostasis* 1991, 66, 6–15.
- [18] J. W. Fenton II, D. H. Bing, *Semin. Thromb. Hemostasis* 1986, 12, 200–208.
- [19] J. W. Fenton II, *Semin. Thromb. Hemostasis* 1988, 14, 234–240.
- [20] B. Blomback, M. Blomback, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1972, 202, 77–97.
- [21] L. Lorand, R. B. Credo, K. J. M. Miloszewski, *Prog. Hemostasis Thromb.* 1980, 5, 245–290.
- [22] M. E. Nesheim, K. G. Mann, *J. Biol. Chem.* 1979, 254, 1326–1334.
- [23] J. J. Toole, J. L. Knopf, J. M. Wozney, L. A. Sultzman, J. L. Buecker, D. D. Pittman, R. J. Kaufman, E. Brown, C. Shoemaker, E. C. Orr, G. W. Amphlett, W. B. Foster, M. L. Coe, G. J. Knutson, D. N. Fass, R. M. Hewick, *Nature (London)* 1984, 312, 342–347.
- [24] K. Naito, K. Fujikawa, *J. Biol. Chem.* 1991, 266, 7353–7358.
- [25] T.-K. H. Vu, D. T. Hung, V. I. Wheaton, S. R. Coughlin, *Cell* 1991, 64, 1057–1068.
- [26] T.-K. H. Vu, V. I. Wheaton, D. T. Hung, I. Charo, S. R. Coughlin, *Nature (London)* 1991, 353, 674–677.
- [27] N. L. Esmon, C. T. Esmon, *Semin. Thromb. Hemostasis* 1988, 14, 210–215.
- [28] C. T. Esmon, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 4743–4746.
- [29] A. J. Marcus in *Thrombosis and Hemorrhage* (Hrsg.: J. Loscalzo, A. I. Schafer), Blackwell, Boston, 1994, S. 279–289.
- [30] L. Sottrup-Jensen in *The Plasma Proteins*, Vol. 5 (Hrsg.: F. W. Putnam), Academic Press, New York, 1987, S. 191–291.
- [31] R. D. Rosenberg, P. S. Damas, *J. Biol. Chem.* 1973, 248, 6490–6505.
- [32] D. M. Tollefsen, P. W. Majerus, M. K. Blank, *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 2162–2169.
- [33] B. Wiman, D. Collen, *Nature (London)* 1978, 272, 549–550.
- [34] H. R. Lijnen, D. Collen, *Thromb. Haemostasis* 1991, 66, 88–110.
- [35] N. Kieffer, D. R. Phillips, *Annu. Rev. Cell Biol.* 1990, 6, 329–357.
- [36] D. R. Phillips, I. F. Charo, R. M. Scarborough, *Cell* 1991, 65, 359–362.
- [37] T. M. Connolly, J. W. Jacobs, C. Condra, *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 6893–6898.
- [38] P. M. Keller, L. D. Schultz, C. Condra, J. Karczewski, T. M. Connolly, *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 6899–6904.
- [39] R. Munro, C. P. Jones, R. T. Sawyer, *Blood Coagulation Fibrinolysis* 1991, 2, 179–184.
- [40] L. Waxman, T. M. Connolly, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 5445–5449.
- [41] P. M. Keller, L. Waxman, B. A. Arnold, L. D. Schultz, C. Condra, T. M. Connolly, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 5450–5456.
- [42] J. Mustard, R. L. Kinlough-Rathbone, M. A. Packham, D. W. Perry, K. R. M. Pai, *Blood* 1979, 54, 987–993.
- [43] M. L. Bajt, M. H. Ginsberg, A. L. Frelinger, M. C. Berndt, J. C. Loftus, *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 3789–3794.
- [44] A. J. Nichols, R. R. Ruffolo, Jr., W. F. Huffman, G. Poste, J. Samanen, *Trends Pharmacol. Sci.* 1992, 13, 413–414.
- [45] J. L. Seymour, W. J. Henzel, B. Nevins, J. T. Stults, R. A. Lazarus, *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 10143–10147.
- [46] M. S. Dennis, W. J. Henzel, R. M. Pitti, M. T. Lipari, M. A. Napier, T. A. Deisher, S. Bunting, R. A. Lazarus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87, 2471–2475.
- [47] M. D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, *Nature (London)* 1984, 309, 30–33.
- [48] E. J. Topol, E. F. Plow, *Thromb. Haemostasis* 1993, 70, 94–98.
- [49] J. I. Weitz, B. Leslie, J. Ginsberg, *J. Clin. Invest.* 1991, 87, 1082–1090.
- [50] S. J. Gardell, L. T. Duong, R. E. Diehl, J. D. York, T. R. Hare, R. B. Register, J. W. Jacobs, R. A. F. Dixon, P. A. Friedman, *J. Biol. Chem.* 1989, 264, 17947–17952.
- [51] T. R. Hare, S. J. Gardell, *Thromb. Haemostasis* 1992, 68, 165–169.
- [52] P. W. Bergum, S. J. Gardell, *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 17726–17731.
- [53] S. J. Gardell, T. R. Hare, P. W. Bergum, G. C. Cuca, L. O'Neill-Palladino, S. M. Zavodny, *Blood* 1990, 76, 2560–2564.
- [54] D. Collen, H. K. Gold in *Thrombolysis in Cardiovascular Disease* (Hrsg.: D. Julian, W. Kübler, R. M. Norris, H. J. C. Swan, D. Collen, M. Verstraete), Dekker, New York, 1990, S. 45–67.
- [55] I. Jang, H. Gold, R. C. Leinbach, J. T. Fallon, D. Collen, *Circ. Res.* 1990, 67, 1552–1561.
- [56] S. M. Malinconico, J. B. Katz, A. Z. Budzynski, *J. Lab. Clin. Med.* 1984, 103, 44–58.
- [57] R. Munro, *Platelets* 1991, 2, 55–56.
- [58] I. K. Jang, H. K. Gold, A. A. Ziskind, J. T. Fallon, R. E. Holt, R. C. Leinbach, D. Collen, *Circulation* 1989, 79, 920–928.
- [59] F. Markwardt, G. Nowack, J. Stürzebecher, *Haemostasis* 1991, 21, 133–136.
- [60] F. Markwardt, *Semin. Thromb. Hemostasis* 1989, 15, 269–282.
- [61] J. M. Maraganore, *Thromb. Haemostasis* 1993, 70, 208–211.
- [62] G. P. Vlasuk, *Thromb. Haemostasis* 1993, 70, 212–216.
- [63] T. E. Petersen, H. R. Roberts, L. Sottrup-Jensen, S. Magnusson, *Protides Biol. Fluids* 1978, 145–149.
- [64] J. Dodi, H. P. Müller, U. Seemüller, J.-Y. Chang, *FEBS Lett.* 1984, 165, 180–184.
- [65] J. Dodi, U. Seemüller, R. Maschler, H. Fritz, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1985, 366, 379–385.
- [66] J.-Y. Chang, *FEBS Lett.* 1983, 164, 307–313.
- [67] J. Dodi, W. Machleidt, U. Seemüller, R. Maschler, H. Fritz, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1986, 367, 803–811.
- [68] S. J. T. Mao, M. T. Yates, D. T. Blankenship, A. D. Cardin, J. L. Krstenansky, W. Lovenberg, R. L. Jackson, *Anal. Biochem.* 1987, 161, 514.
- [69] D. Tripiar, *Folia Haematol. (Leipzig)* 1988, 115, 30–35.
- [70] M. Scharf, J. Engels, D. Tripiar, *FEBS Lett.* 1989, 255, 105–110.
- [71] V. Steiner, R. Knecht, K. O. Börnsen, E. Gassmann, S. R. Stone, F. Raschdorf, J.-M. Schlaeppli, R. Maschler, *Biochemistry* 1992, 31, 2294–2298.
- [72] E. Scacheri, G. Nitti, B. Valsasina, G. Orsini, C. Visco, M. Ferrera, *Eur. J. Biochem.* 1993, 214, 295–304.
- [73] K.-H. Strube, B. Kröger, S. Bialojan, M. Otte, J. Dodi, *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 8590–8595.
- [74] R. P. Harvey, E. Degryse, L. Stefani, F. Schamber, J.-P. Cazenave, M. Courtney, P. Tolstoshev, J.-P. Lecoq, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986, 83, 1084–1088.
- [75] C. Bergmann, J. Dodi, S. Köhler, E. Fink, H. G. Gassen, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1986, 367, 731–740.
- [76] E. Fortkamp, M. Rieger, G. Heisterberg-Moutsos, S. Schweitzer, R. Sommer, *DNA* 1986, 5, 511–516.
- [77] W. Bode, I. Mayr, U. Baumann, R. Huber, S. R. Stone, J. Hofsteenge, *EMBO J.* 1989, 8, 3467–3475.
- [78] W. Bode, D. Turk, A. Karshikov, *Protein Sci.* 1992, 1, 426–471.
- [79] S. Dennis, A. Wallace, J. Hofsteenge, S. R. Stone, *Eur. J. Biochem.* 1990, 188, 61–66.
- [80] M. C. Naski, J. W. Fenton II, J. M. Maraganore, S. T. Olson, J. A. Shafer, *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 13484–13489.
- [81] T. Schmitz, M. Rothe, J. Dodi, *Eur. J. Biochem.* 1991, 195, 251–256.
- [82] W. Bode, R. Huber, *Eur. J. Biochem.* 1992, 204, 433–451.
- [83] M. Laskowski, Jr., I. Kato, *Annu. Rev. Biochem.* 1980, 49, 593–626.
- [84] T. J. Rydel, K. G. Ravichandran, A. Tulinsky, W. Bode, R. Huber, C. Roitsch, J. W. Fenton II, *Science* 1990, 249, 277–280.
- [85] M. G. Grütter, J. P. Priestle, J. Rahuel, H. Grossenbacher, W. Bode, J. Hofsteenge, S. R. Stone, *EMBO J.* 1990, 9, 2361–2365.

- [86] P. J. M. Folkers, G. M. Clore, P. C. Driscoll, J. Dodt, S. Köhler, A. M. Groenborn, *Biochemistry* **1989**, 28, 2601–2617.
- [87] H. Haruyama, K. Wüthrich, *Biochemistry* **1989**, 28, 4301–4312.
- [88] S. R. Stone, J. Hofsteenge, *Biochemistry* **1986**, 25, 4622–4628.
- [89] S. P. Jordan, S.-S. Mao, S. D. Lewis, J. A. Shafer, *Biochemistry* **1992**, 31, 5374–5380.
- [90] P. Braun, S. Dennis, J. Hofsteenge, S. R. Stone, *Biochemistry* **1988**, 27, 6517–6522.
- [91] M. P. Jackman, M. A. A. Parry, J. Hofsteenge, S. R. Stone, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 15375–15383.
- [92] J. DiMaio, B. Gibbs, D. Munn, J. Lefebvre, F. Ni, Y. Konishi, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 21698–21703.
- [93] M. A. A. Parry, S. R. Stone, J. Hofsteenge, P. Jackman, *Biochem. J.* **1993**, 290, 665–670.
- [94] J. Dodt, U. Seemüller, H. Fritz, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1987**, 368, 1447–1453.
- [95] A. Wallace, S. Dennis, J. Hofsteenge, S. R. Stone, *Biochemistry* **1989**, 28, 10079–10084.
- [96] J. B. Lazar, R. C. Winant, P. H. Johnson, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 685–688.
- [97] A. Betz, J. Hofsteenge, S. R. Stone, *Biochemistry* **1992**, 31, 4557–4562.
- [98] U. Seemüller, J. Dodt, E. Fink, H. Fritz in *Proteinase Inhibitors* (Hrsg.: A. Barrett, G. Salvesen), Elsevier, Amsterdam, **1986**, S. 337–359.
- [99] J. Hofsteenge, S. R. Stone, A. Donella-Deana, L. Pinna, *Eur. J. Biochem.* **1990**, 188, 55–59.
- [100] C. Niehrs, W. B. Huttner, D. Carvallos, E. Degryse, *J. Biol. Chem.* **1990**, 265, 9314–9318.
- [101] S. R. Stone, S. Dennis, J. Hofsteenge, *Biochemistry* **1989**, 28, 6857–6863.
- [102] A. Betz, J. Hofsteenge, S. R. Stone, *Biochem. J.* **1991**, 275, 801–803.
- [103] T. J. Rydel, A. Tulinsky, W. Bode, R. Huber, *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, 583–601.
- [104] A. Karshikov, W. Bode, A. Tulinsky, S. R. Stone, *Protein Sci.* **1992**, 1, 727–735.
- [105] A. Betz, J. Hofsteenge, S. R. Stone, *Biochemistry* **1991**, 30, 9848–9853.
- [106] M. T. Stubbs, W. Bode, *Thromb. Res.* **1993**, 69, 1–58.
- [107] J. L. Krstenansky, S. J. T. Mao, *FEBS Lett.* **1987**, 211, 10–16.
- [108] J. L. Krstenansky, T. J. Owen, M. T. Yates, S. J. T. Mao, *J. Med. Chem.* **1987**, 30, 1688–1691.
- [109] S. J. T. Mao, M. T. Yates, T. J. Owen, J. L. Krstenansky, *Biochemistry* **1988**, 27, 8170–8173.
- [110] J. M. Maraganore, B. Chao, M. L. Joseph, J. Jablonski, K. L. Ramachandran, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 8692–8698.
- [111] E. Skrzypczak-Jankun, V. E. Carperos, K. G. Ravichandran, A. Tulinsky, M. Westbrook, J. M. Maraganore, *J. Mol. Biol.* **1991**, 221, 1379–1393.
- [112] Z. Szewczuk, B. F. Gibbs, S. Y. Yue, E. O. Purisima, Y. Konishi, *Biochemistry* **1992**, 31, 9132–9140.
- [113] F. Ni, Y. Konishi, H. A. Scheraga, *Biochemistry* **1990**, 29, 4479–4489.
- [114] J. M. Maraganore, P. Bourdon, J. Jablonski, K. L. Ramachandran, J. W. Fenton II, *Biochemistry* **1990**, 29, 7095–7101.
- [115] J. I. Witting, P. Bourdon, D. V. Breznjak, J. M. Maraganore, J. W. Fenton II, *Biochem. J.* **1992**, 283, 737–743.
- [116] J. DiMaio, F. Ni, B. Gibbs, Y. Konishi, *FEBS Lett.* **1991**, 282, 47–52.
- [117] T. Kline, C. Hammond, P. Bourdon, J. M. Maraganore, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 177, 1049–1055.
- [118] X. Qiu, K. P. Padmanabhan, V. E. Carperos, A. Tulinsky, T. Kline, J. M. Maraganore, J. W. Fenton II, *Biochemistry* **1992**, 31, 11689–11697.
- [119] F. Markwardt, G. Fink, B. Kaiser, H.-P. Klöcking, G. Nowack, M. Richter, J. Stürzebecher, *Pharmazie* **1988**, 43, 202–207.
- [120] F. Markwardt, P. Walsmann, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1959**, 317, 64–77.
- [121] I. Björk, B. Nordenman, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 68, 507–511.
- [122] P. L. Lane, J. Denton, A. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, *Biochem. J.* **1984**, 218, 732–735.
- [123] S. T. Olson, I. Björk, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 6353–6364.
- [124] J. Hirsh, *N. Engl. J. Med.* **1991**, 324, 1565–1574.
- [125] B. P. Schmitt, B. Adelman, *Am. J. Med. Sci.* **1993**, 305, 208–215.
- [126] C. A. A. van Bockel, M. Petitou, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 1741–1761; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1671–1690.
- [127] C. Y. Liu, H. L. Nossel, K. L. Kaplan, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 10421–10425.
- [128] P. J. Hogg, P. M. Jackson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 3619–3623.
- [129] J. I. Weitz, M. Hudoba, D. Massel, J. M. Maraganore, J. Hirsh, *J. Clin. Invest.* **1990**, 86, 385–391.
- [130] R. Bar-Shavit, A. Eldor, I. Vlodavsky, *J. Clin. Invest.* **1989**, 84, 1096–1104.
- [131] D. A. Lane, J. Denton, L. Flynn, L. Thunberg, U. Lindahl, *Biochem. J.* **1984**, 218, 725–732.
- [132] J. Bichler, R. Gemmerli, H. Fritz, *Thromb. Res.* **1991**, 61, 39–51.
- [133] F. Markwardt, J. Hauptmann, G. Nowack, C. Kleßen, P. Walsmann, *Thromb. Haemostasis* **1982**, 47, 226–229.
- [134] A. Henschen, F. Markwardt, P. Walsmann, *Folia Haematol.* **1988**, 115, 59–63.
- [135] P. Klement, A. Borm, J. Hirsh, J. Maraganore, G. Wilson, J. Weitz, *Thromb. Haemostasis* **1992**, 68, 64–68.
- [136] D. F. Rigel, R. W. Olson, R. W. Lappe, *Circ. Res.* **1993**, 72, 1091–1102.
- [137] H.-P. Klöcking, F. Markwardt, *Pharmazie* **1989**, 44, 341–342.
- [138] G. Agnelli, C. Renga, J. I. Weitz, G. Nenci, J. Hirsh, *Blood* **1992**, 80, 960–965.
- [139] T. Friedrich, B. Kröger, S. Bialojan, H. G. Lemaire, H. W. Höffgen, P. Reuschenbach, M. Otte, J. Dodt, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 16216–16222.
- [140] R. T. Sawyer, *BioTechnology* **1991**, 9, 513–518.
- [141] M. L. Connolly, *Science* **1983**, 221, 709–713.
- [142] J. A. Wells, *Biochemistry* **1990**, 29, 8511–8517.