

# Rekombinowana hirudyna

Tadeusz Pietrucha<sup>1</sup>  
Cezary Watała<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii I  
<sup>2</sup>Samodzielna Pracownia Zaburzeń Krzepnięcia Krwi  
Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej  
Akademia Medyczna  
Łódź

## 1. Wprowadzenie

Stosowanie hirudyny w praktyce lekarskiej ma ogromną tradycję sięgającą roku 1884. Jest to najsilniejszy i najbardziej specyficzny ze znanych inhibitorów trombiny (1), pełniący główną rolę w procesie krzepnięcia krwi. Stąd też, obserwuje się rosnące zainteresowanie hirudyną jako lekiem przeciwzakrzepowym (2)\*. To właśnie zainteresowanie sprawiło, że w wielu ośrodkach naukowych, zarówno akademickich, jak i tych pracujących na rzecz poszczególnych firm biotechnologicznych, podjęto udane próby otrzymania rekombinowanej hirudyny. Posłużono się w tym celu różnymi systemami ekspresyjnymi wykorzystując jako komórki gospodarza zarówno bakterie *E. coli* (3) lub *Bacillus subtilis* (4), jak i drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (5,6).

## 2. Budowa cząsteczki hirudyny

W warunkach naturalnych występują trzy główne odmiany hirudyny o nieznacznie zmienionej strukturze pierwszorzędowej (rys. 1), określane jako HV1, HV2, HV3. Rosnące w ostatnim czasie zainteresowanie tym specyficznym inhibitorem trombiny doprowadziło do odkrycia dalszych odmian (7). Jedną z najnowszych jest polipeptyd wyizolowany z *Hirudinaria manillensis* (8-10). Wykazuje on 72% homologię struktury pierwszorzędowej z odmianą HV1 (8). Szczególną uwagę zwraca tu brak sulfonowanej reszty tyrozyny

---

\* Zastosowanie hirudyny jako leku przeciwzakrzepowego oraz mechanizm jej działania szerzej zostały omówione również w innej pracy przeglądowej wysłanej do druku (Pietrucha R., Baj Z. Watała C., *Przeciwzakrzepowe własności hirudyny i jej potencjalne zastosowanie w leczeniu chorób układu krążenia*, Acta Haematologica Polonica).

HV1: VYTDCTESG QNLCLCEGSN VCGGKNKCV GSDGEKNQCV TEGGTPKPS HNDGDFEIP EE YLQ

HV2: IYTDCTESG QNLCLCEGSN VCGKGNKCV GSNGKGNQCV TEGGTPNPES HNGDFEIP EE YLQ

HV3: IYTDCTESG QNLCLCEGSN VCGKGNKCV GSQKGNQCV TEGGTPKPS HNGDFEIP EDAYDE

Rys. 1. Struktura pierwszorzędowa izohirudyn określanych jako HV1, HV2, HV3.

w C-końcowej części cząsteczki, która zastąpiona jest przez kwas asparaginowy (10).

Naturalna hirudyna jest jednołańcuchowym polipeptydem złożonym z 65 lub 66 aminokwasów. Jej masa cząsteczkowa wynosi ok. 7000 D. C-końcowy obszar zawiera aminokwasy o charakterze kwaśnym, które odgrywają ważną rolę w oddziaływaniu z trombiną oraz tworzeniu kompleksu hirudyna/trombina.

W warunkach naturalnych cząsteczka hirudyny ulega posttranslacyjnej modyfikacji w pozycji Tyr<sub>63</sub>, do której dołączana jest reszta siarczanowa. Hirudyna zawiera również trzy mostki disiarczkowe utworzone pomiędzy Cys<sub>6</sub>-Cys<sub>14</sub>, Cys<sub>16</sub>-Cys<sub>28</sub>, Cys<sub>22</sub>-Cys<sub>39</sub> (11). W wyniku procesów denaturacji i renaturacji w warunkach *in vitro* odtworzenie mostków disiarczkowych pomiędzy poszczególnymi cysteinami zachodzi w dużej mierze losowo. Powoduje to powstawanie puli izomerów, cząsteczek hirudyny o nieprawidłowej strukturze trzeciorzędowej (11-13). Zastąpienie Asp<sub>33</sub> przez Cys i poddanie tak zmutowanej rekombinowanej hirudyny procesowi denaturacji, a następnie łagodnej renaturacji w buforze węglanowym (pH 8,3) wywołuje powstawanie dimeru, w którym Cys<sub>33</sub> tworzą mostek disiarczkowy (14). Dimer ten wykazuje podobne właściwości hamowania aktywności trombiny jak hirudyna typu dzikiego. Niektórzy badacze (15) wyróżniają trzy domeny w strukturze rekombinowanej hirudyny. Są to: a) domena główna, tworząca jakby najważniejszy szkielet tej cząsteczki, zawierająca reszty aminokwasowe 3-30, 37-46, 56-57, b) domena typu *finger* utworzona przez aminokwasy 31-36 oraz c) C-końcowy „ogon” zbudowany z reszt aminokwasowych 50-65. W roztworach wodnych rekombinowana hirudyna zachowuje analogiczną strukturę jak białko wyizolowane z materiału biologicznego (16). W badaniach z zastosowaniem metody dichroizmu kołowego wykazano, że w buforze fosforanowym o pH 7,4 ok. 60% cząsteczki hirudyny tworzy strukturę  $\beta$ . Brak jest natomiast struktur typu  $\alpha$ -heliks (17). Podobne wyniki uzyskano w badaniach z wykorzystaniem techniki jądrowego rezonansu paramagnetycznego (NMR). W cząsteczce hirudyny wykazano istnienie molekularnego rdzenia utworzonego przez reszty aminokwasowe 3-30 i 37-48 (18) oraz dwóch antyrównoległych struktur  $\beta$  przy braku struktur typu  $\alpha$ -heliks (15,16,18).

### 3. Mechanizm działania hirudyny

Trombina jest enzymem podlegającym przemianom allosterycznym określanym jako przejście „forma wolna  $\rightarrow$  forma szybka” (*slow  $\rightarrow$  fast transition*) (19). Mechanizm oddziaływania trombiny z hirudyną kontrolowany jest przez wiązanie jonów Na<sup>+</sup> i Cl<sup>-</sup> do enzymu i towarzyszące temu zjawisku zmiany allosteryczne. Wiązanie Na<sup>+</sup> indukuje zmiany konformacyjne będące wynikiem tranzycji „forma wolna  $\rightarrow$  forma szybka”. Hirudyna wiąże się z większym powinowactwem do „formy szybkiej” trombiny. Stąd też tranzycja formy „wolnej” do „szybkiej” jest głównym elementem molekularnego rozpoznawania cząsteczki hirudyny przez trombinę. Jony chlorkowe działają antagonistycznie w stosunku do sodowych.

Ayala i DiCera (19) proponują 3-stopniowy mechanizm rozpoznawania hirudyny przez trombinę na poziomie molekularnym.

1. C-końcowy „ogon” hirudyny, zawierający kwasowe reszty aminokwasowe, oddziałuje z miejscem wiążącym fibrynogen, powodując wyparcie niektórych jonów chlorkowych z powierzchni trombiny.

2. W wyniku tego oddziaływania, trombina podlega zmianom konformacyjnym powodującym zwiększenie dostępności „kieszeni katalitycznej” dla małych syntetycznych substratów poprzez przemieszczenie pętli Trp<sub>148</sub>. Zmiany w centrum katalitycznym połączone są z przyłączeniem jonów sodowych. Są one identyczne z tymi jakie obserwujemy przy tranzycji „forma wolna → forma szybka”, indukowanej jonami sodowymi.

3. Zwarta N-końcowa domena hirudyny zostaje umieszczona w obszarze otaczającym kieszeń katalityczną. Odgrywa ona szczególnie ważną rolę (dzięki resztom aminokwasowym Leu<sub>15</sub>, Glu<sub>17</sub>, Asn<sub>20</sub>, Val<sub>21</sub>) w utrzymaniu stabilności kompleksu (20).

Dzięki technice mutagenезy punktowej (*site-directed mutagenesis*) wykazano, że istotną rolę w oddziaływaniu hirudyny z trombiną odgrywają ujemnie naładowane reszty aminokwasowe znajdujące się przy C-końcu cząsteczki, a mianowicie: Glu<sub>57</sub>, Glu<sub>58</sub>, Glu<sub>61</sub>, Glu<sub>62</sub>. Zastąpienie tych aminokwasów glutaminą (Gln) powoduje zwiększenie stałej dysocjacji kompleksu trombina/hirudyna (21). Ważność tego obszaru w oddziaływaniu z trombiną potwierdza również eksperyment, w którym zastosowano przeciwciała monoklonalne rozpoznające specyficzne regiony C-końcowe cząsteczki hirudyny (Glu<sub>61</sub>, Glu<sub>62</sub>) (22). Zsyntetyzowany chemicznie peptyd odpowiadający C-końcowemu fragmentowi łańcucha hirudyny wiąże się z trombiną w miejscu odpowiedzialnym za wiązanie fibrynogenu (23). Dodatkowo naładowane reszty aminokwasowe znajdujące się przy N-końcu cząsteczki wymagane są z kolei dla optymalnego wiązania z  $\alpha$ -trombiną (24). W badaniach krystalograficznych z zastosowaniem techniki jądrowego rezonansu paramagnetycznego (NMR) potwierdzono wiązanie C-końcowego „ogona” hirudyny do miejsca wiążącego fibrynogen w cząsteczce trombiny (25,26). Trzy pierwsze reszty aminokwasowe N-końcowe (Val, Val, Tyr) wiążą się do kieszeni będącej częścią miejsca aktywnego trombiny.

#### 4. Klonowanie i ekspresja rekombinowanej hirudyny

Gen hirudyny najczęściej otrzymywano na drodze syntezy chemicznej (27) lub też stosując metodę polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) (28,29). Uzyskane cDNA włączano następnie do wektora ekspresyjnego. Istotnym problemem pozostaje wydajność systemu ekspresyjnego. Zastąpienie naturalnego peptydu sygnałnego peptydem sygnałnym *omp A2*, pochodzącym z białka bakteryjnej błony cytoplazmatycznej (usytuowanego na jej zewnętrznej stronie), polepszało zdolności sekrecyjne komórek gospodarza dla tego peptydu (30). Zmodyfikowany gen hirudyny ulega ekspresji pod kontrolą promotorów powszechnie stosowanych w wektorach bakteryjnych, takich jak *lpp* i *trp*

(30), oraz zmodyfikowanego regionu regulatorowego z *operonu kolicyny E1* (*colicin E1*). Hirudyna wydzielana jest do przestrzeni okołoplazmatycznej komórek gospodarza (*Escherichia coli*). Jej charakterystyczną cechą odróżniającą ją od białka występującego w warunkach naturalnych jest brak reszty sulfonowej w pozycji Tyr<sub>63</sub>. Liczne doniesienia wskazują jednak, że desulfatohirudyna wykazuje niezmienną aktywność inhibitorową w stosunku do trombiny.

W celu uzyskania ekspresji rekombinowanej hirudyny w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, posłużono się genem syntetyzowanym chemicznie (6). W wyborze kodonów dla poszczególnych aminokwasów kierowano się preferencjami komórek gospodarza. Konstruując wektor ekspresyjny, gen hirudyny przyłączano do fragmentu promotora *GAP* o długości 198 par zasad (6). Wykorzystywano również peptyd sygnałny białka ściany komórkowej komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2*, ulepszając w ten sposób sekrecję (31). Desulfonowana postać rekombinowanej HV1 wydzielana była do pożywki hodowlanej, a następnie oczyszczana z wykorzystaniem m.in. chromatografii jonowymiennej i filtracji żelowej (32). W wyniku przeprowadzonej dokładniejszej analizy produktu fermentacji drożdżowej wykazano, że ok. 10-20% rekombinowanej hirudyny stanowiły formy zawierające łańcuch polipeptydowy, skrócony o 1 lub 2 aminokwasy z C-końca cząsteczki (33).

cDNA dla wariantu HV2 hirudyny otrzymano nie na drodze syntezy chemicznej, lecz poprzez klonowanie i izolowanie z materiału biologicznego (34). Ekspresję białka uzyskano pod kontrolą promotora *lambda PL* w komórkach *E. coli*. Wysoką wydajność rekombinowanej HV2 uzyskano również wykorzystując *Saccharomyces cerevisiae* oraz system wydzielniczy znajdujący się pod kontrolą sekwencji *prepro* feromonu  $\alpha$  (*MF $\alpha$ 1*) (5). Także i w tym przypadku otrzymywano niewielką pulę rekombinowanego białka, nieznacznie zdegradowanego (prawdopodobnie na skutek aktywności enzymów proteolitycznych w procesie fermentacji), jak i z dodatkowym aminokwasem przy N-końcu (5,35).

Problemy te i niedogodności inspirują naukowców do poszukiwania nowych systemów ekspresyjnych. Dobre wyniki osiągnięto stosując plazmid określane jako *pNPH 208*. Zawiera on DNA kodujący białko fuzyjne zawierające obojętny propeptyd proteazy z *Bacillus amyloiquefaciens* oraz hirudynę. Gen hirudyny syntetyzowano chemicznie kierując się preferencją kodonów charakterystyczną dla *B. subtilis*. Transformowane szczepy bakteryjne *Bacillus subtilis* wydzielały dojrzałą postać hirudyny do pożywki hodowlanej (4).

Zwiększenie wydajności wytwarzania rekombinowanego białka przez komórki gospodarza, można uzyskać m.in. przez zwiększenie presji selekcyjnej. Taką drogę postępowania wybrali Hottiger i wsp. (36). Skonstruowany przez nich wektor ekspresyjny zawierał, oprócz genu hirudyny, gen kodujący metalotioneinę CUP 1 jako marker selekcyjny. W obecności siarczanu miedzi komórki *Saccharomyces cerevisiae*, zawierające wymieniony gen, były bardziej stabilne w procesie podziałów mitotycznych niż komórki nie zawierające genu metalotioneiny CUP 1. Zapewniało to całkowitą stabilność plazmidu, nawet podczas wydłużonego procesu fermentacji, co z kolei polepszało znacznie

wydajność produkcji hirudyny. Wysoką wydajność uzyskiwano również stosując plazmid zawierający promotor galaktozowy oraz syntetyczny gen kodujący białko hybrydowe HV1-HV2 i MF alfa 1 *preprolider* (37).

W procesie oczyszczania rekombinowanej hirudyny stosowano różne techniki chromatograficzne, jak również metodę elektroforezy kapilarnej (38).

## 5. Atrakcyjność hirudyny jako leku przeciwzakrzepowego

Wszelkie dane wskazują na to, że w najbliższym czasie hirudyna stanie się poważnym konkurentem szeroko stosowanej heparyny w grupie leków przeciwzakrzepowych. Zdaniem wybitnego specjalisty w dziedzinie leczenia chorób układu krążenia, prof. Verstraete (39) z Centre for Molecular and Vascular Biology, University of Leuven, Belgia, wynika to z następujących przesłanek:

1. Hirudyna nie jest neutralizowana przez heparynazę, monomery włókniaka i białka osocza, takie jak czynnik płytkowy 4, czy białko bogate w histydynę.

2. Heparyna, aby mogła skutecznie działać jako czynnik przeciwzakrzepowy, musi utworzyć kompleks z antytrombina III. W przypadku niedoboru tego białka w osoczu, skuteczność heparyny znacznie się obniża.

3. Hirudyna jest silnym, bardzo specyficznym inhibitorem trombiny i działa w sposób niezależny od antytrombiny III. Z powodzeniem blokuje ona aktywność zarówno wolnego jak i związanego ze skrzepem enzymu.

4. Duży kompleks heparyna/antytrombina III z trudnością penetruje zakrzep, który zawiera związaną trombinę mogącą nadal aktywować krwinki płytkowe i trawić fibrynogen.

5. Hirudyna zmniejsza odkładanie się krwinek płytkowych w tworzących się zakrzepach powstałych w wyniku uszkodzenia ściany naczyń żył głębokich (heparyna nie wykazuje podobnych właściwości).

6. Hirudyna, specyficznie blokując działanie trombiny hamuje trombinozależną aktywację płytek, nie wpływając na agregację wywołaną innymi czynnikami, takimi np. jak: ADP, serotonina, kolagen, tromboksan. Niefrakcjonowana heparyna może natomiast wywoływać agregację krwinek płytkowych. Niskocząsteczkowa niefrakcjonowana heparyna powoduje niekiedy trombocytopenię. Tego rodzaju działań ubocznych nie zaobserwowano, jak dotąd, w przypadku hirudyny.

7. Okres półtrwania heparyny w osoczu jest zmienny i wynosi, w zależności od dawki, 30-60 min. W przypadku hirudyny jest on krótszy i wynosi 40 min.

Hirudyna blokuje wszystkie znane funkcje trombiny, w tym także jej oddziaływanie z trombomoduliną. Wiadomo, że kompleks trombina/trombomodulina aktywuje białko C i białko S, które są wewnątrzpochodnymi inhibitorami procesu krzepnięcia krwi. Niepożądane działania uboczne hirudyny, w postaci ryzyka wystąpienia krwawień, są porównywalne jak w przypadku heparyny (40-44). Być może uda się je ograniczyć na drodze konstruowania

nowych, udoskonalonych z klinicznego punktu widzenia odmian hirudyny, technikami inżynierii białkowej. Jedną z pierwszych takich prób podjęli już Bode i wsp. (45). Polegała ona na połączeniu wiązaniem kowalencyjnym hirudyny do fragmentów Fab' przeciwciała monoklonalnego (59D8), które selektywnie wiąże się do włókniaka. Tak zmodyfikowana cząsteczka inhibitora była 10-krotnie skuteczniejsza w hamowaniu odkładania się włókniaka na powierzchni eksperymentalnego skrzepu w roztworze fibrynogenu i osoczu, niż hirudyna niemodyfikowana (45). Połączenie cech leku fibrynolitycznego z właściwościami przeciwzakrzepowymi hirudyny uzyskano w wyniku utworzenia kowalencyjnego kompleksu streptokinazy (białka pochodzenia bakteryjnego stosowanego w medycynie do rozpuszczania zakrzepów) z rekombinowaną hirudyną (46). Wiadomo także, że rekombinowana hirudyna zachowuje swe właściwości w utworzonym *in vitro* kompleksie z białkiem osocza — albuminą (47).

Zastosowanie metod inżynierii genetycznej spowoduje z pewnością w najbliższym czasie wytworzenie wielu nowych białek hybrydowych utworzonych na bazie hirudyny z myślą o polepszeniu jej właściwości terapeutycznych.

## Literatura

1. Marki W. E., Wallis R. B., (1990), *Thromb. Haemost.*, 64, 344-348.
2. Lewandowski K., Zawilska K., (1992), *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 88, 273-279.
3. Johnson P. H., Sze P., Winant R., Payne P. W., Lazar J. B., (1989), *Semin. Thromb. Hemost.*, 15, 302-315.
4. Furutani Y., Honjo M., Nakajama A., Kawamura K., Mita I., Audo K., (1988), European patent application 0352387 A1 (priority 26. 7. 1988 JP 18455788).
5. Riehl Bellon N., Carvallo D., Acker M., van Dorsseleer A., Marquet M., Loison G., Lemoine Y., Brown S. W., Courtney M., Roitsch C., (1989), *Biochemistry*, 28, 2941-2949.
6. Janes M., Meyhack B., Zimmermann W., Hinnen A., (1990), *Curr. Genet.*, 18, 97-103.
7. Scharf M., Engels J., Tripier D., (1989), *FEBS Lett.*, 225, 105-110.
8. Vindigni A., De Filippis V., Zanotti G., Visco C., Orsini G., Fontana A., (1994), *Eur. J. Biochem.*, 226, 323-333.
9. Electricwala A., Hartwell R., Scawen M. D., Atkinson T., (1993), *J. Protein Chem.*, 12, 365-370.
10. Scacheri E., Nitti G., Valsasina B., Orsini G., Visco C., Ferrera M., Sawyer R. T., Sarmientos P., (1993), *Eur. J. Biochem.*, 214, 295-304.
11. Chang J. Y., Schindler P., Chatrenet B., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 11992-11997.
12. Chang J. Y., Schindler P., Ramseier U., Lai P. H., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 9207-9216.
13. Chang J. Y., (1993), *J. Biol. Chem.*, 268, 4043-4049.
14. Chang J. Y., Grossenbacher H., Meyhack B., Maerki W., (1993), *FEBS Lett.*, 336, 53-56.
15. Clore G. M., Sukumaran D. K., Nilges M., Zarbock J., Gronenborn A. M., (1987), *EMBO J.*, 6, 529-537.
16. Haruyama H., Wuthrich K., (1989), *Biochemistry*, 28, 4301-4312.
17. Electricwala A., Atkinson T., (1990), *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 1, 267-271.
18. Szyperski T., Guntert P., Stone S. R., Wuthrich K., (1992), *J. Mol. Biol.*, 228, 1193-1205.
19. Ayala Y., Di Cera E., (1994), *J. Mol. Biol.*, 235, 733-746.

20. Betz A., Hopkins P. C., Le Bonniec B. F., Stone S. R., (1994), *Biochem. J.*, 298, 507-510.
21. Braun P. J., Dennis S., Hofsteenge J., Stone S. R., (1988), *Biochemistry*, 27, 6517-6522.
22. Schlaeppi J. M., Vekemans S., Rink H., Chang J. Y., (1990), *Eur. J. Biochem.*, 188, 463-470.
23. Chang J. Y., Ngai P. K., Rink H., Dennis S., Schlaeppi J. M., (1990), *FEBS Lett.*, 261, 287-290.
24. Wallace A., Dennis S., Hofsteenge J., Stone S. R., (1989), *Biochemistry.*, 28, 10079-10084.
25. Rydel T. J., Ravichandran K. G., Tulinsky A., Bode W., Huber R., Roitsch C., Fenton J. W. (1990), *Science*, 249, 277-280.
26. Grutter M. G., Priestle J. P., Rahuel J., Grossenbacher H., Bode W., Hofsteenge J., Stone S. R., (1990), *EMBO J.*, 9, 2361-2365.
27. Rink H., Liersch M., Sieber P., Meyer F., (1984), *Nucleic Acids Res.*, 12, 6369-6387.
28. Majumder K., (1992), *Gene*, 110, 89-94.
29. Sandhu G. S., Aleff R. A., Kline B. C., (1992), *Biotechniques*, 12, 14-16.
30. Ghrayeb J., Kimura H., Takahara M., Hsiung H., Masui Y., Inouye M., (1984), *EMBO J.*, 3, 2437-2442.
31. Achstetter T., Nguyen Juilleret M., Findeli A., Merkamm M., Lemoine Y., (1992), *Gene*, 110, 25-31.
32. Hinnen A., Meyhack B., Heim J., (1989), *Biotechnology*, 13, 193-213.
33. Meyhack B., Marki W., Heim J., (1987), European patent application 0225 633 A2 (16. 6. 1987).
34. Harvey R. P., Degryse E., Stefani L., Schamber F., Cazenave J. P., Courtney M., Tolstshev P., Lecocq J. P., (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1084-1088.
35. van Dorsselaer A., Lepage P., Bitsch F., Whitechurch O., Riehl Bellon N., Fraisse D., Green B., Roitsch C., (1989), *Biochemistry*, 28, 2949-2956.
36. Hottiger T., Kuhla J., Pohlig G., Furst P., Spielmann A., Garn M., Haemmerli S., Heim J., (1995), *Yeast.*, 11, 1-14.
37. Lehman E. D., Joyce J. G., Bailey F. J., Markus H. Z., Schultz L. D., Dunwiddie C. T., Jacobson M. A., Miller W. J., (1993), *Protein Expr. Purif.*, 4, 247-255.
38. Dette C., Watzig H., (1995), *J. Chromatogr. A*, 700, 89-94.
39. Werstraete M., (1995), *Desirudin. Review of its pharmacology and prospective clinical uses*, Royal Society of Medicine, London.
40. Cannon C. P., Braunwald E., (1995), *J. Am. Coll. Cardiol.*, 25, 30S-37S.
41. Lee L. V., (1995), *Am. J. Cardiol.*, 75, 7-13.
42. GUSTO IIa Investigators, (1994), *Circulation*, 90, 1631-1637.
43. Antman E. M., (1994), *Circulation.*, 90, 1624-1630.
44. Cannon C. P., McCabe C. H., Henry T. D., Schweiger M. J., Gibson R. S., Mueller H. S., Becker R. C., Kleiman N. S., Haugland J. M., Anderson J. L., et al., (1994), *J. Am. Coll. Cardiol.*, 23, 993-1003.
45. Bode C., Hudelmayer M., Mehwald P., Bauer S., Freitag M., von Hodenberg E., Newell J. B., Kubler W., Haber E., Runge M. S., (1994), *Circulation*, 90, 1956-1963.
46. Phaneuf M. D., Ozaki C. K., Johnstone M. T., Loza J. P., Quist W. C., LoGerfo F. W., (1994), *Thromb. Haemost.*, 71, 481-487.
47. Phaneuf M. D., Ito R. K., LoGerfo F. W., (1994), *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 5, 641-645.

## Recombinant hirudin

### Summary

Hirudin is a well known antithrombotic agent with potentially wide applications in the clinical treatment of in the diseases of circulatory system. In this review the authors discuss biochemical



and functional properties of natural hirudins as well as recombinant forms of the protein. The genetic engineering approaches to hirudin expression, as well as the methods and techniques of protein isolation and purification are discussed and summarized.

We emphasize the most important advantages potentially originating from the clinical use of hirudin as a specific thrombin inhibitor, and its potential role in clinical practice, particularly in regard to heparin preparations.

**Key words:**

hirudin, recombinant hirudin, thrombin, antithrombotic agents, circulatory system diseases, thrombotic diseases.

*Adres do korespondencji:*

Tadeusz Pietrucha, Zakład Biochemii I, Akademia Medyczna, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź.