

Projektowanie nowych inhibitorów trombiny*

Zbigniew Szewczuk
Instytut Chemii
Uniwersytet Wrocławski

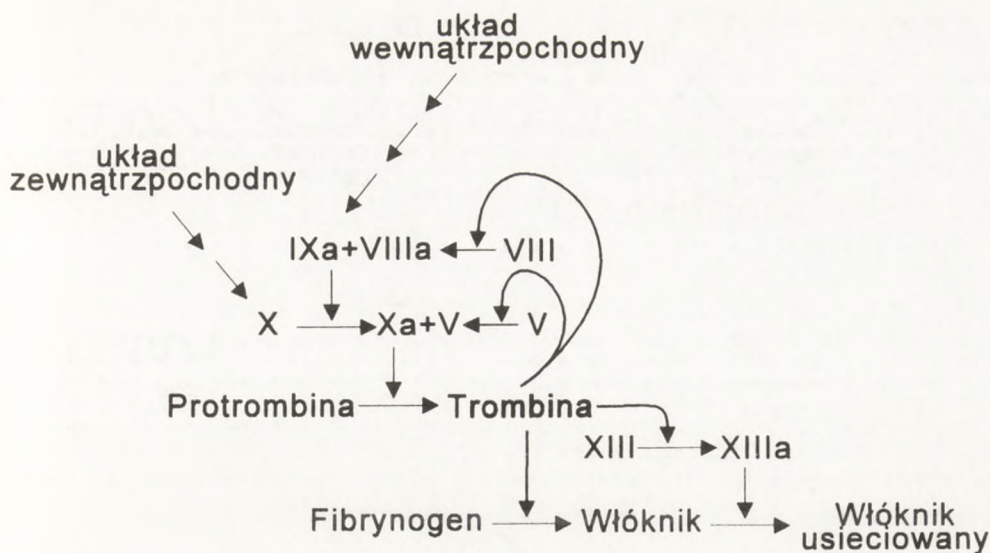
1. Wstęp

Krzepnięcie krwi zabezpiecza organizm przed jej utratą w razie uszkodzenia naczynia krwionośnego. Na uszkodzonej ścianie tworzy się zakrzep zmniejszając, przez zamknięcie uszkodzonego miejsca, niebezpieczeństwo krwotoku. W niektórych stanach patologicznych tworzenie zakrzepu wewnątrz naczyń krwionośnych serca może doprowadzić do zawału, który jest obok raka główną przyczyną śmierci ludzi w XX w. Dlatego prowadzone są intensywne badania nad środkami farmakologicznymi umożliwiającymi kontrolę krzepnięcia krwi.

α -trombina jest enzymem proteolitycznym pełniącym kluczową rolę w procesie krzepnięcia krwi (1). Katalizuje ona hydrolizę rozpuszczalnego białka krwi — fibrynogenu, prowadzącą do utworzenia monomerów włóknika, które następnie ulegają spontanicznej polimeryzacji tworząc nierozpuszczalny włóknik. Powstały liniowy polimer jest następnie sieciowany za pomocą, aktywowanego również przez trombinę, czynnika XIII (rys. 1). Ponadto α -trombina aktywuje płytki krwi, umożliwiając ich agregację i adhezję, które wypełniając siatkę włóknika tworzą zakrzep. Inną ważną rolą α -trombiny w procesie koagulacji jest przyspieszanie własnego wytwarzania poprzez proteolityczne aktywowanie czynników V i VIII uczestniczących jako kofaktory w kaskadowym procesie koagulacji (rys. 1).

W swoim początkowym stadium, zawał serca może być leczony przez podanie enzymów aktywujących plazminogen do plazminy takich jak tkankowy aktywator plazminogenu, urokinazę lub streptokinazę (2,3,4,5). Powstała plazmina katalizuje lizę włóknika w zakrzepie, co może przywrócić przepływ krwi przez naczynia krwionośne. Zastosowanie kliniczne tych enzymów jest jednak ograniczone z uwagi na częste przypadki retrombozy (tj. ponowne powstanie zakrzepów) występujące po takim leczeniu (6,7,8). Wysznięto nawet przypuszczenie, że terapia trombolityczna wywołuje fizjologiczną aktywację procesu koagulacji (9). Prawdopodobnie, jest to związane z obecnością wewnątrz za-

*Artykuł opracowany na podstawie referatu wygłoszonego na XXIX Zjeździe Polskiego Towarzystwa Biochemicznego we Wrocławiu.



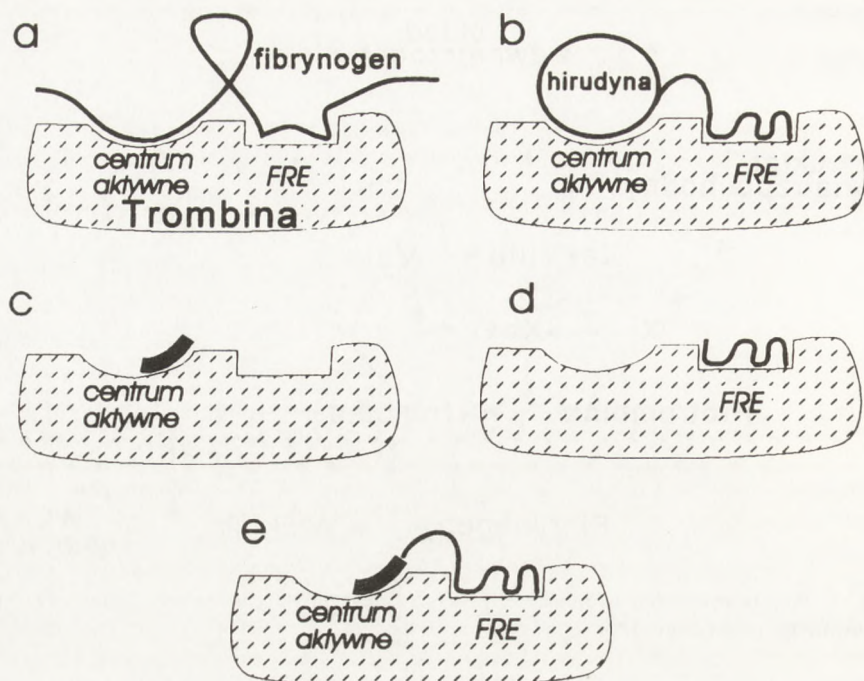
Rys. 1. Podstawowa rola trombiny w procesie koagulacji. Końcowy fragment schematu zaproponowanego przez Bone (15).

krzepu znacznej ilości aktywnej trombiny, która może być uwolniona podczas lizy zakrzepu (10). W przeciwieństwie do trombiny rozpuszczonej w osoczu krwi, trombina uwięziona wewnątrz zakrzepu jest stabilna i niedostępna dla heparyny (11,12). Niezbędne, jak się wydaje, jest podawanie, równolegle ze środkami trombolitycznymi, inhibitorów trombiny, które mogłyby skutecznie unieczynnić trombinę uwalnianą podczas lizy zakrzepu.

Jednym ze znanych, stosowanych środków zmniejszających krzepliwość krwi jest heparyna. Jest ona polisacharydem, który łącząc się z naturalnym inhibitorem trombiny — antytrombiną III aktywuje ją (13). Chociaż kompleks heparyny z antytrombiną III może skutecznie dezaktywować trombinę i niektóre inne enzymy uczestniczące w procesie koagulacji jej stosowanie w terapii napotyka na szereg ograniczeń (14,15) co sprawia, że obecnie poszukuje się nowych antykoagulantów będących bezpośrednimi inhibitorami trombiny.

2. Bezpośrednie inhibitory trombiny

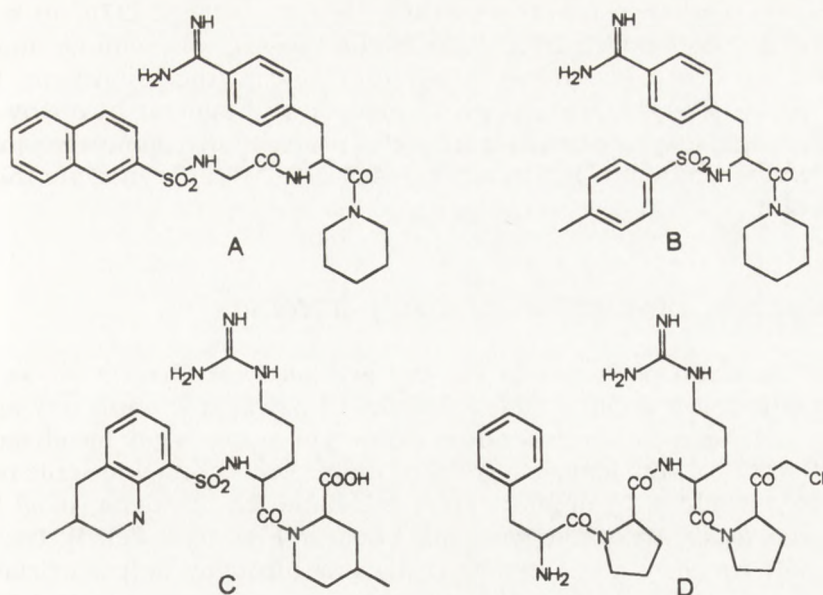
α -trombina wykazuje znacznie większą specyficzność substratową niż inne znane proteazy serynowe. Jest to związane z obecnością na jej powierzchni co najmniej trzech, niezależnych i oddalonych od siebie obszarów mogących specyficznie oddziaływać z odpowiednimi substratami lub inhibitorami (16). Istnieje wiele tak zwanych bivalentnych substratów i inhibitorów, które oddziałując z trombiną łączą się jednocześnie z dwoma jej obszarami wiążącymi.



Rys. 2. Schemat oddziaływania trombiny z fibrynogenem (a), hirudyną (b), PPACK (c), C-końcowym fragmentem hirudyny: Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln (d), i bivalentnym inhibitorem -Ac-[D-Phe⁴⁵, Arg⁴⁷]hirudyna⁴⁵⁻⁶⁵ (e).

Fibrynogen jest jednym z bivalentnych substratów trombiny oddziałującym jednocześnie z jej centrum aktywnym i pobocznym obszarem FRE (z ang. *fibrinogen recognition exo-site*) (rys. 2a). Dlatego substancje skutecznie blokujące centrum aktywne α -trombiny oraz jej obszar FRE mogą być kompetywnymi inhibitorami trombiny w procesie powstawania fibryny (17).

Znanych jest wiele bezpośrednich inhibitorów trombiny wiążących się z jej miejscem aktywnym (18). Inhibitory te hamują katalizowaną przez trombinę hydrolizę fibrynogeny oraz krótkich substratów peptydowych (np. H-D-Phe-Pro-Arg-pNA lub Tos-Gly-Pro-Arg-pNA (pNA = p-nitroanilid) (19). Poza liczną grupą związków niepeptydowych, z których najaktywniejsze struktury przedstawiono na rys. 3, najbardziej znane są pochodne tripeptydu D-Phe-Pro-Arg posiadające wysoką aktywność antytrombinową. Niedawno określono metodami rentgenograficznymi trójwymiarową strukturę nieodwracalnego kompleksu D-Phe-Pro-ArgCH₂Cl (PPACK, rys. 3D) z α -trombiną (19). Badania te wykazały, że PPACK blokuje centrum katalityczne α -trombiny w podobny sposób w jaki substraty oddziałują z jej centrum aktywnym (rys. 2c). W kompleksie tym łańcuch boczny argininy inhibitora znajduje się w obszarze S₁ [użyto nomenklatury Schechtera i Bergera (20)] centrum aktywnego enzymu, a reszty D-fenylalaninowa i prolinowa inhibitora zajmują obszar S₂ enzymu. Można



Rys. 3. Struktury inhibitorów trombiny wiążących się z jej miejscem aktywnym. A. NAPAP — N^{α} -(2-naftylo-sulfonylo-glicylo)DL-p-amidyno-fenylalanyno-piperydyna. B. 4-TAPAP- N^{α} -(4-tolueno-sulfonylo)DL-p-amidyno-fenylalanyno-piperydyna. C. OM805 — kwas (2R, 4R)-4-metylo-1-[N^{α} -((RS)-3-metylo-1,2,3,4-tetrahydro-8-chinolinosulfonylo)-L-arginylo]-2-piperydynokarboksylowy. D. PPACK — D-Phe-Pro-ArgCH₂Cl.

przypuszczać, że wszystkie (również odwracalne) inhibitory trombiny będące pochodnymi tripeptydu D-Phe-Pro-Arg oddziałują w identyczny sposób z enzymem jak PPAK.

Najaktywniejszym ($K_d \approx 10^{-14}$ M) ze znanych naturalnych inhibitorów trombiny jest hirudyna (21). Jest ona białkiem zbudowanym z 65 reszt aminokwasowych wytwarzanym przez ślaniarki pijawki lekarskiej *hirudo medicinalis*. Cząsteczka hirudyny przypomina kształtem kijankę, ze sztywną N-końcówą, 48-peptydową „głową”, której konformacja jest stabilizowana trzema mostkami disulfidowymi, oraz C-końcowym „ogonem” (reszty aminokwasowe 49 – 65 (22)) o nie uporządkowanej konformacji w roztworze (23,24). Wyjątkowo wysoka specyficzność i aktywność hirudyny wynika z bivalentnego charakteru oddziaływania z trombiną. Niedawno określono strukturę rentgenograficzną kompleksu hirudyny z α -trombiną (25). W kompleksie tym hirudyna blokuje swoją N-końcówą, 48-peptydową częścią centrum aktywne enzymu, podczas gdy jej C-końcowy undekapeptydowy fragment „ogonu” wiąże się z centrum bocznym FRE (rys. 2b). Obydwa te fragmenty aktywne hirudyny połączone są heksapeptydowym wysięgnikiem (hirudyna^{49–54}). Syntetyczny C-końcowy undekapeptydowy fragment hirudyny (Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln, hirudyna^{55–65}) blokując FRE (26) trombiny (rys. 2d), hamuje jej oddziaływanie z fibrynogenem. Chociaż hirudyna^{55–65} jest inhibitorem trom-

biny w reakcji hydrolizy fibrynogenu ($IC_{50} = 1,2 \cdot 10^{-6}$ M (27)), to w przeciwieństwie do pochodnych tripeptydu D-Phe-Pro-Arg, nie hamuje amidolizy krótkich substratów oddziałujących wyłącznie z centrum aktywnym. Wykazano też, że syntetyczny N-końcowy 47-peptydowy fragment hirudyny (hirudyna¹⁻⁴⁷) blokuje wyłącznie centrum aktywne trombiny, kompetycyjnie hamując hydrolizę krótkich substratów ($K_i = 4,2 \cdot 10^{-7}$ M) i fibrynogenu ($K_i = 4,6 \cdot 10^{-7}$ M) (28).

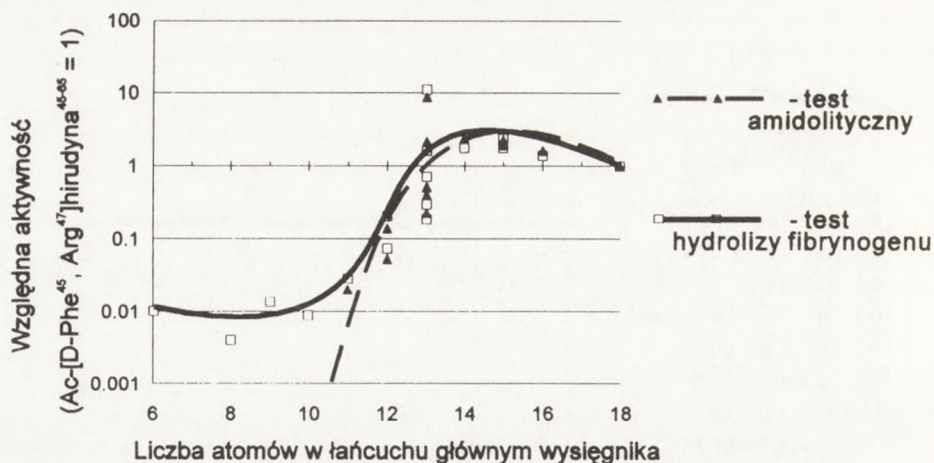
3. Syntetyczne, biwalentne inhibitory trombiny

Chociaż zarówno pochodne D-Phe-Pro-Arg jak i hirudyna⁵⁵⁻⁶⁵ są swoistymi inhibitorami trombiny, oddziałują one z enzymem w odmienny sposób. Pierwsze z nich łączą się z jego centrum aktywnym, podczas gdy hirudyna⁵⁵⁻⁶⁵ blokuje obszar FRE. Znajomość tego faktu umożliwiła zaprojektowanie nowego biwalentnego inhibitora trombiny, który podobnie jak hirudyna, mógł blokować zarówno jej centrum aktywne, jak i obszar FRE (rys. 2e). W tym celu, zastąpiono N-końcowy 48-peptydowy fragment hirudyny (odpowiedzialny za blokowanie centrum aktywnego trombiny) N-acetylową pochodną tetrapeptydu D-Phe-Pro-Arg-Pro (29). Otrzymany inhibitor (Ac-[D-Phe⁴⁵, Arg⁴⁷]hirudyna⁴⁵⁻⁶⁵, rys. 4b) pomimo masy cząsteczkowej trzykrotnie mniejszej od hirudyny, posiadał znaczną aktywność antytrombinową ($K_i = 5,5 \cdot 10^{-9}$ M (30)). W otrzymanym peptydzie można wyróżnić trzy regiony spełniające różne funkcje w inhibitorze:

- N-końcowy fragment: Ac-D-Phe⁴⁵-Pro⁴⁶-Arg⁴⁷-Pro⁴⁸- wiążący się z miejscem aktywnym enzymu.
- C-końcowy fragment o sekwencji: -Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln (hirudyna⁵⁵⁻⁶⁵) odpowiedzialny za wiązanie się z miejscem FRE trombiny.
- Heksapeptydowy wysięgnik -Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly- (hirudyna⁴⁹⁻⁵⁴) łączący powyższe fragmenty.

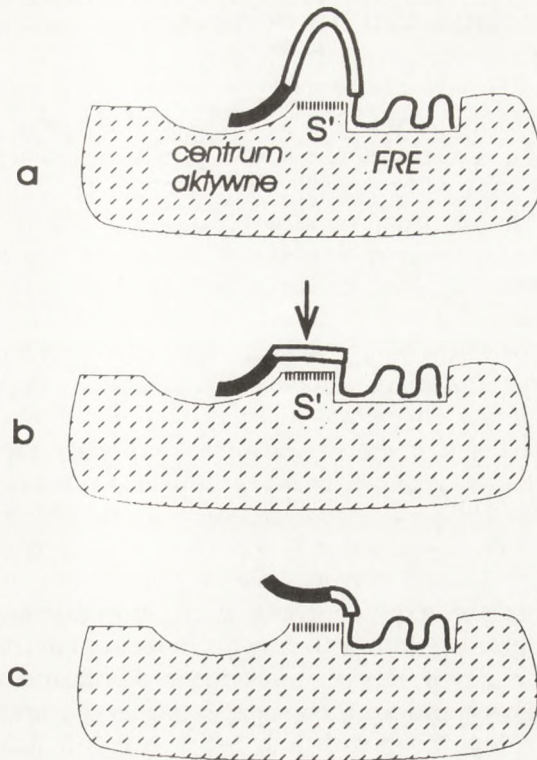
Użycie reszty Pro⁴⁸ w pozycji P' Ac-[D-Phe⁴⁵, Arg⁴⁷]hirudyny⁴⁵⁻⁶⁵ miało za zadanie obniżenie szybkości hydrolizy wiązania peptydowego znajdującego się za Arg⁴⁷ katalizowanej przez trombinę. Dalsze ograniczenie trombinolizy tego wiązania peptydowego było możliwe poprzez zastąpienie go pseudopeptydową grupą ketometylenową (-CO-CH₂-). Otrzymany inhibitor, Ac-[D-Phe⁴⁵, Arg⁴⁷](COCH₂)⁴⁷, Gly⁴⁸]hirudyna⁴⁵⁻⁶⁵ zachowywał wysoką aktywność inhibitorową, nie będąc jednocześnie hydrolizowanym w obecności trombiny (31).

Struktury krystalograficzne kompleksów α -trombiny z PPACK i z hirudyną, posłużyły w ustaleniu, metodami komputerowego modelowania molekularnego, modelu oddziaływania Ac-[D-Phe⁴⁵, Arg⁴⁷]hirudyny⁴⁵⁻⁶⁵ z trombiną (30). Cząsteczka trombiny posiada na swej powierzchni głęboką szczelinę pomiędzy centrum aktywnym a miejscem FRE. Zgodnie z modelem, heksapeptydowy wysięgnik -Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly- pozostaje na zewnątrz szczeliny i nie uczestniczy w oddziaływaniu inhibitora z trombiną. To przypuszczenie



Rys. 5. Zależność aktywności antytrombinowej bivalentnych inhibitorów typu Ac-D-Phe-Pro-Arg-Pro-**X**-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln od liczby atomów w łańcuchu głównym wysięgnika **X**.

rys. 5. Peptydy z wysięgnikami krótszymi od 11-atomowych nie wykazują aktywności w teście amidolitycznym, natomiast w teście hydrolizy fibrynogenu zachowują aktywność porównywalną z aktywnością hirudyny⁵⁵⁻⁶⁵. Może to dowodzić, że wysięgniki posiadające do 10 atomów w łańcuchu głównym są zbyt krótkie aby połączyć centrum aktywne z miejscem FRE, a inhibitory z takimi wysięgnikami mogą oddziaływać wyłącznie z obszarem FRE trombiny (rys. 6c). Wszystkie inhibitory z wysięgnikami dłuższymi od 13-atomowych są kompetycyjnymi bivalentnymi inhibitorami trombiny (35), a ich aktywność tylko nieznacznie zależy od długości i budowy chemicznej wysięgnika. Sugeruje to, że wysięgnik — będąc dłuższym niż jest to niezbędne — nie oddziałuje z obszarem S' trombiny i posiada znaczną swobodę konformacji, a jego funkcja ogranicza się do roli mostka łączącego obydwie części aktywne inhibitora (rys. 6a). Zgodnie z przewidywaniem teoretycznym, peptydy z wysięgnikami zawierającymi 12 – 13 atomów w łańcuchu głównym są bivalentnymi inhibitorami trombiny, lecz ich wysięgnik jest rozciągnięty pomiędzy centrum aktywnym a obszarem FRE trombiny (rys. 6b). Ten stan „wymusza” sporo kontaktów wysięgnika z obszarem S' trombiny. Dlatego aktywność takich inhibitorów zależy od budowy chemicznej wysięgnika. Ciekawy może być przykład różnych aktywności dwóch izomerów z trzynastoatomowymi wysięgnikami zbudowanymi z reszt kwasu 4-aminomasłowego (Abu) i kwasu 7-aminoheptanowego (Ahe): Ac-D-Phe-Pro-Arg-Pro-**Ahe-Abu**-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH ($K_i = 8,2 \cdot 10^{-10}$ M) i Ac-D-Phe-Pro-Arg-Pro-**Abu-Ahe**-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH ($K_i = 2,5 \cdot 10^{-8}$ M) (33), których budowy różnią się wyłącznie położeniem wiązania peptydowego w wysięgniku. Komputerowa symulacja dynamiki molekularnej kompleksu pierwszego ze związków z trombiną tłumaczy ten fenomen możliwością utworzenia



Rys. 6. Schemat oddziaływania trombiny z biwalentnymi inhibitorami posiadającymi wysięgniki różnej długości. A. Wysięgnik dłuższy od 13-atomowego nie tworzy oddziaływań z cząsteczką trombiny. B. Wysięgnik 12-13-atomowy jest optymalnej długości i tworzy wymuszone oddziaływanie z obszarem S' trombiny. C. Wysięgnik krótszy od 11-atomowego jest za krótki aby skierować fragment Ac-D-Phe-Pro-Arg-Pro inhibitora do centrum aktywnego trombiny.

wiązania wodorowego pomiędzy tlenem grupy karbonylowej wysięgnika a grupą NH reszty trombiny Leu⁴⁰, znajdującej się na powierzchni S' szczeliny. Wiązanie peptydowe drugiego z peptydów znajduje się w hydrofobowym otoczeniu, co znacznie zmniejsza oddziaływanie z trombiną. W oparciu o komputerowe badania dynamiki molekularnej zaprojektowano nowe inhibitory z wysięgnikami tworzącymi wiązanie wodorowe z trombinową grupą NH Leu⁴⁰ i jeszcze „lepiej pasujące” do S' szczeliny (na przykład Ac-Orn(Ac-D-Phe-Pro-Arg-Pro-Bal-Gly-)-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH (gdzie Bal oznacza β-alaninę) $K_i = 5,1 \cdot 10^{-10}$ M) (33). Wysięgniki takich inhibitorów spełniają podwójną rolę. Są nie tylko mostkiem łączącym funkcyjne obszary biwalentnego inhibitora, lecz same oddziałując z enzymem zwiększają siłę wiązania. Takie inhibitory stanowią więc przykłady nowego typu triwalentnych inhibitorów trombiny, jednocześnie wiążących się z: 1) centrum aktywnym, 2) szczeliną S' i 3) miejscem FRE trombiny.

4. Zwiększenie odporności na proteolizę C-końcowego fragmentu hirudyny

Stosunkowo mała odporność C-końcowego fragmentu hirudyny i jego aktywnych analogów na proteolizę (36,37) uniemożliwia zastosowanie ich w terapii. Z drugiej strony klasyczne metody zwiększenia stabilności tego peptydu przez zamianę konfiguracji niektórych reszt aminokwasowych prowadziły do otrzymania nieaktywnych analogów (38). Wymagało to zastosowania innej metody podwyższenia odporności, jaką jest usztywnianie jego biologicznie aktywnej konformacji.

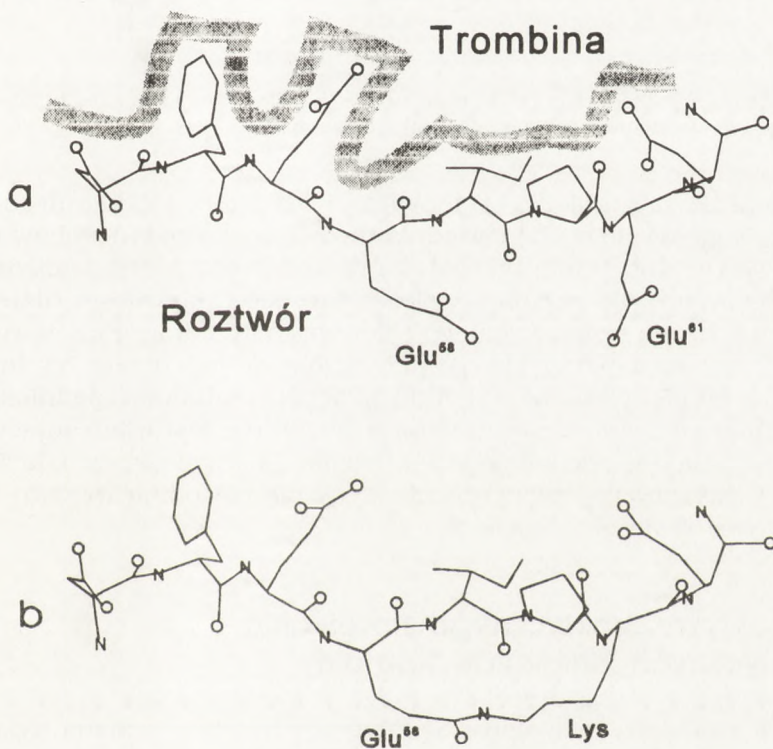
Krótkie liniowe peptydy są zazwyczaj elastyczne i przyjmują w roztworze dużą liczbę energetycznie zbliżonych konformacji. Peptydowy inhibitor, w chwili oddziaływania z enzymem, musi przyjąć określoną konformację (często różną od uprzywilejowanych w roztworze), co wiąże się z obniżeniem entropii układu. Analog takiego peptydu, w którym usztywniono (np. przez cyklizację) biologicznie aktywną strukturę posiada ograniczoną liczbę konformerów. Jego wiązanie z enzymem może być energetycznie korzystniejsze z uwagi na niewielkie zmiany entropii, a co za tym idzie powinien mieć wyższą aktywność. Takie usztywnienie peptydu, w którym przyjmuje on konformację dla jednego bioreceptora, jakim jest enzym, może uniemożliwić przyjmowanie innych konformacji, a tym samym powodować konformacyjną „niekompatybilność” z innymi bioreceptorami, co może ograniczyć uboczne działania peptydu. Podczas proteolitycznego rozkładu peptydowe substraty (a przynajmniej ich fragmenty w najbliższym otoczeniu hydrolizowanego wiązania peptydowego) łącząc się z centrum aktywnym enzymu przyjmują ściśle określone konformacje. Jeżeli zatem konformacje te nie będą do przyjęcia przez usztywnione analogi peptydów, to należy oczekiwać, że będą one stabilne na biodegradację. Znane są przykłady cyklizacji peptydów prowadzących do otrzymania analogów aktywniejszych (39,40), bardziej swoistych w działaniu (41,42), odpornych na biodegradację (43) i o przedłużonym czasie działania *in vivo* (44), w stosunku do ich liniowych pierwowzorów.

Warunkiem koniecznym do aktywności usztywnionego analogu peptydu jest możliwość przyjęcia aktywnej konformacji liniowego pierwowzoru. Dlatego znajomość struktury krystalicznej kompleksu hirudyny z trombiną ułatwiła racjonalne zaprojektowanie odpowiedniego usztywnienia. Wykorzystano informację, że łańcuchy boczne reszt Glu⁵⁸ i Glu⁶¹ hirudyny znajdują się blisko siebie i skierowane są na zewnątrz kompleksu enzymu z inhibitorem (w stronę rozpuszczalnika) (rys. 7a). Sugerowało to, że połączenie tych łańcuchów poprzez odpowiednie wiązanie chemiczne pozwoli zachować biologicznie aktywną konformację (rys. 7b), a także, że utworzony mostek nie powinien kolidować z częścią enzymu, gdyż w chwili oddziaływania będzie się znajdował po stronie rozpuszczalnika.

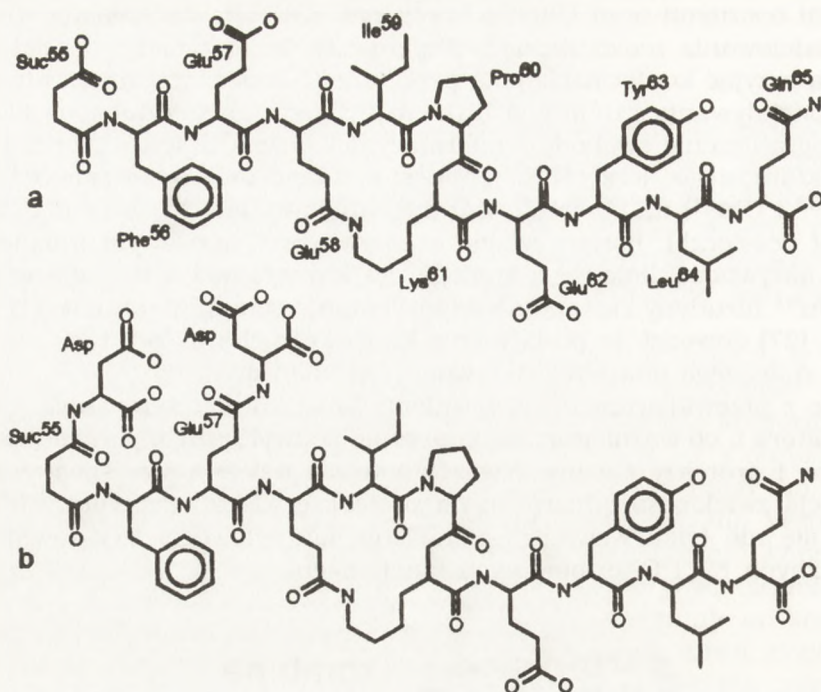
W celu ułatwienia chemicznej syntezy cyklicznego peptydu, podstawiono resztę Glu⁶¹C-końcowego fragmentu hirudyny lizyną, po czym w wyniku wewnątrzcząsteczkowego sprzęgania wytworzono wiązanie amidowe pomiędzy

łańcuchami bocznymi reszt Glu⁵⁸ i Lys⁶¹ (rys. 8a) (27). Badanie spektroskopowe i modelowania molekularnego sugerowały, że otrzymany peptyd może z łatwością przyjąć konformację jaką przyjmuje C-końcowy segment hirudyny podczas oddziaływania z trombiną. Taka modyfikacja chemiczna spowodowała nie tylko ograniczenie swobody konformacyjnej wewnątrz wytworzonego pierścienia laktamowego, lecz także, poprzez zamianę dwóch kwasowych grup (reszt Glu⁵⁸ i Glu⁶¹) na obojętne wiązanie amidowe, istotnie zmieniła chemiczny profil cząsteczki. Porównywalna z natywnym C-końcowym fragmentem hirudyny aktywność liniowego analogu, w którym łańcuchy boczne reszt Glu⁵⁸ i Glu⁶¹ hirudyny zastąpiono odpowiednio resztami glutaminy i N^ε-acetylo-lizyny (27) dowodzi, że pozbawienie kwasowego charakteru tych reszt nie powoduje znacznego obniżenia aktywności inhibitorowej.

Zgodnie z przewidywaniem usztywnienie kilkakrotnie podwyższyło aktywność inhibitora i, co ważniejsze, dramatycznie podwyższyło odporność na chymotrypsynę i proteazy plazmy krwi. Odnotować należy także spostrzeżenie, że cyklizacja zwiększyła odporność na proteolizę wiązań peptydowych znajdujących się nie tylko wewnątrz pierścienia laktamowego, lecz również na egzocyklicznych N- i C-terminalnych łańcuchach.



Rys. 7. Porównanie biologicznie aktywnej konformacji fragmentu hirudyny⁵⁵⁻⁶² (a) z niskoenergetycznym konformerem cyklicznego analogu tego fragmentu (b).



Rys. 8. Struktury chemiczne cyklicznych analogów C-końcowego fragmentu hirudyny. Suc — reszta kwasu bursztynowego (deaminoasparaginowego).

Modelowanie molekularne kompleksu otrzymanego cyklicznego peptydu z trombiną sugerowało, że odpowiednia modyfikacja jego łańcuchów bocznych może wytworzyć dodatkowe oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy inhibitorem i obszarem FRE trombiny, polepszające jego aktywność. Dlatego ostatnio przeprowadzono syntezę analogu cyklicznego inhibitora FRE zawierającego dwie reszty kwasu asparaginowego przyłączone do łańcuchów bocznych reszt w pozycjach 55 i 57 (rys. 8b) (45). Modyfikacja ta dodatkowo podniosła aktywność i stabilność cyklicznego inhibitora. Wynik ten jest interesujący z uwagi na fakt, że podobne modyfikacje łańcuchów bocznych reszt Glu⁵⁵ i Glu⁵⁷ liniowego C-końcowego fragmentu hirudyny nie powodują wzrostu aktywności, lecz wyraźnie ją obniżają (45).

5. Perspektywy praktycznego stosowania syntetycznych inhibitorów trombiny

Obecnie uważa się, że syntetyczne inhibitory trombiny zostaną wykorzystane jako środki do stabilizowania preparatów krwi (46), a przede wszystkim mogą znaleźć zastosowanie jako środki „uzupełniające” w terapii trombolitycznej (47), gdyż są one pozbawione podstawowych wad stosowanej obecnie heparyny:

- mogą oddziaływać z trombiną uwięzioną wewnątrz zakrzepu,
- nie są neutralizowane przez endogenne czynniki,
- nie wywołują aktywacji płytek krwi,
- ich działanie jest natychmiastowe, gdyż nie zależy od obecności plazmatycznych kofaktorów,
- nie powodują zmniejszenia ilości wolnej antytrombiny III,
- jako niskocząsteczkowe substancje nie mają właściwości antygenowych.

Jednym z głównych motywów poszukiwania nowych syntetycznych inhibitorów trombiny jest otrzymanie zwiększonej aktywności antytrombinowej. Niezmiernie ważną kwestią jest również wysoka specyficzność inhibitorów. Dlatego fakt, że krótkie inhibitory trombiny łączące się wyłącznie z centrum aktywnym (np. PPACK) są jednocześnie inhibitorami enzymów fibrynolitycznych (48) dyskwalifikuje je jako potencjalne leki. Można oczekiwać, że inhibitory oddziałujące nie tylko z centrum aktywnym trombiny, ale i z jej pobocznymi centrami (np. FRE), nie występującymi w innych serynowych proteazach będą wykazywały dalej posuniętą swoistość niż inhibitory jednofunkcyjne.

Prawdopodobnie projektowanie nowych inhibitorów trombiny będzie prowadzone w trzech równoległych kierunkach: 1) poszukiwanie nowych inhibitorów trombiny pochodzących ze źródeł naturalnych, 2) chemiczne modyfikacje znanych inhibitorów mające na celu zwiększenie ich aktywności i stabilności (to ostatnie może umożliwić doustne ich podawanie) oraz pozabawienie skutków ubocznych przez zwiększenie swoistości działania, 3) projektowanie i synteza substancji oddziałujących z nowymi obszarami wiążącymi trombiny (na przykład oddalony od centrum aktywnego i od FRE obszar wiążący heparynę (49)) oraz projektowanie wysięgników do łączenia tych substancji z inhibitorem macierzystym. Niewątpliwie określenie struktury przestrzennej trombiny z różnymi inhibitorami było kamieniem milowym na drodze racjonalnego poszukiwania lepszych inhibitorów trombiny. Oczekiwać należy, że w niedługim czasie otrzymane zostaną nowe inhibitory trombiny możliwe do zastosowania w terapii.

Literatura

1. Stubbs M.T., Bode W., (1993), *Thromb. Res.* 69, 1 – 58.
2. Chesebro J.H., Knatterud G., Roberts R., Borer J., Cohen L.S., Dalen J., Dodge H.T., Francis C.K., Hillis D., Ludbrook P., Markis J.E., Mueller H., Passamani E.R., Powers E.R., Rao A.K., Robertson T., Ross A., Ryan T.J., Sobel B.E., Willerson J., Williams D.O., Zaret B.L., Braunwald E., (1987), *Circulation*, 76, 142 – 154.
3. Verstraete M., Bernard R., Bory M., Brower R.W., Collen D., De Bono D.P., Erbel R., Huhmann W., Lennane R.J., Lubsen J., Mathey D., Meyer J., Michels H.R., Rutsch W., (1985), *Lancet*, 1, 842 – 847.
4. While H.D., Rivers J.T., Masłowski A.H., Ormiston J.A., Takayama M., Hart H.H., Sharpe D.N., Whitloch R.M.L., (1989), *New Engl. J. Med.*, 320, 817 – 821.
5. Wilcox R.G., von der Lippe G., Olsson C.G., Jensen G., Skene A.M., Hampton J.R., (1988), *Lancet* 2, 525 – 530.
6. Marder V.J., Sherry S., (1988), *New Engl. J. Med.*, 318, 1512 – 1520.

7. Topol E.J., (1989), *Semin. Hematol.* 26, 25 - 31.
8. Verstraete M., (1992), *Circulation* 82, Suppl. II, 96 - 109.
9. Munkvad S., Gram J., Jespersen J., (1991), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 51, 581 - 590.
10. Agnelli G., Pascucci C., Cosmi B., Nenci G.G., (1991), *Thromb. Haemostasis*, 66, 592 - 597.
11. Hogg P.J., Jackson C.M., (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 3619 - 3623.
12. Weitz J.I., Hudoba M., Massel D., Maraganore J., Hirsh J., (1990), *J. Clin. Invest.*, 86, 385 - 391.
13. Rosenberg R.D., (1987), in: *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*, Eds. Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J., Salzman E.W., 1373 - 1392, Lippincot 2nd ed., Philadelphia.
14. Weitz J.I., Hirsh J., (1992), *Ann. Rev. Med.*, 43, 9 - 16.
15. Bone R.C., (1992), *Arch. Intern. Med.*, 152, 1381 - 1389.
16. Tulinsky A., Qiu X.Y., (1993) *Blood Coagulation & Fibrinolysis* 4, 305 - 312.
17. Hopfner K.P., Ayala Y., Szewczuk Z., Konishi Y., Di Cera E., (1993), *Biochemistry*, 32, 2947 - 2953.
18. Stürzebecher J., (1984), *The Thrombin*, Ed. Machovich R., 131 - 160, CRC Press, Boca Raton, FL.
19. Bode W., Mayr U., Ulrich B., Huber R., Stone S.R., Hofsteenge J., (1989), *EMBO J.* 8, 3467 - 3475.
20. Schechter I., Berger A., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27, 157 - 162.
21. Stone S.R., Hofsteenge J., (1986), *Biochemistry*, 25, 4622 - 4628.
22. Numerowanie reszt aminokwasowych opisywanych inhibitorów trombiny odpowiada ich sekwencji w hirudynie.
23. Folkers P.J.M., Clore G.M., Driscoll P.C., Dodt J., Koehler S., Gronenborn A.M., (1989), *Biochemistry*, 28, 2601 - 2617.
24. Haruyama H., Wüthrich, (1989), *Biochemistry*, 28, 4301 - 4312.
25. Rydel T.J., Tulinsky A., Bode W., Huber R., (1991), *J. Mol. Biol.*, 221, 583 - 601.
26. Skrzypczak-Jankun E., Caperos V.E., Ravichandran K.G., Tulinsky A, Westbrook M., Maraganore J.M., (1991), *J. Mol. Biol.*, 221, 1379 - 1393.
27. Szewczuk Z., Gibbs B.F., Yue S.Y., Purisima E.O., Konishi Y., (1992), *Biochemistry*, 31, 9132 - 9140.
28. Schmitz T., Rothe M., Dodt J., (1991), *Eur. J. Biochem.*, 195, 251 - 256.
29. Di Maio J., Gibbs B., Munn D., Lefebvre J., Ni F., Konishi Y., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 21698 - 21703.
30. Yue S.Y., Di Maio, J. Szewczuk Z., Purisima E.O., Ni F., Konishi Y., (1992), *Protein Eng.*, 5, 77 - 85.
31. Di Maio J., Ni F., Gibbs B., Konishi Y., (1991), *FEBS Lett.*, 282, 47 - 52.
32. Maraganore J.M., Bourdon P., Jablonski J., Ramachandran K.L., Fenton II J.W., (1990), *Biochemistry*, 29, 7095 - 7101.
33. Szewczuk Z., Gibbs B.F., Yue S.Y., Purisima E., Zdanov A., Cygler M., Konishi Y., (1993), *Biochemistry*, 32, 3396 - 3404.
34. Szewczuk Z., Yue S.Y., Konishi Y., (1992), *Peptides, Chemistry and Biology*, Proc. 12 Am. Peptide Symp., Eds. Smith J.A., River J.E., Escom, Leiden, 806 - 807.
35. Hopfner K.P., Ayala Y., Szewczuk Z., Konishi Y., Di Cera E., (1993), *Biochemistry*, 32, 2947 - 2953.
36. Chang J.Y., (1990), *J. Biol. Chem.*, 265, 22159 - 22166.
37. Knadler M.P., Ackermann B.L., Coutant J.E., Hurst G.H., (1992), *Drug. Metab. Dispos.* 20, 89 - 95.
38. Krstenansky J.L., Broersma R.J., Owen T.J., Payne M.H., Yates M.T., Mao S.J.T., (1990), *Thromb. Hemostasis*, 63, 208 - 214.
39. Rizo J., Gierasch L.M., (1992), *Ann. Rev. Biochem.*, 61, 387 - 418.
40. Szewczuk Z., Kubik A., Siemion I.Z., Wieczorek Z., Spiegel K., Zimecki M., Janusz M., Lisowski J., (1988), *Int. J. Peptide Protein Res.*, 32, 98 - 103.

41. Szewczuk Z., Rebholz K.L., Rich D.H., (1992), *Int. J. Pept. Protein Res.*, 40, 233 – 242.
42. Szewczuk Z., Rebholz K.L., Rich D.H., (1993), *Peptides 1992*, Proc. 22nd Europ. Peptide Symp., Eds. Schneider C.H., Eberle A.N., Escom, Leiden, 593 – 594.
43. Sham H.L., Bolis G., Stein H.H., Fesik S.W., Marcotte P.A., Plattner J.J., Rempel C.A., Greer J., (1988), *J. Med. Chem.*, 31, 284 – 295.
44. Siemion I.Z., Szewczuk Z., Herman Z.S., Stachura Z., (1981), *Molec. Cell. Biochem.*, 34, 23 – 29.
45. Szewczuk Z., Gibbs B.F., Yue S.Y., Konishi Y., (1993), *Peptides 1992*, Proc. 22nd Europ. Peptide Symp., Eds. Schneider C.H., Eberle A.N., Escom, Leiden, 555 – 556.
46. Bode A.P., Miller D.T., (1989), *J. Lab. Clin. Med.*, 113, 753 – 756.
47. Hauptmann J., Markwardt F., (1992), *Semin. Thromb. Hemost.*, 18, 200 – 217.
48. Gilboa N., Villaneuva G.B., Fenton II J.W., (1988), *Enzyme*, 40, 144 – 148.
49. Fenton II J.W., Ofosu F.A., Moon D.G., Maraganore J.M., (1991), *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 2, 69 – 75.

Design of new thrombin inhibitors

Summary

Thrombin inhibitors are anticoagulants that inhibit clot formation. The most potent, known thrombin inhibitor is hirudin, a 65 amino acid protein isolated from the salivary glands of the medicinal leech. An X-ray three — dimensional structure of the complex of hirudin with human α -thrombin has been recently reported. This review article describes the design based on the crystal structure, of new synthetic hirudin analogs with reduced sequence and enhanced proteolytic stability.

Key words:

bivalent inhibitors, biologically active conformation, cyclic peptides, hirudin, thrombin.

Adres dla korespondencji:

Zbigniew Szewczuk, Instytut Chemii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Joliot-Curie 14, 50 – 383 Wrocław.