



УДК 577.157.2

А. А. Гершкович

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГИРУДИНА С ТРОМБИНОМ

Рассмотрены биохимические, химические и физические подходы к изучению строения гирудина и механизма ингибирования им тромбина. Результаты этих исследований открывают путь для создания синтетических ингибиторов тромбина нового типа.

Введение. Тромбин (Е. С. 3. 4. 13) — ключевой фермент системы свертывания крови на протяжении многих лет является объектом интенсивных научных исследований [1]. В сферу изучения гемостаза попадают не только тромбин и другие регуляторные ферменты, но также их природные и искусственные регуляторы — активаторы и ингибиторы. Среди природных ингибиторов тромбина лучшим является гирудин — небольшой белок, производимый слюнными железами медицинской пиявки, *Hirudo medicinalis*.

Гирудин хорошо связывается с тромбином ($K_d \sim 10^{-12}$ моль/л), предотвращая таким образом расщепление фибриногена и образование сгустка. Естественно, ученые возлагают большие надежды на использование этого отличного антикоагулянта в медицинской практике.

Более 100 лет тому назад, в 1884 году, Д. Хэйграфт, работавший в Страсбурге, обнаружил, что медицинские пиявки содержат вещество, обладающее антикоагулянтной активностью [2]. В последующие годы врачи использовали водные вытяжки из пиявок и только в 1904 году Якоби [3] выделил неочищенный гирудин и дал ему название, а очистил и охарактеризовал его в 1937 г. известный немецкий ученый Марквардт [4]. Основным препятствием для использования гирудина в клинике была сложность получения его в больших количествах, поэтому можно утверждать, что отдаленной целью всех описанных ниже исследований было получение искусственным путем гирудина или его аналогов и активных фрагментов. Эти работы имели также важное значение при изучении природы взаимодействия тромбина с другими высокомолекулярными субстратами (и ингибиторами): фибриногеном, анти-тромбином, гепарином, тромбомодулином и др. [1]. Кроме того, они вносят весомый вклад в общую проблему белок-белкового узнавания, являющуюся одной из самых важных в современной биоорганической химии и молекулярной биологии.

Ввиду того, что гирудин образует с тромбином высокоспецифический комплекс, назначение отдельных деталей его строения может быть понято только при изучении взаимодействия этих биополимеров. Поэтому целесообразно начать наш обзор с краткого изложения структурно-функциональных особенностей тромбина.

Протеолитическая специфичность тромбина. В настоящее время тромбин хорошо изучен и описан в ряде монографий и обзоров [1, 5—7]. Он является трипсиноподобной протеазой, но обладает более слабыми ферментативными свойствами, чем трипсин, при расщеплении пептидных связей, образованных остатками аргинина или лизина. На-

© А. А. ГЕРШКОВИЧ, 1992

пример, тромбин расщепляет в своем главном физиологическом субстрате фибриногене только 4 из 376 чувствительных к действию трипсина связей (причем это четыре связи аргинин — глицин), что приводит к отщеплению двух пар N-концевых пептидов — фибринопептидов А и В от А α - и В β -цепей фибриногена, к образованию фибрина и его дальнейшей полимеризации. Многолетние исследования позволили выяснить некоторые особенности строения тромбина, обуславливающие его высокую специфичность: «карман» первичного связывания хуже подогнан к специфическим субстратам, чем у трипсина [6], рядом с активным центром расположен вторичный аполярный связывающий участок, который вносит значительный вклад в катализ; кроме этих сайтов,

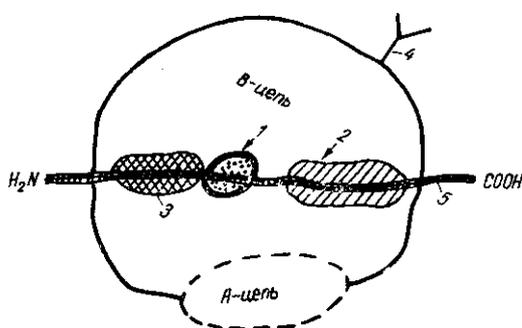


Рис. 1. Схематическое изображение связывающих участков тромбина: 1 — каталитический центр; 2 — анион-связывающий участок; 3 — аполярный связывающий участок; 4 — углеводная цепь; 5 — пептидный субстрат [8]

имеется еще отдаленный участок связывания белковых субстратов или «анион-связывающий участок» [7, 8] (рис. 1). Из-за перечисленных особенностей строения тромбин в общем плохо расщепляет связи, соответствующие только его первичной специфичности (определяемой остатками аргинина или лизина); лучше, если субстраты имеют слева от расщепляемой связи (в положении P₃ по классификации Шехтера и Бергера [9]) гидрофобную аминокислоту, которая взаимодействует с аполярным связывающим центром (вторичная специфичность); и особенно эффективно — субстраты, взаимодействующие по всем трем указанным сайтам. Этому требованию отвечает фибриноген. Рентгеноструктурный анализ тромбина человека [10, 11] в целом подтвердил наличие трех вышеуказанных связывающих участков в молекуле и позволил точно локализовать их в трехмерной структуре тромбина.

Особый интерес представляет удаленный от активного центра «анион-связывающий участок», отсутствующий в аутолитических производных тромбина — его β - и γ -формах, что связывают с выщеплением в них основного пептида — фрагмента В-цепи 63—74 [1, 6, 7]. Показательно, что β - и γ -тромбины расщепляют эфирные и амидные субстраты с такой же эффективностью, как и нативный α -тромбин, однако при расщеплении ими фибриногена она уменьшается до величины (k_{cat}/K_M), приблизительно в 2500 раз меньшей, чем в случае расщепления α -тромбином [12]. Поэтому указанные формы тромбина практически не обладают свертывающей активностью. По-видимому, тот факт, что взаимодействие тромбина с гирудином изучалось почти во всех лабораториях, исследующих тромбин, связан с повышенным интересом ученых именно к строению и локализации «анион-связывающего участка» в тромбине.

Структурные особенности гирудина. Гирудин, 65-членный белок из *H. medicinalis*, впервые был очищен и охарактеризован Марквардтом [4], а его аминокислотная последовательность установлена Додтом с соавт. [13] и уточнена Мао с соавт. [14] (рис. 2). Молекулярная масса гирудина составляет 7000 и несколько колеблется у разных исследователей из-за существования трех типов гомологичных гирудинов: наиболее изученного HV1 [13], а также двух других форм — HV2 [15] и HV3 [16], гомология которых по первичной структуре составляет 85—90 %, причем все они содержат в C-концевой части молекулы сульфированный тирозин. Ввиду того, что большинство исследователей работало с гирудином HV1, мы будем называть «гирудином» именно эту

форму, в случае необходимости уточняя, с какой формой проводили исследования.

Гирудин является одноцепочечным белком, содержащим шесть остатков цистеина, соединенных тремя дисульфидными мостиками. По данным работы [14], в положении 33 полипептидной цепи скорее содержится остаток аспарагина, чем аспарагиновой кислоты. При рассмотрении первичной структуры гирудина обращают на себя внимание следующие ее особенности: на небольшом отрезке из 9 аминокислот (участок 55—64) содержатся 6 отрицательно заряженных остатков,

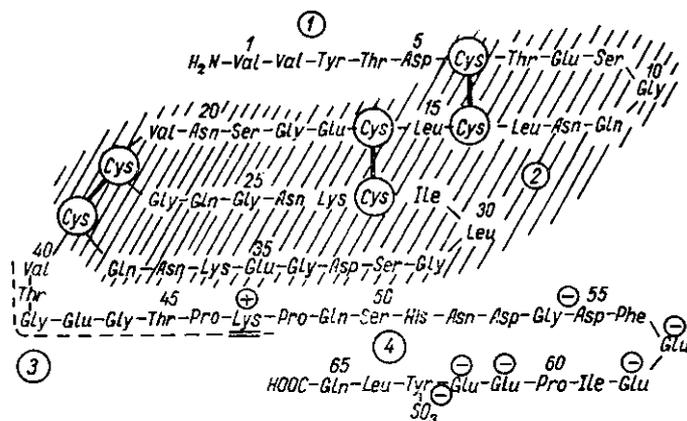


Рис. 2. Аминокислотная последовательность гирудина: 1 — N-концевой фрагмент; 2 — центральный кор; 3 — последовательность, гомологичная расщепляемому участку в протромбине; 4 — С-концевой участок

включая сульфированный Тир-63; участок цепи 6—39 представляет собой компактный кор, сшитый дисульфидными мостиками, в то время как С-концевой участок (40—65) и N-концевая часть молекулы (1—5) являются подвижными относительно кора. Ченг [14] обратил внимание на обратную гомологию участка 46—65 с фибринопептидами А и В, а Дергиз с соавт. [18] отметили гомологичность центрального участка гирудина 40—47 расщепляемому тромбином сайту в протромбине. Таким образом, простой анализ аминокислотной последовательности позволил предположить наличие в гирудине по крайней мере двух участков связывания с тромбином: отрицательно заряженного С-концевого сегмента 55—65 и участка 40—50 (при этом допускалось, что остаток Lys-47 связывается в «кармане» активного центра тромбина [18]).

Анализ С-концевого участка по методу Чоу и Фасмана [3] показал возможность образования им α -спиральной конформации. Изображение этого сегмента в виде «колеса Эдмундсона» [3] допускает вероятность формы амфифильной искаженной спирали, в которой все гидрофобные остатки расположены по одну сторону спирали, а гидрофильные — по другую (рис. 3). Авторы этой работы предположили, что такая амфифильная спиральная структура С-концевого сегмента может быть вполне пригодной для взаимодействия с аннон-связывающим центром тромбина.

Более существенные данные о пространственной структуре гирудина получены при его изучении методом ЯМР в водном растворе. Было показано, что молекула состоит из трех доменов: центрального кора, состоящего из остатков 3—30, 37—46 и 56—57; выступающего «штифта» из остатков 31—36, образующих антипараллельную β -структуру, и экспонированной наружу петли, формируемой остатками сегмента 47—55 [19]. Структура каждого домена относительно хорошо разрешена, однако ориентация двух минорных доменов относительно центрального кора не определена, так как в двухмерном ЯМР-спектре дальнедействующие протонные взаимодействия не наблюдались. Цент-

ральный кор стабилизируется тремя дисульфидными мостиками, имеются две β -структуры (15—22 и 35—42) и участки нерегулярного клубка 1—5, 13—14 и 42—65 [20]. Так как расчеты методами молекулярной динамики показали возможность свободного перемещения двух минорных доменов относительно кора, авторы работы [19] предположили, что это может иметь функциональное значение: минорные N- и C-концевые домены способны действовать как «щупальцы» при связывании гирудина с тромбином.

Изучение структуры гирудина методом ЯМР позволило позднее получить дополнительные данные [21]. При изучении природного гирудина и его рекомбинантного аналога, в котором Lys-47 заменяли на

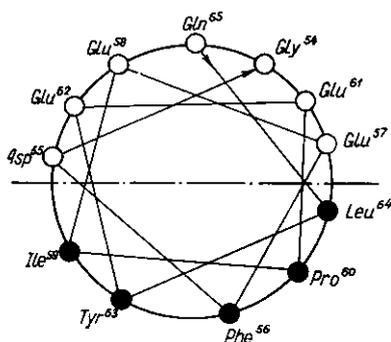


Рис. 3. Диаграмма фрагмента гирудина 54—65 в виде «колеса Эдмундсона», показывающая распределение аминокислот в α -спиральной конформации [3]

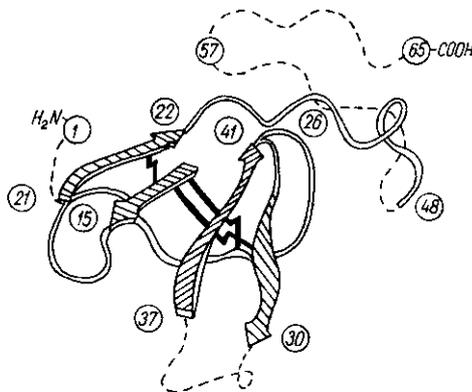


Рис. 4. Пространственная структура гирудина в водном растворе по данным ЯМР. Стрелками указаны β -складки; в виде ленты показаны области петель, образуемых полипептидной цепью; пунктирной линией — сегменты, плохо разрешаемые ЯМР, и зигзагообразными линиями — дисульфидные связи [22]

Glu (r-Hir-Glu-47), была хорошо разрешена структура фрагментов 2—30 и 37—48 и показано, что произведенная замена остатка Lys-47 вызывает различимый, но очень слабый эффект на пространственную структуру молекулы.

Изучение структуры рекомбинантного десульфированного гирудина методом ЯМР в растворе было предпринято также Харуяма с соавт. [22]. Полученная ими картина очень похожа на описанную нами выше: остатки 3—30 и 37—48 образуют плотный кор с двумя антипараллельными β -складками и несколькими хорошо определяемыми поворотами. Хорошо идентифицированы также три дисульфидные связи — 6—14, 16—28 и 22—39. Однако метод не позволяет найти предпочтительную конформацию фрагмента 49—65 и петли, образуемой сегментом 31—36. Пространственная структура гирудина, полученная на основании этих исследований, изображена на рис. 4.

Исходя из сведений о первичной и вторичной структурах гирудина (особенности первичной структуры, наличие β -складок, организация компактного центрального кора молекулы и двух подвижных минорных N- и C-концевых доменов) авторы цитируемых работ могли выдвигать довольно правдоподобные гипотезы о механизмах взаимодействия гирудина с тромбином, однако достоверными можно считать данные, полученные только в результате изучения взаимодействия этих молекул. В следующих разделах будет показано, как решалась эта задача с помощью комплекса современных методов исследования — биохимических, химических и физических. Результаты таких исследований в настоящем обзоре изложены не в хронологическом порядке, а условно разнесены по разделам, так как такой подход, по мнению автора, хорошо иллюстрирует возможности каждого метода для решения задач белок-белкового узнавания. Однако следует отметить, что работы с

использованием разных подходов велись параллельно, дополняя и уточняя друг друга.

Биохимические методы. В данном разделе изложены результаты изучения взаимодействия гирудин — тромбин как традиционными биохимическими методами (различные модификации фермента или ингибитора и т. п.), так и современными методами получения «мутантных» белков посредством сайт-специфического мутагенеза.

Прежде всего рассмотрим исследование влияния различных модифицирующих агентов на способность гирудина сохранять связывающую активность по отношению к тромбину [23]. В этом случае использовали надмуравьиную кислоту, натрийборгидрид, diazometan, уксусный ангидрид, 2, 4-динитрофторбензол, циановокислый калий и некоторые другие агенты. На основании проведенных экспериментов был сделан вывод о том, что для эффективного ингибирования тромбина в

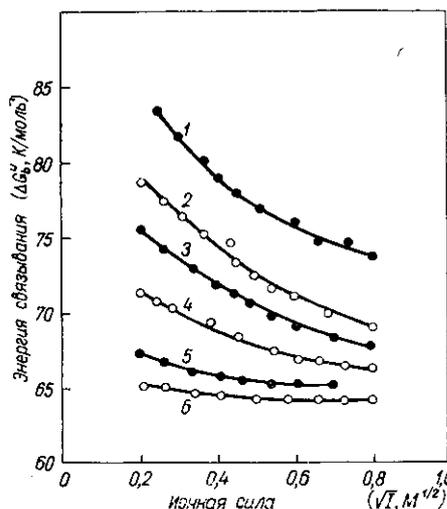


Рис. 5. Влияние ионной силы на энергию связывания комплекса гирудин — тромбин: 1 — природный гирудин; 2 — рекомбинантный гирудин; 3 — глутамин⁶²-гирудин; 4 — глутамин^{57, 58}-гирудин; 5 — глутамин^{57, 58, 62}-гирудин; 6 — глутамин^{57, 58, 61, 62}-гирудин [24]

гирудине важна сохранность дисульфидных связей, а также наличие карбоксильных и, в меньшей степени, аминогрупп, что позволяет предположить важность компактной структуры центрального кора и существенный вклад в связывание электростатических сил. Кроме того, было показано, что остаток гистидина, по-видимому, более значителен, чем остаток тирозина и С-концевая аминокислота. Отмечено также, что действие на гирудин денатурирующих агентов (50—100 % этанола, 100 % муравьиной кислоты, 8 М мочевины и щелочи (pH 12)) не влияет на его способность связываться с тромбином [29].

На основании этих данных можно сделать вывод об устойчивости молекулы гирудина, которая обусловлена компактностью центрального кора, и решающей роли этой структуры в физиологически важной конформации молекулы.

Для изучения влияния ионной силы на кинетику взаимодействия гирудина с тромбином Стоун с соавт. [24] исследовали взаимодействие различных рекомбинантных гирудинов (r-Hir), которые отличались количеством отрицательно заряженных остатков в С-концевой части молекулы и содержали несulfированный тирозин. В частности, сравнивали связывание нативного гирудина (Hir), рекомбинантного гирудина и четырех его аналогов, в которых остатки глутаминовой кислоты заменяли на глутамин: r-Hir-Gln⁽⁶²⁾; r-Hir-Gln⁽⁵⁷⁾, Gln⁽⁵⁸⁾; r-Hir-Gln⁽⁵⁷⁾, Gln⁽⁵⁸⁾, Gln⁽⁶²⁾; r-Hir-Gln⁽⁵⁷⁾, Gln⁽⁵⁸⁾, Gln⁽⁶¹⁾, Gln⁽⁶²⁾. Вклад неионных взаимодействий был одинаковым для всех типов исследуемых соединений, в то время как ионный вклад варьировал с изменением заряда молекулы (рис. 5): каждый остаток глутаминовой кислоты давал приблизительно равный вклад — 4 кДж/моль. Для нативного гирудина ионные взаимодействия составляют 32 % от общей связывающей энергии (при ионной силе, равной нулю).

В работе [25] сделана попытка разделить вклады во взаимодействие с гирудином в районе активного центра тромбина и его анион-связывающего участка. Для этого определяли константу диссоциации гирудин-тромбинового комплекса, варьируя концентрации гирудина при

постоянных концентрациях тромбина и трипептидного хромогенного субстрата. Зависимость константы диссоциации комплекса от концентрации субстрата предполагает наличие у тромбина высокоаффинного связывающего участка для субстрата, который можно идентифицировать с активным центром фермента. Константа диссоциации заметно зависит от ионной силы (что подтверждает важность ионных взаимодействий) и скорость диссоциации комплекса не зависит от связывания субстрата в активном центре фермента (т. е., по-видимому, гирудин не взаимодействует с активным центром тромбина).

Додт с соавт. [26] изучали кинетику образования гирудин-тромбинового комплекса, используя различные рекомбинантные гирудины со следующими заменами в аминокислотной последовательности: Ile-27, Glu-27, Ile-36, Glu-36, Ile-47, Glu-47, Leu-51 и Asp-51. Сравнительно с незамещенным рекомбинантным гирудином отмечалось значительное увеличение константы ингибирования при замене Lys-47 на глутаминовую кислоту и слабое ее изменение при замене других основных аминокислот. Авторы работы [26] предположили, что чувствительность Lys-47 к модификации указывает на влияние этого остатка на стабильность комплекса, определяя возможность его связывания со специфическим «карманом» активного центра тромбина. Предполагается также, что большая скорость образования комплекса и ее зависимость от ионной силы свидетельствуют в пользу того, что процесс этот является реакцией, контролируемой диффузией, и включает ионные взаимодействия. Возможно, удаленный участок связывания с тромбином формируется протяженной поверхностью гидрофильных и заряженных остатков центрального кора с С-концевым сегментом.

В одной из первых работ в этом направлении Ченг [17] показал, что удаление С-концевых аминокислот у нативного гирудина ферментативными или химическими способами ведет к полной потере ингибиторной активности, на основании чего делается вывод о большом значении С-концевого сегмента. В этой работе предполагается наличие в «реактивном» центре гирудина остатка Lys-47, что свидетельствует о первоочередной важности доменной структуры гирудина для взаимодействия с тромбином.

Дегриз с соавт. [18] изучали влияние замен в гирудине HV2 остатков, гомологичных гирудину HV1, — в положении 47 в нем находится Asp, а в положении 35 — Lys. Были получены рекомбинантные аналоги HV2 со следующими заменами: Lys-47, Arg-47, Lys-47 и Thr-35. Ввиду того, что остатки в положениях 35 и 47 находятся в сегменте 40—47, гомологичном расщепляемому тромбином участку протромбина, предполагалось большое значение этого сегмента для связывания. Кинетические исследования показали, что константы диссоциации комплекса при замене Asp-47 на Lys или Arg уменьшаются в 5—14 раз по сравнению с немодифицированным HV2, в то время как замена Lys-35 влияния не оказывает. Авторы считают, что эти данные подтверждают предполагаемую важность отмеченного ими протромбиноподобного домена 40—47 для связывания с тромбином.

В работе [27] изучено взаимодействие рекомбинантных гирудинов, в которых каждый из трех остатков лизина и гистидина заменяли нейтральным остатком глутамина. Замена Lys-47 внесла незначительное изменение в величину константы диссоциации комплекса (увеличение в 9 раз), в то время как другие «мутации» были неэффективными. Это указывает на то, что для гирудина в отличие от большинства других ингибиторов сериновых протеаз взаимодействие со специфическим «карманом» в активном центре фермента не имеет решающего значения при ингибировании.

Мы рассмотрели модификации гирудина, главным образом, в его центральном и С-концевом участках, однако значительный интерес представляют также исследования Уоллеса с соавт. [28] по влиянию модификаций в N-концевой части гирудина на его ингибирующую активность. Для этого использовали сайт-специфический мутагенез и хи-

мические модификации. В рекомбинантных аналогах гирудина временно заменяли Lys-27 на Gln, Lys-36 на Gln и Lys-47 на Arg и сравнивали сродство такого модифицированного по трем остаткам гирудина к тромбину со сродством его химических модификаций по концевой аминогруппе (уксусным ангидридом, ацетилимидатом и глицином). Ацетилирование аминогруппы, как и добавление остатка глицина, значительно повышало константу ингибирования (соответственно в 6,1 и 2,7 тысячи раз), в то время как ацетимидирование концевой аминогруппы (при этом сохранялся положительный заряд) увеличивало ее всего в 17 раз. При модификации незамещенного рекомбинантного гирудина остатками метионина или глицина K_i возрастала соответственно в $2,4 \cdot 10^4$ и $2 \cdot 10^3$ раз. Особый интерес представляют данные по влиянию на K_i замены гидрофобных остатков валина в положениях 1 и 2 полипептидной цепи (табл. 1). Замещение концевых остатков валина на гидрофильные аминокислоты значительно увеличивает константу ингибирования, тогда как замещение их гидрофобными остатками влияет незначительно. На основании этих данных делается вывод о важности положительного заряда на N-конце молекулы дополнительно к его гидрофобности. Кроме того, в этой работе показано, что уменьшение гидрофобности N-концевой части молекулы гирудина снижает на 30 % неионную составляющую связывающей энергии и практически не влияет на ионную. Анализируя высокий вклад концевого гидрофобного дипептида в энергию связывания с тромбином, авторы [28] делают очень важное предположение о возможности контактов этой части молекулы с аполярным связывающим участком вблизи активного центра тромбина. Кроме того, они допускают, что в активном центре тромбина должен быть кислый остаток для образования солевого мостика с концевой аминогруппой гирудина.

Додт с соавт. [29] определили связывающие участки в тромбине для фрагментов гирудина 1—47 и 48—65, в которых остаток Pro-48 был заменен на Ala. Эти фрагменты получили расщеплением рекомбинантного гирудина (r-Hir-Ala⁴⁸) эндопротеиназой Lys-C. Они ингибировали свертывающую активность тромбина с IC_{50} соответственно 0,6 и 4,9 мкмоль/л (для исходного r-Hir она составляет 2,4 нмоль/л, т. е. соответственно в 300 и 2000 раз меньше). Было установлено, что C-концевой фрагмент 48—65 связывается тромбином на участке В-цепи 62—74 — в районе аннион-связывающего участка, а N-концевой фрагмент 1—47 — с участком в районе 150—151 В-цепи.

В работе [30] также использовали большие фрагменты рекомбинантного гирудина, в котором остаток Asp-52 заменили на метионин, что позволило расщепить его бромцианом на фрагменты r-Hir¹⁻⁵² и r-Hir⁵³⁻⁶⁵. Изучали кинетику ингибирования этими фрагментами тромбина с целью идентификации участков, с которыми эти белки взаимодействуют друг с другом.

В результате взаимодействия фрагмента 53—65 с тромбином происходит уменьшение константы Михаэлиса в 2,5 раза для гидролиза хромогенного субстрата D-Phe-Pip-Arg-pNA, что, по мнению авторов, вызвано незначительными конформационными изменениями в молекуле

Таблица 1

Константы ингибирования тромбина аналогами гирудина с различными замещениями двух N-концевых остатков валина [28]

Форма гирудина	Константа ингибирования (K_i), нмоль/л	Форма гирудина	Константа ингибирования (K_i), нмоль/л
r-Hir	0,231	r-Hir-Gly ¹ , Gly ²	694,000
r-Hir-Ile ¹ , Ile ²	0,099	r-Hir-Glu ¹ , Glu ²	67000,000
r-Hir-Phe ¹ , Phe ²	0,238	r-Hir-Leu ¹	0,235
r-Hir-Leu ¹ , Leu ²	9,910	r-Hir-Leu ²	10,300
r-Hir-Ser ¹ , Ser ²	175,000	r-Hir-Glu ¹	295,000
r-Hir-Lys ¹ , Lys ²	152,000	r-Hir-Glu ²	248,000

тромбина, которые влияют на его активный центр. Отмечается низкая кооперативность при одновременном использовании фрагментов 1—52 и 53—65: совместно они ингибируют тромбин в 10^5 раз хуже, чем исходный рекомбинантный гирудин. Показано, что фрагмент 53—65 защищает тромбин от расщепления его трипсином, а фрагмент 1—52 — от расщепления панкреатической эластазой. Эти данные подтверждают предположение о том, что гирудин связывается с выступающей на поверхности тромбина петлей, которая имеет отношение к его анион-связывающему участку.

Интересные исследования проводили по модификации в гирудине остатков тирозина в положениях 3 и 63 полипептидной цепи [31]. Если десульфирование Tug-63 в рекомбинантном гирудине снижает его активность по сравнению с природным в 6—10 раз, то нитрование или йодирование Tug-63 восстанавливает ее почти до уровня природного ингибитора. Однако нитрование Tug-3, наоборот, в 4—5 раз снижает активность. Возможно, механизм изменения активности включает уменьшение величины рК гидроксильной группы тирозина в результате введения в его ароматическое ядро таких электроноакцепторных заместителей, как I- или NO_2 -группы, что приводит к увеличению отрицательного заряда при нейтральных значениях pH.

В случае Tug-63 это ведет к имитации сульфирования и увеличению сродства к тромбину за счет лучшего связывания с анион-связывающим участком. Однако при модификации Tug-3 снижение рК ОН-группы увеличивает полярность остатка, что может дестабилизировать его взаимодействие с аполярным связывающим участком вблизи активного центра фермента. Такой механизм подтверждается тем, что замена высококонсервативного остатка Tug-3 на Phe или Tgr почти в 2 раза увеличивает сродство к тромбину, а их йодирование или нитрование ведет к еще большему увеличению сродства (что, возможно, связано с повышением гидрофобности остатков в положении 3 полипептидной цепи гирудина). Полученные в работе [31] результаты подтверждают важность N- и C-концевых сегментов для взаимодействия с ферментом.

До сих пор мы рассматривали изучение образования гирудин-тромбинового комплекса с использованием различных модификаций молекулы гирудина. В ряде работ изучали взаимодействие гирудина (или его фрагментов) с модифицированным тромбином, что также явилось источником ценной информации.

Ввиду того, что большое значение в ингибировании тромбина придавалось наличию в гирудине нескольких кислых остатков в его С-концевой части, предполагалось, что они должны вступать в ионные взаимодействия с основными аминокислотами, которые расположены на поверхности молекулы тромбина. Исходя из этого Чэнг с соавт. [32] изучили влияние на связывание гирудина с тромбином модификаций различных остатков лизина в ферменте. Модификация остатков лизина в В-цепи тромбина в положениях 21, 52, 65, 106, 107 или 154 вызвала снижение сродства к гирудину в среднем на 20%. Эти результаты подтверждают, что указанные остатки лизина в ферменте участвуют в связывании с гирудином и расположены внутри или рядом с центром связывания в тромбине.

Стоун с соавт. [33] исследовали вклад различных участков α -тромбина в связывание. Использовали различные модификации тромбина как в районе активного центра (дизопропилфторфосфат или необратимый ингибитор D-Phe-Pro-Arg- CH_2Cl), так и в удаленных от него участках (β -, γ - и ϵ -формы тромбина). Результаты исследований представлены в табл. 2.

Как видно из табл. 2, для связывания гирудина важно окружение активного центра. Хлорметилкетон трипептида, закрывающий аполярный связывающий центр, ингибирует связывание с гирудином в 1000 раз сильнее, чем дизопропилфторфосфат, который модифицирует остаток серина в каталитическом центре. Интересны результаты по ингибированию протеолитическими формами тромбина: ϵ -тромбин име-

ет разрыв в В-цепи на участке 154—155, γ -тромбин — выщепление в В-цепи двух пептидов — 63—73 и 124—154, а β -тромбин — выщепление только фрагмента 63—73 [1]. Соответственно количеству поврежденных в В-цепи тромбина изменяется и его сродство к гирудину, особенно важен участок 63—73. Поэтому авторы делают вывод о его большом значении для образования ионных взаимодействий с гирудином.

Интересная информация о природе взаимодействия гирудина с тромбином была также получена при использовании иммунологических методов. Ноэ с соавт. [34] получили поликлональные антитела к синтетическому пептиду H-Arg-Ile-Gly-Lys-His-Ser-Arg-Tyr - Glu - Arg - OH, соответствующему выщепляемому фрагменту В-цепи 62—73 в β - и γ -формах. Антитела хорошо связывались как с α -тромбином, так и с его бромциановым фрагментом, содержащим последовательность 62—73, конкурентно ингибировали связывание гирудина в пределах концентраций от 0 до 43 нмоль/л и не влияли на гидролиз тромбином хромогенного субстрата. Кроме того, они ингибировали отщепление фибринопептидов А от двух А α -цепей фибриногена с $K_i = 11,7 \pm 4$ нмоль/л. На основании этих данных делается вывод о том, что антитела экранируют анион-связывающий участок тромбина от его взаимодействия с гирудином.

Шлеппи с соавт. [35] получили набор моноклональных антител к природному гирудину, рекомбинантному гирудину и двум его синтетическим фрагментам 40—65 и 52—65. Только моноклональные антитела к рекомбинантному гирудину показали высокое сродство к гирудину. Эпитопный анализ показал, что все связывающие домены антипептидных антител расположены вблизи С-концевой части молекулы гирудина, так как связь между остатками Glu⁶¹ и Glu⁶² защищена от расщепления стафилококковой протеазой. Антитела к рекомбинантному гирудину предотвращали расщепление связей Glu⁴³-Gly⁴⁴ стафилококковой протеазой и Lys⁴⁷-Pro⁴⁸ — лизил-эндопептидазой. Предполагается, что этот эпитоп вовлечен в связывание с тромбином.

Следующий раздел посвящен изучению взаимодействия гирудина и тромбина с привлечением методов химического синтеза пептидов.

Химические методы. Биохимические методы исследования гирудин-тромбинового взаимодействия дали много ценной информации, позволяющей предполагать механизмы этого процесса. Дополнительная информация о взаимодействии фрагментов гирудина разной величины с тромбином была получена благодаря использованию в исследованиях большого количества синтетических пептидов.

Авторы работы [36] изучали взаимодействие синтетического фрагмента гирудина 45—65, содержащего несulfированный тирозин и ацетилированный по концевой аминогруппе, с тромбином. Он способен ингибировать свертывающую активность тромбина, однако активный центр фермента при этом не затрагивает, так как действие пептида не влияет на гидролиз хромогенного субстрата. Пептид связывается с единственным центром в тромбине с константой ассоциации 10^5 моль⁻¹л⁻¹, что лишь на порядок меньше, чем константа взаимодействия тромбина с гирудином. Это свидетельствует о том, что фрагмент 45—65 содержит связывающий домен, узнаваемый ферментом, однако не связывается с его активным центром.

В следующей работе этих авторов [3] исследовалось взаимодействие тромбина с серией из 20 синтетических аналогов сегмента 55—65 гирудина. В минимальном участке, необходимом для эффективного

Т а б л и ц а 2

Константы диссоциации для взаимодействия различных форм тромбина с гирудином [33]

Форма тромбина	Константа диссоциации (K_d), моль/л
α	$22 \cdot 10^{-15}$
β	$(2,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-12}$
γ	$(19 \pm 1) \cdot 10^{-9}$
ϵ	$(56 \pm 7) \cdot 10^{-15}$
Динзопропилфторфосфат	$(26 \pm 6) \cdot 10^{-12}$
D-Phe-Pro-Arg-CH ₂	$(19 \pm 2) \cdot 10^{-9}$

ингибирования (сегмент 56—64) свертывающей активности тромбина, остатки Phe-56, Glu-57, Ile-59, Pro-60 и Leu-64 оказались чувствительными к заменам другими аминокислотами. Предполагается, что они необходимы для прямого взаимодействия с ферментом или для поддержания нужной конформации ингибитора. Предполагается также возможность образования на этом участке амфифильной α -спирали, о чем мы упоминали ранее (см. рис. 3). Обращает на себя внимание важность некоторых гидрофобных остатков, а также тот неожиданный факт, что из четырех остатков глутаминовой кислоты только один (Glu-57) оказался необходимым для эффективного ингибирования. Кроме того,

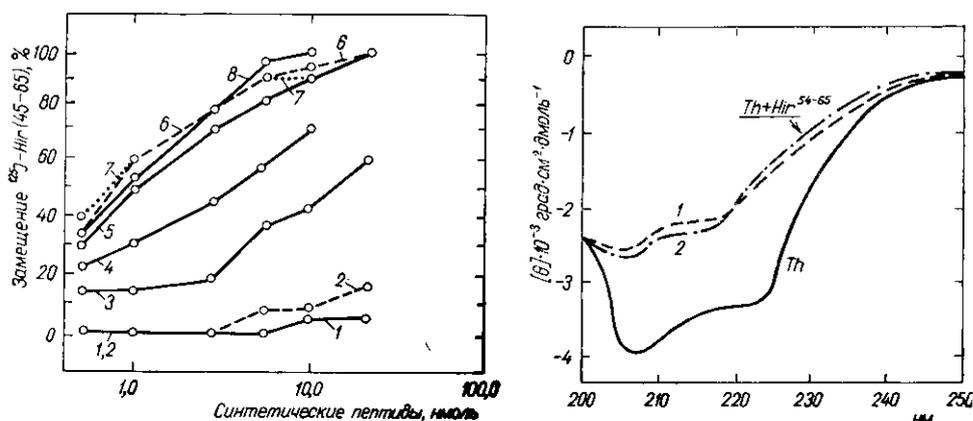


Рис. 6. Замещение ^{125}I -меченного фрагмента гирудина 45—65 с тромбин-сефарозы синтетическими пептидами. Фрагменты гирудина: 1—58—65; 2—57—65; 3—56—65; 4—55—65; 5—54—65; 6—52—65; 7—50—65; 8—45—65 [38]

Рис. 7. Спектры КД тромбина и его комплекса с фрагментом гирудина 54—65. Добавки фрагмента гирудина: 1—2; 2—1 нмоль [38]

если сульфирование остатка Tug-63 в пептиде приводит к 10-кратному увеличению его ингибирующей способности, то замена его Tug-63 на остаток глутаминовой кислоты снижает ее в 4 раза.

Как считают авторы приведенной работы, на основании сравнения последовательностей С-концевой части гирудина и фибринопептидов А и В нельзя сделать вывод о том, что гирудин и фибриноген связываются с одним и тем же участком тромбина и что, если они и используют для связывания некий общий участок, модели взаимодействия с ним гирудина и фибриногена могут быть различными.

Оуэн с соавт. [37] продолжили изучение синтетических фрагментов сегмента 54—65 для определения оптимальных остатков в положениях 54 и 56 для связывания. Оказалось, что минимально необходимой последовательностью является 56—64, содержащая в положении 56 *L*-аминокислоту. Замена Phe-56 на Tug не приводит к изменению ингибирующей активности, в то время как замена его на *n*-хлорфенилаланин или фенилглицин — к ее снижению. Удаление аминогруппы концевой остатка Asp-55 (путем замены его янтарной кислотой) также ведет к возрастанию активности. Высокая чувствительность аминокислоты в положении 56 пептидной цепи гирудина к модификациям свидетельствует о ее важности для взаимодействия с тромбином.

Мао с соавт. [38] исследовали взаимодействие серии синтетических фрагментов С-концевого участка гирудина (45—65, 50—65, 52—65, 54—65, 55—65, 56—65, 57—65 и 58—65) методом гель-фильтрации при высоком давлении, а также по их способности вытеснять меченный ^{125}I гирудин из его комплекса с иммобилизованным тромбином (рис. 6). Сродство фрагментов к тромбину падало при замене Phe-56 на его *D*-изомер, Glu или Leu.

Проводилось также изучение серии синтетических пептидов, отвечающих последовательности 45—65 гирудина [39], с целью определе-

в тромбине, который, таким образом, находится рядом с участком связывания гирудина. Это является хорошим экспериментальным доказательством того, что гирудин связывается с ферментом в районе анион-связывающего сайта. Кроме того, это позволило на основании данных рентгеноструктурного анализа тромбина определить, что анион-связывающий сайт расположен на расстоянии 1,8—2,0 нм от каталитического центра фермента.

Подводя итоги результатов изучения образования гирудин-тромбинового комплекса биохимическими и химическими методами (а эта огромная работа была проведена в основном за короткий период с 1987 по 1990 год), можно отметить следующее.

1. Показано, что гирудин взаимодействует с тромбином в двух основных сайтах — С-концевой домен, по-видимому, взаимодействует с

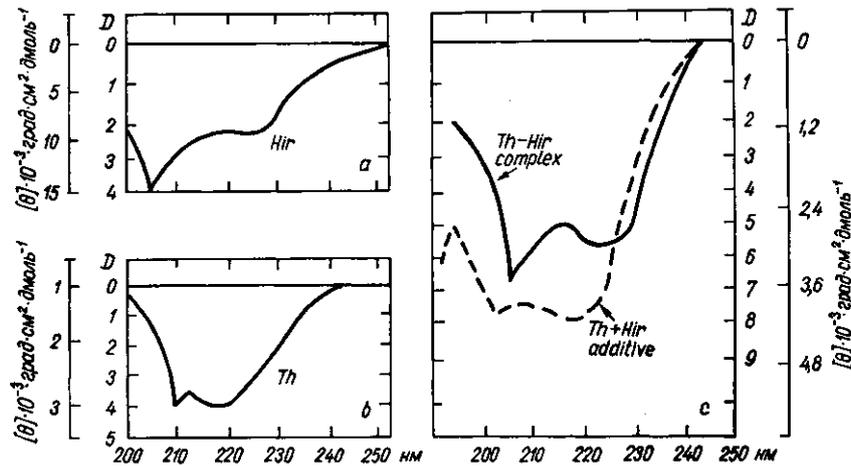


Рис. 8. Спектры КД гирудина (а), тромбина (b) и их комплекса (с) [42]

анион-связывающим сайтом тромбина и это вносит большой вклад в энергию связывания; N-концевой фрагмент и центральный кор взаимодействуют с аполлярным связывающим участком вблизи активного центра фермента, однако, скорее всего, связывающий «карман» тромбина в этом взаимодействии участия не принимает.

2. Установлено эффективное ингибирование свертывающей активности тромбина небольшим фрагментом 54—64 гирудина, что открывает пути для создания хороших синтетических ингибиторов тромбина нового типа. Однако, если результаты этих исследований прояснили картину взаимодействия тромбина с гирудином в общих чертах, то окончательно механизм этого процесса был установлен с помощью изучения комплекса гирудин — тромбин физическими методами.

Физические методы. Изучение строения комплекса гирудина с тромбином физическими методами также было проведено за короткий срок — с 1987 по 1990 гг. и привело к окончательному решению проблемы.

В уже упоминавшейся работе Мао с соавт. [38] изучались спектры кругового дихроизма (КД) тромбина в присутствии С-концевого синтетического пептида 54—65 и укороченного фрагмента 57—65. Спектры снимали в присутствии пептидов и без них (рис. 7). Структура тромбина в присутствии фрагмента 54—65 более беспорядочна, что свидетельствует о конформационных изменениях, происходящих при образовании комплекса, однако фрагмент 57—65, плохо связывающийся с тромбином, не влияет на спектр КД тромбина. Пептиды брали в такой концентрации, чтобы отсутствовало их собственное дихроическое поглощение. Предполагается, что наблюдаемое изменение конформации тромбина может быть причиной снижения свертывающей и других активностей фермента.

Конно с соавт. провели более тщательное исследование спектров КД комплекса [42]. Они показали, что кривые КД комплекса гирудин-тромбин (рис. 8) отличаются как от спектра КД самого гирудина или тромбина, так и от их суммарного спектра. Это отклонение от аддитивности особенно велико в области от 210 до 225 нм, что указывает на изменение вторичных структур обоих белков при образовании ими комплекса. В процессе титрования тромбина гирудином спектральное отклонение от аддитивности имеет сигмоидальный характер, что подтверждает кооперативность процесса связывания. Гель-фильтрация смеси тромбина и гирудина не показала иного состава комплексов, чем 1 : 1, однако гель-фильтрация свободного гирудина выявила, что он существует в форме ассоциированных молекул разного состава. Отсюда следует, что кооперативный характер процесса обусловлен взаимодействием тромбина с множественной формой гирудина, причем на второй стадии множественный комплекс диссоциирует в тип 1 : 1. Это приводит к заметным конформационным изменениям и значительному изменению связывания, что и регистрируется методом КД.

Большой интерес представляет изучение в этой работе спектров КД комплексов гирудина с различными модификациями тромбина (табл. 3). Регистрировали отклонение эллиптичности от аддитивности при 222 нм, чем и характеризовалось связывание. Как видно из табл. 3, наименьшее отклонение (0—5 %) наблюдалось в случае ингибирования тромбина необратимым ингибитором, а при использовании γ -тромбина оно составило 30—40 % (для α -формы отклонение условно принято за 100 %). Так как отклонение от аддитивности уменьшалось с ухудшением связывания, сделан вывод о важности как активного центра и его окружения, так и основного участка В-цепи тромбина 63—74 (отсутствующего в γ -форме) для связывания.

Следует отметить, что метод КД является относительно малоинформативным для изучения вторичной структуры белков, поэтому значительно более ценная информация получена при использовании метода ЯМР в растворе. Ни с соавт. [43] исследовали взаимодействие тромбина с синтетическими фрагментами гирудина 52—65 и Ac-55—65 методом одномерного и двухмерного ЯМР. Установлено наличие α -спирали на участке гирудина 61—65. Фрагмент 55—65 дает в комплексе с тромбином хорошо разрешаемую структуру. Это отчасти верно и для пептида 56—65, так как наблюдался средний и дальний перенос поляризации, обусловленный ядерным эффектом Оверхаузера (transferred NOE), между протонами остова полипептидной цепи и боковых остатков аминокислот. Отмечается, что структура сегмента 55—65 довольно амфифильна, т. е. одна сторона ее полярна и заряжена, а другая гидрофобна. С-Концевые пептиды — фрагменты гирудина — не взаимодействуют с каталитическим центром фермента. Остатки глутамино-

Таблица 3
Отклонение от аддитивности спектров КД гирудин-тромбинового комплекса [42]

Состав исследуемых смесей компонентов	Отклонение эллиптичности от аддитивности, %
α -Тромбин+гирудин	100
γ -Тромбин+гирудин	30—40
α -Тромбин+гирудин+ +H-D-Phe-Phe-Arg- CH ₂ Cl	100—110
α -Тромбин+гирудин+ H-D-Phe-Pro-Arg-CH ₂ Cl	0—5

Таблица 4
Сравнительная способность к ингибированию тромбина различных фрагментов физиологически важных белков гемостаза [54]

Фрагменты белков	Эффективность ингибирования свертывания (IC ₅₀), мкмоль/л
Кофактор II гепарина человека (54—75)	38
То же (49—75)	28
V _B -цепь фибриногена (410—427)	130
Тромбомодулин (426—444)	140
Гирудин десульфированный (54—65)	1,3
Гирудин природный (54—65)	0,17

вой кислоты в положениях 58, 61 и 62 обращены в сторону растворителя, чем можно объяснить их неучастие в связывании, как указывалось ранее [3].

Однако Glu-57 необходима для взаимодействия из-за сближенности с гидрофобным ядром молекулы и поэтому может принимать участие в ионном взаимодействии. Эти структурные особенности реализуются за счет изменения направления цепи возле остатков Glu-57 и Glu-58 посредством вытягивания структуры, включая остатки Ile-59 и Pro-60, а также поворотом искаженной α -спирали из остатков от Glu-61 до Glu-65 на полтора оборота.

Что нового в понимании механизмов взаимодействия гирудина с тромбином дали эти исследования? Во-первых, они подтвердили неструктурированность С-концевой части гирудина в отсутствие тромбина, что согласуется с более ранними данными [19]. Во-вторых, подтверждено образование амфифильного кластера сегментом 52—65, что очень похоже на предсказанную ранее амфифильную спираль (см. рис. 3), которая может образоваться в результате взаимодействия с тромбином.

Однако решающую роль в физических исследованиях сыграли работы по прямому изучению строения комплекса гирудин — тромбин методом рентгеноструктурного анализа, опубликованные почти одновременно [44, 45]. На основании данных проведенного анализа кристаллов комплекса было получено четкое доказательство того, что гирудин ингибирует тромбин по неизвестному ранее механизму ингибирования сериновых протеаз: в отличие от других известных ингибиторов специфичность гирудина обусловлена не взаимодействием со специфическим связывающим «карманом» фермента, а, скорее, участками, расположенными как вблизи активного центра, так и на некотором удалении от него. В гирудине имеется N-концевой глобулярный домен и протяженный (3,9 нм) С-концевой домен. С-Концевой сегмент 48—65 закручен вокруг молекулы тромбина вдоль предполагаемого анион-связывающего сайта и связан с ним электростатическими силами, в то время как пять последних остатков образуют спиральную петлю, которая может образовывать несколько гидрофобных контактов с ферментом.

Анион-связывающий участок тромбина представляет собой длинную щель, вытянутую от впадины активного центра тромбина и закрытую петлями 35—59 и 70—80 в В-цепи. Очень интересные результаты получены относительно механизма взаимодействия гирудина с областью активного центра фермента: гирудин связывается с участком вблизи активного центра своими тремя N-концевыми остатками — Val-1, Val-2 и Tyr-3 (как было предсказано в работах, приводимых в предыдущих разделах!), причем Val-1 занимает подцентр S_2 , а Tyr-3 — подцентр S_3 в тромбине [9], т. е. аполярный связывающий участок.

По данным рентгеноструктурного анализа, 27 из 65 остатков гирудина сближены в пространстве на расстоянии менее 0,4 нм с тромбином (10 ионных пар и 23 водородные связи), чем можно объяснить высокую аффинность и специфичность гирудина. Предполагается, что N-концевая аминокислота образует водородную связь с гидроксилом серина каталитического центра тромбина, но специфический «карман» фермента во взаимодействии с ингибитором участия не принимает. Схема взаимодействия гирудина с тромбином изображена на рис. 9.

Перспективы практического использования результатов исследований. Выше отмечалось, что основной целью почти 100-летнего изучения ингибитора гирудина было использование его в клинике в качестве антикоагулянта и создание новых препаратов, механизм действия которых основан на тех же принципах, что и ингибирование тромбина гирудином. Исследования на лабораторных животных [46, 47] и человеке [48, 49] показали, что гирудин может быть использован в медицинской практике в качестве высокоселективного и эффективного антикоагулянтного препарата ввиду его высокого сродства к тромбину, очень низкой

антигенности и возможности быстрого выведения из кровяного русла (время его полужизни в организме около 1 ч). Поэтому гирудии может применяться для лечения тромбозов наряду с широко используемым в клинике естественным ингибитором, содержащимся в организме, гепарином [46, 49].

Возникает вопрос, почему до сих пор использование гирудина в клинике не пошло дальше экспериментальных исследований, если его

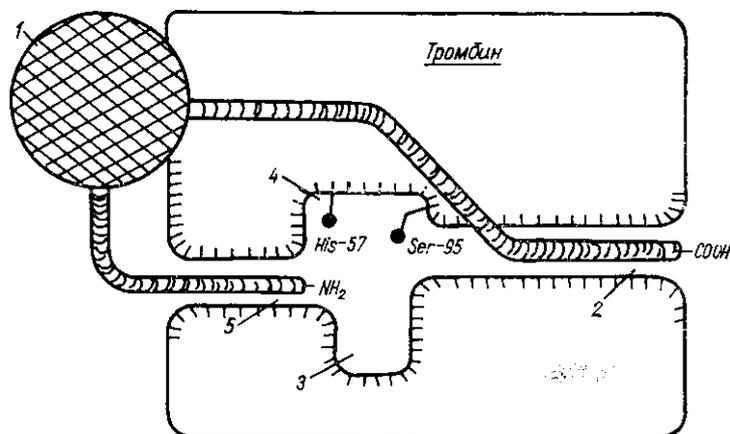


Рис. 9. Схематическая диаграмма гирудин-тромбинового комплекса по данным рентгеноструктурного анализа: 1 — центральный кор гирудина; 2 — фибриноген-связывающая щель в тромбине; 3 — первичный связывающий «карман» тромбина; 4 — каталитический центр фермента; 5 — аполярный связывающий участок тромбина [44]

выделение из природного источника (медицинских пиявок) как-будто не составляет большой проблемы? По приблизительным оценкам Марквардта [2], ежегодно для научных исследований требуется 50 тыс. пиявок, однако их количество в природе ограничено, и к тому же недавно они были занесены в список исчезающих видов! Значит, нужны другие источники гирудина. В этом большую помощь могут оказать биотехнологические методы получения рекомбинантного ингибитора. Кроме работ в этом направлении, упомянутых нами ранее, можно указать еще несколько публикаций [50—53].

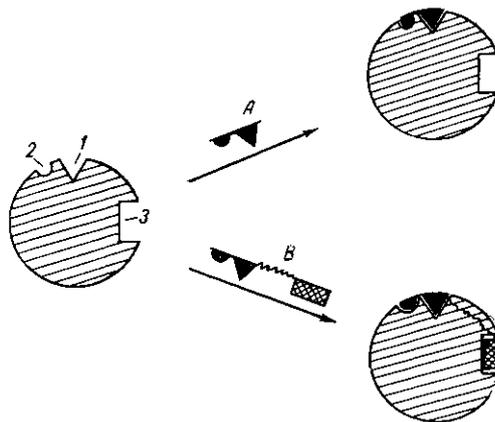


Рис. 10. Схема ингибирования тромбина пептидом *D*-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly (а) и гирулогами (б) [56]

По-видимому, в терапевтических целях можно использовать не только гирудин, но и его небольшие синтетические фрагменты. Например, Хортии с соавт. [54] приводят сведения о сравнительной антисвертывающей активности фрагментов различных природных субстратов и ингибиторов тромбина, имеющих анионную природу и, вероятно, взаимодействующих с анион-связывающим сайтом фермента (табл. 4). Из таблицы видно, что синтетический фрагмент гирудина 54—65 (и особенно его сульфированный аналог) является гораздо лучшим ингибитором, чем все приведенные пептиды. Это особенно важно, если принять во внимание, что Хортии [55] получил патент на использование в качестве антитромбинового препарата 22-членного синтетического пептида, соответствующего последовательности 54—75 (с заменой Ser-68 на Ala) кофактора II гепарина человека (см. табл. 4).

В заключение обзора следует рассмотреть очень важную и перспективную работу по созданию гирудиноподобных ингибиторов тромбина — «гирулогов» [56]. Целью ее было получение эффективного обратимого ингибитора тромбина на основе изученных механизмов ингибирования его гирудином. Для взаимодействия с анион-связывающим сайтом тромбина авторы использовали синтетический пептид — фрагмент 54—64 гирудина, а для связывания с активным центром фермента — известный синтетический ингибитор *D*-Phe-Pro-Arg-Pro-Gly, которые связали друг с другом «мостиком» из остатков глицина (рис. 10). Важным в этой работе было то, что авторы использовали информацию о расстоянии между этими двумя связывающими центрами в тромбине — 18—2,0 нм (табл. 5).

Таблица 5
Константы ингибирования гидролиза тромбином *p*-нитроанилида
D-гексагирутирозил-аланил-аргинина гирулогами [56]

Соединение	Аминокислотная последовательность	K_i , нмоль/л
Гирулог-1	<i>D</i> -Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly) ₄ -гирудин (53—64)	2,3
Гирулог-2	<i>D</i> -Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly) ₂ -гирудин (53—64)	64,5
Гирулог-3	<i>D</i> -Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly) ₆ -гирудин (53—64)	3,0
Гирулог-4	<i>D</i> -Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly) ₈ -гирудин (53—64)	2,6
Гирулог-5	H-Phe-Pro-Arg-Pro-(Gly) ₄ -гирудин (53—64)	156,0
Ингибитор	<i>D</i> -Phe-Pro-Arg-Pro-GlyOH	$>2 \cdot 10^3$
Гирудин (53—64)*	Ac-Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-LeuOH	$>2 \cdot 10^3$

* Синтетический фрагмент 53—64 гирудина ускоряет гидролиз хромогенного субстрата.

Из табл. 5 видно, что для эффективного ингибирования тромбина достаточно, чтобы мостик был построен из четырех остатков глицина. Этот синтетический пептид проявляет антикоагулянтную активность, сравнимую с активностью гирудина и в 100 раз (!) превосходящую активность сульфированного фрагмента 53—64. На первый взгляд, большим преимуществом гирудина перед гирулогами является то, что он не взаимодействует со специфическим «карманом» активного центра тромбина, т. е. в принципе (в отличие от гирулогов) не может ингибировать другие трипсиноподобные ферменты системы свертывания крови. Следовательно, при сравнимом сродстве к тромбину гирулоги обладают более низкой селективностью, чем гирудин, что является очень важным фактором при создании терапевтического препарата.

Однако опыты по ингибированию гидролиза хромогенного субстрата фактором X_a , плазмином и трипсином показали, что эти ферменты не ингибировались гирулогом-1 даже в концентрациях, в 1000 раз превышающих таковые указанных ферментов. Таким образом, гирулоги обладают достаточно высокой селективностью к тромбину, чтобы явиться примером нового класса его бивалентных ингибиторов.

Автор выражает благодарность В. К. Кибиреву за обсуждение рукописи обзора и ценные замечания и А. А. Серейской — за предоставление некоторых оригинальных работ по теме обзора.

Резюме. Розглянуто біохімічні, хімічні та фізичні підходи до вивчення будови гірудина і механізму пригнічення їм тромбіна. Результати цих досліджень відкривають шлях до створення синтетичних інгібіторів тромбіна нового типу.

Summary. Biochemical, chemical and physical methods for study of hirudin-thrombin bounding mechanisms are reviewed. Perspectives of the clinical usage of recombinant hirudin and its small synthetic fragments are observed. The possibility for designing of novel drugs based on the studied hirudin-thrombin interaction mechanisms is shown on example of synthetic hirudin-like inhibitors «hirulogs».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bioregulatory functions of thrombin* / Eds D. A. Walz et al.— New York: Acad. Sci., 1986.— 450 p.
2. *Markwardt F.* Pharmacology of hirudin: one hundred years after the first report of the anticoagulant agent in medical leeches // *Biomed. and biochim. acta.*— 1985.— **44**, N 7/8.— P. 1007—1013.
3. *Anticoagulant peptides: nature of the interaction of the C-terminal region of hirudin with a noncatalytic binding site on thrombin* / J. L. Krstenansky, T. J. Owen, M. T. Yates, S. J. T. Mao // *J. Med. Chem.*— 1987.— **30**, N 7.— P. 1688—1691.
4. *Markwardt F.* Die Isolierung und Chemische Charakterisierung des Hirudins // *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*— 1967.— **308**, N 4.— S. 147—156.
5. *Fenton J. W. II.* Thrombin specificity // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1981.— **370**.— P. 468—495.
6. *Серебряный С. Б.* Тромбин: его строение и особенности катализа // *Биохимия животных и человека.*— 1982.— Вып. 6.— С. 14—26.
7. *Струкцова С. М.* Структурно-функциональные особенности тромбина // *Там же.*— С. 26—38.
8. *Fenton J. W. II, Sonder S. A.* Thrombin active-site regions and functions // *Ann. N. Y. Acad. Sci.*— 1984.— **435**.— P. 412—414.
9. *Shechter I., Berger A.* On the size of the active site in proteases. I. Papain // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*— 1967.— **27**.— P. 157—162.
10. *The refined 1,9 Å crystal structure of human α -thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment* / W. Bode, I. Mair, U. Baumann et al. // *EMBO J.*— 1989.— **8**, N 11.— P. 3467—3475.
11. *Human D-Phe-Pro-Arg-CH₂- α -thrombin crystallization and diffraction data* / E. Skrzypczak-Jankun, T. Rydel, A. Tulinsky et al. // *J. Mol. Biol.*— 1989.— **206**, N 4.— P. 755—757.
12. *Catalytic competence of human α - and γ -thrombin in the activation of fibrinogen and factor XIII* / S. D. Lewis, L. Lorand, J. W. II Fenton, J. A. Shafer // *Biochemistry.*— 1987.— **26**, N 24.— P. 7597—7603.
13. *The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor* / J. Dodt, H.-P. Müller, U. Seemüller, J.-Y. Chang // *FEBS Lett.*— 1984.— **165**, N 2.— P. 180—184.
14. *Rapid purification and revised amino terminal sequence of hirudin: a specific thrombin inhibitor of the Bloodsucking leech* / S. J. T. Mao, M. T. Yates, D. T. Blankenship et al. // *Anal. Biochem.*— 1987.— **161**.— P. 514—518.
15. *Cloning and expression of a cDNA coding for anticoagulant hirudin from the Bloodsucking leech, Hirudo medicinalis* / R. P. Harvey, E. Degryse, L. Stefani et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1986.— **83**, N 4.— P. 1084—1088.
16. *Isolation and characterization of hirudin isoforms and sequence analysis of hirudin PA* / J. Dodt, W. Machleidt, U. Seemüller et al. // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.*— 1986.— **367**, N 6.— P. 803—811.
17. *Chang J.-Y.* The functional domain of hirudin, a thrombin specific inhibitor // *FEBS Lett.*— 1983.— **164**, N 2.— P. 303—313.
18. *Point mutations modifying the thrombin inhibition kinetics and antithrombotic activity in vivo of recombinant hirudin* / E. Degryse, M. Acker, G. Defreyne et al. // *Protein Eng.*— 1989.— **2**, N 6.— P. 459—465.
19. *The conformation of hirudin in solution: a study using nuclear magnetic resonance, distance geometry and restrained molecular dynamics* / G. M. Clore, D. K. Sukumaran, M. Nigles et al. // *EMBO J.*— 1987.— **6**, N 2.— P. 529—537.
20. *Protein nuclear magnetic resonance study of hirudin: resonance assignment and secondary structure* / D. K. Sukumaran, G. M. Clore, A. Preuss et al. // *Biochemistry.*— 1987.— **26**, N 2.— P. 333—338.
21. *Solution structure of recombinant hirudin and Lys47→Glu mutant: a nuclear magnetic resonance and hybrid distance geometry-dynamical simulated annealing study* / P. J. M. Folkers, G. M. Clore, P. C. Driscoll et al. // *Ibid.*— 1989.— **28**, N 6.— P. 2601—2617.
22. *Haruyama H., Wüthrich K.* Conformation of recombinant desulfatohirudin in aqueous solution determined by nuclear magnetic resonance // *Ibid.*— N 10.— P. 4301—4312.
23. *Tetlin C., De La Llosa P., Jutisz M.* Effect des modifications chimiques de l'hirudine sur son action inhibitrice de l'activité enzymatique de la thrombine // *Bull. Soc. Chim. Biol.*— 1967.— **49**, N 12.— P. 1837—1843.
24. *Stone S. R., Dennis S., Hofsteenge J.* Quantitative evaluation of the contribution of ionic interactions to the formation of the thrombin-hirudin complex // *Biochemistry.*— 1989.— **28**, N 17.— P. 6857—6863.
25. *Stone S. R., Hofsteenge J.* Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin // *Ibid.*— 1986.— **25**, N 16.— P. 4622—4628.
26. *Dodt J., Köhler S., Baici A.* Interaction of site specific hirudin variants with α -thrombin // *FEBS Lett.*— 1988.— **229**, N 1.— P. 87—90.
27. *Use of site-directed mutagenesis to investigate the basis for the specificity of hirudin* / P. J. Braun, S. Dennis, J. Hofsteenge, S. R. Stone // *Biochemistry.*— 1988.— **27**, N 17.— P. 6517—6522.
28. *Contribution of the N-terminal region of hirudin to its interaction with thrombin* / A. Wallace, S. Dennis, J. Hofsteenge, S. R. Stone // *Ibid.*— 1989.— **28**, N 26.— P. 10079—10084.

29. *Distinct binding sites of Ala⁴⁸-hirudin¹⁻⁴⁷ and Ala⁴⁸-hirudin⁴⁸⁻⁶⁵ on α -thrombin* / J. Dodt, S. Köhler, T. Schmitz, B. Wilhelm // *J. Biol. Chem.*—1990.—**265**, N 2.— P. 713—718.
30. *Use of fragments of hirudin to investigate thrombin-hirudin interaction* / S. Dennis, A. Wallace, J. Hofsteenge, S. R. Stone // *Eur. J. Biochem.*—1990.—**188**, N 1.— P. 61—66.
31. *Winant R. G., Lazar J. B., Johnson P. H.* Chemical modifications and amino acid substitutions in recombinant hirudin that increase hirudin-thrombin affinity // *Biochemistry*.—1991.—**30**, N 5.— P. 1271—1277.
32. *Chang J.-Y.* The hirudin-binding site of human α -thrombin // *J Biol. Chem.*—1989.—**264**, N 13.— P. 7141—7146.
33. *Stone S. R., Braun P. J., Hofsteenge J.* Identification of regions of α -thrombin involved in its interaction with hirudin // *Biochemistry*.—1987.—**26**, N 15.— P. 4617—4624.
34. *The use of sequence-specific antibodies to identify a secondary binding site in thrombin* / G. Noe, J. Hofsteenge, G. Rovelli, S. R. Stone // *J. Biol. Chem.*—1988.—**263**, N 24.— P. 11729—11735.
35. *Preparation of monoclonal antibodies to hirudin and hirudin peptides. A method for studying the hirudin-thrombin interaction* / J.-M. Schlaepfli, S. Vekemans, H. Rink, J.-Y. Chang // *Eur. J. Biochem.*—1990.—**188**, N 2.— P. 463—470.
36. *Krstenansky J. L., Mao S. J. T.* Antithrombin properties of C-terminus of hirudin using synthetic insulated N α -acetyl-hirudin using 45—65 // *FEBS Lett.*—1987.—**211**, N 1.— P. 10—16.
37. *N-Terminal requirements of small peptide anticoagulants based on hirudin⁵⁴⁻⁶⁵* / T. J. Owen, J. L. Krstenansky, M. T. Yates, J. T. Mao // *J. Med. Chem.*—1988.— N 5.— P. 1009—1011.
38. *Interaction of hirudin with thrombin: identification of minimal binding domain of hirudin that inhibits clotting activity* / S. J. T. Mao, M. T. Yates, T. J. Owen, J. L. Krstenansky // *Biochemistry*.—1988.—**27**, N 21.— P. 8170—8173.
39. *Anticoagulant activity of synthetic hirudin peptides* / J. M. Maraganore, B. Chao, M. L. Joseph et al. // *J. Biol. Chem.*—**264**, N 15.— P. 8692—8698.
40. *Binnie C. G., Erickson B. W., Hermans J.* Inhibition of thrombin by synthetic hirudin peptides // *FEBS Lett.*—1990.— N 1/2.— P. 85—89.
41. *Bourdon P., Fenton J. W. II, Maraganore J. M.* Affinity labelling of lysine-149 in the anion-binding exosite of human α -thrombin with N (dinitrofluorobenzyl)hirudin C-terminal peptide // *Biochemistry*.—1990.— **29**, N 27.— P. 6379—6384.
42. *Konno S., Fenton J. W. II, Villanueva G. B.* Analysis of the secondary structure of hirudin and the mechanism its interaction with thrombin // *Arch. Biochem. and Biophys.*—1988.—**267**, N 1.— P. 158—166.
43. *Ni F., Konishi Y., Scheraga H. A.* Thrombin-bound conformation of the C-terminal fragments of hirudin determined by transferred nuclear Overhauser effects // *Biochemistry*.—1990.—**29**, N 18.— P. 4479—4489.
44. *Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition* / M. G. Grütter, J. P. Priestle, J. Rahuel et al. // *EMBO J.*—1990.—**9**, N 8.— P. 2361—2365.
45. *The structure of a complex of recombinant hirudin and human α -thrombin* / T. J. Rydel, K. G. Ravichandran, A. Tulinsky et al. // *Science*.—1990.—**249**, N 4966.— P. 277—280.
46. *The effect of hirudin on endotoxin induced disseminated intravascular coagulation (DIC)* / A. Ishikawa, R. Hafter, U. Seemüller et al. // *Thromb. Res.*—1980.—**19**, N 3.— P. 351—358.
47. *Pharmacological studies on the antithrombotic action of herudin in experimental animals* / F. Markwardt, J. Hauptmann, G. Novak et al. // *Thromb. Haemostas.*—1982.—**47**, N 3.— P. 226—229.
48. *Pharmacokinetics and anticoagulant effects of hirudin in man* // F. Markwardt, G. Novak, J. Stürrebecher et al. // *Ibid.*—1984.—**52**, N 2.— P. 160—163.
49. *Markwardt F.* Pharmacology of selective thrombin inhibitors // *Now. Rev. Fr. Hematol.*—1988.—**30**.— P. 161—165.
50. *Cloning and expression in E. coli of a synthetic DNA for hirudin the blood coagulation inhibitor in the Leech* / E. Fortkamp, M. Reiger, G. Heisterberg-Mautses et al. // *DNA*.—1986.— **5**, N 6.— P. 511—517.
51. *Cloning and expression of a cDNA coding for anticoagulant hirudin from the Bloodsucking leech, Hirudo medicinalis* / R. P. Harvey, E., Degryse, L. Stefani et al. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—**83**, N 4.— P. 1084—1088.
52. *Expression and secretion in S. cerevisiae of biologically leech hirudin* / G. Loison, A. Findeli, S. Bernard et al. // *Bio/Techonology*.—1988.—**6**, N 1.— P. 72—77.
53. *Degryse E.* Determination of the specific activity of recombinant hirudin // *Thromb. Res.*—1990.—**60**, N 6.— P. 433—443.
54. *Hortin G. L., Benutto B. M.* Inhibition of thrombins clotting activity by synthetic peptide segments of its inhibitors and substrates // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1990.—**169**, N 2.— P. 437—442.
55. *Pat. 299576 USA, IC¹ A61K37/02, C 07K 7/10 / G. L. Hortin (23.01.89)* // РЖ «Физико-химическая биология и биотехнология».—1990.— № 10. Реф. 10A208П.
56. *Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin* / J. M. Maraganore, P. Bourdon, J. Jablonski et al. // *Biochemistry*.—1990.— **29**, N 30.— P. 7095—7101.

Ин-т биоорг. химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Получено 30.07.91