

MC
111.825

47.



FOLIA BIOTECHNOLOGICA

HU ISSN 0237-0743

ISBN 963 593 125 5

OMIKK

OMFB

FOLIA BIOTECHNOLOGICA

monográfia-sorozat

AZ OMIKK ÉS AZ OMFB KÖZÖS KIADVÁNYA

Főszerkesztő:

Dr. KÁLLAI LÁSZLÓ

Szakszerkesztő:

FAZEKASNÉ HORVÁTH ZSUZSANNA

Technikai szerkesztők:

LABAN CZ MÁRTA

BAUMGARTNER ZOLTÁN

MC 111.825



1997

Kiadja az

Országos Műszaki Információs Központ és Könyvtár

Bp. VIII. Múzeum u. 17.

Postacím: Bp. Pf. 12. 1428

A szerkesztőség telefonszáma: 1-382-915

A kiadásért felelős: Jánszky Lajos

Készült az OMIKK nyomdájában

1011 Bp, Gyorskocsi u. 5-7.

Felelős vezető: Tóth Károly

OMIKK

OMFB

Bagdy Dániel
Az orvosi pióca hatóanyagainak
előállítása biotechnológiával

Proteinase inhibitors of the leech *hirudo medicinalis*

This study reports a brief survey on the biologically active inhibitors of medicinal leech, from their isolation processes to their preparation by genetic engineering.

The production, isolation and structure of recombinant hirudin as well as the recent study on crystallographic structure of a recombinant hirudin-thrombin complex are reviewed in details.

Detailed comparative investigations have shown that the pharmacological properties (anticoagulant and antithrombotic action) of recombinant hirudin are very similar to those of leech hirudin with regard both pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics. The use of recombinant hirudins for clinical purpose can be expected for the near future.

Az orvosi pióca hatóanyagainak előállítása biotechnológiával

A tanulmány rövid áttekintést nyújt az orvosi pióca biológiailag aktív inhibitorairól, izolálásuktól kezdve géntechnikai előállításukig. A szerzők részletesen ismertetik a rekombináns hirudin előállítását, izolálását és szerkezetét, valamint a rekombináns hirudin-trombin komplex krisztallográfiai szerkezetét. Az összehasonlító vizsgálatok azt mutatták, hogy a rekombináns hirudin farmakológiai tulajdonságai (antikoaguláns és antitrombotikus hatás) nagyon hasonlóak az orvosi pióca hirudinjéhez, mind a farmakodinamikai, mind a farmakokinetikai jellemzőket tekintve. A rekombináns hirudinok klinikai alkalmazása a közeljövőben várható.

Herstellung der Wirksubstanzen des Blutegels (*Hirudo medicinalis*) auf biotechnologischem Weg

Kenntnisse über die körpereigenen bioaktiven Hemmstoffe des Blutegels, über deren Isolierung, als auch über deren Herstellung auf gentechnischem Weg werden in aller Kürze dem Leser vermittelt. Hiernach werden Einzelheiten über die Herstellung, die chemische Struktur von rekombinantem Hirudin, und über die Kristallstruktur von rekombinantem Hirudin-Thrombin Komplex erläutert. In vergleichenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die pharmakologischen Eigenschaften von rekombinantem Hirudin (antikoagulanter und antithrombotischer Effekt) denen von nativem Hirudin aus *Hirudo medicinalis* sehr ähnlich sind, sowohl aus

pharmakodynamischer, als auch aus pharmakokinetischer Sicht. Rekombinante Hirudine werden jedem Anschein nach bald klinische Anwendung finden.

TARTALOM

Bevezetés	5
Hirudinok	6
A biotechnológia alkalmazása a népi gyógyászatban	6
Laboratóriumi módszerek	7
A pióca-hirudin előállítása ipari méretben	7
A hirudin teljes kovalens szerkezete	9
Izohirudinok	10
Hirudin-trombin kölcsönhatás	11
Hirudin vizsgálati módszerek	15
Farmakológiai hatások	16
Hirudin-peptidek szintézise kémiai technológiával	18
A biotechnológia alkalmazása hirudin előállítására	22
Rekombináns hirudin előállítása és izolálása	22
Szerkezet és hatás összefüggésének vizsgálata	23
A rekombináns hirudinok farmakológiája	27
Az r-hirudinok és a vérlemezkefunkció	28
Az r-hirudinok antitrombotikus hatása	29
Antikoaguláns hatás	31
Farmakokinetika	32
Mellékhatások és toxikológia	34
Bdellinek	38
Eglinek	39
Rekombináns eglin	41
Farmakológiai és terápiás vonatkozások	42
Irodalom	44

Bevezetés

A szív és keringési betegségek elterjedése és halálozási arányszáma az Egészségügyi Világszervezet (WHO) statisztikai adatai szerint vezető helyet foglal el a betegségek között, megelőzve a daganatos betegségeket is. Jól ismert, hogy ezeknek a betegségeknek jelentős hányada vérrögképződéssel, trombólízzal jár együtt, és a keringés útját beszűkítő vagy elzáró vérrögök, trombusok különösen a szívben és az agy területén közvetlen életveszélyt okoznak. A trombólízis okai igen változatosak, a sokféle kóroktani tényező azonban három támadásponton érvényesülhet: az érfalon, a véráramlásban és a vér összetételében fellépő változás vagy ezek kombinációja indítja meg a trombus képződését, amelynek növekedésében - sok más tényező között - döntő szerepet a trombin, az alvadási folyamat kulcsenzime játszik. Ebből következik, hogy a trombin specifikus gátlása döntő tényező a trombólízis gyógyszeres megelőzésében és gyógyításában.

Bár a vérárvadás és a vérrögoldás biokémiai történéseire vonatkozó ismereteink az utóbbi negyedszázadban is alapvető felismerésekkel gyarapodtak, a trombólízis megelőzésére és gyógyítására világszerte ma is a század első felében bevezetett antikoagulánsokat, a heparint és az ún. orális antikoagulánsokat (dikumarin- és indandion-származékok) használják. Ezeknek hatékonysága, nem ritkán életmentő szerepe évtizedek során bizonyítást nyert, egyidejűleg azonban kedvezőtlen, nem kívánatos mellékhatásaikra is fény derült. Ezért érthető és indokoltak azok a törekvések, amelyek a meglevőknel specifikusabban ható és enyhébb mellékhatásokkal járó alvadásgátló molekulák tervezését, előállítását és a terápiába való bevezetését tűzték ki célul. A kutatások egyik fő iránya természetes eredetű hatóanyagokra irányul, köztük is elsősorban az *orvosi pióca* (*Hirudo medicinalis*) antikoaguláns hatóanyagára, a hirudinra.

A vérszívó állatok változatos fajai - tetvek, poloskák, szúnyogok, bögölyök, piócák - között mai ismereteink szerint egyedül a piócák (*Hirudinoidea*) hasznosak az ember számára. Köztük is az álkapcsos piócák (*Gnathobdellae*) rendjébe tartozó gyűrűsféreg, az orvosi pióca, amely a legrégebben ismert piócafajta. Nem az egyetlen azonban, amely a hemosztatízisra ható anyagot tartalmaz. Így pl. a délamerikai *Haementeria ghilianii*-ban, az Amazonas vidékén élő piócafajban olyan enzimet találtak - (hementin, molekulatömege 120 kD), amely specifikusan hasítja a fibrinogént és a fibrint, s így alkalmas vérrögoldásra. A *Haementeria lutzi* szintén a trombólízisre hat - a plazminogén aktiválása útján. Mindez úgy gazdagí-

totta a piócákra vonatkozó tudományos ismereteinket, hogy még jobban kiemelte az orvosi pióca specifikus hatóanyagainak, mindenekelőtt a hirudinnak jelentőségét.

Ez a tanulmány összefoglaló és értékelő ismertetést kíván adni az orvosi pióca hatóanyagairól, a részlet-ismeretek tárgyalásakor áttekintve azt az utat is, amely hasznosságuk felismerésétől - a biotechnológia lépcsőin - a géntechnológiával előállított r-hirudinok gyógyászati alkalmazásához vezet.

Hirudinok

Biotechnika alkalmazása a népi gyógyászatban

Nagyon valószínűnek látszik, hogy a sekély, álló vagy folyóvízbe lépő ember és a pióca első találkozásai a beláthatatlanul messzi múltban történtek. E találkozások keedvező tapasztalatait azután nemzedékek évszázadokon adták tovább. Csak a múlt század vége táján érkezett el annak ideje, amikor az empiria, a felhalmozódott, élő tapasztalat a tudományos érdeklődést is felkeltette: mi okozhatja a piócák bizonyos jótékony hatását egyes betegségekben? *A népi gyógyászatban kialakult biotechnika* nagyon egyszerű volt, s éppen ezért nagyon könnyen megvalósítható mindenki számára, aki élni kívánt vele. A csupán néhány gramm súlyú éhező piócákat a lemosott, majd szárazra törölt testfelületre helyezték; a piócák szemmel is jól láthatóan teleszívták magukat vérrel, közben 2-3-szorosára megnőtt súlyuk; ezután a bőrre ártalmatlan anyaggal eltávolították őket. A népi gyógyászat e meglehetősen széles körűen elterjedt, *egyszerű biotechnikáját* számos európai államban, így hazánkban is törvényesítették azzal, hogy a gyógyszertárakban kötelezővé tették orvosi piócák tartását.

Mai szemmel nézve a pióca - a kölcsönös előnyök jegyében - a lehető legegyszerűbben végzi gyógyhatású anyagok bőrön át való bejuttatását az élő szervezetekbe. A fűrészfogaival ejtett finom sebzés útján egyfelől hatóanyagokat juttat a "megtámadott" szervezetbe, másfelől pedig ezek révén táplálékhoz jut, vért szív. A kölcsönhatás kedvező tapasztalatait a legkevesbé sem befolyásolta az, hogy a hatóanyag(ok) és a hatásmód a legutóbbi időig teljesen ismeretlen volt. Hazánkban például az országos igények kielégítésén túl különleges exportcikké is vált az orvosi pióca, mert a belvizes területekről nagy mennyiségben tudták begyűjteni. Számuk - hasonlóan Európa más országaihoz - a belvizek lecsapolásával fokozatosan és jelentősen

megcsappant s nem véletlen, hogy 1983-ban már veszélyeztetett fajnak nyilvánították. Ugyanakkor - a tudományos érdeklődés erősödésével - csaknem egyidejűleg hozták létre Európa első piócatenyészetét az Egyesült Királyságban (BIOPHARM, UK Ltd).

Laboratóriumi módszerek

Haycraft /1/ 1884-ben elsőként közölte azt, hogy az orvosi pióca nyálmirigyének váladéka antikoaguláns hatású anyagot tartalmaz. Ennek izolálásával többen próbálkoztak már századunk első évtizedeiben is, a törekvések azonban - a fehérjekémia akkori fejlődési foka miatt - nem járhattak sikerrel. Waldschmitz-Leitz /2/ figyelemre méltó adatokat közölt a hirudin proteolitikus enzimekkel szembeni viselkedéséről, a hatóanyag kivonására vonatkozó megállapításai azonban hosszú időre korlátozták az izolálásnak a hozamot döntően meghatározó kezdeti lépését. Döntő fordulat csak az ötvenes években következett be, amikor Markwardt és munkatársai /3/ újra felfedezték a hirudint: a piócák feji részéből kémiai tisztá hirudint állítottak elő és jellemezték a trombinnal való reakcióját. Ezenkívül adatokat közöltek *a hirudin in vivo hatásaira* nézve is, felszívódási és kiürülési viszonyaira és toxicitására. Úttörő munkájuk érdemei vitathatatlanok, kutatásaikat azonban erősen korlátozta az a tény, hogy - minden korábbi izolálási eljárással megegyezően - ők is a piócák feji részét használták kiindulási anyagként, és így *laboratóriumi módszerük* csupán igen kis mennyiségű hirudin előállítását tette lehetővé. A feji részből kiinduló izolálási eljárások közös hátránya az, hogy rendkívül munkaigényesek (ezer és ezer pióca egyenkénti lefejezése!) és alkalmatlanok kémiai homogén hirudin nagyobb mennyiségben való előállítására.

A pióca-hirudin előállítása ipari méretben

Egész piócából mint kiindulási nyersanyagból az első ipari méretű hirudin-eóállítás eljárást a Gyógyszerkutató Intézet Biokémiai osztályán dolgoztuk ki /4-8/. A nyers terméket vizes közegű frakcionálási lépésekkel, adszorpcióval/leoldással nyertük (lásd az 1. ábrát), a tisztítást többlépcsős kromatográfiával végeztük, amit a 2-4. ábra mutat. Eljárásunk végcsoport és ultracentrifugás analízis alapján egyaránt homogén hirudin-végterméket adott. Ennek tudományos jelentősége a következőkben tükröződött: a világ számos, trombóziskutatással foglalkozó laboratóriuma és intézete hozzánk

A hirudin ipari előállításának folyamatábrája

- i A piócák éheztetése (2-4 napig 4-6°C-on)
 - ii Lefagyasztás és tárolás (-20-40°C-on)
 - iii Felolvasztás és darálás az extrahálás előtt
 - 1 Extrahálás vizes közegben
↓ oldhatatlan rész eltávolítása
 - 2 A szennyezések kicsapása etanollal
↓ a csapadék eltávolítása
 - 3 A fölötte betöményítése vákuumban
↓
 - 4 Acetonos frakcionálás
↓ 50 tf%-os acetonos csapadék
eltávolítása
 - 5 Zeolitos adszorpció és elúció
↓
 - 6 Az eluátum betöményítése vákuumban
↓
 - 7 A szennyezések izoelektromos kicsapása pH 4,5-ön
↓ a csapadék eltávolítása
 - 8 Fagyasztott állapotból való szárítás
- TERMELÉS: 80 000-140 000 ATE/kg pióca
SPECIFIKUS ACTIVITÁS: 400-700 ATE/mg fehérje
ATE = antitrombin egység

A nyers hirudin tisztításának folyamatábrája

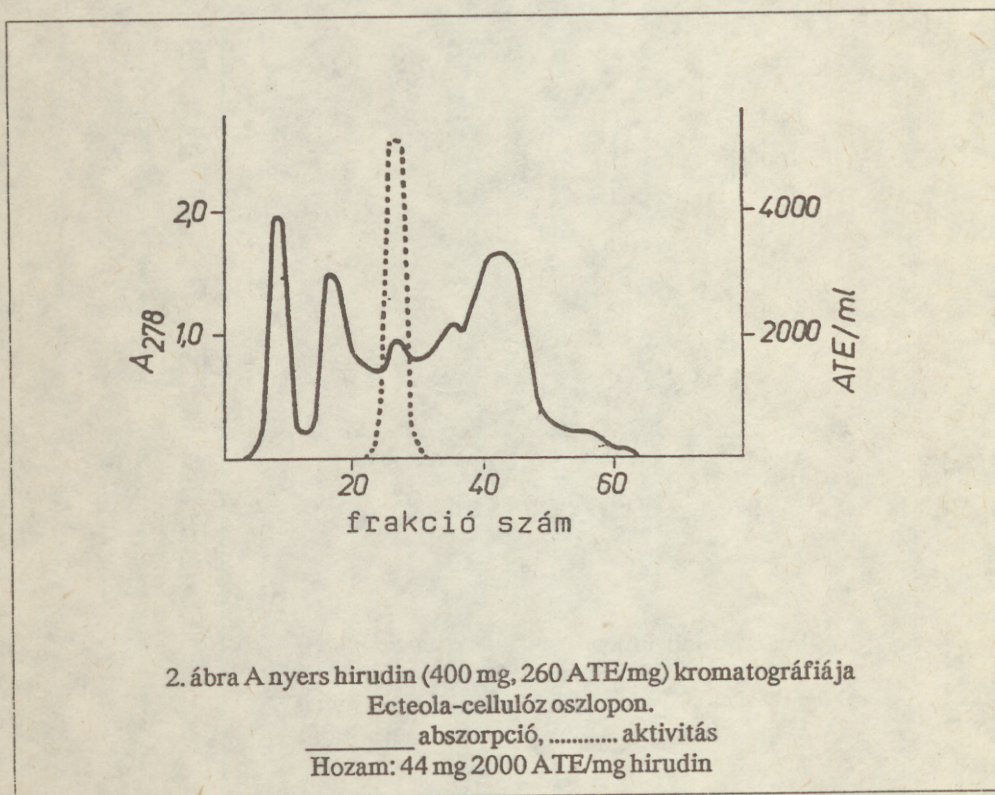
- 1 kromatografálás Ecteola-cellulózon
↓
 - 2 Kromatográfia CM-Sephadex C-25-ön
↓
 - 3 Gélszűrés Sephadex G-75-ön
↓
 - 4 Liofilizálás
- TERMELÉS: átlagosan 70% ATE aktivitás a nyers
hirudinra vonatkoztatva
SPECIFIKUS ACTIVITÁS: 6000-8000 ATE/mg fehérje

1.ábra

fordult hirudinért (köztük a National Institute of Health, USA); a REANAL Finomvegyszergyárban termelt és a Medimpex útján exportált nyers hirudinból új proteináz-inhibitorokat fedeztek fel; a Gyógyszerkutató Intézet nemzetközi tudományos kapcsolatainak új fejezete nyílt meg; nemzetközi tudományos együttműködésben lehetőség adódott a pióca-hirudin első szekvencia-analízisére; felkérésre a *Methods in Enzymology*-ben kerülhetett sor eredményeink összefoglaló közlésére. Az első szekvencia-analízis eredményét (lásd az 5. ábrát) a későbbiek megerősítették, s így lényegében első, kiinduló forrásként is tekinthető a hirudin-gén szintéziséhez.

A hirudin teljes kovalens szerkezete/9/

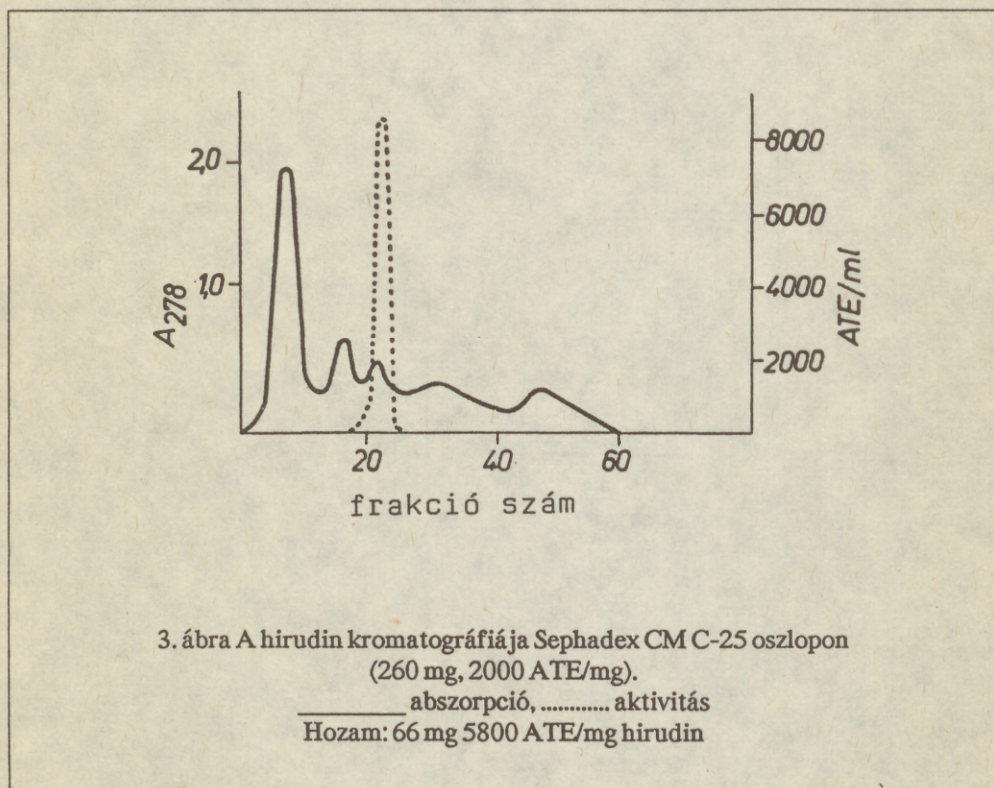
A hirudin, az orvosi pióca trombin-specifikus inhibitora egyláncú, 65 aminosavból álló fehérje, amely három diszulfid-hidat tartalmaz. Ennek a három hídnak a helyét a természetes hirudin termolizines emésztési termékének HPLC-vel kapott tisztin-peptidek szerkezete alapján határozták meg. Kilenc nagyobb fragmensnek aminosavanalízis, N-terminális aminosav- és



szekvencia analízis alapján történt jellemzése nyomán a következő diszulfidhidakat azonosították: Cys⁶-Cys¹⁴, Cys¹⁶-Cys²⁸ és Cys²²-Cys²⁹ (lásd a 6. ábrát). Minthogy más szerinproteázok fehérje-inhibitorával a hirudin sem közeli szekvencia-homológiát, sem szerkezeti topológiai homológiát nem mutat, így új, eddig nem ismert inhibitor családot képvisel.

Izohirudinok

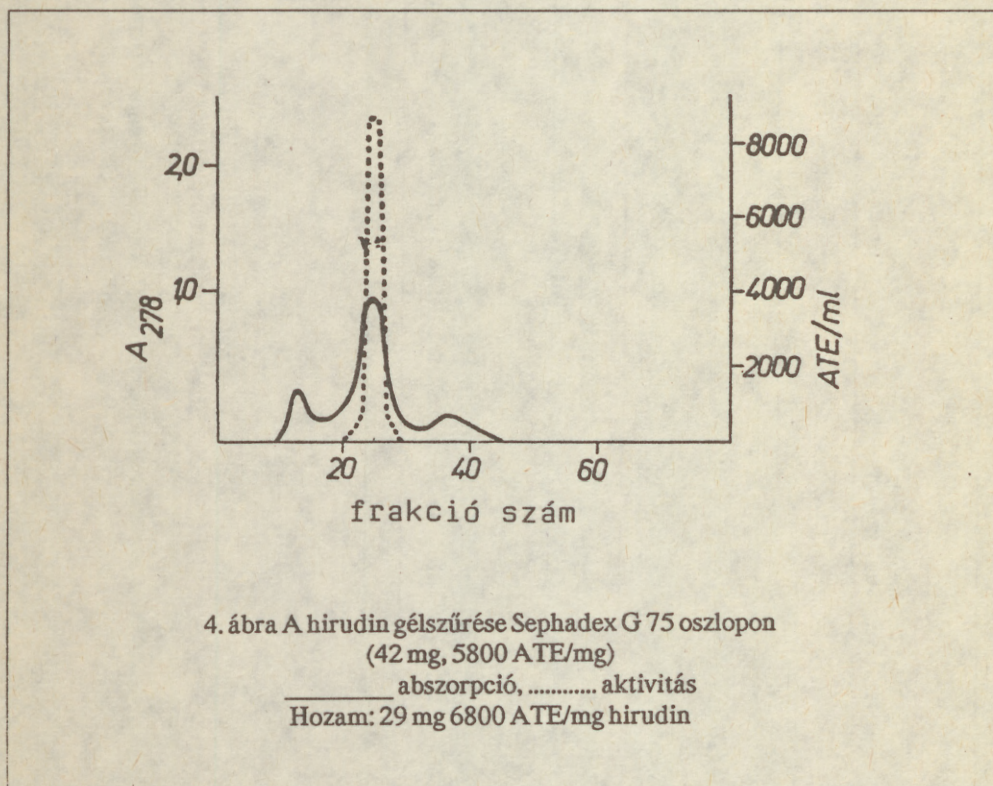
HPLC-vel eddig nyolc izohirudint izoláltak és szekvenáltak. A nagyon közeli rokonságban lévő Val-N-terminálissal rendelkező fehérjéket hirudin-nak, hirudin-1-nek (HV-1), hirudin-2-nek (HV-2) stb. nevezték el, míg az Ile-N-terminálisúakat hirudin PA-nak, hirudin PA-1-nek, hirudin PA-2-nek. Mindezek elsődleges szerkezete nagyon hasonló (lásd a 7. ábrát), az N-terminálisukban mutatkozó különbségen kívül a 34. és 38. pozícióban van eltérés. A HV-1-ben és változataiban Lys₄₇ található, két oldalán Pro-nal. Feltételezik, hogy a molekuláknak ez a része a hirudin "aktív helyeként"

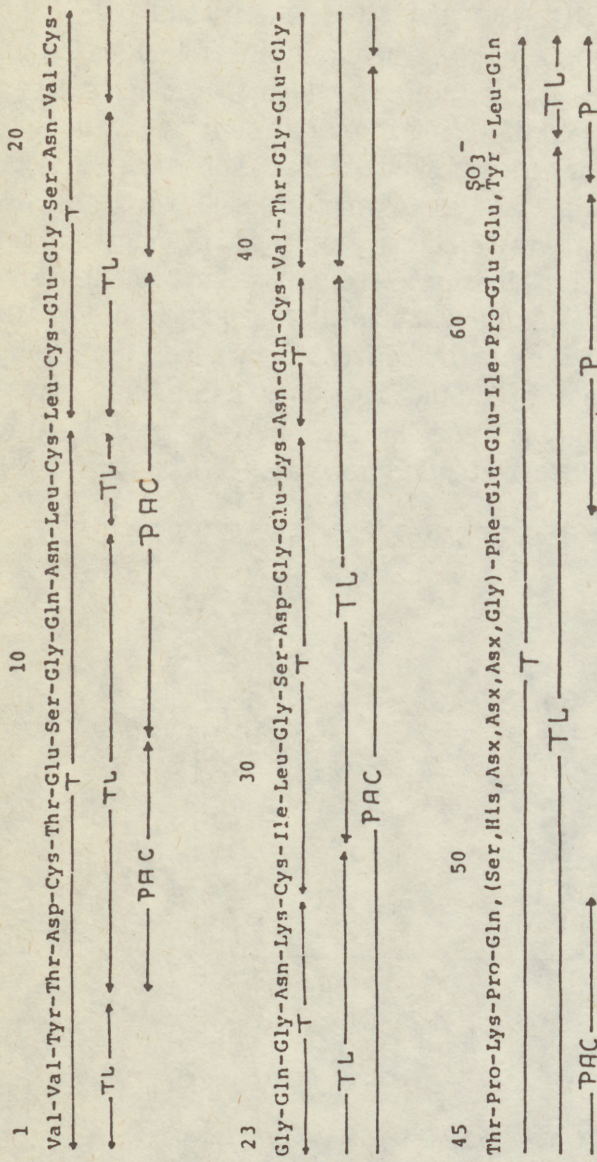


működik. Figyelemre méltó, hogy a Tyr₆₃ a natív hirudin mindegyik variánsában szulfatált.

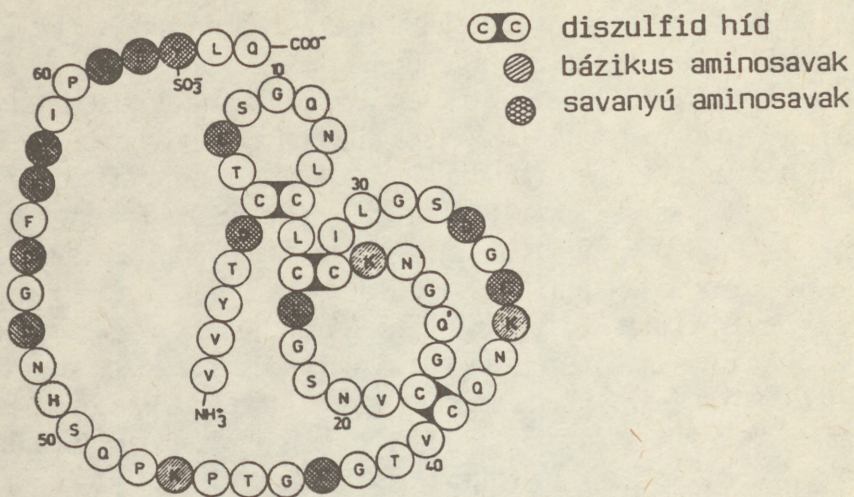
A hirudin-trombin kölcsönhatás

Az egy polipeptidláncú, szénhidrát-mentes hirudin molekula C-terminális része különösen gazdag savanyú aminosavakban, s ezek egy része páronként helyezkedik el. A célenzimbén, a trombinban viszont - ellentétben a hirudin iránt érzéketlen más tripszinszerű enzimekkel - több bázikus aminosavpár, pl. Lys-Lys található. Bajusz és munkatársai /10/ szinтетikus hirudin-fragmensekkel végzett vizsgálatai arra mutattak rá, hogy a hirudin és trombin éppen e csoportok révén ismeri fel egymást. Ez a feltételezés összhangban van Markwardtnak és munkatársainak a hirudin-trombin asszociációs komplexére vonatkozó eredeti elképzelésével. Eszerint a hirudin pH 4-10 között olyan asszociációs komplexeket képez a trombinnal, amelyben a két fehérjemolekula töltéssel rendelkező csoportjai - megfelelő térbeli elrendeződés nyomán elektrosztatikus vonzás útján fedik egymást és ennek





5. ábra A hirudin aminosav-sorrendje
 T - peptidek a redukált, aminoetilált hirudin tripszines emésztéséből
 TL - peptidek a redukált és karboximetilált hirudin termolitikus emésztéséből
 P - peptidek a natív hirudin pepszines emésztéséből
 PAC - a peptikus peptidek perhangyasavas oxidációjával, Staphylococcus eredetű proteázos inkubációjával, majd kimotripszines emésztésével nyert töredékek



6. ábra A hirudin teljes elsődleges szerkezete

Hirudin:	[V V] Y T D C T E S ¹⁰ G G N L C L C E G S N ²⁰
Hirudin PA:	[I T] Y T D C T E S G G N L C L C E G S N
Hirudin:	V C G [Q] G N K C I L G S [D] G [E] K [N] O C V ³⁰ ⁴⁰
Hirudin PA:	V C G [K] G N K C I L G S [Q] G [K] D [N] O C V
Hirudin:	T G E G T P K P Q S H N [D] G D F E [E] P ⁵⁰ ⁶⁰
Hirudin PA:	T G E G T P K P Q S H N [Q] G D F E [P] P
Hirudin:	E [E] [Y] [L] [Q]
Hirudin PA:	E [D] [A] [Y] [D] [E]

7. ábra A hirudin és a hirudin PA aminosav-sorrendje.
 A bekeretezett részek a változó pozíciókat jelölik.
 Y = tirozín-O-szulfát.

következtében mindkettő elveszti biológiai aktivitását. Az asszociációs komplex képzésében a hirudinnak szabad karboxilcsoportjai, fenolos hidroxil- és imidazolcsoportjai, a trombinnak pedig szabad aminocsoportjai vesznek részt. Az enzim és az inhibitor közti kötés annyira specifikus, hogy az enzimet megvédi a diizopropil-fluorofoszfát denaturáló hatásától (amely közismerten az enzim hatóhelyével reagál). Ismert tény az is, hogy a hirudin molekula savanyú aminosavai oldalláncainak kémiai eszterifikációja vagy a trombin bázikus aminocsoportjainak formaldehides kezelése egyaránt teljesen megszünteti az enzim és inhibitora közti affinitást. A hirudin eszterifikált karboxilcsoportjainak illetve a trombin gátolt aminocsoportjainak hidrolízisével viszont ez visszaállítható. A hirudin alfa-trombinnal képzett stabil, nem kovalens komplexének disszociációja igen alacsony. A gátlás kinetikáját speciális kísérleti körülmények között vizsgálva Stone és munkatársai /11/ a korábban közöltekénél 3 (!) nagyságrenddel alacsonyabb K_i -értéket számítottak: $K_i = 20 \text{ fmol/L}$. E vizsgálatok szerint az enzim és inhibitora közti reakció két lépésben történik. Az elsőben a fent vázolt sókötések jönnek létre ionos kölcsönhatások útján. A második lépésben, amit feltételezhetően a trombin konformációváltozása indít el, a hirudin az enzim aktív helyéhez kötődik.

A *hirudin másodlagos szerkezetének* analízisére és a trombinnal való kölcsönhatásának mechanizmusára vonatkozó legújabb vizsgálatokat cirkuláris dichroizmus (CD) spektrumok felvételével végezték /12/. Megállapították, hogy a hirudin és az alfa-trombin komplex-képződése alatt a CD spektrumban bekövetkező változások erősen konformációváltozásokra utalnak, s ezek az enzimet és az inhibitora is érinthetik. A trombin-hirudin komplex CD-spektruma nem additív jellegűnek bizonyult (az additivitástól való eltérés gamma-trombinnal végzett kísérletben csökkent). A trombin-hirudin keverék gélszűrése nem mutatott 1:1 arányú komplexnél nagyobb molekulaformákat, de a szabad hirudin gélszűrése multimer formára utalt. A kísérletekben egy szintetikus trombin inhibitora, a D-Phe-Pro-Arg-CH₂Cl-t és annak nem inhibitor analógját, a D-Phe-Phe-Arg-CH₂Cl-t is vizsgálták. A kötési folyamat kooperatív természete annak tudható be, hogy a trombinmolekulák a multimer hirudinhoz kapcsolódnak s ezt követi a disszociáció 1:1 arányú komplexekre.

Hirudin vizsgálati módszerek

A hirudin mérésére kidogozott eljárások elve és érzékenysége egyaránt igen különböző. Ennek megfelelően felhasználási területük is különböző.

A *biológiai módszer* (trombin-titrálás) az első és legegyszerűbb eljárás, amelyet ma is több változatban használnak - elsősorban *in vivo* inhibitor-hatás megítélésében. Alapja az, hogy a trombin és hirudin specifikus reakciója ekvimoláris és az enzim rendkívüli affinitása nagyobb az inhibitorhoz, mint természetes szubsztrátumához, a fibrinogénhez. Ebből következőleg a hirudint, fibrinogént és trombint tartalmazó reakcióelegyben mindaddig nem következik be változás, azaz alvadás, amíg a hirudin feleslegben van jelen. Más szóval a hirudin fibrinogén mint indikátor jelenlétében trombinnal titrálható. A hirudin aktivitását a trombin NIH (National Institute of Health, USA) egységeiben kifejezett értékére vonatkoztatjuk: 1 ATE (antitrombin egység) az a hirudin mennyiség, amely 1 NIH trombin egységet inaktívál. A mérés hitelességének előfeltétele a nemzetközi trombin standard alkalmazása. A biológiai módszer széleskörűen alkalmazható.

A *kromogén szubsztrátumot* használó módszer(ek) kizárólag a trombinra kifejtett direkt hatását méri a tiszta hirudinnak vagy a plazma hirudin tartalmának $\leq 0,6 \mu\text{g/ml}$ koncentrációkban, - illetve $0,1 \text{ ATE/ml}$ hirudin koncentrációban.

¹²⁵I hirudint farmakokinetikai vizsgálatokban használnak állatkísérletekben hirudin meghatározására. A vizsgálandó plazma vagy más testfolyadék mintát trombin-agaróz minioszlopon engedik át, a megkötött radioaktivitást hirudinkoncentrációra számítják át - a térfogat és a bevitt ¹²⁵I hirudin radioaktivitásának megfelelően. A mérés határát a specifikus radioaktivitás szabja meg.

A *radioimmuno-bioassay* szintén trombinkötésen alapszik és emberi trombinnal nyúlban termelt antitestek alkalmazásával fejlesztették ki. $2-3 \text{ ng/ml}$ hirudinkoncentráció kimutatására alkalmas, így érzékenységét tekintve az elsők közt van. (Ilyen alacsony koncentrációknak természetesen nincs klinikai-farmakológiai jelentősége.)

Bár a hirudin gyenge immunogén és így nehéz vele szemben antitestet termeltetni, két eljárást is kidolgoztak enzim-immunoassay elvén. A *kompetitív ELISA módszer* vizeletben és pufferoldatokban használható a hirudin kvantitatív mérésére $0,008 - 7,7 \mu\text{g/ml}$ hirudinkoncentráció határok között. A legújabban kifejlesztett "*catching ELISA módszer*" gyors, érzékeny és

reprodukálható eljárás a hirudin plazmában való mérésére is. Érzékenységeben minden korábbi módszert felülmúl, nem zavarja a vizsgálati minták egyéb paramétereit, alkalmas a hirudin lokális és parenteralis adása utáni farmakokinetikai vizsgálatokra. Plazmában 0,2-25 ng/ml, vizeletben 0,8-200 ng/ml, pufferoldatban 0,1-12,5 ng/ml koncentrációhatárok között mér.

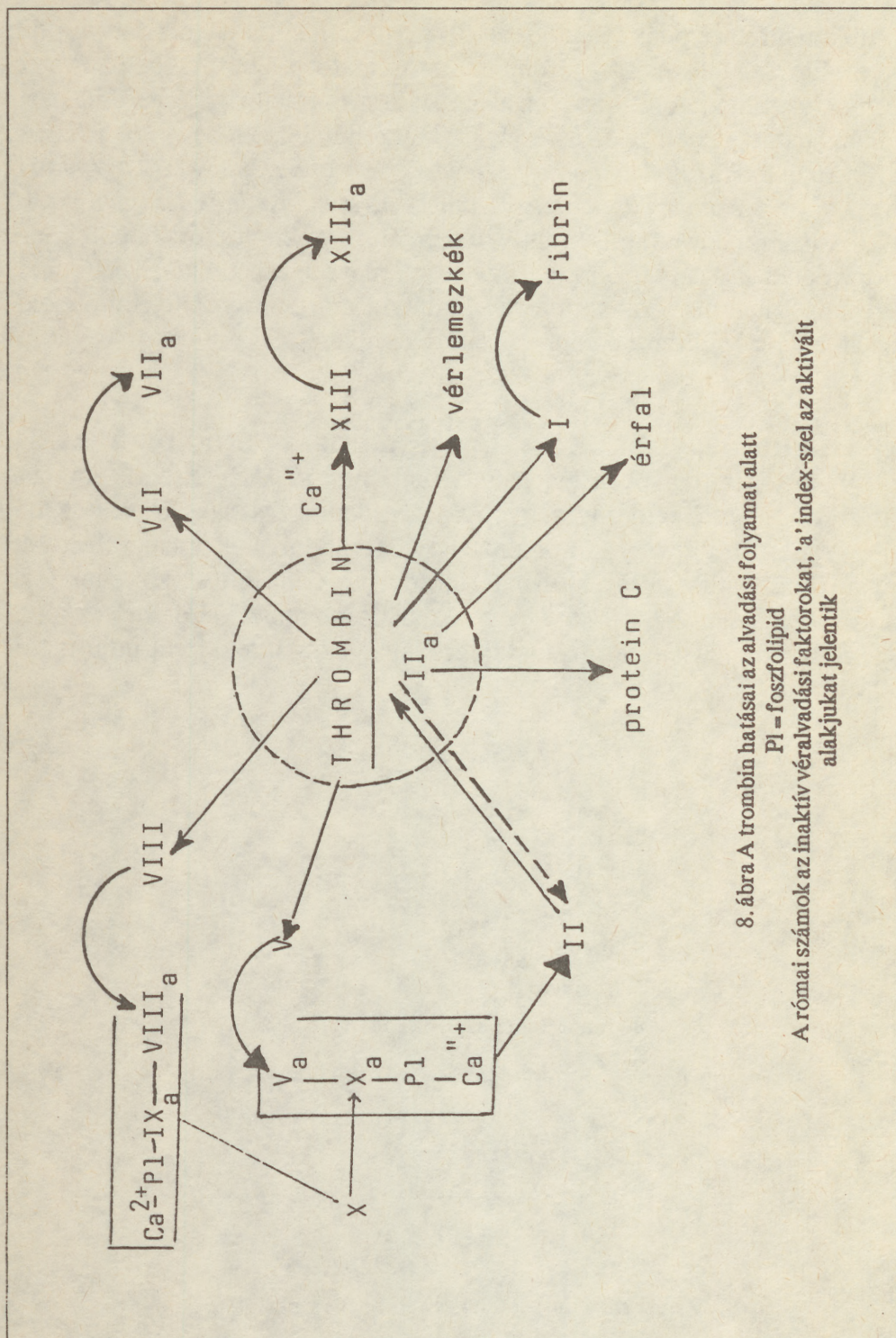
Klinikai-farmakológiai nézőpontból az alvadási próbákon alapuló módszereknek (aktivált parciális tromboplasztin idő, trombin idő - szoros kapcsolatban a trombin-titrálásos módszerrel) az az előnyük a többi módszerrel szemben, hogy a hirudinnak mint antikoagulánsnak a funkcióját méri az adott időpontokban, tehát azt a paramétert, amely a gyógyító orvos számára egyedül igazán értékes.

Farmakológiai hatások

Az *in vitro* erős trombin-inhibitor molekulák *in vivo* hatékonyságát egyfelől a trombinnek a véralvadási láncreakcióban sokoldalúan megerősített kulcsszerepe (lásd a 8. ábrát), másfelől a gátló anyagnak a vér oldott és sejtes komponenseivel lehetséges kölcsönhatásai határozzák meg. A gyógyszerhatástani szempontból optimális (ideális) trombin-inhibitor az enzimnek a véralvadási tényezőkre, a vérlemezkék aktiválására és az érfalra kifejtett helyi hatását egyaránt gátolja anélkül, hogy durván befolyásolná a haemostatikus rendszer dinamikus egyensúlyát és megzavarná más, a vérben és a szövetekben lévő szabályozó rendszer élettani működését. A hirudin - széles körű vizsgálatok alapján - eleget tesz ezeknek a követelményeknek.

Antikoaguláns hatása intravénás és szubkután adás után dózisfüggőnek bizonyult. *Antitrombotikus hatékonyságát* nyúlkísérletekben (endotoxinnal kiváltott disszeminált intravaszkuláris koaguláció) igazolták: i.v. infúziója meggátolta a kontrollcsoportban kialakult veseelégtelenséget, a glomerulusok mikrotrombózisát és a vérlemezkeszám csökkenését. Más állatfajokban is védelmet nyújtott a hirudin infúziója a tüdőben, májban, lépben fellépő mikrotrombózisok ellen. Modellkísérletekben a trombin érfalra kifejtett hatását is kedvezően befolyásolta, bár a lemezkék egy-két rétegének felrakódását a sértett helyen nem akadályozta meg, a lemezke-trombus növekedését jelentősen, a heparinnál hatásosabban csökkentette.

Önkéntes egészséges egyéneken egyszeri i.v. bolus és s.c. hirudin injekcióknak megvizsgálták a véralvadási paraméterekre kifejtett hatását, farmakokinetikáját és az immunallergia lehetőségét /13/. Az alvadási paraméterek változása a hirudin plazma-koncentrációjától függött. A



8. ábra. A trombin hatásai az alvadási folyamat alatt

P1 = foszfolipid

A római számok az inaktív véralvadási faktorokat, 'a' index-szel az aktivált alakjukat jelentik

szubkután felszívódás féléletidejét 75 percnek találták. A beadott hirudin fele változatlan formában - trombinnal titrálhatóan - 24 órán belül a vesén keresztül ürült ki. A hirudin igen alacsony koncentrációi is mérhető antikoaguláns hatást okoztak. A mérések alapján feltételezték, hogy kb. 150 mg, azaz 20 μmol hirudin napi adagja elegendő lesz ahhoz, hogy 500 ng/ml (70 nM) plazma szintet állandósítson, amely az alvadási idő k terápiás értékű megnyúlását váltja ki (pl. az aktivált parciális tromboplastin időt 25 s-sel). Bőrpróbákban és *in vitro* tesztekben (hisztamin felszabadulás, ELISA módszer specifikus humorális antitestek kimutatására) nem észleltek immunológiai reakciót - egyszeri parenterális kezelés után.

Hirudin-peptidek szintézise kémiai technológiával

A pióca-hirudin specifikus trombin-inhibitor sajátosága, szerkezethatás összefüggéseinek felderítése, gyógyászati alkalmazásának a molekula méretével összefüggő egyes problémái egyaránt indokolták annak felvetését: vajon feltétlenül szükséges-e a natív hirudin molekula teljes szekvenciája az antikoaguláns hatáshoz, vagy lényegesen kisebb molekulatöredék is képes gátolni a trombin hatását. A kutatási eredmények, szintetikus hirudin-pepti-

- 1 N^{a} -acetylhirudin₅₄₋₆₅
- 2 hirudin₅₄₋₆₅
- 3 N^{a} -acetylhirudin₅₅₋₆₅
- 4 hirudin₅₅₋₆₅
- 5 [de₂NH₂-Asp⁵⁵]hirudin₅₅₋₆₅
- 6 hirudin₅₆₋₆₅
- 7 hirudin₅₅₋₆₄ amid
- 8 [de₂ NH₂-Phe⁵⁶]hirudin₅₆₋₆₄ amid
- 9 N^{a} -trans-cinnamoylhirudin₅₇₋₆₄ amid
- 10 N^{a} -benzoylhirudin₅₇₋₆₄ amid
- 11 [Tyr⁵⁶]hirudin₅₄₋₆₅
- 12 p-Cl-Phe⁵⁶ hirudin₅₄₋₆₅
- 13 [Pgl⁵⁶]hirudin₅₄₋₆₅

9. ábra Hirudin-peptidek N-terminális szükséglete

dek előállítására, tulajdonságaik *in vitro* és *in vivo* vizsgálatára vonatkozó mai ismereteink röviden a következőkben foglalhatók össze.

A Merrel Dow Res. Inst. kutatói szilárd fázisú szintézissel peptid szériát állítottak elő (a tisztításukat HPLC-vel végezték), hogy meghatározzák a hirudin C-terminális fragmensei számára az optimális N-terminális aminosavat és az 56. pozíció funkcióját. Referenciaként hirudin 54-65-t használtak és a vegyületek antikoaguláns hatását a trombinhatás természetes szubszt-ráton való gátlásával vizsgálták. /14/

Megállapították, hogy az antikoaguláns hatáshoz szükséges minimális szekvencia 56-64, és L-aromás aminosav szükséges az 56. pozícióban. A referencia vegyülethez (2) viszonyítva, aktivitását 100-nak véve az 1, 3, 4, 5, 6, 7, 11 és 12 számú peptid sorrendben a következő aktivitásokat mutatta: 70, 72, 53, 219, 12, 16, 112 és 29. A vegyületek IC₅₀ értékeit a következőknek találták: 5.3, 3.7, 5.2, 7.1, 1.7, 34.0, 23.4, 3.3 és 12.6 µM. A 8, 9, 10 és 13 számú peptid nem mutatott antikoaguláns hatást.

Krstenasky és munkatársai a pióca-hirudin C-terminális régiójának alapján terveztek és szintetizáltak konformációjukban korlátozott peptid-antikoagulánsokat. *Diszulfid-híddal ciklizált gyűrűs peptideket* állítottak elő, amelyek a trombin nem enzim (katalitikus) helyéhez kötődve gátolják a

#	Sequence	Suc - N ^{alfa} -szukcinil
1	DFEEIPEEYLQ	# - C-terminális amid
2	DFEEIPEEYLA	-ol - C-terminális alkohol
3	DFEEIPEEYLA-ol	No.4 - D-aminosav
4	DFEEIPEEYL-ol	
5	DFEEIPEEYL#	
6	SucYEPIPEEAFQ	
7	SucYEPIPEEAFQ#	
8	SucYEPIPEEAFE	
9	SucYEPIPEEAFK	
10	SucYEPIPEEAFK#	
11	SucYEPIPEEAFK#	

10. ábra Az 54-56-deszulfato-hirudin C-terminális peptid-alkohol, sav és amid-analógjai

fibrinogén hasítását. Az inhibitoroknak több konformációs modelljét vették számításba. Egy alfa-helikális modell alapján tervezett vegyületek között több olyan ciklikus analógot találtak, amelyek megőrizték antitrombin aktivitásukat.

A (D-Cys⁵⁸, Cys⁶¹)-hirudin₅₄₋₆₅ és (D-Cys⁶⁰, Cys⁶³)-hirudin₅₄₋₆₅ IC₅₀ értéke 26, ill. 30 µM volt *in vitro*, szemben a lineáris hirudin 3.7 µM-os értékével. /15/

Ugyanez a munkacsoport a hirudin₅₄₋₆₅ antitrombotikus peptidje C-terminálisának módosításával további széria-analógot szintetizált. /16/

A peptid-analógok antikoaguláns hatását *in vitro* plazmaalvadék képződésének gátlásával mérték. Megállapították, hogy neutrális vagy savanyú aminosav vagy aminoalkohol jelenléte a 65. pozícióban nem okozott lényeges aktivitás-növekedést. A 65. pozíciójú D- vagy L-karboxiamidoknak volt ugyan aktivitása, de lényegesen kisebb a kiindulási molekuláénál. A 65. aminosav elhagyása és a szekvenciák alkohol vagy amid-analóggal való zárása a 65-Ala analóggal hasonló aktivitásúnak bizonyult. Ez arra mutat, hogy a C-végi hidrofíl oldallánc jelentős az inhibitor-aktivitás szempontjából.

Egy kiválasztott szintetikus decapeptid (MDL 28.050) antikoaguláns hatását *in vitro*, *ex vivo* és *in vivo* részletesen tanulmányozták. Ennek a vegyületnek IC₅₀ értéke természetes szubsztráton (fibrinalvadék képződés gátlása plazmában) 150 nM volt. *In vitro* patkány, kutya és emberi plazmán 10-25 µg/ml koncentrációban meghosszabbította a parciális tromboplasztin időt és a protrombin időt, kutyaplazmán azonban lényegesen kevésbé volt hatásos. 2.5-20 mg/kg intravénás adása után kutya és patkányplazmán *ex vivo* dóziszfüggően érvényesült antikoaguláns aktivitása. 10 mg/kg szubkután dózis kétszeresére nyújtotta meg az alvadási időket a fenti próbákban, 20 mg/kg-os dózis hatása 2 órán át tartott. /17/

Szintetikus hirudinpeptidek gátló hatását szintetikus szubsztrátumokon is részletesen vizsgálták egér, patkány, marha, ló és emberi trombinnal szemben. Ezek eredménye szerint a legjobbnak bizonyult származék is jelentősen elmaradt a hirudintól: alvadási próbákban 50-szer gyengébbnek bizonyult. Kitűnt, hogy a gátlás erőssége a trombin eredetétől is függ.

A Biogen Inc. (Cambridge, MA, USA) kutatói a hirudin C-terminális szekvenciáját modellként teintve Tyr-szulfátot tartalmazó dodecapeptideket szintetizáltak (BG 8865). *In vitro* és *in vivo* hatásainak vizsgálata során megállapították, hogy dózistól függően nyújtotta meg az emberi plazma trombin idejét: önkéntes egészséges egyénekét 2.2-4.1 µg/ml koncentráci-

óban 2-3-szorosára. Az aktivált parciális tromboplasztin idő megkétszerezésére 20 $\mu\text{g/ml}$ BG-koncentráció volt szükséges, szemben a heparinnal, amelynek 0.07 egység/ml (= kb. 0.5 μg) mennyisége volt elegendő ugyanekhez. A hatás nem függött az AT III-tól, és az inhibitor-aktivitást nem függesztette fel sem protaminszulfát, sem a PF 4 vérlemezke-tényező. A BG 8865 gátolta a trombinnal indukált vérlemezke-aggregációt, az 5-HT és a TXA₂-képződést. Két betegen nem befolyásolta a heparin által okozott, klinikailag bizonyított vérlemezkeszám-csökkenést. Ezek a hatásai jellemzik a heparinnal szembeni előnyeit.

A trombinnal indukált *ex vivo* aggregáció BG IC₅₀ értéke - 0.25, ill. 0.5 egység/ml alfa-trombinra vonatkoztatva: 0.72 és 2.2 $\mu\text{g/ml}$. 0.25 egység/ml trombinra nézve 1.1 $\mu\text{g/ml}$ BG 90%-nál erősebben gátolta az 5-HT felszabadulást és a TXA₂ képződést. Két heparin által okozott trombocitopeniából felgyógyult egyén vérplazmájában *in vitro* a BG 1.7-55 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban nem váltott ki sem aggregációt, sem TXA₂ felszabadulást - szemben a heparinnal (0.05-0.5 egység/ml) /18/. A heparinhoz hasonlóan gátolta viszont a dodekapeptid a nyulakban trombinnal okozott tüdő-mikroembolizációt. Infúziója felfüggesztette a lemezkék lerakódását, a vérnyomás-emelkedést a tüdőartériában és a kísérleti állat elpusztulását. Ennek alapján használhatónak ítélik tromboembóliás betegségek kezelésében. /19/

Szintetikus hirudinpeptid-kutatás napjainkban is folyik, így korai volna értékelést adni fejlesztésükről és alkalmazási lehetőségeikről. Az azonban már ma is világosan látszik, hogy ezeknek a molekuláknak a rekombináns hirudinokkal való sok szempontú összevetésére már a következő években sor kerül. Nagyon valószínű az is, hogy részletesen összehasonlítják majd ezeket a hirudinszerű molekulákat a fejlesztésben lévő, kis molekulásúlyú specifikus trombin inhibitorokkal is. A széles körű összehasonlító tanulmányok eredménye alapján remélhető, hogy a század végére a ma használatban lévőknél specifikusabb hatású, mellékhatásokban sokkal szegényebb, új típusú, megelőzésre és gyógyításra egyaránt alkalmas molekulákkal bővül majd a gyógyszerkincs a trombózisos betegségek leküzdésére.

Biotechnológia alkalmazása hirudin előállítására

Rekombináns hirudin előállítása és izolálása

A hirudin egyik variánsát kódoló DNS klónozását és expresszióját *E.coli*-ban négy évvel ezelőtt közölték. Harvey és munkatársai [20] éhező piócák feji részéből tisztítottak mRNS-t, és ebből komplementer génbankot alkottak. Összesen kilenc pozitív klónt izoláltak. Közülük a legnagyobbat pTG717-nek nevezték el és ezt használták expresszióra *E.coli*-ban a rekombináns hirudin (r-hirudin) termelés kezdeti lépéseként. Expresszió után a sejtek lizátumában mutatták ki az antitrombin aktivitást. A hatóanyag izolálása előtt erősen savanyú pH-n és magas hőmérsékleten távolították el a baktériumfehérjéket; ez a kezelés nem károsította a hirudint, amelyet végül affinitáskromatográfiával tisztítottak. Az izolált r-hirudin variáns, a rekombináns r2 (HV-2) cDNS által meghatározott aminosavsorrendje jelentősen különbözött az egész piócából nyert hirudin 1 (HV-1)-től, amelynek N-terminálisa Val-Val-. A leginkább figyelemre méltó különbség az r2 (HV2) variáns és a természetes inhibitor között a 47. pozíciójú Lys cseréje Asn-ra.

A bioszintetikus hirudin előállítását ismertető első tanulmányt [21] szintén 1986-ban közölték Cornelia Bergmann és munkatársai. A hirudin aminosavsorrendje alapján kémiai szintézissel készített oligodezoxinukleotidok enzimes kapcsolása útján nyerték az inhibitor fehérjét kódoló DNS-t. A 226 bázispárt tartalmazó szintetikus gén hordozta a transzláció megkezdéséhez és befejezéséhez szükséges jeleket. A szintetikus gént *E.coli*-ban expresszálták fúziós fehérjeként beta-galaktoszidázzal a *lac*-promoter kontrollja mellett, így egy nem-hibrid fehérjét a λ P_L promoter kontrollja mellett. A nem-fúziós gén kifejeződésének egyik fehérjéje a természetes eredetű hirudinhoz hasonló biológiai sajátosságokat mutatott. A hirudin nemcsak a sejt-kivonatokban, hanem a táptalaj felülúszójában is kimutatható volt, és a fölöttesből nyert inhibitor specifikus aktivitása kétszer nagyobb volt, mint a sejt-kivonatból kapotté. Az izolálás technológiai optimalizálására vonatkozó kísérletekből mégis azt a következtetést vonták le, hogy az *E.coli*-ban expresszált hirudin-aktivitás hozama alacsony s nem kedvező az ipari méretű termelés gazdaságossága szempontjából. Ezért tértek át alternatív szekréción rendszer alkalmazására: a HV-1 deszulfatált hirudin variánst élesztőben (*S. cerevisiae*) expresszálták, s ez jó hozammal tette lehetővé a rekombináns hirudin termelését az extracelluláris közegből. A trombin specifikus inhibitor kb. 10 mg/l koncentrációban halmozódott fel az élesztő

sejtkultúra folyékony táptalajában (s csak kisebb része maradt a sejtekhez kapcsoltnak)./22/

A táptalajból kromatográfiás módszerekkel kémiailag homogén formába tisztított, biológiailag aktív fehérjét összehasonlították az enzimesen deszulfatált hirudinnal: fordított fázisú HPLC-vel gélszűrővel, ioncserés kromatográfiával, poliakrilamid-gélelektroforézissel és ioncserés fókuszálással analizálták mindkét peptidet. A polipeptidek szerkezet-analízise kiterjedt a molekulásúly meghatározására, aminosavanalízisre és mikro-szekvencia analízisre is. Mindegyik kromatográfiás módszer és elektroforetikus analízis megerősítette a rekombináns és a referencia deszulfatált hirudin azonosságát. Mind a 65 aminosav és sorrendjük azonosnak bizonyult. Az N-terminális aminosavsorrend megegyezett a természetes HV-1 variánséval: Val-Val. Az intakt rekombináns hirudin molekulásúlyát 6963.44 Dalton-nak mérték (a számított érték 6963.52). Az r-HV-1 és a kontroll deszulfatált HV-1 biológiai aktivitása is megegyezett, s ez erős bizonyítéka annak, hogy a rekombináns hirudin nem szenvedett poszt-transzlációs módosítást és kiválasztása helyes konformációban történt, beleértve mindhárom diszulfidhidat. (Kis mennyiségben csökkent antitrombin aktivitású melléktermékek is képződtek. Ezeket az analízis rövidült molekuláknak azonosította, kitűnt, hogy C-terminálisukból 1-2 aminosav hiányzott). /23/ A diszulfidhidak alapvetően fontosak az inhibitor antitrombin funkciója szempontjából: oxidációjuk vagy redukciójuk csökkenti, ill. megszünteti ezt a funkciót. A C-terminális közelében a természetes hirudinmolekulákban mindig jelenlévő tirozil-O-szulfát funkciója viszont nem tisztázott. Tény csupán az, hogy a rekombináns hirudinok mindeddig deszulfatálnak bizonyultak.

A rekombináns hirudin-variánsok tisztítására különböző eljárásokat írtak le. Közös jellemvonásuk azonban az, hogy mind a fermentléből való izolálást, mind a nyerstermék tisztítását több lépésben végzik: az izolálást általában hagyományos műveletekkel, a tisztítást pedig speciális kromatográfiás módszerek alkalmazásával /24/.

Szerkezet és hatás összefüggésének vizsgálata

Német és amerikai kutatók egy csoportja a rekombináns vad típusú hirudin és a Lys-47-Glu mutánsa szerkezetét oldatban tanulmányozták. Kétdimenziós NMR-technikát alkalmaztak a két hirudin variáns PMR spektrumának meghatározására. Azt találták, hogy a hirudinnak van egy

kompakt N-terminális doménje (1-49 aminosav), amelyet 3 diszulfidhíd tart össze, és egy rendezetlen C-terminális farka (56-65 aminosav), amely nem takarja be a fehérje maradék részét. 32 struktúrát számítottak mind a vad típusú, mind a mutáns hirudinra. A trombinhoz való kötődésben 10-szeres különbséget észleltek a vad típus és a mutáns között, nem volt azonban világos, hogy ez szerkezeti különbségnek tulajdonítható-e vagy nem, mert a különbségek olyan kicsik voltak. /25/

Legújabban 2.3 Å-ös feloldásban vizsgálták a rekombináns hirudin-trombin komplex kristályszerkezetét. Megállapították, hogy a hirudin egy globuláris N-terminális doménből és egy hosszú (39 Å), nyújtott, C-terminális doménből áll. A hirudin Ile¹-Tyr³ oldalláncai a trombin Ser²¹⁴-Glu²¹⁷ részével parallel béta-szálat képeznek úgy, hogy az Ile¹ N-atomja hidrogénkötést létesít a katalitikus hely Ser¹⁹⁵ O-gamma-atomjával, de a trombin specifikus kötőzsákja nem vesz részt a kölcsönhatásban. A karboxil-terminális szegmens számos elektrosztatikus kölcsönhatást létesít a trombin anionkötő külső részével, míg az utolsó öt aminosava helikális hurkot alkot, amely sok hidrofób kapcsolatot létesít. Mindent egybevetve: a hirudin 65 aminosava közül 27 4 Å-nél kisebb távolságban érintkezik a trombinnal (10 ionpár és 23 hidrogénkötés). Ilyen nagyszámú kölcsönhatás magyarázhatja a hirudin nagy affinitását és specificitását /26/.

Johnson és munkatársai /27/ új mikrobális expressziós rendszert és tisztítási eljárást dolgoztak ki rekombináns hirudin előállítására. Neutrális pH-n végzett analitikai gélfiltrációs kísérleteik alapján a hirudin multimernek tekinthető. A trombin-hirudin közti kezdeti kötést a hirudin-multimer disszociációja követi és ennek eredményeként 1:1 hirudin-trombin erős kötésű komplex alakul ki. *Génsebészeti eljárást, molekulamodellezést és biokémiai technikákat használtak* a szerkezet-funkció összefüggésének tanulmányozásához. A trombin hirudin-gátlásának mechanizmusa nem kovalens kölcsönhatáson alapszik. A trombin katalitikus helye, apoláris kötőhelye és anionkötő külső helye vesz részt benne. A hirudinnak a trombin specifikus kötőzsákjával való kölcsönhatása nem lényeges a gátló hatás szempontjából. A vizsgálatok szerint a hirudin az endotélhez kötött aktivált X faktorról (X_a) is képes kapcsolatba lépni, "elmozdíthatja" helyéről s ennek révén gátolhatja a protrombin aktiválását *in vivo*. Szintetikus hirudin-peptideket is vizsgáltak és a 42-65, valamint az 51-65 (de nem a 6-28) fragmenseket azonos gátló hatásúnak találták a trombin-fibrinogén reakcióban. Mindhárom fragmens hatástalannak bizonyult azonban egy peptidil-paranitro-anilid szubsztrátumon.

A hirudin trombin-gátlás szempontjából fontosnak vélt régióit helyspecifikusan irányított mutagenézissel is vizsgálták. Az első rekombináns hirudin r2 (HV-2) viszonylag magas K_i értéke feltűnő volt a natív hirudinéval összehasonlítva. Az r2 hirudinban, mint ismert, Asn van a 47. pozícióban Lys helyett. Ennek Arg-ra vagy Lys-re való cseréje az r2 hirudin trombin iránti affinitását több mint egy nagyságrenddel megnövelte. Egy másik rekombináns hirudin r1-ben három bázikus aminosavat cseréltek lépésről-lépésre izoleucinra, illetve glutaminsavra /28/. Kitűnt, hogy csak a Lys-47 cseréje csökkentette a hirudin trombin iránti affinitását. A Pro-48 cseréje Ala-nal nem okozott változást. Kinetikai vizsgálatok alapján kimutatták, hogy a Glu-47 hirudin K_i értéke kb. 10-szer nagyobb, mint a Lys-47 hirudiné /29/. E két mutáns asszociáció sebessége csaknem azonos a Lys-47 hirudinéval (K_{on}); disszociációs sebességük (K_{off}) viszont nagyobb, különösen a Glu-47 hirudiné /30/. A K_i érték megnagyobbodása a Glu-47 hirudinban elsősorban annak tudható be, hogy az asszociáció sebességének hatszoros csökkenésével szemben a disszociáció sebessége csak másfélszeresére nőtt. Más pozíciójú lizinek vagy a His-51 Glu-ra való cseréje nem okozott jelentős változást a K_i értékében. A hirudin C-terminális szerkezetének jelentőségét a Glu-Gln csere tisztázta. A Glu-61 vagy a Glu-63 cseréje 1.6-szorosára, ill. 2.4-szeresére növelte a K_i értékét, ha azonban nemcsak egyetlen csere történt, drámaian csökkent az affinitás. A Gln-57-Gln-58-Gln-61-Gln-62 hirudin csökkent antitrombin aktivitásúnak bizonyult és K_i értéke 60-szor nagyobb volt az r1-hirudinénál. Ezek a kísérletek újból egyértelműen bizonyították ennek a molekulársznek a jelentőségét a trombinnal való kölcsönhatás szempontjából. Lehetséges, hogy a savanyú C-terminális peptid-farok a trombin B-láncának 62-73 szakaszával lép kölcsönhatásba /31/. Az enzimnek ez a 62-73 szekvencia-része nagyszámú bázikus aminosavat tartalmaz. Az e szekvenciával szemben termeltetett antitest csökkentette a trombin hirudin iránti affinitását.

A trombin hirudin-gátlásának mechanizmusára vonatkozó ismereteink alapján megállapítható, hogy ez a mechanizmus jelentősen különbözik a legtöbb természetes eredetű proteináz-inhibitorétól. A hirudin N-terminális, kompakt doménből álló része hidrofób kölcsönhatás útján kötődik a trombinhoz. Bár ez a kölcsönhatás már elfogadott, az enzim kötőhelyének szekvenciáját még nem derítették fel. A molekula N-terminálisával ellentétben a C-terminális régió (50-65) szerkezete NMR vizsgálatok alapján "rendezetlennek" látszik. A két fehérje gyors kapcsolódása a hirudin C-terminális részén megy végbe. Ennek a résznek megváltoztatása, a negatív töltésű

aminosavak eltávolítása mutáció útján a trombin-hirudin komplex disszociációs állandójának növekedését vonta maga után. Kettőnél több savanyú aminosav cseréje már szignifikánsan megnövelte az asszociációs állandót (K_{on}). A Lys-47 mutánsaival kapott eredmények arra utalnak, hogy ez az aminosav valóban a P_1 helyzetű komponense lehet a hirudinnak. Az inhibitor affinitása csak kis mértékben csökkent, de a mutáció nem befolyásolta a specificitást.

A Transgene SA (Strasbourg) és a Sanofi kutatóközpontjának (Toulouse) kutatói a rekombináns hirudin pontmutációit állították elő, amelyek módosítják a trombin-gátlás kinetikáját és az *in vivo* antitrombotikus hatást. A HV-2 hirudin-variánst a HV-2 cDNS *in vitro* helyspecifikus mutagenézisével módosították, hogy HV-2(Asn Lys)-t HV-2(Asn-47 Arg)-t és HV-2(Lys-35 Thr, Asn-47 Lys)-t termeljen. A 35. és 47. pozíciójú aminosav a hirudinnak az ujj és protrombinszerű doménjén belül helyezkedik el, amelyekkel kapcsolatban felmerült az a gondolat, hogy trombint kötő helyek. A módosított polipeptideket szekréciós vektor alkalmazásával *Saccharomyces cerevisiae*-ben szintetizálták és a táptalajfölösztéséből tisztították. Az emberi alfa-trombin: hirudin gátlási reakciónak "steady-state" feltételek között végzett analízise azt mutatta, hogy a HV-2(Lys-47) és a HV-2(Arg-47) disszociációs állandói 4-14-szer alacsonyabbak voltak, mint a nem módosított HV-2-é, míg a Lys-35 mutációja nem jelentősen változtatta meg a gátlás kinetikáját. Ezen túlmenően a HV-2(Lys-47), amelynek szekvenciája azonos a természetes hirudin variánssal, fokozott *in vivo* antitrombotikus hatást fejtett ki: nyulak Wessler-típusú vénás trombózis modelljében 100-szor kisebb ED₅₀ értéket mutatott a HV-2-énél. A kísérletek eredményei alátámasztják a hirudin protrombinszerű doménjének szerepét a trombin-kötésben. Ezen túlmenően bizonyítják, hogy az *in vivo* antitrombotikus hatékonyság összefüggésben van a gátlási reakció disszociációs konstansával /32/.

Az utóbbi két évtizedben számos tudományos intézetben a hirudin kémiai, biokémiai és biológiai megismerésére összpontosult sokrétű kutatómunka természetesen szépszámú szabadalommal védett eljárás közzétételével is járt. A szabadalmi oltalmat nyert eljárásoknak még a felsorolása és vázlatos jellemzése sem lehet feladata rövid, áttekintő tanulmányunknak. A gyakorlatilag minden lehetséges változatot magában foglaló európai szabadalom (hirudin mutánsok és sóik) lényegének ismertetése azonban jellemzésül ideillik (lásd a 11. ábrát).

A-B-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-
C-E-Leu-Cys-Leu-Cys-F-G-Ser-I-Val-
 Cys-Gly-J-Gly-Asn-Lys-Cys-K-Leu-Gly-
 Ser-L-Gly-Glu-M-Asn-N-Cys-Val-Thr-Gly-
 Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-
 Asp-Gly-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-
 Tyr(R)-Leu-Gln

A = Val vagy Ile, B = Val vagy Thr, C = Glu vagy Gln
 E = Asn vagy Asp, F = Glu vagy Gln, G = Asp vagy Gly
 I = Asp vagy Asn, J = Glu, Gln, Asn vagy Lys, K = Ile vagy Lys
 L = Asp vagy Asn, M = Lys vagy Glu, N = Glu vagy Gln,
 R = H vagy SO₃H - (ha J = Gln, akkor L nem Asp).

11. ábra Módosított hirudin-molekulák /33/

A rekombináns hirudinok farmakológiája

A természetes hirudinnal végzett experimentális és klinikai farmakológiai vizsgálatok egyértelműen bizonyították a molekula antitrombotikus hatását. A rendkívül specifikus trombininhibitor a különféle trombózis modellekben (amelyek többé-kevésbé jól utánozták az emberi tromboembóliás betegségek kórélettani mechanizmusát) hatékonyan mutatkozott. Bármely kedvező hatású vegyület azonban csak akkor válhat gyógyszerre, ha

megfelelő mennyiségben áll rendelkezésre. Jóllehet megfelelő ipari eljárás van pióca-hirudin termelésére, megfelelő mennyiségű nyersanyag hiányában - ezen a piócatenyésztés sem segít - ez nem ésszerű. Így a pióca hirudinnal végzett széleskörű farmakológiai vizsgálatok jó előtanulmányként szolgálhattak a rekombináns hirudin farmakológiai sajátosságainak megismeréséhez. Ezeknek tulajdonképpen két igazán lényeges kérdésre kellett választ adniuk: megegyezik-e a rekombináns hirudinok antikoaguláns és antitrombotikus hatása a természetes eredetűével (i) - és ha igen, a rekombináns hirudin alkalmazásának milyen előnyei vannak az évtizedek óta világszerte használt heparinokkal szemben (ii) ? A következőkben a fenti két kérdésre adott válaszok alapján foglaljuk össze a szakirodalomban megjelent tudományos közlemények legfontosabb megállapításait.

Az r-hirudinok és a vérlemezkefunkció

Az r-hirudin (HV-1 és HV-2) hatását a trombinnal kiváltott *in vitro* vérlemezke aggregációra és a vérlemezkek viselkedését alvadásában hirudinnal gátolt emberi plazmában részletesen tanulmányozták. Megállapították, hogy az r-hirudin koncentrációjától függően gátolja mind az aggregációt, mind a trombinnal kiváltott ¹⁴C-serotonin felszabadulást. Jól ismert, hogy az alvadásgátlóként használt citrát a kalciumionok megkötésével alapvetően változtatja meg a vér természetes környezetét, s ez a lemezkeműködésre sem közömbös. A hirudin és a heparin mint alvadásgátlók, nem csökkentik az ionizált kalcium koncentrációját. A hirudinnak azonban a heparinnal szemben az is előnye, hogy közömbös a vér oldott és sejtes komponenseire, míg a heparinok - polianion természetüknél fogva nem, s a vérlemezkek aggregációját is elősegíthetik. Megfigyelték, hogy az alvadásban r-hirudinnal meggátolt vérben nem következett be a vérlemezkek spontán aggregációja, szemben a citrát-, ill. heparinplazmával. A citrátos lemezkedűs plazmával mint kontrollal szemben r-hirudinplazmában minőségileg és mennyiségileg is másnak bizonyult a vérlemezkeknek különböző aggregáló anyagokkal kiváltott válaszreakciója. Így pl. bár az adenosin-difoszfáttal (ADP) indukált aggregáció erőssége megközelítőleg azonosnak mutatkozott a citrát-, heparin- és r-hirudin-plazmában, dezaggregáció leginkább az r-hirudin-plazmában volt megfigyelhető. A heparinnal ellentétben a hirudin nem fokozta a lemezkék ADP-érzékenységét citrát-plazmában. Adrenalin csupán igen enyhe vagy éppen elhanyagolható aggregáció volt kiváltható r-hirudin-plazmában, míg citrát- vagy heparinplazmában kétfázisú aggregáció követke-

zett be. Ezenkívül hirudin-plazmában nem szabadult fel ^{14}C -szerotonin ADP vagy adrenalin-indukció hatására. Viszont a kollagénnel vagy a lemezek aktiváló tényezővel (PAF = Platelet Activating Factor) kiváltott aggregáció és a ^{14}C -szerotonin felszabadulás tekintetében nem volt lényeges különbség a citrátos-, heparinózott és r-hirudin-plazma között. Az r-hirudin ugyanúgy befolyásolta a lemezkeműködést, mint a természetes eredetű, és így kalciumionok jelenlétében teszi lehetővé a vérlemezkék működésének tanulmányozását./34,35,36/

Az r-hirudinok antitrombotikus hatása

Az r-hirudinok (HV-1 és HV-2) antitrombotikus hatékonyságának tanulmányozására ugyanazokat a trombózis modelleket használták, amelyeket a természetes hirudinnal végzett kísérletekben alkalmaztak /37/. A különböző laboratóriumokban végzett vizsgálatoknak egybehangzó megállapítása az, hogy a vérrögképződés részleges vagy teljes gátlásához - az adásmódtól és az ér jellegétől és helyétől függően - egyaránt különböző mennyiségű r-hirudinra van szükség. Az r-hirudin legjobban (legkisebb dózisokban) a *vénás stasis* modellekben és *DIC modellekben* (*disseminated intravascular coagulation* = szétszórt, éren belüli alvadás-) hatott; ezekben alacsony r-hirudin vérszint is elegendőnek bizonyult az alvadás belső (intrinsic) vagy külső (extrinsic) útja aktiválása nyomán keletkező trombin trombus-növelő hatásának gyengítéséhez, ill. felfüggesztéséhez. (1. táblázat). Patkány vénás stasis trombózis modellben intravénás adáskor (iv.) - 0.01 mg/kg, szubkután (sc.) adáskor pedig 0.4 mg/kg értéket (ID_{50}) adták meg az 50%-os gátlás mértékéül /38/. Teljes gátláshoz viszont sc. 1 mg/kg-os dózis volt szükséges /39/. Wistar patkányokon heparinnal végzett összehasonlító kísérletekben /40/ az r-hirudin bizonyult jobbnak nemcsak stasis-modellben (v.cava inferior), hanem trombokináz infúziójával kiváltott mikrotrombózis gátlásában is.

A rekombináns hirudin arteriás és arterio-venosus shunt trombózis modellben is hatásos volt, ezekben azonban nagyobb dózisok voltak szükségesek. Patkányok elektromos árammal sértett a.carotisának trombotikus elzáródási idejét késleltette az r-hirudin, ill. megakadályozta az elzáródást, és arterio-venosus shunt-modellben (extrakorporális keringés) dózisfüggően is ezt észlelték. Az antitrombotikusan hatásos dózisok nem okoztak vérzést. Míg vénás trombózisban 1 mg/kg sc. dózis teljesen gátolta a trombózist, addig arteriovenosus shuntben teljes gátlás 10 mg/kg dózusra

Trombózis modell	Antitrombotikus hatás	Dózis µg/kg/perc	Plazmakoncentráció µg/ml
Trombinnal kiváltott DIC	a mikrotrombózis megelőzése	1.0	0.15 ± 0.05
Vénás trombózis (stasis-indukált)	a trombusképződés megelőzése	8.0	0.62 ± 0.08
Artériás trombózis (elektromos árammal kiváltott)	a trombotikus elzáródás megelőzése	20.0	2.15 ± 0.35
Koszorúér-trombózis (endotél-sértés ezüst-nitráttal)	a szívizom-ischaemia megelőzése	2.0	0.35 ± 0.08
Arterio-venosus shunt trombózis	az elzáródási idő megnégyszereződése	40.0	3.55 ± 0.62

1. táblázat A rekombináns hirudin hatásos dózisaiknak és plazmakoncentrációinak összehasonlítása patkányok kísérletes trombózis modelljeiben /37/ (n = 6 mindegyik modellben - adásmód : i.v. infúzió)

következett be ugyanezzel az adásmóddal. Elektromos árammal végzett endothelsértéssel kiváltott arteriás trombózisban patkányokon szintén 10 mg/kg-os sc. dózis volt szükséges jelentős - 70-80%-os gátláshoz /39, 41/. A koszorúér trombózisának megelőzésére kifejtett hatást nyitott mellkasú, érzéstelenített kutyákon vizsgálták /42/. Folyamatos iv. infúzióban 5 mg/kg/h kezdeti dózis után 2 mg/kg/h dózissal folytatták a kezelést. Ennek eredményeként a konyhasós kontrollokban mért 10.8 ± 1.5 mg-mal szemben a kezelt állatokban 4.5 ± 0.8 mg-ra csökkent a trombus súlya. Ezenkívül csökkent a trombózisos esetek száma is, és kesleltetett a trombózis bekövetkezése. Heparinnal összehasonlító kísérletekben is tanulmányozták a rekombináns deszulfato-hirudin trombin gátlási hatékonyságát sertések érplasztikája alatt képződő akut lemezke-trombus kifejlődésére. A hirudin dózisa 1 mg/kg iv. bolus injekció, majd 1 mg/kg/h infúzió. A kétoldali a.carotis érplasztikát 20 perccel az infúzió után végezték. 1 óra múltán értékelték az eredményeket, és megállapították, hogy a rekombináns hirudin (CIBA-GEIGY, Plantorgan) a heparin legnagyobb dózisának hatását is felülmúlta. Ez arra mutat, hogy arteriás sérüléseknél, mint pl. az akut MI (miokardiális infarktus) érplasztikájában feltétlenül szükség van a trombin specifikus hatásának specifikus gátlására /43/.

Az r-hirudin antitrombotikus hatását a lemezkék és érfal közötti reakció befolyásolására és a következményes trombus növekedésére is tanulmányozták. Három biológiai érfelületen (éryanagok: kollagén típusú szálak /a/, enyhén /b/ és súlyosan /c/ károsított érfal) ellenőrzött áramlási feltételek között tipikus, normális arteriának és beszűkült arteriának megfelelően heparinozott vérrel hasonlították össze az antitrombotikus védőhatást. Megállapították, hogy 1-2 lemezkeréteg felszívódását egyik antikoaguláns sem befolyásolta a súlyos érfalkárosodási anyaggal okozott jelentős trombusnövekedést azonban az r-hirudin szignifikánsan csökkentette - szemben a heparinnal /44/.

Antikoaguláns hatás

Az r-hirudin alvadásgátló hatásának nyomonkövetésére általában azokat a paramétereket alkalmazzák, amelyeket Verstraete és Verwilghen /45/ a heparin és az orális antikoagulánsok klinikai monitorozására ajánlott: az aktivált parciális tromboplastin időt (APTT) és a trombin idő (TT) mérését, nagyon ritkán a teljes véralvadási időt (WBCT) s a protrombin időt (PT). *In vitro* és *in vivo* kísérletek egyaránt igazolták az r-hirudin antiokaguláns ha-

tásának koncentrációtól való függését. Így pl. patkányokban az APTT bázis idő kétszeresére meghosszabbodásához intravénásan 0.3 mg/kg, szubkután 2 mg/kg dózisa volt szükség. Wistar patkányokon a CGP-39393 jelű rekombináns deszulfato-hirudin 2 mg/kg-os egyszeri sc. dózisa után meghosszabbodott APTT értékek 2 órán át voltak mérhetőek /38/. Kutyakísérletekben - a koszorúér trombózis kialakulása késleltetésére, ill. kivédésére megfelelő r-hirudin dózisos a protrombin bázis-időt 2-3-szorosára, az aktívált parciális tromboplastin időt 2-4-szeresére nyújtották meg intravénás infúzió hatására /42/. A teljes véralvadási idő változására nem közöltek adatokat.

Farmakokinetika

A trombózis gyógyszeres megelőzésében és kezelésében elsőrendűen fontos az antikoaguláns és/vagy antitrombotikus hatású vegyület megfelelő vérszintjének fenntartása és ellenőrzése. Az r-hirudin felszívódását, megoszlását és kiürülését különféle fajokon és különböző adásmódokon részletesen tanulmányozták. Az r-hirudin vérszintjének meghatározására biológiai módszert, kromogén szubsztrátos eljárást és radiojód-hirudint egyaránt használtak.

Patkányok on végzett vizsgálatok alapján megállapították, hogy az *intratracheálisan bevitt r-hirudin*nak mintegy 30%-a szívódott fel; a végbélből viszont nem szívódott fel a hatóanyag. Eredménytelenül végződtek a bélből való felszívódásra vonatkozó, kutyákon végzett kísérletek is. A pióca-hirudinnal mintegy 25 évvel ezelőtt végzett saját kísérleteink eredménye alapján ez várható volt, hiszen a hirudin nemcsak pepszines emésztés, hanem triptikus lebontás (bélnedv) hatására is nagyon rövid időn belül inaktiválódott, elvesztette trombin-gátló funkcióját.

Kutyák r-hirudin vérszintje *szubkután adás* után gyorsan emelkedett az első félórán, másfél órán belül elérte a maximumot és dózistól függően órákon át mérhető volt - a használt módszer érzékenységtől függően - olyan tartományban is, amelyben az antikoaguláns, ill. az antitrombotikus hatás már nem érvényesült. Az *intravénásan* adott (i.v. bolus injekció) r-hirudin - hasonlóan a természetes eredetűhöz - kutyákból és patkányokból is viszonylag gyorsan ürült ki /46/. A plazmakoncentráció kezdeti gyors esése a megoszlással magyarázható, ezt elsőrendű kiürülési kinetika követte. Az r-hirudin kiürülésének fél-életideje kb. 1 órára tehető - egyezően a természetes hirudinéval. A *folyamatos i.v. infúzió* 1 órán túl csaknem állandó

vérszintet tartott fenn - már az infúzió kezdetétől eltelt első félóra után. Az infúzió befejezése után az r-hirudin plazma-koncentrációja kezdetben meredeken csökkent, majd viszonylag lassan, az i.v. bolus injekciónak megfelelő féleletidővel.

Míthogy a gyors kiürülés nem kedvez a terápiás hatásnak, az r-hirudint 70 kDa dextránhoz kapcsolták, amely túlnyomórészt az érrendszeren belül oszlik szét. Patkányokban dextrán-r-hirudin adására lényegesen magasabb vérszint volt elérhető, mint az r-hirudin azonos dóziséval. A kiürülési féleletidő 7 órára hosszabbodott meg. Ez azt mutatja, hogy a dextránhoz kovalensen kötött r-hirudin tartózkodási ideje a vérben és így hatásának időtartama is jelentősen megnő. Ugyanekkor - véleményem szerint - nyitott kérdés az, hogy a fehérje-poliszacharid komplex, amelynek molekulatömegét nem köztölték, nem viselkedik-e antigénként; ennek lehetősége ugyanis korántsem zárható ki /47/.

Patkányokból az i.v. vagy s.c. adott ¹²⁵I-dal jelzett r-hirudinnak csak 10-15%-a választódott ki a vizeletbe. 1 mg/kg I-hirudin i.v. injekciója után 5 órával a szervek közti megoszlás viszonylag egységes képet mutatott, bizonyos felhalmozódás csak a vesében volt megfigyelhető /48/. A természetes hirudinnal kutyákon végzett vizsgálatok szerint a molekula farmakokinetikus aktivitása hasonló az emberben észlelthez: az r-hirudin a vesékben - a glomerulus szűrlettel aktív formában ürül: már az első órában 70%-a és 5 óra múltán 95%-a (!). A vizeletből izolált r-hirudin aminosavösszetétele megegyezett a beadott készítményével /49/. Veseírtott kutyákon viszont kimutatták, hogy a kezdeti megoszlás után a vérszint 3-4 órán át állandó marad. Ebből nyilvánvaló, hogy az r-hirudin kizárólag a veséken keresztül és nem más anyagcsereúton vagy kiválasztással ürül ki a szervezetből. E tekintetben - feltételezés szerint szerkezeti különbözősége miatt - túltesz a természetes hirudinon. - Terhes nyulakon végzett vizsgálatok alapján megállapították, hogy a rekombináns hirudinnak a méhlepénybe való átjutása igen csekély.

Az r-hirudin legfontosabb farmakokinetikai sajátosságai emberben megegyeznek az állatkísérletekben találtakkal. Önként jelentkezőknél 0.1 mg/kg i.v. injekciója után gyors kezdeti megoszlást, majd kiürülést figyeltek meg. Az r-hirudin plazmakoncentrációjának időgörbéje legjobban elsőrendű kinetikájú, nyitott kétkompartmentes modellel írható le. Szubkután vagy izomba adott injekcióban ugyanennek a dóziséval az adása után 60-120 percen belül emelkedett a plazma r-hirudin szintje, majd tetőzés után 5 óra elteltével esett a kimutathatóság határa alá. A felszívódás sebességi állandói mindkét adásmódra nézve gyors folyamatot jeleztek, s ez terápiás szem-

pontból kedvezőnek tekinthető. A beadott hirudin nagy része aktív formában ürült a vizelettel /50/.

Verstraete és munkatársai /51/ 60 egészséges önként jelentkező egyénen részletesen vizsgálták a rekombináns deszulfato-hirudin farmakokinetikáját és hemosztatikus hatásait. Megállapították, hogy a készítmény (CGP-39393) i.v. adása dóziszfüggően megnyújtotta az aktivált parciális tromboplastin időt, a trombin időt és az antitrombin szinteket. Nem befolyásolta a vérlemezkék számát és az aggregációt, de csökkentette a szérum tromboxán B₂-t. A vérzési időt 10 közül 5 személyben megnyújtotta. 0.1 mg/kg-os dózisa az APTT legalább kétszeresére hosszabbodott meg az első 10 percen, 0.3 és 0.5 mg/kg dózisa az első 60 percen és 2 órára 1 mg/kg i.v. dózisa. A vegyület immunogén hatását 0.1 mg/kg s.c. dózis adása után 1 hónappal megismételt dózissal provokálták. Kitűnt, hogy az s.c. rekombináns hirudin nem immunogén 60 egyénen.

Mellékhatások és toxikológia

A rekombináns hirudin 1 - 10 mg/kg i.v. dózisban sem a haemodinamiás paramétereket (vérnyomás, pulzus, EKG), sem a légzést nem befolyásolta *kutyák*ban. Nem változtatta meg a vérlemezkék számát, hatástalan volt a fibrinogén szintre. Rágcsálókön végzett vizsgálatok is kedvező eredménnyel jártak: 200 mg/kg i.v. dózis nem okozott elhullást *egérkísérletekben*; az állatok viselkedése nem tért el a normálistól 8 napos megfigyelési szakaszban és az ezt követő kórszövettani feldolgozás sem mutatott ki kóros elváltozást. Negatív eredménnyel járt a *patkányokon* végzett 4 hetes, szubkrónikus toxicitási vizsgálat is, mind a vér sejtsejtes elemeivel, mind néhány enzimszint mérésével összefüggésben; szövettani vizsgálattal sem volt kimutatható elváltozás. Egy hónapnál hosszabb időtartamú adagolás nem váltott ki patkányokban allergiás reakciót. A fenti kísérletekben használt 1 mg/kg szubkután dózis nem jelentősen nyújtotta meg a standardizált eljárással mért vérzési időt többhetes kísérletben sem. Intravénás infúziós kísérletekben (1 óra időtartam) a dózis növelésével megfigyelték a vérzési idő meghosszabodását, ez azonban jelentőssé csak nagy dózisokra - 3.6 - 4.8 mg/kg/h - vált, amelyek 4 µg/ml-nél magasabb vérszintekkel jártak együtt, s ezek lényegesen magasabbak az antitrombotikus hatáshoz szükségesnél. 4 mg/kg szubkután dózis viszont nem okozott jelentős változást a vérzési időben és vérzési szövödmények sem fordultak elő.

Klinikai-farmakológiai tanulmányokban az r-hirudin i.v., s.c. és i.m. beadása után nem figyeltek meg mellékhatásokat sem keringési, sem immunológiai vonatkozásban.

Összefoglalva megállapítható a mellékhatásokra és a toxicitásra vonatkozó kísérletekből, hogy az r-hirudint jól tűrik az élő szervezetek.

A *klinikai alkalmazás* vonatkozásában a rekombináns hirudin előnyei a heparinnal végzett nagyszámú összehasonlító kísérlet eredményeként a következőkben láthatók. (lásd a 2. táblázatot). /52/

A táblázatból világosan kitűnnek az r-hirudin előnyei a heparinnal szemben: a hatás specifikitása és a ezzel szorosan összefüggő kedvezőtlen mellékhatások hiánya tekintetében. Ugyanakkor látszik az sc.r-hirudin biológiai hasznosulásának a heparinéval egyező, viszonylag alacsony volta s rövid biológiai féléletideje. A s.c. hasznosulás alacsony volta - az intravénással szemben egyfelől a szöveti (helyi) proteolitikus enzimek működésének tudható be, másfelől szerepet játszhat benne az r-hirudin molekulatömege is. Emiatt a trombózis megelőzésében aligha lesz fontos szerepe az r-hirudinnak. Rövid ideig tartó terápiás használata azonban az eddigi tapasztalatok alapján ígéretesnek látszik. A heparinnal szemben igen lényeges előnye, hogy hatás-szélessége messze felülmúlja a heparinét, a vérzés veszélye így elhanyagolható. Alkalmazásra kerülhet majd az r-hirudin a szív- és érsebészetben, ahol rövid időtartamú, igen erős antikoaguláns hatásra van szükség. Szívátültetésnél, mesterséges szív használatakor is előnyös lehet klinikai alkalmazása, hiszen a vérlemezkéket nem károsítja még nagy dózisokban sem, ellentétben a heparinnal. Hatását a vérplazma természetes trombin-inhibitorának, az antitrombin III-nak csökkenése vagy akár teljes hiánya sem befolyásolja.

Az *r-hirudin biomedicinális alkalmazásának* lehetőségei azt a területet ölelik fel, amelyen eddig kizárólagosan a heparint használták. Így pl. különböző műtéti eszközök (katéterek, csövek, membránok, extrakorporális eszközök - szív-tüdő pumpák, haemodialízis egységek, vérgyűjtő egységek, mesterséges szívek stb.) bevonására trombusképzést gátló felület kialakítására. Az r-hirudin minderre azért látszik alkalmasabbnak a heparinnál, mert közömbös a vérlemezkékre, és a plazma AT III hiányos állapotában is teljes értékű antitrombotikus hatást fejt ki. Lehetséges - s ezt a jövő dönti el, hogy ehhez hirudin-fragmens(ek) is használható(k) lesz(nek).

Mint laboratóriumi reagens is alkalmazható az r-hirudin, biokémiai kutatásokban és diagnosztikai célokra egyaránt. Alkalmas trombin és protrombin

	hirudin	heparin
Kémiai jellemző	egységes	sok komponensű
Hatásmechanizmus	a trombin specifikus inhibitora nem függ	katalizálja a T-AT III reakciót alapvetően függ
AT-III függés	nincs	csökkenti a heparin hatását
Pf 4 kölcsönhatás	rendkívül rövid	rövid
Biológiai féléletidő	kb. 25%	20 - 30 %
Biológiai hasznosulás /sc/	nincs	jelentős
Érhatás	közömbös	reagál a membrán lipoproteinekkal
Vérlemezekre kifejtett hatás	elhanyagolható	jelentős is lehet a készítménytől függően
Vérzési időre kifejtett hatás	nem szükséges	protaminszulfát
Antidotum		

2. táblázat Az r-hirudin és a heparin összehasonlítása néhány objektív szempont alapján

meghatározására alvadászavarok diagnózisában, az orális antikoaguláns terápia ellenőrző követésére és az alvadási tényezők amidolitikus módszerekkel történő mérésére /53/. A trombin különféle sejtekkel létrejövő kölcsönhatásainak (vérlemezek, limfociták, endotélsejtek, fibroblasztok, monociták/makrofágok, idegsejtek és simaizomsejtek) tanulmányozásában is hasznos a rendkívül specifikus hatású inhibitor molekula alkalmazása.

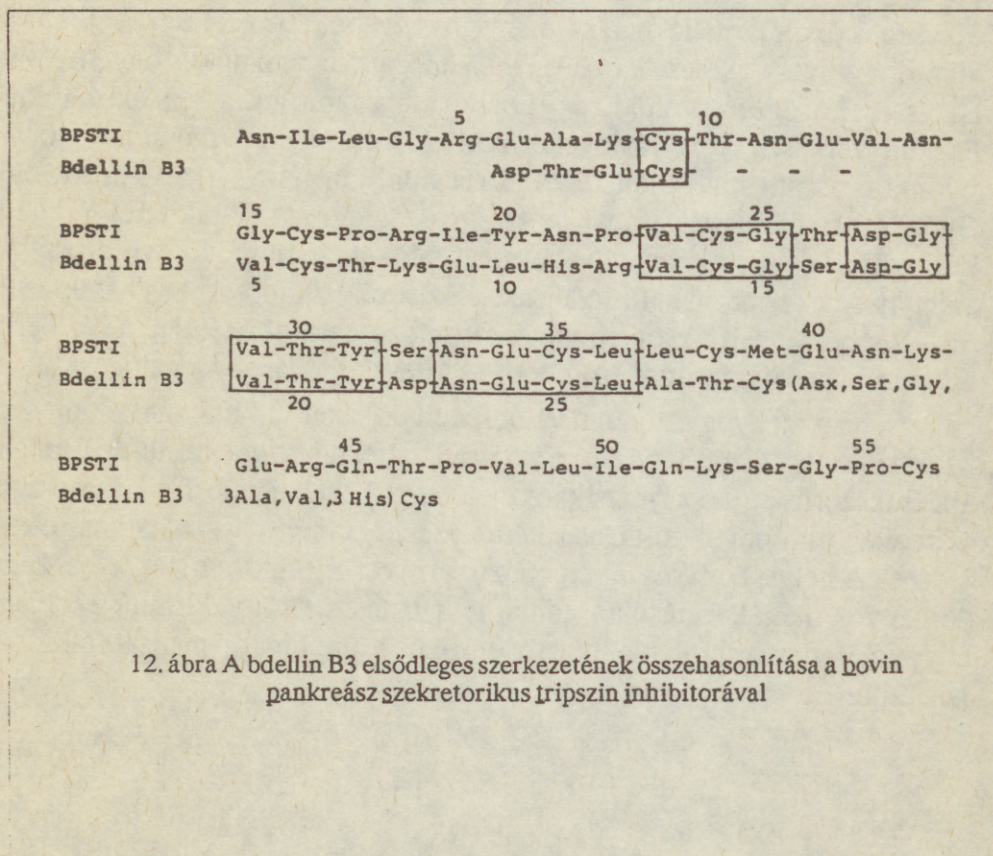
A rekombináns hirudin klinikai alkalmazása a közeljövőben megkezdődhet, hiszen megfelelő mennyiségben áll majd a felhasználók rendelkezésére. A használatban lévő különböző heparinkészítményekkel szemben kétségtelenül előnye a trombin iránti nagy affinitása. Viszonylag rövid félétideje arra utal, hogy inkább terápiásan fogják használni, mint megelőzésre. Tény, hogy intravénásan lényegesen jobban hasznosul a szervezetben, mint szubkután adva (95% - 25%). Az r-hirudin sok tekintetben megfelel az ideális antikoaguláns (antitrombotikummal) szemben támasztott követelményeknek. Gyorsan - 1 órán belül - felszívódik, hatása gyorsan megszűnik adásának megszüntetése után, nem halmozódik fel a szervezetben, nincsenek toxikus mellékhatásai, nem lép kedvezőtlen mellékreakcióba a véralkotórészeivel, így nem károsítja a haemosztázis dinamikus egyensúlyát. Hatás-szélessége nagyon jó, s így hosszú időtartamú adása sem okoz komplikációt, vérzéses szövődeményeket, ami a világszerte használatban lévő hagyományos antikoagulánsokkal kapcsolatban nem ritkán fordul elő. Gyógyászati felhasználásának lehetséges területei: a különböző kóreredetű DIC esetei, az extrakorporális keringés, az antitrombin hiányos állapotok, amelyekben a heparin hatástalan, széptikus sokk-állapotok, a vénás és artériás trombólízis és a tüdőembóliák megelőzése és feltehetőleg a vérrögoldási terápiával összefüggő trombotikus újra-elzáródások megelőzése.

Az r-hirudin gyógyszerként való alkalmazásának határait ma két tényező határozza meg: kizárólagosan parenterális hatékonysága és rendkívül magas ára (sokszorososa a heparinénak). Az előbbi a közeli jövőben biztosan nem változik, az utóbbi biztosan csökken, s ez megkönnyíti használatának elterjedését. A helyspecifikus mutagenézissel nyert hirudin-mutánsok újabb tudományos megállapításokra adnak lehetőséget, nem valószínű azonban, hogy az eredeti hirudin molekula specifikus trombingátló hatását felül fogják múlni.

BDELLINEK

A hatvanas években hazánkban gyártott és exportált nyers hirudinban (REANAL Finomvegyszergyár - Medimpex) Fritz és munkatársai /54/ tripszint és plazmint (fibrinolizint) gátló anyagokat találtak. A pióca görög neve alapján bdellineknek nevezték el ezeket az inhibitorokat, és anioncserélő kromatográfiás viselkedésük alapján két csoportjukat különböztették meg: A és B bdellinek tulajdonságait közölték.

A nyers hirudin-preparátumokból affinitás kromatográfiával és ioncserélő kromatográfiával izolált bdellin A kis ionerősségű (0.1, pH 6.0), a bdellin B nagy ionerősségű (0.5, pH 6.0) pufferoldattal elulálódott. DEAE-cellulózra végzett egyensúlyi kromatográfiával mindkét bdellin-típusnak több formáját különítették el, a leoldási sorrendben A1-A5-nek, valamint B1-B6-nak jelölték ezeket. Köztük a bdellin B-3 bizonyult a legerősebb specifikus inhibitoroknak. (lásd a 12. ábrát)



12. ábra A bdellin B3 elsődleges szerkezetének összehasonlítása a bovin pankréasz szekretorikus tripszin inhibitorával

A bdellin A és B aminosav-összetételében csak a cisztein komponensek számában mutatkozott lényeges különbség. A bdellin A4-ben 10, a B-3 bdellinben 6 Cys-t találtak. Még nem tisztázott, hogy a multimer formák egyetlen molekula bdellin-A-ból és bdellin B-ből származnak-e, vagy pedig a pióca genetikus változatainak következményei, netán minden egyes piócafa jétának megvan a maga géncsaládja minden egyes bdellin számára. A kétféle bdellin család molekulatömegében is eltér egymástól. Gélszűrőssel végzett mérések alapján a bdellin-A-nak 7000, a bdellin-B-nek 5000 a molekulásúlya. A bdellin B-3 aminosavsorrendjének összehasonlítása más természetes eredetű proteínáz-inhibitorokkal azt mutatta, hogy Kazal-típusú inhibitor. Nem tartalmaz prolint és metionint. Reaktív helye a Lys-8: ennek kémiai módosítása az inhibitor-aktivitás teljes elvesztését vonja maga után. A Cys-tartalom alapján valószínűleg 3 diszulfidhíd van a molekulában. /55, 56/

A bdellin-A és -B erős inhibitorai a tripszinnek, plazminnak és a spermiumok acrosin-jának. Szintetikus szubsztrátumokon kimért gátlási állandók 10^{-7} - 10^{-10} M között vannak.

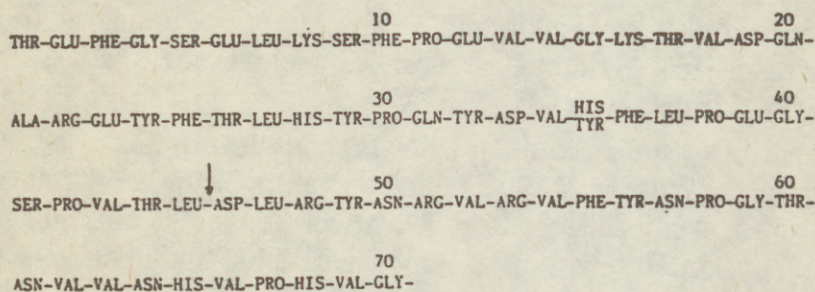
A bdellinek a pióca minden testrészében előfordulnak, legnagyobb mennyiségben azonban a külső nemi szervek tájékán. Ezért feltételezik, hogy a reprodukcióban lehet szerepük. Mivel élettani jelentőségük még ismeretlen, gyakorlati felhasználásukra plazmingátló tulajdonságaik alapján kerülhetne sor -vérzések csökkentésére, megszüntetésére. Erre a célra azonban lényegesen kisebb molekulásúlyú és olcsón előállítható szintetikus antifibrinolitikumok régóta rendelkezésre állanak.

EGLINEK

Egész piócák homogenizátumából izolálták először e különleges proteínáz-inhibitor aktivitásokat mutató kis molekulásúlyú fehér jéket. Szerves oldószeres frakcionálással, gélszűrőssel és ioncserés kromatográfiával két homogén inhibitort állítottak elő, és eglin-b-nek és eglin-c-nek nevezték el őket. Homogenitásukat SDS poliakrilamid-gélelektroforézissel, végcsoport meghatározással és aminosavösszetételük alapján ellenőrizték és deklarálták. Igen kis különbséget találtak köztük. Molekulásúlyuk csaknem azonosnak bizonyult (8073 és 8099), izoelektromos pontjuk is alig eltérő (eglin-b pH 6.6, eglin-c pH 6.45). Mindkét eglin 70 aminosavból álló egyláncú polipeptid, aminosavösszetételük egyetlen helyen tér el. /57/

Közös jellemzőjük a Cys hiánya, s ez szokatlan a szerinproteáz-inhibitorok között. Ugyanis ezek nagy többségének reaktív helye egy diszulfidhurokban van, s ez akadályozza meg a módosított inhibitorban (reaktív hely-hasított kötés) a peptidláncok disszociációját. Egyes esetekben azonban erős, nem kovalens kötés helyettesíti a diszulfidhidat.

Az eglin molekulák aminosav-szekvenciája (13. ábra) a 35. helyzetben lévő aminosavban különbözik. Az eglin-b His-t, az eglin-c Tyr-t tartalmaz. Ez egyetlen báziscserének felel meg (U/C) a DNS-szekvenciában. Nyilvánvaló, hogy a különböző eglinek előfordulását a génen belüli pontmutáció okozza. /58, 59, 60/



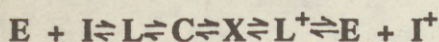
13. ábra Az eglin b (His - 35) és eglin c (Tyr - 35) elsődleges szerkezete. A nyíl a reaktív hely peptidkötését mutatja.

Az eglinek nagyon rideg molekulák, pH 2-9 között 80 °C-on 10 percig teljes biológiai aktivitásukat megtartják. Szilárd harmadlagos szerkezetüket kizárólag nem kovalens erők hozzák létre: hidrogén, hidrofób és ionos kötések, valamint van der Waals kölcsönhatások. Úgy látszik, hogy az N-terminális végén lévő 6 aminosav nem vesz részt a stabilizálásban. Ezt a feltételezést támasztja alá az a megfigyelés, hogy az ezeket nem tartalmazó (7-70) eglinszármazék még gátló hatású.

Az egyező gátlási tulajdonságokkal rendelkező eglin-b és c erősen gátolja a bovin alfa-kimotripsint, a szubtilizint, az ember, ló és patkány neutrofil fehérvérsejtjeinek elasztázát, az emberi és patkány katepszin G-t és a sertés-tüdő eredetű kimázt. Ebből azt a következtetést vonták le, hogy a 35. helyze-

tű aminosav csak közvetve vesz részt a komplex-képzésben. A tirozin- oldalláncok kémiai módosítása csökkentette ugyan az eglin-c inhibitor-aktivitását, változatlan maradt viszont az eglin-b-é; másfelől a hisztidinek módosítása szelektíven az eglin-b aktivitását csökkentette.

Az eglin-proteináz komplex disszociációs állandóját 2×10^{-10} M-nak mérték; így az eglinek igen nagy affinitásukkal tűnnek ki a lizoszomális elasztáz és katepszin G természetes eredetű, kis molekulatömegű inhibitorai közül. Ennek jelentőségét kiemeli az a tény, hogy a neutrofil proteinázok szerepet játszhatnak a tüdőtágulat, továbbá bizonyos gyulladásoz folyamatok és alvadászavarok kóroktanában. *Gátlási mechanizmusukat* tekintve az eglinek reverzibilis, kompetitív inhibitorok. A célenzimmel az alábbi séma szerint képeznek nem-kovalens kötésű komplexeket:



Az ún. standard inhibitorok egy laza köztitermék (L = Michaelis komplex) útján képezik a nem-kovalens, reverzibilis komplexet (C) a célenzimmel (E). Ez a reakció (X = acilenzim-komplex, kovalens komplex) hozza létre a módosított inhibitort (I⁺) a reaktív helyű hasított peptidkötésével. A módosított inhibitor - legalábbis részben - még aktív, mert a diszulfidhíddal stabilizált két peptidlánc konformációja, azaz a reaktív hely területének szerkezete majdnem eredeti állapotában megőrzött (konzervált). Bár az eglinek nem tartalmaznak Cys-t, a fenti standard gátlási mechanizmus lényegében rájuk nézve is érvényesnek bizonyult. /61/

Rekombináns eglin

A neutrofil fehérvérsejtek elasztáza iránti biológiai-orvosi érdeklődés fokozódásával egyidejűleg nőtt az érdeklődés az eglinek iránt is. Figyelembe véve azt a tényt, hogy egy pióca kb. 20 µg eglint tartalmaz, a hatóanyag piócából való kinyerése és ipari méretű előállítása nyilvánvalóan nem járható út. Ezért tűzték ki célul az eglin bioszintetikus előállítását transzformált baktériumokban. Az eglint kódoló 232 bázispárt tartalmazó DNS szekvenciát megszintetizálták, plazmid vektorba helyezték és E.coli-ba vitték be. A szintetikus gén expressziója (kiifejeződése) nagy hozammal sikerült: 400 mg/l (!). A megtisztított rekombináns eglin (r-eglin) fizikai-kémiai sajátágaiban és gátló hatásában megegyezett a természetes eredetű eglinnel, N-

terminálisában azonban eltérés mutatkozott a pióca eredetű eglinétől: a Thr alfa-aminocsoportja acetilezett. Az eglin egyfelől kis molekulatömege, másfelől a diszulfidhíd hiánya miatt igen alkalmas fehérjének bizonyult az E.coli-ban való expresszióra. Ezen túlmenően szokatlanul ellenállóan mutatkozott mind proteolízissel, mind denaturációval szemben. /62/

Farmakológiai és terápiás vonatkozások

Mai ismereteink szerint a gyulladásos kórképekkel együtt jár a neutrofil fehérvérsejtek fehérjebontó enzimeinek kiszabadulása (elasztáz és katepszin G), a vérplazma proteináz-inhibitorainak (pl. alfa₁-proteinázinhibitor) oxidatív denaturáció útján vagy enzimhatásra bekövetkező részleges inaktiválása, továbbá természetes inhibitorok célenzimes komplexelése miatti elhasználása. Mindezek arra mutatnak, hogy a nem-specifikus proteolízis fontos része a gyulladásos kórképeknek. Hatékony elasztáz- és katepszin G-inhibitor adása ilyen esetekben terápiás értékű lehet. Ennek a feltételezésnek a realitását modellkísérletekben igazolták (sertések szeptikémiája, kísérletesen előidézett tüdőtágulat hörcsögökben). Szövetani vizsgálatokkal is megerősítették, hogy az eglin nem okoz változást a tüdő működésében és nem toxikus - szemben a klórmethyl-ke-toncsoportot tartalmazó, kis molekulatömegű szintetikus elasztáz-inhibitorokkal, míg megvédi a tüdőt a becsepegtetett elasztáz hatásától. A kísérleti állatok jól tűrték, nem befolyásolta sem a központi idegrendszert, sem a keringési rendszert, hatástalan maradt mint a komplement, mind a véralvadási multienzim rendszerre. Hatékonyága mellett az is lényeges, hogy viszonylag kis molekulaméreténél fogva nem hordja magában túlérzékenységi (allergiás) vagy immunogén (idegen fehérje) válaszreakció veszélyét. Kedvező, hogy a vese kiválasztó működése nyomán az eglinek gyorsan távoznak a keringésből. /63/

A piócák proteináz-inhibitorai - hirudinok, bdellinek és eglinek - immunológiailag sem rokon molekulák. Előfordulási helyüket a piócában monospecifikus antitestekkel, immunfluoreszcensz technikával állapították meg. Kitént, hogy míg a bdellinek és eglinek az egész testben - nem egyenletesen eloszolva - találhatóak, addig a hirudinok kizárólag a feji rész nyálmirigyében.

A proteináz inhibitorokon kívül más hatóanyagot is izoláltak piócákból. Ezeket - kutatási célokra a BIOPHARM (UK) Ltd forgalmazza.

Ceramid-glikanáz piócából - eddig ez az egyetlen glikoszfinbolipid hasító enzim. Különböző szerkezetű glikánokat hasít, így alkalmas glikán láncok gliko-szfinbolipidekből való általános felszabadítására.

Collagenáz - Calonase EC 3.4.24.7 - Kollagénre specifikus enzim, kimutatható kazein- vagy más fehérjebontó aktivitás nélkül. Molekulasúlya 55 kDa. Érzékeny redukáló anyagokra, hatása Ca-ionoktól függő. Kromogén szubsztátokkal szemben inaktív.

Hementin - *Hementase* - nagy tisztaságú, közvetlenül ható, specifikus fibrinolitikus enzim az óriási Amazonas-piócából (*Haementeria ghilianii*). Nincs plazminogen aktiváló hatása és közömbös más alvadási tényezőkre, továbbá a plazma természetes proteináz inhibitoraira. A stabilizált (kereszt-kötött) és nem stabilizált fibrint egyaránt bontja.

Hialuronidáz - Orgelare EC 3.2.1.36. Molekulatömege 28.5 kDa. Proteolitikus hatástól mentes, hialuronsavra specifikus endo- β -glukuronidáz. Heparin nem gátolja hatását. A hialuronsavban belső β -N-acetil-D-glukozamin kötéseket hasít.

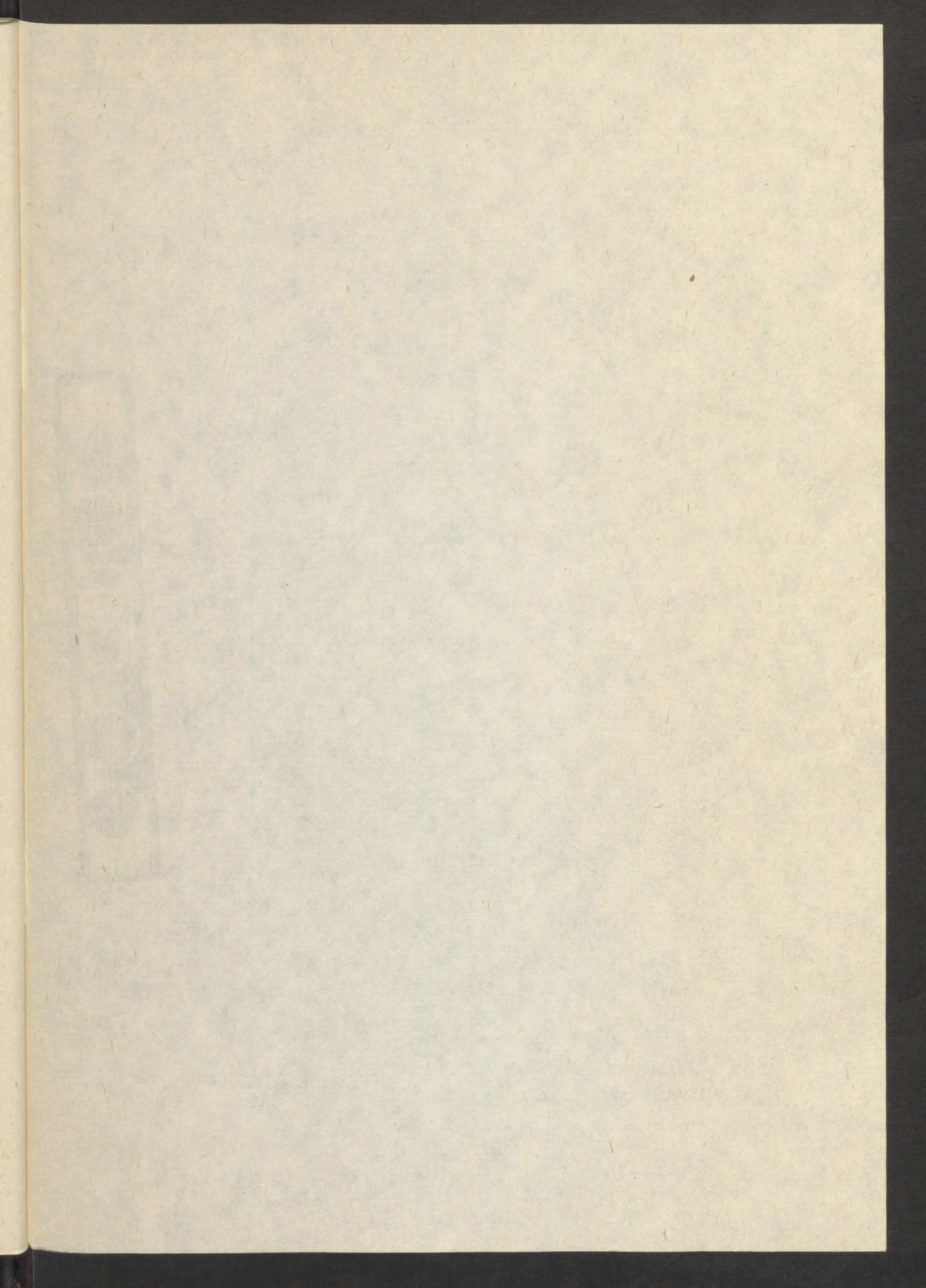
IRODALOM

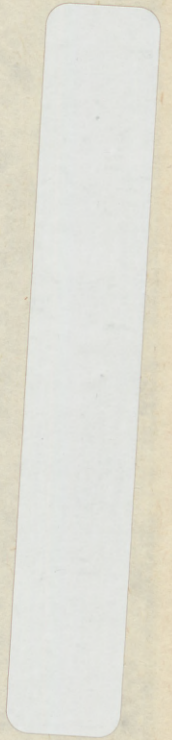
1. Haycraft, J.B. On the action of secretion obtained from the medicinal leech on the coagulation of the blood. *Proc Roy Soc London* 1884, 36: 478-87.
2. Waldschmitz-Leitz, E., Stadler, P., Steigerwaldt, F. Hoppe-Seyler's *Z. physiol. Chem.* 1929, 183: 39-46.
3. Markwardt, F. *Naturwissenschaften* 1955, 42: 537-8.
4. Bagdy, D., Török, S. Eljárás hirudin kinyerésére. 1962. 150 600 1.sz. magyar szabadalom.
5. Bagdy, D., Barabás, É., Jécsay, Gy., Kazi, E. Eljárás hirudin tisztítására. 1965. 152 836 1.sz. magyar szabadalom.
6. Bagdy, D., Barabás, É., Gráf, L. Large scale preparation of hirudin. *Thromb. Res.* 1973; 2:229-238.
7. Gráf, L., Patthy, L., Barabás, É., Bagdy, D. On the N-terminal residue of hirudin. *BBA* 1973, 310: 416-17.
8. Bagdy, D., Barabás, É., Gráf, L., Petersen, T.E., Magnusson, S. Hirudin. in *Methods in Enzymology XLV Part B.* 1976, pp.669-678. Acad Press, New York.
9. Dodt, J., Seemüller, U., Maschler, R., Fritz, H. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 1985, 366: 379-85.
10. Bajusz, S., Fauszt, I., Barabás, É., Diószeghy, M., Bagdy, D. in *Peptides, Proc. 18th Eur. Pept. symp.* 1984, pp.473-476. Almquist er Wiksell Internat. Stockholm.
11. Stone, S.R., Hofsteenge, J. *Biochemistry* 1986, 25: 4622-28.
12. Konno, S., Fenton, J.W.II., Villanueva, G.B. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988, 267: 158-66.
13. Bichler, J., Siebeck, M., Fichtl, B., Fritz, H. *Thromb. Haemostas.* 1989, 62: 533-540.
14. Owen, T.J., Krstenansky, J.L., Yates, M.T., Mao, S.J.T. *J. Med. Chem.* 1988, 31: 1009-11.
15. Krstenansky, J.L., Owen, T.J., Yates, M.T., Mao, S.J.T. *BBA* 1988, 957: 53-59.
16. Krstenansky, J.L., Payne, M.H., Owen, T.J., Yates, M.T., Mao, S.J.T. *Thromb. Res.* 1989, 54: 319-25.
17. Broersma, R.J., Owen, T.J., Payne, M.H., Yates, M.T., Mao, S.J.T. *Thromb. Haemostas.* 1990, 63: 208-14.
18. Jakubowski, J.A., Maraganore, J.M. *Blood* 1990, 75: 399-406.
19. Palabrica, T.M., Aronovitz, M.J., Maraganore, J.M., Scott, D., Konstam, M.A. *Circulation* 1989, 80/4/ Suppl. 646.
20. Harvey, R.P., Degryse, E., Stefani, L., Schamber, F., Casevane, J.P., Courtney, M., Tolstoshev, P., Lecocq, J.P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1986, 83: 1084-1088.

21. Cornelia Bergmann, Dodt, J., Köhler St., Fink, E., Gassen, H.G. *Biol.Chem.Hoppe-Seyler* 1986; 367: 731-740.
22. Meyhack, B., Heim, J., Rink, H., Zimmermann, W., Maerki, W. *Thromb.Res.* 1987; Suppl. VII. p.53.
23. Grossenbacher, H., Auden, J.A.L., Bill, K., Liersch, M., Maerki, W., Maschler, R. *Thromb.Res.* 1987; Suppl. VII p.34.
24. Bischoff, R., Clesse, D., Whitechurch, O., Lepage, P., Roitsch, C.J. *Chromatogr.* 1989; 476: 245-255.
25. Folkers, P.J.M., Clore, G.M., Driscoll, P.C., Dodt, J., Koehler, S., Gronenborn, A.M. *Biochemistry* 1989; 28/6/: 2601-2017.
26. Rydel, T.J., Ravichrandan, K.G., Tulinsky, A., Bode, W., Huber, R., Roitsch, C., Fenton, II.J. *Science* 1990:249: 277-280.
27. Johnson, P., Friedberg, R., Sze, P., Winant, R., Almquist, R., Lazar, J. *Thromb.Hae-mostas.* 1989; 62/1/: 328.
28. Köhler, S., Dodt, J. *Folia Haematol (Leipzig)* 1988; 115: 24-29.
29. Dodt, J., Köhler, S., Baici, A. *FEBS Letter* 1988; 229: 87-90.
30. Braun, P.J., Dennis, S., Hofsteenge, J., Stone, S.R. *Biochemistry* 1988; 27: 6517-6522.
31. Noe, G., Hofsteenge, J., Rovelli, G., Stone, S.R. *J.Biol.Chem.* 1988; 263: 11729-11735.
32. Degryse, E., Acker, M., Defreyn, G., Bernat, A., Maffrand, J.P., Roitsch, C., Courtney, M. *Protein Engineering* 1989; 2: 459.
33. Hoechst AG 21.10.88-DE-835815, 26.04.90-EP-364942-A New hirudin polypeptides - useful as thrombin inhibitors.
34. Hoffmann, A., Markwardt, F. *Haemostasis* 1984; 14: 164-169.
35. Glusa, E., Urban, U. *Folia Haematol.(Leipzig)* 1988; 115: 88-93.
36. Walsmann, P., Kaiser, B. *Drugs of Today* 1989; 25/7/: 473-485.
37. Markwardt, F., Fink, G., Kaiser, B., Klöcking, H.P., Nowak, G., Richter, M., Stürzbecher, J., *Pharmazie* 1988; 43: 202-220.
38. Kerry, R., Talbot, M.D., Ambler, J., Peters, R.F., Wallis, R.B. *Abstracts, Xth Int. Congr. on Thrombosis Athens, 1988; No.117.*
39. Ambler, J., Butler, K.D., Kerry, R., Mitchell, A., Peters, R.F., Talbot, M.D. *Circulation* 1989; 80/4/ Suppl. 316.
40. Doutremepuich, C., Deharo, E., Guyot, M., Lailanne, M.C., Walenga, J., Fareed, J. *Thromb.Res.* 1989; 54/5/: 435-45.
41. Talbot, M.D., Ambler, J., Butler, K.D., Findlay, V., Mitchell, K.A., Peters, R.F. *Thromb.Haemostas.* 1989; 6/4/: 77-80.
42. Homeister, J.W., Mickelson, J.K., Hoff, P.T., Lucchesi, B.R. *Circulation* 1989; 80/4/ Suppl. 421.
43. Heras, M., Chesebro, J.H., Penny, W.J., Bailey, K.R., Badimon, L., Fuster, W. *Cir-culation* 1989; 79/3/: 657-65.

44. Badimon,L., Badimon,J., Lassila,R., Heras,M., Chesebro,J.H., Fuster,V.,
J.Am.Coll.Cardiol. 1989; 13/2: Suppl.A., 145A.
45. Verstraete,M., Verwilghen,R. In: Drug Treatment. Principles and Practice of
Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2nd ed. (Avery.G.S.Ed.) 1980;
p.919.
46. Nowak,G., Markwardt,F., Fink,E. Folia Haematol.(Lpz) 1988; 115: 70-74.
47. Richter,M., Walsmann,P., Markwardt,F. Pharmazie 1989; 44: 72-74.
48. Richter,M., Cyranka,U., Nowak,G., Walsmann,P. Folia Haematol.(Lpz) 1988;
115: 64-69.
49. Henschen,A., Markwardt,F., Walsmann,P., Thromb.Res. 1987; Suppl. VII. p.37.
No.30.
50. Markwardt,F., Nowak,G., Stürzebecher,J., Vogel,G. Thromb.Res. 1988; 52: 393-
400.
51. Verstraete,M., Hoet,B., Tornai,I., Stockmans,F., Arnout,J. Circulation 1989;
80/4: Suppl. 421.
52. Walenga,J.M., Pifarre,R., Fareed,J. Drugs of the Future 1990; 15/3: 267-280.
53. Walsmann,P. Pharmazie 1988; 43/11/: 737-44.
54. Fritz,H., Oppitz,K.H., Gebhart,M., Oppitz,J., Werle,E., Hoppe-Seyler's Z.Physiol.
Chem. 1969; 350: 91-92.
55. Fritz,H., Gebhart,M., Meister,R., Fink,E. Proc.Int.Res.Conf. on Proteinase inhi-
bitors, 1970, München. (Fritz,H., Tschesche,H.eds. Walter de Gruyter, Ber-
lin, 1971); 271-280.
56. Krejci,K., Fritz,H. FEBS Letters 1976; 64/1/: 152-155.
57. Seemüller,U., Meier,M., Ohlsson,K., Müller,H.P., Fritz,H. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem. 1977; 358: 1105-1117.
58. Seemüller,U., Eulitz,M., Fritz,H., Strobl,A. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.
1980; 361: 1841-1846.
59. Knecht,R., Seemüller,U., Liersch,M., Fritz,H., Braun,D.G., Chang,J.Y. Anal.Bio-
chem. 1983; 130: 65-71.
60. Chang,J.Y., Knecht,R., Maschler,R., Seemüller,U., Biol.Chem. Hoppe-Seyler
1985; 366: 281-286.
61. Seemüller,U., Dodt,J., Fink,E., Fritz,H. In: Proteinase Inhibitors (Barrett and
Salvesen eds.) 1986; pp.337-359. Elsevier Science Publishers BV (Biomed-
ical Division).
62. Rink,H., Liersch,M., Sieber,P., Meyer,F., Nucl.Acids Res. 1984; 12: 6369-6387.
63. Schnebli,H.P., Braun,N.J. In: Proteinase Inhibitors (Barrett and Salvesen eds.)
1986; pp.613-627 Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division).







FOLIA annyi, mint levél: levél, biotechnológia tárgyában,
melyet valaki Önhöz írt, Kedves Olvasó!

Reméljük, érdekelni fogja, de az is lehet, hogy a sorozat valamelyik száma nem éppen az Ön érdeklődési területe.

A FOLIA BIOTECHNOLOGICA

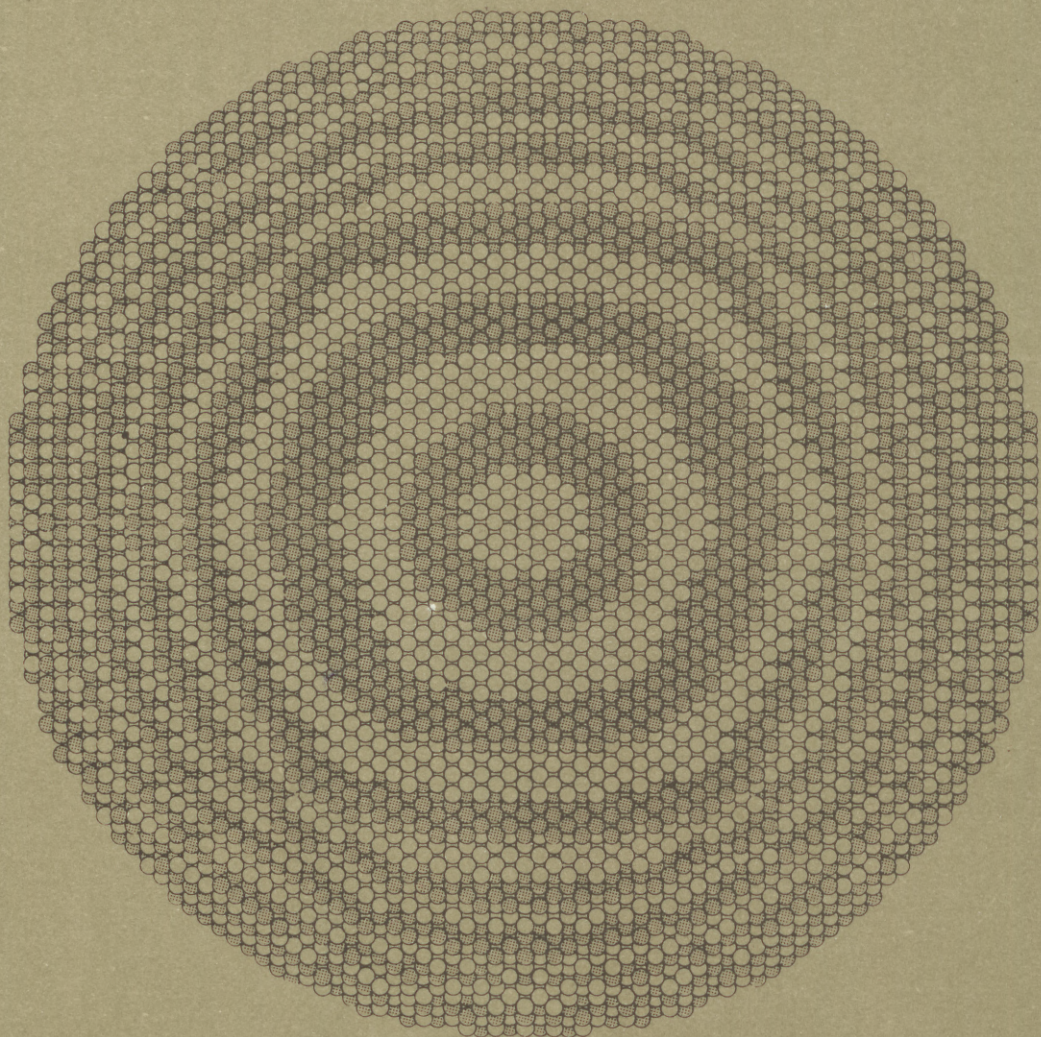
ugyanis különböző szerzők által, különféle témákban írt monográfiásorozat: Az egyik füzet biofizikáról, a másik mikrobiológiáról szól, a harmadik a sejt öröklési apparátusának rafinált manipulálását, a következő tán a fermentáció folyamat-szabályozását vagy a növények mikroszaporítását, esetleg az állatok klónozását tárgyalja és így tovább.

Alighanem nagyon is kevesen lesznek, akik minden számára igényt tartanak, és ez így van jól.

Tessék választani!

A választék olyan bőséges, amennyire a biotechnológia legjobb magyar szakembereinek (jó)kedvéből, erejéből vagy idejéből futja.

3114-3



ORSZÁGOS MŰSZAKI FEJLESZTÉSI BIZOTTSÁG
FEHÉRJE- ÉS BIOTECHNOLÓGIAI IRODA

