◆総説◆

合成インヒビターのデザイン戦略

—二機能性トロンビン阻害剤のデザイン—

津田 裕子*, 岡田 芳男*

Strategy for Development of Protease Inhibitor
—Design of Bifunctional Thrombin Inhibitor—

Yuko TSUDA* and Yoshio OKADA*

Key words: antithrombotic effect, bifunctional thrombin inhibitor, hirudin, nonpolar interactions, nonsubstrate-type inhibitor

はじめに

トロンビン (E.C.3.4.21.5) はセリン酵素に分類されるトリプシン様酵素である。循環血液中では通常不活性型のプロトロンビンとして存在しているが、血管が損傷した時などに活性化されてトロンビンとなる。トロンビンはフィブリノーゲンの Arg-Gly ペプチド結合を切断してフィブリンへと導き、不溶性のフィブリン血栓を形成し、複雑な血液凝固カスケードにおいて中心的役割を果たす¹⁾。さらにトロンビンは第 V 因子、第 VIII 因子を活性化してフィブリン形成を亢進したり、第 XIII 因子を活性化してフィブリンを安定化させ¹⁾、血小板を活性化する等²⁾、血栓形成を促進している。他方、トロンボモジュリンに結合したトロンビンはプロテイン C を活性化することにより第 V 因子、第 VIII 因子を不活性化し、血栓形成を抑制して抗凝固作用も示す。さらに、トロンビンは血中に存在するアンチトロンビン III (ATIII) などにより血中より除去され、血栓形成の動的平衡が保たれている。従って、そのバランスの崩れは血栓

症等の病的状態を引き起こすので、トロンビンを標的にした阻害剤は血栓症の治療薬として、大学、研究所、製薬企業において精力的に開発研究がすすめられている。

構造と機能

ヒルジンはヒルの唾液腺から得られ、65 アミノ酸残基からなるもっとも強力なトロンビン阻害剤である ($K_i = 2.2 \times 10^{-14}$ M)^{6a)} (図 1)^{3)~5)}。

図 1 ヒルジンの構造 (図は BRI・小西康夫博士より提供された)

* 神戸学院大学薬学部 [〒 651-2180 神戸市西区伊川谷町有瀬 518]

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kobe Gakuin University, [Nishi-ku, Kobe 651-2180, Japan.]

ヒルジン (1-65位): $K_i = 2.2 \times 10^{-14} \text{ M}$ 6a)

ヒルジン (1-43位): $K_d = 3.0 \times 10^{-7} \text{ M}$ 6b)

ヒルジン (55-65位): $IC_{50} = 7.1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 6c)

図2 ヒルジンの構造と機能 (模式図)

ヒルジンはフィブリン形成を妨げるばかりでなく^{3)6a)}, トロンビンによる第V因子, 第VIII因子, 第XIII因子, 血小板の活性化も妨げ¹⁾, 抗トロンビン剤として注目された^{7)~9)}. さらに特記すべきことは, トロンビンとヒルジン^{10)~12)}あるいは合成阻害剤¹³⁾との複合体のX線結晶解析やNMRの研究により, トロンビンと阻害剤との相互作用やトロンビンの構造と機能が明らかとなったことである. トロンビンは活性中心(AS)とフィブリノーゲン認識エキソサイト(FRE)の2つの領域を持ち, 2点で基質を認識しうる. ヒルジンのN端ドメイン(1~48位)はトロンビンのASに, 陰イオンに富んだC端ドメイン(55~65位)はFREに, 同時に結合し, ゆえに高い親和性と特異性を発揮する(図2). ヒルジンのユニークな阻害様式を参考にして, ヒルジンのC端ドメイン(55~65位)を修飾したFRE指向性阻害剤MDL-28050¹⁴⁾や, ヒルジンの阻害様式を模した二機能性阻害剤¹⁵⁾¹⁶⁾の開発が推進された. これら阻害剤は岡本らのアルガトロバン¹⁷⁾に代表されるAS指向性阻害剤とは結合様式が異なり, 新しい抗トロンビン剤開発へのアプローチとして期待されている. ここではカナダ国立遺伝子工学研究所(NRC-BRI)小西康夫博士の研究室で行われている,

ヒルジンのアミノ酸配列を基にした二機能性トロンビン阻害剤のデザイン戦略を中心に紹介する.

低分子化

ヒルジンは分子量約7,000 Daの小タンパクで, 弱い抗原性を示す¹⁸⁾. Maraganoreら¹⁵⁾はAS指向性シーケンスであるD-Phe-Pro-Arg-Proを, グリシン4残基の架橋を介してFRE指向性シーケンスであるヒルジン(53~64位)と結合して分子量~2,000 Da(ヒルジンの1/3)の合成ペプチド(ヒルログ-1)のデザインに成功した(図3). ヒルログ-1の K_i 値は $2.3 \times 10^{-9} \text{ M}$ とヒルジンには遥かに及ばないが, アルガトロバン($K_i = 1.9 \times 10^{-8} \text{ M}$)に比べ10倍強力であり, 臨床的に利用可能な値であった. 臨床治験がすすめられ, 急性心筋梗塞¹⁹⁾や冠動脈形成術においてヒルログの有効性が報告されている. Maraganoreとほとんど同時期にNRC-BRI小西博士のグループでもP53と呼ばれる二機能性阻害剤をデザインしており, これはヒルジン(45~65位)の配列を基に45位ThrをD-Pheに, 47位LysをArgに置換したもので, K_i 値 $2.8 \times 10^{-9} \text{ M}$ でトロンビンを阻害した¹⁶⁾. いずれもヒルジンのN端ドメイン(1~48位)を小分子で置換することにより, 親和性の低下は伴うものの, 分子量を約3分の1に減らすことに成功した.

安定化

ヒルログ-1のN末端であるD-Phe-Pro-Arg-ProやP53のN末端であるAc-D-Phe-Pro-Arg-Pro配列はトロンビンの基質でもあり, ヒルログ-1やP53は穏やかではあるがトロンビンにより分解される. Maraganoreらは安定なヒルログを得るために, 加水分解されないArgψ[CH₂CONH]X結合やArg-X結合, すなわちArgψ[CH₂NH]Gly, Argψ[CH₂N]

A: 活性中心に結合する領域、 L: 架橋部位、 E: フリプリーゼン認識部位に結合する領域

図 3 二機能性トロンビン阻害剤（基質型）の構造

図 4 アルガトロバンおよびアルガトロバン類似体の構造

Pro の導入を行った²⁰⁾。これらの結合の導入によりトロンビンによる加水分解を受けなくなり、 β -homoarginine-Gly 結合をもつヒルログ-3 (図 3) は K_i 値 4.6×10^{-9} M でトロンビンを阻害した。P53 分子における Arg-Pro は Arg ψ [CO (CH₂)_n CO] で置換され、トロンビンに対して安定なヒルトニン 1-6 が得られた²¹⁾²²⁾。ヒルトニン-2 は K_i 値 3.8×10^{-10} M でトロンビンを阻害し、安定性ばかりでなく阻害活性においても改善が認められた。上記の試みは、基質シークエンスを基に、酵素により開裂可能であるアミド結合をほかの開裂に抵抗する結合で置

換したり、アミド結合の位置を動かすことにより酵素に安定な分子を得ようとするものであり、合成上の複雑さを伴う。津田ら²³⁾は N 末端に基質ではなく阻害剤であるアルガトロバン類似体を導入し、トロンビンに安定な二機能性阻害剤を得ようと試みた。アルガトロバンおよびアルガトロバン類似体は Arg 残基を中心にその N 末に疎水性残基を、C 末にピペコリン酸誘導体をもつ構造が特徴である (図 4)。アルガトロバンのピペリジン環は D-Phe-Pro-Arg-CH₂-Cl の Pro と同様に、S2 サブサイトを占有し¹³⁾、D-Phe-Pro-Arg-Pro とは異なる非基質型様式

図5 活性中心指向性阻害剤とトロンビン活性中心との相互作用 (模式図)

でASに結合する(図5参照)。従って、アルガトロバン分子中のArgのカルボニル基はもちろん、ピペコリン酸のカルボン酸を介してのヒルジン配列への結合は、トロンビンの活性中心にある195位Serから離れて存在し、トロンビンによる分解からは免れると予測された。dansyl-Arg-(D-pipecolic acid)をAS指向性セグメントとし、ヒルジン(55~65位)をFRE指向性セグメントとして、両セグメントを ω アミノ酸で架橋したP448は K_i 値 1.7×10^{-11} Mの高い親和性でトロンビンを阻害し、予測通り、トロンビンと37°C、6時間インキュベーションしても分解されなかった(図6)²³⁾。アルガトロバン類似体を取り込んだ新しいタイプの二機能性阻害剤とトロンビンとの複合体の構造を示す(図7)。インヒビターのN末端部分がトロンビンのASに、C末端部分がFREに結合し、架橋部分はASとFREの間の溝に沿って横たわっている。また、アルガトロバン類似体部分とASの相互作用では(図8)、ピペコリン酸のカルボニル基と195位Ser側鎖OH基との距離が4オングストローム以上あって、トロンビンに対する安定性が理解できる。非基質型のAS結合シーケンス(アルガトロバン類似体)を二機能性阻害剤に組み込むことにより、トロンビンに安定で、親和性の高いトロンビン阻害剤を得ることが出来た。

分子認識のクリティカルスポット

ヒルジンC端部(55~65位)は疎水性残基5残基、酸性残基5残基、そしてC端部カルボン酸からなる。これら疎水性残基と親水性残基は両親媒性構造を形成し、ヒルジンC端部(55~65位)がトロンビンに結合するとき、疎水性残基はFREに結合し、一方、酸性残基は溶媒に露出している¹⁰⁾¹²⁾。酸性残基はヒルジントロンビン複合体の会合速度に寄与するが^{24)~26)}、解離定数は溶液のイオン強度やGluをGln残基に置換しても一定であった^{6a)24)25)}。また疎水的相互作用はヒルジントロンビン複合体の安定化に重要で、この疎水的相互作用にもっとも深く関与する残基を探索する目的で、55位から65位のアミノ酸を1つずつGlyで置換し、それらの抗トロンビン活性を評価した²⁷⁾。59位IleをGlyに置換したペプチドが著しい阻害活性の低下を示し、59位IleがヒルジンC端部(55~65位)とトロンビンとの相互作用に重要であることが示された(図9)。次に、Ileを、Ileの類似体で置換した二機能性阻害剤Ac-(D-Phe)-Pro-Arg-Pro-[linker]-Asp-Glu-Glu-Xaa-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Glnを合成し、抗トロンビン活性を測定した。Ileはもっともよいアミノ酸の1つであり($K_i=8.2 \times 10^{-10}$ M), *tert*-butylalanineで置換すると K_i 値 3.9×10^{-10}

図 6 P448 の HPLC プロファイル

(A) トロンビンと 6 時間インキュベーション後, (B) ヒト血漿プロテアーゼと 3 時間インキュベーション後, (C) 腎臓膜プロテアーゼと 1 時間インキュベーション後 (図は許可を得て BRI Publication No. 36847 より転載した)。

M とわずかではあるが改善がみられた²⁸⁾。理論的結合自由エネルギーは実験値とよく一致し, Ile 側鎖分子内および分子間ファン・デル・ワールス力が親和性を支配していることが明らかになった²⁸⁾²⁹⁾。

リンカーを超えて

二機能性阻害剤の架橋部分は単に AS 阻害セグメントと FRE 阻害セグメントを結びつける

図 7 (上図) α -トロンビン-P 500 複合体の構造
P 500 はグリーンスティックで示されている (図は BRI・小西康夫博士より提供された)。

図 8 (下図) α -トロンビン活性中心におけるアルガトロバン類似体 (白, スティック) と (D-Phe)-Pro-Arg-Pro シークエンス (グリーン, スティック) の比較
ボールは α -トロンビンの Ser¹⁹⁵ を示す (図は BRI・小西康夫博士より提供された)。

だけと考えられていたが, 架橋部分が酵素の S' 部分を占有することから, S' 部分との非極性相互作用を検索してトロンビンへの親和性を高める試みが行われた³⁰⁾。最適な架橋の鎖長として 16 原子を見出した後, 1 番目の原子から 16 番目の原子まで順にメチル側鎖基を挿入していく, “メチルスキャン” を行い, トロンビンとの親和性の上がる位置を探した。2 番目, 8 番目の原子にメチル側鎖基を挿入すると K_i 値はそれぞれ 2.1×10^{-12} M, 2.7×10^{-12} M を示し, 最小

図9 [D-Phe⁴⁵, Arg⁴⁷] hirudin⁴⁵⁻⁶⁵の各残基をGlyで置換した類似体の抗トロンビン活性、フィブリンクロット形成に対する阻害活性をIC₅₀値で求め、[D-Phe⁴⁵, Arg⁴⁷] hirudin⁴⁵⁻⁶⁵の阻害活性を1とし、相対活性で表わしてある(図は許可を得てBRI Publication No. 32768より転載した)。

図10 Bbs-Arg-(D-Pip)-[linker]-Asp-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-(Cha)-(D-Glu)-OHの抗トロンビン活性、架橋部分の主鎖のメチル基の位置をX軸に、メチル側鎖のない阻害剤とのK_i値の比をY軸に示してある(図は許可を得てBRI Publication No. 39980より転載した)。

表1 二機能性トロンビン阻害剤のHe-Neレーザー惹起血栓形成における抗血栓作用

トロンビンインヒビター	K _i (nM)	最小有効投与量 (μmol/l, i.v.)*	
		細動脈	細静脈
2-Nas-Arg-(D-Pip)-μAdod-γAbu-Asp-Tyr-Glu-Pro-Ile-Pro-Glu-Glu-Ala-(Cha)-(D-Glu)-OH (P551)	0.0042 ²³⁾	3.0	3.0
2-Nas-Arg-(D-Pip)-μAdod-γAbu-Asp-Phe-Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln-OH (P532)	0.0165 ²³⁾	5.9	5.9
r-hirudin	0.005 ³²⁾	16.8	16.8
hirulog-1	2.3 ¹⁵⁾	11.6	11.9
argatroban	19 ¹⁷⁾	2.5	6.2

(略語) 2-Nas, 2-naphthalenesulfonyl; Pip, picolic acid; μAdod, 12-aminododecanoic acid; γAbu, 4-aminobutyric acid; Cha, β-cyclohexylalanine.

* データは文献(31)より引用した。

値となった(図10)。これはリンカーが単なる繋ぎ手であるばかりでなく、第3の相互作用を持ちうる場所であることを示した。Slonらは更に大きな側鎖を導入し、K_i値1.7×10⁻¹⁴ Mと天然ヒルジン(K_i=1.7×10⁻¹⁴ M)に匹敵する阻害剤の合成に成功した(投稿準備中)。

抗血栓作用

このようにして、ヒルジンのアミノ酸配列を

基にして、分子量はヒルジンの3分の1に縮小され、親和力はヒルジンに匹敵する二機能性トロンビン阻害剤が合成されたが、それではこれらの阻害剤は抗血栓作用を示すのであろうか。山下ら³¹⁾はラット微小血管にヘリウム・ネオンレーザーを照射し、血管内に血栓を形成する系を用いて二機能性阻害剤の抗血栓作用を評価した。表1に示すように、細動脈、細静脈のいずれでもP551およびP532は、リコンビナントヒルジン、ヒルログより強力に血栓の形成を抑制

した。K_i 値から判断して P551 および P532 はアルガトロバンより強く、持続して血栓形成を抑制すると期待したが、抗血栓作用、持続時間ともアルガトロバンとほぼ同等であった。更に改良された二機能性阻害剤は、ヘモスタットメーターを使って評価すると、アルガトロバンの10 倍の活性を示しており(高ら: 第21 回日本血栓止血学会学術集会), 今後のデザインが期待される。

最後に

立体構造が詳細に解明されているトロンビンの二機能性阻害剤のデザインについて、その一部を紹介した。効率よく阻害剤をデザインするためには標的とする酵素, 受容体やリガンドの構造に関する知見—X 線解析, NMR, 計算化学の応用等による—が重要視されている。デザイン, 合成, 生物学的評価, それぞれの活動が有機的に機能して成果があがるのは当然であるが, 結合時の構造の変化を含む, 標的となる物質の構造に関する情報の重要性はますます増大すると考えられる。

謝 辞: 本稿をまとめるにあたって, ご助言, ご校閲賜りました, カナダ国立遺伝子工学研究所 (NRC-BRI) 小西康夫博士ならびに血栓止血研究神戸プロジェクト・和中敬子博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Fenton JW II: Thrombin specificity. *Ann N Y Acad Sci* **371**: 468-469, 1981.
- 2) Fenton JW II, Bing DH: Thrombin active-site regions. *Semin Thromb Hemost* **12**: 200-208, 1986.
- 3) Markwardt F: Hirudin as an inhibitor of thrombin, in Perlmann GE, Lorand L (ed): *Methods Enzymol* **19**, New York, Academic Press, 924-932, 1970.
- 4) Bagdy D, Barabas E, Graf L, Petersen TE, Magnusson S: Hirudin, in Lorand L (ed): *Methods Enzymol* **45**, New York, Academic Press, 669-678, 1976.
- 5) Dodt J, Muller HP, Seemuller U, Chang J-Y: The complete amino acid sequence of hirudin, a thrombin specific inhibitor/application of colour carboxymethylation. *FEBS Lett* **165**: 180-183, 1984.
- 6) a) Stone SR, Hofsteenge J: Kinetics of the inhibition of thrombin by hirudin. *Biochemistry* **25**: 4622-4628, 1986.
b) Chang J-Y, Ngai PK, Rink H, Dennis S, Schlaeppi J-M: The structural elements of hirudin which bind to the fibrinogen recognition site of thrombin are exclusively located within its acidic C-terminal tail. *FEBS Lett* **261**: 287-290, 1990.
c) Owen TJ, Krstenansky JL, Yates MT, Mao SJT: N-Terminal requirements of small peptide anticoagulants based on hirudin 54-65. *J Med Chem* **31**: 1009-1011, 1988.
- 7) Walsmann P, Markwardt F: Biochemical and pharmacological aspects of the thrombin inhibitor hirudin. *Pharmazie* **36**: 653-660, 1981.
- 8) Markwardt F, Hauptmann J, Nowak G, Klessen C, Walsmann P: Pharmacological studies on the antithrombotic action of the hirudin in experimental animals. *Thromb Haemost* **47**: 226-229, 1982.
- 9) Markwardt F, Fink G, Kaiser B, Klocking HP, Nowak G, Richter M, Sturzebecher J: Pharmacological survey of recombinant hirudin. *Pharmazie* **43**: 202-207, 1988.
- 10) Rydel TJ, Ravichandran, Tulinsky A, Bode W, Huber R, Roitsch C, Fenton JW II: The structure of a complex of recombinant hirudin and human α -thrombin. *Science* **249**: 277-280, 1990.
- 11) Grutter MG, Priestle JP, Rahuel J, Grossenbacher H, Bode W, Hofsteenge, Stone SR: Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *EMBO J* **9**: 2361-2365, 1990.

- 12) Rydel TJ, Tulinsky A: Refind structure of the hirudin-thrombin complex. *J Mol Biol* **221**: 583-601, 1991.
- 13) Bode W, Turk D, Sturzebecher J: Geometry of binding of the benzamidie- and arginine-based inhibitors $N\alpha$ -(2-naphthyl-sulfonyl-glycyl)-DL-p-aminophenylalanyl-piperidine (NAPAP) and (2R, 4R)-4-methyl-1-[$N\alpha$ -(3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulphonyl)-L-arginyl]-2-piperidine carboxylic acid (MQPA) to human α -thrombin. *Eur J Biochem* **183**: 175-182, 1990.
- 14) Kretenansky JL, Broesma RJ, Owen TJ, Payne MH, Yates MT, Mao SJ: Development of MDL 28,050, a small stable antithrombin agent based on a functional domain of the leech protein, hirudin. *Thromb Haemost* **63**: 208-214, 1990.
- 15) Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton JW II: Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry* **29**: 7095-7101, 1990.
- 16) DiMaio J, Gibbs B, Munn D, Lefebvre J, Ni F, Konishi Y: Bifunctional thrombin inhibitors based on the sequence of hirudin 45-65. *J Biol Chem* **265**: 21698-21703, 1990.
- 17) Kikumoto R, Tamao Y, Tezuka T, Yonomura S, Hara H, Ninomiya K, Hijikata A, Okamoto S: Selective inhibition of thrombin by (2R, 4R)-4-methyl-1-[$N\alpha$ -(3-methyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-8-quinolinesulphonyl)-L-arginyl]-2-piperidine carboxylic acid. *Biochemistry* **23**: 85-90, 1984.
- 18) Markwardt F, Nowak G, Stuerzebecher J, Griessbach U, Walsmann P, Vogel G: Pharmacokinetics and anticoagulant effect of hirudin in man. *Thromb Haemost* **52**: 160-163, 1984.
- 19) White HD, Aylward PE, Fery MJ, Adgey AA, Nair R, Hillis WS, Shalev Y, Brown MA, French JK, Collins R, Maraganore J, Adelman B: Randomized, double-blind comparison of hirulog versus heparin in patients receiving streptokinase and aspirin for acute myocardial infarction (HERO). Hirulog early reperfusion/occlusion (HERO) trial investigators. *Circulation* **96**: 2155-2161, 1997.
- 20) Kline T, Hammond C, Broudon P, Maraganore M: Hirulog peptides with scissile bond replacements resistant to thrombin cleavage. *Biochem Biophys Res Commun* **177**: 1049-1055, 1991.
- 21) DiMaio J, Ni F, Gibbs B, Konishi Y: A new class of potent thrombin inhibitors that incorporates a scissile pseudopeptide bond. *FEBS Lett* **282**: 47-52, 1991.
- 22) DiMaio J, Gibbs B, Lefebvre J, Konishi Y, Munn D, Yue S-Y: Synthesis of a homologous series of ketomethylene arginyl pseudodipeptides and application to low molecular weight hirudine-like thrombin inhibitors. *J Med Chem* **35**: 3331-3341, 1992.
- 23) Tsuda Y, Cygler M, Gibbs BF, Pedyczak A, Fethiere J, Yue S-Y, Konishi Y: Design of potent bivalent thrombin inhibitors based on hirudin sequence: incorporation of nonsubstrate-type active site inhibitors. *Biochemistry* **33**: 14443-14451, 1994.
- 24) Braun PJ, Dennis S, Hofsteenge J, Stone SR: Use of site-directed mutagenesis to investigate the basis for the specificity of hirudin. *Biochemistry* **27**: 6517-6522, 1988.
- 25) Stone SR, Dennis S, Hofsteenge J: Quantitative evaluation of the contribution of ionic interactions to the formation of the thrombin-hirudin complex. *Biochemistry* **28**: 6857-6863, 1989.
- 26) Betz A, Hofsteenge J, Stone SR: Ionic interactions in the formation of the thrombin-hirudin complex. *Biochem J* **275**: 801-803, 1991.
- 27) Yue S-Y, DiMaio J, Szewczuk Z, Purisima EO, Ni F, Konishi Y: Characterization of the interaction of a bifunctional inhibitor with α -thrombin by molecular modeling and peptide synthesis. *Protein Eng* **5**: 77-85, 1992.
- 28) Tsuda Y, Szewczuk Z, Wang J, Yue S-Y, Purisima E, Konishi Y: Interaction of hirudin-based inhibitor with thrombin: critical role of the IleH59 side chain of the inhibitor. *Biochemistry* **34**: 8708-8714, 1995.
- 29) Wang J, Szewczuk Z, Yue S-Y, Tsuda Y, Konishi Y, Purisima EO: Calculation of relative binding free energies and configurational entropies: a

- structural and thermodynamic analysis of the nature of non-polar binding of thrombin inhibitors based on hirudin⁵⁵⁻⁶⁵ *J Mol Biol* **253**: 473-492, 1995.
- 30) Slon U JJ, Purisima E, Tsuda Y, Sulea T, Pedyczak A, Fethiere J, Cygler M, Konishi Y: Nonpolar interaction of thrombin S' subsites with its bivalent inhibitor: methyl scan of the inhibitor linker. *Biochemistry* **36**: 13494-13502, 1997.
- 31) Yamashita T, Tsuda Y, Konishi Y, Okada Y, Matsuoka A, Giddings JC, Yamamoto J: The antithrombotic effect of potent bifunctional thrombin inhibitors based on hirudin sequence, P551 and P532, on He-Ne laser-induced thrombosis in rat mesenteric microvessels. *Thromb Res* **90**: 199-206, 1998.
- 32) Dodt J, Kohler S, Schmitz T, Wilhelm B: Distinct binding sites of Ala⁴⁸-Hirudin¹⁻⁴⁷ and Ala⁴⁸-Hirudin⁴⁸⁻⁶⁵ on α -thrombin. *J Biol Chem* **265**: 713-718, 1990.
-