



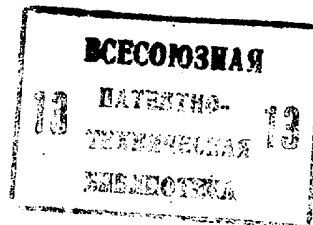
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1128601 A

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

(51) 4 C 12 N 9/72, 11/00 //
A 61 K 37/48

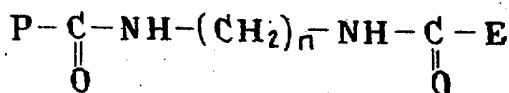
ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- (21) 3590957/28-13
(22) 10.05.83
(46) 15.07.85. Бюл. № 26
(72) А.В.Максименко, Е.Г.Тищенко,
В.П.Торчилин, В.Н.Смирнов
и Е.И.Чазов
(71) Всесоюзный кардиологический
научный центр АМН СССР
(53) 577.15(088.8)
(56) 1. T.Kitao, K.Hattori. Thrombos,
Haemostas, 1980, 43, 70.
2. Патент США № 4106992,
кл. 195-66 В, 1978.
3. Патент Японии № 113488,
кл. 30A2, 1979.
4. V.P.Torchilin, A.V.Maksimenko,
V.N.Smirnov, J.V.Berezin, K.Martinek,
Biochim. Biophys. Acta, 1979, 568, 1.
5. Авторское свидетельство СССР
№ 824053, кл. G 01 N 33/86, 1979.

(54) УРОКИНАЗА, ИММОБИЛИЗОВАННАЯ НА
ФИБРИНОГЕНЕ.

(57) Урокиназа, иммобилизованная
на фибриногене, общей формулы



где Р - фибриноген,

Е - урокиназа,

n - 0, 4, 7, 10, 12,

обладающая пролонгированной тромболи-
тической активностью и сродством к
материалу тромба, характеризующаяся
мол.мас. соответственно 36000, 385000,
400000, 420000, 440000, содержанием
белка соответственно 30, 15, 14, 12,
10 мас.%,

K_m (11,0-18,0): 10^{-4} М

K_{cat} 21-33 c^{-1}

pH-оптимум 7,4-7,8.

(19) SU (11) 1128601 A

Изобретение относится к биоорганической химии, в частности к синтезу биологически активных соединений, обладающих сродством к материалу тромба и проявляющих тромболитическую 5 активность.

Предлагаемые соединения представляют собой продукт связывания урокиназы с фибриногеном. Фермент урокиназа широко используется в медицине 10 для лечения тромбоэмболий кровеносных сосудов. Фибриноген представляет собой белок крови и после превращения в фибрин под действием тромбина является строительным материалом тромбов. 15

Известны производные урокиназы, которые получают присоединением фермента к различным носителям. Так получают водонерастворимые производные 20 урокиназы, например путем связывания ее с эритроцитарной массой [1].

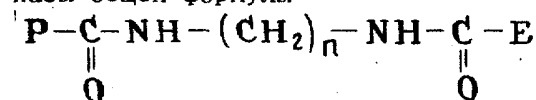
Однако для терапевтических целей пригодными являются водорастворимые производные урокиназы, например 25 электростатический комплекс фермента с гепарином [2]. К недостаткам подобных производных относится их нестability.

Наиболее близким к известным производным является препарат, представляющий собой урокиназу, ковалентно связанную с декстраном [3]. 30

Однако подобная модификация фермента не имеет сродства к материалу тромба и поэтому повышение общей фибринолитической активности крови при использовании таких производных не гарантирует эффективного осуществления процесса тромболитизиса. 35

Цель изобретения — получение нового препарата — иммобилизованной урокиназы, обладающей пролонгированной тромболитической активностью и сродством к материалу тромба. 40

Цель изобретения достигается свойствами иммобилизованной урокиназы общей формулы 45



где Р — фибриноген,
Е — урокиназа,
n — 0, 4, 7, 10, 12, 50

характеризующейся мол.мас. соответственно 360000; 385000; 400000; 420000; 440000 и содержанием белка соответственно 30, 15, 14, 12, 10 мас.%, получаемой присоединением молекул фермента к фибриногену через алифатические диамины различной длины с предварительной активацией карбоксильных групп белков карбодиимидом.

Способ осуществляют в три стадии.

1. Активация карбоксильных групп фибриногена с помощью карбодиимида и присоединение к нему алифатического амина.

Этот процесс проводят по общепринятой методике [4].

К раствору фибриногена в дистиллированной воде (рН 3,8) добавляют 100-кратный молярный избыток 1-этил-3-(диметиламинопропил) карбодиимида и инкубируют смесь 10 мин при комнатной температуре, после чего к ней при рН 4,5 и температуре 4° добавляют 100-кратный молярный избыток алифатического амина в фосфатном буфере рН 8,3 и инкубацию продолжают в течение 5 ч. Полученный продукт (I) диализуют против дистиллированной воды при 4°, а затем против фосфатного буфера рН 8,3. 50

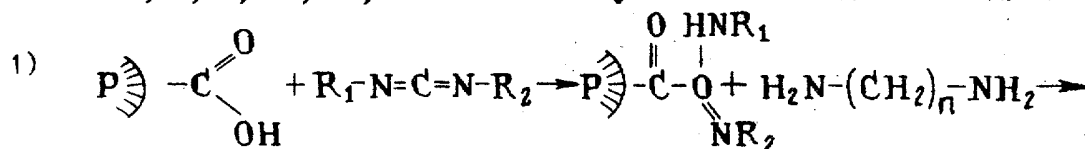
2. Активация карбоксильных групп урокиназы с помощью карбодиимида.

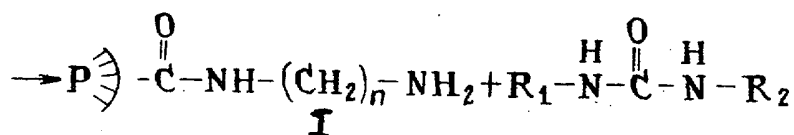
К раствору урокиназы, предварительно отдиализованной против дистиллированной воды и фосфатного буфера рН 8,3, добавляют 1-этил-3-(диметиламинопропил) карбодиимид молярном отношении 1:100 и инкубируют при 4° в течение 20 мин (продукт II).

3. Полученные урокиназы, иммобилизованной на фибриногене.

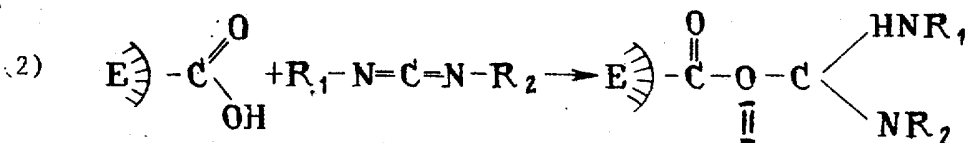
Реакцию связывания урокиназы с фибриногеном осуществляют сливанием продуктов I и II с последующей инкубацией смеси в течение 18 ч при 4°. Затем полученный препарат урокиназы, ковалентно связанной с фибриногеном, выделяют с помощью гель-хроматографии или ультрафильтрации на приборе "Amikon" с фильтром ХМ-100. 55

Процесс получения производных урокиназы иллюстрируется следующей

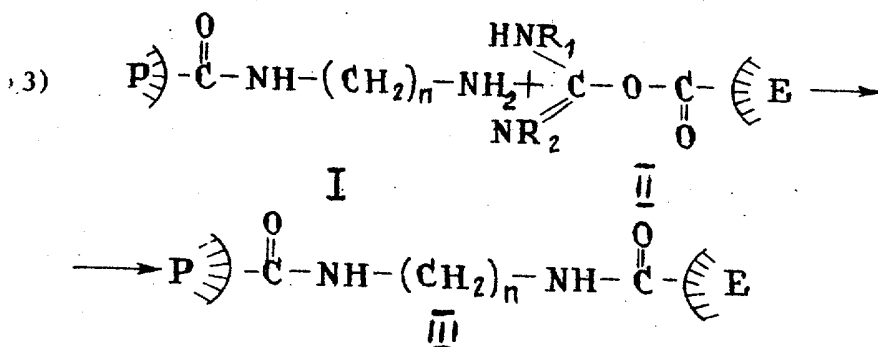




где P - белок (фибриноген).



где E - фермент урокиназа



Полученное производное урокиназы (III) представляет собой урокиназу, ковалентно связанную с фибриногеном, являющимся строительным материалом тромба, и обладающую вследствие этого повышенным сродством к тромбу.

Включение подобного конъюгата в тромб за счет средства носителя (после взаимодействия с тромбином) с материалом тромба обеспечивает повышенную локальную концентрацию урокиназы на поверхности тромба. По-видимому, это происходит на всех участках тромбообразования, что обуславливает возможность превращения подобных производных в средство системного тромблизиса.

Включение в структуру производных фибриногена и урокиназы не позволяет с очевидностью предположить, что получаемые производные будут характеризоваться тромболитической активностью с повышенным сродством к материалу тромба. Неожиданность достигаемого эффекта обеспечивается тем, что как урокиназа, так и фибриноген, относятся к элементам противоборствующих систем в организме. Урокиназа - активатор плазминогена - элемент системы фибринолиза, в то время как фибриноген - элемент системы свертывания крови. Соединение этих элементов в одном производном предполагает возможное разрушение матрицы

носителя (фибриногена) под каталитическим действием урокиназы, поскольку фибриноген является субстратом для системы фибринолиза. Только структура агломератов - подшивка фермента к фибриногену через ножку диамина - позволяет урокиназе, с одной стороны, обладать определенной подвижностью, необходимой для эффективного тромболиза, а с другой стороны, препятствует разрушению носителя вследствие стерических затруднений, обусловленных модификацией фибриногена диамином.

Подобное связывание урокиназы с фибриногеном придает получаемым производным неочевидные, новые свойства: наряду с тромболитической активностью повышенное сродство к материалу тромба. Влияние структуры получаемых агломератов на достигаемый эффект проявляется в том, что матрица носителя (фибриноген) в результате известных превращений способствует встраиванию препарата в формирующийся тромб, основу которого составляет фибрин. Это обеспечивает достаточную эффективность действия таких препаратов, тромболитическая активность возрастает.

Полученное производное урокиназы, ковалентно связанной с фибриногеном (III), сохраняет около 50% первоначальной эстеразной активности, опре-

деляемой по гидролизу метилового эфира ацетилглициллизина (AGLMe). По кинетическим параметрам гидролиза этого субстрата полученное производное близко к нативному ферменту, а по термостабильности превосходит его рН-оптимум каталитической активности модифицированной урокиназы по гидролизу AGLMe сдвигается в кислую сторону по сравнению с нативным ферментом, переходя в область физиологических рН. Преимущество производных заключается в повышении сродства их к тромбу, что в результате обеспечивает большую эффективность тромболизиса.

Кроме того, связывание фермента с высокополимерной матрицей, обычно повышает стабильность фермента в физиологических условиях, что означает удлинение сроков его действия и повышение эффективности ферментной терапии.

При исследовании свойств предлагаемых соединений сравнение проводили с нативным ферментом, так как известное производное урокиназы проявляет свойства, идентичные свойствам нативного фермента.

Пример 1. 7,83 мг фибриногена растворяют в 6 мл дистиллированной воды ($3,8 \cdot 10^{-6}$ М) при комнатной температуре, раствор подкисляют с помощью HCl до рН 3,8 и затем добавляют карбодиимида. Через 10 мин когда рН раствора достигнет максимального значения (рН 4,5), отбирают 2 мл раствора активированного фибриногена, который добавляют на холоду (4°C) к 2 мл раствора додекаметилендиамина ($3,8 \cdot 10^{-4}$ М) в 0,1 М фосфатном буфере рН 8,3 и инкубируют смесь в течение 5 ч. После этого инкубационную смесь диализуют в течение 2 ч на холоду сначала против дистиллированной воды, а затем в тех же условиях против 0,02 М фосфатного буфера рН 8,3 (продукт I).

Препарат урокиназы (24.000 I U) растворяют в 2 мл дистиллированной воды и диализуют на холоду 2 ч против дистиллированной воды, затем еще 2 ч против 0,05 М фосфатного буфера рН 8,3. К отдиализованному раствору урокиназы добавляют 4 мг карбодиимида и инкубируют смесь

при перемешивании на холоду в течение 20 мин (продукт II).

После этого к раствору активированной урокиназы (II) приливают 2 мл раствора фибриноген-додекаметилендиамина (I). Смесь инкубируют в течение 18 ч: при 4°C , затем полученный препарат выделяют из реакционной смеси с помощью ультрафильтрации на "Amicon" с фильтром XM-100. В результате эксперимента с фибриногеном связывается 80% урокиназы, причем препарат сохраняет 50% эстеразной активности от первоначальной.

Пример 2. Процесс осуществляется так же, как и в примере 1, за исключением того, что в качестве сшивающего реагента используется 1,10-декаметилендиамин.

С фибриногеном связывается 90% урокиназы, сохраняемая препаратом остаточная эстеразная активность составляет 45% от первоначальной. Мол.мас. продукта - 420000, содержание белка - 12 мас.%.
25

Пример 3. Процесс осуществляется так же, как и в примере 1, за исключением того, что в качестве сшивающего агента используется 1,7-гептаметилендиамин.

С носителем связывается 85% урокиназы, остаточная эстеразная активность производных урокиназа - фибриноген 30%. Мол.мас. 400000, содержание белка 14 мас.%.
35

Пример 4. Процесс осуществляется так же, как и в примере 1, за исключением того, что в качестве сшивающего агента используется 1,4-тетраметилендиамин.

К фибриногену присоединяется до 90% урокиназы. Препарат имеет остаточную эстеразную активность 40%. Мол.мас. 385000, содержание белка 15 мас.%.
45

Пример 5. Урокиназу присоединяют к фибриногену непосредственно, без удлиняющего мостика алифатического диамина.

2 мл урокиназы (12.000 I U/ml) диализуют 2 ч при 4°C против дистиллированной воды, а затем против 0,02 М фосфатного буфера рН 8,3. К раствору урокиназы добавляют 2 мл активированного карбодиимидом фибриногена ($3,8 \cdot 10^{-6}$ М) и 1 мл 0,1 М
55

фосфатного буфера pH 8,3. Смесь инкубируют 18 ч при 4°C. Полученное производное выделяют ультрафильтрацией.

С фибриногеном связывается 90% урокиназы, препарат сохраняет до 32% первоначальной эстеразной активности. Мол.мас. 560000, содержание белка 30 мас.%.
5

Таким образом, присоединение урокиназы к фибриногену с помощью различных алифатических диаминов с предварительной карбодиимидной активацией исходных белков позволяет получать производные урокиназы, присоединенные к матрице носителя как через ножки различной длины, так и без них.

Кинетические параметры каталитического гидролиза такими препаратами низкомолекулярного субстрата AGLMe (pH 7,5; 0,1 M HCl, комнатная температура) незначительно отличаются от соответствующих констант нативной урокиназы. Об этом свидетельствуют данные табл. 1. В качестве объекта сравнения использована нативная урокиназа, так как последняя в условиях эксперимента сопоставима с известным препаратом [3].
20

Концентрация AGLMe 10^{-3} – 10^{-2} M, концентрация фермента в ячейке 100 IU/ml.
25

Как видно из данных табл. 1, лучшие кинетические параметры среди модифицированных препаратов урокиназы имеет продукт примера 1 – урокиназа, присоединенная к фибриногену с помощью 1,12-додекаметилендиамина. Использование самой длинной из имеющегося набора ножек позволяет получать препараты, наиболее близкие по свойствам к нативному ферменту.
30

По-видимому, длинная ножка в значительной степени устраняет неблагоприятное слияние на глобулу фермента со стороны матрицы, которое может проявляться в изменении конформационного состояния молекулы связанного фермента, в стерических затруднениях, возникающих при взаимодействии с субстратом и т.д. Это подтверждается сравнением кинетических характеристик нативной урокиназы и продуктов ее модификации. Так, по мере укорочения ножки для производных урокиназы возрастают величины K_m и уменьшаются величины $K_{кат}$. Для продукта примера 5 (урокиназа, связанная с фибрино-

геном без помощи диамина) характерны максимальное значение K_m и минимальное значение $K_{кат}$, что означает резкое снижение активности этого производного по сравнению с нативной урокиназой.

Присоединение урокиназы к фибриногену сдвигает pH-оптимум каталитической активности фермента по гидролизу AGLMe в кислую сторону. Так, pH-оптимум нативной урокиназы – 8,3, pH-оптимум продукта модификации урокиназы из примера 1 – 7,5. Это объясняется элиминированием отрицательного заряда карбоксильных групп в глобуле урокиназы при их активации карбодиимидом. Изменение остаточной каталитической активности урокиназы при ее модификации происходит следующим образом: активность фермента до модификации – 100% после стадии карбодиимидной активации – 88%, после связывания с фибриногеном, модифицированным 1,12,додекаметилендиамином, – 57%, после выделения полученного производного методом ультрафильтрации на "Amicon" – 52%. Связывание фермента с полимерной матрицей фибриногена наряду с тем, что позволяет глобуле фермента сохранять определенную подвижность (изменения K_m , $K_{кат}$), придает получаемому препарату биокатализатора повышенную стабильность, о чем говорят данные табл. 2.
35

Определение остаточной каталитической активности проводили на pH-стате по гидролизу 10^{-3} M раствора AGLMe в 0,1 M KCl при pH 7,5 и комнатной температуре.
40

Экспериментальное определение тромболитической активности препаратов нативной и модифицированной урокиназы было выполнено согласно известной методике [5], с добавлением в оmyвающий раствор 0,33 мг/мл плазминогена человека. К 0,5 мл раствора (10 мг/мл) фибриногена приливают 0,2 мл раствора (4 мг/мл) тромбина и выдерживают эту смесь 1 ч при комнатной температуре, за это время формируется фибриновый остов тромба. Его помещают на проницаемую пленку в закрепленную пластмассовую трубочку диаметром 1,0–1,5 см, дно которой оmyвается 15 мл раствора 0,1 M фосфатного буфера pH 7,4. В этом растворе растворяют плазмино-

ген (0,33 мг/мл контроль), а также препараты нативной и модифицированной урокиназы, которые берут в соотношении, обеспечивающем их одинаковую эстеразную (AGLMe) каталитическую активность. 5 За растворением фибринового сгустка следят по увеличению оптической плотности при $\lambda = 280$ нм омывающего раствора по времени. Результаты эксперимента приведены в табл. 3.

Отношение прироста оптической плотности раствора (в результате деструкции при тромболлизисе нерастворимого фибринового сгустка и перехода его фрагментов в раствор) к величине промежутка времени, за который оно произошло, характеризует скорость процесса тромболлизиса ($tg\alpha$) в такой системе. В контрольном эксперименте значительного лизиса фибринового сгустка не наблюдается. Для препаратов же нативной и модифицированной урокиназы (продукт примера 1) значения $tg\alpha$ составляют соответственно 0,3 и 0,5, что свидетельствует о большой тромболитической эффективности модифицированного производного и подтверждается также значениями времени полного растворения тромба, составляющими 5 и 3 ч соответственно.

Окончательные результаты экспериментов по тромболлизису представлены в табл. 4.

Приведенные в табл. 4 данные показывают, что с ростом длины ножки использованного диамина растет эффективность тромболитического действия препарата модифицированной урокиназы. 40 Можно предполагать, что причина этого заключается в наиболее благоприятном соотношении у таких производных подвижности фермента, удаленности его от матрицы носителя и ее способности быть встроенной в материал тромба. Дальнейшее увеличение длины ножки нецелесообразно, так как утрачивается стабилизирующее влияние носителя и затрудняется его модификация такими бифункциональными реагентами, возрастающая гидрофобность которых сокращает их реальную длину (скручивание метиленовой цепи). Как показывают опытные данные, 12 метиленовых групп в цепи реагента — это близкая к оптимальной длина межмолекулярной сшивки.

Экспериментальное подтверждение возросшей тропности препарата модифицированной урокиназы к тромбу было продемонстрировано следующим образом: сформировавшиеся сгустки фибрина омывались определенное время (15 мин) растворами препаратов нативной и модифицированной урокиназы. 10 Затем сгустки переносили в растворы того же буфера без фермента и инкубации в течение 3 ч. В этих растворах определяли прирост оптической плотности, т.е. скорость растворения фибринового сгустка, причем контролем служил буфер, содержащий плазминоген и омывающий фибриновый сгусток в течение всего времени эксперимента. Показано, что происходит быстрое встраивание и фибриновый сгусток 15 фибриногена из омывающего раствора. Это включение обнаруживается визуально уже через 5–15 мин (см. табл. 5).

Из данных табл. 5 следует, что 25 действие нативного препарата урокиназы ($tg\alpha 0,15$) по эффективности тромболлизиса близко к данным контрольного эксперимента ($tg\alpha 0,14$). Фибринолиз в контроле объясняется, 30 вероятно, наличием в препарате плазминогена примесей плазмина. Значительно большую тромболитическую активность обнаруживает продукт модификации урокиназы из примера 1 ($tg\alpha 0,3$). Это означает, что 35 именно это производное урокиназы обладает сродством к фибриноному сгустку, поскольку вляется в него при первой 15-минутной инкубации и переносится вместе со сгустком в буферный раствор, где в течение 3 ч продолжается фибринолитическое действие препарата. Более того, при повторении этого эксперимента с теми же фибриновыми сгустками несколько 45 раз (до 5, см. табл. 5) обнаруживается, что производные урокиназы обладают способностью дополнительно встраиваться в уже лизирующийся тромб, о чем свидетельствуют возрастающие значения (от 0,3 до 0,46) $tg\alpha$ 50 характерного показателя эффективности тромболлизиса. Как видно из табл. 5, подобная способность не свойственна нативной урокиназы.

Синтез препаратов урокиназы, ковалентно связанных через алифатический диамин с фибриногеном, позво-

ляет получить производные фермента, обладающие высокой тромболитической активностью, повышенной стабильностью и сродством к материалу тромба. Подобные производные урокиназы представляют собой эффективные средства системного тромболизиса пролонгированного действия, которые могут быть использованы при инфарктах мио-

карда, эмболиях легочных артерий, тромбозах сосудов головного мозга и ряде других заболеваний. Использование подобных препаратов урокиназы 5 облегчит курс лечения и повысит его эффективность за счет снижения расхода дорогостоящего фермента, удлинения срока и обеспечения строгой направленности действия.

Т а б л и ц а 1

Кинетические константы описываемых производных
урокиназы

Кинетический параметр препарата	Нативная урокиназа	Продукт примера				
		1	2	3	4	5
K_m, M	$3,0 \cdot 10^{-4}$	$11,0 \cdot 10^{-4}$	$13 \cdot 10^{-4}$	$14 \cdot 10^{-4}$	$15,0 \cdot 10^{-4}$	$18,0 \cdot 10^{-4}$
$K_{cat} \text{ сек}^{-1}$	62	33	30	29	27	21

Т а б л и ц а 2

Стабильность производных урокиназы

Препарат	Сохраняемая препаратом остаточная каталитическая активность при инкубации при 50°C в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,5 через, ч				
	3	7	14	24	48
Нативная урокиназа	80	56	38	10	-
Продукт примера					
1	85	75	60	47	32
2	86	75	56	49	37
3	86	73	58	45	40
4	88	76	60	51	42
5	90	78	66	56	44

Т а б л и ц а 3

Динамика растворения фибринового сгустка под воздействием
производного урокиназы

Время, мин	Нативная урокиназа			Урокиназа-1,1,12-додекаметилендиамин- фибриноген		
	A ²⁸⁰	A ²⁸⁰	%	A ²⁸⁰	A ²⁸⁰	%
0	0,292	0	0	0,842	0	0
30	0,326	0,034	11	0,809	0,037	12
90	0,383	0,091	30	0,971	0,129	43
150	-	-	-	1,083	0,241	80
180	0,418	0,126	42	1,144	0,302	100
240	0,484	0,192	64	-	-	-
270	0,539	0,247	82	-	-	-
300	0,592	0,300	100	-	-	-

Т а б л и ц а 4

Результаты тромболизиса

Препарат	Скорость растворения фибринового сгустка tg %	Время полного раство- рения фибринового сгустка, ч
Нативная урокиназа	0,3	5
Продукт примера 1	0,5	3
2	0,43	3 ч 45 мин
3	0,40	4
4	0,36	4 ч 20 мин
5	0,25	5,5

Результаты экспериментов по исследованию сродства
производных к тромбу

Препарат	Скорость растворения фибринового сгустка за 3 ч в растворе буфера после инкубации с препаратом в течение (в мин)				
	15	15	15	15	15
Нативная урокиназа	0,15	0,17	0,14	0,16	0,14
Продукт примера					
1	0,3	0,38	0,42	0,44	0,46
Контроль	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
2	0,22	0,26	0,28	0,30	0,31
3	0,19	0,22	0,24	0,25	0,27
4	0,16	0,20	0,23	0,25	0,26
5	0,11	0,12	0,12	0,14	0,15

Редактор Л. Письман	Составитель Техред Т.Фанта	Корректор В. Бутяга
Заказ 4513/5	Тираж 525	Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4