

РСТ

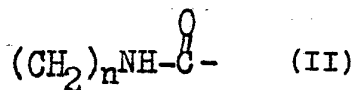
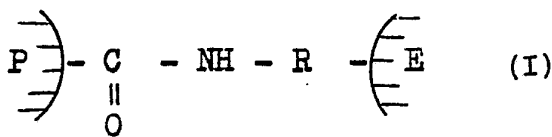
ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
Международное бюро

МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ
С ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(51) Международная классификация изобретения ³ : C12N 9/72, 11/02; A61K 37/48	A1	(11) Номер международной публикации: WO 84/04536 (43) Дата международной публикации: 22 ноября 1984 (22.11.84)
(21) Номер международной заявки: PCT/SU84/00008 (22) Дата международной подачи: 1 марта 1984 (01.03.84) (31) Номер приоритетной заявки: 3590957/28 (32) Дата приоритета: 10 мая 1983 (10.05.83) (33) Страна приоритета: SU (71) Заявитель (для всех указанных государств, кроме US): ВСЕСОЮЗНЫЙ КАРДИОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР [SU/SU]; Москва 121552, ул. 3-я Черепковская, д. 15а (SU) [VSESOJUZNY KARDIOLOGICHESKY NAUCHNY TSENTR AKADEMII MEDITSINSKIKH NAUK SSSR, Moscow (SU)]. (72) Изобретатели, и (75) Изобретатели/Заявители (только для US): МАКСИМЕНКО Александр Васильевич [SU/SU]; Москва 117463, проезд Карамзина, д. 1, корп. 3, кв. 59 (SU)	[MAXIMENKO, Alexandr Vasilievich, Moscow (SU)]. ТИЩЕНКО Елена Георгиевна [SU/SU]; Москва 129327, ул. Енисейская, д. 15, кв. 25 (SU) [TISCHENKO, Elena Georgievna, Moscow (SU)]. ТОРЧИЛИН Владимир Петрович [SU/SU]; Москва 119121, Ростовская наб., д. 1, кв. 90 (SU) [TORCHILIN, Vladimir Petrovich, Moscow (SU)]. СМИРНОВ Владимир Николаевич [SU/SU]; Москва 103104, Южинский пер., д. 3, кв. 7 (SU) [SMIRNOV, Vladimir Nikolaevich, Moscow (SU)]. ЧАЗОВ Евгений Иванович [SU/SU]; Москва 121552, ул. 3-я Черепковская, д. 15а (SU) [CHAZOV, Evgeny Ivanovich, Moscow (SU)]. (74) Агент: ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА СССР; Москва 103012, ул. Куйбышева, д. 5/2 (SU) [THE USSR CHAMBER OF COMMERCE AND INDUSTRY, Moscow (SU)]. (81) Указанные государства: DE, GB, JP, SE, US Опубликована С отчетом о международном поиске	

(54) Title: UROKINASE DERIVATIVES

(54) Название изобретения: ПРОИЗВОДНЫЕ УРОКИНАЗЫ



(57) Abstract: The urokinase derivatives are either urokinase bound covalently with fibrinogen, or urokinase which is covalently bound through aliphatic diamine with fibrinogen, and represented by general formula (I), wherein P is fibrinogen, E is urokinase and R either is not present at all or defines the group (II), where n=1-12, the molecular mass of the urokinase derivatives being in an amount of 360000 to 440000 D, the content of protein therein amounts to 10-30% by mass and the esterase catalytic activity thereof is in the range of 30 to 60%. Said derivatives possess an enhanced affinity to fibrine and have a prolonged fibrinolytic effect.

(57) Аннотация: Производные урокиназы представляют собой урокиназу, ковалентно связанную с фибриногеном, или урокиназу, ковалентно связанную через алифатический диамин с фибриногеном, общей формулы (I), где Р-фибриноген, Е-урокиназа, а R-отсутствует или означает группу (II), где n=1-12, с молекулярной массой 360000-440000 D, содержанием белка 10-30% по массе, эстеразной каталитической активностью 30-60%. Указанные производные имеют повышенное сродство к фибрину и обладают пролонгированным фибринолитическим действием.

ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ИНФОРМАЦИИ

Коды, используемые для обозначения стран-членов РСТ на титульных листах брошюр, в которых публикуются международные заявки в соответствии с РСТ:

AT	Австрия	KR	Корейская Республика
AU	Австралия	LI	Лихтенштейн
BE	Бельгия	LK	Шри Ланка
BG	Болгария	LU	Люксембург
BR	Бразилия	MC	Монако
CF	Центральноафриканская Республика	MG	Мадагаскар
CG	Конго	MR	Мавритания
CH	Швейцария	MW	Малави
CM	Камерун	NL	Нидерланды
DE	Федеративная Республика Германии	NO	Норвегия
DK	Дания	RO	Румыния
FI	Финляндия	SD	Судан
FR	Франция	SE	Швеция
GA	Габон	SN	Сенегал
GB	Великобритания	SU	Советский Союз
HU	Венгрия	TD	Чад
JP	Япония	TG	Того
KP	Корейская Народно-Демократическая Республика	US	Соединённые Штаты Америки

ПРОИЗВОДНЫЕ УРОКИНАЗЫ

Область техники

Изобретение относится к биоорганической химии, а точнее касается новых производных урокиназы, обладающих сродством к материалу тромба и проявляющих тромболитическую активность.

Предшествующий уровень техники

Известны различные производные урокиназы, так например, водорастворимые производные урокиназы, пригодные для терапевтических целей, представляющие собой комплексы фермента урокиназы с гепарином или с декстран-сульфатом (патент США № 4106992, 1978г., патент Японии № 159387, 1977г.).

Однако указанные производные урокиназы нестабильны.

При попадании их в кровоток происходит разрушение электростатических взаимодействий с образованием практически смеси урокиназы с носителем, что сопровождается быстрой инактивацией фермента и прекращением тромболитического действия.

Известны также производные урокиназы, представляющие собой урокиназу, ковалентно связанную с декстраном (патент Японии № 54-113488, 1979г.).

Эти производные водорастворимы и обладают повышенной стабильностью. Однако подобная модификация фермента не обеспечивает сродства к материалу тромба и поэтому повышение общей фибринолитической активности крови при использовании таких производных еще не гарантирует эффективного осуществления процесса тромболизиса.

Раскрытие изобретения

В основу изобретения положена задача создания новых производных урокиназы с повышенным сродством к фибрину, обладающих пролонгированным фибринолитическим действием за счет возрастания их стабильности.

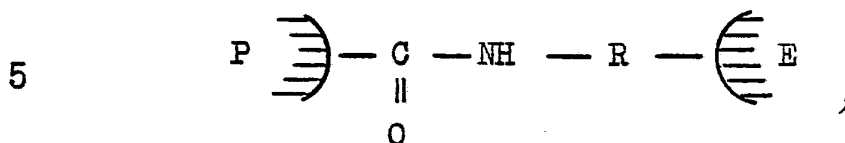
Заявляемые производные урокиназы являются новыми и в литературе не описаны.

Задача решена тем, что производные урокиназы, со-



- 2 -

гласно изобретению, представляют собой урокиназу, ковалентно связанную с фибриногеном, или урокиназу, ковалентно связанную через алифатический диамин с фибриногеном, общей формулы:



где

Р - фибриноген, Е - урокиназа, O R-отсутствует или означает группу - $(\text{CH}_2)_n - \text{NH} - \underset{\text{O}}{\underset{\parallel}{\text{C}}} -$, где n от I до I2; с молекулярной массой 360000- 440000 D, содержанием белка 10-30% масс, эстеразной каталитической активностью 30-60%.

Заявляемые соединения представляют собой продукт связывания урокиназы с фибриногеном, использованным в качестве носителя для иммобилизации урокиназы.

Заявляемые соединения за счет выбора матрицы высокомолекулярного носителя (фибриногена) имеют повышенную тропность к материалу тромба. Это обеспечивает эффективное протекание тромболитического процесса. Вместе с тем, предварительная модификация фибриногена алифатическими диаминами затрудняет деструкцию матрицы белка в ходе фибринолиза. Присоединение же урокиназы к фибриногену придает соединениям повышенную стабильность, что может обеспечивать пролонгацию фибринолитической активности таких производных. По кинетическим параметрам полученные соединения близки нативному ферменту, а по фибринолитическому действию превосходят исходную урокиназу почти вдвое.

Лучший вариант осуществления

Свойства заявляемых новых соединений были изучены в эксперименте *in vitro*.

30 Эксперимент проводили параллельно с нативной урокиназой и следующими заявляемыми производными урокиназы: соединение I (урокиназа, присоединенная к фибриногену с помощью I, I2-додекаметилендиамина), соединение



-3-

- 2 (урокиназа, присоединенная к фибриногену с помощью I,10-декаметиленамина), соединение 3 (урокиназа, присоединенная к фибриногену с помощью I,7-гептаметиленамина), соединение 4 (урокиназа, присоединенная к фибриногену с помощью I,4-тетраметиленамина), соединение 5 (урокиназа, присоединенная к фибриногену).

Изучение кинетических параметров ферментативного гидролиза метилового эфира ацетилглициллизина (AGLMe) заявляемыми соединениями показало, что эти соединения близки к нативному ферменту (урокиназе). Данные эксперимента приведены в таблице I.

Таблица I

15	Кинетические параметры	:Нативная урокиназа	:Производное урокиназы фибриногена и I,12-декаметиленамина (соединение I)	:Производное урокиназы фибриногена и I,10-декаметиленамина (соединение 2)			
		:	:	:			
		:	:	:			
		:	:	:			
		:	:	:			
		:	:	:			
20		:	:	:			
	I	:	2	:	3	:	4
	K_M , M		$3,0 \cdot 10^{-4}$		$11,0 \cdot 10^{-4}$		$13 \cdot 10^{-4}$
	k_{cat} , сек ⁻¹		62		33		30

Продолжение таблицы I

25	Кинетические параметры	:Производное урокиназы фибриногена и I,7-гептаметилен-диамина (соединение 3)	:Производное урокиназы фибриногена и I,4-тетраметилендиамин (соединение 4)	:Производное урокиназы и фибриногена (соединение 5)
30				
	I	5	6	7
		$14 \cdot 10^{-4}$	$15,0 \cdot 10^{-4}$	$18,0 \cdot 10^{-4}$
		29	27	21

35 Концентрация AGLMe 10^{-3} - 10^{-2} М, концентрация фермента в ячейке 100 IU/ml

Как видно из данных таблицы I, лучшие кинетические



-4-

параметры среди заявляемых производных урокиназы имеет соединение I (урокиназа, присоединенная к фибриногену с помощью I,I2-додекаметилендиамина). Использование самого длинного из имеющегося набора алифатического диамина (длинной "ножки") позволяет получать препараты, наиболее близкие по свойствам к нативному ферменту.

По-видимому, длинная "ножка" в значительной степени устраняет неблагоприятное влияние на глобулу фермента со стороны матрицы, которое может проявляться в изменении конформационного состояния молекулы связанного фермента, в стерических затруднениях, возникающих при взаимодействии фермента с субстратом и так далее. 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_{cat} . Для соединения 5 (урокиназа, связанная с фибриногеном без помощи диамина) характерны максимальное значение K_M и минимальное значение k_{cat} , что означает заметное снижение активности этого производного по сравнению с нативной урокиназой.

Присоединение урокиназы к фибриногену сдвигает pH-оптимум каталитической активности фермента по гидролизу AGIme в кислую сторону. Так, pH-оптимум нативной урокиназы - 8,3, pH-оптимум заявляемого производного урокиназы (соединения I) 7,5. Это объясняется элиминированием отрицательного заряда карбоксильных групп в глобуле урокиназы при их активации карбодимидом. Изменение остаточной каталитической активности урокиназы при ее модификации происходит следующим образом: активность фермента до модификации - 100%, после стадии карбодимидной активации - 88%, после связывания с фибриногеном, модифицированным I,I2-додекаметилендиаминном - 57%, после выделения полученного производного методом ультрафильтрации на "Amicon" - 52%. Связывание фермента с полимерной матрицей фибриногена наряду с тем, что позволяет глобуле фермента



-5-

сохранять определенную подвижность (изменения K_M , k_{cat}), придает получаемому соединению биокатализатора повышенную стабильность, о чем говорят данные таблицы 2.

5

Таблица 2

	Соединения	: Сохраняемая препаратом остаточная ката- литическая активность при инкубации при : 50°С в 0,1М фосфатном буфере рН 7,5 : через:			
10		: 3 часа: 7 часов: 14 часов: 24 часа: 48 часов			

	Нативная уро-				
	киназа	80	56	38	10 -
	Соединение 1	85	75	60	47 32
	Соединение 2	86	75	56	49 37
15	Соединение 3	86	73	58	45 40
	Соединение 4	88	76	60	52 42
	Соединение 5	90	78	66	56 44

Определение остаточной каталитической активности проводили на pH-стате по гидролизу 10^{-3}M раствора

20 AG1Me в 0,1М KCl при pH 7,5 и комнатной температуре.

Экспериментальное определение тромболитической активности соединений нативной урокиназы и заявляемых производных урокиназы было выполнено по методике, описанной в авторском свидетельстве СССР № 824023 с добавлением в омывающий раствор 0,33 кг/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 час при комнатной температуре, за это время формируется фибриновый остов тромба. Его помещают

30 на проницаемую пленку в закрепленную пластмассовую трубочку диаметром 1,0-1,5 см, дно которой омывается 15 мл раствора 0,1М фосфатного буфера pH 7,4. В этом растворе растворяют плазминоген (0,33 мг/мл; контроль), а также препараты нативной урокиназы и заявляемых производных

35 урокиназы, которые берут в соотношении, обеспечивающем

-6-

их одинаковую эстеразную (AGLMe) каталитическую активность. За растворением фибринового сгустка следят по увеличению оптической плотности при $\lambda = 280$ нм омывающего раствора по времени. Результаты эксперимента приведены в таблице 3.

Таблица 3

Время мин.	Нативная урокиназа			Заявляемое соединение I (урокиназа - I, I2-додека- метилендиамин-фибриноген)		
	A^{280}	A^{280}	%	A^{280}	A^{280}	%
0	0,292	0	0	0,842	0	0
30	0,326	0,034	II	0,879	0,037	I2
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			

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

Окончательные результаты экспериментов по тромболизису представлены в таблице 4.



-7-

Таблица 4

	Препарат	:Скорость растворе- :ния фибринового :сгустка :	:Время полного :растворения :фибринового :сгустка, час
5	Нативная урокиназа	0,3	5
	Соединение 1	0,5	3
	Соединение 2	0,43	3 часа 45 ми- нут
10	Соединение 3	0,40	4
	Соединение 4	0,36	4 часа 20 минут
	Соединение 5	0,25	5,5

Приведенные в таблице 4 данные показывают, что с ростом длины "ножки" использованного диамина растет эффективность тромболитического действия заявляемых производных урокиназы. 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. По-видимому, дальнейшее увеличение длины "ножки" не целесообразно, 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 урокиназы и заявляемыми производными урокиназы. Затем сгустки переносили в растворы того же буфера без фермента и инкубировали в



-8-

течение 3-х часов. В этих растворах определяли прирост оптической плотности, то есть скорость растворения фибринового сгустка, причем контролем служил буфер, содержащий плазминоген и омывающий фибриновый сгусток в течение всего времени эксперимента. Показано, что происходит быстрое встраивание в фибриновый сгусток фибриногена из омывающего раствора. Это включение обнаруживается визуально уже через 5-15 минут. Результаты испытаний представлены в таблице 5.

10

Таблица 5

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

Из данных таблицы 5 следует, что действие нативного препарата урокиназы ($tg \alpha = 0,15$) по эффективности тромболизиса близко к данным контрольного эксперимента ($tg \alpha = 0,14$). Фибринолиз в контроле объясняется наличием в препарате плазминогена примесей плазмينا. Значительно большую тромболитическую активность обнаруживает заявляемое производное урокиназы соединение I ($tg \alpha = 0,3$). Это означает, что именно это производное урокиназы обладает сродством к фибриноному сгустку, поскольку включается в него при первой 15-минутной инкубации и переносится вместе со сгустком в буферный раствор, где в течение 3-х часов продолжается фибринолитическое действие препарата. Более того, при повто-



- 9 -

рении этого эксперимента с теми же фибриновыми сгустками несколько раз (до 5) обнаруживается, что заявляемые производные урокиназы обладают способностью дополнительно встраиваться в уже лизирующийся тромб, о чем 5 свидетельствуют возрастающие значения $\text{tg } \alpha$ (от 0,3 до 0,46), характерного показателя эффективности тромболиза. Как видно из таблицы 5, подобная способность не свойственна нативной урокиназе.

Способ получения заявляемых производных урокиназы 10 осуществляют по известной схеме.

Способ осуществляют в 3 стадии.

I) Активизация карбоксильных групп фибриногена с помощью карбодимида и присоединение к нему алифатического амина.

15 Этот процесс проводится по общепринятой методике.

К раствору фибриногена в дистиллированной воде (рН 3,8) добавляют 100-кратный молярный избыток I-этил-3(3-диметиламинопропил) карбодимида и инкубируют смесь 10 мин при комнатной температуре, после чего к 20 ней при рН 4,5 и температуре 4°C добавляют 100-кратный молярный избыток алифатического амина в фосфатном буфере рН 8,3 и инкубацию продолжают в течение 5 часов. Полученный (продукт I) диализуют против дистиллированной воды при 4°C, а затем против фосфатного буфера 25 рН 8,3.

2) Активация карбоксильных групп урокиназы с помощью карбодимида.

К раствору урокиназы, предварительно отдиализованной против дистиллированной воды и фосфатного буфера 30 рН 8,3, добавляют I-этил-3(диметиламинопропил) карбодимид в молярном отношении 1:100 и инкубируют при температуре 4°C в течение 20 минут (продукт II).

3) Присоединение урокиназы, иммобилизованной к фибриногену.

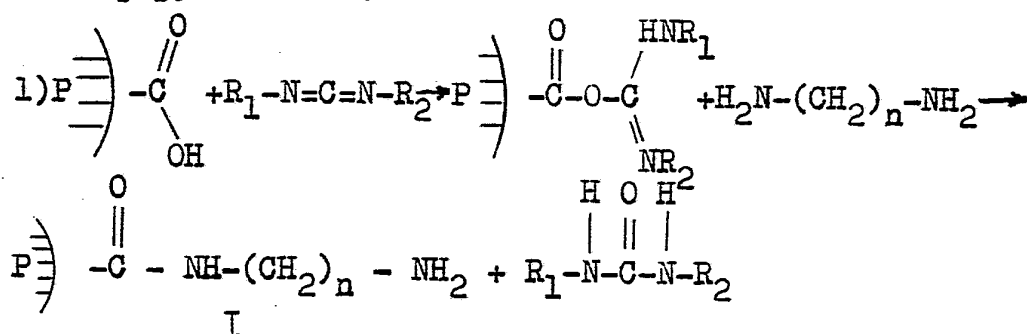
35 Реакцию связывания урокиназы с фибриногеном осуществляют смешиванием продуктов I и II с последующей



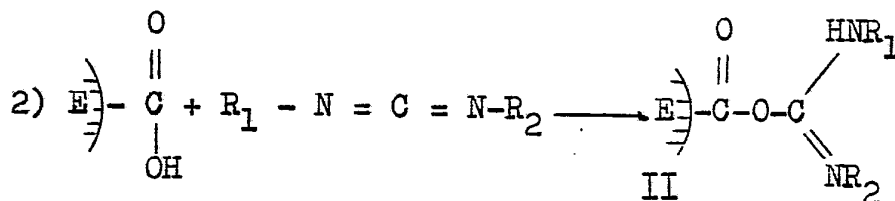
- 10 -

инкубацией смеси в течение 18 часов при температуре 4°C. Затем полученный препарат урокиназы, ковалентно связанной с фибриногеном, выделяют с помощью гельхроматографии или ультрафильтрации на приборе "Amicon" с фильтром XM-100.

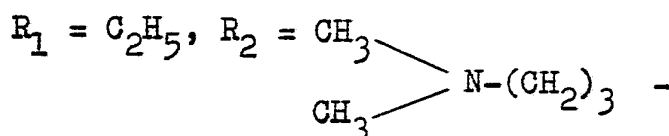
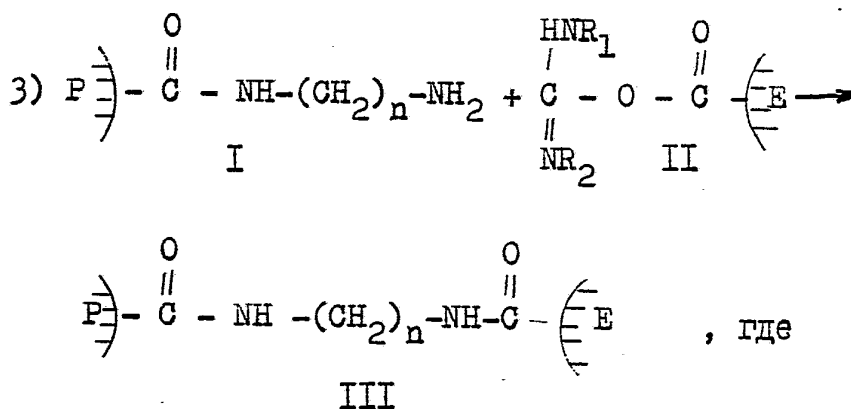
Указанный процесс получения производных урокиназы иллюстрируется следующей схемой.



где P - белок фибриноген.



где E - фермент урокиназа.



Проведение гель-хроматографического выделения полученных производных на колонке сефадекса G-100

-II-

показало увеличение молекулярной массы продукта (360-440 тыс. D.) по сравнению с нативной урокиназой (31-54 тыс. D.). Это свидетельствует о ковалентном присоединении урокиназы к фибриногену (регистрацию
5 продукта вели как по белку (280 нм, спектрофотометрически), так и по эстеразной каталитической активности урокиназы).

Вместе с тем сравнение свойств полученных производных (таблицы I, 2, 4) обнаружило, что урокиназа, не-
10 посредственно присоединенная к фибриногену (без "ножки" диамина, соединение 5), отличается по ряду признаков от производных фермента, присоединенных к матрице носителя через диамин.

Так, тенденции изменения K_M и k_{cat} , как указано
15 выше, свидетельствуют об увеличенном стерическом влиянии носителя на каталитические свойства урокиназы. Большая термостабильность продукта (соединения 5) подтверждает более жесткое присоединение урокиназы к фибриногену в этом случае. Фибринолитическая активность
20 соединения 5 ниже, чем в соединениях I-4, что указывает на ограничение подвижности фермента в этой ситуации. Перечисленные факты доказывают, что присоединение урокиназы к фибриногену в соединениях I-4 осуществляется через "ножку" алифатического диамина.

25 Полученные производные урокиназы представляют собой после лиофилизации белый хлопьевидный порошок, легко растворимый в воде.

Молекулярный вес получаемых производных составляет 360000-440000 D, содержание белка 10-30% масс., эстеразная каталитическая активность 30-60%.

30 Синтез производных урокиназы, ковалентно связанных через алифатический диамин с фибриногеном, позволяет получить производные фермента, обладающие высокой тромболитической активностью, повышенной стабильностью и сродством к материалу тромба. Подобные производные
35 урокиназы представляют собой эффективные средства системного тромболизиса пролонгированного действия.

- 12 -

Для лучшего понимания настоящего изобретения приводятся следующие примеры производных урокиназы и способы их получения.

Пример 1

- 5 7,83 мг фибриногена растворяют в 6 мл дистиллированной воды ($3,8 \cdot 10^{-6} \text{M}$) при комнатной температуре, раствор подкисляют с помощью KCl до pH 3,8 и затем добавляют 4 мг карбодимида. Через 10 минут, когда pH раствора достигает максимального значения (pH 4,5),
- 10 отбирают 2 мл раствора активированного фибриногена, который добавляют при температуре (4°C) к 2 мл раствора I,12-додекаметилендиамина ($3,8 \cdot 10^{-4} \text{M}$) в 0,1 М фосфатном буфере pH 8,3 и инкубируют смесь в течение 5 часов. После этого инкубационную смесь диализуют в течение
- 15 2 часов на холоду сначала против дистиллированной воды, а затем в тех же условиях против 0,02 М фосфатного буфера pH 8,3 (продукт I).

- Препарат урокиназы (24000 IU) растворяют в 2 мл дистиллированной воды и диализуют на холоду 2 часа
- 20 против дистиллированной воды, а затем еще 2 часа против 0,05 М фосфатного буфера pH 8,3. К отдиализованному раствору урокиназы добавляют 4 мг карбодимида и инкубируют смесь при перемешивании на холоду в течение 20 минут (продукт II).

- 25 После этого к раствору активированной урокиназы (продукт II) приливают 2 мл раствора фибриноген - I,2-додекаметилендиамина (продукт I). Смесь инкубируют в течение 18 часов при 4°C , затем полученный препарат выделяют из реакционной смеси с помощью ультрафильтра-
- 30 ции на "Amicon" с фильтром XM-100. Получают продукт, представляющий собой урокиназу, ковалентно связанную с фибриногеном с помощью I,12-додекаметилендиамина. Молекулярная масса 440000 D, содержание белка 10% масс, сохраняемая эстеразная каталитическая ак-
- 35 тивность 50%, считая на исходную урокиназу.

Пример 2

Процесс осуществляют аналогично описанному в при-



-13-

мере I, за исключением того, что в качестве сшивающего реагента используют I,10-декаметилендиамин.

- Получают продукт, представляющий собой урокиназу, ковалентно связанную с фибриногеном с помощью I,10-декаметилендиамина. Молекулярная масса 420000 D, содержание белка 12% масс, сохраняемая эстеразная каталитическая активность 45%, считая на исходную урокиназу.

Пример 3

- Процесс осуществляется аналогично описанному в примере I, за исключением того, что в качестве сшивающего агента используется I,7-гептаметилендиамин. Получают продукт, представляющий собой урокиназу, ковалентно связанную с фибриногеном с помощью I,7-гептаметилендиамина. Молекулярная масса 400000 D, содержание белка 14% масс, сохраняемая эстеразная каталитическая активность 30%, считая на исходную урокиназу.

Пример 4

- Процесс осуществляется аналогично описанному в примере I, за исключением того, что в качестве сшивающего агента используется I,4-тетраметилендиамин. Получают продукт, представляющий собой урокиназу, ковалентно связанную с фибриногеном с помощью I,4-тетраметилендиамина. Молекулярная масса 385000 D, содержание белка 15% масс, сохраняемая эстеразная каталитическая активность 40%, считая на исходную урокиназу.

Пример 5

Урокиназу присоединяют к фибриногену непосредственно, без удлиняющего мостика алифатического диаминна.

- 2 мл урокиназы (12000 IU/ml) диализуют 2 часа при 4°C против дистиллированной воды, а затем против 0,02 M фосфатного буфера pH 8,3. К раствору урокиназы добавляют 2 мл активированного карбодимидом фибриногена ($3,8 \cdot 10^{-6}$ M) и 1 мл 0,1 M фосфатного буфера pH 8,3. Смесь инкубируют 18 часов при 4°C. Полученное производное выделяют ультрафильтрацией. Получают продукт, представляющий собой урокиназу, ковалентно связанную с



-14-

фибриногеном. Молекулярная масса 360000 D , содержание белка 30% масс , сохраняемая эстеразная активность 32%, считая на исходную урокиназу.

Промышленная применимость

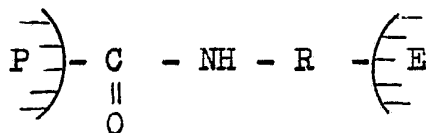
- 5 Заявляемые производные урокиназы с повышенным сродством к фибрину, обладающие пролонгированным фибринолитическим действием, могут быть использованы в медицине для лечения инфаркта миокарда, при тромбозах коронарных сосудов, эмболиях легочных артерий, тромбозах сосудов головного мозга и глубоких вен конечностей, а также в ряде других случаев.
- 10



- 15 -

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Производные урокиназы, представляющие собой урокиназу, ковалентно связанную с фибриногеном, или урокиназу, ковалентно связанную через алифатический диамин с фибриногеном, общей формулы:



где Р - фибриноген, Е - урокиназа, R - отсутствует или означает группу $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, где $n = 1-12$, с молекулярной массой 360000-440000 D, содержанием белка 10-30% масс, эстеразной каталитической активностью 30-60%.

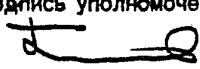
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/SU 84/00008

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC ³ C 12 N 9/72, C 12 N 11/02, A 61 K 37/48														
II. FIELDS SEARCHED Minimum Documentation Searched ⁴ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; padding: 5px;">Classification System</th> <th style="padding: 5px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;">IPC³</td> <td style="padding: 10px;">C 12 N 9/72, C 12 N 11/00, C 12 N 11/02, A 61 K 37/48</td> </tr> </table> Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵			Classification System	Classification Symbols	IPC ³	C 12 N 9/72, C 12 N 11/00, C 12 N 11/02, A 61 K 37/48								
Classification System	Classification Symbols													
IPC ³	C 12 N 9/72, C 12 N 11/00, C 12 N 11/02, A 61 K 37/48													
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category *</th> <th style="padding: 5px;">Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷</th> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹⁸</th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">US, A, 4349630 (Alexandr V. Maximenko, et al) 14 September 1982 (14.09.82)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">&</td> <td style="padding: 5px;">SU, A, 1022988</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">JP, A, 54-113488 (Midori juji KK) 05 September 1979 (05.09.79)</td> <td></td> </tr> </table>			Category *	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸	A	US, A, 4349630 (Alexandr V. Maximenko, et al) 14 September 1982 (14.09.82)	1	&	SU, A, 1022988		A	JP, A, 54-113488 (Midori juji KK) 05 September 1979 (05.09.79)	
Category *	Citation of Document, ¹⁶ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸												
A	US, A, 4349630 (Alexandr V. Maximenko, et al) 14 September 1982 (14.09.82)	1												
&	SU, A, 1022988													
A	JP, A, 54-113488 (Midori juji KK) 05 September 1979 (05.09.79)													
* Special categories of cited documents: ¹⁵ "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family														
IV. CERTIFICATION <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search ² 14 May 1984 (14.05.84) </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report ² 13 June 1984 (13.06.84) </td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;"> International Searching Authority ¹ ISA/SU </td> <td style="padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer ²⁰ </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search ² 14 May 1984 (14.05.84)	Date of Mailing of this International Search Report ² 13 June 1984 (13.06.84)	International Searching Authority ¹ ISA/SU	Signature of Authorized Officer ²⁰								
Date of the Actual Completion of the International Search ² 14 May 1984 (14.05.84)	Date of Mailing of this International Search Report ² 13 June 1984 (13.06.84)													
International Searching Authority ¹ ISA/SU	Signature of Authorized Officer ²⁰													

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка № PCT/SU 84/00008

I. КЛАССИФИКАЦИЯ ОБЪЕКТА ИЗОБРЕТЕНИЯ (если применяются несколько классификационных индексов, укажите все) ³		
В соответствии с Международной классификацией изобретений (МКИ) или как в соответствии с национальной классификацией, так и с МКИ ² C12N 9/72, C 12N 11/02, A 61K 37/48		
II. ОБЛАСТИ ПОИСКА		
Минимум документации, охваченной поиском ⁴		
Система классификации МКИ	Классификационные рубрики C 12N 9/72, C 12N 11/00, C 12N 11/02, A 61K 37/48	
Документация, охваченная поиском и не входившая в минимум документации, в той мере, насколько она входит в область поиска ⁵		
III. ДОКУМЕНТЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К ПРЕДМЕТУ ПОИСКА ¹⁴		
Категория*	Ссылка на документ ¹⁶ , с указанием, где необходимо, частей, относящихся к предмету поиска ¹⁷	Относится к пункту формулы №18
A	US, A, 4349630, (Alexandr V. Maximenko et al) 14 сентября 1982 (14.09.82)	I
&	SU, A, 1022988	
A	JP, A, 54-113488 (Midori juji KK) 05 сентября 1979 (05.09.79)	I
* Особые категории ссылочных документов ¹⁵ :		
.A* документ, определяющий общий уровень техники, который не имеет наиболее близкого отношения к предмету поиска.		
.E* более ранний патентный документ, но опубликованный на дату международной подачи или после нее.		
.L* документ, подвергающий сомнению притязание(я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано).		
.O* документ, относящийся к устному раскрытию, применению, выставке и т. д.		
.P* документ, опубликованный до даты международной подачи, но на дату испрашиваемого приоритета или после нее.		
.T* более поздний документ, опубликованный на или после даты международной подачи или даты приоритета и не порочащий заявку, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение.		
.X* документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной и изобретательским уровнем.		
.Y* документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; документ в сочетании с одним или несколькими подобными документами порочит изобретательский уровень заявленного изобретения, такое сочетание должно быть очевидно для лица, обладающего познаниями в данной области техники.		
& документ, являющийся членом одного и того же патентного семейства.		
IV. УДОСТОВЕРЕНИЕ ОТЧЕТА		
Дата действительного завершения международного поиска ² 14 мая 1984 (14.05.84)	Дата отправки настоящего отчета о международном поиске ² 13 июня 1984 (13.06.84)	
Международный поисковый орган ¹ ISA/SU	Подпись уполномоченного лица ²⁰  Н.Шепелев	