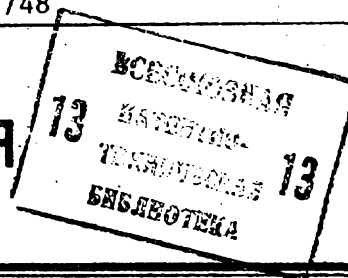




(51)4 C 12 N 9/72, 11/00//
A 61 K 37/48

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

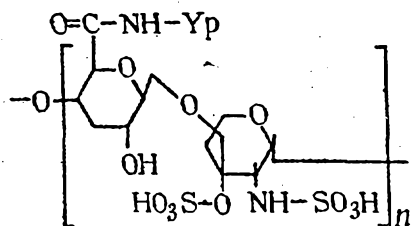
К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- где NH - Yp - урокиназа,
n = 27-46,
обладающая пролонгированной тромбо-
литической активностью и антикоагули-
рующим действием и характеризующаяся
следующими параметрами:

Молекулярная масса	70000±9000
Содержание белка	20-30 мас. %
Сохраняемая ката- литическая актив- ность	70-90% (от исходной)

Специфическая активность	150000-200000 1U урокиназы 1000 1U гепарина,
K _m	(9,3-9,94) × 10 ⁻⁴ М
K _{cat} .	25-29 с ⁻¹
pH-оптимум	7,3-8,5



SU 1137760 A

Изобретение относится к биоорганической химии, а именно к синтезу биологически активных химических соединений, обладающих тромболитической и антикоагулирующей активностью.

Предлагаемые соединения представляют собой продукт связывания урокиназы с гепарином. Урокиназа, являясь активатором плазминогена в организме, применяется как тромболитический агент. Гепарин представляет собой антикоагулирующее средство. Обычно вся тромболитическая терапия ведется на фоне гепаринизации.

Известны производные урокиназы, представляющие собой комплекс урокиназы с гепарином, основанные на их электростатическом взаимодействии, которые получают инкубацией фермента с гепарином [1]. В смесях гепарина и урокиназы образуются наибольшие количества производных, представляющих собой урокиназу, электростатически связанную с гепарином.

Получаемые таким способом производные представляют собой урокиназу, электрически связанную с гепарином.

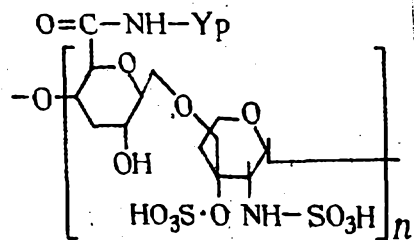
Однако стабильность этих производных оказывается сильно зависимой от величин ионной силы и pH раствора, что является препятствием для их использования в терапии.

Соотношение активностей компонентов такого комплекса составляет 30000-100000 IU урокиназы на 100 IU гепарина. Количество гепарина в комплексе (100 IU) недостаточно для проявления значимого эффекта антикоагулянта в организме. Увеличение дозы препарата гепарината урокиназы приводит к тому, что наряду с увеличением количества гепарина (и следовательно, антикоагулирующей активности) увеличивается и количество связанной с ним урокиназы. Избыток тромболитика вызывает подавление системы свертывания крови.

Таким образом, данный комплекс урокиназы с гепарином не характеризуется сбалансированным соотношением его компонентов, пролонгированной и повышенной тромболитической активностью.

Целью изобретения является получение нового препарата - иммобилизованной урокиназы, обладающей тромболитической активностью и антикоагулирующим действием.

Цель изобретения достигается за счет свойств иммобилизованной урокиназы общей формулы



где NH-Yp - урокиназа, $n = 27-46$, характеризующейся следующими параметрами:

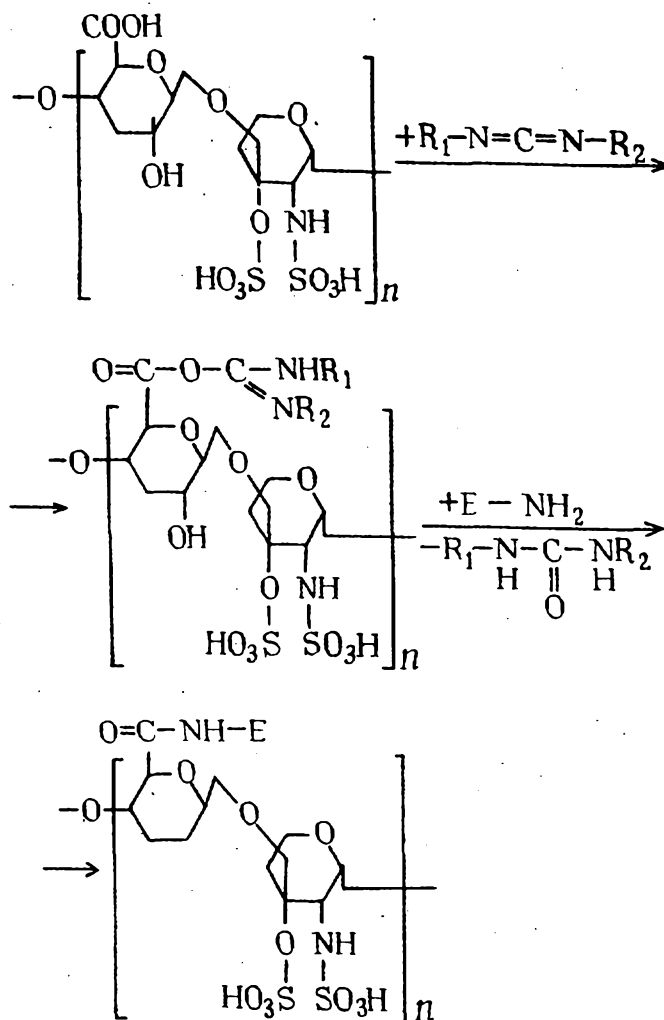
Молекулярная масса	70000±9000
Содержание белка	20-30 мас. %
Сохраняемая каталитическая активность	70-90% (от исходной)
Специфическая активность	150000-200000 IU урокиназы/100 IU гепарина
Km	(9,3-9,94) × 10 ⁻⁴ M
Kcat	25-29 с ⁻¹
pH-оптимум	7,3-8,5

и получаемой связыванием урокиназы с гепарином в слабощелочной среде при температуре от 0 до 25°C в течение 2-20 ч. Значения n , как и в молекуле гепарина, составляет 27-46.

Способ осуществляют следующим образом.

В 0,01-0,1 M фосфатном буфере pH 8,0-8,5 растворяют гепарин, к которому затем осторожно добавляют избыток карбодиимида. Смесь инкубируют в течение получаса на холоду, а затем к ней добавляют раствор урокиназы и проводят инкубацию еще в течение 2-20 ч при температуре от 4 до 25°C. После этого полученное производное подвергают очистке диализом в течение 6 ч против дистиллированной воды и лиофилизируют.

Связывание урокиназы с гепарином происходит через стадию карбодиимидной активации карбоксильных групп гепарина с последующим взаимодействием с аминок группами фермента (схема 1).



Полученный продукт представляет собой урокиназу, ковалентно связанную с гепарином. Синтезированные производные водорастворимы, что весьма удобно для их повседневного клинического использования. На фоне гепарина заметно эффективнее действует фермент-тромболитик. Модификация урокиназы существенно не меняет ее кинетических свойств, не изменяется и термостабильность, зато тромболитическое действие приобретает пролонгированный характер. Остаточная каталитическая активность производного урокиназы в физиологических условиях составляет 70-90% от первоначальной активности нативного фермента

Таким образом, преимуществами описываемого препарата следует считать: возрастание тромболитической активности предлагаемых соединений (в 1,5 раза), придание ей пролонгированного характера, а также появ-

ление у них новых свойств - привитой антикоагулирующей активности. В результате для медицинской практики предлагается новое вещество - препарат комплексного пролонгированного действия на ферментной основе.

Увеличение молекулярной массы синтезированного препарата способствует увеличению срока его действия в кровотоке.

Пример 1. В 4 мл 0,05 М фосфатного буфера pH 8,3 растворяют 8 мг гепарина, к которому осторожно добавляют на холоду (4°C) 5 мг 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодимида и смесь инкубируют при перемешивании в течение 30 мин. Затем к инкубационной смеси добавляют 1 мл раствора урокиназы 50.000 IU/мл и инкубацию продолжают при 4°C в течение 16 ч. После этого раствор диализуют против дистиллированной воды в течение 6 ч и лиофилизируют. В ре-

результате осуществления реакции связывания с гепарином взаимодействует 90% белка от его исходного количества (по данным гельфильтрации на сефадексе Г-100), при этом фермент сохраняет 90% эстеразной активности от первоначальной. По термостабильности полученное производное весьма близко к нативному ферменту, известному своей термостойкостью. Специфическая активность полученного производного 45000 IU/мл, содержание белка 30 мас.%.
 30 мас.%.
 10

Пример 2. Процесс осуществляют также, как и в примере 1, за исключением того, что реакцию связывания урокиназы с гепарином проводят в 0,1 М фосфатном буфере pH 8,0.

С гепарином связывается 80% исходного белка, при этом фермент сохраняет 78% эстеразной активности, и по термостабильности не уступает нативной урокиназе. Специфическая активность полученного производного 39000 IU/мл, содержание белка по весу 26%.
 20

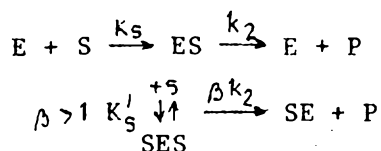
Пример 3. Процесс осуществляют так же, как в примере 1, за исключением того, что реакцию связывания урокиназы с гепарином проводят в 0,01 М фосфатном буфере pH 8,5.

С носителем связывается 85% исходного белка при сохранении 75% исходной эстеразной активности. Специфическая активность 37000 IU/мл, содержание белка по весу 24%.
 35

Пример 4. Процесс проводят так же, как и в примере 1, за исключением того, что реакцию связывания урокиназы с гепарином осуществляют в 0,01 М фосфатном буфере pH 8,3 при 25°C в течение 2 ч. В реакцию связывания вступает 85% белка от исходного, сохраняемая каталитическая эстеразная активность ферментного производного 75%. Кинетические свойства препарата, его термостабильность близки тем, что и в примере 1. Специфическая активность 38000 IU/мл, содержание белка по весу 25%.
 40

Таким образом, из приведенных примеров следует, что количество связанного с гепарином фермента меняется в зависимости от pH инкубации. Диапазон pH 8,0-8,5 является оптимальным для протекания двух реакций: активации карбоксильных групп гепарина
 50

карбодимидом и взаимодействия их с аминокеттогруппами урокиназы. Именно полученные при таких значениях pH ферментные производные (примеры 1-4) обладают наилучшими свойствами. Так, реакция каталитического гидролиза нативной урокиназой метилового эфира ацетилглициллизина осуществляется по схеме активации хода реакции ее субстратом (схема 2).



Продукты примеров 1-4 осуществляют катализ этой реакции по той же схеме. При этом модификация урокиназы гепарином существенно не меняет кинетические свойства урокиназы. В табл. 1 приведены кинетические параметры реакции гидролиза метилового эфира ацетилглициллизина нативной и модифицированной урокиназой при 25°C 0,1 М KCl и pH 7,8 (оптимум эстеразной активности).
 25

Таким образом, каталитические свойства модифицированной урокиназы, изученные на реакции гидролиза метилового эфира ацетилглициллизина, вполне сравнимы с каталитическими свойствами нативной урокиназы.

Тромболитическую активность нативной и модифицированной урокиназы определяли по известной методике [2] с добавлением в раствор буфера 0,33 мг/мл плазминогена человека.

Препараты нативной и модифицированной урокиназы используют в соотношении, обеспечивающем одинаковую оптическую плотность при 280 нм. Результаты экспериментов приведены в табл. 2 (pH 7,4, комн. температура).
 40

$\text{tg } \alpha$ представляет собой отношение прироста оптической плотности раствора (в результате деструкции при тромболлизе нерастворимого фибринового сгустка и перехода его фрагментов в раствор) к величине промежутка времени, за который оно произошло, и характеризует скорость процесса тромболизиса.

Представленные в табл. 2 данные показывают, что в результате модификации урокиназы гепарином тромболитическая активность полученного фер-

ментного производного возрастает приблизительно в 1,5 раза, что является весьма важным для тромболитической терапии.

Антикоагулирующее действие препаратов модифицированной урокиназы изучали на богатой тромбоцитарной плазме кролика. Показано, что после предварительной инкубации препаратов нативной урокиназы и производных гепарин-урокиназы (100-250 ед/мл, 5-15 мин, 25°C) с богатой тромбоцитарной плазмой кролика не обнаруживается различий в предотвращении агрегации тромбоцитов и реакции высвобождения АТФ из них, индуцируемых тромбином (1 мМ). Это свидетельствует о том, что по активности гепарин в связанном с урокиназой виде не уступает свободному гепарину. Таким образом, ковалентное связывание урокиназы с гепарином не ухудшает терапевтических свойств урокиназы и гепарина и позволяет

получить препарат комбинированного действия.

Получение тромболитических средств расширенного спектра действия, в том числе и производных урокиназы, обладающих тромболитическим и антикоагулирующим действием, позволяет разрабатывать новые, высокоэффективные способы тромболитической терапии. Предлагаемый препарат модифицированной урокиназы отличается не только более высокой тромболитической активностью чем нативная урокиназа, но и пролонгированным действием. Этот препарат дает возможность перейти от струйных методов введения к инъекционным, сократить продолжительность терапии, уменьшить дозы назначаемых больному лекарств и соответственно уменьшить риск "лекарственной болезни". Все это позволит широко использовать эти препараты для лечения тромбоэмболий, инфаркта миокарда и заболеваний кровеносных сосудов.

Т а б л и ц а 1

Препарат	K_S 10^{-4} , М	k_2 c^{-1}	K'_S 10^3 , М	β
Нативная урокиназа	2,87	31	1,33	1,33
Продукт примера 1	9,5	29	7,9	1,35
Продукт примера 2	9,83	27	8,1	1,31
Продукт примера 3	9,94	25	8,5	1,30
Продукт примера 4	9,3	28	8,1	1,33

Т а б л и ц а 2

Препарат	Скорость лизиса тромба	
	$\text{tg } \alpha$	%
Нативная урокиназа	0,20	100
Продукт примера 1	0,33	165
Продукт примера 2	0,29	145
Продукт примера 4	0,27	135