



УДК 612.115.12:577.112.089

## АКТИВАТОРЫ ПЛАЗМИНОГЕНА ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ. НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ИЗУЧЕНИЯ

© 1999 г. А. В. Максименко<sup>#</sup>

Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗМП РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., 15А

Поступила в редакцию 08.10.98 г. Принята к печати 06.04.99 г.

Обобщены сведения последних лет по разработке новых форм активаторов плазминогена (АП). Продемонстрированы результаты изучения таких АП, полученных технологией рекомбинантных ДНК в виде мутантных производных. Приведены данные о химерных (гибридных) формах АП и их конъюгатах, синтезированных химическим путем. Проанализированы перспективные пути поиска АП. Показано новое направление изучения АП третьего поколения, предназначенных для комбинированной активации плазминогена и дальнейшего развития методов тромболитической терапии.

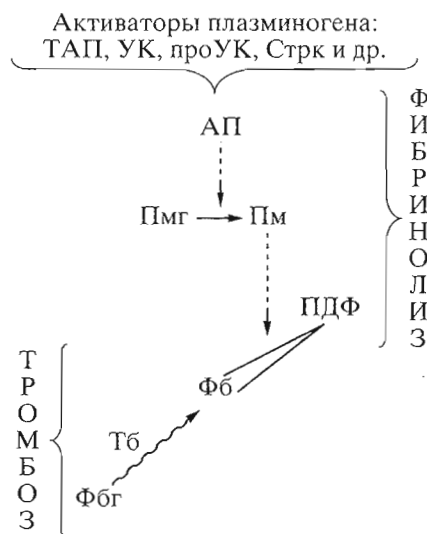
*Ключевые слова:* активаторы плазминогена, рекомбинантные формы, химические конъюгаты; фибринолитическая активность; тромболитиз, пролонгация действия.

### ВВЕДЕНИЕ

Конструирование биомакромолекул с заранее заданными свойствами нашло свое яркое воплощение в разработке новых форм активаторов плазминогена (АП) [1–3]. Последние условно можно разделить на несколько поколений. АП первого поколения исторически считают урокиназу и стрептокиназу, второго поколения – тканевый активатор плазминогена (ТАП) и проурокиназу; к ним можно отнести и разрабатываемую сейчас стафилокиназу [1, 2]. Названные препараты применяются в медицине в качестве действенных средств тромболитической терапии [4–7]. На основе природных форм АП методами химического или биологического синтеза были получены новые производные, названные АП третьего поколения. Основные достижения этого направления исследований уже обобщались в ряде обзоров [2, 5, 7–12], однако стремительное развитие работ по поиску новых форм АП привело к накоплению за последние годы ряда новых интересных результатов. Их рассмотрение и анализ осуществлены в настоящем обзоре.

На рисунке приведена схема превращений белков крови. На последних стадиях развития сосудистого поражения растворимый белок крови фибриноген под ферментативным действием тромбина превращается в нерастворимый фибрин, составляющий основу для формирования тромба. Наличие тромбов ухудшает или полностью блокирует кровотоки и является одной из основных причин весьма распространенных заболеваний сердечно-сосудистой системы. Растворение

внутрисосудистых тромбов происходит под действием плазмина. Эта сериновая протеиназа катализирует лизис фибрина до образования растворимых продуктов, что способствует восстановлению кровотока. Время полужизни (при активном функционировании) плазмина в кровотоке (не на сгустке) составляет 0.1 с, поскольку в объеме



Схематическое представление взаимодействий белков крови при тромбозе и фибринолизе. Обозначения: Фбг – фибриноген, Фб – фибрин, Тб – тромбин, ПДФ – продукты деградации фибрина, Пмг – плазминоген, Пм – плазмин, АП – активаторы плазминогена: ТАП – тканевый активатор плазминогена, УК – урокиназа, проУК – проурокиназа, Стрк – стрептокиназа. Пояснения указанных взаимодействий приведены в тексте. Процессы фибринолиза и развития тромбоза для наглядности обозначены стрелками разного вида.

<sup>#</sup> Факс: (095) 415-29-62; e-mail: cclibr@transts.ru.

плазмы он быстро ингибируется  $\alpha$ -2-антиплазмином. Плазмин – заключительное звено фибринолитической системы – образуется в результате активации его предшественника, другого белка плазмы крови, пламиногена, под действием АП.

Среди АП в настоящее время, как уже говорилось выше, выделяют несколько поколений [2, 3, 5, 7, 10]. Они существенно различаются между собой по своему составу и происхождению, однако их активирующее действие обусловлено протеолизом одной и той же пептидной связи Arg561-Val562 пламиногена. При одинаковом для всех АП каталитическом принципе действия АП разных видов значительно различаются в сорбционной способности, определяющей распознавание и связывание активатора с биохимическими компонентами зоны тромботического поражения. Разнообразие механизмов сорбционных взаимодействий и участвующих в них биологических агентов дали в распоряжение исследователей большие возможности для конструирования АП с повышенной эффективностью фибринолитического и тромболитического действия. С развитием технологии рекомбинантных ДНК [2, 3, 13] и совершенствованием приемов химического конъюгирования биомолекул [9–11] было получено большое число новых производных, отличающихся от нативных форм АП и причисленных к АП третьего поколения.

В настоящем обзоре на примере таких производных предпринята попытка проанализировать направления поиска новых АП и его перспективы, определяющие дальнейшее развитие методов и средств тромболитической терапии.

### МУТАНТНЫЕ ФОРМЫ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

Использование методов генной инженерии [13] позволило не только достичь масштабированного производства природных биологически активных белковых веществ, но и конструировать путем направленного мутагенеза их модифицированные формы, в которых произведены одна или несколько замен аминокислотных остатков природной последовательности или удалены определенные участки. Среди АП третьего поколения такие мутантные белковые производные (мутеины) оказались сейчас наиболее исследованными клинически [2, 3, 10].

Молекула нативного ТАП состоит из нескольких структурно идентифицируемых областей – доменов, которым присущи различные функции [2, 3, 7]. В молекулу ТАП дикого типа входят: фибронектиновый пальцеобразный домен, существенный для высокоаффинного связывания с фибрином; домен, гомологичный эпидермальному фактору роста, ответственный за рецепторное связывание с клетками печени и ускоренный клиренс; два кренделеподобных домена (крингла) –

крингл 1, существенный для связывания с рецепторами эндотелиальных клеток, и крингл 2, ответственный за низкоаффинное связывание с фибрином; а также протеиназный домен, представляющий собой специфичную к пламиногену протеиназу, имеющую в своей последовательности участок связывания ингибитора активатора пламиногена 1 (ИАП-1). Молекулярная масса этого одноцепочечного гликопротеина составляет ~64 кДа. В результате ограниченного протеолиза под действием пламина или трипсина по связи Arg275-Ile276 одноцепочечный ТАП превращается в двухцепочечную форму. Протеиназный домен образует при этом В-цепь белка, а все остальные домены составляют А-цепь. Указанные цепи удерживаются в структуре биокатализатора дисульфидными связями. В физиологических условиях обе формы ТАП (одноцепочечная и двухцепочечная) со сходной эффективностью активируют превращение пламиногена в плазмин [10].

Благодаря единственной замене Cys84 в молекуле ТАП в составе домена, гомологичного эпидермальному фактору роста [Cys84 на Ser (C84S)], мутантная форма, обозначенная E6010, приобретает способность к пролонгированному пребыванию в кровотоке и эффективному тромболитическому действию *in vivo* после внутривенного инъекционного (болюсного) введения [14, 15]. Клинические испытания показали высокую терапевтическую эффективность производного E6010 в сравнении с действием родительского ТАП [16].

Из более чем тысячи разнообразных исследованных мутантных форм ТАП было отобрано производное со свойствами наиболее перспективного тромболитического агента [17]. Комбинация мутаций в молекуле ТАП, состоящая из замен T103N, N117Q и KHRR(296-299)AAAA, обусловила быстрое тромболитическое действие мутантного белка, названного TNK-TPA, и его сниженное участие в фибринолизе. Это производное в меньшей степени ингибировалось ИАП-1 и более длительное время находилось в крови в сравнении с показателями родительской формы. Пилотное клиническое изучение TNK-TPA показало его эффективность после одного болюсного внутривенного введения пациентам с острым инфарктом миокарда [18]. Планируются дальнейшие клинические исследования TNK-TPA.

Ретеплаза (устоявшееся название серийной формы мутантного ТАП, обозначаемого как r-PA; другое название коммерческого препарата – ретаваза) была получена как негликозилированная форма ТАП с удалением из его молекулы ряда доменов: пальцеобразного, гомологичного эпидермальному фактору роста и крингла 1 [19]. Такая модификация обеспечивала пролонгацию действия и повышенную эффективность r-PA при артериальном тромболлизе у собак, меньшее истощение уровня содержания гемостатических

белков крови (системное действие) в сравнении с эффектами родительской формы ТАП [20, 21]. Быстродействие ретеплазы было подтверждено (в сравнительных клинических исследованиях препаратов) у пациентов с острым инфарктом миокарда после двойного болюсного внутривенного введения r-PA [22]. Полученные результаты имеют практическую значимость для улучшения тромболитической терапии.

Ожидается появление интересных клинических данных по изучению другой мутантной формы ТАП, названной п-РА. Это производное ТАП имеет несколько мутаций [23]. В нем отсутствуют пальцеобразный домен и домен, гомологичный эпидермальному фактору роста, и кроме того остаток Gln117 заменен на Asn. Полученное производное отличается от ТАП увеличенным временем полужизни в кровотоке (30–45 мин) и существенно более эффективным тромболитическим действием на модели тромбоза у кроликов.

В целом, разработка мутантных форм АП ведется весьма широко [8]. На фоне клинических испытаний мутантных белков, отмеченных выше, продолжается получение и исследование их новых производных, некоторые из которых упомянуты далее. Плодотворным оказался подход сравнения структурных особенностей белков в паре профермент–фермент при сопоставлении свойств пары химотрипсиноген–химотрипсина с парой одноцепочечный ТАП–двухцепочечный ТАП [24]. Одноцепочечный ТАП обладает высокой для профермента каталитической активностью (составляющей 8% от активности двухцепочечной формы при отсутствии в системе фибрина), тогда как у химотрипсиногена каталитическая активность весьма низка. Из сопоставления структур названных белков можно видеть, что указанное отличие коррелирует с отсутствием в молекуле одноцепочечного ТАП полной второй триады, сходной по составу с каталитической и имеющейся у химотрипсиногена (Asp194...His40...Ser32, нумерация по химотрипсину). В химотрипсине вторая триада конформационно разрушается, а сохраняется лишь одна каталитическая триада Asp102...His57...Ser195. Авторами работы [24] было постулировано, что отсутствие второй триады (зимогенной триады) в одноцепочечном ТАП обуславливает высокий уровень его “зимогенной” каталитической активности. Благодаря замене R275E предотвращалось превращение одноцепочечной формы ТАП в двухцепочечную под действием плазмينا. Это позволило оценить кинетические параметры активации плазминогена одноцепочечным ТАП.

Создание в молекуле одноцепочечного ТАП направленным мутагенезом (A292S, F305H) полной второй триады (остаток Asp477 (194 по химотрипсину) является инвариантным) подавляло ферментативную активность “проферментного” производного, повышая инертность в отношении

активации плазминогена без фибрина в кровотоке. В присутствии фибрина, являющегося кофактором ТАП [7, 10], каталитическая активность мутантного производного существенно возросла (в 130000 раз по сравнению с наблюдаемым для ТАП увеличением в 520 раз, будучи эквивалентной для этих сравниваемых форм в условиях определения). Такие результаты позволяют рекомендовать мутантное производное ТАП с заменами R275E, A292S, F305H как фибринолитический фермент с повышенной селективностью действия [24], тромболитическая эффективность которого должна быть изучена в будущих экспериментах *in vivo*.

Другим физиологическим АП, на основе которого разрабатываются производные третьего поколения, является проурокиназа. Она продуцируется клетками в виде одной полипептидной цепи (полное номенклатурное название – одноцепочечный активатор плазминогена урокиназного типа) [2, 4, 8]. В ее составе имеется домен, гомологичный эпидермальному фактору роста, кренделеподобный домен (крингл 1) и протеиназный домен, содержащий сериновый и другие остатки для формирования активного центра. Молекулярная масса такой проурокиназы около 54 кДа. Проурокиназа обнаруживает сродство к фибрину только при условии сохранности пептидной связи Lys158-Phe159. Ее разрыв под действием плазмина (или калликрейна) ведет к образованию двухцепочечного активатора плазминогена урокиназного типа, называемого обычно урокиназой или урокиназой высокой молекулярной массы. При этом тяжелая ( $M \sim 31$  кДа, обозначаемая как А-цепь) и легкая ( $M \sim 23$  кДа, обозначаемая как В-цепь и содержащая активный центр биокатализатора) цепи удерживаются вместе дисульфидной связью, образованной остатками Cys148 и Cys279. Каталитическая эффективность урокиназы существенно выше, чем у проурокиназы [7, 10]. При отщеплении от *N*-концевой части молекулы урокиназы (по остатку Lys135) фрагмента с  $M \sim 21$  кДа образуется урокиназа низкой молекулярной массы ( $M \sim 33$  кДа). Такое превращение обычно происходит в результате самопереваривания урокиназы в процессе ее выделения и очистки. По эффективности каталитического действия урокиназы разной молекулярной массы сходны между собой. Технология рекомбинантных ДНК позволяет получать производные проурокиназы низкой молекулярной массы, не имеющие в своем составе указанного *N*-концевого фрагмента. На молекулу проурокиназы может воздействовать и тромбин, расщепляя пептидную связь Arg156-Phe157, в результате чего возникают каталитически неактивные производные урокиназного активатора плазминогена. Таким образом, взаимодействие проурокиназы с плазмином повышает каталитическую эффективность урокиназного активатора

плазминогена, а взаимодействие с тромбином инактивирует его.

Проведение направленного мутагенеза в молекуле проурокиназы привело к неоднозначным результатам [25]. Сопоставляя структуру белковых пар проурокиназа–урокиназа с химотрипсиноген–химотрипсин (как профермент–фермента), авторы предположили, что остаток Lys300 в проурокиназе служит поддержанию ее каталитических свойств, так как солевой мостик между остатками Lys300 и Asp355 стабилизирует гибкую петлю вблизи остатка Ser356 активного центра. В результате этого данный профермент отличается высокая для зимогенов каталитическая активность (0.4% от урокиназной). Замена направленным мутагенезом остатка Lys300 на Ala, “уничтожившая солевой мостик”, действительно уменьшала каталитическую активность мутантного белка, способствуя снижению активации им плазминогена в объеме кровотока (уменьшение системной активации). Однако наряду с этим снижалась и фибринолитическая активность мутанта K300A проурокиназы. Для полученной в дальнейшем [Ala300]урокиназы также отмечалось снижение способности активировать плазминоген в присутствии фибрина из-за уменьшения скорости катализа по сравнению с таковой для нативной урокиназы, обусловленное снижением величины  $k_{cat}$ . Таким образом, оказалось, что остаток Lys300 важен не только для проявления активности проурокиназы, но и для эффективного функционирования урокиназы [25].

Остаток Asp194 является инвариантным в сериновых ферментах. Однако было показано, что в отличие от химотрипсиногена, где он подавляет каталитическую активность зимогена, в молекуле одноцепочечного ТАП этот остаток служит поддержанию каталитических свойств [26]. Это подтверждалось исследованием ряда мутантных белков ТАП, полученных заменой Asp194 на Glu или Asn. Такие производные имели активность в 1–2 тысячи раз меньшую по сравнению с диким типом ТАП. В присутствии же фибрин-мономера мутантные формы резко увеличивали свою активность. Отмеченное увеличение составляло для родительского ТАП 960 раз, а для названных производных 498000–1050000 раз [26]. Эти данные важны для изучения взаимодействия фибрина с ТАП, определяющего эффективность тромболитика.

Весьма интересен подход, связанный с использованием для активации тромболитика *in vitro* ферментов коагуляционного каскада крови. Так было получено мутантное производное плазминогена, превращаемое в плазмин тромбином [27]. Участок вблизи расщепляемой АП связи Arg561-Val562 был изменен по позициям P3, P2 и P1' заменой на фрагмент P7–P1' из фактора XI (Thr363.....Ple370, место действия тромбина). Мутантный плазминоген быстро растворял *in vitro* сгусток, образова-

нный под действием тромбина. Это подтверждало достаточность концентраций тромбина, обеспечивающих протекание процессов коагуляции, для активации мутантного плазминогена и индукции фибринолиза. Учитывая длительное пребывание плазминогена в кровотоке, его мутантная форма может оказаться эффективным средством профилактики и устранения тромбозов [27], поскольку аминокислотная последовательность мутантного производного подразумевает его активацию только по очагам образования тромбина, т.е. практически по месту развития новых сосудистых поражений.

### ХИМЕРНЫЕ ФОРМЫ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

Методами генной инженерии оказалось возможным получать химерные формы АП, в состав которых входят домены молекул разных белков [1, 2, 5, 8, 10]. Основной принцип конструирования таких производных заключался в соединении каталитической части АП, обеспечивающей образование плазмينا, с распознающими биологический субстрат или специфические компоненты зоны тромбоза фрагментами молекул других белков, способствующими связыванию и накоплению такого агента в очаге сосудистого поражения. По составу структурных фрагментов эти химерные формы можно условно разделить на четыре типа (табл. 1).

Отметим появившиеся сообщения о получении химерных производных первого типа (табл. 1), состоящих из Fab-фрагментов моноклональных антител против фибрина и проурокиназы низкой молекулярной массы [28]. Особенностью этого гибридного белка ( $M \sim 91$  кДа) являлось отсутствие в урокиназной части дипептида Phe157-Lys158. Благодаря такой делеции (PRII вместо PRFKII) урокиназный АП не превращался под действием плазмينا в двухцепочечную форму, а активировался тромбином по связи R-I вместо инактивирующего разрыва связи R-F. Получение такой активируемой тромбином урокиназной части делало химерную форму АП специфичной к свежим, но не старым тромбам, что, впрочем, показано пока лишь *in vitro* [28]. Преимущества такого подхода сходны с достоинствами уже упоминавшегося выше приема по получению активируемого тромбином плазминогена [27]. На модели тромбоза у обезьян химерный белок, состоящий из моноклональных антител против фибрина и проурокиназы низкой молекулярной массы [29], вызывал более эффективный тромболитис по сравнению с действием ТАП и проурокиназы.

Данные о производных второго типа (табл. 1) приведены в указанных обзорах и литературе к ним. Новых публикаций о таких производных обнаружить не удалось.

**Таблица 1.** Структурный состав химерных форм активаторов плазминогена\*

Тип производных	Распознающая часть (специфическое связывание с биологическим субстратом)	Каталитическая часть (активация плазминогена для тромболиза)	Литература
1	МА против фибрина (или их фрагменты)	КЧ урокиназного АП	[1, 2, 5, 8–12, 28, 29]
2	МА против фибрина (или их фрагменты)	КЧ ТАП	[5, 8, 9, 11]
3	Домены ТАП, обеспечивающие связывание с фибрином	Урокиназный АП или его КЧ	[2, 8, 10, 30]
4	Белки или их фрагменты, связывающиеся селективно с компонентами зоны сосудистого поражения (Р-селектин, аннексин V, гирудин)	Урокиназный (или тканевой) АП или его КЧ	[31–33]

\* Сокращения: МА – моноклональные антитела, КЧ – каталитическая часть, остальные сокращения даны в тексте.

Среди производных третьего типа (табл. 1) отметим химеру, состоящую из кринглов 1 и 2 (включая аминокислотные остатки 1–3 и 87–274) от ТАП и каталитической части УК (аминокислотные остатки 144–411) [30]. По клиническим показаниям она оказалась пригодной для эффективного болюсного внутривенного введения невысокой дозы (10–20 мг) пациентам, страдающим сердечно-сосудистыми поражениями.

Весьма заметными в последние пять лет стали сообщения о химерных производных АП четвертого типа (табл. 1). Их особенность оказалось использование в качестве распознающей части других белков (или их фрагментов), отличных от АП, и антител против компонентов очага сосудистого поражения. Так, в одной из химер в качестве распознающей части использовали Р-селектин [31]. Этот поверхностно экспрессируемый эндотелием и тромбоцитами белок обеспечивает адгезию названных клеток к нейтрофилам и моноцитам, ускоряя превращения тромботического каскада. Полученная химера Р-селектина с мутантной формой ТАП, обладающей сниженным ингибированием ИАП-1, по данным изучения *in vitro* и *in vivo* показала себя перспективным средством для терапии острого ишемического синдрома [31]. В роли агента, нацеливающего АП на тромб, использовали аннексин V, который обладает способностью прочно связываться ( $K_d \sim 7$  нМ) с молекулами фосфатидилсерина на мембранах активированных тромбоцитов [32]. Помимо последнего химера содержала каталитическую часть проурокиназы. По фибринолитическим свойствам *in vitro* эта химера не уступала урокиназе [32].

Для комбинирования антитромбиновой и фибринолитической активности была получена химера, содержащая фрагмент 53–65 гирудина и связанную с ним через 14-членную вставку каталитическую часть проурокиназы (фрагмент 47–411) [33]. Благодаря такому сочетанию компонентов производное отличала повышенная фибриноспецифичность, сниженный фибринолиз, антитромбиновая активность. Эти свойства подтверждали целесообразность дальнейшего исследования агента *in vivo* [33].

Бифункциональные антитела, представляющие собой ковалентно связанные друг с другом молекулы разных антител против АП (или их фрагментов), с одной стороны, и против компонентов зоны тромбоза, с другой стороны, условно можно отнести к накапливающим формам АП. Это связано с тем, что возможно введение таких антител в кровоток одновременно с АП (тотчас же после их предварительного смешения в одном объеме перед введением). Последовательное введение сначала бифункциональных антител, а затем АП, не слишком облегчает процедуру лечения. Однако обоснованную предпочтительность пути введения (из упомянутых выше) определяют эксперименты, которые пока лишь начаты [8, 9, 11].

Появление все большего числа химерных форм АП закономерно ставит вопрос о реальности их клинического применения. Анализ имеющегося материала показывает, что терапевтическое использование химерных активаторов определяется, в первую очередь, преодолением выявленных биохимическими изучениями ограничений. Они заключаются в следующем. (i) Само конструирование химер из фрагментов других белков приводит к игнорированию роли целостности родительской молекулы, присущей исходным формам АП [10], или, наоборот, к новым видам внутримолекулярных взаимодействий [34]. Это может сказаться на эффективности тромболиза и особую важность приобретает иммунологическая оценка свойств химер как новых белковых форм. (ii) Поскольку эффективность каталитического действия урокиназы выше, чем ТАП [10], и урокиназный активатор играет главенствующую роль в ранозаживлении сосудистого поражения [35], в составе химер целесообразнее использовать только каталитическую часть урокиназного активатора. (iii) Распространение новых химер в качестве лечебных средств возможно при условии наличия продуктивных способов их получения и невысокой стоимости препаратов. Значимость экономического фактора обусловлена, в частности, тем фактом, что меньшая стоимость ангиопластики (в сравнении с терапевтическим тромболизом) обещает ее преимущественное распространение

[36]. Этот факт может существенно изменить характер клинического интереса к рассматриваемой проблеме. В нынешней ситуации поиск высокопродуктивных способов получения химерных белков [11, 32] и усилия по снижению стоимости таких препаратов [6, 10] сопряжены со значительными трудностями.

### ХИМИЧЕСКИ КОНЪЮГИРОВАННЫЕ ФОРМЫ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

Получение новых АП химическим конъюгированием известных АП с другими биологически активными веществами (с сопутствующим лечебным действием) имеет более длительную историю, чем технология рекомбинантных ДНК [9–11, 37]. Публикации такого рода продолжают регулярно появляться. Сообщалось о получении конъюгатов В-цепи урокиназы с аннексином V [38], стрептокиназы с гирудином [39].

Уместно напомнить, что стрептокиназа является белком ( $M \sim 45$  кДа), состоящим из 414 или 415 а.о. и секретируемым штаммом гемолитических стрептококков [4, 6, 8, 10]. Она может образовывать активаторный (стехиометрический) комплекс с молекулами плазминогена (или плазмина), который катализирует превращение других молекул плазминогена в плазмин. Благодаря этому свойству стрептокиназа применяется в медицине как действенное средство тромболитической терапии. Полагают, что одноцепочечная молекула стрептокиназы, не имеющая дисульфидных связей, состоит из трех доменов [40]. Начиная с *N*-конца ее полипептидной цепи, их обозначают как  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -домены. Считают, что в комплексе с плазмином аминоконцевой  $\alpha$ -домен стрептокиназы повышает субстратное распознавание плазминогена активаторным комплексом. *C*-Концевой  $\gamma$ -домен стрептокиназы является существенным для контактной активации плазминогена в активаторном комплексе, формируя его каталитический аппарат в результате конформационных изменений. Взаимодействие  $\beta$ -домена стрептокиназы с плазмином относительно невелико [40]. В настоящее время стрептокиназа – наиболее дешевый и доступный АП, используемый для исследовательских и медицинских целей. На основе стрептокиназы были получены новые формы АП [10, 39].

В табл. 2 сопоставлены свойства упомянутых выше конъюгатов, полученных методами химического [38, 39] или биологического синтеза [32, 33]. Выход продукта должен быть достаточным для его испытания *in vivo*, поскольку именно тромболитическая эффективность определяет перспективы изучения таких средств. Химическое конъюгирование по выходу продукта [38] для производного урокиназного активатора с аннексином V оказалось предпочтительнее биологического [32]. Имеются и обратные примеры, когда биологический синтез более продуктивен, чем химический [9, 11].

В настоящее время поиск новых форм АП ведется по всем направлениям [7–12]. В качестве распознающей составляющей оказалось возможным использовать модифицированный тромбин (с блокированной каталитической активностью, но сохраненной способностью связываться с тромбомодулином и фибриногеном) [41]. Его конъюгирование с урокиназой оказалось эффективным: такой конъюгат вызывал достоверный тромболитический эффект у собак с артериальным тромбозом при инфузионном введении в дозах, при которых нативная урокиназа не проявляла активности [42]. Отметим, что направленным мутагенезом также пытаются получать мутантные формы тромбина, лишённые коагуляционной активности и сохраняющие антикоагулянтную (активация протеина С) с увеличенным временем нахождения в кровотоке [43]. Полагают, что такие производные могут оказаться полезными для разработки новых видов антитромботических средств. Конъюгирование мутантной формы проурокиназы (с заменой Ser9 на Cys) с человеческим сывороточным альбумином проводили посредством их ковалентного связывания с помощью *N*-сукцинимидного эфира пиридилдитиопропионовой кислоты через аминокгруппы альбумина и сульфгидрильную группу цистеинового остатка [Cys9]проурокиназы [44]. Полученный конъюгат обнаружил пролонгированное пребывание в кровотоке приматов в сравнении с показателями для нативной и [Cys9]проурокиназы. Названные производные [38, 39, 44] предполагается исследовать в биомедицинских экспериментах.

Представленные данные свидетельствуют о разнообразии путей создания новых АП. Появление сведений об их производных четвертого поколения, полученных комбинацией приемов биологического и химического синтеза [44, 45], а также о тромболитических смесях (именуемых в медицине композициями или составами) [46], относимых к пятому поколению АП [10], лишь подтверждает этот вывод. Вероятно, достижение достоверной высокой терапевтической эффективности вместе с удешевлением стоимости препаратов будут определять направления решающих исследований в разработке АП третьего и других, более высоких поколений.

### НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ИЗУЧЕНИЯ АКТИВАТОРОВ ПЛАЗМИНОГЕНА

В настоящее время проведены или ведутся клинические испытания четырех препаратов активаторов плазминогена третьего поколения: ретеплазы, Е6010, исследуемого в Японии, а также ТНК-ТРА и ланотеплазы (как была названа форма п-РА) [47]. Клинические испытания двух последних форм станут известны в 1999–2000 годах и их введение в терапию позволит надеяться на достижение заметных успехов клинического тромболитического. С другой стороны, огромные силы

**Таблица 2.** Свойства биологически и химически полученных форм активаторов плазминогена

Биологический синтез	Химический синтез
Химера проурокиназа–аннексин V [32]	Конъюгат В-цепь урокиназы–аннексин V [38]
1. Значения $K_m$ и $V_m$ активации плазминогена близки к таковым для урокиназы 2. <i>In vitro</i> оба компонента химеры сохраняют полностью активность родительских молекул 3. Низкий выход растворимого белка	1. По величине активаторной активности сходен с урокиназой 2. Мембранное связывание такое же, как у аннексина V, по фибринолитической активности близок к урокиназе 3. Выход продукта достаточен для проведения изучения <i>in vivo</i> 4. На модели легочной эмболии у крыс обнаружено в 3–4 раза более эффективное действие, чем для урокиназы 5. Время нахождения в кровотоке крыс одинаково с показателями урокиназы или ее В-цепи
Химера проурокиназа–гирудин [33]	Конъюгат стрептокиназа–гирудин [39]
1. Фибринолитическая активность такая же, как и у проурокиназы 2. Полное ингибирование тромбина требует в 30 раз больших концентраций химеры, чем гирудина 3. Фибринолиз в 3–4 раза слабее, чем для проурокиназы в плазме 4. Плазмин превращает проурокиназу в химере в урокиназу с увеличением фибринолитической активности 5. Обработанная плазмином химера лизирует сгусток в плазме так же, как проурокиназа, но с большим снижением уровня фибриногена	1. Активация плазминогена в 7.9 раза слабее, чем под действием стрептокиназы 2. Ингибирование тромбина конъюгатом в 1.2 раза ниже, чем гирудином, при их концентрациях больше 3.13 нМ 3. Связывание с тромбин–сефарозой в 17 раз больше, чем для стрептокиназы 4. Одинаковое ингибирование тромбина без и в присутствии плазминогена 5. Активация плазминогена в присутствии тромбина в 3–4 раза выше, чем в его отсутствие

и средства, задействованные в указанных исследованиях, снижают заинтересованность в тестировании других АП третьего поколения.

Клиническая эффективность полученных до настоящего времени новых АП при более высокой цене оказалась не существенно выше эффективности уже известных препаратов. Такое положение дел позволяет заявить, что до сих пор “идеальный” тромболитический агент еще не найден [47]. Сравнительные клинические испытания проурокиназы (коммерческое название препарата саруплаза) и стрептокиназы (для терапии острого инфаркта миокарда) продемонстрировали, что проурокиназа по показателю смертности в течение 30 сут от начала лечения, по крайней мере, эквивалентна стрептокиназе [48]. Ранее, по начальным показателям терапии (в интервале 45 мин–40 ч) отмечалось, что проурокиназа по эффективности и безопасности действия при остром инфаркте миокарда сходна с ТАП (коммерческий препарат альтеплаза) [49]. Достоверное получение лишь таких “скромных” заключений при огромном расходе средств и сил (обследование десятков тысяч пациентов) замедляет дальнейшую разработку новых тромболитических препаратов [48]. И хотя полагают, что акцент в таких разработках АП может быть смещен в сторону оптимизации лечения (варьирование доз препаратов, схем и способов их введения и т.п.) [47, 50], использования агентов дополнительной (смежной) терапии [51], приме-

нения ангиопластики [52], насущным становится преодоление намечающегося застоя в ходе поиска новых тромболитиков [48].

Один из путей преодоления встающих в этой области проблем – комбинированная тромболитическая терапия [53]. Комбинированное (сочетанное) введение разных АП использовалось и ранее, однако нами впервые было показано, что совместное применение АП с комплементарным механизмом действия и фармакокинетически различимым профилем достоверно способствует достижению эффективного тромболитического действия *in vivo* [54]. В качестве таких агентов мы применили ТАП как триггер (инициатор процесса) тромболитического действия и ковалентный конъюгат урокиназы–фибриноген – как средство поддерживающего тромболитического действия, которым он обладает благодаря пролонгированному пребыванию в кровотоке [55]. Уже последовательное двойное болюсное внутривенное введение ТАП и конъюгата урокиназы–фибриноген обеспечивает на модели венозного тромбоза у собак быстрый и значимый тромболитический эффект при умеренном истощении содержания гемостатических белков крови [56]. На основании полученных результатов [54–56] представляется целесообразным изучить тромболитическое действие смеси/композиции этих АП после ее внутривенного введения единственной инъекцией [53]. Названная композиция состоит из невысоких доз указанных компонентов, в 4–20 раз

меньших, чем используемые для монотерапии [57]. Такое уменьшение доз может существенно снизить стоимость лечения, превращая его в широко доступную инъекционную форму скорой тромболитической помощи на догоспитальном этапе терапии.

Универсальность предложенного подхода делает актуальным исследование комбинированной активации плазминогена и тромболитической композициями на основе инициатора процесса тромболитической и полученных ранее АП третьего поколения. Последние должны обладать, в первую очередь, комплементарным триггеру механизмом действия, пролонгированным пребыванием в кровотоке и не вызывать существенного системного фибринолиза (т.е. иметь тромбоспецифичность выше, чем у нативной урокиназы). Составление таких тромболитических композиций, исследование их свойств и испытание действия *in vivo* формирует новое направление изучения активаторов плазминогена третьего поколения [53, 54]. Его развитие может скоро дать медицинской практике высокоэффективное и качественно новое средство лечения тромбоэмболической болезни в XXI веке [57, 58].

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен академику Е.И. Чазову и чл.-корр. РАН В.Н. Смирнову за интерес и поддержку этой работы. Искренне признателен за помощь в приготовлении материала сотруднику Кардиоцентра Е.Г. Тищенко.

Данная работа частично финансировалась из средств Государственной научно-технической программы "Новейшие методы биоинженерии", направления "Инженерная энзимология" и "Биокаталитические технологии", а также Министерством здравоохранения и медицинской промышленности Российской Федерации.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Becker R.C. // *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1993. V. 7. P. 825–828.
2. Verstraete M., Lijnen H.R. // *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1994. V. 8. P. 801–812.
3. Smalling R.W. // *Am. J. Cardiol.* 1996. V. 78. Suppl. 12A. P. 2–7.
4. Marder V.J., Sherry S. // *New Engl. J. Med.* 1988. V. 318. P. 1512–1520; V. 318. P. 1585–1595.
5. Haber E., Quertermous T., Matsueda G.R., Runge M.S. // *Science.* 1989. V. 243. P. 51–56.
6. Anderson H.V., Willerson J.T. // *New Engl. J. Med.* 1993. V. 329. P. 703–709.
7. Collen D. // *Circulation.* 1996. V. 93. P. 857–865.
8. Максименко А.В. // *Хим.-фарм. журн.* 1994. Т. 28. С. 4–11.
9. Dewerchin M., Collen D. // *Bioconjugate Chem.* 1991. V. 2. P. 293–300.
10. Максименко А.В. // *Молекулярн. биология.* 1995. Т. 29. С. 38–60.
11. Hayzer D.J., Lubin I.M., Runge M.S. // *Bioconjugate Chem.* 1991. V. 2. P. 301–308.
12. Maksimenko A.V. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996. V. 799. P. 139–145.
13. Short R. // *Br. J. Cardiol.* 1996. V. 3. P. 89–93.
14. Saito M., Suzuki S., Yui Y., Kawai C. // *Jpn. Circ. J.* 1995. V. 59. P. 556–564.
15. Suzuki S., Saito M., Suzuki N., Kato H., Nagaoko N., Yoshitake S., Yui Y., Kawai C. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993. V. 22. P. 834–840.
16. Kawai C., Hosoda S., Nobuyoshi M., Suzuki S., Sato H., Takatsu F., Motomiya T., Kanmatsuse K., Kodama K., Yabe Y., Minamino T., Kimata S.-I., Nakashima M. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997. V. 29. P. 1447–1453.
17. Keyt B.A., Paoni N.F., Refino C.J., Berlean L., Nguyen H., Chow A., Lai J., Pena L., Pater C., Ogez J., Etcheverry T., Botstein D., Bennett W.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 3670–3674.
18. Cannon C. P., McCabe C. H. G., Gibson C. M., Ghali M., Sequeira R. F., McKendall G. R., Breed J., Modi N. B., Fox N.L., Tracy R.P., Love T.W., Braunwald E. // *Circulation.* 1997. V. 95. P. 351–356.
19. Martin U., Bader R., Bohm E., Kohnert U., von Mollendorf E., Fischer S., Sponer G. // *Cardiovasc. Drug Rev.* 1993. V. 11. P. 299–311.
20. Jackson C. V., Frank J. D., Craft T.J., Sundboom J.L., Smith G.F. // *J. Pharmacol. Exptl. Ther.* 1992. V. 260. P. 64–70.
21. Martin U., Fischer S., Kohnert U., Rudolph R., Sponer G., Stern A., Strein K. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991. V. 18. P. 111–119.
22. Bode C., Smalling R.W., Berg G., Burnett C., Lorch G., Kalbfleisch J.M., Chernoff R., Christie L.G., Feldman R.L., Seals A.A., Weaver W.D. // *Circulation.* 1996. V. 94. P. 891–898.
23. Larsen G. R., Timony G. A., Horgan P. G., Barone K.M., Henson K.S., Angus L.B., Stoudemire J.B. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 8156–8161.
24. Tachias K., Madison E.L. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 18319–18322.
25. Liu J.-N., Tang W., Sun Z.-Y., Kung W., Pannell R., Sarmientos P., Gurevich V. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 14070–14076.
26. Strandberg L., Madison E.L. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 23444–23449.
27. Dawson K. M., Cook A., Devine J. M., Edwards R. M., Hunter M.G., Raper R.H., Roberts G. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 15989–15992.
28. Yang W.-P., Goldstein J., Procyk R., Matsueda G. R., Shaw S.-Y. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 2206–2312.
29. Runge M.S., Harker L.A., Bode C., Ruef J., Kelly A.B., Marzec U.M., Allen E., Caban R., Shaw S.-Y., Haber E., Hanson S.R. // *Circulation.* 1996. V. 94. P. 1412–1422.
30. Van de Werf F., Lijnen H.R., Collen D. // *Coron. Art. Dis.* 1993. V. 4. P. 929–933.
31. Fujise K., Revelle B.M., Stacy L., Madison E.L., Yeh E.T.H., Willerson J.T., Beck P.J. // *Circulation.* 1997. V. 95. P. 715–722.
32. Tait J.F., Engelhardt S., Smith C., Fujikawa K. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 21594–21599.



33. Lijnen H.R., Wnendt S., Schneider J., Janocha E., van Hoeff B., Collen D., Steffens G.J. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 234. P. 350–357.
34. Novokhatny V., Medved L., Lijnen H.R., Inghan K. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 8680–8685.
35. Carmeliet P., Moons L., Herbert J.-M., Crawley J., Lupu F., Lijnen R., Collen D. // *Circ. Res.* 1997. V. 81. P. 829–839.
36. Rentrop K.P. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1995. V. 25. Suppl. 7. P. 1S–2S.
37. Максименко А.В. // *Итоги науки и техники. Сер. биотехнология* / Ред. Торчилин В.П. М.: ВИНТИ, 1988. Т. 8. С. 50–78.
38. Tanaka K., Einaga K., Tsuchiyama H., Tait J. F., Fujikawa K. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 922–929.
39. Phaneuf M.D., Ozaki C.K., Johnstone M.T., Loza J.-P., Quist W.C., Lo Gerfo F.W. // *Thrombos. Haemostas.* 1994. V. 71. P. 481–487.
40. Wang X., Lin X., Loy J.A., Tang J., Zhang X.C. // *Science.* 1998. V. 281. P. 1662–1665.
41. Максименко А.В. // *Биохимия.* 1993. Т. 58. С. 1373–1383.
42. Maksimenko A. V., Petrov A. D., Tischenko E. G., Smirnov M.D. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995. V. 750. P. 496–501.
43. Tsiang M., Paborsky L.R., Li W.-X., Jain A.K., Mao C.T., Dunn K.E., Lee D.W., Matsumura S.Y., Matteucci M.D., Coutre S.E., Leung L.L.K., Gibbs C.S. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 16449–16457.
44. Breton J., Pezzi N., Molinari A., Bonomini L., Lansen J., Gonzalez de Buitrago G., Prieto I. // *Eur. J. Biochem.* 1995. V. 231. P. 563–569.
45. Robinson J.H., Browne M.J., Carey J.E., Chamberlain P.D., Cronk D.W., Dodd I., Entwisle C., Esmail A.F., Kalinjian S.B., Lawrence G.M., McMurdo L., Mitchell D., Smith R.A.G., Wilson S. // *Circulation.* 1992. V. 86. P. 548–552.
46. Максименко А.В. // *Хим.-фарм. журн.* 1994. Т. 28. С. 3–13.
47. White H.D., Van de Werf F.J.J. // *Circulation.* 1998. V. 97. P. 1632–1646.
48. Tebbe U., Michels R., Adgey J., Boland J., Caspi A., Charbonnier B., Windeler J., Barth H., Groves R., Hopkins G.R., Fennell W., Betriu A., Ruda M., Mlczoch J. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998. V. 31. P. 487–493.
49. Bar F.M., Meyer J., Vermeer F., Michels R., Charbonnier B., Haerten K., Spiecker M., Macaya C., Hanssen M., Heras M., Boland J., Morice M.-C., Dunn F.G., Uebis R., Hamm C., Auzenberg O., Strupp G., Withagen A.J., Klein W., Windeler J., Hopkins G., Barth H., von Fisenne M.J.M. // *Am. J. Cardiol.* 1997. V. 79. P. 727–732.
50. White H.D. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998. V. 31. P. 494–496.
51. Topol E.J. // *Circulation.* 1998. V. 97. P. 211–218.
52. Milavetz J.J., Giebel D.W., Christian T.F., Schwartz R.S., Holmes D.R., Jr., Gibbons R.J. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 1998. V. 31. P. 1246–1251.
53. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. // *Хим.-фарм. журн.* 1998. Т. 32. С. 12–16.
54. Максименко А.В. // *Биоорг. химия.* 1998. Т. 24. С. 376–380.
55. Максименко А.В., Тищенко Е.Г., Добровольский А.Б. // *Хим.-фарм. журн.* 1998. Т. 32. С. 3–7.
56. Максименко А.В., Тищенко Е.Г., Добровольский А.Б., Голубых В.Л. // *Хим.-фарм. журн.* 1998. Т. 32. С. 8–11.
57. Maksimenko A.V., Tischenko E.G., Dobrovolsky A.B., Golubykh V.L. // *Fibrinolysis & Proteolysis.* 1998. V. 12. P. 45–52.
58. Maksimenko A.V. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998. V. 864. P. 96–105.

## Third-Generation Plasminogen Activators: A New Direction in Research

A. V. Maksimenko<sup>#</sup>

*Institute of Experimental Cardiology, Russian Cardiological Research and Production Complex, Ministry of Health and Medicinal Industry of the Russian Federation, Tret'ya Cherepkovskaya ul. 15A, Moscow, 121552 Russia*

Recent information on the development of new plasminogen activators (PA) is reviewed. The results of studies of PA mutant derivatives synthesized by recombinant DNA techniques are discussed. Data on chimeric (hybrid) forms of PAs and their chemically synthesized conjugates are presented. The trends in the search for PAs are analyzed. A new direction in the study of third-generation PAs for combined plasminogen activation and in the further development of the methods of thrombolytic therapy is outlined.

*Key words: plasminogen activators, recombinant forms, chemical conjugates; fibrinolytic activity; thrombolysis, prolongation of action*

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 415-2962; e-mail: cclibr@transts.ru.