



КОНЬЮГАТЫ СРЕПТОКИНАЗА-ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ С ПОВЫШЕННОЙ СТАБИЛЬНОСТЬЮ И СНИЖЕННЫМИ ПОБОЧНЫМИ ЭФФЕКТАМИ

© 2014 г. Р. Б. Айсина*, #, Л. И. Мухаметова*, Д. В. Тюпа*, К. Б. Гершкович**,
Д. А. Гулин**, С. Д. Варфоломеев*

*ГУНУ Химический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119992, Москва, Ленинские горы

**ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

Поступила в редакцию 03.10.2013 г. Принята к печати 14.04.2014 г.

Ковалентные конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 с различными степенями модификации аминокислотных групп белка получены вариацией времени инкубации стрептокиназы (СК) с активированным полиэтиленгликолем (M 2 и 5 кДа, ПЭГ2 и ПЭГ5); изучены их свойства в сравнении со свойствами свободной СК *in vitro*. Показано, что максимально стабильные в плазме и сохраняющие 80% исходной фибринолитической активности конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 образуются при степенях модификации аминокислотных групп белка 54 и 52% соответственно. При взаимодействии данных конъюгатов с плазминогеном в эквимольных концентрациях образуются активаторные комплексы плазмина (Пл) Пл-СК-ПЭГ2 и Пл-СК-ПЭГ5, максимальная амидазная активность которых равна активности комплекса Пл с нативной СК. Найдено, что каталитическая эффективность активации плазминогена ($k_{\text{Пл}}/K_{\text{Пл}}$) комплексом Пл-СК-ПЭГ2 немного выше ($2.84 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$), а комплексом Пл-СК-ПЭГ5 ниже ($1.17 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$), чем немодифицированным комплексом Пл-СК ($2.1 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$). Исследование кинетики лизиса сгустков из плазмы крови человека и истощение уровней плазминогена и фибриногена в плазме под действием равных доз свободной СК и указанных конъюгированных образцов СК показало, что конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 обладают высокой тромболитической активностью (89 и 72% от активности свободной СК соответственно) и вызывают в 3.5–4 раза меньшие побочные эффекты, чем свободная СК. Полученные нами конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 с повышенной стабильностью в плазме и низким уровнем побочных эффектов могут быть использованы в терапии тромботических заболеваний.

Ключевые слова: стрептокиназа, плазминоген, конъюгаты с полиэтиленгликолем, активность, стабильность, полиэтиленгликоль, фибриноген.

DOI: 10.7868/S0132342314050029

ВВЕДЕНИЕ

Особое место среди белковых лекарственных препаратов, вводимых в кровоток, занимают активаторы плазминогена (АП), которые используются в терапии тромбоэмболических заболеваний. АП различаются по механизму действия, каталитической эффективности и фибринспецифичности действия (т.е. способности активировать плазминоген непосредственно на фибриновом сгустке), но все они быстро выводятся из кровотока ($\tau_{1/2} =$

$= 3\text{--}18$ мин) [1]. Поэтому в терапии тромбозов используют высокие дозы АП, которые вводят длительной инфузией, а это вызывает превращение не только фибринсвязанного, но и циркулирующего плазминогена (Пг) в активную фибринолитическую форму – плазмин (КФ 3.4.21.7) [1–3]. Плазмин, связанный с фибрином, растворяет его, а плазмин, образовавшийся из свободного плазминогена, разрушает фибриноген, факторы V, VII и протромбин в плазме, что вызывает серьезный дефект коагуляции, являющийся причиной геморрагических осложнений [1]. Единого решения для устранения недостатков всех АП нет. С целью снижения побочных воздействий на важные белки плазмы и повышения длительности циркуляции в кровотоке АП включают в микро/наноча-

Сокращения: pNA – п-нитроанилид; TNBS – тринитробензолсульфокислота; АП – активаторы плазминогена; Пг – плазминоген; Пл – плазмин; ПЭГ – полиэтиленгликоль; СК – стрептокиназа; СК-ПЭГ – ковалентный конъюгат стрептокиназа-полиэтиленгликоль, Фг – фибриноген.

Автор для связи (факс: (495) 939-54-17; эл. почта: aйсина2004@mail.ru).

стицы, липосомы и гидрогели, проводят мутацию и химическую модификации их молекул.

В последнее время заметно вырос интерес ученых к стрептокиназе (СК) – бактериальному активатору пламиногена. Ее преимуществами по сравнению с другими АП, являются высокая каталитическая эффективность ($k_{\text{Пг}}/K_{\text{Пг}}$) в реакции активации пламиногена, низкая стоимость и широкий клинический опыт применения. К недостаткам СК относятся ее нестабильность, иммуногенность и быстрое выведение из кровотока. СК – одноцепочечный белок (47 кДа), не обладающий собственной ферментативной активностью. СК – не прямой активатор пламиногена, она образует эквимоллярный комплекс с пламиногеном (Пг-СК) [4, 5], который быстро ($k_1 = 0.24 \text{ мин}^{-1}$) превращается в комплекс плазмин-стрептокиназа (Пл-СК) [6]. Комплексы Пг-СК и Пл-СК активируют избыток пламиногена, однако комплекс Пл-СК не стабилен и теряет активаторную активность из-за деградации его СК-части [7, 8].

С целью улучшения свойств СК предпринимались попытки ее модификации различными способами. Получены обратимо ацилированные по активному центру производные комплекса Пг-СК пролонгированного действия [9, 10]. Получены рекомбинантные варианты СК с повышенной сопротивляемостью к деградации плазином [11, 12]. Разработан конъюгат СК с декстраном ($M 35\text{--}50 \text{ кДа}$), сохранивший лишь 50% исходной активности, но циркулирующий в кровотоке до 3 дней [13, 14]. Недостатками СК, включенной в липосомы, являлись нестабильность липосом, низкая эффективность включения и большая потеря активности агента [15, 16]. Предложена СК, микрокапсулированная в оболочку из полиэтиленгликоля (ПЭГ), защищающую агент от контакта с белками крови до его высвобождения (от 30 до 90 мин) [17, 18].

Ковалентное присоединение ПЭГ (или ПЭГилирование) все чаще используется при создании белковых медицинских препаратов для повышения времени их циркуляции в крови, сохранения биоактивности и снижения антигенности белков [19, 20]. ПЭГилированию СК посвящено небольшое число работ. Коиде с соавторами получили конъюгат СК с ПЭГ ($M 5 \text{ кДа}$) с потерей 67% активности агента [21]. Эти конъюгаты не реагировали с антистрептокиназной сывороткой. Позднее с использованием нового метода активации ПЭГ получены конъюгаты СК с ПЭГ ($M 2, 4 \text{ и } 5 \text{ кДа}$) с минимальной потерей ее активности [22, 23].

Описанные конъюгаты СК-ПЭГ имели очень низкую реактивность к стрептокиназным антителам и значительно медленнее выводились из кровотока, чем свободная СК. Однако каталитическая эффективность активации пламиногена конъюгатами СК-ПЭГ была в 4–10 раз ниже, чем

свободной СК [22]. Это может быть связано с высокой степенью ПЭГ-модификации молекулы СК, использованием ПЭГ со свободными концевыми ОН-группами, а также со стерическими затруднениями, создаваемыми ПЭГ различной молекулярной массы. Конъюгация СК с биосовместимым и не токсичным ПЭГ весьма перспективна для снижения побочных эффектов применения свободной СК и повышения ее стабильности в кровотоке при терапии. Однако исследований по ПЭГ-модификации СК крайне мало, и только одно из них посвящено изучению кинетических свойств СК-ПЭГ-конъюгатов [21].

Для ПЭГилирования СК мы использовали монометокси-ПЭГ молекулярной массы 2 и 5 кДа (ПЭГ2 и ПЭГ5). С целью оптимизации метода получения ковалентных СК-ПЭГ-конъюгатов исследовано влияние степени ПЭГилирования молекулы СК на стабильность в плазме, тромболитические и побочные эффекты полученных конъюгатов *in vitro*, а также на кинетику образования активаторных комплексов Пл-СК-ПЭГ и кинетические параметры активации пламиногена этими комплексами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Стрептокиназа является наиболее доступным, эффективным и хорошо изученным в клинической практике тромболитическим агентом, но ее введение в терапевтических дозах сопровождается истощением уровней фибриногена и пламиногена в плазме крови, а также образованием антител к ней. Кроме того, СК теряет тромболитическую активность в плазме, содержащей высокие концентрации пламиногена, из-за ее протеолитической деградации в составе образующегося комплекса Пл-СК. Литературные данные указывают на то, что из современных методов модификации белков наиболее подходящими для стабилизации СК к протеолитической деградации являются те, в которых полимер, или носитель, ковалентно связывается с остатками аргинина или лизина молекулы СК. Так происходит потому, что пептидные связи, образованные COOH -группами именно этих аминокислот, расщепляются плазином и другими протеазами, а появление высокомолекулярного заместителя по боковой цепи создает стерические затруднения для протеолиза. ПЭГилирование является одним из перспективных методов для улучшения фармакокинетических и терапевтических свойств СК, так как активированный ПЭГ связывается с ϵ -аминогруппами остатков лизина в молекуле СК.

ПЭГ – один из хорошо изученных полимеров для модификации белков – одобрен FDA (Food and Drug Administration, USA) для использования в качестве носителя, или основы, в косметике и

фармацевтике, включая инъекционные, пероральные, ректальные или назальные формы [24]. ПЭГ не иммуногенен, мало токсичен и выводится из организма через почки (для ПЭГ < 30 кДа) в интактном виде [25].

При модификации СК был использован ПЭГ с молекулярными массами 2 и 5 кДа (ПЭГ2 и ПЭГ5), в которых один конец защищен метоксигруппой для исключения возможности связывания двух молекул СК с молекулой ПЭГ. При оп-

тимизации метода ПЭГилирования СК особое внимание уделено максимальному сохранению активаторной и тромболитической активности агента.

Получение конъюгатов СК с ПЭГ. Активацию монометокси-ПЭГ 1,1'-карбонилдиимидазолом проводили по методике, описанной в работе [26]. К раствору СК, предварительно очищенной на колонке с плазминоген-сефарозой 4В, добавляли раствор активированного ПЭГ (схема).

1. Активация монометокси-ПЭГ 1,1'-карбонилдиимидазолом:

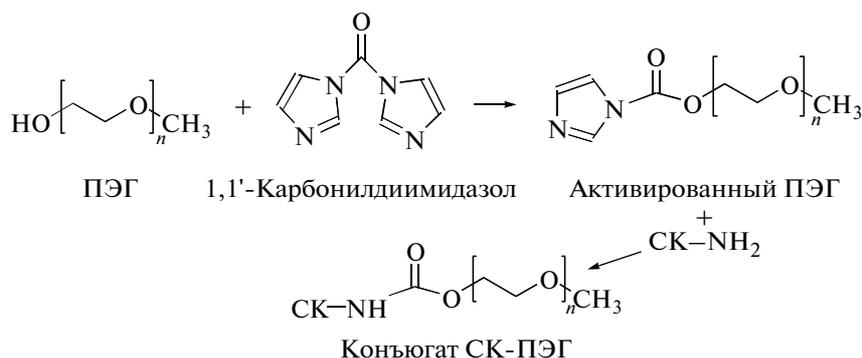


Схема. Схема получения конъюгатов СК-ПЭГ.

В ходе реакции модификации для оценки активности ПЭГилированной СК измеряли остаточную фибринолитическую активность разбавленных проб СК по методу Кристенсена, как описано в работе [27]. Как видно из рис. 1, активность СК падает с увеличением времени ее инкубации с ПЭГ. Для максимального сохранения ак-

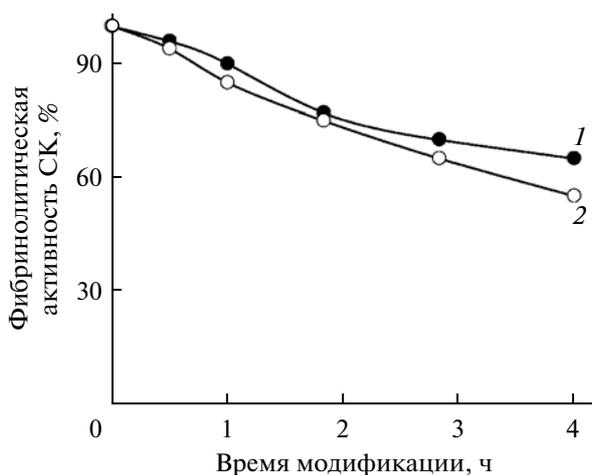


Рис. 1. Изменение фибринолитической активности СК (500 МЕ/мл) в ходе ее модификации активированным ПЭГ: (1) – ПЭГ2 и (2) – ПЭГ5, $p < 0.05$.

тивности СК реакцию модификации активированными ПЭГ проводили не более 2 ч. Конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 с различной степенью замещения аминогрупп СК, полученные через 0.5, 1 или 2 ч, отделяли от не связавшихся ПЭГ и СК на колонке с сефадексом G-25 и лиофильно высушивали. В очищенных конъюгатах СК-ПЭГ степень модификации ε-аминогрупп остатков лизина в белке оценивали титрованием тринитробензолсульфокислотой (TNBS) (табл. 1). Контроль фибринолитической активности очищенных конъюгатов показал сохранение 80% исходной активности СК даже в конъюгатах СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5, полученных через 2 ч реакции.

Стабильность в плазме конъюгатов СК-ПЭГ. Было проведено сравнение стабильности в плазме крови человека равных концентраций стрептокиназы (200 МЕ/мл) в свободной форме и в составе конъюгатов СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 с разной степенью модификации аминогрупп белка (табл. 1). СК в составе конъюгатов СК-ПЭГ теряла фибринолитическую активность в плазме медленнее, чем свободная СК. Повышенную стабильность конъюгатов СК-ПЭГ можно объяснить тем, что молекулы ПЭГ, связанные ε-аминогруппами лизиновых остатков в молекуле СК, создают стерические затруднения для протеолитической деградации пептидных связей, образованных этой аминокислотой. Найдено, что конъюгаты

СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5, сохраняющие в плазме 80% исходной активности СК, образуются уже через 2 ч реакции при степени модификации аминокрупп белка 54 и 52% соответственно. Контрольные эксперименты показали, что при увеличении времени реакции до 3 и 4 ч стабильность конъюгатов не увеличивается, а их активность снижается.

Кинетика образования активаторного комплекса Пл-СК-ПЭГ. Наиболее важным свойством СК является ее способность образовывать активаторный комплекс Пл-СК при взаимодействии с плазминогеном в эквимольной концентрации. При этом сначала образуется прочный комплекс Пг-СК ($K_D = 5 \times 10^{-11}$ М), в котором молекула плазминогена под действием СК очень быстро претерпевает конформационные изменения ($k = 9-23$ мс^{-1}) с формированием активного центра в Пг-части комплекса без протеолитического расщепления молекулы плазминогена. Затем происходит расщепление активационной пептидной связи Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ в молекуле плазминогена и комплекс Пг-СК превращается в Пл-СК [6]. При смешении Пг и СК при 37°C комплекс Пг-СК быстро превращается в Пл-СК. На рис. 2 представлена кинетика образования активаторного комплекса при взаимодействии эквимольных концентраций плазминогена и свободной СК или ПЭГилированных образцов СК (т.е. конъюгатов СК-ПЭГ2 (а) и СК-ПЭГ5 (б)) с разными степенями модификации аминокрупп белка. Найдено, что увеличение времени конъюгации СК с ПЭГ2 и ПЭГ5 приводит к некоторому снижению начальной скорости образования комплексов Пл-СК-ПЭГ2 и Пл-СК-ПЭГ5, но не влияет на их максимальную амидазную активность, которая равна активности немодифицированного комплекса Пл-СК. При этом с увеличением степени ПЭГилирования СК снижение начальной скорости образования комплекса Пл-СК-ПЭГ2 было существенно меньше, чем комплекса Пл-СК-ПЭГ5. Последнее, вероятно, связано с тем, что меньшие по массе молекулы ПЭГ2 создают меньшие стерические затруднения для взаимодействия между молекулами плазминогена и стрептокиназы, чем более крупные молекулы ПЭГ5.

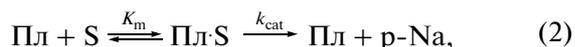
Кинетические параметры активации плазминогена комплексами Пл-СК и Пл-СК-ПЭГ. Для оценки влияния конъюгации СК с ПЭГ на активацию плазминогена были определены кинетические параметры активации нативной Glu-формы плазминогена каталитическими концентрациями (см. эксперим. часть) не модифицированного и ПЭГилированных комплексов Пл-СК. В этих экспериментах использовали комплексы Пл-СК-ПЭГ2 и Пл-СК-ПЭГ5, в которых степень ПЭГилирования СК составляет 52–54% и 49–52% соответственно. Кинетику активации плазминогена изучали с помо-

Таблица 1. Влияние степени модификации аминокрупп СК на стабильность ($\tau_{1/2}$) конъюгатов СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 (200 МЕ/мл) в плазме крови человека *in vitro* (37°C)*

Время модификации, ч	СК-ПЭГ2		СК-ПЭГ5	
	степень модификации, %	$\tau_{1/2}$, мин	степень модификации, %	$\tau_{1/2}$, мин
0.5	39	27	38	32
1	52	32	49	40
2	54	45	52	52

* Стабильность – сохранение активности СК, независимо от ее формы: свободной или ПЭГилированной. $\tau_{1/2}$ – время падения фибринолитической активности свободной СК (22 мин, в условиях эксперимента) и конъюгатов СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 на 50%, $p < 0.05$.

щью сопряженного метода, который основан на протекании в одном растворе двух реакций: активации плазминогена (Пг) активаторным комплексом (Пл-СК) и гидролиза хромогенного пептидного субстрата АФК-рНА (S) образующимся плазмином (Пл):



где $k_{\text{Пг}}$ и $K_{\text{Пг}}$ – кинетические параметры активации плазминогена активаторным комплексом Пл-СК, k_{cat} и K_m – кинетические параметры гидролиза пептидного субстрата плазмином.

За кинетикой активации плазминогена следили по скорости образования *n*-нитроанилина (рНА). Для сопряженной системы реакций (1)–(2) выполнялись следующие условия: $[\text{S}] \gg K_m$, $[\text{Пг}] \gg [\text{Пл-СК}] = \text{const}$ и переменная $[\text{Пл}]$ [28]. Кинетические параметры активации плазминогена под действием не модифицированного и ПЭГилированных комплексов Пл-СК определяли согласно уравнениям, приведенным в работах [29, 30] для определения констант активации плазминогена другими его активаторами. В нашей работе по определению кинетических параметров активации плазминогена (табл. 2) отмечено небольшое снижение $K_{\text{Пг}}$ и увеличение $k_{\text{Пг}}$ активации плазминогена комплексами Пл-СК-ПЭГ2, в результате чего каталитическая эффективность активации ($k_{\text{Пг}}/K_{\text{Пг}}$) ПЭГ2-модифицированных комплексов немного выше, чем комплекса Пл-СК.

В случае активации плазминогена комплексами Пл-СК-ПЭГ5 наблюдалась обратная картина: при увеличении $K_{\text{Пг}}$ и уменьшении $k_{\text{Пг}}$ получали более низкую их каталитическую эффективность ($k_{\text{Пг}}/K_{\text{Пг}}$) в реакции активации плазминогена по сравнению с немодифицированным комплексом

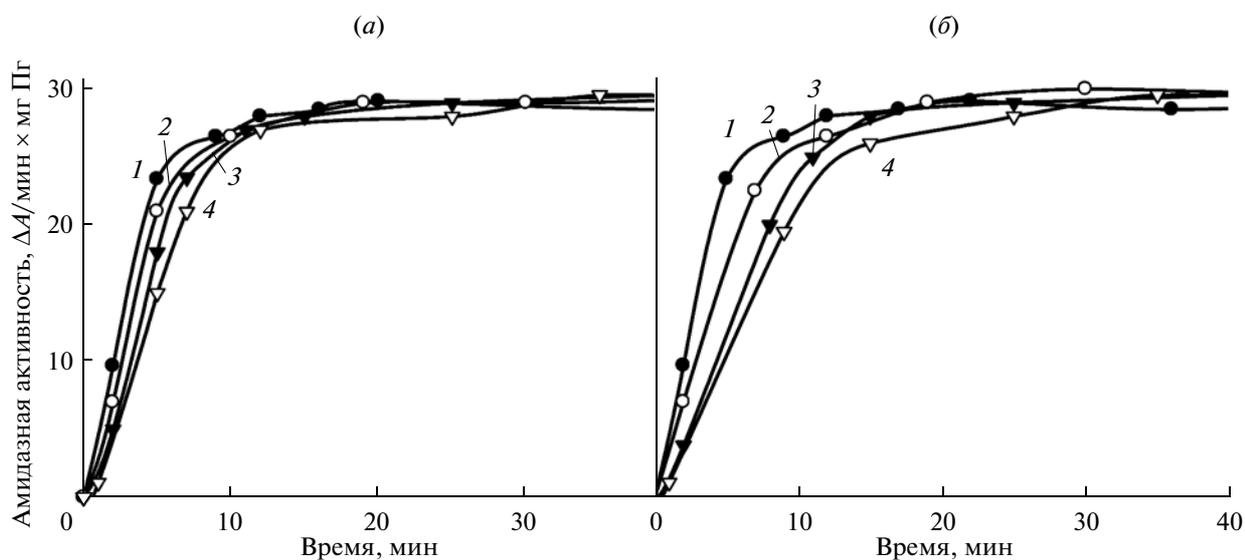


Рис. 2. Кинетика образования активаторного комплекса Пл СК при взаимодействии 1 мкМ раствора плазминогена с 1 мкМ раствором свободной СК (кривая 1) или конъюгатов СК-ПЭГ2 (а) и СК-ПЭГ5 (б). Степень модификации (%) аминокрупп СК: 39 (2), 52 (3) и 54 (4) для СК-ПЭГ2; 38 (2), 49 (3) и 52 (4) для СК-ПЭГ5 (рН 7.4, 37°C), $p < 0.05$.

Пл-СК. Последнее может быть связано с тем, что большая по массе молекула ПЭГ5 создает стерические затруднения для расщепления активационной связи Arg⁵⁶⁰-Val⁵⁶¹ в молекуле плазминогена комплексом Пл-СК-ПЭГ5. Другими словами, молекулы ПЭГ5, связанные с молекулой СК, заметно снижают начальную скорость образования двойного белкового комплекса Пл-СК (см. рис. 2), но их влияние значительно выше при расщеплении активационной пептидной связи в тройном белковом комплексе Пл-СК-ПЭГ5-Пг. В то же время меньшие по массе молекулы ПЭГ2 незначительно влияют на скорость образования двойного комплекса Пл-СК-ПЭГ2 и немного повышают каталитическую эффективность ($k_{Пг}/K_{Пг}$) активации плазминогена этим комплексом. Последнее может быть связано с тем, что молекулы ПЭГ2 способствуют образованию конформационно бо-

лее эффективного тройного комплекса Пл-СК-ПЭГ2-Пг.

Побочные эффекты конъюгатов СК-ПЭГ на плазменные белки *in vitro*. Для оценки побочных эффектов конъюгатов СК-ПЭГ измеряли динамику вызываемого ими падения уровней плазминогена и фибриногена в плазме крови *in vitro*. Полученные данные (рис. 3) демонстрируют, что все конъюгаты СК-ПЭГ вызывают значительно меньшее истощение уровней плазминогена и фибриногена в плазме крови по сравнению с равной дозой свободной СК. При этом, с увеличением степени ПЭГилирования СК глубина ее побочных эффектов уменьшается. Конъюгаты СК-ПЭГ5 вызывают меньшее истощение уровней плазминогена и фибриногена в плазме крови, чем конъюгаты СК-ПЭГ2. Наименьшие побочные эффекты вызывают конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 со степенями модификации аминокрупп СК 54 и 52% соответственно.

Таблица 2. Кинетические параметры активации плазминогена каталитическими концентрациями активаторных комплексов Пл-СК, Пл-СК-ПЭГ2 и Пл-СК-ПЭГ5 (рН 7.4; 37°C, см. эксперим. часть), $p < 0.05$

Препарат	Степень модификации, %	$K_{Пг}$, мкМ	$k_{Пг}$, мин ⁻¹	$k_{Пг}/K_{Пг}$, мин ⁻¹ мкМ ⁻¹
Пл-СК		1.26	2.65	2.1
Пл-СК-ПЭГ2	52	1.00	2.92	2.99
	54	1.16	3.32	2.84
Пл-СК-ПЭГ5	49	1.43	2.18	1.52
	52	1.74	2.05	1.17

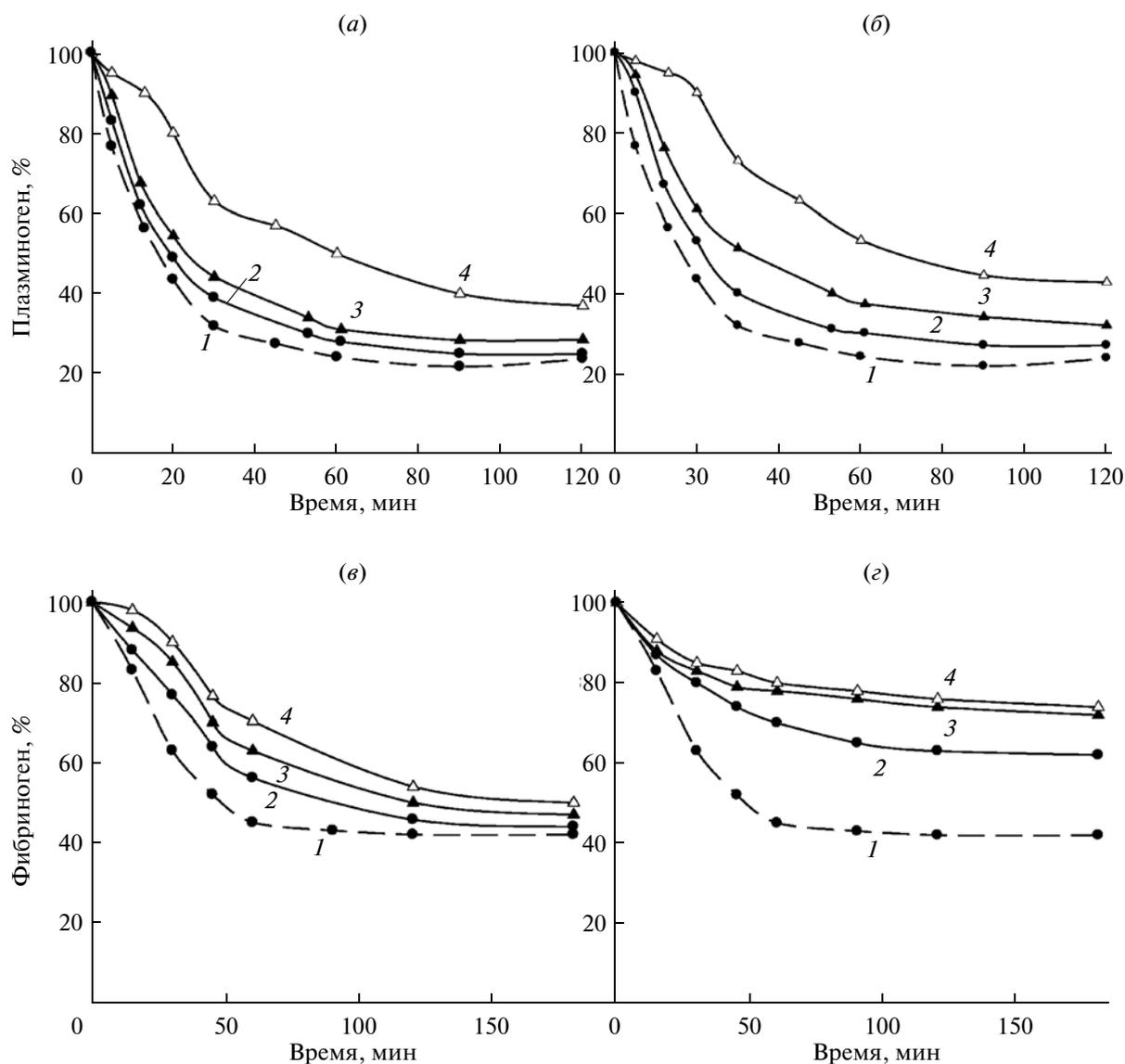


Рис. 3. Динамика истощения уровня плазминогена (верхняя панель) и фибриногена (нижняя панель) в плазме крови *in vitro* под действием 200 МЕ/мл свободной СК (кривые 1) и конъюгатов СК-ПЭГ2 (а, в) и СК-ПЭГ5 (б, г). Степень модификации (%) аминокрупп СК: 39 (2); 52 (3) и 54 (4) для СК-ПЭГ2; 38 (2); 49 (3) и 52 (4) для СК-ПЭГ5 (37°C), $p < 0.05$.

Тромболитическая активность конъюгатов СК-ПЭГ *in vitro*. Тромболитическую активность свободной СК и ее ПЭГилированных производных определяли по скорости лизиса плазменных сгустков, погруженных в плазму, т.е. в условиях, приближенных к *in vivo*. В отличие от фибринолитической активности агентов, которая определялась ранее по лизису очищенного фибрина, в этих экспериментах и сгусток, и окружающая его плазма содержали белковые ингибиторы, включая α_2 -антиплазмин – природный ингибитор комплекса Пл-СК [2]. С увеличением степени ПЭГ-модификации СК наблюдалось снижение тромболитической активности конъюгатов СК-ПЭГ2 (а)

и СК-ПЭГ5 (б) (рис. 4). При этом падение тромболитической активности СК-ПЭГ5 было более выражено, чем у СК-ПЭГ2.

В табл. 3 объединены основные *in vitro*-свойства всех полученных конъюгатов СК-ПЭГ в сравнении со свойствами свободной СК. В таблицу включены вычисленные из данных рис. 3 времена полуистощения уровня плазминогена и фибриногена в плазме крови, вызываемого свободной СК и конъюгатами СК-ПЭГ, а также значения их тромболитических активностей, вычисленные из данных рис. 4. Видно, что максимально стабильные в плазме конъюгаты образуются через 2 ч реакции, когда степень модификации ϵ -амино-

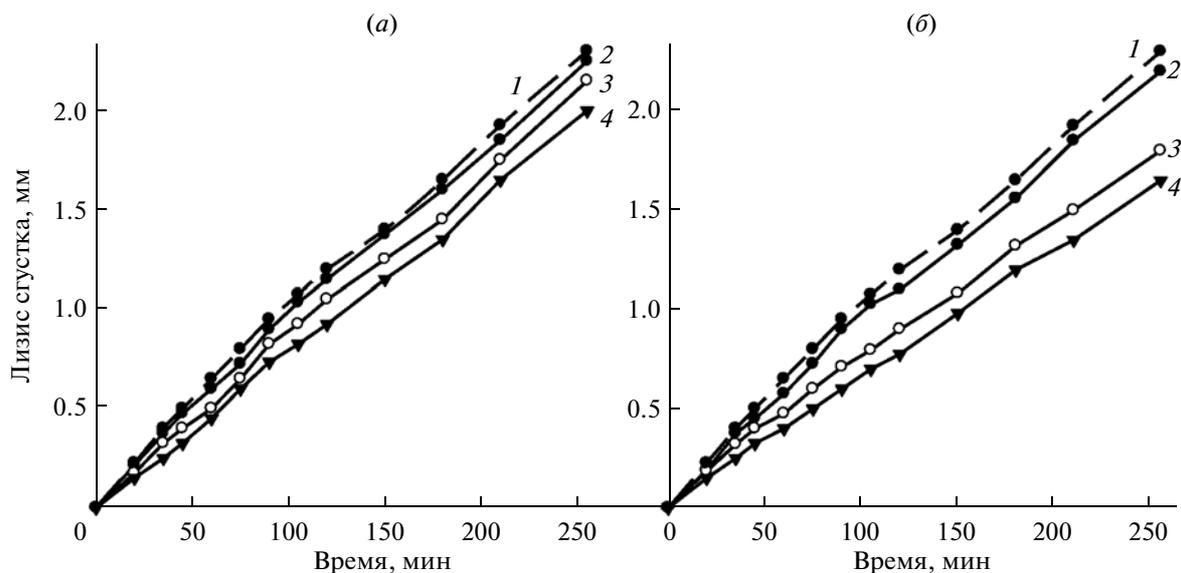


Рис. 4. Кинетика лизиса плазменных сгустков под действием 200 МЕ/мл свободной СК (кривая 1) и конъюгатов СК-ПЭГ2 (а) и СК-ПЭГ5 (б). Степень ПЭГилирования (%) молекулы СК: 39 (2), 52 (3) и 54 (4) для СК-ПЭГ2; 38 (2), 49 (3) и 52 (4) для СК-ПЭГ5 (37°C), $p < 0.05$.

групп остатков лизина в СК составляет 54% с ПЭГ2 и 52% с ПЭГ5. Более низкая тромболитическая активность конъюгата СК-ПЭГ5, по сравнению с конъюгатом СК-ПЭГ2, при близких степенях модификации обусловлена тем, что начальная скорость образования бинарного комплекса ПлСК-ПЭГ5 более замедлена (рис. 2) и каталитическая эффективность ($k_{Пл}/K_{Пл}$) активации пламиногена этим комплексом ниже, чем комплексом ПлСК-ПЭГ2 (табл. 2).

По сравнению со свободной СК конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 (со степенями модификации 54 и 52% соответственно) сохраняют значительную часть тромболитической активности СК (89 и 72% соответственно) и вызывают значительно меньшее истощение пламиногена (в 3.8 и 4.3 раза соответственно) и фибриногена (в 3.5 и

3.75 раза соответственно) в плазме крови. Важно также, что данные конъюгаты более стабильны в плазме (в 2–2.4 раза), чем свободная СК, что способствует значительному пролонгированию их тромболитического действия.

Таким образом, в этой работе оптимизирован метод и получены ковалентные конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5, которые обладают высокой тромболитической активностью, сниженными побочными эффектами и повышенной стабильностью в плазме крови человека, по сравнению со свободной СК.

После стрептококковой инфекции или тромболитической терапии стрептокиназой титры образовавшихся антистрептокиназных антител в плазме пациентов часто остаются повышенными в течение 2–4 лет, вызывая резистентность паци-

Таблица 3. Сравнительные *in vitro*-свойства свободной СК и полученных конъюгатов СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5, $p < 0.05$

Препарат	Степень модификации, %	Стабильность в плазме ($\tau_{1/2}$), мин	Тромболитическая активность, %	Полуистощение ($\tau_{1/2}$), мин	
				пламиноген	фибриноген
СК	—	22	100	16	48
СК-ПЭГ2	39	27	98	18	89
	52	32	94	23	119
	54	45	89	61	167
СК-ПЭГ5	38	32	97	21	>180
	49	40	77	33	>180
	52	52	72	69	>180

ента к повторной терапии стрептокиназой. Принимаемая во внимание тот факт, что модифицированные низкомолекулярным ПЭГ производные СК обладают низкой антигенностью [21, 22], полученные нами конъюгаты СК-ПЭГ2 и СК-ПЭГ5 с высокой тромболитической активностью и повышенной стабильностью в плазме могут быть использованы для терапии тромбозов у пациентов с высоким титром антистрептокиназных антител.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы стрептокиназа (КФ 3.4.99.0) с активностью 6300 МЕ/мг сухой массы (*M* 47 кДа, Reyon Pharmaceutical Co. Ltd., Корея), фибриноген (*M* 340 кДа), тромбин человека (КФ 3.4.21.5) и HCO-Ala-Phe-Lys-pNA (AFK-pNA) (Технология-Стандарт, Россия), монометокси полиэтиленгликоль (ПЭГ) 2 и 5 кДа (Sigma, США); 1,1'-карбонилдиимидазол (Sigma, США); тринитробензолсульфокислота (TNBS), синтезированная в нашей лаборатории; стандартная плазма крови человека (Hemoliance, США); плазма крови человека (пул трех доноров) (Гематологический научный центр МЗ России, Москва); сефадекс G-25, BcCN-сефароза 4В и Lys-сефароза 4В (ЗАО ДжиИ Хэлскеа, Швеция), диализная мембрана (Cellu Sep H1, 1000 Да, Membrane Filtration Products, Inc., США). Остальные реактивы отечественного производства марки "ос.ч." или "х.ч."

Оборудование. Спектрофотометр Biochrom WPA Lightwave II, шейкер-инкубатор для планшет (ST-3, Elmi, Эстония), планшетный фотометр Antos-2020 (Австрия).

Статистический анализ результатов был проведен с помощью программы Sigma Plot 9.0. Данные считались достоверными при $p < 0.05$.

Нативный Glu-плазминоген получали из донорской плазмы крови человека аффинной хроматографией на Lys-сефарозе 4В при 4°C в присутствии апротинина по методу, описанному в работе [29]. По данным титрования апротинином плазмина, полученного активацией плазминогена стрептокиназой, содержание потенциально активного зимогена в препарате составляло 94%, что учитывалось при определении кинетических параметров его активации свободной и модифицированной СК.

Иммобилизацию плазминогена на BcCN-активированной сефарозе 4В проводили по методу, описанному в работе [31].

Очистку коммерческой стрептокиназы от примесных белков и стабилизирующих добавок проводили методом аффинной хроматографии на колонке с плазминоген-сефарозой 4В [32]. Концентрацию свободной и модифицированных образцов стрептокиназы определяли по калибровочной зависимости активности (времени полного

лизиса сгустка) от концентрации стандартной СК (100000 МЕ/мг белка) методом Кристенсена [27].

Получение ковалентных конъюгатов СК-ПЭГ. Модификация СК монометокси-производными ПЭГ2 и ПЭГ5 проводили в два этапа:

Активация ПЭГ и его очистка: Готовили 0.05 М растворы ПЭГ2 в диоксане и ПЭГ5 в хлороформе. К растворам ПЭГ добавляли 1,1'-карбонилдиимидозол до конечной концентрации 0.5 М и инкубировали 2 ч при перемешивании (37°C). Реакционную смесь диализовали с использованием диализных мембран Cellu Sep H1 (1000 Да) против воды и затем лиофильно высушивали.

Модификация СК активированными ПЭГ и очистка конъюгатов: К раствору СК (4 мкМ) в 0.2 М боратном буфере, рН 8.5, добавляли активированный ПЭГ до его конечной концентрации 40 мМ и инкубировали при 20°C. В ходе реакции отбирали пробы для контроля изменений фибринолитической активности СК и степени ПЭГ-модификации ее аминокрупп. Для получения конъюгатов СК-ПЭГ процесс модификации СК проводили 0.5, 1 или 2 ч и реакционную смесь очищали на колонке с сефадексом G-25, уравновешенным 0.05 М фосфатным буфером. Фракции, содержащие ПЭГилированную СК, объединяли и лиофильно высушивали.

Амидазную активность комплексов Пл-СК и Пл-СК-ПЭГ определяли по начальной скорости гидролиза 0.6 мМ AFK-pNA в 0.1 М Na-фосфатном буфере, рН 7.4, содержащем 0.15 М NaCl. Конечные концентрации комплексов Пл-СК и Пл-СК-ПЭГ составляли: 10–100 нМ. Скорость гидролиза регистрировали по накоплению п-нитроанилина при 405 нм ($\epsilon_M^{405} = 10000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) при 25°C. Удельную амидазную активность определяли как изменение оптического поглощения раствора субстрата при $\lambda = 405 \text{ nm}$ за 1 мин, вызываемое 1 мг фермента ($\Delta A/\text{мин} \times \text{мг}$). Каждое измерение активности дублировали.

Фибринолитическую активность СК определяли методом Кристенсена [27], который основан на измерении времени полного лизиса фибриновых сгустков плазмином, образующимся в результате активации плазминогена активатором, т.е. когда Пг и СК включены в сгусток при его формировании. Остаточную фибринолитическую активность СК в ходе ее ПЭГ-модификации определяли с помощью калибровочной зависимости активности нативной СК (50–500 МЕ/мл) от времени полного лизиса сгустков. Измерение активности каждой пробы дублировали.

Степень ПЭГ-модификации молекулы СК определяли путем титрования TNBS количества оставшихся свободных ϵ -аминогрупп остатков лизина в ее молекуле. Для этого к 20 мкл испытуемого образца, содержащего 2.8 мкМ белка, до-

бавляли 235 мкл 0.1 М раствора $\text{Na}_2\text{B}_2\text{O}_7$ в 0.1 М NaOH , pH 10. Затем добавляли 20 мкл 0.42 М раствора TNBS и перемешивали раствор на вортексе. Через 5 мин реакцию останавливали внесением 725 мкл 0.1 М NaH_2PO_4 , содержащего 1.5 мМ Na_2SO_3 и измеряли поглощение раствора при 420 нм (A_{420}). За 100% принимали A_{420}^0 , полученное для свободной СК в тех же условиях. Процент модификации СК в конъюгатах определяли по формуле $(A_{420}^0 - A_{420}) / A_{420}^0 \times 100\%$. Измерение каждой пробы дублировали.

Кинетика образования эквимольных активаторных комплексов ПлСК и ПлСК-ПЭГ2 и ПлСК-ПЭГ5 с разными степенями модификации. В ходе инкубации раствора 1 мкМ плазминогена со СК или различными ее ПЭГилированными образцами той же концентрации в 0.1 М Na -фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl , при 37°C отбирали пробы и измеряли в них амидазную активность. Полноту реакции образования комплекса ПлСК (или ПлСК-ПЭГ) контролировали по росту амидазной активности проб до максимального значения. Полученные комплексы ПлСК, ПлСК-ПЭГ2 и ПлСК-ПЭГ5 с разными степенями модификации использовали для определения кинетических параметров активации ими плазминогена.

Определение кинетических параметров активации плазминогена комплексами ПлСК и ПлСК-ПЭГ. Кинетику активации плазминогена в плазмин каталитическими количествами (в нашем случае соотношение активаторных комплексов ПлСК или ПлСК-ПЭГ к Пг варьируется в пределах 1 : 200 до 1 : 1000) комплексов ПлСК, ПлСК-ПЭГ2 и ПлСК-ПЭГ5 изучали с помощью сопряженного метода, описанного в работе [30], с некоторыми модификациями. В лунки микропланшета вносили 150 мкл 0.1 М Na -фосфатного буфера, pH 7.4, содержащего 0.15 М NaCl , субстрат АФК-рНА и плазминоген в различных концентрациях. После термостатирования при 37°C (10 мин) в шейкере-инкубаторе в рабочие лунки вносили 50 мкл раствора ПлСК, ПлСК-ПЭГ2 или ПлСК-ПЭГ5 в 0.1 М Na -фосфатном буфере, pH 7.4, содержащем 0.15 М NaCl , а в контрольные лунки – 50 мкл буфера (конечный объем 200 мкл). Конечные концентрации реагентов в реакционной смеси составляли: плазминоген – 0.2–3.0 мкМ, АФК-рНА – 0.6 мМ и эквимольный комплекс ПлСК, ПлСК-ПЭГ2 или ПлСК-ПЭГ5 – 0.2 нМ. Закрытые микропланшеты инкубировали при 37°C в шейкере-инкубаторе и следили за кинетикой активации плазминогена по высвобождению *n*-нитроанилина через 3–5-минутные интервалы с помощью планшетного фотометра при 405 нм. Результаты обсчитывались с учетом контроля

(фоновый гидролиз в отсутствие активатора). Каждый эксперимент дублировали. Параболические кривые образования *n*-нитроанилина в сопряженной реакции (A_{405} от t) линеаризовали в координатах A_{405} от t^2 , из тангенсов углов которых вычисляли начальные скорости активации для разных концентраций плазминогена (v_0). Кинетические параметры активации плазминогена ($k_{\text{Пг}}$ и $K_{\text{Пг}}$) определяли из зависимостей $1/v_0$ от $1/[\text{Пг}]$.

Влияние свободной СК и конъюгатов СК-ПЭГ на уровень плазминогена в плазме крови человека определяли с помощью метода, описанного в работе [18], с некоторыми модификациями. Равные дозы (200 МЕ/мл) свободной СК или конъюгата СК-ПЭГ инкубировали в плазме в течение 2 ч при 37°C. В ходе инкубации отбирали пробы (50 мкл) и определяли в них содержание плазминогена. Принцип метода основан на том, что при добавлении избытка СК весь плазменный плазминоген быстро связывается со СК стехиометрически с образованием комплекса Пг-СК [2], обладающего амидазной активностью, которая пропорциональна количеству плазминогена в исследуемом образце плазмы. Для этого к 50 мкл пробы плазмы, разбавленной в 6 раз 0.05 М Трис-НСI-буфером, pH 7.4, содержащим 0.1 М NaCl , добавляли 50 мкл раствора СК (5000 МЕ/мл) в том же буфере, выдерживали 2 мин при комнатной температуре, затем добавляли 100 мкл раствора субстрата АФК-рНА (конечная концентрация 0.6 мМ) и измеряли амидазную активность проб. Концентрацию плазминогена в пробах определяли по калибровочной зависимости амидазной активности от концентрации плазминогена в разбавленной в 7–30 раз стандартной плазме, полученной в вышеописанных условиях. Стандартная плазма содержала 1.4 мкМ плазминоген. Измерения концентрации плазминогена во всех пробах дублировали.

Влияние свободной СК и конъюгатов СК-ПЭГ на уровень фибриногена плазме крови человека определяли с помощью метода, описанного в работе [18], с некоторыми модификациями. Метод основан на изменении мутности исследуемого образца при превращении фибриногена в фибрин под действием тромбина. Равные дозы (200 МЕ/мл) свободной СК или конъюгата СК-ПЭГ инкубировали в плазме в течение 3 ч при 37°C. В ходе инкубации отбирали пробы и определяли в них содержание фибриногена. Исследуемые образцы плазмы разбавляли в 5 раз 0.05 М Трис-НСI-буфером, pH 7.4, содержащим 0.2 мг/мл CaCl_2 и 0.01 мг/мл панкреатического ингибитора трипсина. В ячейку планшетов вносили 250 мкл разбавленной плазмы и после введения 50 мкл раствора тромбина (конечная концентрация 0.06 Ед/мл) измеряли увеличение мутности раствора при 405 нм на планшетном фотометре каждые 2 мин.

Скорость образования фибрина определяли как тангенс угла наклона линейного участка кривой. Концентрацию фибриногена в образце определяли по калибровочной зависимости скорости увеличения мутности от концентрации фибриногена в стандартной плазме (содержащей 2.4 мг/мл), разбавленной в 5–80 раз. Измерения концентрации фибриногена во всех пробах дублировали.

Кинетика тромболиза под действием свободной СК и конъюгатов СК-ПЭГ. Метод основан на измерении скорости расщепления твердофазного субстрата (сгустка из плазмы человека) под действием активатора, внесенного в жидкую фазу (плазму) над сгустком. Столбы плазменного геля формировали так, как описано в работе [18]. К полученным плазменным сгусткам добавляли по 0.45 мл плазмы человека и пробирки инкубировали в шейкере-инкубаторе при 37°C в течение 15 мин. Реакцию фибринолиза инициировали добавлением 50 мкл раствора свободной СК или конъюгата СК-ПЭГ так, чтобы конечные концентрации свободной и ПЭГилированной СК в надгелевой жидкости составляли 200 МЕ/мл. За кинетикой фибринолиза следили по уменьшению высоты столба геля (в мм) во времени с помощью катетометра [33]. Каждое измерение дублировали.

Стабильность в плазме крови человека свободной СК и конъюгатов СК-ПЭГ определяли по падению фибринолитической активности образцов, измеряя уменьшение площади зон лизиса фибриновой пластины стандартной толщины. Раствор с одинаковой дозой СК (200 МЕ/мл) — свободной или конъюгатов СК-ПЭГ, инкубировали в плазме крови человека при 37°C. В ходе инкубации отбирали пробы плазмы (100 мкл) и выделяли их эглобулиновые фракции, содержащие плазминоген, активаторы, около 25% фибриногена и лишённые ингибиторов фибринолиза. Для этого к 100 мкл пробы плазмы добавляли 100 мкл 0.001 М раствора уксусной кислоты, 900 мкл дистиллированной воды и инкубировали при 4°C в течение 40 мин для выпадения осадка. После центрифугирования в течение 10 мин при 14000 об/мин надосадочную жидкость декантировали. Осадок растворяли в 100 мкл 0.2 М Трис-HCl буфера, рН 7.4, и определяли в них остаточную фибринолитическую активность активатора. Выделение каждой пробы дублировали.

На фибриновые пластины, приготовленные так, как описано в работе [34], наносили по 10 мкл растворов эглобулиновых фракций исследуемых проб плазмы и через 16 ч инкубации при 37°C измеряли площади зон лизиса фибриновой пластины (в мм²), которые пропорциональны фибринолитической активности активаторов. Строили зависимость остаточной фибринолитической активности СК (или конъюгата СК-ПЭГ) от времени инкубации

в плазме, принимая за 100% исходную активность образца. Все измерения дублировали.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gulba D.C., Bode C., Runge M.S., Huber K.* // Fibrinolysis & Proteolysis. 1998. V. 12. (Suppl. 2). P. 39–58.
2. *Collen D., Lijnen H.R.* // Fibrinolysis & Proteolysis. 2000. V. 14. P. 66–72.
3. *Bachmann F.* // Thrombosis and Haemostasis / Eds Verstraete M., Vermeylen J., Lijnen R., Arnout J. Leuven; Leuven University Press, 1987. P. 227–265.
4. *McClintock D.K., Bell P.H.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971. V. 43. P. 694–702.
5. *Reddy K.N.N., Marcus G.* // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. P. 4851–4857.
6. *Buck F.F., Hummel B.C.W., De Renzo E.C.* // J. Biol. Chem. 1968. V. 243. P. 3648–3654.
7. *Kunamneni A., Abdelghani T.T.A., Ellaiah P.* // J. Thromb. Thrombolysis. 2007. V. 23. P. 9–23.
8. *Boxrud P.D., Fay W.P., Bock P.E.* // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 14579–14589.
9. *Ferres H.* // Drugs. 1987. V. 33. (Suppl. 3). P. 33–50.
10. *Баишков Г.В., Айсуна Р.Б., Макаров В.А. Сиротенко А.В., Попова Г.Ю., Житкова Ю.В., Казанская Н.Ф.* // Фармакология и токсикология. 1991. V. 54. P. 46–50.
11. *Wu X.C., Ye R., Duan Y., Wong S.L.* // Appl. Environ. Microbiol. 1998. V. 64. P. 824–829.
12. *Houng A., Quen S., Jean L.-F., Reed G.L.* // Thromb. Haemost. 1995. V. 73. P. 1130–1135.
13. *Chazov E.I., Golikov A.P.* // Kardiologiya. 1981. V. 21. P. 10–14.
14. *Kim Y.-W., Kim D.-C.* // Yakche Hakhoechi. 1999. V. 29. P. 211–216.
15. *Perkins W.R., Vaughan D.E., Plavin S.R., Daley W.L., Rauch J., Lee L., Janoff A.S.* // Thromb. Haemost. 1997. V. 77. P. 1174–1178.
16. *Leach J.K., O'Rear E.A., Patterson E., Miao Y., Johnson A.E.* // Thromb. Haemost. 2003. V. 90. P. 64–70.
17. *Leach J.K., Patterson E., O'Rear E.A.* // J. Thromb. Haemost. 2004. V. 2. P. 1548–1555.
18. *Мухаметова Л.И., Айсуна Р.Б., Тюпа Д.В., Медведева А.С., Гершкович К.Б.* // Биоорг. химия. 2013. Т. 39. С. 437–444.
19. *Veronese F.M.* // Biomaterials. 2001. V. 22. P. 405–417.
20. *Webster R., Didier E., Harris P., Siegel N., Stadler J., Tilbury L., Smith D.* // Drug Metab. Dispos. 2007. V. 35. P. 9–16.
21. *Koide A., Suzuki S., Kobayashi S.* // FEBS Lett. 1982. V. 143. P. 73–76.
22. *Rajagopalan S., Gonias S.L., Pizzo S.V.* // J. Clin. Invest. 1985. V. 75. P. 413–419.
23. *Brucato F.H., Pizzo S.V.* // Blood. 1990. V. 76. P. 73–79.
24. *Greenwald R.B., Choe Y.H., McGuire J., Conover C.D.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2003. V. 55. P. 217–250.
25. *Yamaoka T., Tabata Y., Ikada Y.* // J. Pharm. Sci. 1994. V. 83. P. 601–606.
26. *Beauchamp C.O., Gonias S.L., Menapace D.P., Pizzo S.V.* // Anal. Biochem. 1983. V. 131. P. 25–33.

27. Christensen L.R. // Proc. Soc. Biol. Med. 1941. V. 46. P. 674–679.
28. Chibber B.A., Morris J.P., Castellino F.J. // Biochemistry. 1985. V. 24. P. 3429–3434.
29. Aisina, R., Mukhametova, L., Gershkovich, K., Varfolomeyev, S.D. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1725. P. 370–376.
30. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И., Присяжная Н.В., Гулин Д.А., Левашиов М.Ю., Гершкович К.Б. // Биоорг. химия. 2011. Т. 37. С. 319–326.
31. Wiman B., Wallen P. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 36. P. 25–31.
32. Babashamsi M., Razavian M.H., Nejadmoghammad M.R. // AJMB. 2009. V. 1. P. 47–51.
33. Попова Г.Ю., Еремеев Н.Л., Айсина Р.Б., Казанская Н.Ф. // Бюлл. эксперим. биол. мед. 1989. № 5. С. 561–564.
34. Astrup T., Mullerts S. // Arch. Biochem. Biophys. 1952. V. 40. P. 346–351.

Covalent Stretokinase-Polyethylene Glycol Conjugates with Increased Stability and Decreased Side Effects

R. B. Aisina*[#], L. I. Mukhametova*, D. V. Tyupa*, K. B. Gershkovich**,
D. A. Gulin**, S. D. Varfolomeyev*

[#]Fax: +7 (495) 939-54-17; e-mail: aisina2004@mail.ru

*Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie Gori, Moscow, 119992 Russia

**Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia

By variation of incubation time of streptokinase (SK) with activated polyethylene glycol (M 2 and 5 kDa, PEG2 and PEG5) it was obtained covalent SK-PEG2 and SK-PEG5 conjugates with different modification degrees of amino groups of protein and their properties were studied in vitro as compared with free SK. It was shown, that maximal stable and retaining 80% fibrinolytic activity SK-PEG2 and SK-PEG5 conjugates are formed when the modification degrees of amino groups of protein are 54 and 52%, respectively. At interaction of the given conjugates with equimolar plasminogen concentration it were formed the plasmin(Pm):SK-PEG2 and Pm:SK-PEG5 activator complexes, the maximal amidase activity of which is equal to activity of unmodified Pm:SK complex. It was found, that the catalytic efficiency of plasminogen activation (k_{Pg}/K_{Pg}) by Pm:SK-PEG2 complex is some higher ($2.84 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$) and by Pm:SK-PEG5 complex is lower ($1.17 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$), than that by unmodified Pm:SK complex ($2.1 \text{ min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$). Investigation of lysis kinetics of human plasma clots and depletion of plasminogen and fibrinogen in plasma under the action of free SK and SK-PEG2 and SK-PEG5 conjugates showed, that the latter's have high thrombolytic activity (89 и 72%, respectively) and cause 3.5–4 fold lower side effects, than free SK. Obtained by us SK-PEG2 and SK-PEG5 conjugates with increased stability and decreased side effects may be used in the therapy of thrombotic disorders.

Keywords: streptokinase, plasminogen, polyethylene glycol conjugates, activity, stability, polyethylene glycol, fibrinogen