

Choroby układu krążenia — wyzwanie dla biotechnologii

Tadeusz Pietrucha

Janusz Szemraj

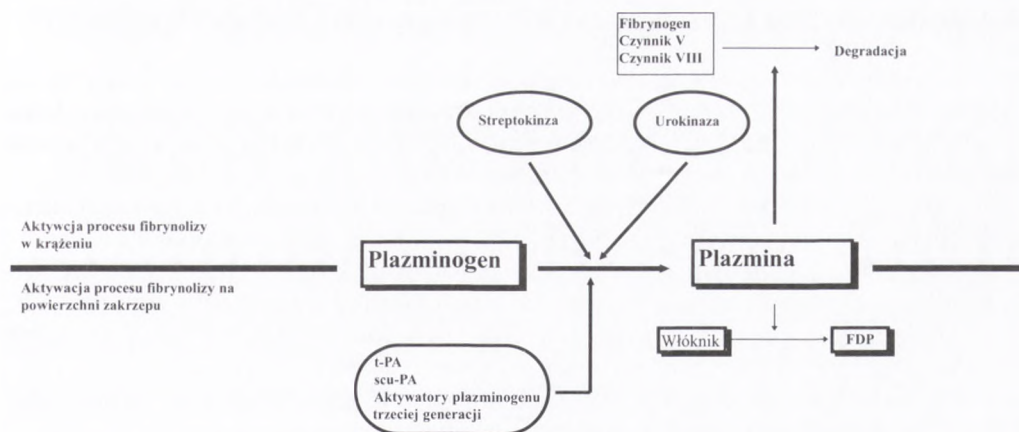
Pracownia Biotechnologii Medycznej, Zakład Biochemii
Akademia Medyczna
Łódź

1. Wstęp

Rola powikłań zakrzepowych w powstawaniu i przebiegu chorób układu krążenia, w tym m.in. takich jak choroba niedokrwienna serca czy zawał mięśnia sercowego, jest dość dobrze udokumentowana i nie budzi wątpliwości (1). Powszechnie uważa się, że zakrzepy wewnątrznacyniowe mogą być przyczyną zwężenia lub całkowitego zamknięcia światła naczynia krwionośnego. Niewielkie zakrzepy lub agregaty płytkowe oderwane od ściany naczynia i niesione z prądem krwi, po natrafieniu na odpowiednio mały przekrój naczynia, powodują zator uniemożliwiający dalszy przepływ krwi przez to naczynie. Uaktywnienie procesu fibrynolizy powoduje rozpuszczanie złożeń włókniaka, jednego z głównych elementów strukturalnych zakrzepu, a tym samym, częściowe lub całkowite udrożnienie naczynia.

Według danych przedstawionych na XV Kongresie Międzynarodowego Towarzystwa Zakrzepów i Hemostazy (Jerozolima, 1995), głównymi wskazaniami do zastosowania terapii trombolitycznej są ostry zawał mięśnia sercowego i rozległy zator płucny (2). Jest także wykorzystywana w leczeniu zakrzepicy żył głębokich oraz ostrej okluzji obwodowych naczyń tętniczych (3,4). W fazie eksperymentalnej znajdują się próby leczenia czynnikami trombolitycznymi udaru mózgu.

O tym jak bardzo przyszłościową i dynamicznie rozwijającą się obecnie dziedziną medycyny jest terapia trombolityczna, świadczy chociażby liczba publikacji i doniesień naukowych. Według danych bazy Medline w latach 1996-1998 opublikowano ponad 2190 artykułów poświęconych terapii trombolitycznej. Tematyka ta wywołuje również spore zainteresowanie w Polsce (5-10).



Rys. 1. Mechanizm działania czynników trombolitycznych. Powstanie dużej ilości wolnej plazminy w krążeniu ogólnoustrojowym, np. w wyniku działania streptokinazy czy urokinazy, powoduje zaburzenie funkcjonowania systemu krzepnięcia poprzez degradację m.in. fibrynogeny, czynników V i VIII, a co za tym idzie — zwiększa ryzyko krwawień. Aktywacja plazminogenu w obrębie zakrzepu umożliwia efektywne trawienie włóknika do rozpuszczalnych produktów degradacji (FDP), bez niepożądanych skutków ubocznych.

2. Na czym polega istota mechanizmu działania leków trombolitycznych?

Istotą działania aktywatorów plazminogenu zaliczanych do grupy czynników trombolitycznych (rozpuszczających zakrzepę) jest przekształcenie nieaktywnego białka krążącego w osoczu, plazminogenu, do jego aktywnej postaci — plazminy. Zasadność stosowania aktywatorów plazminogenu opiera się na sygnalizowanym spostrzeżeniu, a mianowicie, że w zwężeniu lub całkowitym zamknięciu światła naczynia krwionośnego niezwykle istotną rolę odgrywają czynniki zakrzepowe. Głównym elementem strukturalnym zakrzepu jest włóknik, ulegający enzymatycznej degradacji katalizowanej przez plazminę (rys. 1). Zróżnicowana skuteczność poszczególnych czynników trombolitycznych, jak też skutki uboczne przez nie wywoływane, wynikają głównie z ich różnych właściwości, których następstwem są m.in. odmienne dla poszczególnych aktywatorów mechanizmy działania (11). Dzięki rozwojowi technik biologii molekularnej istnieje duża możliwość ingerencji w strukturę białek, a tym samym modyfikacji ich właściwości biochemicznych. Stąd też pojawiła się pokusa „poprawiania natury”, polegająca na tym, by przekształcić naturalnie występujące aktywatory plazminogenu w idealne leki trombolityczne.

3. Czego lekarze oczekują od idealnego leku trombolitycznego?

Na podstawie dotychczasowych, klinicznych doświadczeń związanych ze stosowaniem terapii trombolitycznej można określić cechy idealnego leku trombolitycznego. Idealny czynnik trombolityczny powinien charakteryzować się m.in.

— dostatecznie długim okresem półtrwania w krążeniu, tak by mógł skutecznie rozpuścić zakrzep przy stosunkowo niskiej dawce preparatu,

— wykazywać specyficzność działania (być aktywnym tylko w obrębie zakrzepu) i powodować rozpuszczanie zębów włókniaka i agregatów płytkowych, nie uszkadzając przy tym innych elementów morfotycznych krwi i białek osocza),

— brakiem immunogenności, czyli nie powinien wywoływać odpowiedzi immunologicznej w postaci wytwarzania przeciwciał,

— brakiem skutków ubocznych, zwłaszcza w postaci szczególnie groźnych krwawień śródczaszkowych,

— działaniem tylko w obrębie niebezpiecznych zakrzepów ograniczających lub wręcz uniemożliwiających przepływ krwi — być tani i szeroko dostępny,

— łatwością w stosowaniu (np. poprzez jednorazową iniekcję).

4. Nowe leki trombolityczne

Patrząc z perspektywy czasu na rozwój badań nad czynnikami rozpuszczającymi zakrzepy można wyróżnić kilka generacji tych leków. Pierwszą stanowiły streptokinaza (Streptase[®]), białko pochodzenia bakteryjnego, oraz urokinaza izolowana z ludzkiego moczu. Działanie obu tych czynników jest mało specyficzne. Poprzez mało wybiórczą aktywację plazminogenu w krążącej krwi powodują one cały szereg niepożądanych skutków ubocznych (rys. 1). Wzbogacenie zestawu tych środków stanowiły tzw. czynniki drugiej generacji, do których zalicza się m.in. Alteplase lub Actilyse — tkankowy aktywator plazminogenu (t-PA) (8), jednołańcuchowy aktywator typu urokinazowego (scu-PA) oraz Anistreplase — acylowany kompleks plazminogen-streptokinaza (APSAC).

Zastosowanie na szeroką skalę technik biologii molekularnej, a w szczególności inżynierii genetycznej, zapoczątkowało w końcu lat osiemdziesiątych dynamiczny rozwój badań nad możliwością udoskonalenia naturalnych białek mających zastosowanie jako leki trombolityczne (7). Obecnie, m.in. dzięki zainteresowaniu problematyką ze strony znanych firm farmaceutycznych, badania związane z zapobieganiem chorobom układu krążenia przeżywają nadal swój dynamiczny rozwój (5). Wspomniane oczekiwania w stosunku do tego typu preparatów wytyczają jednocześnie główne kierunki poszukiwań (tab. 1). Efektem tych poszukiwań jest obecnie 15 nowych preparatów będących w fazie prób klinicznych (tab. 2), które określa się jako leki trombolityczne trzeciej generacji.

TABELA 1

KIERUNKI POSZUKIWAŃ NAD UZYSKANIEM CZYNNIKÓW FIBRYNOLITYCZNYCH TRZECIEJ GENERACJI

Zwiększenie powinowactwa czynnika trombolitycznego do zakrzepu	Ochrona czynników trombolitycznych przed inaktywacją	Wydłużenie okresu półtrwania czynnika trombolitycznego w krążeniu	Sprzęganie czynników trombolitycznych z przeciwzakrzepowymi	Konstrukcja czynników trombolitycznych wywołujących równocześnie efekt rozszerzający na ścianę naczynia
sprzęganie czynników fibrynolitycznych z przeciwciałami antyfibrynowymi	mutageneza epitopu reagującego z PAI-1: prototyp t-PA KHRR (296-299) AAAA	usunięcie reszt cukrowych	sprzęganie z hirudyną lub heparyną	sprzęganie czynnika EDRF (NO) z wolną cysteiną t-PA
sprzęganie czynników trombolitycznych z trombomoduliną	acylacja miejsca aktywnego	usunięcie domeny typu EGF	sprzęganie z aktywnym białkiem C	
sprzęganie czynników trombolitycznych z przeciwciałami anty- GPIIb/IIIa		sprzęganie z PEG		
utrzymanie t-PA w postaci jednolitej przez mutację aminokwasów tworzących wiązanie peptydowe ulegające hydrolizie (Arg ₂₇₅ -Ile ₂₇₆)		wstawienie domeny <i>kringle</i> 5 pochodzącej z plazminogenu do łańcucha A w cząsteczce t-PA		

TABELA 2

NOWE LEKI TROMBOLITYCZNE BĘDĄCE W FAZIE BADAŃ KLINICZNYCH UZYSKANE NA DRODZE BIOTECHNOLOGII*

Nazwa produktu	Kod lub synonim	Nazwa firmy	Faza rozwoju	Uwagi
1	2	3	4	5
A 74187		Abbott	II	glikozylowana prourokinaza
CGP 42935	K2tu-PA	Ciba-Geigy	II	chimera jednołańcuchowego rekombinowanego aktywatora plazminogenu zawierająca domenę K2 łańcucha A tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA) oraz C-końcowy obszar prourokinazy
CTC-111		Teijin	III	aktywna forma białka C przechodząca III fazę badań klinicznych w leczeniu rozsianego wykrzepiania śródnaczyniowego (DIC)
aktywator plazminogenu ze śliny <i>Desmodus</i>	ZK-152387	Schering AG	I	rekombinowany aktywator plazminogenu pochodzący ze śliny nietoperza
E 6010	Mf-tPA	Eisai	przed rejestracją	rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu o silniejszym i bardziej wydłużonym efekcie działania niż Alteplase
MMR-701		Mitsui Toatsu, Mochida	przed rejestracją	otrzymany za pomocą technik inżynierii genetycznej jednołańcuchowy tkankowy aktywator plazminogenu
NPA	tPA-2, rNPA	Genetics Institute, Suntory, Bristol-Meyers Squibb	III	otrzymany za pomocą technik inżynierii genetycznej t-PA drugiej generacji
prourokinaza	FCE 27485	Pharmacia & Upjohn	badania przedkliniczne	rekombinowany, niskocząsteczkowy wariant prourokinazy, w którym brak domeny EGF i domen krążkowych (reszty aminokwasowe od 11 do 135)
prourokinaza	PUK	Genome Therapeutics	III	prourokinaza wydzielana przez nefrocyty linii komórkowej TCL 598
Retepłase	BM-06022	Boehringer Mannheim	III	nieglikozylowany tkankowy aktywator plazminogenu zawierający domenę K2 i część proteazową ludzkiego tkankowego aktywatora plazminogenu. Zachowuje specyficzność w stosunku do włóknika oraz odznacza się bardziej wydłużonym okresem półtrwania w krążeniu niż Alteplase

1	2	3	4	5
Saruplase	CG-4509	Gruenthal, Genentech, Searle (Monsanto)	przed rejestracją	rekombinowana nieglikozylowana forma prourokinazy (gen został sklonowany i ulega ekspresji w komórkach bakteryjnych)
stafylokinaza		Medac, nonindustrial source, Yakult Housha	II	rekombinowana forma stafylokinazy
SUN9216		Suntory	III	nowa chimera złożona z plazminogenu oraz aktywatora plazminogenu
TNK-tPA	tPA-2	Genetech	II	druga generacja tkankowego aktywatora plazminogenu
YM-866	YM-22866	Yamanouchi	II	analog Alteplase o wydłużonym działaniu (usunięcie domeny K1 oraz mutacja punktowa w domenie K2)

*Na podstawie (46).

5. Leki trombolityczne trzeciej generacji

Są to preparaty, które powstały w wyniku zaawansowanej technologii i wiedzy naukowej. Białka rekombinowane uzyskiwane w bakteryjnych komórkach gospodarza mają zdecydowaną przewagę nad preparatami uzyskiwanymi w systemach ekspresyjnych komórek eukariotycznych (np. linii CHO). Poniżej omawiamy te preparaty, które według subiektywnej oceny autorów rokują największe nadzieje na szerokie zastosowanie w leczeniu chorób układu krążenia.

5.1. Stafylokinaza

Stafylokinaza jest jednołańcuchowym polipeptydem zbudowanym ze 136 aminokwasów wytwarzanym przez niektóre szczepy bakterii *Staphylococcus aureus* (12). Dzięki technikom inżynierii genetycznej i biotechnologii możliwe jest otrzymywanie preparatu w ilościach wystarczających do przeprowadzenia pierwszych prób klinicznych (9). Tworzy ona z plazminogenem i plazminą kompleks w stosunku molowym 1:1, który z kolei aktywuje cząsteczki plazminogenu związane z zakrzepem do plazminy. Kompleks plazminogen(plazmina)/stafylokinaza jest blokowany w krążeniu przez α_2 -antyplazminę, dlatego też powoduje on znacznie mniejszą uogólnioną aktywację systemu fibrynolitycznego niż streptokinaza (9). Poza tym, w osoczu stafylokinaza jedynie w nieznacznym stopniu wiąże się z wolnym plazminogenem. Wiązanie to następuje dopiero z plazminogenem związanym z lekko nadtrawionym zakrzepem (13). Stafylokinaza, jak się wydaje, jest zatem obiecującym czynnikiem fibrynolitycznym, konkurencyjnym zarówno w stosunku do streptoki-

nazy jak i t-PA (14,15). Obecnie trwają intensywne prace nad dalszym udoskonaleniem tego preparatu (16). Poprzez przeprowadzenie szeregu mutacji punktowych w cząsteczce stafylokinazy usiłuje się wyeliminować, względnie obniżyć, jej immunogenność (17-19).

Zalety stafylokinazy są następujące:

1) jest ona znacznie bardziej specyficzna niż streptokinaza i powoduje znacznie mniejsze ubytki fibrynogenu i innych białek osocza, a także mniejszą uogólnioną aktywację systemu fibrynolitycznego;

2) wykazuje, tak pożądaną w przypadku czynnika trombolitycznego, działanie ograniczone głównie do obszaru zakrzepu;

3) w badaniach przeprowadzonych na pawianach wykazano, że jest ona znacznie silniejszym czynnikiem trombolitycznym w przypadku rozpuszczania bogatopłytkowych zakrzepów niż streptokinaza (20). W przeprowadzonych badaniach *in vitro* wskazuje się, że w przeciwieństwie do streptokinazy nie wywiera ona klinicznie istotnego wpływu na funkcje krążących krwinek płytkowych w ludzkim ciele (21), natomiast obecność płytek w zakrzepie zwiększa jej aktywność fibrynolityczną (22);

4) podobnie jak streptokinaza, stafylokinaza nie jest enzymem. Ułatwia to procedurę oczyszczania i przechowywania preparatu;

5) koszty uzyskania preparatu są porównywalne z otrzymywaniem streptokinazy, a zatem znacznie niższe niż np. t-PA.

5.2. Reteplaza

Reteplaza jest to pochodna tkankowego aktywatora plazminogenu oznaczona przez firmę Boehringer Mannheim jako produkt BM 06022. Białko to, o masie cząsteczkowej 39 kDa, zbudowane jest z jednołańcuchowego polipeptydu złożonego z 355 aminokwasów, i wytwarzane jest przez rekombinowany szczep komórek bakteryjnych *E. coli* (23). W stosunku do t-PA reteplaza różni się brakiem domeny typu *finger*, podobnej do EGF, oraz domeny *kringle 1*, jak również wprowadzeniem mutacji punktowej uniemożliwiającej jej przejście do formy dwułańcuchowej pod wpływem działania plazminy. Zmiany te spowodowały wydłużenie okresu półtrwania w krążeniu oraz preferencyjną aktywację plazminogenu związanego z włóknikiem (23,24). Usuwanie preparatu Reteplase z krążenia zachodzi ponad cztero-, pięciokrotnie wolniej niż t-PA (Alteplase) (25). Niewykluczone, że większa skuteczność działania BM06022 wynika m.in. z przedłużonego czasu przebywania w krążeniu (26). Jego okres półtrwania w krążeniu u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego wynosi 14-18 min (27).

W wielośrodkowych badaniach klinicznych tego preparatu wykazano jego znaczną konkurencyjność w stosunku do preparatu Alteplase (28).

5.3. TNK-t-PA

TNK-t-PA jest zmodyfikowaną za pomocą technik inżynierii genetycznej formą rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu, skonstruo-

waną w laboratorium naukowym firmy Genentech. Modyfikacje te polegają na wymianie aminokwasów: Thr₁₀₃→Asn, Asn₁₁₇→Gln oraz sekwencji Lys₂₉₆-His-Arg-Arg₂₉₉ na sekwencję Ala-Ala-Ala-Ala.

Zamiana peptydu Lys₂₉₆-His-Arg-Arg₂₉₉ na tetrapeptyd alaninowy oraz substytucja Thr₁₀₃→Asn powodują znaczny wzrost oporności na inaktywację cząsteczki przez inhibitor tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1) oraz są przyczyną wydłużenia okresu półtrwania preparatu w krążeniu (29). Dodatkowa mutacja Asn₁₁₇→Gln, która eliminuje miejsce glikozylacji w domenie K2, powoduje 8-krotne zwolnienie tempa usuwania tego preparatu z krążenia oraz 200-krotne zwiększenie jego oporności w stosunku do PAI-1 (30).

5.4. E 6010 Mf t-PA

Cząsteczka E6010 t-PA różni się od t-PA typu dzikiego jedynie wymiana pojedynczego aminokwasu w domenie typu EGF (Cys₈₄→Ser). Na skutek ekspresji tego białka w komórkach *E. coli* cząsteczka pozbawiona jest również reszt cukrowych. Zabiegi te pozwoliły wydłużyć okres półtrwania w krążeniu do ok. 20 min. W badaniach przeprowadzonych na zwierzętach wykazano wysoką skuteczność tego preparatu (31-36). Niestety, brak jest w piśmiennictwie anglojęzycznym bliższych danych na temat wielośrodkowych badań klinicznych przeprowadzanych w Japonii nad zastosowaniem tego preparatu, m.in. do leczenia i prewencji zawału mięśnia sercowego u ludzi.

5.5. Aktywatory plazminogenu ze śliny nietoperza

Wyizolowano i scharakteryzowano 4 postacie aktywatora plazminogenu pochodzącego ze śliny nietoperzy *Desmodus rotundus*. Dwie z nich wykazują wysoki stopień homologii z t-PA (85%). Są to DSP_{α1} (m.cz. 43 kDa) i DSP_{α2} (m.cz. 39 kDa). Oba białka nie zawierają domeny typu *kringle* 2 i miejsca wrażliwego na proteolityczne działanie plazminy. DSPβ nie zawiera domeny typu *finger*, a DSPγ domeny typu *finger* i EGF (*Epidermal growth factor*) (37-39). Jedynie formy DSP_{α1} i DSP_{α2} wykazują właściwości specyficznego wiązania z włóknikiem (40).

Po pomyślnym ukończeniu etapu badań na zwierzętach (41), w fazie prób klinicznych znajduje się rekombinowana forma aktywatora DSP_{α1}, określana jako ZK152387 (tab. 2), otrzymywana z hodowli rekombinowanej linii komórek eukariotycznych (CHO lub komórek owadzych) (42). Aktywator ten ulega posttranslacyjnej modyfikacji, w wyniku której pojawia się O-glikozylowe wiązanie L-fukozy do treoniny w pozycji 61 domeny typu EGF, zarówno w przypadku formy naturalnej, jak i formy rekombinowanego białka izolowanego z linii komórkowej CHO (43).

6. Uwagi końcowe

Lista doniesień naukowych na temat nowych odmian aktywatorów plazminogenu jest ogromna i przedstawienie ich wszystkich wymagałoby napisania książki o znacznej objętości. Jak do tej pory 15 spośród nich (tab. 2) ma szansę w niedługim czasie stać się zarejestrowanymi lekami, dostępnymi na rynku. Na podstawie subiektywnej oceny autorów, wspartej kilkuletnią aktywną obserwacją tych zmagających, omówione w pracy aktywatory plazminogenu mają największe szanse na wejście do powszechnie dostępnego zestawu środków trombolitycznych. Wkrótce zapewne zostaną poddane wielośrodkowym testom klinicznym następane preparaty, takie jak chimera złożona z domen K1K2t-PA i domeny proteazowej aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (K1 K2Pu), czy też chimery będące połączeniem aktywatorów plazminogenu z przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko receptorowi dla fibrynogenu na płytkach krwi (np. 7E3) lub z przeciwciałem MA-15C5, skierowanym przeciwko usieciowanemu włóknikowi. Mimo wysiłku wielu grup badawczych, ciągle jeszcze nie udało się jednak uzyskać takiego czynnika fibrynolitycznego, który spełniałby jeśli nie wszystkie, to przynajmniej większość oczekiwań lekarzy i pacjentów. Mimo że nadal jest miejsce na dokonywanie coraz to nowych ulepszeń, wykorzystując coraz nowsze techniki i możliwości naukowców, wydaje się, iż istotną rolę w postępie zwalczania chorób układu krążenia mogą dokonać sami lekarze, stosując nowe metody leczenia. Polegają one m.in. na odpowiednim sposobie podawania tych preparatów, jak i stosowania odpowiedniej kombinacji leków. Przykładem takiego podejścia może być odpowiednie łączenie środków trombolitycznych z przeciwzakrzepowymi, np. z hirudyną (44), która także staje się dostępna dzięki technikom inżynierii genetycznej (45) lub lekami przeciw płytkowymi. By móc pełniej wykorzystać możliwości współczesnej biotechnologii medycznej dla konstruowania nowych leków służących zwalczaniu chorób układu krążenia, a także poprawić skuteczność działania i decyzji samych lekarzy, konieczny jest dalszy postęp badań na temat molekularnych i biochemicznych podstaw tych zaburzeń. Wiedza ta umożliwi lekarzowi zarówno dobranie odpowiedniego zestawu środków terapeutycznych, jak i najbardziej odpowiedniej strategii leczenia danego pacjenta. Bez dalszego uzupełnienia tej wiedzy konstruowanie i testowanie coraz nowszych odmian czynników trombolitycznych przypomina nieco grę w loterię, tyle, że z nieco większym prawdopodobieństwem trafienia na optymalne rozwiązanie terapeutyczne.

Literatura

1. Davies M. J., (1996), *Thromb. Res.*, 82, 1-32.
2. Samama M. M., Acar J., (1995), *Thromb. Haemost.*, 74, 106-110.
3. Marder V. J., (1995), *Thromb. Haemost.*, 74, 101-105.
4. Pietrucha T., Goch J. H., (1993), *Pol. Tyg. Lek.*, 48, 132-135.
5. Cierniewski C. S., Stasiak M., (1996), *Biotechnologia*, 34, 11-22.
6. Krzezińska-Pakuła M., (1996), *Zakrzepy i zatory*, red. Łopaciuk S., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 157-158.
7. Pietrucha T., Cierniewski C. S., (1990), *Post. Bioch.*, 36, 33-40.

8. Pietrucha T., Cierniewski C. S., (1992), *Acta Haematol. Pol.*, 23, 157-164.
9. Pietrucha T., Watała C., (1996), *Biotechnologia*, 34, 43-51.
10. Zawilska K., (1996), *Zakrzepy i zatory*, red. Łopaciuk S., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 129-140.
11. Collen D., Lijnen H. R., (1995), *Thromb. Haemost.*, 74, 167-171.
12. Molkkanen T., Kuikka A., Kuusela P., (1996), *Fibrinolysis*, 10 (Suppl. 3), Abstr. 478.
13. Sakharov D. V., Rijken D. C., (1996), *Fibrinolysis*, 10 (Suppl. 3), Abstr. 256.
14. Lijnen H. R., Collen D., (1996), *Fibrinolysis*, 10, 119-126.
15. Vanderschueren S., Collen D., (1996), *Thromb. Haemost.*, 75, 816-819.
16. Silence K., Hartmann M., Guhrs K. H., Gase A., Schlott B., Collen D., Lijnen H. R., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 27192-27198.
17. Collen D., Bernaerts R., Declercq P., Decock F., Demarsin E., Jenne S., Laroche Y., Lijnen H. R., Silence K., Verstreken M., (1996), *Circulation*, 94, 197-206.
18. Collen D., Moreau H., Stockx L., Vanderschueren S., (1996), *Circulation*, 94, 207-216.
19. Vanderschueren S., Stassen J. M., Collen D., (1996), *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 27, 809-815.
20. Collen D., Lijnen H. R., (1994), *Blood*, 84, 680-686.
21. Abdelouahed M., Helft G., Emadi S., Hatmi M., Samama M. M., Elalamy I., (1996), *Fibrinolysis*, 10 (Suppl. 3), Abstr. 368.
22. Suehiro A., Tsujioka H., Yoshimoto H., Ueda M., Higasa S., Kakishita E., (1995), *Thromb. Res.*, 80, 135-142.
23. Verstraete M., (1995), *Fibrinolysis*, 74, 25-35.
24. Kohnert U., Rudolph R., Verheijen J. H., (1992), *Protein Eng.*, 5, 93-100.
25. Rijken D. C., Groeneveld E., Barrett Bergshoeff M. M., (1994), *Thromb. Haemost.*, 72, 906-911.
26. Martin U., Fischer S., Kohnert U., Opitz U., Rudolph R., Spöner G., Stern A., (1991), *Thromb. Haemost.*, 65, 560-564.
27. Martin U., Bader R., Böhm E., (1993), *Cardiovasc. Drug Rev.*, 11, 299-311.
28. Smalling R. W., Bode C., Kalbfleisch J. A., (1995), *Circulation*, 91, 2725-2732.
29. Fefino C. J., Paoni N. F., Keyt B. A., (1993), *Thromb. Haemost.*, 70, 313-319.
30. Collen D., Stassen J. M., Yasuda T., (1994), *Thromb. Haemost.*, 72, 98-104.
31. Saito M., Suzuki S., Yui Y., Kawai C., (1994), *Jpn. J. Pharmacol.*, 66, 17-23.
32. Saito M., Suzuki S., Yui Y., Kawai C., (1995), *Jpn. Circ. J.*, 59, 556-564.
33. Suzuki N., Suzuki S., Nagaoka N., Mizuo H., Yuzuriha T., Yoshitake S., (1994), *Jpn. J. Pharmacol.*, 65, 257-263.
34. Suzuki S., Saito M., Suzuki N., Kato H., Nagaoka N., Yoshitake S., Yui Y., Kawai C., (1993), *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 22, 834-840.
35. Suzuki S., Saito M., Suzuki N., (1991), *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 17, 738-746.
36. Suzuki S., Saito M., Yui Y., Kawai C., (1995), *Jpn. Circ. J.*, 59, 205-212.
37. Bergum P. W., Gardell S. J., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 17726-17731.
38. Gardell S. J., Duong L. T., Diehl R. E., York J. D., Register R. B., Jacobs J. W., Dixon R. A. F., Friedman P. A., (1989), *J. Biol. Chem.*, 264, 17947-17952.
39. Gardell S. J., Ramjit D. R., Stabilito I. I., Fujita T., Lynch J. J., Cuca G. C., Jain D., Wang S., Tung J., Mark G. E., Shebuski R. J., (1991), *Circulation*, 84, 244-253.
40. Bringmann P., Gruber D., Liese A., Toschi L., Kratzchmar J., Schleuning W. D., (1995), *J. Biol. Chem.*, 270, 25596-25603.
41. Witt W., Maass B., Baldus B., Hildebrand M., Donner P., Schleuning W. D., (1994), *Circulation*, 90, 421-426.
42. Petri T., Langer G., Bringmann P., Cashion L., Shallow S., Schleuning W. D., (1995), *J. Biotechnol.*, 39, 75-83.
43. Gohlke M., Baude G., Nuck R., Grunow D., Kannicht C., Bringmann P., Donner P., (1996), *J. Biol. Chem.*, 271, 7381-7386.
44. Pietrucha T., Baj Z., Watała C., (1996), *Acta Haematol. Pol.*, 27(3), 249-259.
45. Pietrucha T., Watała C., (1996), *Biotechnologia*, 34, 34-42.
46. Pharmaprojects Plus CD-ROM, (January 1996), za: *Vessels*, (1996), 2(1), 15.

Cardiovascular disease — the challenge for biotechnology

Summary

The significance of thromboembolic complications in the etiology and development of cardiovascular diseases, such as ischaemic heart disease or myocardial infarction, is undisputable and well documented. It is commonly believed that intravascular thrombi may cause vessel narrowing and even lead to complete vessel occlusion. When encountering circulation, narrowing of vascular lumen, such as intravascular clots and platelet aggregates, is believed to result in thromboembolisms. Activation of the fibrinolytic system allows for the proteolysis of fibrin clots, the main components of vascular thrombi, and thus it may lead to vascular reperfusion.

According to numerous data presented during the 15th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (1995), the superior indications for the use of thrombolytic therapy are acute myocardial infarction and extensive pulmonary embolism. It is still more frequently used in the therapy of deep venous thrombosis and occlusions of peripheral arterial vessels. Treatment of cerebral stroke with thrombolytic agents is under experimental studies.

The development of modern techniques in molecular biology, genetic engineering and biotechnology has led to the 'eruption' of quite new perspectives in thrombolytic pharmacology.

Key words:

biotechnology, thrombolytic agents, antithrombotic agents, cardiovascular disease.

Adres do korespondencji:

Tadeusz Pietrucha, Pracownia Biotechnologii Medycznej, Zakład Biochemii,
Akademia Medyczna, ul. Lindleya 6, 90-131 Łódź,
e-mail: tpietruc@psk2.am.lodz.pl