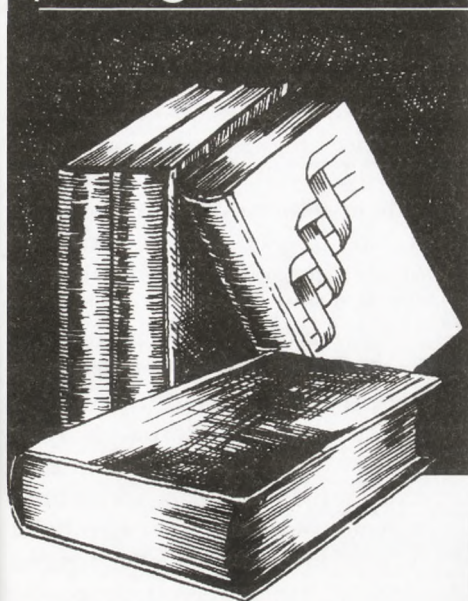


## Prace przeglądowe



# Aktualne kierunki biotechnologii leków stosowanych w chorobach naczyń — białka rekombinowane, analogi peptydów i oligonukleotydy antysensowe\*

Czesław S. Cierniewski

Marta Stasiak

Zakład Biofizyki, Akademia Medyczna  
Łódź

### 1. Wprowadzenie

Badania podstawowe nad procesami składającymi się na hemostazę bardzo często inicjowane są potrzebą wyjaśnienia mechanizmu powstałego zaburzenia homeostazy systemów krzepnięcia krwi i fibrynolizy oraz zapotrzebowaniem na nowe środki terapeutyczne, które przywróciłyby pierwotny stan tych systemów. Zakrzepy i zatory zakrzepowe w naczyniach krwionośnych serca i mózgu wstrzymujące przepływ krwi są bezpośrednią

---

\* Wykład wygłoszony podczas XXXI zjazdu Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, wrzesień 1995, Warszawa.

przyczyną większości zgonów w uprzemysłowionych krajach. Ze względu na tak wielkie zagrożenie, wiele firm farmaceutycznych inwestuje olbrzymie kwoty w celu opracowania swoistych leków antyzakrzepowych i trombolitycznych. Jest to oczywiście bardzo korzystna sytuacja dla laboratoriów naukowych i badaczy zajmujących się tą dziedziną oraz dla postępu badań.

W mojej prezentacji chciałbym naświetlić aktualne kierunki tych badań z dziedziny hemostazy, które bezpośrednio doprowadziły do zaproponowania nowych leków o naturze białkowej, peptydowej oraz oligonukleotydowej. We wstępnej części, przypomnę istotę procesów prowadzących do pojawienia się zakrzepu, scharakteryzuję mechanizmy regulujące i hamujące krzepnięcie krwi, a następnie na bazie tych podstawowych wiadomości omówię strategię zastosowaną w celu uzyskania czynników swoiście przyspieszających lub blokujących poszczególne fazy procesu krzepnięcia krwi.

Fizjologiczna funkcja systemów krzepnięcia krwi i fibrynolizy polega na zachowaniu sprawnej hemostazy, czyli hamowaniu krwawień po przerwaniu ciągłości naczyń krwionośnych. Odbywa się to dzięki harmonijnemu oddziaływaniu płytek krwi z elementami ściany naczyń krwionośnych oraz różnymi substancjami rozpuszczonymi we krwi. Homeostaza systemu krzepnięcia krwi utrzymywana jest dzięki licznym pętlom ujemnego i dodatniego sprzężenia zwrotnego, występującym na każdym etapie aktywacji osoczowych czynników krzepnięcia, aktywacji płytek krwi, a także ich oddziaływania z elementami ściany naczyń. W pewnych warunkach fizjologiczna funkcja tych procesów ulega wypaczeniu i ciągi reakcji, w których biorą udział składniki tych systemów, prowadzą do zakrzepic. Ich powstanie jest wynikiem lokalnej aktywacji krzepnięcia krwi zachodzącej w miejscu uszkodzenia ściany naczynia, mającego zwykle naturę miażdżycową. Uszkodzenie to może być również wywołane zabiegami mechanicznymi mającymi na celu rekanalizację naczyń, np. podczas terapii zawału serca polegającej na przezskórnej angioplastyce wieńcowej. Lokalnej aktywacji krzepnięcia krwi towarzyszy wówczas często restenoza, która prowadzi do zwężania światła naczynia krwionośnego i w końcu jego zamknięcia, w wyniku proliferacji komórek mięśnia gładkiego.

Obecnie wiadomo, że aktywacja procesu krzepnięcia krwi jest niezwykle złożonym i uporządkowanym ciągiem reakcji zachodzących na powierzchni płytek krwi i komórek śródbłonna, w których biorą udział nie tylko białka osocza krwi, ale również liczne receptory rozpoznające ligandy, tak wolne jak i związane z powierzchnią innych komórek. W tym systemie główną rolę pełni trombina, nie tylko jako enzym przyczyniający się do powstania włókniaka, lecz również jako czynnik, który z jednej strony przyspiesza kaskadę krzepnięcia krwi na drodze swoistej aktywacji różnych czynników osoczowych, a z drugiej uruchamia ciąg reakcji hamujących ten proces poprzez aktywację białka C. Trombina jest także jednym z najsilniejszych aktywatorów płytek krwi, uwalniając z nich wiele substancji biologicznie aktywnych oraz powodując ich nieodwracalną agregację. Wszystkie czynniki składające się na system krzepnięcia krwi zostały sklonowane, niektóre mają poznana również budowę przestrzenną cząsteczki. Mimo intensywnych, wieloletnich badań z zastosowaniem wszelkich możliwych metod daleko nam jeszcze jednak

do zrozumienia mechanizmu współdziałania wszystkich czynników uczestniczących w procesie krzepnięcia krwi. W dalszym ciągu nie w pełni poznany jest mechanizm tej pierwszej reakcji, inicjującej pojawienie się cząsteczek trombiny. Nie ulega wątpliwości, że w tej reakcji bierze udział czynnik tkankowy (TF, *tissue factor*), integralne białko błony komórkowej ściśle powiązane z fosfolipidami, które po uszkodzeniu ściany naczyniowej tworzy w obecności jonów Ca bardzo trwałe kompleks z cząsteczką czynnika VII. W nie uszkodzonym układzie krwionośnym czynnik tkankowy nie jest ekspozycyjny ani dostępny na powierzchni śródbłonna, ani komórek krwi. Komórki te, w szczególności monocyty mogą być pobudzone do syntezy i ekspresji czynnika tkankowego przez wiele czynników, między innymi przez cytokiny, endotoksynę i aktywny komponent C5a dopełniacza. W jaki sposób czynnik VII w kompleksie z czynnikiem tkankowym przechodzi w formę aktywną i staje się proteazą serynową zdolną do aktywacji czynnika VII obecnie nie wiadomo. Pojedyncze wiązanie peptydowe Arg152-Ile, które wówczas ulega hydrolizie, w warunkach *in vitro* rozszczepia trombina, czynnik VIII, IXa i Xa, a także inne proteazy komórkowe. Przypuszcza się, że ślady tych enzymów występujące w pobliżu kompleksu czynnika VII z czynnikiem tkankowym odpowiedzialne są za tę pierwszą reakcję. Tradycyjnie przyjmuje się, że proces krzepnięcia krwi może być inicjowany również w układzie wewnątrzpochnym, poprzez aktywację czynnika XI. Podobnie w tym przypadku nieznanym jest mechanizm zapłonowy i ostatnio przypuszcza się, że to raczej trombina niż składniki pętli kallikreiny (czynnik XII, prekallikreina, wysokocząsteczkowy kininogen) bierze udział w tym procesie.

Dodatkowym mechanizmem zapłonowym krzepnięcia krwi po uszkodzeniu ściany naczyń krwionośnych jest przyleganie płytek krwi do odsłoniętych w ten sposób włókien kolagenowych tkanki łącznej. Po związaniu się z kolagenem poprzez swoje receptory, płytki krwi zmieniają kształt, rozplaszczają się i ulegają aktywacji. Uwalniają też wiele substancji biologicznie aktywnych, wśród których ADP jako aktywator agregacji płytek oraz PDGF jako silny czynnik odpowiedzialny za proliferację komórek mięśnia gładkiego, są szczególnie istotne. Powstanie czopu hemostatycznego uwarunkowane jest obecnością swoistych receptorów płytkowych.

Płytki krwi zawierają kilka receptorów, swoiście reagujących z białkami adhezywnymi, takimi jak: fibrynogen, fibronektyna, witronektyna, czynnik von Willebranda, laminina, kolagen. Szczególne znaczenie w hemostazie mają receptory należące do integryn, tj. białek odpowiedzialnych za rozpoznawanie i przyleganie komórek do elementów matriksu zewnątrzkomórkowego oraz oddziaływanie komórek między sobą. Charakterystyczną cechą receptorów integrynowych jest to, że w wyniku aktywacji zmienia się odwracalnie ich powinowactwo wiązania cząsteczek ligandu. Reagują one wówczas z określonymi białkami obecnymi w matriksie zewnątrzkomórkowym, w błonie innych komórek, lub rozpuszczonymi w płynach ustrojowych. Dzięki temu, integryny umożliwiają swoistą adhezję komórek, ich agregację lub ukierunkowaną migrację.

Aktywacja receptorów płytkowego  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 wywołuje zmianę konformacyjną cząsteczki i pojawienie się miejsca wiążącego ligand białkowy, którym w oso-

czu krwi jest fibrynogen. W ten sposób następuje powiększanie się czopu, który zamyka uszkodzenie w ścianie. Na powierzchni płytek zachodzą również reakcje aktywacji osoczowych czynników krzepnięcia krwi prowadzące do powstania trombiny. Dzięki temu aktywacji ulegają następne płytki krwi, a fizjologiczny skrzep utworzony z agregatów płytkowych i złożeń włóknikowych powiększa swoją objętość. Taki niekontrolowany wzrost skrzepu może doprowadzić do zamknięcia światła naczynia krwionośnego, lub też po oderwaniu od ściany jako zakrzep może zatorować naczynia o mniejszej średnicy. Taki mechanizm powstawania zakrzepu jest dość typowy w naczyniach tętnicznych, których ściana uległa zmianom miażdżycowym. Pęknięcie płytki miażdżycowej powoduje odsłonięcie elementów tkanki łącznej znajdujących się pod śródbłonkiem i umożliwia ich kontakt z płytkami krwi.

## 2. Regulacja procesu krzepnięcia krwi

Warunkiem sprawnej hemostazy jest pełna autokontrola poszczególnych procesów składających się na krzepnięcie. Aby krew pozostawała płynna, aktywacja krzepnięcia, chroniąca organizm przed utratą krwi musi być ograniczona do okolicy uszkodzenia w ścianie naczyniowej. Stężenie protrombiny w osoczu ludzkim jest około 100-krotnie większe od tego, jakie potrzebne jest do bardzo szybkiego wykrzepienia całej objętości krwi. Mechanizmy kontrolujące krzepnięcie krwi w przestrzeni i czasie są zatem liczne i w zasadzie niezwykle sprawne.

W zdrowym organizmie skuteczność i sprawność hemostazy w znacznym stopniu wiąże się z tym, że: (a) poszczególne fazy tego procesu zachodzą dzięki utworzeniu na fosfolipidach dwuwarstwy lipidowej błon płytkowych połączeń typu *enzym-kofaktor-substrat*, w których to kompleksach kinetyka reakcji enzymatycznej ulega olbrzymiemu przyśpieszeniu, a ponadto czynniki, takie jak np. IXa i Xa nie są inaktywowane przez osoczowe inhibitory krzepnięcia; (b) w osoczu krwi występuje duża liczba endogennych inhibitorów, których lista stale rośnie. Czołowe miejsce wśród nich zajmuje antytrombina III (AT III) i tzw. drugi kofaktor heparyny (HC II). Antytrombina III wiąże i inaktywuje wszystkie wolne proteazy krzepnięcia krwi oprócz czynnika VIIa, przede wszystkim zaś Xa i trombinę. Trombinę hamuje także HC II, a działanie obu inhibitorów przyśpieszają znacznie sulfonowane glikozaminoglikany — heparyna i heparynoidy. Do listy naturalnych inhibitorów krzepnięcia dopisano ostatnio neksynę I oraz aneksynę V. Bardzo istotnym inhibitorem jest białko TFPI (ang. *tissue factor pathway inhibitor*), które w obecności czynnika Xa swoiście inaktywuje kompleks czynnika tkankowego z VIIa; (c) ważnym elementem hemostazy, ograniczającym aktywację krzepnięcia, jest naturalny układ antykoagulacyjny, którego działanie wyzwała generacja trombiny w krwiobiegu lub jej dożylnie podanie. Składnikami tego układu są trombomodulina — receptor dla trombiny na powierzchni komórek oraz dwa białka zależne od witaminy K — białko C i białko S. Trombina po przyłączeniu do trombomoduliny zmienia swoją specyficzność substratową, traci zdolność wykrzepiania fibrynogenu,

a także aktywacji czynników VIII, V, XIII oraz płytek krwi. Wzrasta natomiast tysiąckrotnie zdolność trombiny do aktywacji białka C, które następnie inaktywuje czynnik Va, VIIIa i inhibitor aktywatorów plazminogenu.

## 2.1. System fibrynolizy

Kolejny mechanizm przeciwdziałający nadmiernemu wykrzepianiu krwi w naczyniach krwionośnych jest powiązany z systemem fibrynolizy. W ogólnym zarysie, na aktywność fibrynolityczną krwi składa się oddziaływanie wielu białek, wśród których szczególną rolę odgrywają aktywatory plazminogenu i ich inhibitory. Wszystkie aktywatory możemy podzielić na dwie grupy, tj. (a) wewnętrzne, syntetyzowane w organizmie, takie jak: tkankowy aktywator plazminogenu, urokinaza oraz aktywator podobny do urokinazy i (b) zewnętrzne, pochodzenia bakteryjnego, które mogą pojawić się w organizmie po infekcji. Wśród nich najbardziej znane to streptokinaza i stafylokinaza. Konwersja plazminogenu do plazminy zachodzi w wyniku hydrolizy pojedynczego wiązania peptydowego Arg<sub>560</sub>-Val<sub>561</sub>, przy czym mechanizm tej reakcji jest różny w przypadku aktywatorów plazminogenu, wewnętrznych i zewnętrznych. W warunkach fizjologicznych, w momencie zapoczątkowania tworzenia zakrzepu uruchomione zostają równocześnie mechanizmy aktywujące oraz hamujące fibrynolizę. Bardzo ważną rolę w tym procesie odgrywa  $\alpha_2$ -antyplazmina, która jest głównym inhibitorem plazminy. Inhibitor ten wykazuje wysokie powinowactwo w stosunku do plazminy, a kompleks tych dwóch białek charakteryzuje się stałą dysocjacji —  $K_D = 2 \times 10^{-10}$  M.  $\alpha_2$ AP jest wiązany kowalencyjnie do włókniaka przez czynnik XIIIa, zagęszcza się w ten sposób w obrębie zakrzepu chroniąc go przed lizą. Równowaga między  $\alpha_2$ AP oraz plazminogenem, związanymi z włókniakiem uzewnętrznia się tym, że skrzepy otrzymane w obecności  $\alpha_2$ AP nie ulegają spontanicznej lizie. Szczególną pozycję wśród wielu inhibitorów hamujących aktywatory plazminogenu zajmuje inhibitor typu 1 (PAI-1). Neutralizuje on czynne cząsteczki tkankowego aktywatora plazminogenu i aktywatora typu urokinazowego. PAI-1 syntetyzowany jest głównie przez komórki śródbłonna, ale wykrywa się go także w innych komórkach. Wykazano *in vitro*, że podwyższoną ekspresję genu oraz wzrost stężenia białka PAI-1 uwalnianego z komórek śródbłonna wywołuje wiele różnych substancji biologicznie aktywnych. Podwyższony poziom inhibitora aktywatorów plazminogenu wiąże się zawsze z występowaniem u ludzi tendencji prozakrzepicowych.

W normalnym osoczu krwi składniki białkowe ochraniane są przed niekontrolowaną rozległą proteolizą na drodze kilku mechanizmów: (a) aktywatory plazminogenu występują w bardzo małych ilościach we krwi i ich uwalnianie, np. z komórek śródbłonna kontrolowane jest działaniem różnych czynników; (b) wszystkie enzymy proteolityczne systemu fibrynolitycznego inaktywowane są przez swoiste inhibitory. Stężenie molowe inhibitorów jest kilkukrotnie wyższe w osoczu krwi od stężenia proteaz serynowych systemu fibrynolitycznego; (c) plazminogen oraz t-PA swoście adsorbują się na powierzchni włókniaka i w ten sposób aktywacja plazminogenu do plazminy zachodzi głównie w ob-

rębie zakrzepu; (d) t-PA, który jest jedynym komponentem systemu fibrynolitycznego aktywnym także w formie jednołańcuchowej, w obecności niewielkich stężeń plazminy, kallikreiny lub czynnika Xa przechodzi w formę dwułańcuchową. Aktywność proteolityczna jedno- i dwułańcuchowej formy w stosunku do plazminogenu wzrasta od 200 do 400 razy w obecności włókniaka. Odbywa się to po utworzeniu trójskładnikowego kompleksu „plazminogen/włókniak/tkanekowy aktywator plazminogenu”. Szczególną rolę dla przyspieszenia aktywacji plazminogenu przez t-PA odgrywa sekwencja łańcucha  $\alpha$ 148-197 włókniaka, która jest ukryta w cząsteczce fibrynogenu i zostaje odsłonięta w monomerach włókniaka, (e) w wyniku hydrolizy plazminowej, na powierzchni zakrzepu pojawiają się reszty lizynowe, do których przyłącza się zwiększona liczba cząsteczek plazminogenu i t-PA. Po rozpuszczeniu zakrzepu przez plazminę, enzym ten natychmiast inaktywowany jest przez  $\alpha_2$ -antyplazminę; (f) w regulacji homeostazy systemu fibrynolitycznego szczególną rolę odgrywa inhibitor aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1). Neutralizuje on czynne cząsteczki tkankowego aktywatora plazminogenu i aktywatora typu urokinazowego.

## 2.2. Tarcze dla czynników farmakologicznych

Teoretycznie rozważając, po pojawieniu się zaburzenia homeostazy systemu krzepnięcia krwi i fibrynolizy, istnieje wiele możliwości terapeutycznej interwencji. Tarczą dla środków farmakologicznych mogą być: (a) końcowy zakrzep utworzony z włókniaka i agregatów płytkowych, (b) aktywne czynniki krzepnięcia krwi (np. trombina), (c) inhibitory systemu fibrynolizy (PAI-1), (d) składniki płytek krwi (receptory integrynowe, inne elementy niezbędne dla aktywacji płytek), (e) czynniki odpowiedzialne za restenozę. W tym celu zastosowanie znalazły białka rekombinowane, analogi peptydów, a także coraz to większe zainteresowanie wzbudzają oligonukleotydy antysensowe, które swoiście hamują syntezę określonych białek.

## 3. Czynniki trombolityczne

Z punktu widzenia historycznego najwcześniej zostały opublikowane prace nad rozpuszczeniem zakrzepu przez preparaty aktywatorów plazminogenu pochodzenia bakteryjnego. W 1933 r. Tilet z John Hopkins Medical School przypadkowo zaobserwował, że ekstrakty niektórych szczepów hemolitycznych streptokoków wywołują bardzo szybką lizę skrzepów. Preparaty te, zawierające tylko około 10% streptokinazy, nazwanej w ten sposób błędnie przez tych autorów aktywnej substancji, która nie jest enzymem jak wskazywałaby na to nazwa, po raz pierwszy zastosowane zostały w 1947 r. do rozpuszczenia hemothoraxu, który pojawił się po zabiegu operacyjnym u chorego na *cystic bronchiectasies*. Po znacznie lepszym doczyszczeniu preparatu streptokinazy, wprowadzono na rynek preparat Varidase, który Johnson i Tilet jako pierwsi w 1952 r. zastosowali z powodzeniem do rozpuszczania zakrzepu u królików. Rok później, Clifton wykazał, że ten sam efekt

można uzyskać po zastosowaniu preparatu plazminogenu, uprzednio zaktywowanego *in vitro* streptokinazą. Obserwacje te zapoczątkowały długotrwały spór dotyczący rodzaju czynnika trombolitycznego, który mógłby być stosowany w celach terapeutycznych, tj. czy ma to być plazmina czy też streptokinaza. Aby wykazać, który z nich byłby właściwy, w kilku laboratoriach związanych z firmami farmaceutycznymi udoskonalono metody oczyszczania tak streptokinazy, jak i plazminy. W końcu lat pięćdziesiątych pojawiły się preparaty ludzkiej plazminy — *actase* z Ortho i *thrombolysin* z Mercka. Okazało się, że plazmina nie jest dobrym czynnikiem trombolitycznym, obecnie wiadomo już, iż jest to spowodowane jej szybką inaktywacją przez  $\alpha_2$ -antyplazminę. Bardzo wcześnie natomiast zaobserwowano ścisłą korelację między stężeniem aktywatora we krwi i aktywnością trombolityczną. Rozpoczęły wówczas wyścig między firmami farmaceutycznymi, mający na celu uzyskanie pierwszeństwa we wprowadzeniu na rynek swoistego czynnika trombolitycznego był również bodźcem dla badaczy interesujących się podstawowymi aspektami hemostazy. Zaowocował wykryciem naturalnych aktywatorów plazminogenu, które występują w organizmie i opisaniem ich struktury oraz mechanizmu działania.

W związku z tym, że pierwsze preparaty streptokinazy zanieczyszczone były pirogenami, których nie udawało się wyeliminować, pojawił się drugi kierunek w badaniach nad czynnikami trombolitycznymi, głównie rozwijany w Stanach Zjednoczonych, tj. skupiono się nad wyizolowaniem bezpośredniego aktywatora plazminogenu, urokinazy. Urokinaza niepirogenna i nieimmunogenna pozbawiona była wad streptokinazy. Pierwsze preparaty urokinazy, nadające się do wstrzyknięcia zwierzęciu otrzymał w 1961 r. Guest z moczu ludzkiego. Metoda oczyszczania tego białka została następnie udoskonalona przez White w 1966 r. i zmodyfikowana przez Barlow w 1976 r., tak że nadawała się do izolowania urokinazy z komórek embrionalnych nerek. W odróżnieniu od sc<sub>t</sub>-PA, jednolącuchowa cząsteczka u-PA (scu-PA) nie ma aktywności proteolitycznej. Przechodzi w formę aktywną dopiero po hydrolizie wiązania Lys<sub>158</sub>-Ile<sub>159</sub> i przyjęciu postaci dwulącuchowej. Odbywa się to przy udziale czynników aktywowanych po adsorpcji na ujemnie naładowanej powierzchni, tj. czynnika XII i prekallikreiny, a także plazminy. W badaniach kinetycznych przeprowadzonych na oczyszczonych preparatach białek wykazano, że wydajność kinetyczna w stosunku do plazminogenu ( $K_{cat}/K_M$ ) scu-PA jest 16 – 100-krotnie niższa od tej, która charakterystyczna jest dla tcu-PA. Różni badacze podają wartości  $K_M$  dla scu-PA i tcu-PA w stosunku do plazminogenu w zakresie od 1,0 do 47  $\mu$ M. scu-PA wykazuje trochę większą selektywność działania w stosunku do włókniaka niż tcu-PA, ale do końca nie jest poznany mechanizm tego działania. W wyniku hydrolizy wiązania Lys<sub>135</sub>-Lys<sub>136</sub> w cząsteczce u-PA powstaje niskocząsteczkowa urokinaza. Już w latach sześćdziesiątych XX w. rozpoczęto próby kliniczne z urokinazą i streptokinazą, a w 1965 r. Fletcher i Alkjaersig wykazali, że urokinaza ma taką samą aktywność i skuteczność trombolityczną u ludzi.

Pierwsze informacje na temat tkankowego aktywatora plazminogenu można znaleźć w pracy Rijkena, opublikowanej w 1979 r., w której scharakte-

ryzowano aktywator otrzymany z komórek macicy. Dwa lata później, Rijken uzyskał tkankowy aktywator plazminogenu z komórek melanoma linii Bowes, które produkują wyłącznie ten typ aktywatora plazminogenu. Umożliwiło to otrzymanie przez Rijken w 1981 r. 2 g czystego tkankowego aktywatora plazminogenu, a tym samym ustalenie nie tylko budowy tego białka, ale także przeprowadzenie prób klinicznych na bardzo dużej grupie pacjentów, na podstawie których wykazano olbrzymią skuteczność tego białka po zastosowaniu w celach trombolitycznych. Częsteczką t-PA uwolniona do układu krążenia krwi, po syntezie w komórkach śródbłonna, zbudowana jest z jednego łańcucha polipeptydowego (sct-PA). Po hydrolizie wiązania Arg<sub>278</sub>-Ile<sub>279</sub> przechodzi w cząsteczkę zbudowaną z dwóch łańcuchów polipeptydowych powiązanych mostkiem disiarczkowym (tct-PA). Obie formy t-PA aktywują plazminogen bardzo efektywnie, tylko wówczas gdy są związane z powierzchnią skrzepu włóknikowego. Badania kinetyki aktywacji Glu-plazminogenu, którego stężenie w osoczu krwi wynosi 2  $\mu\text{M}$ , przez t-PA wykazały, że reakcja ta w obecności włóknika opisana jest stałą  $K_M$  niższą od 1  $\mu\text{M}$ , a w nieobecności włóknika  $K_M$  jest większa od 10  $\mu\text{M}$ . Wydajność katalityczna reakcji ( $K_{\text{cat}}/K_M$ ) wzrasta około 300-krotnie, wówczas gdy zachodzi na powierzchni włóknika. Oddziaływanie t-PA z włóknikiem odbywa się za pośrednictwem domeny typu „finger” i „kringle 2”. Przypuszcza się, że domena „finger” odpowiedzialna jest za wstępne wiązanie do włóknika, które następnie ulega wzmocnieniu dzięki oddziaływaniu domeny „kringle 2” z resztami lizyny włóknika.

Prawdziwe megapróby kliniczne wykonano już z rekombinowanymi aktywatorami plazminogenu łącznie na około 100 000 chorych, w których porównywano skuteczność działania trombolitycznego różnych aktywatorów podawanych w różny sposób chorym po zawale serca. Potwierdziły one wcześniejsze obserwacje sugerujące bezpośredni związek leczenia trombolitycznego z obniżeniem śmiertelności. Jednoznacznie udokumentowano to w badaniach angiograficznych wykazując rekanalizację naczyń po lokalnym wprowadzeniu aktywatorów plazminogenu w krótkim czasie po ostrym zawale serca.

### 3.1. Cechy nowych aktywatorów plazminogenu

W dotychczasowych próbach klinicznych z aktywatorami plazminogenu użytymi w celu trombolitycznym wykazano pewne niedoskonałości tych leków dlatego w dalszym ciągu poszukuje się nowych aktywatorów, które byłyby bardziej swoiste i nie naruszały hemostazy. Próbuje się uzyskać aktywatory, które miałyby większą skuteczność niż dotychczasowe, tj. powodowałyby rekanalizację u wszystkich, a nie tylko u 75% chorych. Nowe czynniki mają też być pozbawione tych cech, które powodują, że u 6-16% chorych leczonych trombolitycznie zachodzi reokluzja naczyń, a u 0,5% chorych krwawienia wewnątrzczaszkowe będące przyczyną zejść śmiertelnych.

W dalszym ciągu pracuje się nad tym, aby nowe czynniki miały podwyższone powinowactwo wiązania do włóknika i w ten sposób aktywowały plazminogen znajdujący się wyłącznie na powierzchni zakrzepu. Zdolność wiązania



z włóknikiem nie jest jednakże warunkiem specyficzności działania aktywatorów plazminogenu. Wiadomo, że preferencyjne rozpuszczanie zakrzepu bez hydrolizy fibrynogenu uzyskuje się również po użyciu stafylokinazy, która nie wiąże się z włóknikiem. W tym przypadku, swoistość działania kompleksu stafylokinaza — plazmina regulowana jest wrażliwością tego kompleksu w stanie rozpuszczonym na inaktywację przez  $\alpha_2$ -antyplazminę. Inaktywacja nie zachodzi, wówczas gdy kompleks utworzony jest na powierzchni włóknika co uzewnętrznia się specyficzną listą zakrzepu i natychmiastową inaktywacją kompleksu stafylokinaza — plazmina po jego uwolnieniu do osocza krwi. Podobny mechanizm prawdopodobnie odpowiedzialny jest za swoiste rozpuszczanie zakrzepu pod wpływem aktywatorów plazminogenu pochodzących ze śliny nietoperza. Wykryto tam 4 różne aktywatory plazminogenu wykazujące do 85% homologii w budowie cząsteczek z tkankowym aktywatorem plazminogenu, dwa wysokocząsteczkowe: DSP $\alpha$ 1 i DSP $\alpha$ 2 i dwa o niższej masie cząsteczkowej: DSP $\beta$  i DSP $\gamma$ . Wszystkie z nich powodują swoistą listę zakrzepu, ale tylko dwa pierwsze mają zdolność wiązania się z włóknikiem.

Kolejną cechą, którą próbuje się udoskonalić jest wydłużenie okresu półtrwania aktywatorów w układzie krążenia krwi. Aktywatory znikają w ciągu kilku minut z układu krążenia i w celu zwiększenia efektywności ich działania, pożądana jest ich dłuższa obecność we krwi po dożylniej iniekcji.

W ten sposób uzyskano już ponad sto różnych cząsteczek białkowych o właściwościach zbliżonych do tych, którymi charakteryzuje się tkankowy aktywator plazminogenu lub aktywator podobny do urokinazy. Otrzymano i przetestowano setki zmutowanych cząsteczek t-PA i u-PA, w których w wyniku mutacji punktowej usiłowano: zmienić wrażliwość na działanie enzymów aktywujących, obniżyć powinowactwo wiązania z receptorami komórkowymi, odpowiedzialnymi za eliminację aktywatorów z krążenia krwi, a także uzyskać odporność cząsteczek aktywatorów na inaktywację. Otrzymano też dziesiątki zmodyfikowanych cząsteczek, w których na drodze delekcji wyeliminowano obecność poszczególnych domen w dojrzałym białku i w ten sposób również zmieniono właściwości powstałych mutantów. Wprowadzane zmiany w strukturze cząsteczek białkowych polegały również na przyłączeniu do nich dodatkowych białek, które miały podwyższyć swoistość działania otrzymanego kompleksu. W tym celu zastosowano swoiste przeciwciała dla włóknika, które po wycięciu stałych regionów z mysiej cząsteczki IgG i wprowadzeniu w to miejsce ludzkich sekwencji aminokwasowych skoniugowano z t-PA oraz u-PA. Otrzymany produkt nie był immunogeny i w badaniach klinicznych wykazywał tylko nieznacznie ulepszone właściwości jako czynnik trombolityczny. Przetestowano również liczne hybrydy utworzone z poszczególnych domen t-PA i u-PA, a także chimery białkowe utworzone z plazminogenu, do którego dołączono poszczególne domeny u-PA i t-PA.

Wśród nowych aktywatorów plazminogenu, które nie są jeszcze zatwierdzone przez FDA, ale przeszły fazę badań klinicznych znajdują się m. in. reteplaza (nieglikozylowany fragment K2P z t-PA) oraz analog K1K2Pu zawierający reszty Ser1-Gln3 i Asp87-Phe274 z t-PA oraz Ser138-Leu411 z u-PA).

Lista nowych aktywatorów plazminogenu, które testowane są w celach trombolitycznych ciągle rośnie. Ostatnio duże nadzieje wiąże się ze stafylokinazą, która otrzymana została w postaci rekombinowanej, wykazuje ona swoistość działania w stosunku do zakrzepu, a także charakteryzuje się niskim kosztem produkcji i jest immunogenna. Prowadzone są badania nad identyfikacją regionów szczególnie immunogennych i ich inaktywacją.

Ze względu na to, że wszystkie do tej pory przebadane aktywatory plazminogenu powodują u znacznej części chorych reokluzję, prowadzone są obecnie badania nad opracowaniem czynnika, który zapobiegałby ponownemu powstawaniu zakrzepu.

## 4. Inhibitory agregacji płytek

Reokluzja spowodowana jest przez agregaty płytkowe powstałe pod wpływem trombiny, która uwolniona została do krwi, po rozpuszczeniu zakrzepu. Celem kolejnego kierunku badań w tej dziedzinie jest opracowanie swoistego leku zapobiegającego agregacji płytek krwi. W odróżnieniu od aspiryny czy tiklopidyny, które blokują agregację płytek wywołaną niektórymi tylko agonistami, lek taki powinien skutecznie przeciwdziałać agregacji płytek indukowanej wszystkimi agonistami, w tym również trombiną.

### 4.1. Udział receptorów integrynowych w funkcji płytek krwi

W końcowej fazie agregacji płytek krwi następuje przyłączenie cząsteczek fibrynogenu do aktywnych receptorów  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, które występują w dużej ilości na powierzchni płytek krwi. Receptory te nie tylko odpowiedzialne są za utworzenie końcowych agregatów, ale także biorą udział w adhezji aktywnych płytek krwi do niektórych elementów matriksu zewnątrzkomórkowego, takich jak czynnik von Willebranda czy też fibronektyna.

Receptor  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 zbudowany jest z dwóch podjednostek, które zmieniają konformację po aktywacji płytek krwi, tak że pojawia się miejsce wiążące ligand w postaci kieszeni. Zablokowanie tej kieszeni przez peptydy z sekwencją RGD, analogi peptydowe o budowie przestrzennej i ładunku takim samym jak RGD, krótkie peptydy pochodzące z jadu żmij zawierające sekwencję RGD, lub przez przeciwciała znosi zdolność wiązania fibrynogenu przez receptor. Szczególne zainteresowanie ze względu na przypuszczalne wykorzystanie farmakologiczne wzbudziły przeciwciała monoklonalne oraz substancje, które nie są peptydami, a zachowują właściwości RGD i blokują agregację płytek. Mechanizm blokowania agregacji w obu przypadkach jest ten sam i polega na wypełnieniu miejsc wiążących ligand w aktywnych cząsteczkach receptora przez inhibitory i uniemożliwieniu przyłączenia cząsteczki fibrynogenu do płytek krwi. Ze względu na to, że każdy z aktywatorów płytek krwi w końcowej fazie aktywacji prowadzi do tej reakcji, oba typy inhibitorów są swoiste dla płytek krwi i nie naruszają funkcji innych komórek. W badaniach klinicznych prowadzonych z przeciwciałem 7E3, które jest swoiste

dla aktywnego receptora fibrynogenu wykazano, że podanie tego przeciwciała chorym po wykonaniu angioplastyki wieńcowej w znacznym stopniu zapobiega restenozie. Przeciwciała to zostało „humanizowane” i w takiej postaci oczekuje zatwierdzenia przez FDA do terapeutycznego stosowania.

Cechą charakterystyczną tego receptora jest rozpoznawanie bardzo małej sekwencji utworzonej przez trzy reszty aminokwasowe Arg-Gly-Asp, które występują we wszystkich białkach wiążących się z tym receptorem. Sekwencja RGD znajduje się zwykle w strukturze  $\beta$  turn typu II i takie ułożenie przestrzenne jest warunkiem wiązania ligandu białkowego z receptorem. Motyw ten rozpoznawany jest również przez inne receptory integrynowe.

Na podstawie znanej budowy przestrzennej aktywnej postaci peptydów z sekwencją RGD zsyntetyzowano dziesiątki różnych analogów oraz związków symulujących właściwości strukturalne sekwencji RGD. Charakteryzują się one opornością na działanie enzymów oraz powinowactwem wiązania z receptorem fibrynogenu o kilka rzędów wielkości wyższym niż to typowe dla RGD. Substancje te wyprodukowane przez Mercka z serii MK lub przez La Roche serii Ro przeszły fazę badań klinicznych, przyczyniły się też do opracowania inhibitorów, które mogą być stosowane doustnie.

## 5. Kontrolowana ekspresja białek regulujących tworzenie i rozpuszczanie zakrzepu

Od kilku lat usiłuje się również modyfikować homeostazę układu krzepnięcia krwi i fibrylizy przez obniżenie ekspresji różnych białek regulujących tempo wykrzepiania lub fibrylizy. Ze względu na tak istotną funkcję dla regulacji aktywności fibrynolitycznej krwi jaką pełni inhibitor aktywatorów plazminogenu PAI-1, białko to było jedną z pierwszych tarcz takich zabiegów, w których wykorzystywano swoiste oligonukleotydy antysensowe. Takie podejście prawie równocześnie opisane zostało przez nasz zespół oraz grupę prof. W.J. Steca z Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi.

Inhibitor PAI-1 ma kilka właściwości predestynujących go do roli, którą pełni podczas fibrylizy: (a) normalnie występuje w bardzo niewielkich ilościach we krwi, ale pod wpływem wielu substancji następuje znaczne podwyższenie ekspresji tego białka; (b) PAI-1 występuje we krwi w kilku postaciach. Bezpośrednio po uwolnieniu cząsteczka PAI-1 jest aktywnym inhibitorem aktywatorów plazminogenu i charakteryzuje się bardzo niestabilną termodynamicznie strukturą. Tylko w tej formie może tworzyć nieodwracalnie kompleksy z aktywatorami plazminogenu i tym samym je inaktywować. Dysocjacja takich kompleksów jest możliwa jedynie w warunkach denaturujących, np. w roztworach detergentów lub mocznika i guanidyny. Po dysocjacji kompleksu, cząsteczka PAI-1 ma zwykle rozszczerzone wiązanie peptydowe w centrum reaktywnym, jest pozbawiona aktywności i przyjmuje najbardziej stabilną termodynamicznie konformację. Hydroliza pojedynczego wiązania

w obrębie centrum reaktywnego zachodzi także w obecności trombiny i białka C. Cząsteczki PAI-1 po syntezie jeśli pozostają w komórce to występują w formie aktywnej. Oprócz proteaz, PAI-1 wiąże się również z włóknikiem, heparyną i witronektyną. Ponad 90% nowo syntetyzowanych cząsteczek uwolnionych zostaje na zewnątrz i jeśli nie napotkają aktywatorów plazminogenu, witronektyny lub określonych składników zewnątrzkomórkowego matriksu, w bardzo krótkim czasie przechodzą w formę utajoną, która jest bardziej stabilna od formy aktywnej, ale mniej od cząsteczki z rozszczepionym wiązaniem peptydowym Arg<sub>346</sub>-Met<sub>347</sub>. Kompleksy PAI-1 z witronektyną łatwo dysocjują w obecności aktywatorów plazminogenu i uwolniony PAI-1 natychmiast inaktywuje aktywatory plazminogenu. Wiadomo również, że witronektyna stabilizuje aktywność PAI-1 oraz zmienia specyficzność działania. Tylko w kompleksie z witronektyną może inaktywować trombinę i jego reaktywność w stosunku do trombiny wzrasta około 200-krotnie. Forma utajona PAI-1 może być reaktywowana w obecności detergentów, a także po adsorpcji na ujemnie naładowanych powierzchniach, np. pecherzyków fosfolipidowych.

W naszych badaniach wykorzystaliśmy całą serię oligonukleotydów antysensowych, reagujących z m-RNA PAI-1, wśród których wykryliśmy fragment szczególnie aktywny w hamowaniu syntezy i uwalnianiu PAI-1 z komórek śródbłonna ludzkiego. Poddawane one były następnie najróżniejszym modyfikacjom chemicznym, tak aby zwiększyć ich odporność na działanie nukleaz oraz ulepszyć transport przez błonę komórkową. W ten sposób uzyskaliśmy analog oligonukleotydu, który był aktywny nie tylko w hodowli komórek śródbłonna, ale także *in vivo* po iniekcji dożylniej szczurom.

### **Current trends in biotechnology of drugs applied in cardiovascular diseases — recombinant proteins, peptide analogues and antisense oligonucleotides**

#### **Summary**

This lecture consists of three parts, the first one gives a summary of mechanisms regulating hemostasis and fibrinolysis, the second — discusses potential target molecules for therapeutic intervention, and the third one describes recent studies on selective inhibition of certain pathophysiological processes by molecules designed to prevent cardiovascular problems. Thus, a critical review of current trends in biotechnology of drugs which recently have been designed and tested to improve survival of patients with different cardiovascular diseases is provided.

#### **Key words:**

cardiovascular diseases, hemostatis, fibrynolysis.

#### *Adres do korespondencji:*

Czesław Cierniewski, Zakład Biofizyki, Akademia Medyczna, ul. Lindleya 3, 90-131 Łódź.