

Rekombinowane pochodne stafylokinazy – czy będą idealnymi lekami trombolitycznymi?

Recombinant staphylokinase derivatives – ideal thrombolytic agents?

Adrian Stankiewicz¹, Janusz Szemraj², Anna Gromotowicz¹, Marzena Wojewódzka-Żeleznakowicz³, Renata Tarnowska¹, Jerzy R. Ładny³, Ewa Chabielska¹

¹ Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny, Białystok

² Zakład Biochemii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny, Łódź

³ Zakład Medycyny Ratunkowej i Katastrof, Uniwersytet Medyczny, Białystok

Streszczenie

Choroby o etiologii zakrzepowo-zatorowej (zawał serca, niedokrwienny udar mózgu, żylna choroba zakrzepowo-zatorowa i związany z nią zator tętnicy płucnej) są najczęstszą przyczyną zgonów i inwalidztwa ludzi w najbardziej twórczym okresie ich życia. Uzasadnia to wielokierunkowość badań mających na celu tworzenie bardziej skutecznych i bezpiecznych leków trombolitycznych. Unikalne cechy rekombinowanej stafylokinazy (r-SAK) stały się powodem, dla których r-SAK postrzegana jest jako obiecujący lek trombolityczny. Celem pracy jest przedstawienie właściwości r-SAK i jej rekombinowanych pochodnych, a także potencjalnego zastosowania w leczeniu zawału mięśnia sercowego oraz innych chorób o etiologii zakrzepowo-zatorowej.

Słowa kluczowe: stafylokinaza, zawał serca, tromboliza, białka hybrydowe

Abstract

Cardiovascular diseases, such as an acute myocardial infarction, a stroke and a venous thromboembolism, are the major causes of death or disability in the adult population. The immediate underlying etiology in these conditions is often a thrombotic obstruction of critically situated blood vessels, causing a loss of blood flow to vital organs. Acute thromboembolic disease may be treated by the administration of thrombolytic agents that activate the conversion of plasminogen to plasmin-serine protease that hydrolyzes fibrin and, thus, dissolves thrombus. Elucidation of the molecular mechanism of physiological fibrinolysis has opened up a new era of fibrin-specific thrombolysis. This review will focus on the properties of recombinant staphylokinase (r-SAK) and its derivatives, which would make use of treatment in acute myocardial infarction and other thromboembolic diseases.

Key words: staphylokinase, myocardial infarction, thrombolysis, hybrid proteins

Kardiologia Polska 2009; 67 (supl. 6): 455–462

Wprowadzenie

W ciągu ostatnich 20 lat doszło do zasadniczych zmian w strategii postępowania z chorymi z zawałem mięśnia sercowego, począwszy od leczenia zachowawczego na oddziale intensywnej opieki kardiologicznej, przez stopniowe wdrażanie kolejnych generacji leków trombolitycznych, do coraz szerszego stosowania przezskórnych interwencji wieńcowych. Obecnie w leczeniu ostrego zawału mięśnia sercowego z uniesieniem odcinka ST (STEMI) zalecana jest przezskórna wewnątrznacyniowa angioplastyka wieńco-

wa (PTCA) [1]. W sytuacji, gdy niemożliwe jest wdrożenie PTCA, znaczenia nabiera farmakologiczne leczenie trombolityczne. Celem trombolizy jest szybkie przywrócenie przepływu objętościowego krwi w naczyniu przez aktywację układu fibrynolitycznego oraz zapobieganie wczesnej i opóźnionej reokluzji. Niezależnie od podanego leku trombolitycznego, prawidłowy przepływ wieńcowy (TIMI 3) w ciągu pierwszych godzin leczenia utrzymuje się tylko u 50–70% pacjentów i u 51–58% pacjentów 5.–7. dnia od rozpoczęcia leczenia [2].

Adres do korespondencji:

dr n. med. Adrian Stankiewicz, Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Uniwersytet Medyczny, ul. Mickiewicza 2C, 15-089 Białystok, tel.: +48 85 748 56 07, +48 85 748 56 06, e-mail: stankiewiczad@wp.pl

Poza niezadowalającym efektem trombolitycznym stosowanych obecnie leków (Tabela I) niepełny sukces farmakologicznej trombolizy związany jest także z uruchomieniem szeregu reakcji prozakrzepowych w trakcie lizy zakrzepu (Tabela II). Paradoksalnie, również leki stosowane w terapii trombolitycznej działają prokoagulacyjnie, ograniczając efektywną trombolizę oraz prowokując reokluzję naczyń [2] (Tabela II). Jest zatem oczywiste, że tylko szybkie i wielokierunkowe działania mogą ograniczać prozakrzepowe procesy uaktywniania w trakcie farmakologicznego udrażnienia naczynia. Współczesna terapia trombolityczna STEMI polega zatem na łącznym stosowa-

niu leków trombolitycznych (streptokinaza – SK, alteplaza – rt-PA, reteplaza – r-PA, tenekteplaza – TNK-tPA), przeciwplatek (kwas acetylosalicylowy, klopidogrel) i anty-trombinowych (heparyna niefrakcjonowana, heparyny drobnocząsteczkowe, biwalirudyna) [1]. Ten schemat postępowania, poprzez wpływ na różne mechanizmy krzepnięcia i fibrylizy, prowadzi do zwiększenia ryzyka krwawień, w tym zagrażających życiu pacjenta krwawień śródczaszkowych [5]. Ograniczenia terapii trombolitycznej uzasadniają więc konieczność badań mających na celu syntezę bardziej skutecznych i bezpiecznych leków trombolitycznych.

Tabela I. Wybrane właściwości leków trombolitycznych rekomendowanych przez Europejskie Towarzystwo Kardiologiczne w leczeniu ostrego zawału serca z utrzymującym się uniesieniem odcinka ST (*) oraz rekombinowanej stafylokinazy i pegylowanej stafylokinazy

	Swoistość względem fibryny	Immunogenność	T _{0,5} [min]	Dawkowanie	TIMI 3 [%] 45–90 min	Udar krwotoczny [%]	Poważne krwawienia pozaczaszkowe [%]
SK*	–	+	18–23	infuzja	10–41	0,1–0,6	0,3–4,8
rt-PA*	++	–	4–8	bolus + infuzja	46–75	0,6–0,9	0,6–5,9
r-PA*	+	–	11–14	bolus + bolus	60–63	0,8–0,9	4,6
TNK-tPA*	+++	–	11–20	bolus	63	0,9	2,2–5,2
r-SAK	++++	+	3–6	bolus + bolus	58–74	0,8	4,9 ^Δ
PEG-SAK	++++	–	13 ± 1,5	bolus	41–78	1,3 [^]	3,2 [^]

SK – streptokinaza, rt-PA – alteplaza, r-PA – reteplaza, TNK-tPA – tenekteplaza, r-SAK – rekombinowana stafylokinaza, PEG-SAK – pegylowana stafylokinaza, T_{0,5} – biologiczny okres półtrwania, TIMI 3 – prawidłowy przepływ wieńcowy, ^Δ badanie CAPTORS [3], [^] badanie CAPTORS II [4]

Tabela II. Efekty prozakrzepowe w trakcie leczenia trombolitycznego [2]

Czynnik	Miejsce działania	Efekt
Plazmina	płytki krwi	agregacja
	śródbłonek	proteoliza miejsc kontaktu komórka-komórka, retrakcja komórek, ekspozycja trombogenicznej warstwy podśródbłonkowej
	receptor śródbłonkowy	hamowanie produkcji t-PA
Trombina	płytki krwi	agregacja
	fibrynogen	powstawanie fibryny
	aktywacja czynnika XIII	stabilizacja fibryny
	inhibitor fibrylizy aktywowany trombiną	upośledzone wiązanie plazminogenu i t-PA z fibryną
Powierzchnia płytek krwi	aktywacja osoczowych czynników krzepnięcia	synteza trombiny
Płytki krwi	uwalnianie PAI-1 z płytek krwi	hamowanie aktywatorów plazminogenu
Uszkodzenie śródbłonna	płytki krwi	adhezja i aktywacja płytek krwi
t-PA	płytki krwi	zmiany morfologii płytek, zwiększenie adhezji płytek krwi
Heparyna	płytki krwi	uwalnianie mikroplatek, interakcja z płytkami krwi, leukocytami i ścianą naczynia
	monocyty	stymulowanie syntezy czynnika tkankowego

t-PA – tkankowy aktywator plazminogenu, PAI-1 – inhibitor aktywatorów plazminogenu typu pierwszego

W 1999 r. Van de Werf w pracy pt.: *The ideal fibrinolytic: can drug design improve clinical results?* [6] zdefiniował cechy, którymi powinien charakteryzować się trombolityk przyszłości:

- szybkie przywracanie drożności naczyń,
- u 100% pacjentów przepływ TIMI 3,
- możliwość podania w bolusie,
- swoistość względem fibryny,
- niskie ryzyko krwawień pozaczaszkowych,
- niskie ryzyko krwawień śródczaszkowych,
- oporność na inhibitory aktywatorów plazminogenu,
- niskie ryzyko reokluzji,
- brak wpływu na ciśnienie tętnicze,
- brak immunogenności,
- przystępna cena.

Miniona dekada przyniosła rejestrację r-PA w 1999 r. i TNK-tPA w 2000 r. ze wskazaniem w leczeniu STEMI. Leki te jednak w dalszym ciągu nie spełniają kryteriów idealnego leku trombolitycznego. Preparatem, który budzi obecnie szczególne zainteresowanie farmakologów i klinicystów, jest r-SAK oraz jej pochodne będące genetycznymi i/lub chemicznymi modyfikacjami cząsteczki r-SAK.

Rekombinowana stafylokinaza

stafylokinaza (SAK) jest białkiem pochodzenia bakteryjnego, obecnie otrzymywanym metodami inżynierii genetycznej (r-SAK). Właściwości trombolityczne SAK zostały opisane już w 1948 r. Pierwsze próby oceny działania trombolitycznego SAK przeprowadzono na psach. Model badawczy był chybiony, bowiem układ fibrynolityczny tych zwierząt jest szczególnie podatny na działanie SAK, obserwowano więc poważne powikłania krwotoczne [7]. Wyniki te na wiele lat ograniczyły zainteresowanie SAK. Punktem zwrotnym stały się badania z roku 1990 z użyciem osocza człowieka [8]. W dalszych badaniach laboratoryjnych i klinicznych udowodniono silne i swoiste względem fibryny działanie r-SAK. Rekombinowana stafylokinaza ma najwyższą wśród stosowanych obecnie leków trombolitycznych swoistość względem fibryny (zakrzepu) (Tabela I). Drugą ważną zaletą r-SAK jest oporność na działanie inhibitorów aktywatorów plazminogenu (PAI). Niestety, po jej podaniu, podobnie jak po streptokinazie, dochodzi do powstania przeciwciał anty-SAK, które ją neutralizują przy kolejnym podaniu [9, 10]. Przeciwciała anty-SAK pojawiają się w organizmie człowieka ok. 14. dnia od jej podania i utrzymują się przez 18 miesięcy, co obniża efektywność trombolityczną r-SAK przy jej powtórnym zastosowaniu. Odpowiedź organizmu na r-SAK związana jest również z pamięcią immunologiczną po wcześniej przebytych infekcjach gronkowcowych. Należy podkreślić, iż immunogenność r-SAK jest 10-krotnie niższa w porównaniu ze streptokinazą [11].

Unikalny mechanizm działania stafylokinazy

Mechanizm aktywacji plazminogenu przez r-SAK jest odmienny od mechanizmu działania rt-PA, który będąc en-

zymem proteolitycznym, rozszczepia cząsteczki plazminogenu do plazminy. Aktywacja plazminogenu przez r-SAK przebiega pośrednio. Rekombinowana stafylokinaza, która nie jest enzymem proteolitycznym, tworzy z plazminogenem osoczkowym nieaktywny kompleks r-SAK-plazminogen, z plazminą zaś aktywny kompleks r-SAK-plazmina. Kompleks r-SAK-plazmina aktywuje plazminogen zarówno związany z r-SAK, jak też wolny. Plazmina kompleksu r-SAK-plazmina wiąże się z wplecioną w zakrzep fibrynę za pośrednictwem miejsc wiążących lizynę. Poprzez te same miejsca alfa2-antyplazmina (α 2-AP) unieczynnia plazminę. Oznacza to, iż fibryna ochrania plazminę kompleksu r-SAK-plazmina przed jej degradacją, czyniąc miejsca wiążące lizynę niedostępnymi dla α 2-AP. Należy podkreślić, iż wolna r-SAK nie łączy się bezpośrednio z fibryną i nie jest inaktywowana przez α 2-AP oraz PAL. Niezwiązany z fibryną kompleks r-SAK-plazmina jest szybko degradowany przez α 2-AP. Rekombinowana stafylokinaza uwolniona z kompleksu r-SAK-plazmina zachowuje swą aktywność i może powtórnie łączyć się z plazminą. Tak więc obecność silnego aktywatora plazminogenu – kompleksu r-SAK-plazmina, wyłącznie w obecności fibryny, i szybka inaktywacja przez α 2-AP kompleksu krążącego w osoczu są podstawą unikalnego, wysoce swoistego względem fibryny działania r-SAK [8].

Badania kliniczne z zastosowaniem rekombinowanej stafylokinazy

W 1993 r. miały miejsce pierwsze próby wykorzystania r-SAK (1 mg podany w 2-minutowym bolusie, a następnie 9 mg w 30-minutowym wlewie) u pacjentów ze STEMI [9]. Collen i wsp. potwierdzili angiograficznie reperfuzję w 40 min od rozpoczęcia infuzji u 4 spośród 5 leczonych chorych. Ocena angiograficzna po 20–28 godz. wykazała reokluzję tylko u jednego pacjenta. Obserwowano znamienne, progresywne wzrost stężenia D-dimerów potwierdzający rozpad stabilizowanej fibryny. Udrożnieniu naczyń nie towarzyszyła systemowa aktywacja układu fibrynolitycznego, o czym świadczyły niezmienione stężenia fibrynogenu (90–95% wartości wyjściowej) i α 2-AP. Nie wystąpiła reakcja alergiczna, natomiast po 14–35 dniach pojawiły się przeciwciała anty-SAK. Dwa lata później w badaniu STAR porównano skuteczność r-SAK vs rt-PA w grupie 100 pacjentów ze STEMI. W 90. min od rozpoczęcia leczenia przepływ TIMI 3 wykazano u 50% chorych, którzy otrzymali r-SAK w dawce 10 mg (1 mg 2-minutowy bolus plus 9 mg 30-minutowa infuzja), u 74% po podaniu r-SAK w dawce 20 mg (2 mg 2-minutowy bolus plus 18 mg 30-minutowa infuzja) i u 58% po podaniu rt-PA w przyspieszonym schemacie dawkowania (15 mg bolus plus 0,75 mg/kg 30-minutowa infuzja plus 0,5 mg/kg 60-minutowa infuzja). Po 24 godz. przepływ TIMI 3 utrzymywał się odpowiednio u 80, 74 i 62% pacjentów. Stężenie fibrynogenu po r-SAK nie zmieniło się, natomiast w grupie otrzymującej rt-PA obniżyło się do $68 \pm 42\%$ wartości początkowej. Wynik ten potwierdził wyższą swoistość r-SAK względem fibryny [12]. Badanie STAR wykazało porównywalną sku-

teczność trombolityczną obu leków. W badaniu CAPTORS z 2000 r. (82 pacjentów ze STEMI) oceniono efekt trombolityczny r-SAK w zależności od dawki podanej w bolusie stanowiącym 20% całej dawki; pozostałą część leku podano w 30-minutowej infuzji [3]. Przepływ TIMI 3 w 90. min od podania r-SAK w dawkach 15, 30 i 45 mg obserwowano odpowiednio u 62, 65 i 63% chorych. Zatem badanie to wykazało podobną skuteczność trombolityczną r-SAK w zakresie dawek 15–45 mg. Nie obserwowano krwawień śródczaszkowych, ale u 4 pacjentów obserwowano poważne krwawienia pozaczaszkowe, a u 9 umiarkowane krwawienia pozaczaszkowe. Analiza powyższych badań wskazuje, iż r-SAK podana w 30-minutowej infuzji poprzedzonej początkowym bolusem w zakresie dawek 10–45 mg wykazuje wysoką skuteczność trombolityczną (przepływ TIMI 3 w zakresie 50–80%) u pacjentów ze STEMI.

Równolegle prowadzono badania nad wyznaczeniem optymalnej dawki r-SAK podanej tylko w bolusie. W badaniu pilotażowym z 1996 r. chorzy ze STEMI otrzymali r-SAK w dawce 20 mg w 5-minutowym bolusie. Przepływ TIMI 3 w 60. min uzyskano u 58% pacjentów [13]. Brak zadowalającego wyniku stał się powodem rozpoczęcia kolejnego badania, w którym r-SAK podano w podwójnym bolusie w dawce 2 × 15 mg (15 mg 5-minutowy bolus, drugi podany po 30 min) i porównano z rt-PA podaną wg przyspieszonego schematu dawkowania. Przepływ TIMI 3 w 90. min obserwowano u 68% pacjentów leczonych r-SAK i u 57% leczonych rt-PA [10]. Po 24 godz. od rozpoczęcia leczenia przepływ TIMI 3 utrzymywał się u wszystkich pacjentów leczonych r-SAK i u 79% leczonych rt-PA. Te dwa badania dowodzą, iż r-SAK podana w bolusie wykazuje wysoką skuteczność trombolityczną.

Modyfikacja cząsteczki rekombinowanej stafylokinazy

Najwyższa swoistość względem fibryny spośród stosowanych obecnie trombolityków, oporność na działanie PAI i wysoka skuteczność trombolityczna u pacjentów ze STEMI – to główne powody, dla których r-SAK postrzegana jest jako obiecujący lek trombolityczny. Rozpoczęte w pierwszej połowie lat 90. badania nad modyfikacjami cząsteczki r-SAK obejmują cztery główne kierunki, mające na celu poprawę jej właściwości farmakokinetycznych i farmakodynamicznych.

1. Redukcja immunogenności rekombinowanej stafylokinazy

Zidentyfikowanie immunogennych obszarów w cząsteczce r-SAK [14] i wprowadzenie mutacji punktowych w tych obszarach pozwoliło na uzyskanie cząsteczek o zmniejszonej immunogenności. Niestety, pierwsze pochodne r-SAK (SakSTAR.M38 i SakSTAR.M89), które w badaniach *in vitro* wykazały mniejszą immunogenność w porównaniu z r-SAK [15], charakteryzowały się słabszą aktywnością trombolityczną w modelach eksperymentalnej trombolizy u zwierząt [16]. Zamieniając kolejne aminokwasy w immunogennym regionie r-SAK, otrzymano mutanty o zmniejszonej immunogenności i aktywności trombolitycznej porównywalnej z r-SAK [17]. W roku 1996 przeprowadzono pierwsze próby kliniczne tych cząsteczek w grupie pacjentów z zakrzepicą tętnic obwodowych. Potwierdzono zmniejszoną immunogenność pochodnych r-SAK [SakSTAR.M38, SakSTAR.M89, SakSTAR(K74) i SakSTAR(K74ER)] przy jednocześnie wysokiej skuteczności trombolitycznej (Tabela III).

Tabela III. Rekombinowane pochodne stafylokinazy o zmniejszonej immunogenności – badania chorych z zakrzepicą tętnic obwodowych

Rekombinowana pochodna SAK	Modyfikacja cząsteczki r-SAK	Efekt
SakSTAR.M38 [16]	mutacje punktowe	<ul style="list-style-type: none"> • zmniejszenie immunogenności vs r-SAK • całkowita rekanalizacja u 75% pacjentów vs 86% r-SAK • brak powikłań krwotocznych • brak zmian stężenia fibrynogenu, plazminogenu, α2-AP
SakSTAR.M89 [16]	mutacje punktowe	<ul style="list-style-type: none"> • zmniejszenie immunogenności vs r-SAK • całkowita rekanalizacja u 100% pacjentów vs 86% r-SAK • brak powikłań krwotocznych • brak zmian stężenia fibrynogenu, plazminogenu, α2-AP
SakSTAR(K74) [18]	mutacje punktowe	<ul style="list-style-type: none"> • zmniejszenie immunogenności vs r-SAK • całkowita rekanalizacja u 75% pacjentów vs 100% r-SAK • brak powikłań krwotocznych • brak zmian stężenia fibrynogenu, plazminogenu, α2-AP
SakSTAR(K74ER) [18]	mutacje punktowe	<ul style="list-style-type: none"> • zmniejszenie immunogenności vs r-SAK • całkowita rekanalizacja u 100% pacjentów vs 100% r-SAK • brak powikłań krwotocznych • brak zmian stężenia fibrynogenu, plazminogenu, α2-AP
SY15, SY19, SY46, SY118, SY141, SY45, SY151, SY155 [19]	mutacje punktowe	<ul style="list-style-type: none"> • zmniejszenie immunogenności vs r-SAK

r-SAK – rekombinowana stafylokinaza, α 2-AP – alfa2-antyplazmina

2. Wydłużenie okresu półtrwania rekombinowanej stafylokinazy

Okres półtrwania r-SAK jest krótki i u ludzi wynosi 3–6 min [9, 20]. Wydłużenie okresu półtrwania r-SAK ma kluczowe znaczenie z uwagi na możliwość modyfikacji drogi jej podania (zmiana schematu dawkowania na szybki, pojedynczy bolus). Próby wydłużenia okresu półtrwania polegały na połączeniu r-SAK z glikolem polietylenowym (PEG). Pegylowana stafylokinaza (PEG-SAK) ma większą masę cząsteczkową, zmniejszony klirens osoczowy i wydłużony okres półtrwania. W 2000 r. opisano wstępne wyniki leczenia PEG-SAK (SY161-P5) podanej w jednorazowym bolusie (5 mg) pacjentom ze STEMI. Okres półtrwania tego białka wynosił $13 \pm 1,5$ min, a dodatkowa mutacja punktowa zmniejszyła immunogenność. W 60. min od rozpoczęcia leczenia przepływ TIMI 3 obserwowano u 78% pacjentów [20]. Korzystne wnioski płynące z tego badania (możliwość podania w jednorazowym bolusie, wydłużenie okresu półtrwania, wysoki przepływ TIMI 3 przy zredukowanej dawce, brak powikłań hemodynamicznych i reakcji alergicznej, brak zmian stężenia fibrynogenu, plazminogenu i α 2-AP) zachęciły do dalszego stosowania PEG-SAK w badaniach klinicznych. W badaniu CAPTORS II ustalano dawki PEG-SAK o skuteczności trombolitycznej porównywalnej z rt-PA podaną w 90-minutowym przyspieszonym schemacie dawkowania [4]. W celu zwiększenia bezpieczeństwa stosowania PEG-SAK w badaniu tym po raz pierwszy pochodna r-SAK została podana w przeliczeniu na kg masy ciała (m.c.) w dawkach 0,01–0,15 mg/kg m.c. w pojedynczym bolusie. Wykazano, iż PEG-SAK w dawce 0,05 mg/kg m.c. jest równie skuteczna jak rt-PA (przepływ TIMI 3 – 41%). Początkowo badanie zostało wstrzymane, gdyż u 3 z 27 pacjentów otrzymujących PEG-SAK wystąpił krwotok śródczaszkowy (u 2 chorych po dawce 0,05 mg/kg m.c., u jednego po dawce 0,15 mg/kg m.c.). Autorzy badania wiążą te krwawienia z podaniem heparyny i klopido-grelu w związku z wykonanym zabiegiem PTCA. Badanie kontynuowano bez dwóch najwyższych dawek PEG-SAK (0,1 i 0,15 mg/kg m.c.). Całościowa analiza ryzyka krwawień z badania CAPTORS II wykazała, że PEG-SAK w dawkach 0,01–0,15 mg/kg m.c. powodowała 1,3% krwawień śródczaszkowych i 3,2% poważnych krwawień pozaczaszkowych, a u pacjentów leczonych rt-PA zaobserwowano 0,8% krwawień śródczaszkowych i 4,9% poważnych krwawień pozaczaszkowych.

Planowane jest przeprowadzenie badania CAPTORS III w celu ustalenia bezpieczeństwa stosowania PEG-SAK u pacjentów ze STEMI.

3. Zmniejszenie ryzyka krwawień

Podanie r-SAK i jej pegylowanych pochodnych, tak jak w przypadku wszystkich trombolityków, wiąże się z ryzykiem powikłań krwotocznych, których podstawową przyczyną są stosowane wspomagające leki przeciwplatekcyjne i przeciwzakrzepowe. Próby ograniczenia krwawień, poza

doborem dawki trombolityku na kg m.c., sprowadzają się do dalszego zwiększenia swoistości r-SAK i siły jej działania trombolitycznego. To w konsekwencji powinno doprowadzić do zmniejszenia dawki. W tym celu wprowadza się do cząsteczki r-SAK domeny typu *kringle* (K1 lub K2) rt-PA lub plazminogenu. Cechą tych domen jest zdolność bezpośredniego łączenia się z fibryną (zakrzepem). Badania *in vitro* dowiodły, iż pochodne r-SAK wzbogacone w domeny typu *kringle* charakteryzują się większym niż r-SAK powinowactwem i siłą wiązania z fibryną (Tabela IV). Także w badaniach eksperymentalnych w modelach zwierzęcych te pochodne r-SAK działały silniej trombolitycznie niż r-SAK (Tabela V).

4. Eliminacja efektu prokoagulacyjnego

Kolejny ważny cel modyfikacji cząsteczki r-SAK to wyposażenie jej w cechy umożliwiające zapobieganie reokluzji naczyń. W tym celu konstruowane są wielofunkcyjne rekombinowane białka (hybrydy), które powstają w wyniku połączenia ze sobą minimum 2 cząsteczek leków lub ich fragmentów. W skład takich hybryd wchodzi: r-SAK, bezpośrednie inhibitory trombiny (dipetalina, hirudyna, hirulog) i/lub związki przeciwplatekcyjne (aneksyna XI – białko przeciwplatekcyjne wiążące fosfolipidy błonowe płytek krwi), trójaminokwasowe sekwencje przeciwplatekcyjne RGD (Arg-Gly-Asp) i DGR (Asp-Gly-Arg) antagoniści receptora GP IIb/IIIa (Tabela IV i V).

Jak wykazują badania własne oraz innych autorów, takie hybrydy zmniejszają ryzyko reokluzji naczyń w modelach eksperymentalnej zakrzepicy oraz wykazują aktywność fibrynolityczną, antytrombinową i przeciwplatekową *in vitro* i *in vivo* w eksperymentalnych modelach zwierzęcych [24, 26, 30, 32] (Tabela IV i V).

Podsumowanie

1. Genetyczna i/lub chemiczna modyfikacja cząsteczki r-SAK pozwoliła na uzyskanie pochodnych r-SAK o zredukowanej immunogenności i wydłużonym czasie działania. Skuteczność trombolityczną tych pochodnych udowodniono w badaniach klinicznych u pacjentów z ostrym zawałem serca i zakrzepicą tętnic obwodowych.
2. Rekombinowana stafylokinaza jest wykorzystywana do konstrukcji wielofunkcyjnych hybryd trombolitycznych wzbogaconych o właściwości przeciwplatekcyjne i przeciwtrombinowe. Ich aktywność trombolityczno-przeciwzakrzepową potwierdzono w warunkach *in vitro* i *in vivo* w modelach zwierzęcych.
3. Rekombinowane pochodne stafylokinazy mają większość cech idealnego leku trombolitycznego (możliwość podania w bolusie, wysoka swoistość względem fibryny, oporność na inhibitory aktywatorów plazminogenu, niskie ryzyko reokluzji, brak wpływu na ciśnienie tętnicze oraz brak immunogenności). Nadal najpoważniejszym ograniczeniem terapii trombolitycznej z wykorzystaniem r-SAK i jej pegylowanych pochodnych jest ryzyko krwawień.

Tabela IV. Rekombinowane pochodne stafylokinazy wzbogacone w domeny typu *kringle* (K), domeny przeciwplatek i/lub przeciwzakrzepowe – badania *in vitro*

Rekombinowana pochodna SAK	Domeny włączone do r-SAK	Efekt
PLATSAK [21]	<ul style="list-style-type: none"> • RGD • fragment fibrynopeptydu A • hirudyna 	<ul style="list-style-type: none"> • wydłużenie APTT i TT vs r-SAK • zahamowanie aktywności amidolitycznej trombiny vs r-SAK • aktywność fibrynolityczna vs r-SAK (NS) • agregacja płytek krwi vs r-SAK (NS)
H6-Sak-Dip-I+II [22]	<ul style="list-style-type: none"> • dipetalina 	<ul style="list-style-type: none"> • APTT, PT, TT vs dipetalina (NS) • hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs dipetalina (NS) • hamowanie relaksacji naczyń vs dipetalina (NS) • aktywacja plazminogenu vs r-SAK (NS) • czas lizy ludzkiego skrzepu vs r-SAK (NS)
DGR [23]	<ul style="list-style-type: none"> • DGR 	<ul style="list-style-type: none"> • zmniejszenie immunogenności u świnek morskich vs r-SAK • nieznacznie wyższa aktywność fibrynolityczna vs r-SAK • nasilone hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs r-SAK • aktywacja plazminogenu vs r-SAK (NS)
RL1 [23]	<ul style="list-style-type: none"> • RGD 	<ul style="list-style-type: none"> • zmniejszenie immunogenności u świnek morskich vs r-SAK • nieznacznie niższa aktywność fibrynolityczna vs r-SAK • nasilone hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs r-SAK • aktywacja plazminogenu vs r-SAK (NS)
SAK-RGD-K2-Hir [24]	<ul style="list-style-type: none"> • RGD • K2 • hirudyna 	<ul style="list-style-type: none"> • większe powinowactwo i siła wiązania z fibryną vs r-SAK • zwiększenie lizy ludzkiego skrzepu vs r-SAK • wiązanie z plazminą vs r-SAK (NS) • aktywacja ludzkiego plazminogenu vs r-SAK (NS) • hamowanie aktywności amidolitycznej trombiny vs hirudyna (NS) • hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs RGD (NS)
SAK-ANXXI [25]	<ul style="list-style-type: none"> • aneksyna XI 	<ul style="list-style-type: none"> • aktywność trombolityczna osoczowych skrzepów bogato- i ubogopłytkowych vs r-SAK (NS) • wydłużenie czasu krzepnięcia vs r-SAK
RGD-SAK [26]	<ul style="list-style-type: none"> • mutacje punktowe² 	<ul style="list-style-type: none"> • aktywacja ludzkiego plazminogenu vs r-SAK (NS) • zwiększone wiązanie z ludzkimi płytkami krwi vs r-SAK • wiązanie z fibryną vs r-SAK (NS) • skrócenie czasu lizy bogatopłytkowego skrzepu fibrynowego vs r-SAK • nasilone hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs r-SAK • hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs RGD (NS)
Pochodna SakSTAR [27]	<ul style="list-style-type: none"> • hirudyna • mutacje punktowe^{1, 2} 	<ul style="list-style-type: none"> • hamowanie aktywności amidolitycznej trombiny • zmniejszenie immunogenności • nasilone hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs r-SAK
Pochodne SAK [28]	<ul style="list-style-type: none"> • mutacje punktowe² 	<ul style="list-style-type: none"> • zwiększona aktywacja ludzkiego plazminogenu vs r-SAK • nasilone hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs r-SAK
Y1-Sak [29]	<ul style="list-style-type: none"> • mutacje punktowe^{1, 2} 	<ul style="list-style-type: none"> • zwiększona aktywacja ludzkiego plazminogenu vs r-SAK • nasilone hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs r-SAK
SAK-RGD-K2-Hirul [30]	<ul style="list-style-type: none"> • RGD • K2 • hirulog 	<ul style="list-style-type: none"> • większe powinowactwo i siła wiązania z fibryną vs r-SAK • zwiększenie lizy ludzkiego skrzepu vs r-SAK • wiązanie z plazminą vs r-SAK (NS) • aktywacja ludzkiego plazminogenu vs r-SAK (NS) • hamowanie aktywności amidolitycznej trombiny vs hirudyna (NS) • hamowanie agregacji ludzkich płytek krwi vs RGD (NS)

r-SAK – rekombinowana stafylokinaza, K1 – pierwsza domena typu *kringle* ludzkiego plazminogenu, RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy) – trójaminokwasowa sekwencja przeciwplatek, DGR (odwrócona sekwencja RGD) – trójaminokwasowa sekwencja przeciwplatek, K2 – druga domena typu *kringle* tkankowego aktywatora plazminogenu (t-PA), hirudyna, hirulog – bezpośrednie inhibitory trombiny, APTT – czas częściowej trombolastyny po aktywacji, TT – czas trombinowy, PT – czas protrombinowy, NS – nieistotne statystycznie

¹ redukcja immunogenności

² wprowadzenie domeny RGD

Tabela V. Rekombinowane pochodne stafylokinazy – badania w modelach zwierzęcych

Rekombinowana pochodna SAK	Domeny włączone do r-SAK	Model	Efekt
PLATSAK [31]	<ul style="list-style-type: none"> • RGD • fragment fibrynopeptydu A • hirudyna 	model zakrzepicy tętniczej i żyłnej u pawiana	<ul style="list-style-type: none"> • wyższa aktywność trombolityczna vs kontrola (ekstrakt <i>E. coli</i>) • podwyższone ryzyko krwawień • stężenie fibrynogenu vs kontrola (NS)
SAK-RGD-K2-Hir, SAK-K2-Hir, SAK-RGD-K2 [32]	<ul style="list-style-type: none"> • RGD • K2 • hirudyna 	model zakrzepicy tętniczej u szczura model zakrzepicy żyłnej u szczura	<ul style="list-style-type: none"> • niższa aktywność trombolityczna SAK-RGD-K2-Hir vs r-SAK, rt-PA • wyższa aktywność trombolityczna SAK-RGD-K2 vs r-SAK, rt-PA • wyższa aktywność trombolityczna SAK-RGD-K2-Hir, SAK-K2-Hir vs r-SAK • podwyższone ryzyko krwawień po podaniu w dawce 1,0 mg/kg • stężenie fibrynogenu vs r-SAK (NS)
SFH [33]	<ul style="list-style-type: none"> • hirudyna 	indukowane karageniną niedokrwienie <u>mysiego ogona</u> model zakrzepicy żyłnej u szczura	<ul style="list-style-type: none"> • zwiększenie aktywności trombolitycznej vs r-SAK • zmniejszenie ryzyka krwawień vs r-SAK + hirudyna
RGD-SAK [26]	<ul style="list-style-type: none"> • RGD 	model zakrzepicy tętniczej u świnek miniaturowych	<ul style="list-style-type: none"> • wyższa skuteczność trombolityczna w upłynnianiu zakrzepu w tętnicach wieńcowych vs r-SAK • brak reokluzji po 30 dniach od podania SAK-RGD, współczynnik reokluzji po podaniu r-SAK ok. 67% • powikłania krwotoczne vs r-SAK (NS) • APTT, PT, TT, fibrynogen vs r-SAK (NS)

r-SAK – rekombinowana stafylokinaza, RGD (arginina-glicyna-kwas asparaginowy) – trójaminokwasowa sekwencja przeciwpłytkowa, K2 – druga domena typu kringle t-PA umożliwiającą bezpośrednie połączenie z fibryną (zakrzepem), hirudyna – bezpośredni inhibitor trombiny, APTT – czas częściowej trombolastyny po aktywacji, PT – czas protrombinowy, TT – czas trombinowy, NS – nieistotne statystycznie

Piśmiennictwo

1. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008; 29: 2909-45.
2. Fox KA. Have we reached the limit with thrombolytic therapy? *Cardiovasc Drugs Ther* 1999; 13: 211-6.
3. Armstrong PW, Burton J, Palisaitis D, et al. Collaborative Angiographic Patency Trial Of Recombinant Staphylokinase (CAPTORS). *Am Heart J* 2000; 139: 820-3.
4. Armstrong PW, Burton J, Pakola S, et al. CAPTORS II Investigators. Collaborative Angiographic Patency Trial Of Recombinant Staphylokinase (CAPTORS II). *Am Heart J* 2003; 146: 484-8.
5. Patel SC, Mody A. Cerebral hemorrhagic complications of thrombolytic therapy. *Prog Cardiovasc Dis* 1999; 42: 217-33.
6. Van de Werf FJ. The ideal fibrinolytic: can drug design improve clinical results? *Eur Heart J* 1999; 20: 1452-8.
7. Lewis JH, Shirakawa M. Effects of fibrinolytic agents and heparin on blood coagulation in dogs. *Am J Physiol* 1964; 207: 1049-52.
8. Matsuo O, Okada K, Fukao H, et al. Thrombolytic properties of staphylokinase. *Blood* 1990; 76: 925-9.
9. Collen D, Van de Werf F. Coronary thrombolysis with recombinant staphylokinase in patients with evolving myocardial infarction. *Circulation* 1993; 87: 1850-3.
10. Vanderschueren S, Dens J, Kerdsinchai P, et al. Randomized coronary patency trial of double-bolus recombinant staphylokinase versus front-loaded alteplase in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997; 134: 213-9.
11. Collen D, De Cock F, Stassen JM. Comparative immunogenicity and thrombolytic properties toward arterial and venous thrombi of streptokinase and recombinant staphylokinase in baboons. *Circulation* 1993; 87: 996-1006.
12. Vanderschueren S, Barrios L, Kerdsinchai P, et al. A randomized trial of recombinant staphylokinase versus alteplase for coronary artery patency in acute myocardial infarction. The STAR Trial Group. *Circulation* 1995; 92: 2044-9.
13. Vanderschueren S, Collen D, van de Werf F. A pilot study on bolus administration of recombinant staphylokinase for coronary artery thrombolysis. *Thromb Haemost* 1996; 76: 541-4.
14. Warmerdam PA, Vanderlick K, Vandervoort P, et al. Staphylokinase-specific cell-mediated immunity in humans. *J Immunol* 2002; 168: 155-61.
15. Collen D, Bernaerts R, Declerck P, et al. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. I: Construction and characterization. *Circulation* 1996; 94: 197-206.
16. Collen D, Moreau H, Stockx L, et al. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. II: Thrombolytic properties and antibody induction. *Circulation* 1996; 94: 207-16.
17. Vanderschueren S, Stassen JM, Collen D. Comparative antigenicity of recombinant wild-type staphylokinase (SakSTAR) and a selected mutant (SakSTAR.M38) in a baboon thrombolysis model. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 27: 809-15.
18. Collen D, Stockx L, Lacroix H, et al. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. IV: Identification of variants with reduced antibody induction but intact potency. *Circulation* 1997; 95: 463-72.
19. Laroche Y, Heymans S, Capaert S, et al. Recombinant staphylokinase variants with reduced antigenicity due to elimination of B-lymphocyte epitopes. *Blood* 2000; 96: 1425-32.

20. Collen D, Sinnaeve P, Demarsin E, et al. Polyethylene glycol-derivatized cysteine-substitution variants of recombinant staphylokinase for single-bolus treatment of acute myocardial infarction. *Circulation* 2000; 102: 1766-72.
21. van Zyl WB, Pretorius GH, Hartmann M, et al. Production of a recombinant antithrombotic and fibrinolytic protein, PLATSAK, in *Escherichia coli*. *Thromb Res* 1997; 88: 419-26.
22. Icke C, Schlott B, Ohlenschläger O, et al. Fusion proteins with anticoagulant and fibrinolytic properties: functional studies and structural considerations. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 203-9.
23. Su HB, Zhang YG, He JT, et al. Construction and characterization of novel staphylokinase variants with antiplatelet aggregation activity and reduced immunogenicity. *Acta Biochim Biophys Sin* 2004; 36: 336-42.
24. Szemraj J, Walkowiak B, Kawecka I, et al. A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity – a staphylokinase variant. I: In vitro study. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 2156-65.
25. Chiou JF, Woon MD, Cheng SN, et al. Staphylo-kinase-annexin XI chimera exhibited efficient in vitro thrombolytic activities. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 1122-9.
26. Chen H, Mo W, Zhang Y, et al. Functional properties of a novel mutant of staphylokinase with platelet-targeted fibrinolysis and antiplatelet aggregation activities. *Eur J Pharmacol* 2007; 566: 137-44.
27. Kochanowski R, Kotłowski R, Szweda P. Expression and intein-mediated purification of novel staphylokinase SakSTAR with reduced immunogenicity and antiplatelet and antithrombin activation. *Appl Biochem Biotechnol* 2007; 141: 321-33.
28. He J, Di J, Xu R, et al. Novel recombinant thrombolytic and antithrombotic staphylokinase variants with an RGD motif at their N-termini. *Biotechnol Appl Biochem* 2008; 50: 17-23.
29. He J, Wang G, Xu R, et al. Refolding of a staphylokinase variant y1-Sak by reverse dilution. *Appl Biochem Biotechnol* 2008; 151: 29-41.
30. Kowalski M, Brown G, Bieniasz M, et al. Cloning and expression of a new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent – a staphylokinase variant. *Acta Biochim Pol* 2009; 56: 41-53.
31. van Zyl WB, Pretorius GH, Lamprecht S, et al. PLATSAK, a potent antithrombotic and fibrinolytic protein, inhibits arterial and venous thrombosis in a baboon model. *Thromb Res* 2000; 98: 435-43.
32. Szemraj J, Stankiewicz A, Rozmysłowicz-Szermińska W, et al. A new recombinant thrombolytic and antithrombotic agent with higher fibrin affinity – a staphylokinase variant. An in-vivo study. *Thromb Haemost* 2007; 97: 1037-45.
33. Shi B, Yu A, Liu Y, et al. Locally activity-released bifunctional fusion protein enhances antithrombosis and alleviates bleeding risk. *J Thromb Thrombolysis* 2007; 24: 283-92.