



УДК 577.112.6 + 541.69

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИТРОМБИНОВОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ФОСФОАЛАНИН

© 2003 г. С. А. Пояркова[#], О. Д. Федоряк, В. К. Кибирев, В. П. Кухарь

Институт биоорганической химии и нефтехимии
НАН Украины, 02094, Украина, Киев-94, ул. Мурманская, 1
Поступила в редакцию 18.01.2002 г. Принята к печати 19.03.2002 г.

Классическими методами пептидного синтеза в растворе синтезированы трипептиды общей формулы $\text{Woc/Tos-L-Phe-L-Arg-Xaa}$, где $\text{Xaa} = \text{L-Ala-OBu}^t$, L-Ala или $\text{DL-Ala}^P(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$. Изучены особенности их взаимодействия с тромбином и трипсином. Показано, что тромбин в отличие от трипсина не катализирует гидролиз связи $\text{-L-Arg-L-Ala}^P(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$. Среди исследованных соединений максимальную ингибиторную способность по отношению к тромбину проявляет пептид строения $\text{Tos-L-Phe-L-Arg-DL-Ala}^P(\text{OC}_2\text{H}_5)_2$. Обсуждается связь между структурой и ингибиторным действием синтезированных пептидов.

Ключевые слова: тромбин, ингибиторы, пептиды, фосфоаминокислоты.

ВВЕДЕНИЕ

Тромбин (КФ 3.4.21.5) – трипсиноподобная многофункциональная сериновая протеиназа, ключевой фермент процессов тромбообразования и гемостаза. Основная функция тромбина – специфический ограниченный гидролиз фибриногена до фибрина, сопровождающийся полимеризацией последнего с образованием основы кровяного сгустка [1]. Проявляя как ферментативные, так и гормоноподобные свойства, фермент играет жизненно важную роль на всех уровнях гемостаза (плазменном, клеточном и сосудистом), ускоряя или замедляя его [2, 3].

Согласно современным представлениям, по сравнению с другими сериновыми протеиназами тромбин имеет более протяженный [4–6] и изогнутый [7, 8] вторичный связывающий центр. Обнаружено, что специфическая пространственная организация подцентров S'_1 , S'_2 и S'_3 очень важна для узнавания и связывания аминокислот, расположенных в молекуле субстрата в направлении C -конца от расщепляемой связи [9, 10].

Часть этой работы была доложена на конференции: Augustusburg conference of advanced science. Nucleic acids – targets and tools. 17–19 сентября 2000, Германия. Принятые сокращения соответствуют рекомендациям номенклатурной комиссии IUPAC-IUB; в аббревиатуре аминокислот L -ряда символ конфигурации опущен; Ala^P и $\text{Ala}^P(\text{OEt})_2$ – фосфоаланин и его диэтиловый эфир; АРА – аминокислотные фосфонаты; IC_{50} – концентрация ингибитора, при которой время свертывания фибриногена тромбином увеличивается вдвое по сравнению со временем образования сгустка без ингибитора; оФВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

[#] Автор для переписки (эл. почта: Spoyar@bpci.kiev.ua; тел.: 380 (44) 573-27-28).

Ярко выраженная вторичная стереоспецифичность тромбина [11] проявляется как утрата ферментом способности к гидролизу субстратов, содержащих остатки гидрофобных D -аминокислот в положении P_2 . Эти результаты хорошо согласуются с данными рентгеноструктурного анализа тромбина [12], согласно которым вторичный связывающий центр тромбина организован в так называемую “гидрофобную клетку”, образованную остатками Ile174, Trp215, Leu99, His57, Tyr60A и Trp60D (нумерация аминокислотных остатков по химотрипсину). Кроме того, авторами работы [12] найдена новая особенность укладки β -цепи тромбина в виде вытянутой петли с расположенными в ней остатками Tyr60A и Trp60D, которая вместе с петлей вокруг Trp148 образует узкую и глубокую щель активного центра. Индольные кольца Trp60D и Trp148 прикрывают щель, тем самым затрудняя доступ к активному центру тромбина [12]. Возможно, именно стерические препятствия являются одной из причин узкой специфичности фермента и отражаются на механизме гидролиза им низкомолекулярных субстратов [13–15].

Несмотря на то что тромбин является наиболее изученным представителем ферментов узкоспецифического действия [16], механизм его каталитического действия еще недостаточно ясен.

Для выяснения механизма действия ферментов и исследования природы их субстратной специфичности наряду с рентгеноструктурным анализом, дающим представление о статике взаимодействия ингибитора с ферментом, широко применяется субстратно-ингибиторный анализ, который позволяет обнаружить тонкости механизма ферментативного катализа. В ряде случаев исследуемые ингибиторы могут иметь практическое при-

менение в качестве потенциальных лекарственных средств. Особенно это важно для тромбина, который является основной мишенью для создания новых антикоагулянтов [17].

Один из подходов к исследованию структурной организации активных центров ферментов состоит в изучении кинетики их взаимодействия со стереоизомерными субстратами и ингибиторами [18]. Известно, что пептиды, состоящие из *D*- и *L*-аминокислот, характеризуются более компактной структурой, чем их аналоги, построенные из аминокислот одной конфигурации [19]. Стереоизомеры пептидов могут проявлять различия при образовании продуктивных комплексов с ферментом. В частности, на скорость гидролиза субстратов тромбином влияет конфигурация аминокислотных остатков в положениях P_2 и P_3 пептида [20]. Кроме того, известно, что замена *L*-аминокислот, образующих гидролизуюмую связь ($P_1-P'_1$), на их энантиомеры, приводит к тому, что полученный аналог либо вообще не расщепляется, либо расщепляется очень медленно, что часто используется для синтеза пептидных ингибиторов, устойчивых к деградации их ферментами организма [21].

Перспективным направлением создания антикоагулянтов, устойчивых к энзиматической деградации, является использование соединений, содержащих аминокислотные остатки (АРА). Показано, что фосфорные аналоги аминокислотных остатков, как природные, так и синтетические, проявляют заметную биологическую активность и обладают весьма широким спектром действия [22–25]. Однако классифицировать ингибиторы, содержащие АРА, по механизму их действия достаточно сложно [26].

В работе [27] представлены новые фосфонопептиды общей формулы $D\text{-Phe-Pro-Aac}^P(\text{OPh})_2$ с липофильной аминокислотой (*D*-Phe) в положении P_3 и аминокислотной группой с нейтральной боковой цепью (Aac^P) в положении P_1 , которые оказались достаточно эффективными ингибиторами тромбина (со значениями IC_{50} от 0.00094 до 4.4 мкМ). Предполагается [27], что эти соединения ингибируют тромбин путем фосфорилирования остатка Ser215 активного центра, поэтому некорректно сравнивать их с известными ингибиторами тромбина, которые связываются с активным центром фермента только за счет нековалентных взаимодействий. Механизм действия фосфонопептидов на тромбин обсуждается также в работе [22]. Представляется интересным синтезировать и исследовать соединения, сочетающие свойства как нековалентного конкурентного ингибитора (остаток аргинина в положении P_1), так и ковалентного неконкурентного ингибитора (АРА в положении P'_1).

Практически все известные методы синтеза АРА приводят к образованию рацемических смесей [28, 29]. Ацилированием аминокислотных групп рацемических аминокислотных остатков производными оптически активных α -аминокарбоновых кислот получают диастереомерные фосфонопептиды, которые могут быть разделены хроматографией на ионообменных смолах [30] или на силикагеле. Предложен метод [31] получения оптически активных α -аминофосфонокарбоновых кислот, основанный на разделении незащищенных или полностью защищенных фосфонопептидов колоночной хроматографией на сульфокатионите “Hitachi 2611” с последующим кислотным гидролизом полученных диастереомеров.

В целом, ингибиторы на основе аминокислотных остатков можно рассматривать как новый класс специфических ингибиторов, который представляется весьма полезным для изучения тонкого механизма действия ферментов, а также для дизайна новых ингибиторов тромбина.

Цель настоящей работы – синтез и исследование антитромбинового действия пептидов, содержащих *DL*-фосфоаланин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Трипептиды, синтезированные в данной работе, различаются строением и конфигурацией аминокислотного остатка в положении P'_1 субстрата (*L*-аланин или рацемат фосфоаланина), а также характером *N*-концевой защитной группы (Woc- или Tos-) или ее отсутствием. Структура трипептидов была выбрана по следующим соображениям: 1) ранее было показано [11], что дипептид Tos-Phe-Arg- OCH_3 проявляет свойства как субстрата, так и ингибитора тромбина и имеет оптимальные характеристики для связывания с активным центром фермента; 2) остаток *L*-аланина и, вероятно, его биологически активный [26] фосфорилированный аналог (*L*-Ala^P) в положении P'_1 комплементарны сайту S'_1 фермента. Можно было ожидать, что сочетание этих двух компонентов в молекуле трипептида приведет к получению нового ингибитора тромбина, обладающего интересными свойствами и характеристиками.

В связи с практической недоступностью оптически чистых изомеров АРА [29] для синтеза пептидов согласно схеме, приведенной на рис. 1, был использован рацемат фосфоаланина. При получении дипептидов Woc-Phe-Arg-ОН (I) и Tos-Phe-Arg-ОН (II) использовали устойчивые к гидролизу *N*-оксисукцинимидные эфиры Woc- или Tos-фенилаланина, что позволило вести синтез в водном диоксане, а также получать целевые пептиды со свободной *C*-концевой карбоксильной группой [32].

Трипептиды синтезировали с помощью карбодиимидного метода. В целях уменьшения степени

рацемизации и образования побочных продуктов к реакционной смеси добавляли *N*-гидроксисбензотриазол.

Синтез Boc/Tos-Phe-Arg-Ala^P(OEt)₂ (III)/(IV) осуществляли конденсацией соответствующего дипептида (I)/(II) с диэтиловым эфиром *DL*-фосфоаланина (*DL*-Ala^P(OEt)₂) (рис. 1). Обычно эфиры аминокислот выделяют в виде солей – хлоргидратов, пикратов или кислых оксалатов [28]. В данной работе использовали оксалат – Ala^P(OEt)₂ · (COOH)₂. Удаление Boc-группы у защищенного трипептида с получением соединения (V) осуществляли обработкой 3 н. HCl в абсолютном диоксане.

По аналогичной схеме из Tos-дипептида (II) и Ala-OBu^t был получен трипептид Tos-Phe-Arg-Ala-OBu^t (VI). Снятие *tert*-бутильной защитной группы проводили действием HCl в абсолютном диоксане.

Физико-химические свойства и данные элементного анализа синтезированных соединений приведены в табл. 1.

Полученные смеси диастереомеров (*LLL*- и *LLD*-изомеры) защищенных трипептидов (III) и (IV) подвергали офВЭЖХ. Обнаружено, что смесь диастереомеров Boc-трипептида (III) таким способом не разделяется. В то же время Tos-трипептид (IV) имеет значительное время удерживания на сорбенте С-18, что позволяет разделить его на оптически активные изомеры (времена удерживания пиков составляют 34 и 37 мин, рис. 2). При этом необходимо применять подвижную фазу с высоким содержанием органического модификатора [33].

Определить принадлежность материала пиков, полученных при офВЭЖХ соединения (IV), к *LLL*- или *LLD*-изомерам невозможно. Однако, по-

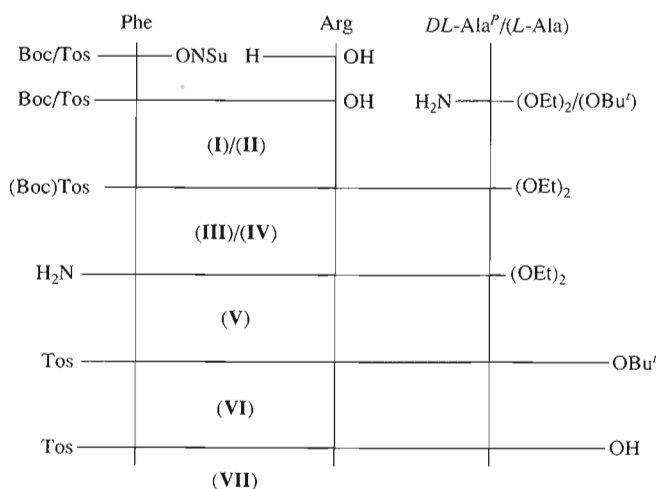


Рис. 1. Схема синтеза трипептидов.

скольку ферменты физиологически приспособлены к расщеплению производных *L*-аминокислот, очевидно, что в первую очередь ферментативному гидролизу будет подвергаться *LLL*-изомер. Поэтому для отнесения пиков с помощью офВЭЖХ осуществляли контроль реакции гидролиза смеси диастереомеров ферментами – тромбином и трипсином. В ходе исследования было установлено, что тромбин вообще не катализирует гидролиз трипептидов (IV) (рис. 3).

При действии трипсина на смесь диастереомеров (IV) наблюдалось постепенное исчезновение (рис. 4) первого пика (время удерживания 34 мин, рис. 2), что позволяет отнести его к *LLL*-изомеру трипептида, в то время как площадь второго пика (время удерживания 37 мин, *LLD*-изомер) оставалась без изменения. Линеаризация эксперимен-

Таблица 1. Физико-химические характеристики синтезированных соединений

Пептид	Соединение	Выход, %	Т. пл., °С	<i>R</i> _f [*]	<i>E</i> _{Arg} ^{**}	Данные элементного анализа								Брутто-формула
						вычислено				найдено				
						С	Н	Ν	Ρ	С	Н	Ν	Ρ	
(III)	Boc-Phe-Arg-DL-Ala ^P (OEt) ₂	28	125–127	0.66	0.5	50.28	7.46	13.53	4.99	50.35	7.50	13.80	5.01	C ₂₆ H ₄₅ N ₆ O ₇ P HCl
(IV)	Tos-Phe-Arg-DL-Ala ^P (OEt) ₂	60	99–100	0.54	0.66	49.81	6.57	12.45	4.59	49.76	6.35	12.41	4.53	C ₂₈ H ₄₂ N ₆ O ₇ PS HCl
(V)	H-Phe-Arg-DL-Ala ^P (OEt) ₂	74	121–122	0.45	0.97	45.25	7.05	15.08	5.56	45.41	6.90	15.15	5.55	C ₂₁ H ₃₆ N ₆ O ₅ P 2HCl
(VI)	Tos-Phe-Arg-Ala-OBu ^t	39	98–100	0.76	0.6	54.49	6.78	13.15	–	54.67	6.59	13.20	–	C ₂₉ H ₄₁ N ₆ O ₆ S HCl
(VII)	Tos-Phe-Arg-Ala-OH	82	111–115	0.72	0.55	51.50	6.05	14.41	–	51.68	5.92	14.47	–	C ₂₅ H ₃₃ N ₆ O ₆ S HCl

* Приведена подвижность пептидов при ТСХ на пластинках силуфол в системе *n*-бутанол–уксусная кислота–вода (4 : 1 : 1).

** Электрофоретическую подвижность пептидов (относительно аргинина) определяли при помощи электрофореза на бумаге FN-16 при рН 6.5 и градиенте потенциала 60 В/см в течение 1 ч.

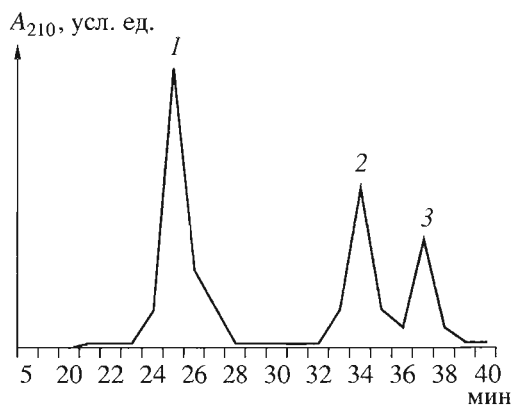


Рис. 2. Контроль разделения диастереомеров трипептидов (III) и (IV) с помощью офВЭЖХ. 1 – смесь LLL-(III) и LLD-(III), 2 – LLL-(IV), 3 – LLD-(IV). Условия см. “Эксперимент. часть”.

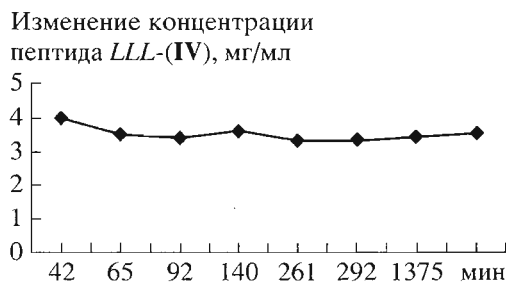


Рис. 3. Контроль действия тромбина на смесь диастереомеров Tos-Phe-Arg-DL-Ala^P(OEt)₂ (IV). Приведена кривая для пика 2 рис. 2.

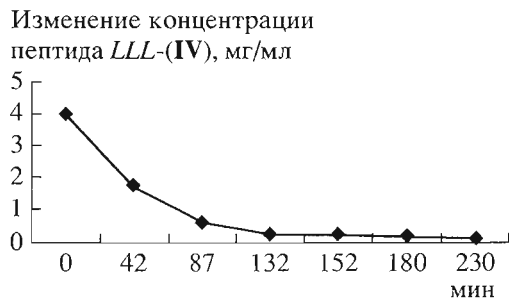


Рис. 4. Контроль реакции гидролиза смеси диастереомеров Tos-Phe-Arg-DL-Ala^P(OEt)₂ (IV) трипсином.

тальной кривой (рис. 4) по методу, предложенному в работе [34], позволила определить кинетические параметры гидролиза трипептида LLL-(IV) трипсином: k_{cat} 0.01 с⁻¹, K_m 0.11 мМ, k_{cat}/K_m 91 М⁻¹с⁻¹.

Таким образом, было показано, что тромбин более чувствителен к природе заместителя в положении P₁ⁱ, чем трипсин. Это подтверждает данные работ [9, 10] о тонкой организации подцентра тромбина S₁ⁱ и его важной роли в проявлении ферментом каталитической активности.

Далее была изучена эффективность ингибирования синтезированными пептидами (IV)–(VII) реакции гидролиза фибриногена под действием тромбина (табл. 2). Для этого измеряли время свертывания фибриногена тромбином в присутствии возрастающих концентраций каждого из исследуемых соединений. На основании полученных экспериментальных данных строили графики в координатах $(\tau - \tau_0)/\tau_0$ от [I], где τ_0 и τ – время свертывания фибриногена тромбином без ингибитора и в присутствии ингибитора; [I] – концентрация ингибитора. Из построенных графиков определяли величину IC₅₀.

Из табл. 2 видно, что трипептид со свободной аминогруппой (V) проявляет минимальную анти-тромбиновую активность. Это подтверждает важность гидрофобных взаимодействий в подцентре тромбина S₃. Ароматическое кольцо тозилльной группы, занимающее положение P₃ (соединения (IV) и (VI)), сближается в пространстве с остатком ароматической аминокислоты в подцентре P₂, образуя гидрофобный кластер, необходимый для продуктивного связывания пептида с тромбином. Удаление тозилльной группы не позволяет создать необходимое гидрофобное ядро, и ингибиторная активность пептида (V) снижается. Информацию об участии подцентра тромбина S₂ⁱ в образовании фермент-субстратного комплекса можно получить, сравнивая ингибиторные эффекты соединений (VI) и (VII). Поскольку величины IC₅₀ для этих соединений практически не различаются (табл. 2), можно предположить, что подцентр тромбина S₂ⁱ не принимает участия в связывании изучаемых соединений с ферментом.

Сравнение ингибирующего действия трипептидов (IV) и (VI) подтвердило наше предположение об эффективности фосфорилированных ингибиторов тромбина: введение остатка фосфоаланина вместо аланина в 5 раз увеличило анти-тромбиновую активность пептида (VI). Кроме того, трипептид (IV), как показано выше, не поддается гидролизу тромбином, в то время как его нефосфорилированный аналог (VI) гидролизует ферментом. Таким образом, можно утверждать, что соединения, содержащие фосфоаминокислоты, являются перспективными в плане синтеза новых, стойких к энзиматической деградации ингибиторов тромбина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали аминокислоты (Reanal, Венгрия), ТРСК-трипсин (активность 40 U^{*}/мг)

* 1 U – единица активности трипсина катализирует превращение 1 мкМ ВАЕЕ при рН 8.5, 25°C.

(Merck, Германия), тромбин (активность 4000 NIH^{*}/мг), выделенный в нашей лаборатории, фибриноген (90% свертываемого белка, Serva, Германия), полиэтиленгликоль М 6000 (Serva, Германия), оксалат диэтилового эфира *DL*-фосфоаланина, любезно предоставленный В.А. Солоденко (ИБОНХ НАН Украины), растворители и реагенты марки "х.ч." или "ос.ч.". Температуру плавления синтезированных пептидов определяли на приборе Koffler Voetius (Германия).

Контроль за синтезом производных аминокислот и пептидов осуществляли при помощи ТСХ на пластинках Silufol (Чехословакия) в системе растворителей: *n*-бутанол–уксусная кислота–вода (4 : 1 : 1).

Для препаративной очистки пептидов использовали колоночную хроматографию на СМ-целлюлозе (СМ-52, Whatman, Англия), полисорбе-А (Олайне, СССР) и сефадексе LH-20 (Serva, Германия). Электрофорез пептидов осуществляли на бумаге Filtrak-16 (Германия) в течение 1 ч при рН 6.4 и градиенте потенциала 60 В/см. Электрофореграммы обрабатывали реактивом Сакагучи (раствор I: 0.01% α -нафтол в 95% этаноле с 5% мочевины. Раствор II: 2.0 г брома в 100 мл 8% раствора NaOH. Перед применением к раствору I прибавляли несколько гранул КОН и после их растворения опрыскивали хроматограмму, затем высушивали и опрыскивали раствором II.

Анализ смеси диастереомеров осуществляли при помощи хроматографической системы LKB Pharmacia Liquid Chromatographic System (Швеция), снабженной колонкой (150 × 3 мм) Separon Six C-18 мкм. Условия разделения: 0.02 М фосфатный буфер рН 5.3, 70% MeOH; скорость потока 0.5 мл/мин, температура 35°C; длина волны детектирования 210 нм; чувствительность детектора – 0.10–0.25 ОЕ. Объем пробы 5 мкл, концентрация 5 мг/мл.

Woc-Phe-Arg-OH (I) и Tos-Phe-Arg-OH (II) получали как описано ранее ([32] и [35] соответственно)

Woc-Phe-Arg-DL-Ala^P(OEt)₂ (III). К раствору 1.26 г (3 ммоль) Woc-фенилаланиларгинина (I) в 20 мл ацетона прибавляли 0.4 мл конц. HCl, упаривали, прибавляли еще 20 мл ацетона и снова упаривали. Полученный гидрохлорид растворяли в DMF (раствор 1).

Раствор 0.7 г (3 ммоль) оксалата диэтилового эфира *DL*-фосфоаланина в 50% K₂HPO₄ экстрагировали хлороформом, упаривали, остаток растворяли в DMF (раствор 2). Растворы 1 и 2 сливали, реакционную смесь охлаждали 30 мин до –4°C, затем прибавляли 0.41 г (3 ммоль) *N*-гидро-

Таблица 2. Ингибирование синтезированными пептидами реакции свертывания фибриногена тромбином при рН 7.0 и 29°C*

Пептид	Структура	IC ₅₀ , мМ**
(IV)	Tos-Phe-Arg-DL-Ala ^P (OEt) ₂	0.36
(V)	H-Phe-Arg-DL-Ala ^P (OEt) ₂	4.30
(VI)	Tos-Phe-Arg-Ala-OBu ^t	1.80
(VII)	Tos-Phe-Arg-Ala-OH	1.60

* Представлены средние значения из 2–4 опытов. Ошибка эксперимента не превышает 10% определяемой величины.

** Величина ингибиторной активности (IC₅₀) соответствует концентрации пептида, при которой время свертывания фибриногена тромбином возрастает в два раза.

ксибензтриазола, а через 10 мин – 0.64 г (3 ммоль) DCC и перемешивали в течение 24 ч. Отделяли осадок дициклогексилмочевины, фильтрат упаривали в вакууме при 40°C; остаток промывали этилацетатом и затирали с эфиром. Выход продукта (III) составил 0.5 г (28%). Для очистки пептид (III) в 5–7 мл 0.05 М AcONH₄ хроматографировали на СМ-целлюлозе (2.5 × 30 см), уравновешенной 0.05 М аммоний-ацетатным буфером (рН 6.5), промывали 100 мл исходного буфера и элюировали в линейном градиенте концентрации AcONH₄ (0.05–0.5 М) (общий объем 500 мл) со скоростью 60–100 мл/ч.

Гомогенность продукта контролировали электрофорезом (рН 6.5), однако в чистом виде пептид (III) получить не удалось.

H-Phe-Arg-DL-Ala^P(OEt)₂ (V). Раствор 0.5 г (0.8 ммоль) *N*-защищенного пептида (III) в 3 мл 6 н. HCl в абсолютном диоксане выдерживали 45 мин, упаривали, остаток растворяли в 5 мл метанола и хроматографировали на сефадексе LH-20 (2.5 × 40 см); элюент – метанол, наличие трипептида (V) во фракциях устанавливали при помощи электрофореза на бумаге. Для очистки пептид (V) кристаллизовали из эфира; выход 0.35 г.

Tos-Phe-Arg-DL-Ala^P(OEt)₂ (IV). 1.43 г (3 ммоль) Tos-фенилаланиларгинина (II) обрабатывали 0.4 мл 6 н. HCl в ацетоне, упаривали, затем трижды прибавляли ацетон и снова упаривали. Полученный гидрохлорид Tos-фенилаланиларгинина в DMF смешивали с диэтиловым эфиром *DL*-фосфоаланина в DMF, полученным из 1 г (3.7 ммоль) соответствующего оксалата, как описано при синтезе Woc-трипептида (III). К охлажденной до –4°C смеси прибавляли 0.41 г (3 ммоль) *N*-гидроксибензтриазола и 0.64 г (3 ммоль) DCC, перемешивали 48 ч при комнатной температуре, осадок дициклогексилмочевины отбрасывали, фильтрат упаривали, остаток обрабатывали этилацетатом, осадок трипептида (IV) промывали этилацетатом.

Для очистки продукт (IV) в 5 мл метанола хроматографировали сначала на Al₂O₃ (2.5 × 20 см; элюент – метанол), а затем – на полисорбе А-1

** 1 NIH – единица активности тромбина катализирует свертывание 0.1% раствора фибриногена при рН 7.4, 25°C за 15 с.

(6 × 40 см), уравновешенном водой; элюент – ступенчатый градиент концентрации (0; 15; 50; 80%) этанола. Элюаты, содержащие трипептид (IV), собирали, растворитель упаривали, остаток кристаллизовали из абсолютного эфира, полученный трипептид (IV) сушили над P₂O₅.

Tos-Phe-Arg-Ala-OBu' (VI). Раствор 0.82 г (1.9 ммоль) Tos-фенилаланиларгинина (II) в DMF перемешивали 40 мин при комнатной температуре с 0.41 г (2.28 ммоль) гидрохлорида *трет*-бутилового эфира аланина, охлаждали до 0°C и прибавляли 0.3 г (2.28 ммоль) *N*-гидроксисбензтриазола и 0.47 г (2.28 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали 4 ч при охлаждении и 20 ч при комнатной температуре. Осадок дициклогексилмочевины отбрасывали, фильтрат упаривали, остаток промывали этилацетатом и минимальным количеством воды, масло затирали с эфиром.

Tos-Phe-Arg-Ala-OH (VII). 0.35 г (5 ммоль) *трет*-бутилового эфира трипептида (VI) выдерживали 1 ч при комнатной температуре в 10 мл 6.2 н. HCl в диоксане, упаривали, масло затирали с эфиром, продукт кристаллизовали из воды. Выход пептида (VII) 0.25 г.

Свертывающую активность тромбина определяли с помощью растворов фибриногена и буферов, приготовленных по методике, описанной в работе [14]. Исходный раствор тромбина готовили таким образом, чтобы время свертывания 0.1% фибриногена в стандартных условиях составляло 15–20 с. Для изучения влияния исследуемых соединений на свертывающую активность тромбина к 0.5 мл 0.2 % фибриногена прибавляли 0.5 мл 0.04 М Трис-HCl-буфера (pH 7.3), содержащего ингибитор, 0.15 М NaCl и 0.66% полиэтиленгликоль, термостатировали 5 мин при 29°C, затем прибавляли 20 мкл исходного раствора тромбина и отмечали время, необходимое для образования сгустка. Время свертывания фибриногена определяли по три раза для 5–6 концентраций пептида – ингибитора; из графика зависимости $(\tau - \tau_0)/\tau_0$ от [I] вычисляли значение IC₅₀.

Гидролиз трипсином смеси диастереомеров Tos-Phe-Arg-DL-Ala^P(OC₂H₅)₂ (IV). 150 мг смеси диастереомеров трипептида (IV) растворяли в 10 мл 0.05 М Трис-HCl-буфера (pH 8.2), содержащего 0.15 М NaCl и 0.002 М CaCl₂, и добавляли 0.1 мг ТРСК-трипсина в 0.1 мл 0.01 н. HCl. Ферментативную реакцию проводили при перемешивании в термостатированной при 36°C ячейке, каждый час отбирали пробы по 0.5 мкл и наносили на колонку Serapon Six C-18 (см. “Анализ смеси диастереомеров”). Количество прогидролизованного LLL-(IV) определяли по уменьшению площади соответствующего пика ($T_{уд}$ 34 мин). Из кривой зависимости накопления продукта от времени реакции рассчитывали кинетические константы в координатах Клесова [34].

Гидролиз тромбином смеси диастереомеров Tos-Phe-Arg-DL-Ala^P(OC₂H₅)₂ (IV). 150 мг смеси диастереомеров пептида (IV) растворяли в 10 мл 0.05 М Трис-HCl-буфера (pH 8.2), содержащего 0.15 М NaCl, и добавляли 0.1 мл раствора тромбина с активностью 4000 NIH/мг. Ферментативную реакцию проводили и анализировали как указано выше для трипсина. Пробы отбирали через 1, 6 и 24 ч.

Авторы выражают свою признательность В.А. Солоденко (ИБОНХ НАН Украины) за предоставленный рацемат фосфоаланина и И.П. Шишкиной (ИБОНХ НАН Украины) за анализ синтезированных соединений при помощи ВЭЖХ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fenton J.W., Offosu F.A., Moon D.G., Maraganore J.M. // Blood Coagul. Fibrinol. 1991. V. 2. P. 69–75.
2. Максименко А.В. // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 1373–1383.
3. Fenton J.W. // Serine Proteases and Serpine Inhibitors in Nervous System / Ed. B.W. Festoff. N.Y.: Plenum Press, 1990. P. 3–7.
4. Hageman N.C., Scheraga H.A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1974. V. 164. P. 707–716.
5. Liem R.K.H., Scheraga H.A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1973. V. 158. P. 387–395.
6. Liem R.K.H., Scheraga H.A. // Arch. Biochem. and Biophys. 1974. V. 160. P. 333–339.
7. Bajusz S., Szell E., Bagdy D., Barabas E., Horvath G., Dioszegi M., Fittler Z., Szabo G., Juhasz A., Tomori E., Szilagyi G. // J. Med. Chem. 1990. V. 33. P. 1729–1735.
8. Pozsgay M., Szabo G.C.S., Bajusz S., Simonsson R., Gaspar R., Elodi P. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 115. P. 491–495.
9. Qiu X., Padmanabhan K.P., Carperos V.E., Tulinsky A., Kline T., Maraganore J.M., Fenton J.W. II. // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 11689–11697.
10. Le Bonniec B.F., Myles T., Jonhson T., Knight C.G., Tapparelli C., Stone S.R. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 7114–7122.
11. Пояркова С.А., Кибирев В.К., Серебряный С.Б. // Укр. биохим. журн. 1987. Т. 59. № 5. С. 5–11.
12. Bode W., Mayr I., Baumann U., Huber R., Stone S.R., Hofsteenge J. // EMBO J. 1989. V. 8. P. 3467–3475.
13. Швачко Л.П., Пояркова С.А., Костюченко Н.В., Кибирев В.К. // Укр. биохим. журн. 1992. Т. 64. № 4. С. 34–37.
14. Пояркова С.А., Храпунов А.Н., Драган А.И., Кольчева М.П. // Биополимеры и клетка. 1992. Т. 8. С. 20–30.
15. Пояркова С.А., Кибирев В.К., Серебряный С.Б. // Укр. биохим. журн. 1986. Т. 58. № 6. С. 3–8.
16. Ayala Y., Di Cera E. // J. Mol. Biol. 1994. V. 5. P. 733–746.
17. Das J., Kimball S.D. // Bioorg. Med. Chem. 1995. V. 8. P. 999–1007.
18. Клесов А.А., Цетлин В.И. // Биоорганич. химия. 1977. Т. 3. С. 1523–1538.
19. Bystrov V.F., Portnova S.L., Balashova T.A. // Tetrahedron Lett. 1969. V. 60. P. 5283–5286.

20. Карабут Л.В., Тетко И.В., Пояркова С.А. // Доповіді НАН України. 1995. № 6. С. 113–116.
21. Shemyakin M.M., Ovchinnikov Y.A., Ivanov V.T. // *Angew. Chem.* 1969. В. 86. S. 523–529.
22. Aminophosphonic and Aminophosphinic Acids. Chemistry and Biological Activity / Eds V.P. Kukhar, H.R. Hudson. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., 2000.
23. Hildebrand R.L., Curley-Joseph J., Lubansky H.I., Henderson T.O. // *Interscience.* 1983. V. 11. P. 297–338.
24. Prajer K., Rachon J. // *Z. Chem.* 1975. В. 15. S. 209–215.
25. Кухарь В.П., Солоденко Н.М., Солоденко В.А. // Укр. биохим. журн. 1988. Т. 60. № 6. С. 95–111.
26. Bartlett P.A., Zamden Z.A. // *Bioorg. Chem.* 1986. V. 14. P. 356–377.
27. Cheng L., Goodwin C.A., Scully M.F., Kakkar V.V., Clae-son G. // *Tetrahedron Lett.* 1991. V. 32. P. 7333–7336.
28. Badet V., Ynagaki K., Soda K., Walsh C.T. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 3275–3282.
29. Кухарь В.П., Солоденко В.А. // Успехи химии. 1987. Т. 56. С. 1504–1532.
30. Хомутов Р.М., Осипова Т.И., Жукова Ю.Н., Гандурина И.А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1979. № 12. С. 2118–2122.
31. Белов Ю.П., Даванков В.А., Цырякин В.А., Рогожин С.В. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1975. № 10. С. 1619–1620.
32. Филатова М.П., Крит Н.А., Сучкова Г.С., Равдель Г.А., Иванов В.Т. // Биорган. химия. 1975. Т. 1. С. 437–441.
33. Galushko S.V., Shishkina I.P., Poyarkova S.A. // *Column Liquid Chromatography.* May 9–14, 1993. Congress Centrum, Hamburg, Germany.
34. Клесов А.А., Березин И.В. // Биохимия. 1972. Т. 37. С. 170–183.
35. Пояркова С.А., Кибирев В.К., Серебряный С.Б. // Химия природн. соед. 1978. № 3. С. 423–424.

Synthesis and Antithrombin Activity of Phosphoalanine-Containing Peptides

S. A. Poyarkova[#], O. D. Fedoryak, V. K. Kibirev, and V. P. Kukhar[']

[#] Phone: 380 (44) 573-2728, e-mail: Spoyar@bpci.kiev.ua

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, ul. Murmanskaya 1, Kiev-94, 02094 Ukraine

Boc/Tos-*L*-Phe-*L*-Arg-*Xaa* tripeptides (where *Xaa* = *L*-Ala-OBu^t, *L*-Ala, or *DL*-Ala^P(OC₂H₅)₂) were synthesized by conventional methods of peptide synthesis in solution. Special features of their interaction with thrombin and trypsin were studied. Unlike trypsin, thrombin did not catalyze the hydrolysis of the *L*-Arg-*L*-Ala^P(OC₂H₅)₂ bond. The Tos-*L*-Phe-*L*-Arg-*DL*-Ala^P(OC₂H₅)₂ peptide was the most active inhibitor of thrombin among all the compounds studied. The relationship between the structure and inhibitory action of the synthesized peptides is discussed. A part of this study was reported in the Augustusburg Conference of Advanced Science: Nucleic Acids–Targets and Tools, September 17–19, 2000, Germany. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: inhibitors, peptides, phosphoamino acids, thrombin