

# ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.152.344 + 547.962

## РОЛЬ ЗАРЯДА И ГИДРОФОБНЫХ ЭФФЕКТОВ В РЕАКЦИЯХ ПЕПТИДНЫХ СУБСТРАТОВ И ИНГИБИТОРОВ С ТРОМБИНОМ

А. А. ПОЯРКОВ, В. В. ПРОКОПЕНКО, С. А. ПОЯРКОВА

Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;  
e-mail: alexp@bpci.kiev.ua

Проведен анализ взаимодействия тромбина с синтетическими пептидными субстратами и ингибиторами, различающимися гидрофобностью и объемом бокового заместителя аминокислоты, локализованной в подцентрах субстрата P2 и P3. Оценены кинетические параметры индивидуальных стадий энзимного процесса ( $K_s$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ). Показано, что скорость стадий ацилирования и деацилирования энзимной реакции снижается с увеличением гидрофобности заместителя в P2 и P3, а сродство пептида к энзиму возрастает. Для оценки гидрофобности соединений рассчитаны  $\text{Log}P$  и проведено сравнение этих значений со значениями  $K_i$ . Сравнительный кинетический анализ Z-Arg-OMe и его незаряженного аналога Z-Cit-OMe показал, что при отсутствии гидролиза незаряженного аналога, он ингибирует гидролиз тромбином заряженного аналога. Эти исследования подтверждают важность гидрофобных остатков в структуре ингибиторов тромбина.

*Ключевые слова:* тромбин, пептиды, субстраты, ингибиторы, константы ацилирования и деацилирования,  $\text{Log}P$ .

Протеолитические энзимы, участвующие в расщеплении пептидов и протеинов и выполняющие разнообразные регуляторные функции, постоянно являются предметом фундаментальных и прикладных исследований [1]. Особенно это относится к тромбину (3.4.21.5), который признан в настоящее время наиболее удобной мишенью для создания ингибиторов сериновых протеиназ трипсиноподобного действия [2]. Тромбин играет первостепенную роль в процессах тромбообразования и остановки кровотечений. В каскаде энзимных реакций, обуславливающих гемостаз, ключевыми являются как взаимодействие тромбина с фибриногеном, которое сопровождается отщеплением фибринопептидов А и В и образованием фибрин-мономера, так и индуцируемая тромбином агрегация тромбоцитов. Фибрин-мономер способен к спонтанной полимеризации и образованию фибрин-полимера – основы кровяного сгустка [3]. Этот протеин вместе с агрегатами тромбоцитов образует основу своеобразной гемостатической «пробки», которая препятствует вытеканию крови из поврежденного кровеносного сосуда. В ходе этих превращений тромбин проявляет удивительную субстратную

специфичность. Он катализирует расщепление фибриногена всего лишь по двум Arg-Gly связям из 181-ой пептидной связи, типа Arg-X и Lys-X, которые потенциально могут расщепляться тромбином [4]. Физико-химическая природа узкой специфичности тромбина во многом стала понятной благодаря изучению кинетики энзимного гидролиза синтетических и природных субстратов и их фрагментов [5–8], а также благодаря исследованию трехмерной структуры комплексов тромбина с низкомолекулярными пептидами или с олигопептидными фрагментами и аналогами субстратов и ингибиторов [9–11].

Согласно данным рентгеноструктурного анализа, на дне первичного кармана связывания S1 тромбина находится отрицательно заряженный остаток аспарагиновой кислоты Asp189 (нумерация по химотрипсину), который осуществляет ион-ионные взаимодействия с положительно заряженной гуанидиновой группой аргинина пептидного субстрата или ингибитора, а также образует соответствующие водородные связи. Архитектура этого кармана практически аналогична структуре соответствующего кармана трипсина быка [12]. Отличие заключается лишь в том, что у

тромбина имеет место замена аминокислоты Ser190 на остаток Ala190. По сравнению с трипсином это приводит к небольшому увеличению размеров и к росту гидрофобности кармана S1 тромбина. Недалеко от данного подцентра находится аполярная область S3, строение которой определяется такими остатками как Ile 174, Trp 215, His 57, Tyr 60A и Trp 60D и пептидным сегментом Glu 97A – Leu 99 энзима. Этот связывающий центр участвует в гидрофобных взаимодействиях с субстратами и ингибиторами тромбина. Еще один аполярный карман, образованный остатками Ile 174, Trp 215, Tyr 60H, обуславливает контакты с лигандами тромбина не только за счет гидрофобных взаимодействий, но и благодаря  $\pi$ - $\pi$  взаимодействиям ароматических ядер тромбина и субстрата, плоскости которых располагаются при этом перпендикулярно друг другу. Указанная аполярная зона является так называемым «арильным» связывающим центром тромбина [13]. Помимо указанных гидрофобных и электростатических взаимодействий при реакции тромбина с различными соединениями немаловажную роль играют также водородные связи. Например, в комплексе тромбина со специфическим ингибитором D-фенилаланилпролил-аргинин-хлорметилкетон (PPACK) возникают следующие водородные связи: а) между NH-группой аргинина ингибитора и СО-группой остатка Ser 214 энзима; б) между гуанидиновой группой аргинина ингибитора и карбоксильной группой остатка Asp 189 тромбина; в) N-концевая аминокислотная группа D-фенилаланина образует соответствующие водородные связи с остатком Gly 216, наконец, кислород C-концевого карбонила ингибитора, находясь в так называемой «оксианионной впадине» дает две водородные связи с NH-группами Gly 193 и Ser 195 энзима. Указанные водородные связи вносят заметный вклад в стабилизацию соответствующего переходного состояния катализируемой реакции [6,14].

Однако далеко невыясненным остается вопрос, на какой именно стадии энзимной реакции существенны гидрофобные контакты, а на каком этапе важны кулоновские взаимодействия или образование водородных связей. В связи с тем, что энзимная реакция представляет собой многостадийный процесс, корректная интерпретация зависимости структура – реакция способность возможна лишь в том случае, если для соответствующего анализа используются значения кинетических параметров, характеризующие отдельные (индивидуальные) стадии этой реакции.

Поскольку рентгеноструктурные исследования дают лишь статическую картину, наблюдаемую для энзимов в кристаллическом состоянии, желательно использовать другую технику, например методы энзимной кинетики, позволяющие получать информацию и создавать разнообразные динамические модели функционирования энзимов в растворах. В свою очередь такой подход к изучению субстратоподобных ингибиторов энзимов, какими, по сути, являются большинство природных протеиновых ингибиторов, позволит создать их более эффективные формы.

Настоящее исследование посвящено изучению методов энзимной кинетики поведения эфиров аргининсодержащих дипептидов, которые в подцентре P2, P3 имеют остатки аминокислот, различающихся по гидрофобности, размерам бокового заместителя и стерическим характеристикам.

### Методы исследования

**Реактивы.** В работе использовали реактивы фирмы Merck (Германия), тромбин человека (активность 3000 НИЕ-ед./мг, выделенный в нашей лаборатории по методу Фентона [15]), растворители марки хч или осч. Температуру плавления синтезированных соединений определяли на малогабаритном столике (Koffler Voetius, Германия).

Контроль реакции и чистоту продуктов определяли при помощи ТСХ на пластинках с силикагелем Silica gel 60 F254 (Merck, Германия) в системе растворителей: н-бутанол - уксусная кислота - вода (4 : 1 : 1, (А)), хлороформ - метанол (8 : 2, (Б)).

**Синтез.** Методы синтеза и физико-химические характеристики стереоизомеров Tos-Val-Arg-OMe представлены в работе [7], ди- и тетрапептиды, содержащие фторфенилаланин, описаны в работах [16] и [17] соответственно. Стереоизомеры дипептидов Tos-Ala-Arg-OMe были синтезированы аналогично. Эти соединения имеют следующие характеристики:

*Метилловый эфир тозил-L-аланил-L-аргинина* (1) получен с выходом 95%, Тпл. 42–48 °С; Rf (А) = 0,53;  $[\alpha]_D^{25} = -66,5$  (с=1%, MeOH) Найдено %: С 44,01; Н 5,9; N 15,05; S 6,88. C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S·HCl. Вычислено %С 45,38; Н 6,27; N 15,56; S 7,13.

*Метилловый эфир тозил-D-аланил-L-аргинина* (2) получен с выходом 90%, Тпл. 70–72 °С; Rf (А) = 0,55;  $[\alpha]_D^{25} = +53,0$  (с=1%, MeOH). Найдено %: С 44,21; Н 5,75; N 15,15; S 7,01. C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>S·HCl·H<sub>2</sub>O. Вычислено % С 43,63; Н 6,46; N 14,97; S 6,85.

*Метиловый эфир бензилоксикарбонил-L-аргинина* (16) получали обработкой бензилоксикарбонил L-аргинина хлористым тионом в абсолютном метаноле интенсивно перемешивая при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Продукт кристаллизовали из абсолютного метанола. Выход 90%, Тпл.  $48\text{--}50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $R_f(A) = 0,56$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -53,0$  ( $c=1\%$ , MeOH).

*Метиловый эфир бензилоксикарбонил-L-цитруллина* (17). К охлажденному до  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  раствору 1 г (3,23 ммоль) бензилоксикарбонил L-цитруллина в 10 мл абсолютного метанола, прибавляли при интенсивном размешивании по каплям 0,25 мл (3,5 ммоль) свежеперегнанного хлористого тионила. Температуру реакционной смеси медленно поднимали до комнатного значения и раствор размешивали еще в течение 12 часов, затем метанол удаляли на роторном испарителе в вакууме и пропускали через колонку ( $2\times 15\text{ см}$ ), заполненную окисью алюминия (рН 8, активность по Брокману II), продукт вымывали метанолом. Получено 0,7 г (64%). Тпл.  $155\text{--}156\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $R_f(A) = 0,70$ ;  $R_f(B) = 0,51$ ;  $[\alpha]_D^{25} = -17,0$  ( $c=1\%$ , MeOH). Найдено %: С 53,93; Н 6,26; N 12,31;  $C_{15}H_{21}N_3O_5$ . Вычислено %: С 55,72; Н 6,55; N 12,99.

*N-Оксисукцинимидный эфир дансил-пролина*. К раствору 3,9 г (11,2 ммоль) дансил-пролина в 30 мл абсолютного тетрагидрофурана прибавляли 1,3 г (11,2 ммоль) N-гидроксисукцинимид, раствор охлаждали до  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  и прибавляли к нему 2,3 г (11,2 ммоль) дициклогексилкарбодиимида. Смесь перемешивали на магнитной мешалке 4 часа при  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  и затем оставляли на ночь при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, растворитель упаривали в вакууме водоструйного насоса при  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Продукт был получен путем кристаллизации из изопропилового спирта в количестве 4,16 г (83% от теор.). Тпл.  $175\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -50$  ( $c=1\%$ , ДМФА).  $R_f = 0,33$  в системе бензол-этилацетат (5 : 4). Найдено %: С 56,65; Н 5,30; N 9,34; S 6,98  $C_{21}H_{23}N_3SO_6$ . Вычислено %: С 56,62; Н 5,20; N 9,43; S 7,12.

*Дансил-пролил-аргинин*. К раствору N-оксисукцинимидного эфира дансил-пролина в 25 мл ДМФА прибавляли 1,5 г (8,6 ммоль) аргинина в 4 мл воды и размешивали 24 часа при  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . По окончании реакции, ДМФА и воду отгоняли на ротационном испарителе при  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Остаток кристаллизовали из n-бутанола. Выход 4,3 г (99% от теор.). Тпл.  $103\text{--}104\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -50$  ( $c=1\%$ ,  $H_2O$ )  $R_f(A) = 0,18$ . Найдено %: С 54,48; Н 6,42; N 16,56.  $C_{23}H_{32}N_6SO_5$ . Вычислено %: С 54,74; Н 6,39; N 16,65).

*Метиловый эфир дансил-пролил-аргинина* (7). К раствору 1,97 г (3,0 ммоль) дансил-про-

лил-аргинина в 20 мл метанола, охлажденному до  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  при энергичном перемешивании прикапывали 0,3 мл (4,2 ммоль) хлористого тионила. Температуру реакционной смеси медленно поднимали до  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  и перемешивали на магнитной мешалке 18 часов при комнатной температуре. По окончании реакции растворитель удаляли в вакууме водоструйного насоса при  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Остаток очищали путем пропускания раствора пептида через колонку, заполненную оксидом алюминия ( $2\times 25\text{ см}$ ) Выход целевого продукта в виде хлористоводородной соли 1,74 г (80% от теор.). Тпл.  $113\text{--}114\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -42$  ( $c=1\%$ ,  $H_2O$ )  $R_f(A) = 0,36$ . Найдено %: С 50,01; Н 6,55; N 14,68; S 5,68.  $C_{24}H_{34}N_6SO_5\times HCl\times 2H_2O$ . Вычислено %: С 48,76; Н 6,65; N 14,22; S 5,42.

*Изопропиловый эфир дансил-пролил-аргинина* (8) получали аналогично метилому эфиру. Реакцию вели в изо-пропанол. Выход составил 73%. Тпл.  $108\text{--}109\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{25} = -76$  ( $c=1\%$ , метанол)  $R_f(A) = 0,33$ . Найдено % : С 52,04; Н 6,89; N 13,70; S 5,21.  $C_{26}H_{38}N_6SO_5\times HCl\times 2H_2O$ . Вычислено %: С 50,43; Н 7,00; N 13,57; S 5,18.

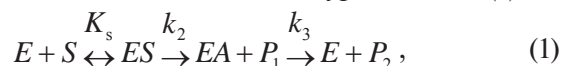
**Определение кинетических параметров гидролиза субстратов тромбином.** Скорость энзимного гидролиза исследуемых субстратов определяли потенциометрическим титрованием в условиях стационарной кинетики [8]. Концентрации субстратов в опыте варьировали от 0,05 до 0,5 мМ.

**Определение свертывающей активности тромбина** осуществляли в соответствии с методикой, описанной в работе [18]. Исходный раствор тромбина готовили таким образом, чтобы время свертывания 0,1%-го раствора фибриногена (Sevva, Германия, М.м. 350 тыс., 90% свертываемого протеина) в стандартных условиях составляло 15–20 с. Изучение влияния исследуемых соединений на активность тромбина проводили в следующих условиях. К 0,5 мл 0,2%-ного раствора фибриногена ( $2,86\times 10^{-6}\text{ М}$ ) в трис-НСI буфере рН 7,3 (0,05 М трис, содержащий 0,15 М хлористого натрия и 0,66% полиэтиленгликоля (Sevva, Германия, М.м. 6000) прибавляли 0,5 мл раствора ингибитора различной концентрации в том же буфере. Смесь термостатировали 5 мин при  $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ , затем прибавляли 20 мкл исходного раствора тромбина ( $1,7\times 10^{-9}\text{ М}$ ) и отмечали время, необходимое для образования сгустка. Время свертывания фибриногена определяли три раза для 5–6 различных концентраций пептида. Значение  $IC_{50}$  вычисляли из графика зависимости  $(\tau - \tau_0)/\tau_0$  от [I], где  $\tau_0$  – время свертывания фибриногена в

отсутствии ингибитора;  $\tau$  – время свертывания фибриногена в присутствии исследуемого соединения;  $[I]$  – концентрация пептида.

**Кинетические уравнения и преобразования.**

Анализ кинетики катализируемого тромбином гидролиза синтезированных соединений осуществляли в соответствии с уравнением (1)



учитывающем три кинетически значимые стадии энзимной реакции [19, 20]. Скорость этого процесса определяется уравнением Михаэлиса–Ментен [21]:

$$v_0 = \frac{k_{кат} \cdot [E_0] \cdot [S_0]}{K_{m(каж)} + [S_0]}, \quad (2)$$

где  $E_0$  и  $S_0$  начальная концентрация энзима и субстрата соответственно, а кинетические параметры  $k_{кат}$  и  $K_{m(каж)}$  связаны с параметрами индивидуальных стадий энзимной реакции ( $K_s$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ) соотношениями (3 а и б):

$$а) k_{кат} = \frac{k_2 \cdot k_3}{k_2 + k_3}; \quad б) K_{m(каж)} = K_s \frac{k_3}{k_2 + k_3}. \quad (3)$$

Значения  $k_{кат}$  и  $K_{m(каж)}$  определяли по начальной скорости и по полным интегральным кривым [20]. Среднеквадратичная ошибка, рассчитанная по 3–4 независимым опытам не превышала 15%. Было показано, что синтезированные соединения способны конкурентно ингибировать гидролиз фибриногена тромбином. В этом случае между величинами  $IC_{50}$  и  $K_i$  существует соотношение (4),

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S_0]}{K_m}\right), \quad (4)$$

которое позволяет легко вычислить значения  $K_i$  синтезированных соединений по экспериментально найденным величинам  $IC_{50}$ . Если теперь значения  $K_i$  характеризующие сродство синтезированных соединений к тромбину при ингибировании ими свертывающей активности энзима, рассматривать как величины  $K_s$ , определяющие сродство тех же соединений к тромбину при их расщеплении этим энзимом, то используя соотношение (3) можно оценить значения остальных индивидуальных кинетических параметров. Соответствующие расчеты проводились с использованием программы EXCEL.

**Результаты и обсуждение**

Для изучения влияния различных функциональных групп синтезированных соеди-

нений на особенности их взаимодействия с активным центром тромбина, а также для оценки вклада гидрофобности, заряда и других физико-химических характеристик субстрата в эффективность энзимной реакции, мы изучили серию дипептидов (1–8), трипептидов (9–10) и тетрапептидов (11–15) различающихся объемом, гидрофобностью и оптическими характеристиками аминокислотного состава, локализованного в подцентре P3–P2. Кроме того, были синтезированы и изучены метиловые эфиры бензилоксикарбонил производных аргинина и цитруллина (16–17), отличающиеся наличием или отсутствием положительного заряда бокового заместителя в подцентре P1. А также изучены субстратные и ингибиторные свойства, синтезированных ранее пептидных субстратов, содержащих L-, D-фторфенилаланин [17].

Полученные результаты представлены в таблице и отображены на диаграмме (таблица, диаграмма).

В таблице представлены экспериментальные значения кинетических параметров, характеризующие синтетические соединения, как субстраты ( $k_{кат}$  и  $K_{m(каж)}$ ) и как ингибиторы тромбина в реакции расщепления им фибриногена ( $IC_{50}$ ). Эти соединения являются конкурентными ингибиторами свертывающей активности тромбина и зная величину ( $IC_{50}$ ), легко вычислить значения  $K_i$  исследуемых пептидов по формуле (4). Если теперь величины  $K_i$ , определяющие их сродство к тромбину, рассматривать как  $K_s$ , то используя соотношение (3), можно оценить значения индивидуальных параметров  $k_2$  и  $k_3$ , характеризующих стадию ацилирования и деацилирования энзимной реакции.

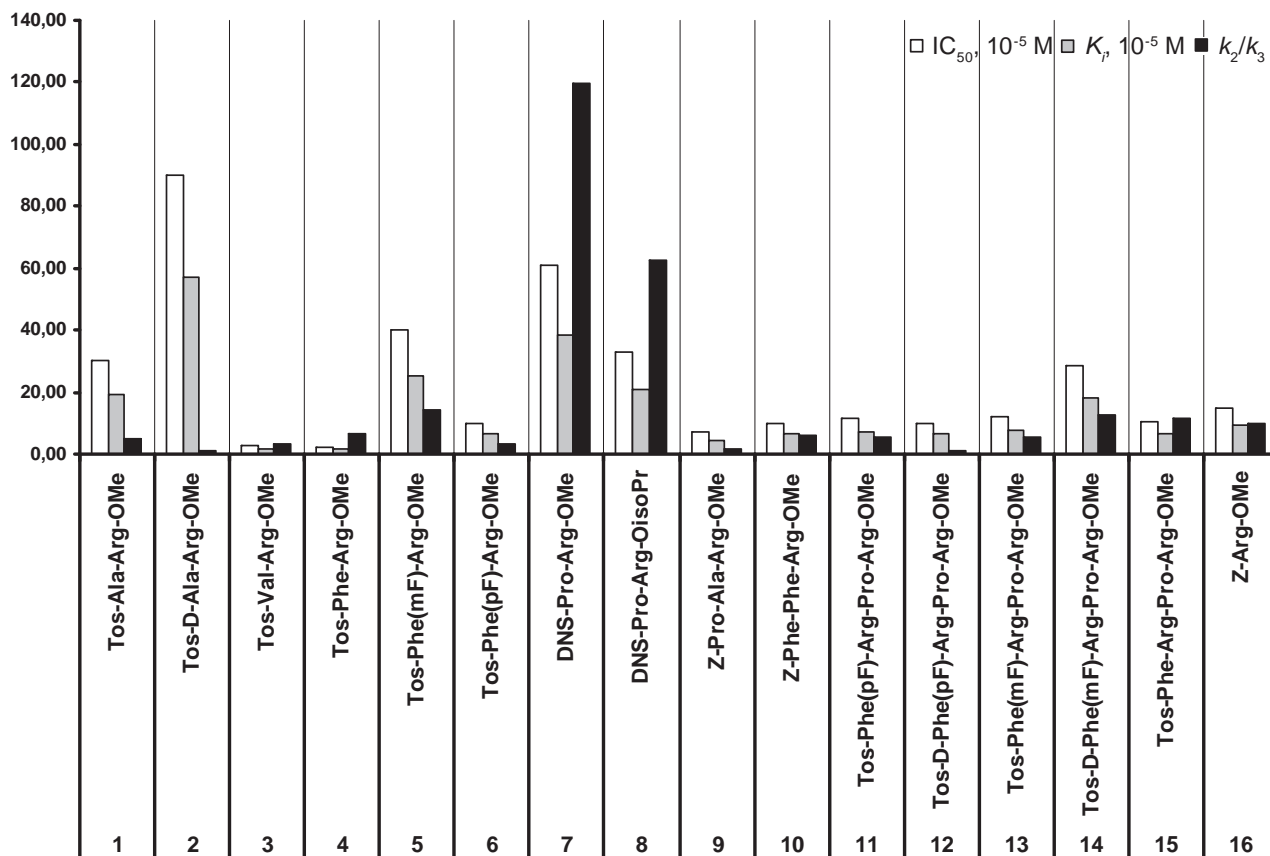
При вычислениях констант  $K_s$ ,  $k_2$  и  $k_3$ , необходимо знать величину  $K_m$  фибриногена. Мы использовали значение  $1,9 \times 10^{-6}$  М, приведенное в работе [22], поскольку условия определения  $IC_{50}$  в наших экспериментах (рН 7,0 и температура 29 °С) соответствуют описанным ранее условиям.

В работе были использованы метиловые эфиры дипептидов, так как скорость гидролиза этих производных регистрируется по образованию кислоты, и согласно уравнению (1), позволяет регистрировать образование второго продукта реакции P2, а следовательно дает возможность определить скорость освобождения продукта реакции, который осуществляет чрезвычайно важные взаимодействия с вторичным связывающим центром тромбина и позволяет оценить их вклад в связывание с ак-

Экспериментальные и вычисленные кинетические параметры гидролиза тромбозина трипептидных субстратов-ингибиторов

Формула	$K_m, 10^{-5} \text{ M}$	$k_{cat} \text{ c}^{-1}$	$IC_{50}, 10^{-5} \text{ M}$	$K_i(K_s), 10^{-5} \text{ M}$	$K_i/K_m$	$k_2/k_3$	$k_2$	$k_3$	LogP
Tos-Ala-Arg-OMe	3,15 ± 0,30	147,6 ± 15,0	30,0 ± 4,0	19,00	6,03	5,03	890,26	176,93	0,19 ± 0,72
Tos-D-Ala-Arg-OMe	27,3 ± 2,8	14,8 ± 1,6	90,0 ± 8,0	57,00	2,09	1,09	30,90	28,40	0,19 ± 0,73
Tos-Val-Arg-OMe	0,43 ± 0,04	65,0 ± 7,5	2,8 ± 0,3	1,77	4,12	3,12	268,05	85,81	1,06 ± 0,72
Tos-Phe-Arg-OMe	0,200 ± 0,015	7,00 ± 0,78	2,4 ± 0,3	1,52	7,60	6,60	53,20	8,06	2,28 ± 0,85
Tos-Phe(mF)-Arg-OMe	1,66 ± 0,17	15,3 ± 1,6	40,0 ± 3,5	25,33	15,26	14,26	233,49	16,37	2,33 ± 0,89
Tos-Phe(pF)-Arg-OMe	1,51 ± 0,14	11,3 ± 1,4	10,0 ± 1,2	6,33	4,19	3,19	47,39	14,84	2,33 ± 0,89
DNS-Pro-Arg-OMe	0,320 ± 0,035	24,0 ± 2,5	61,0 ± 6,3	38,63	120,73	119,73	2897,00	24,20	1,41 ± 0,72
DNS-Pro-Arg-OisoPr	0,33 ± 0,03	25,5 ± 2,6	33,0 ± 3,5	20,90	63,33	62,33	1614,95	25,91	2,28 ± 0,72
Z-Pro-Ala-Arg-OMe	1,760 ± 0,016	65,0 ± 6,0	7,00 ± 0,68	4,43	2,51	1,51	163,7	107,7	-0,18 ± 0,75
Z-Phe-Phe-Arg-OMe	0,90 ± 0,08	31,0 ± 3,5	10,00 ± 1,11	6,33	7,03	6,03	218,14	36,1	4,45 ± 1,20
Tos-Phe(pF)-Arg-Pro-Arg-OMe	1,17 ± 0,12	39,0 ± 4,0	11,6 ± 1,2	7,35	6,28	5,28	244,88	46,39	0,67 ± 1,18
Tos-D-Phe(pF)-Arg-Pro-Arg-OMe	3,30 ± 0,35	54,0 ± 5,0	10,0 ± 1,2	6,33	1,92	0,92	103,63	112,75	0,67 ± 1,19
Tos-Phe(mF)-Arg-Pro-Arg-OMe	1,22 ± 0,10	14,7 ± 1,4	12,00 ± 1,25	7,60	6,23	5,23	91,57	17,51	0,67 ± 1,18
Tos-D-Phe(mF)-Arg-Pro-Arg-OMe	1,35 ± 0,15	11,9 ± 1,1	28,6 ± 2,7	18,11	13,42	12,42	159,66	12,86	0,67 ± 1,18
Tos-Phe-Arg-Pro-Arg-OMe	0,53 ± 0,06	34,6 ± 3,5	10,3 ± 1,4	6,52	12,31	11,31	425,85	37,66	0,62 ± 1,14
Z-Arg-OMe	0,87 ± 0,09	26,5 ± 2,5	15,0 ± 1,5	9,50	10,92	9,92	289,36	29,17	0,62 ± 1,14
Z-Cit-OME	—	—	300,0 ± 35,0	190,00	—	—	—	—	1,33 ± 0,57

\*Значение  $K_i$  определенное по ингибированию гидролиза Z-Arg-OMe.



Діаграма залежності значень  $IC_{50}$ ,  $K$ ,  $k_2/k_3$  від структури сполучень

тивним центром. Використання хромогенних або флуорогенних субстратів для визначення інгібіторного ефекта сполучень відображає ефект затримання ензимної реакції по утворенню першого продукту реакції і не дозволяє розглянути вплив інгібітора на кожній кінетичній стадії цього процесу. Тем не менше, розуміння динаміки взаємодії інгібітора з ензимом дозволяє виділити домінуючі етапи в зв'язуванні ліганду з активним центром ензиму і при розробці нових інгібіторів, враховувати ці домінуючі взаємодії.

Аналіз отриманих даних, наведеної в таблиці і відображеної в діаграмі показав, що з підвищенням гідрофобності амінокислотного залишку в підцентрі P2 різко знижується ефективність як стадії ацилювання ( $k_2$ ), так і стадії деацилювання ( $k_3$ ) цими пептидами залишка серина активного центру тромбіна. С іншої сторони, зв'язування пептида з ензимом зростає в цьому ряду. Найкращими інгібіторами і субстратами є пептиди, що містять в підцентрі P2 залишки валіну і фенілаланіну. Заміна L-валіну на

його стереоізомер (D-Val) призводить до втрати здатності сполучення Tos-D-Val-L-Arg-OMe гідролізуватися тромбіном [6], тобто до проявлення вторинної стереоспецифічності; при цьому зв'язування пептида з ензимом знижується (за даними розрахованих значень  $K$ ) усього в 10 раз. Здатність стереоізомерних пептидів зв'язуватися з ензимом, але не розщеплюватися ним використовувалася для створення нових ефективних сорбентів для очищення препаратів тромбіна [23]. Важливо відзначити, що не тільки гідрофобність і L- або D-конфігурація амінокислотного залишку в положенні P2 грає важливу роль при зв'язуванні пептида з активним центром тромбіна, так і при гідролізі його ензимом, але і електронна густина бензольного кільця. Так при порівнянні ряду пептидів (4–6), що відрізняються наявністю фтору в мета- і пара-положенні бензольного кільця, виявилось, що введення фтору суттєво погіршує (приблизно в 5 раз) зв'язування ароматичного залишку з активним центром тромбіна, однак швидкість гідролізу при цьому збільшується, а інгібіторні властивості таких сполучень

нений ухудшаются. Интересно отметить, что скорость ацилирования соединением 5, содержащем фтор в метаположении резко возрастает и становится сравнимой со скоростью ацилирования валилсодержащего дипептида, в то время как введение фтора в пара положение существенно не влияет на скорость ацилирования этим соединением серина активного центра энзима. На основании этих данных можно предположить, что на связывание лигандов в активном центре тромбина влияют не только гидрофобность и конфигурация аминокислотного остатка в положении P2, но и насыщенность ароматического кольца электронами, которая значительно снижается при введении атома фтора. На основании этих данных можно предположить, что в связывании лиганда с активным центром тромбина принимают участие и  $\pi$ - $\pi$  взаимодействия в активном центре тромбина. Введение в положении P3, P2 субстрата/ингибитора остатка DNS-Pro приводит к увеличению связывания этих соединений соизмеримому с соединениями (3), (4), однако их ингибиторный эффект все же уступает на порядок упомянутым ранее соединениям. При этом скорость ацилирования серина активного центра возрастает в десятки раз. Удивительно, что для этих соединений наблюдается существенное отличие между  $K_s$  и  $K_m$  (каж), что указывает на то, что их значения  $K_m$  (каж) не отражают истинное значение констант связывания. Следует также отметить, что замена уходящей метильной группы на изопропильную увеличивает ингибиторный эффект вдвое, и во столько же раз снижается скорость ацилирования.

Увеличение длины пептидной цепи до трех аминокислотных остатков существенно не улучшает ингибиторный эффект соединений, однако введение двух остатков фенилаланина вместо последовательности пролил-аланина несколько улучшает связывание и замедляет гидролиз этих соединений тромбином.

Изучение субстратных и ингибиторных свойств тетрапептидов, отличающихся конфигурацией и наличием фтора в мета- или параположении бензольного кольца фенилаланина (соединения 11–15), показало, что связывание пептидов, содержащих фторфенилаланин почти в три раза хуже не фторированного аналога, что свидетельствует о существенной роли  $\pi$ - $\pi$  взаимодействий в активном центре тромбина.

На эффективность каталитической реакции, помимо гидрофобности вторичных связывающих центров P2 и P3 исследуемых пептидов, решающее влияние оказывают ионные

взаимодействия боковой цепи аминокислоты, находящейся в подцентре P1. Поскольку тромбин является трипсиноподобной протеазой, важнейшим элементом структуры этого остатка является наличие функциональной группы, несущей положительный заряд. В протеинах и пептидах указанным остатком является аргинин, гуанидиновая группа которого сохраняет положительный заряд в широких интервалах pH. В синтетических субстратах и ингибиторах тромбина используются такие положительно заряженные группы, как гуанидиновая, бензамидиновая, амидинопиперидиновая, амино-, циклогексиламиновая, которые способны взаимодействовать с остатком Asp189, находящегося на дне «кармана» первичного связывания S1 энзима. До недавнего времени большинство исследователей придерживалось того мнения, что короткие пептиды, не содержащие в подцентре P1 остаток аминокислоты с положительно заряженной боковой цепью, не могут взаимодействовать с тромбином. Поскольку тромбин обладает довольно протяженным вторичным аполярным связывающим центром, можно предположить, что за счет вторичных гидрофобных контактов некоторые нейтральные пептиды смогут достаточно эффективно связываться с энзимом. Действительно, были синтезированы и изучены соединения с нейтральной боковой группой в подцентре P1 и показано, что они обладают мощным ингибиторным эффектом [24–27].

В настоящей работе был синтезирован и изучен аналог субстрата Z-Arg-OMe, который вместо заряженной гуанидиновой группы, содержит незаряженную амидную группу, Z-Cit-OMe. Исследование влияния этого соединения на расщепление фибриногена тромбином показало, что его инактивирующее действие чрезвычайно слабое ( $IC_{50} = 300 \times 10^{-5}$  M). Однако ингибирование гидролиза Z-Arg-OMe, происходит значительно интенсивнее ( $K_i = 12,5 \times 10^{-5}$  M), причем как можно видеть из графиков ингибирования (рис. 1, 2) и данных, приведенных в таблице, константа ингибирования Z-Cit-OMe близка по значению к константе ингибирования Z-Arg-OMe ( $K_i = 15,0 \times 10^{-5}$  M).

Полученные данные можно объяснить следующим образом, поскольку фибриноген имеет дополнительные центры связывания с тромбином, помимо каталитического и близко расположенных связывающих центров, небольшие молекулы такие как Z-Cit-OMe и Z-Arg-OMe не могут охватить все необходимые участки связывания тромбина с фибри-

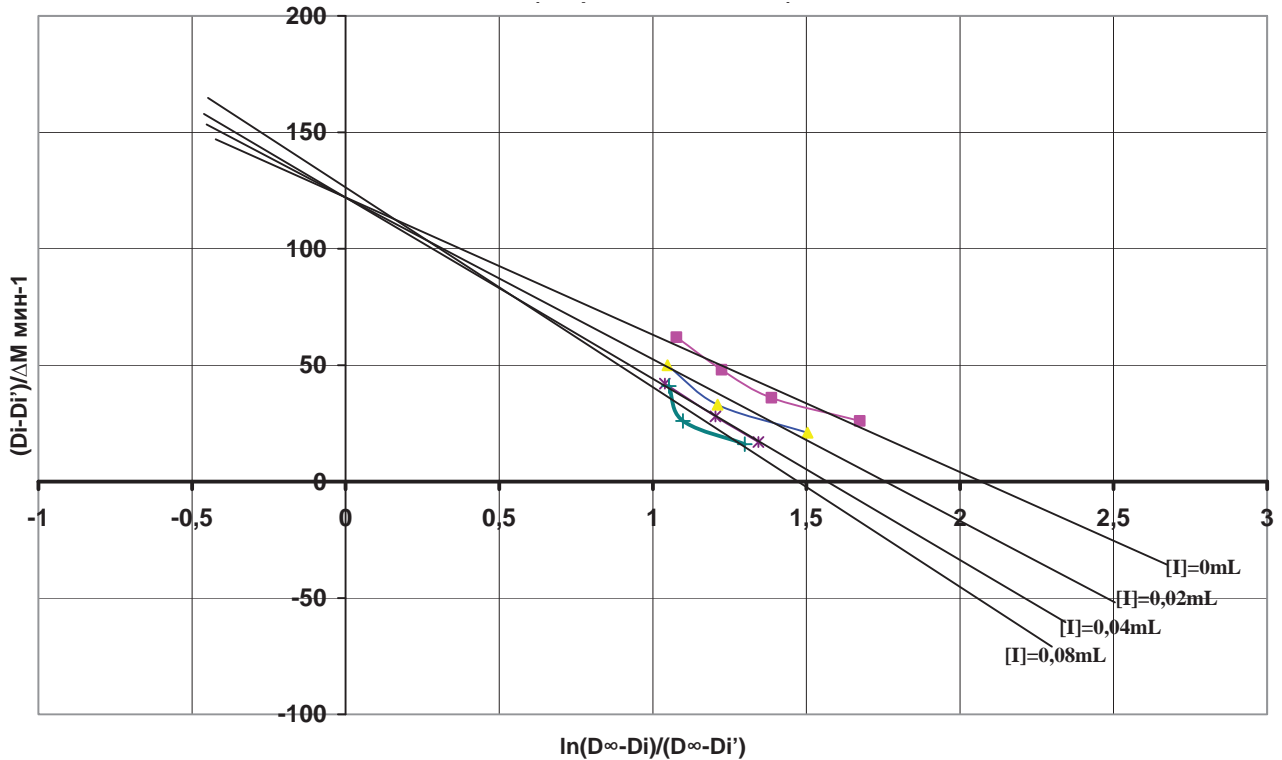


Рис. 1. График ингибирования гидролиза тромбином Z-Arg-OMe, незаряженным аналогом Z-Cit-OMe (координаты Клесова)

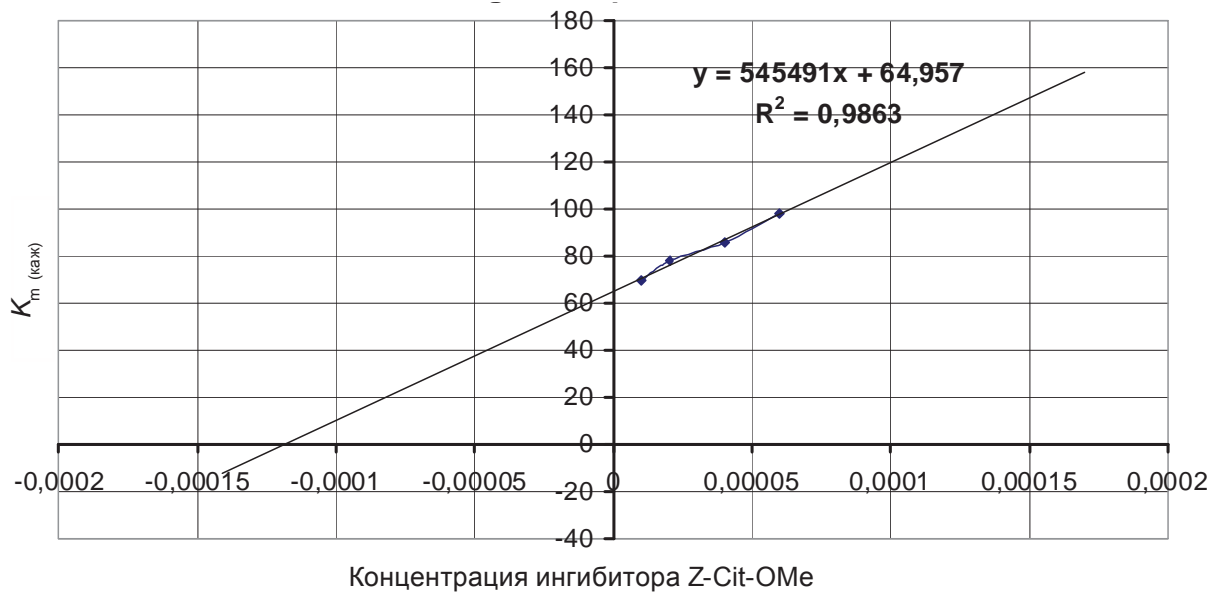


Рис. 2. Определение  $K_i$  Z-Cit-OMe по ингибированию реакции гидролиза Z-Arg-OMe тромбином

ногеном и слабо конкурируют с фибриногеном за связывание с тромбином. Тем не менее, эти две небольшие молекулы достаточно эффективно конкурируют друг с другом за связывание с тромбином. На основании этих данных можно сделать вывод, что вторичные взаимо-

действия с активным центром тромбина вносят более значительный вклад в константу ингибирования таких соединений, и при наличии достаточно мощных взаимодействий с гидрофобными и дополнительными центрами связывания энзима, можно получить эффек-



тивные ингибиторы. В частности, в последние годы синтезирован целый ряд медленно реагирующих, но прочно связывающихся с энзимом миметиков – аналогов переходного состояния на основе борной и фосфорной кислот [25, 26, 28], которые имеют константу ингибирования на пикомолярном уровне.

Как следует из наших исследований, когда за связывающий центр энзима конкурируют между собой низкомолекулярные субстраты/ингибиторы, вклад в связывание соединений Z-Cit-OMe и Z-Arg-OMe в основном определяется заместителем в P2 (в рассматриваемом случае это бензилоксикарбонильная группа), который в этом случае одинаков, о чем свидетельствуют значения  $K_i$  и  $K_m$  соответственно. Однако при ингибировании такими молекулами реакции тромбина с протеиновым субстратом фибриногеном, существенный вклад оказывает заряд аргинина в соединении Z-Arg-OMe, который, скорее всего включается не на стадии образования комплекса Михаэлиса, а на последующих каталитических стадиях взаимодействия энзима с субстратом, о чем свидетельствует более низкое значение  $IC_{50}$  этого соединения по сравнению с его незаряженным аналогом Z-Cit-OMe.

Для понимания сил, принимающих участие в связывании лиганда с тромбином, мы использовали в наших исследованиях рассчитанные значения LogP-коэффициента распределения [29]:

$$\text{LogP}_{\text{oct/wat}} = \log\left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{water}}^{\text{un-ionized}}}\right)$$

Значения LogP для описанных соединений были вычислены с помощью программного пакета ChemSketch ACD LogP, который показал лучшую корреляцию с экспериментальными данными. Указанный программный продукт был загружен с сайта <http://www.acdlabs.org>.

Коэффициент распределения лекарственного препарата сильно влияет на то, как легко он может достигать намеченной мишени в организме, и как долго он будет оставаться в организме в активной форме [30].

В контексте фармакокинетики, коэффициент распределения имеет большое влияние на свойства ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion – всасывание, распределение, метаболизм и выведение). Поэтому гидрофобность соединения является основным фактором, определяющим его как потенциальное лекарственное средство. Более конкретно, для того, чтобы препарат был пригоден для орального введения, он обычно дол-

жен сначала пройти через липидный бислой в кишечном эпителии (процесс, известный как трансцеллюлярный транспорт). Для эффективного транспорта, препарат должен быть, с одной стороны, достаточно гидрофобным для распределения в липидном бислое, а с другой, иметь возможность со временем покинуть его [31].

Кроме того, гидрофобность играет важную роль в определении, где в организме препараты распространяются после адсорбции и, как следствие, как быстро они метаболизируются и выводятся.

В контексте фармакодинамики гидрофобный эффект является основной движущей силой для связывания препаратов со своими целевыми рецепторами [32, 33]. С другой стороны, гидрофобные препараты имеют тенденцию к большей токсичности, потому что они в целом сохраняются дольше, имеют более широкое распространение в организме, несколько менее избирательно связываются с протеинами, и, наконец, часто экстенсивно метаболизируются. В некоторых случаях метаболиты могут быть химически активными. Поэтому желательно сделать препарат по возможности гидрофильным настолько это возможно, но чтобы он по-прежнему сохранял достаточное сродство к терапевтической протеиновой мишени [34]. Поэтому идеальный коэффициент распределения лекарств, как правило, имеет промежуточные значения (не слишком гидрофобных, ни слишком гидрофильных).

Сравнение значений LogP со значениями константы ингибирования  $K_i$  показало, что соединения (1) и (2), содержащие аланин в подцентре P2 и имеющие значения LogP = 0,19 обладают слабым ингибиторным эффектом, в то время как соединение (3), с остатком валина в этом положении имеет ингибиторное действие почти на порядок больше. Максимальным ингибиторным эффектом обладает соединение (4) с остатком фенилаланина в этом подцентре и имеющее значение LogP = 2,28. Соединение (8) с таким же значением LogP имеет константу ингибирования на порядок выше. Значения констант ингибирования соединений (6), (9–13), (15), имеют один порядок, однако нет корреляции со значениями LogP. На основании проведенного анализа, можно сделать вывод, что не всегда значения LogP могут коррелировать со способностью вещества ингибировать энзим. Однако некоторые предварительные данные можно получить используя этот параметр. Например, для ингибиторов исследованного ряда, можно сказать, что обещающи-

ми значеннями LogP будут его значения от 2 до 3. Однако, что и понятно, этот параметр не применим к стереоизомерам аминокислот и к аминокислотам, содержащим электронодонорные или электроноакцепторные заместители в ароматическом ядре.

### РОЛЬ ЗАРЯДУ І ГІДРОФОБНИХ ЕФЕКТИВ У РЕАКЦІЯХ ПЕПТИДНИХ СУБСТРАТІВ ТА ІНГІБІТОРІВ З ТРОМБІНОМ

*О. О. Поярков, В. В. Прокопенко,  
С. О. Пояркова*

Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;  
e-mail: alexp@bpci.kiev.ua

Проведено субстратний та інгібіторний аналіз взаємодії тромбіну із синтетичними пептидними субстратами та інгібіторами, які відрізняються гідрофобністю і обсягом бокового замісника амінокислоти, локалізованої в підцентрах субстрату P2 та P3. Оцінені кінетичні параметри індивідуальних стадій ензиматичного процесу ( $K_s$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ). Показано, що швидкість стадій ацилювання та деацилювання ензиматичної реакції знижується із збільшенням гідрофобності замісника в P2 і P3, а спорідненість пептиду до ензиму, зростає у тому ж ряду. Для оцінки гідрофобності сполук розраховано значення LogP та проведено порівняння його значень із значеннями  $K_i$ . Порівняльний кінетичний аналіз Z-Arg-OMe та його незарядженого аналога Z-Cit-OMe показав, що за відсутності гідролізу незарядженого аналога, він інгібує гідроліз тромбіном зарядженого аналога. Ці дослідження підтверджують важливість гідрофобних залишків у структурі інгібіторів тромбіну.

**Ключові слова:** тромбін, пептиди, субстрати, інгібітори, константи ацилювання та деацилювання, LogP.

### ROLE OF CHARGE AND HYDROPHOBIC EFFECTS IN REACTIONS OF PEPTIDE SUBSTRATES AND INHIBITORS WITH THROMBIN

*A. A. Poyarkov, V. V. Prokopenko,  
S. A. Poyarkova*

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: alexp@bpci.kiev.ua

#### Summary

A substrate and inhibitor analysis of the thrombin interaction with synthetic peptide substrates and inhibitors of differing hydrophobicity and volume of the side amino acid residue, localized in the sub-centers thrombin S2 and S3 were carried out. The kinetic parameters of individual stages of the enzymatic reaction process ( $K_s$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ) were estimated. It is shown that the efficiency of acylation and deacylation stages of the enzymatic reaction decreases with increasing hydrophobicity of the substituent in P2 as well as P3, at the same time the affinity of selected peptides toward enzyme is steadily increasing.

With the aim to evaluate the hydrophobicity of compounds a LogP value was calculated and was made an attempt to compare them with the correspondent  $K_i$  values. Comparative kinetic analysis of Z-Arg-OMe and its uncharged analogue Z-Cit-OMe has shown the absence of uncharged analog hydrolysis, however, the mentioned citrulline derivate inhibits the hydrolysis of the charged analogue. These findings confirm the important role of hydrophobic moiety in the structure of thrombin inhibitors in preferential binding mode and inhibition of thrombin active side.

**Key words:** thrombin, peptide, substrates, inhibitors, acylation and deacylation rate constants, LogP.

1. *Leung, D., Abbenante, G., Fairlie, D. P.* // *J. Med. Chem.* – 2000. – **43**. – P. 305–332.
2. *Fenton J. W., Ofosu F. A., Moon D. G., Maraganore J. M.* // *Blood Coagul Fibrinolysis.* – 1991. – **2** (1). – P. 69–75.
3. *Луговской Э. В.* Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. – К.: Наук. думка, 2003. – С. 219.
4. *Zien R. K. H., Scheraga M. A.* // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1973. – **158** (1). – P. 387–395.
5. *Liet R. K. H., Andreatta R. H., Scheraga H. A.* // *Ibid.* – 1971. – **147** (1). – P. 201–213.
6. *Пояркова С. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б.* // *Укр. биохим. журн.* – 1987. – **59**, № 5. – С. 5–11.
7. *Пояркова С. А., Кибирев В. К., Федоряк Д. М., Серебряный С. Б.* // *Биоорг. химия.* – 1979. – **5** (4). – С. 508–515.
8. *Пояркова С. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б.* // *Укр. биохим. журн.* – 1986. – **58**, № 6. – С. 3–8.
9. *Bode W., Mayr I., Baumann et al.* // *EMBO J.* – 1989. – **8**. – P. 3467–3475.
10. *Brandstetter H., Turk D., Hoeffken H. W.* // *J. Mol. Biol.* – 1992. – **1**. – P. 1085–1099
11. *Banner D. W., Harvary P.* // *J. Biol. Chem.* – 1991. – **266**. – P. 20085–20093.
12. *Bode W., Turk D., Karshikov A.* // *Protein Sci.* – 1992. – **1**. – P. 426–471.
13. *Bode W.* // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. – **3**. – P. 2379–2388.
14. *Maryanoff B. E.* // *J. Med. Chem.* – 2004. – **47** (4). – P. 767–787
15. *Fenton J. M.; Fasco M. J.; Stackrow M. J. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 1977 – **252**. – P. 3587–3598.
16. *Пояркова С. А., Колычева М. П., Драган А. И. и др.* // *Биополимеры и клетка* – 1992. – **8**, № 4. – С. 20–30.
17. *Пояркова С. А., Кухарь В. П.* // *Укр. хим. журн.* – 1994. – **60**, № 2. – С. 182–184
18. *Vaughtan D. J.* / In: *Methods in Enzymology* Academic Press, Inc. LTD. – 1970. – **19**. – P. 145–157.
19. *Клесов А. А., Березин И. В.* // *Биохимия* – 1972. – № 37. – С. 170–183.
20. *Клесов А. А., Березин И. В.* / *Ферментативный катализ* – М.: Изд-во МГУ, 1980. – **1**. – 263 с.
21. *Костерин С. О., Прилучкий Ю. I., Бориско П. О., Мирошниченко М. С.* // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 1. – С. 113–125
22. *Claeson G., Philipp M., Agner E.* // *Biochem. J.* – 1993. – **296**. – P. 309–312.
23. *Пат. 1527261 SU, Очистка тромбина методом аффинной хроматографии / Хага М., Аавиксаар А., Раба М., Пояркова С. А., Швачко Л. П.* – 1989. Оpubл. – *Chem. Abstr.* – 1990. – P. 113, 878
24. *Kettner C., Mersinger L., Knabb R.* // *J. Biol. Chem.* – 1996. – **265**. – P. 18289–18297
25. *Rupin A., Menecier P., Lila C. et al.* // *Thromb. Haemost.* – 1997. – **78**. – P. 1221–1227.
26. *Elgendy S., Deadman J. J., Pate L. G. et al.* // *Tetrahedron Lett.* – 1992. – **33**. – P. 4209–4212.
27. *Deadman J. J., Elgendy S., Goodwin C. A. et al.* // *J. Med. Chem.* – 1995. – **38**. – P. 1511–1522.
28. *Kettner C. C., Kettner L., Mersinger R. J.* // *Biol. Chem.* – 1990. – **265**. – P. 18289–18297.
29. *Leo A., Hansch C., Elkins D.* // *Chem. Rev.* – 1971. – **71** (6). – P. 525–616.
30. *Kubinyi H.* // *Farmacolo Sci.* – 1979. – **34**. – P. 248–276.
31. *Eisenberg, D., McLachlan A. D.* // *Nature.* – 1986. – **319** (6050). – P. 199–203.
32. *Miyamoto S., Kollman P. A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1993. – **90** (18). – P. 8402–8406.
33. *Pliska V., Testa B., Van De Waterbeemd H.* / *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology* New York: John Wiley & Sons Ltd. – 1996. – P. 439
34. *Cronin M. T.* // *Curr. Computer – Aided Drug Design.* – 2006. – **2**. – P. 405–413.

Отримано 07.09.2011