



УДК 577.112.6+547-327

МИМЕТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ Arg-Gly-Asp: СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАГРЕГАЦИОННЫХ СВОЙСТВ

© 2021 г. О. В. Грибовская*, #, В. П. Мартинович*, Е. В. Родько**, Е. Д. Расюк**, Т. В. Рябцева***, В. П. Голубович*

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Беларусь, 220141 Минск, ул. Ак. Купревича, 5/2

**ГУ “Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий”, Беларусь, 220053 Минск, Долгиновский тракт, 160

***ГУ “Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии”, Беларусь, 220116 Минск, ул. Семашко, 8

Поступила в редакцию 16.03.2021 г.

После доработки 27.03.2021 г.

Принята к публикации 29.03.2021 г.

Известно, что последовательность Arg-Gly-Asp в молекуле фибриногена — ключевая в связывании с рецепторами, находящимися на поверхности тромбоцитов. С целью поиска соединений, способных ингибировать данное взаимодействие, были синтезированы аналоги Arg-Gly-Asp-последовательности — 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp, 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp и 4-аминобензоил-βAla-Asp. Показано, что данные соединения способны в разной степени ингибировать агрегацию тромбоцитов. Наибольшую способность ингибировать агрегацию тромбоцитов показал 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp. Также установлено снижение экспрессии маркеров CD62p и CD63 на тромбоцитах при воздействии на них аналогов Arg-Gly-Asp, что подтверждает способность данных соединений блокировать сайты связывания фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами GP IIb/IIIa.

Ключевые слова: Arg-Gly-Asp-миметики, агрегация тромбоцитов, пептидный синтез, GP IIb/IIIa-рецептор, маркеры тромбоцитов

DOI: 10.31857/S0132342321060087

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания — основная причина смерти и инвалидности практически во всех развитых странах. Превалирующее количество летальных исходов приходится на инфаркт миокарда, вызываемый закупоркой сосудов тромбами. Образованию же тромбов чаще всего способствуют гликопротеиновые рецепторы тромбоцитов, поскольку конечным звеном в агрегации тромбоцитов оказывается связывание фибриногена с активированными GP IIb/IIIa-рецепторами тромбоцитов. GP IIb/IIIa-рецептор относится к суперсемейству структурно родственных гликопротеиновых рецепторов, состоящих из двух субъединиц: GP IIb или α_{IIb} (α-субъединица) и GP IIIa или β₃ (β-субъединица), присутствующих в различных клетках и названных “интегринами” [1] или “цитoadгезинами” [2].

Сокращения: GP — гликопротеин; βAla — β-аланин; DIPС — *N,N'*-диизопропилкарбодиимид; TEA — триэтиламин; HOSu — *N*-гидроксисукцинимид; HOBt — *N*-гидроксисбензотриазол; ESI — ионизация распылением в электрическом поле; ОТП — обогащенная тромбоцитами плазма.

Автор для связи: (тел.: + 37517 374-82-63; эл. почта: olymelnik@yandex.ru).

Известно, что некоторые интегринны, включая GP IIb/IIIa, распознают общую аминокислотную последовательность — трипептид Arg-Gly-Asp. Эта последовательность присутствует в цепях большинства адгезивных гликопротеинов, выполняющих различные функции. Важность Arg-Gly-Asp-последовательности подтверждается ингибированием процесса адгезии гликопротеинов в присутствии коротких Arg-Gly-Asp-содержащих пептидов [3]. Несмотря на общий участок распознавания, интегринны высокоспецифичны во взаимодействии с различными гликопротеинами [1, 2].

К настоящему времени определены необходимые функциональные группы в структуре Arg-Gly-Asp-миметиков, участвующие в ионном и гидрофобном взаимодействии с рецептором [4].

Варьирование структуры Arg-Gly-Asp-последовательности [5, 6] позволяет получать соединения с различными физиологическими временами жизни. Известно, что низкомолекулярные Arg-Gly-Asp-содержащие пептиды и пептидомиметики нашли применение при наличии высокого и среднего риска ишемии при остром коронарном синдроме, при ангиопластике в комбинации с клопидогрелем [7, 8]. Например, эптифибатид

(интегрилин), Arg-Gly-Asp-подобный циклический гептапептид, отличается достаточно высокой специфичностью по отношению к GP IIb/IIIa и не оказывает существенного влияния на активность других интегринов [9, 10]. Было создано также несколько пептидомиметиков Arg-Gly-Asp-последовательности, ингибиторов GP IIb/IIIa, для перорального применения (ксемилофибан, орбофибан, сибрафибан, лотрафибан) [11]. Предполагалось использовать их с целью длительной профилактики тромбозов. К сожалению, многочисленные исследования данных веществ [12] не только не показали преимущества их перед аспирином, но даже выявили их высокую цитотоксичность. Это не дало оснований для их клинического применения.

Поэтому разработка новых ферментативно устойчивых, а значит — длительно действующих, Arg-Gly-Asp-пептидов и пептидомиметиков для орального применения важна для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и нарушений мозгового кровообращения.

Цель данного исследования состояла в получении новых аналогов аминокислотной последовательности Arg-Gly-Asp, способных ингибировать агрегацию тромбоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основой для создания миметиков последовательности Arg-Gly-Asp служил трипептид Arg-βAla-

Asp, как показано ранее, эффективный ингибитор агрегации тромбоцитов [13]. Для создания конъюгата с аспирином, способного блокировать тромбообразование по двум механизмам — ингибированию активации тромбоцитов тромбоксаном A₂ и прямому блокированию сайтов связывания гликопротеиновых рецепторов GP IIb/IIIa, был синтезирован 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V) — трипептид Arg-βAla-Asp, ацилированный по α-аминогруппе аргинина ацетилсалициловой кислотой, соединением, обладающим собственной антитромботической активностью.

Исходным соединением в синтезе миметиков Arg-Gly-Asp был дипептид Boc-βAla-Asp(OMe)-OMe (I), который получали конденсацией диметилового эфира аспарагиновой кислоты с защищенной аминокислотой Boc-βAla-OH. В качестве конденсирующего агента использовали *N,N*-дициклогексилкарбодиимид с добавлением *N*-гидроксисукцинимидоэфира ацетилсалициловой кислоты ацилировали α-аминогруппу аргинина. Модифицированный трипептид 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp(OMe)-OMe (IV) был получен конденсацией 2-ацетоксибензоил-аргинина с H-βAla-Asp(OMe)-OMe. Заключительная стадия синтеза — щелочной гидролиз сложноэфирных групп аспарагиновой кислоты. Синтез включает 6 стадий, общий выход соединения (V) составил 46%.

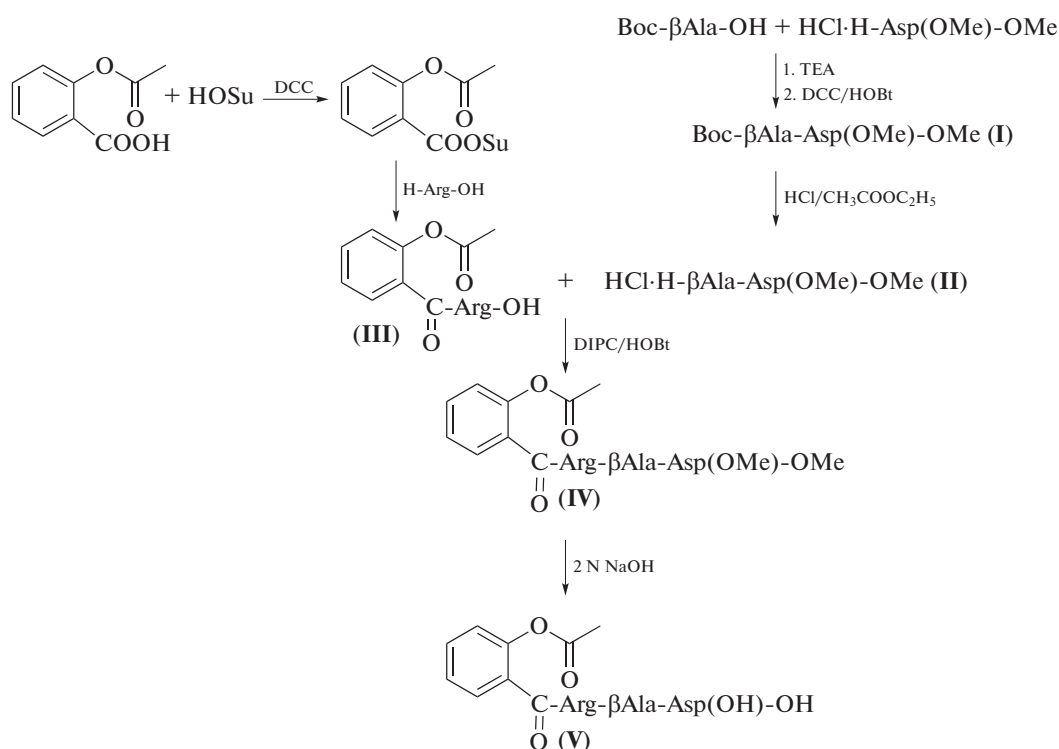


Схема 1. Схема синтеза 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp.

Опираясь на работы [14, 15], мы предположили, что замена аргинина в последовательности Arg-βAla-Asp на 4-пиперидинкарбоновую и 4-аминобензойную кислоты вызовет увеличение антитромботической активности соединений. Это можно объяснить тем, что циклические фрагменты структур пептидомиметиков, имитирующие боковую цепь аргинина, способствуют стабилизации необходимой для проявления биологической активности конформации.

Синтез соединения 4-аминобензоил-βAla-Asp (VIII) осуществляли по схеме 2. Конденсация Вос-производного 4-аминобензойной кислоты, полученного обработкой последней ди-трет-бутилдикарбонатом в водно-диоксановой смеси, с дипептидом HCl·H-βAla-Asp(OMe)-OMe (II) протекала с высоким выходом (86%). Деблокирование соединения (VI) проводили в две стадии – щелочным (для омыления сложноэфирных групп аспарагиновой кислоты) и кислотным гидролизом (для удаления кислотолабильной защитной Вос-группы).

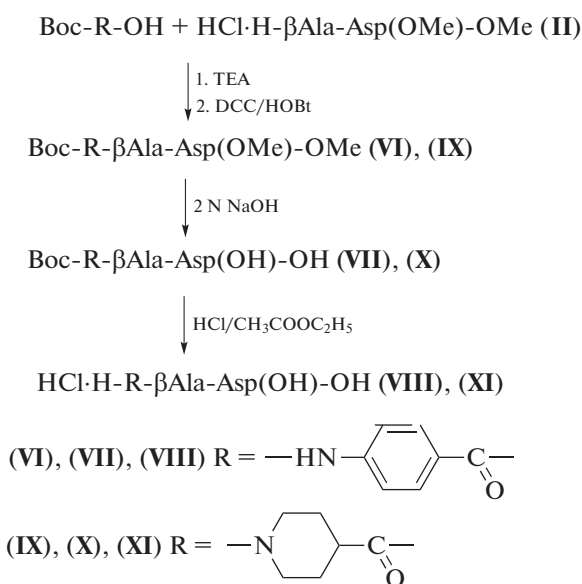


Схема 2. Схема синтеза 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp и 4-аминобензоил-βAla-Asp.

При синтезе 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI) использовали вышеописанные синтетические подходы. Суммарные выходы 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI) и 4-аминобензоил-βAla-Asp (VIII) составили 40 и 51% соответственно. Идентификацию целевых соединений выполняли методами масс-спектрометрии, ¹H-ЯМР-спектроскопии, гомогенность подтверждали методами ТСХ и аналитической ВЭЖХ.

Антиагрегационную активность полученных соединений изучали на богатой тромбоцитами плазме крови человека с использованием ADP в качестве индуктора агрегации тромбоцитов (рис. 1). Исследования показали, что все аналоги

последовательности Arg-βAla-Asp – 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V), 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI) и 4-аминобензоил-βAla-Asp (VIII) – способны в разной степени ингибировать агрегацию тромбоцитов, но все они более активны, чем исходный трипептид Arg-βAla-Asp.

Наибольшую способность ингибировать агрегацию тромбоцитов показало соединение 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V), при добавлении которого степень агрегации снижалась с 42.6 до 15.0% у первого и с 83.7 до 24.1% у второго донора.

Известно [16], что активация тромбоцитов связана с изменением экспрессии ряда поверхностных рецепторов. Для выявления активированных тромбоцитов при иммунофенотипировании чаще всего используют маркеры CD36 (рецептор тромбоспондина), CD61 (интегриновая цепь β3) и CD41 (α-цепь интегрин в комплексе CD61/CD41, известен также как GPIIb/IIIa, CD42a [GPIX], CD42b [GPIb] и CD62P (P-селектин). Эти гликопротеины экспрессируются тромбоцитами и мегакариоцитами, обеспечивая клеточную адгезию и связывание фибриногена, что приводит к агрегации тромбоцитов и их закреплению на эндотелии [17]. Так, P-селектин (CD62P) содержится в α-гранулах тромбоцитов и выступает кальций-зависимым белком, который во время активации тромбоцита перемещается к плазматической мембране, где он участвует во взаимодействии тромбоцитов с эндотелиальными клетками и лейкоцитами. Интегриновые рецепторы располагаются на мембране тромбоцитов в комплексе с тетраспонинами (CD9 и CD63), которые поддерживают трансдукцию сигнала и стабильную адгезию [18].

В подтверждение гипотезы о том, что полученные соединения – 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V), 4-пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI) и 4-аминобензоил-βAla-Asp (VIII) – способны напрямую блокировать сайты связывания гликопротеидных рецепторов GP IIb/IIIa, мы провели оценку экспрессии маркеров тромбоцитов после контакта и инкубации Arg-βAla-Asp-пептида и его аналогов с образцами клеточного тромбоконцентрата методом проточной цитофлуориметрии (BD FACSCantoII). Экспрессию оценивали, регистрируя процент тромбоцитов, связавшихся с флуоресцентно мечеными антителами относительно маркеров (табл. 1).

Полученные результаты – изменение экспрессии маркера CD62p, Δ% от 8.10 (для Arg-βAla-Asp) до 3.10 (для 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp) и маркера CD63, Δ% от 7.15 (для Arg-βAla-Asp) до 1.40 (для соединения (V)) – свидетельствуют о снижении экспрессии маркеров CD62p и CD63 на тромбоцитах при воздействии на них исследуемых веществ, подтверждая, что синтезированные соединения (V), (VIII) и (XI) способны бло-

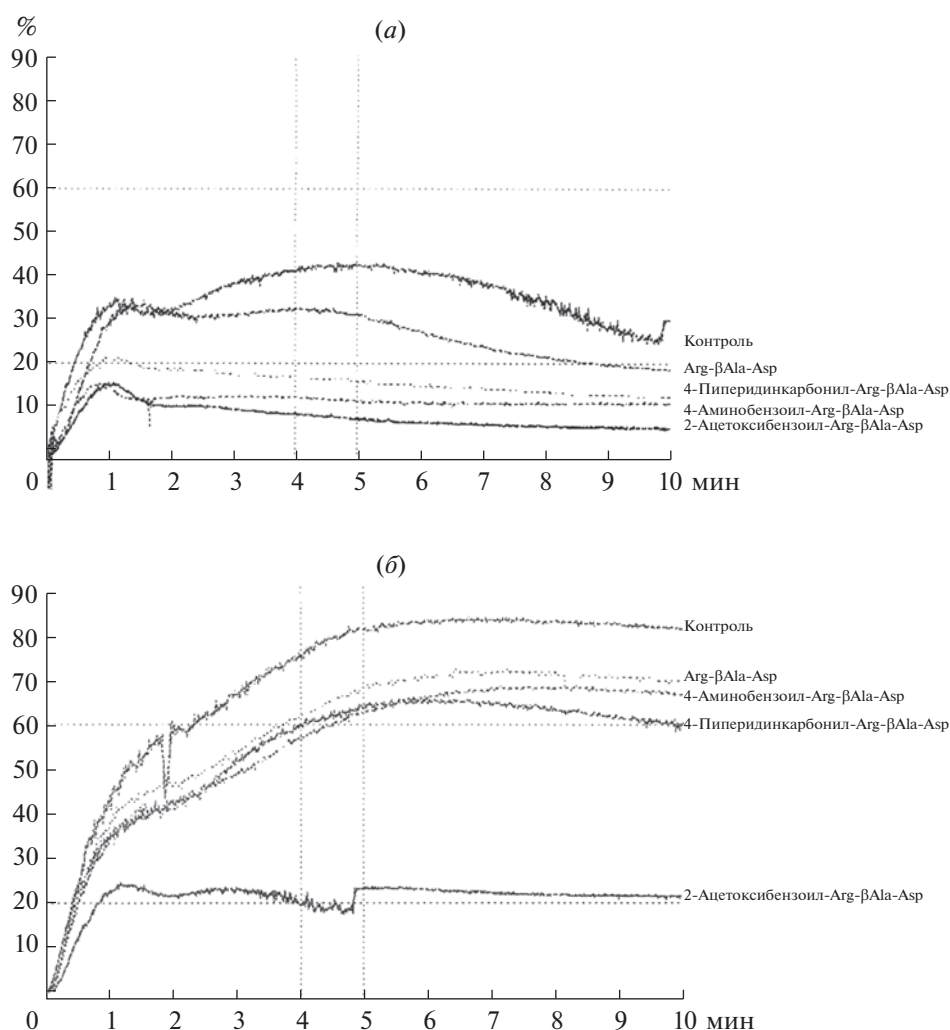


Рис. 1. Агрегация тромбоцитов в присутствии Arg-βAla-Asp и аналогов в концентрации 10^{-5} М в плазме первого (а) и второго (б) доноров.

кировать сайты связывания фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами GP IIb/IIIa. Незначительное снижение экспрессии маркера CD62p и CD63 на тромбоцитах при воздействии на них 2-ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V) скорее всего связано с тем, что немалую роль в ингибировании агрегации тромбоцитов играет способность данного соединения подавлять синтез тромбоксана A_2 – индуктора агрегации тромбоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы аминокислоты, реагенты, растворители (Sigma, США, Fluka, Швейцария, Acros Organics, Бельгия). Процессы синтеза соединений, удаления защитных групп контролировали методом ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (Sorbfil, Россия) в системах растворителей: хлороформ–метанол–

25%-ный раствор аммиака, 6 : 4 : 1 (А); бутанол–уксусная кислота–вода, 4 : 1 : 1 (Б); этилацетат–пиридин–уксусная кислота–вода, 5 : 3 : 2 : 1 (В). Вещества обнаруживали на пластинках с помощью хлор-бензидинового реагента.

Аналитическую ВЭЖХ проводили на хроматографе Agilent 1200 (США) с масс-детектором QQQ (Triple Quadrupole) Agilent 6410, колонка Agilent Zorbax SB C18 RR (2.1 × 30 мм). Использовали градиент концентраций ацетонитрила от 10 до 95% в 0.05%-ном растворе муравьиной кислоты. Скорость потока 0.5 мл/мин.

Спектры ^1H -ЯМР получены на спектрометре AVANCE 500, Bruker BioSpin (США), с рабочей частотой 500 МГц для ядер ^1H в CD_3OD . Химические сдвиги приведены в миллионных долях, а КССВ – в герцах. В качестве внутреннего стандарта использован сигнал растворителя δ_{H} 3.34 м.д. (CD_3OD).

Температуры плавления (некорректируемые) определяли на приборе Кофлера. Удельное вращение соединений измеряли на спектрополяриметре J-20 "Jasco" (Япония).

Вос-βAla-Asp(OMe)₂ (I). К раствору 3.06 г (15.5 ммоль) хлоргидрата диметилового эфира аспарагиновой кислоты в 12.5 мл DMF добавляли 2.80 мл TEA (20.2 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 2.93 г (15.5 ммоль) Вос-βAla-OH. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд вносили последовательно 2.20 г (16.3 ммоль) HOBT и 4.80 г (23.3 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 1.5 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 4.0 мл DMF. В фильтрат добавляли 40.0 мл этилацетата, полученный раствор промывали 9%-ным раствором лимонной кислоты, 5%-ным раствором NaHCO₃, насыщенным раствором NaCl, водой, затем сушили над Na₂SO₄. После сушки этилацетат упаривали, а образовавшийся маслообразный остаток переосаждали из диэтилового эфира петролейным эфиром и сушили над P₂O₅. После сушки в эксикаторе продукт закристаллизовался. Получили 3.50 г (68%) соединения (I), $[\alpha]_D^{20} +9.5^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.55 (Б), 0.90 (В).

HCl·H-βAla-Asp(OMe)-OMe (II). К раствору 3.32 г (10.0 ммоль) соединения (I) в 2.0 мл этилацетата добавляли 5.7 мл 4.5 н. раствора HCl в этилацетате. Перемешивали взвесь в течение 50 мин, осадок отделяли фильтрованием, промывали на фильтре этилацетатом, эфиром, сушили в эксикаторе над NaOH. Выход продукта (II) составил 2.70 г (99%). $[\alpha]_D^{20} -3.5^\circ$ (с 1, MeOH), R_f 0.26 (А), 0.78 (Б).

2-Ацетоксибензоил-Arg (III). К раствору 0.90 г (5.0 ммоль) 2-ацетоксибензойной кислоты в 5.0 мл диоксана добавляли 0.63 г (5.5 ммоль) *N*-гидроксисукцинимид. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд прибавляли 1.23 г (6.0 ммоль) DCC. Перемешивали 1 ч при охлаждении и 2 ч при комнатной температуре. После окончания реакции осадок дициклогексилмочевины отфильтровывали, а полученный раствор *N*-гидроксисукцинимидного эфира 2-ацетоксибензойной кислоты добавляли к 4.0 мл охлажденного водного раствора, содержащего 0.65 г (3.7 ммоль) аргинина. После окончания реакции (12 ч) диоксан упаривали, а в остаток добавляли 12.0 мл ацетона. Выпавший кристаллический осадок соединения (III) дважды промывали этилацетатом по 3.0 мл. После сушки в вакууме над P₂O₅ получали 0.98 г (79%) кристаллического соединения (III), R_f 0.70 (А), 0.58 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 337.36 $[M + H]^+$, 382.38 $[M + 2Na]^+$.

2-Ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp(OMe)-OMe (IV). К раствору 0.67 г (2.7 ммоль) соединения (II) в 3.5 мл DMF добавляли 0.90 г (2.7 ммоль) 2-ацетоксибензоил-Arg (III). Реакционную смесь перемешивали в течение 1 ч. Охладив реакционный сосуд до 0°C, вносили последовательно 0.38 г (2.8 ммоль) HOBT и 0.45 мл (2.9 ммоль) DIPС. Реакционную смесь перемешивали в течение 3 ч при 0°C и 4 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре 0.5 мл DMF. В фильтрат добавляли 15.0 мл диэтилового эфира, выпавший осадок переосаждали из метанола диэтиловым эфиром. Очистку соединения проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле 60 (0.02–0.045 мм), используя в качестве элюента смесь хлороформ–метанол–вода в соотношении 20 : 24 : 1. Фракции, содержащие чистый пептид, объединяли и упаривали. После сушки в эксикаторе получили 0.68 г (49%) соединения (IV). R_f 0.88 (А), 0.91 (В). По данным ВЭЖХ содержание целевого соединения (IV) – 98%. Масс-спектр ESI, m/z : 551.69 $[M + H]^+$, 573.73 $[M + Na]^+$.

2-Ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V). К раствору 0.42 г (0.8 ммоль) соединения (IV) в 9.7 мл метанола добавляли 0.9 мл 2 н. NaOH. После окончания гидролиза реакционную смесь нейтрализовывали до pH 2–3 4.5 н. раствором HCl в этилацетате, растворитель упаривали в вакууме досуха, а к остатку добавляли 2.0 мл метанола. Нерастворившийся осадок NaCl отфильтровывали, в фильтрат добавляли 5.0 мл безводного эфира. После переосаждения из метанола диэтиловым эфиром и сушки в эксикаторе над P₂O₅ было получено 0.39 г (89%) соединения (V) с т. пл. 95–97°C, R_f 0.67 (А), 0.57 (Б). Масс-спектр ESI, m/z : 523.69 $[M + H]^+$, 545.73 $[M + Na]^+$. ¹H-ЯМР (CD₃OD): 1.27 (2H, м, CHCH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 1.31 (2H, м, CHCH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂), 2.62 (2H, д, J 20, CH₂COOH), 2.73 (3H, с, COCH₃), 2.84 (2H, м, CHCH₂CH₂CH₂NH), 3.19 (1H, м, NHCH(CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂)CO), 3.48 (1H, м, CH(CH₂COOH)COOH), 3.70–3.75 (4H, м, HNCH₂CH₂CO), 7.21–7.87 (4H, м, C₆H₄(COCH₃)CO).

Вос-4-аминобензоил-βAla-Asp(OMe)-OMe (VI). К раствору 0.84 г (3.1 ммоль) соединения (II) в 3.5 мл DMF добавляли 0.55 мл TEA (4.0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 0.74 г (3.1 ммоль) Вос-4-аминобензойной кислоты. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд добавляли последовательно 0.43 г (3.2 ммоль) HOBT и 0.76 г (3.7 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 10 ч при комнатной температуре, осадок отфильтровывали, промывали на

фильтре 1.0 мл DMF. В фильтрат добавляли 10.0 мл этилацетата, полученный раствор промывали 9%-ным раствором лимонной кислоты, 5%-ным раствором NaHCO_3 , насыщенным раствором NaCl , водой, затем сушили над Na_2SO_4 . После сушки этилацетат упаривали, а к остатку добавляли 7.0 мл петролейного эфира. После выдерживания на холоде продукт закристаллизовался, его отфильтровали и сушили над P_2O_5 . Выход соединения (VI) составил 1.20 г (86%). R_f 0.82 (Б), 0.88 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 451.88 $[M]^+$.

Вос-4-аминобензоил- β Ala-Asp (VII) образуется в результате омыления 1.00 г (2.2 ммоль) соединения (VI) 2.54 мл 2 н. раствора NaOH в течение 45 мин. Выход кристаллического продукта после обработки, аналогичной для соединения (V), составил 0.83 г (89%). R_f 0.56 (Б), 0.77 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 423.81 $[M]^+$, 446.82 $[M + \text{Na}]^+$.

HCl-4-аминобензоил- β Ala-Asp (VIII). К раствору 0.75 г (1.7 ммоль) Вос-4-аминобензоил- β Ala-Asp (VII) в 2.0 мл этилацетата добавляли 6.8 мл 4.5 н. раствора HCl в этилацетате. Раствор перемешивали в течение 1 ч, растворитель удаляли, а остаток два раза промывали диэтиловым эфиром. После высушивания в эксикаторе над NaOH получено 0.63 г (98%) соединения (VIII) с т. пл. 280–285°C, R_f 0.53 (А), 0.45 (В). По данным ВЭЖХ содержание целевого соединения (VIII) – 96%. Масс-спектр ESI, m/z : 323.38 $[M]^+$, 359.83 $[M + \text{Na}]^+$. ^1H -ЯМР (CD_3OD) δ : 1.20 (2H, тр, J 10, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 2.50 (2H, д, J 20, CH_2COOH), 3.52 (2H, м, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 4.65 (1H, м, $\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$), 6.96; 7.41; 7.91 (4H, 3 д, J 5; 10; 5, $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CO}$).

Вос-4-пиперидинкарбонил- β Ala-Asp(OMe)-OMe (IX) К раствору 1.08 г (4.0 ммоль) соединения (II) в 4.5 мл DMF прибавляли 0.42 мл (5.2 ммоль) TEA. Реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин и затем добавляли 0.92 г (4.0 ммоль) Вос-4-пиперидинкарбоновой кислоты. После охлаждения до 0°C в реакционный сосуд добавляли последовательно 0.57 г (4.2 ммоль) NOEt и 0.99 г (4.8 ммоль) DCC. Реакционную смесь перемешивали в течение 2 ч при 0°C и 10 ч при комнатной температуре. Очистку и выделение вещества (VIII) проводили аналогично описанному для соединения (VI). Выход продукта составил 1.25 г (68.7%). R_f 0.78 (А), 0.84 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 443.36 $[M]^+$, 466.38 $[M + 2\text{Na}]^+$, 489.56 $[M + 2\text{Na}]^+$.

Вос-4-пиперидинкарбонил- β Ala-Asp (X) образуется в результате омыления 0.96 г (2.1 ммоль) соединения (IX) 2.52 мл 2 н. раствора NaOH в течение 45 мин. Выход кристаллического продукта после обработки, аналогичной для соединения (V),

составил 0.82 г (91%). R_f 0.53 (Б), 0.67 (В). Масс-спектр ESI, m/z : 415.38 $[M]^+$, 438.36 $[M + \text{Na}]^+$.

HCl-4-пиперидинкарбонил- β Ala-Asp (XI). К раствору 0.75 г (1.8 ммоль) Вос-4-пиперидинкарбоксил- β Ala-Asp (X) в 2.0 мл этилацетата добавляли 7.0 мл 4.5 н. раствора HCl в этилацетате. Раствор перемешивали в течение 1 ч, растворитель удаляли, а остаток два раза промывали диэтиловым эфиром. После сушки в эксикаторе над NaOH было получено 0.61 г (97%) соединения (XI) с т. пл. 120–122°C, R_f 0.58 (А), 0.34 (В). По данным ВЭЖХ содержание целевого вещества (X) – 98%. Масс-спектр ESI, m/z : 338.32 $[M + \text{Na}]^+$, 361.38 $[M + 2\text{Na}]^+$. ^1H -ЯМР (CD_3OD) δ : 1.28 (1H, кв, J 10, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_{2\text{пиперидин}}$), 1.92–2.02 (4H, м, $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_{2\text{пиперидин}}$), 2.87 (2H, м, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 3.06 (2H, тр, J 15, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CONH}$), 3.47 (4H, м, $\text{CH}_2\text{NHCH}_{2\text{пиперидин}}$), 3.74 (2H, д, J 20, CH_2COOH), 4.18 (1H, м, $\text{NHCH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{COOH}$).

Ингибирование ADP-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro*. Изучение агрегации тромбоцитов проводили с использованием обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), с информированного согласия доноров. Для исключения контактной активации тромбоцитов в работе использовали только пластмассовую или силиконовую посуду (куветы, пробирки, пипетки). Донорскую кровь смешивали с 3.8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1 по объему и центрифугировали при малых оборотах (7 мин при 200 г). Супернатант, представляющий собой ОТП, отбирали в пластиковую посуду. Затем оставшуюся кровь центрифугировали, но уже на более высоких оборотах (15 мин при 2000 г). Образовавшийся после повторного центрифугирования верхний слой представлял собой бестромбоцитную плазму. ОТП использовали для исследования функциональной активности тромбоцитов, бестромбоцитную плазму – для калибровки шкалы оптической плотности прибора и, при необходимости, для разведения ОТП до стандартного содержания клеток, которое должно составлять 200–300 тыс. тромбоцитов/мкл. Агрегацию тромбоцитов вызывали введением агониста ADP в конечной концентрации 2.5 мкМ и регистрировали турбидиметрическим методом Борна [19] на агрегометре AP 2110 фирмы “Солар” (Беларусь, Минск). В контрольном опыте ОТП (300 мкл) инкубировали в течение 2 мин при 37°C с 0.9%-ным раствором NaCl (30 мкл). При исследовании соединений в ОТП (300 мкл) вносили исследуемое соединение с концентрацией 10^{-5} М в 0.9%-ном растворе NaCl . Затем добавляли ADP (30 мкл) и фиксировали протекание агрегации в течение 10 мин. Опыты проводили двукратно.

Определение поверхностных маркеров тромбоцитов осуществляли методом проточной цито-

Таблица 1. Экспрессия маркеров тромбоцитов после контакта и инкубации Arg-βAla-Asp-пептида и его аналогов с образцами клеточного тромбоконцентрата

Воздействующее вещество	Маркер на поверхности тромбоцитов			
	CD62p		CD63	
	экспрессия, %	изменение экспрессии, Δ%	экспрессия, %	изменение экспрессии, Δ%
Контрольный опыт	41.95 (3.55; 67.90)	—	40.80 (10.95; 67.45)	—
Arg-βAla-Asp	23.85 (3.05; 54.72)*	8.10 (0.55; 22.40)	24.04 (8.95; 42.40)*	7.15 (1.85; 24.75)
2-Ацетоксибензоил-Arg-βAla-Asp (V)	35.35 (3.15; 63.15)*	3.10 (0.60; 8.25)	39.70 (9.95; 64.30)*	1.40 (0.20; 2.30)
4-Аминобензоил-βAla-Asp (VIII)	21.25 (3.00; 52.20)*	4.55 (0.55; 13.20)	31.35 (9.15; 57.55)*	5.90 (1.15; 12.05)
4-Пиперидинкарбонил-βAla-Asp (XI)	26.15 (3.30; 46.71)*	6.55 (0.30; 24.69)	33.95 (9.45; 59.50)*	4.50 (1.35; 9.50)

Примечание: результаты представлены в виде медианы, в скобках указаны значения 25-го и 75-го перцентилей.

* Статистически значимые изменения, метод Фридмана ANOVA, $p \leq 0.05$.

флуориметрии (BDFACSCantoII). Тромбоциты получали методом автоматического тромбоцитозера в отделении экстракорпоральных методов лечения ГУ “Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии” с информированного согласия доноров. В опытной пробирке соединяли 500 мкл тромбоконцентрата с 500 мкл раствора исследуемого соединения с концентрацией 10^{-5} М в 0.9%-ном растворе NaCl. В контрольной пробирке использовали раствор NaCl (0.9%). Исходная концентрация тромбоцитов в тромбоконцентрате составляла $698.5 (582.0; 786.5) \times 10^9$ /л. Данные представлены в виде медианы (25-й перцентиль; 75-й перцентиль). Статистический анализ разницы между экспрессией маркера на тромбоцитах в контрольной и опытных пробах проводили методом Фридмана.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы получены аналоги последовательности Arg-βAla-Asp, способные эффективно ингибировать агрегацию тромбоцитов, что делает их перспективными соединениями для дальнейших исследований в качестве потенциальных антитромботических препаратов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры в рамках данного исследования, с участием людей как объектов исследования, были выполнены в соответствии с этическими стандартами национального комитета и комитета организации, где выполнено исследование, и в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 года и последующими ее изменениями или с сопоставимыми этическими стандартами.

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hynes R.O. // Cell. 1987. V. 48. P. 549–554. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90233-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90233-9)
- Plow E.F., Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 6002–6006. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.16.6002>
- Pierschbacher M.D., Ruoslahti E. // Nature. 1984. V. 309. P. 30–33. <https://doi.org/10.1038/309030a0>
- Zablocki J.A., Miyano M., Garland R.B., Pireh D., Schretzman L., Rao S.N., Lindmark R.J., Panzer-Knodle S. G., Nicholson N.S., Taite B.B. // J. Med. Chem. 1993. V. 36. P. 1811–1819. <https://doi.org/10.1021/jm00065a003>
- Miyashita M., Akamatsu M., Hayashi Y., Ueno T. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000. V. 10. P. 859–863. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00113-X)
- Cannon C.P. // Clin. Cardiol. 2003. V. 26. P. 358–364. <https://doi.org/10.1002/clc.4950260803>
- Hirsh J. // Guidelines for Antithrombotic Therapy. BC Decker Inc., Hamilton. Ontario, 1999. 72 p.
- Topol E.J., Moliterno D.J., Herrmann H.C., Powers E.R., Grines C.L., Cohen D.J., Cohen E.A., Bertrand M., Neumann F.J., Stone G.W., DiBattiste P.M., Demopoulos L. // N. Engl. J. Med. 2001. V. 344. P. 1888–1894. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106213442502>
- Valgimigli M., Campo G., Percoco G., Bolognese L., Vasanelli C., Colangelo S., De Cesare N., Rodriguez E. A.,

- Ferrario M., Moreno R., Piva T., Sheiban I., Paschetto G., Prati F., Nazzaro M.S., Parrinello G., Ferrari R.* // JAMA. 2008. V. 299. P. 1788–1799.
<https://doi.org/10.1001/jama.299.15.joc80026>
10. *Sinnaeve P.R., Alexander J.H., Bogaerts K., Belmans A., Wallentin L., Armstrong P., Adgey J.A., Tendera M., Diaz R., Soares-Piegas L., Vahanian A., Granger C.B., Van De Werf F.J.* // Am Heart J. 2004. V. 147. P. 993–998.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2003.12.028>
 11. *Husted S.* // Eur. Heart J. 2007. V. 9. Suppl. D. P. D20–D27.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/sum012>
 12. *Бокарев И.Н.* Противотромбоцитарная терапия в клинической практике. Методические рекомендации. Москва: Ньюдиамед, 2007. 34 с.
 13. *Мельник О.В., Мартинович В.П., Голубович В.П.* // Биоорг. химия. 2006. Т. 32. С. 39–46. [*Mel'nik O.V., Martinovich V.P., Golubovich V.P.* // Russ. J. Bioorg. Chem. 2006. V. 32. P. 122–128.]
<https://doi.org/10.1134/S1068162006020038>
 14. *Pollina E.* // J. Undergrad. Sci. 1996. V. 3. P. 119–126.
 15. *Nicholson N.S., Abood N.A., Panzer-Knodle S.G., Frederick L.G., Page J.D., Salyers A.K., Suleymanov O.D., Szalony J.A., Taite B.B., Anders R.J.* // Med. Res. Rev. 2001. V. 21. P. 211–226.
<https://doi.org/10.1002/med.1007>
 16. *Kannan M., Ahmad F., Saxena R.* // Blood. 2019. V. 37. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.05.007>
 17. *Hechler B., Gachet C.* // Thromb. Vasc. Biol. 2015. V. 35. P. 2307–2315.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.303395>
 18. *Israels S.J., McMillan-Ward E.M.* // J. Thromb. Haemost. 2005. V. 93. P. 311–318.
<https://doi.org/10.1160/TH04-08-0503>
 19. *Born G.V.R.* // Nature. 1962. V. 194. P. 927–929.
<https://doi.org/10.1038/194927b0>

Mimetics of Arg-Gly-Asp Sequence: Synthesis and Study of Antiaggregation Activity

O. V. Gribovskaya*, #, V. P. Martinovich*, E. V. Rodko**, E. D. Rasyuk**,
 T. V. Ryabtseva***, and V. P. Golubovich*

#Phone: +375 17 374-82-63; e-mail: olymelnik@yandex.ru

*Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, ul. ak. Kuprevicha 5/2, Minsk, 220141 Belarus

**State Institution “Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies”,
 Dolginovsky Tract 160, Minsk, 220053 Belarus

***State Institution “Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology”,
 ul. Semashko 8, Minsk, 220045 Belarus

It is known that the Arg-Gly-Asp sequence in the molecule of fibrinogen is responsible for binding to receptors on the surface of platelet. The purpose of our work was to find new compounds that can inhibit this interaction. Mimetics of Arg-Gly-Asp sequence – 2-acetoxybenzoyl-Arg-βAla-Asp, 4-piperidylcarbonyl-βAla-Asp, and 4-aminobenzoyl-βAla-Asp-OH were synthesized. It was shown that these compounds are capable to inhibit platelet aggregation with varying degrees. The mimetic 2-acetoxybenzoyl-Arg-βAla-Asp showed the greatest ability to inhibit platelet aggregation. Also, a decrease in the expression of markers CD62p and CD63 on platelets when exposed to mimetics was found, which confirms the ability of these compounds to block the binding sites of fibrinogen with glycoprotein receptors GP IIb/IIIa.

Keywords: Arg-Gly-Asp-mimetics, platelet aggregation, peptide synthesis, GP IIb/IIIa receptor, platelet markers