



УДК 547.964.07+541.63

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИТРОМБИНОВОЙ АКТИВНОСТИ
НЕКОТОРЫХ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ *Поляркова С. А., Кибирев В. К., Федоряк Д. М.,
Серебряный С. Б.

Институт молекулярной биологии и генетики Академии наук УССР, Киев

Классическими методами пептидной химии синтезирована серия стереоизомерных олигопептидов — аналогов фрагмента $\alpha(A)$ -цепи фибриногена. Исследован антитромбиновый эффект этих соединений в реакции свертывания фибриногена тромбином при pH 7 и 29°. Показано, что стереоизомеры N-тозилвалиларгина типа LL-, DD-, LD-, DL- ингибируют тромбин на 50% при концентрации 6–9 мМ. С ростом длины полипептидной цепи ингибиторный эффект исследуемых соединений увеличивается. Наибольшей антисвертывающей активностью обладает *ретро-D*-тетрапептид строения: Tos-D-Val-D-Ala-D-Arg-D-Phe-OMe (I_{50} 9,4 мкМ).

Тромбин (КФ 3.4.21.5), важнейший фермент системы свертывания крови, является сериновой протеиназой с трипсиноподобным действием. В организме тромбин осуществляет селективное расщепление аргинил-глициновой связи фибриногена, неактивного белка крови, индуцируя превращение его в фибрин-мономер. Полимеризация последнего приводит к образованию сгустка.

Являясь активизирующим ферментом, тромбин отличается от других сериновых гидролаз, таких, например, как трипсин, довольно узкой специфичностью. Так, в своем природном субстрате — фибриногене тромбин расщепляет лишь 4 из 376 аргининовых и лизиновых связей, чувствительных к действию трипсина [1]. Существует представление, что высокая субстратная избирательность тромбина определяется особенностями первичной структуры полипептидной цепи в районе Arg-Gly-связи, гидролизуемой тромбином при превращении фибриногена в фибрин [2]. Аминокислотная последовательность $\alpha(A)$ -цепи участка фибриногена (стрелкой отмечена связь, расщепляемая тромбином) такова: -Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg-Gly-Pro-Arg-Val-.

Изучение субстратных и ингибиторных свойств различных синтетических пептидов, фрагментов фибринопептидов, показало, что эффективность гидролиза олигопептидов возрастает, если в положении P_2 и P_3^{**} находятся аминокислоты с гидрофобными радикалами [3–5]. Существенный вклад в улучшение субстратных (ингибиторных) свойств пептидов вносит остаток фенилаланина в положении P_0 [6, 7] и наличие в пептидах пролина в P_2' [8]. Введение в P_3 остатка D-аминокислоты резко усиливает

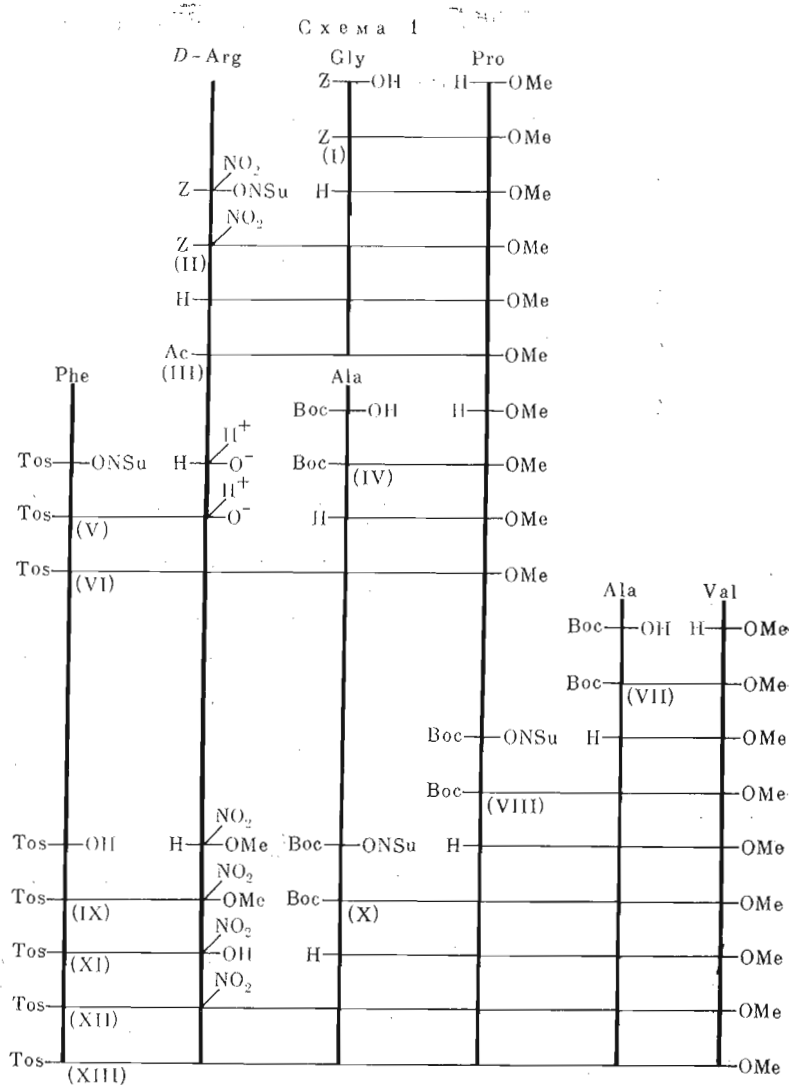
* Часть этой работы была представлена на IV Всесоюзном симпозиуме по химии белков и пептидов (5–8 сентября 1977 г., Минск).

** P_n и P_n' — положение аминокислотных остатков в субстрате слева и справа от расщепляемой связи.

антитромбиновый эффект некоторых синтетических ингибиторов фермента [9]. В обзоре [10] приведены данные об эстеразной, амидазной, протеолитической и свертывающей активности тромбина.

Поскольку влияние конфигурации аминокислотных остатков в участке P_3-P_1' на ингибирующую активность пептидов изучено недостаточно, мы синтезировали серию стереоизомеров тозилвалиларгинина типа LL, DD, LD, DL [11].

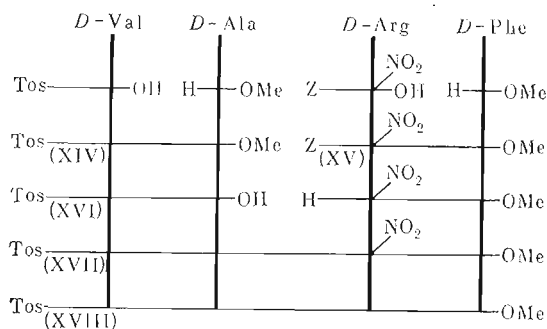
Целью настоящей работы является синтез стереоизомерных олигопептидов, соответствующих первичной структуре указанного выше тетрадекапептида, и изучение их антитромбиновой активности. Ниже описан синтез три-, тетра- и гексапептидов, содержащих вместо остатка L -аргинина его D -изомер. Эти соединения имеют и другие замены, например валин в положении P_2 заменен на фенилаланин. Учитывая тот факт, что введение аланина вместо глицина в P_1' улучшает субстратные свойства соединений [5], большинство синтезированных нами пептидов содержит вместо глицина в положении P_1' аланин. Пептиды синтезировали классическими методами (схема 1), что позволило проводить очистку промежуточных продуктов на любой стадии.



Защищенный трипептид (II) получали конденсацией оксисукцинимидного эфира *N*-карбобензоксинитроаргинина с метиловым эфиром глицилпролина. Отщепление карбобензокси- и нитрогрупп в пептиде (II) каталитическим гидронолизом и последующее ацетилирование приводит к метиловому эфиру ацетил-*D*-аргинилглицилпролина (III). Тетрапептид (VI) синтезировали по схеме 2+2 конденсацией дипептида (V) и метилового эфира *L*-аланилпролина карбонимидным методом в присутствии оксисукцинимида с выходом 30%. Исходный тозилдипептид (V) с хорошим выходом получали взаимодействием оксисукцинимидного эфира тозилфенилаланина с аргинином [11]. Метод синтеза пептидов с незащищенным *C*-концевым аргинином, отличающийся простотой и обладающий рядом других преимуществ, в последнее время нашел довольно широкое применение [12]. Согласно [11], он оказался наиболее удобным и при синтезе дипептидов строения тозилвалиларгинин (XIX—XXII).

Несмотря на то что нами было зафиксировано образование ряда побочных продуктов при каталитическом гидронолизе нитрогруппы, блокирующей гуанидиновую функцию аргинина, нам удалось синтезировать гексапептид (XIII) с хорошим выходом при использовании этой защиты. Для предотвращения рацемизации при конденсации фрагментов карбонимидным методом использовали добавки оксисукцинимида [13].

С х е м а 2



Синтез *регрo-D*-тетрапептида (XVIII), соответствующего «прямой» последовательности -Phe-Arg-Ala-Val-, также проведен с защитой гуанидиновой функции аргинина нитровапием. Пептид (XVII) получали конденсацией двух дипептидных фрагментов. Последующее каталитическое гидрирование над палладиевой чернью приводит к желаемому тетрапептиду (XVIII).

Все конечные пептиды очищали ионообменной хроматографией на СМ-целлюлозе или на колонках с окисью алюминия.

В табл. 1 приведены формулы и некоторые физико-химические характеристики синтезированных соединений; их индивидуальность доказана ТСХ на силикагеле, электрофорезом на бумаге при pH 6,5 и элементным анализом.

В табл. 2 представлена антитромбиновая активность синтезированных соединений, выраженная такой концентрацией пептидов, которая ведет к ингибированию гидролиза фибриногена тромбином на 50% (I_{50}).

Из табл. 2 видно, что значения I_{50} для *LL*- и *DD*-стереоизомеров тозилвалиларгинина одинаковы. Сравнение соединений (XIX) и (XXIII) показывает, что этерификация карбоксильной группы аргинина практически не влияет на величину I_{50} . Однако введение гидрофобной изопропилоксильной группы (XXIV) увеличивает ингибиторный эффект в 2 раза. Аналогичное влияние природы алкоксильного остатка у производных фенилаланилвалиларгинина отмечали Бломбек и др. [14]. Ингибиторный эффект

Строение и физико-химические свойства пептидов

Соединение	Т. пл., °С	R _f		E _{Arg} (рН 6,5)	Вы- ход, %
		А	Б		
(I) Z-Gly-Pro-OMe	Масло	0,73	0,69		82
(II) Z-D-Arg(NO ₂)-Gly-Pro-OMe	143-145 разл.	0,63	0,73		41
(III) Ac-D-Arg-Gly-Pro-OMe	Аморф.	0,17	0,33	0,65	20
(IV) Boc-Ala-Pro-OMe	Масло	0,71	0,67		86
(V) Tos-Phe-D-Arg-OH	253-254	0,64	0,48	0,11	99
(VI) Tos-Phe-D-Arg-Ala-Pro-OMe	134-135 разл.	0,17	0,39	0,40	30
(VII) Boc-Ala-Val-OMe	64-66	0,70	0,70		75
(VIII) Boc-Pro-Ala-Val-OMe	Масло	0,65	0,70		64
(IX) Tos-Phe-D-Arg(NO ₂)-OMe	85-86	0,86	0,93		72
(X) Boc-Ala-Pro-Ala-Val-OMe	Масло	0,73	0,87		54
(XI) Tos-Phe-D-Arg(NO ₂)-OH	—	0,78	0,80		91
(XII) Tos-Phe-D-Arg(NO ₂)-Ala-Pro-Ala-Val-OMe	105-107 разл.	0,66	0,70		60
(XIII) Tos-Phe-D-Arg-Ala-Pro-Ala-Val-OMe	Аморф.	0,20	0,40	0,58	50
(XIV) Tos-D-Val-D-Ala-OMe	182-183	0,79	0,81		52
(XV) Z-D-Arg(NO ₂)-D-Phe-OMe	125-127	0,71	0,73		73
(XVI) Tos-D-Val-D-Ala-OH	126-127	0,48	0,50		90
(XVII) Tos-D-Val-D-Ala-D-Arg(NO ₂)-D-Phe-OMe	147-150	0,64	0,50		40
(XVIII) Tos-D-Val-D-Ala-D-Arg-D-Phe-OMe	Аморф.	0,35	0,35	0,53	35
(XIX) Tos-D-Val-D-Arg-OH	158-160 *	0,31		0,13	71
(XX) Tos-D-Val-Arg-OH	218-220	0,31		0,13	66
(XXI) Tos-Val-D-Arg-OH	220-221	0,31		0,13	77
(XXII) Tos-Val-Arg-OH	158-160 *	0,31		0,13	66

* Т. пл. исправлены.

Таблица 2

Ингибирование синтетическими пептидами реакции свертывания фибриногена тромбином при рН 7 и 29°
Среднее значение из 2-4 опытов

Соединение	I ₅₀ *, мМ	Соединение	I ₅₀ *, мМ
(XXII) Tos-Val-Arg-OH	6,2	(XXI) Tos-Val-D-Arg-OH	8,8
(XIX) Tos-D-Val-D-Arg-OH	6,0	(XXV) Tos-Phe-D-Arg-OH **	1,7
(XXIII) Tos-D-Val-D-Arg-OMe **	5,2	(VI) Tos-Phe-D-Arg-Ala-Pro-OMe	1,1
(XXIV) Tos-D-Val-D-Arg-OPr ¹ **	2,9	(XXVI) Z-Pro-Ala-Arg-OMe **	4,4·10 ⁻¹
(XX) Tos-D-Val-Arg-OH	9,4	(XVIII) Tos-D-Val-D-Ala-D-Arg-D-Phe-OMe	9,4·10 ⁻³

* Величина I₅₀ соответствует концентрации пептида, при которой время образования фибринового сгустка возрастает в 2 раза по сравнению со временем свертывания фибриногена без ингибитора.

** Синтез и физико-химические характеристики приведены в [11].

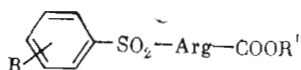
LD- и DL-изомеров одинаков, но несколько ниже антиромбиновой активности LL- и DD-пептидов. Это, очевидно, обусловлено изменением ориентации боковых радикалов D-аминокислот относительно соответствующих S₁- и S₂-центров тромбина и ухудшением эффективности связывания соединений (XX) и (XXI) с ферментом. Сравнение ингибиторных свойств дипептида (XXV) и тетрапептида (VI) свидетельствует о том, что введение дополнительных аминокислотных остатков в положение P₁' и P₂' пептида

не влияет на антитромбиновый эффект. При исследовании производных фенилаланилвалиларгина и валиларгинилглицина Бломбек и др. пришли к такому же выводу [14]. Пролинсодержащий трипептид (XXVI), состоящий из остатков *L*-аминокислот, на порядок более эффективный ингибитор, чем тетрапептид (VI). Однако наибольшего эффекта ингибирования удалось достигнуть в случае *ретро*-энантиомера (XVIII).

Известно, что пептиды, содержащие *D*-аминокислоты, практически не подвергаются энзиматическому гидролизу. Это обстоятельство позволяет синтезировать ингибиторы, устойчивые к гидролитическому расщеплению ферментами организма. Для создания эффективного конкурентного ингибитора необходима стерическая комплементарность боковых радикалов ингибитора соответствующим связывающим участкам фермента. Поскольку простая замена одного из аминокислотных остатков на соответствующий *D*-изомер резко изменяет ориентацию в пространстве его боковых групп [15], таким путем нельзя получить эффективный ингибитор. Как показали Ю. А. Овчинников и В. Т. Иванов [15], лишь *ретро-энантио*-изомерные пептиды, построенные из *D*-аминокислотных остатков, адекватны всей периферии исходной молекулы в целом и отличаются от нее инвертированным расположением атомов в амидных группировках. Топохимический подход [16] позволил нам создать ингибитор (XVIII), который оказался наиболее эффективным из серии изученных соединений (см. табл. 2).

В работе Шераги и др. [3] исследован антитромбиновый эффект синтетических пента- и октапептидов, соответствующих P_5-P_3' -участку $\alpha(A)$ -цепи фибриногена, и показано, что I_{50} составляет величину порядка 7 см. Синтезированные нами соединения, хотя и являются более короткими пептидами, обладают более сильным ингибиторным эффектом.

Ранее нами исследовались ингибиторные свойства производных арил-сульфониларгина общей формулы



и показано, что их антитромбиновое действие зависит от объема и гидрофобности заместителей R и R' [17]. Эти низкомолекулярные соединения оказались пригодными для изучения взаимодействий в каталитическом центре тромбина. Использование синтетических олигопептидов — аналогов фрагментов $\alpha(A)$ -цепи фибриногена позволяет исследовать топографию всего активного центра тромбина — как каталитического, так и связывающего его участков. Наконец, пептиды, *ретро-D*-аналоги фрагментов $\alpha(A)$ -цепи фибриногена, дают возможность картировать только связывающий участок фермента, поскольку по стереохимическим причинам тромбин практически не расщепляет производные *D*-аргина.

Таким образом, синтез и исследование пептидов с *D*-аргином, в особенности *ретро*-энантиомерных производных, открывает новые возможности для целенаправленного поиска новых эффективных ингибиторов тромбина.

Экспериментальная часть

Использовали аминокислоты фирмы Reanal (ВНР). Температуру плавления или разложения синтезированных соединений определяли в открытых капиллярах; в табл. 1 приведены неисправленные значения температур плавления. ТСХ проводили на пластинках Silufol (ЧССР) в системах растворителей: *n*-бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода, 30 : 6 : 20 : 10 (А), *n*-бутанол — уксусная кислота — вода, 2 : 1 : 1 (Б). Для препаративного разделения использовали окись алюминия (Reanal, ВНР) или силикагель L (Chemapol, ЧССР). Электрофорез осуществляли на бумаге Fittrak FN-16 (ГДР) в течение 1,5 ч при pH 6,5 (60 В/см). Электрофореграммы проявляли реактивом Сакагучи и по Райдону — Смуту, а пластинки

для ТСХ — иодом. Аминокислотный состав гидролизатов пептидов определяли на анализаторе ААА-881 (ЧССР). Удельное вращение измеряли на спектрополяриметре Spectropol-1 (Sofica, Франция).

Удаление бензилоксикарбонильной защитной группы. а) К раствору 2 ммоль защищенного пептида в 4 мл ледяной уксусной кислоты прибавляли равный объем 36% бромистого водорода в ледяной уксусной кислоте, перемешивали 1 ч при 20°, а затем выливали в сухой эфир. Аморфный бромгидрат пептида отфильтровывали, промывали сухим эфиром и сушили в вакуум-эксикаторе над КОН.

б) К раствору 1,3 ммоль защищенного пептида в 20 мл метанола прибавляли 1 мл 6 н. HCl и гидрировали над палладиевой черпью не менее 20 ч, контролируя степень отщепления защитных групп электрофоретически или при помощи ТСХ. Тетрапептид (XVII) и гексапептид (XII) гидрировали в 80% уксусной кислоте в течение 16 ч, затем катализатор отфильтровывали, растворитель удаляли в вакууме при 40°, а остаток растирали с эфиром.

Удаление трет-бутилоксикарбонильной защитной группы. К раствору 2,3 ммоль защищенного пептида в 7 мл сухого диоксана прибавляли 10 мл 6 н. HCl в сухом диоксане, выдерживали 40 мин при 20° и выливали в эфир. Гигроскопический осадок хлоргидрата отфильтровывали, промывали сухим эфиром и сушили в эксикаторе над КОН.

Z-D-Arg(NO₂)-D-Phe-OMe (XV). К смеси 2,43 г (11,3 ммоль) хлоргидрата метилового эфира D-фенилаланина, 1,56 мл триэтиламина и 4,0 г (11,3 ммоль) бензилоксикарбонил-D-нитроаргинина в 30–40 мл ДМФА, охлажденной до 0°, прибавляли при размешивании 2,33 г (12 ммоль) ДЦГК. Раствор перемешивали 4 ч при 0° и 12 ч при 20°. Осадок отделяли, из фильтрата растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в этилацетате и промывали последовательно 0,5 н. HCl, водой, раствором NaHCO₃ и снова водой. Органический слой сушили MgSO₄, растворитель удаляли в вакууме, а остаток растирали с петролейным эфиром. Выход аморфного продукта 3,4 г.

Соединения (I), (IV), (VII), (IX) и (XIV) получали аналогично. В ходе синтеза пептидов (IV) и (VII), содержащих Вос-группу, пептиды промывали раствором лимонной кислоты.

Tos-Val-Arg-OH (XIX–XXII). К 3 г (8,1 ммоль) Tos-Val-ONSu [11] в 10 мл диоксана прибавляли 1,4 г (8,1 ммоль) аргинина в 6 мл воды, реакционную смесь размешивали 12 ч при 20°. Растворитель удаляли в вакууме, остаток промывали этилацетатом и кристаллизовали из воды. Выход бесцветных кристаллических пептидов составлял 66–77%. Соединение (V) синтезировали аналогично.

Z-D-Arg(NO₂)-Gly-Pro-OMe (II). К раствору 1,18 (6 ммоль) H₂⁺-Gly-Pro-OMe·Cl⁻ в 10–15 мл ДМФА при 0° прибавляли 0,83 мл триэтиламина. Через 30 мин осадок отфильтровывали и к фильтрату прибавляли 2,2 г (6 ммоль) Z-D-Arg(NO₂)-ONSu и выдерживали 12 ч при 20°. Растворитель удаляли в вакууме и дальнейшую обработку проводили как описано выше. Соединения (VIII) и (X) получали аналогично.

Ac-D-Arg-Gly-Pro-OMe (III). Раствор 700 мг (1,3 ммоль) защищенного пептида (II) в 20 мл метанола гидрировали в присутствии палладиевого катализатора, как описано выше. Образовавшееся соединение растворяли в 20 мл ДМФА, при 0° прибавляли 1,5 мл триэтиламина, размешивали 20 мин, осадок отфильтровывали и к фильтрату прибавляли 1,2 г (1,3 ммоль) AcONSu. Реакционную смесь выдерживали 14 ч при 20°, растворитель удаляли в вакууме, остаток очищали препаративным электрофорезом на бумаге в течение 1,5 ч. Пептид элюировали 1 н. уксусной кислотой и лиофилизировали. Выход 15 мг (20%). Найдено, %: С 47,20, Н 7,20. С₁₇H₃₀N₆O₅. Вычислено, %: С 46,94, Н 6,94.

Tos-Phe-D-Arg-Ala-Pro-OMe (VI). К раствору 0,53 г (2,2 ммоль) H₂⁺-Ala-Pro-OMe·Cl⁻ в 20 мл пиридина прибавляли при 0° 1,04 г

(2,2 ммоль) дипептида (V), 0,23 г (2,2 ммоль) оксисукцинимида и 0,47 г (2,3 ммоль) ДЦГК. Реакционную смесь выдерживали 4 ч при 0° и 12 ч при 20°, растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в *n*-бутаноле и обработку вели, как обычно. Пептид очищали хроматографией на колонке с окисью алюминия. Выход 30%. $[\alpha]_D^{25} -57^\circ$ (*c* 1, метанол). Найдено, %: N 8,56, S 4,11. $C_{24}H_{43}N_{17}O_7S \cdot HCl$. Вычислено, %: N 8,31, S 4,75.

Tos-D-Val-D-Ala-OH (XVI). К 1,4 г (4 ммоль) защищенного дипептида (XIV) в 5 мл метанола прибавляли 8,2 мл 1 н. NaOH и размешивали 1 ч. Метанол удаляли в вакууме, а оставшийся водный раствор подкисляли 6 н. HCl. Осадок отфильтровывали, промывали водой и кристаллизовали из воды. Выход 90%. Соединение (XI) получали аналогично.

Tos-D-Val-D-Ala-D-Arg(NO₂)-D-Phe-OMe (XVII). К смеси 0,87 г (1,67 ммоль) $H_2^+-D-Arg(NO_2)-D-Phe-OMe \cdot Br^-$, 0,23 мл триэтиламина, 0,57 г (1,67 ммоль) дипептида (XVI) и 0,19 г (1,67 ммоль) оксисукцинимида в 15 мл ДМФА, охлажденной до 0°, прибавляли при перемешивании 0,35 г (1,7 ммоль) ДЦГК и выдерживали 4 ч при 0°, а затем 12 ч при 20°. Осадок отделяли, из фильтрата удаляли растворитель в вакууме, остаток растворяли в хлористом метиле и последовательно промывали раствором NaHCO₃, водой, 0,5 н. HCl и снова водой. Органический слой сушили Na₂SO₄, растворитель удаляли в вакууме, остаток растирали с петролейным эфиром. Выход 40%. Снятие нитрогруппы каталитическим гидрогенолизом осуществляли как описано выше. Тетрапептид (XVIII) окончательно очищали ионообменной хроматографией на карбоксиметилцеллюлозе. $[\alpha]_D^{25} +36^\circ$ (*c* 0,3, метанол). Найдено, %: N 14,51, S 4,89. $C_{31}H_{43}N_7O_7S \cdot CH_3COOH$. Вычислено, %: N 14,54, S 4,75.

Tos-Phe-D-Arg-Ala-Pro-Ala-Val-OMe (XIII). К смеси 0,88 г (1,7 ммоль) дипептида (XI), 0,2 г (1,7 ммоль) оксисукцинимида в 15–20 мл ДМФА прибавляли при охлаждении до 0° 0,31 г (1,7 ммоль) ДЦГК, размешивали 45 мин и прибавляли аминокомпонент в 7–10 мл ДМФА, полученный из 0,7 г $H_2^+-Ala-Pro-Ala-Val-OMe \cdot Cl^-$ и 0,23 мл триэтиламина в 7 мл ДМФА. Реакционную смесь выдерживали 4 ч при 0° и 20 ч при 20°. Растворитель удаляли в вакууме, остаток растворяли в хлороформе, промывали раствором NaHCO₃, водой, 0,5 н. HCl и снова водой. Органический слой сушили Na₂SO₄, растворитель удаляли в вакууме, а остаток растворяли в 80% уксусной кислоте и гидрировали в присутствии палладия, как описано выше. Гексапептид (XIII) окончательно очищали на колонке с СМ-целлюлозой. Выход 150 мг (50%). $[\alpha]_D^{20} -29^\circ$ (*c* 1, ДМФА).

Методы очистки пептидов. а) Ионообменная хроматография на СМ-целлюлозе. Очистку пептидов на СМ-целлюлозе (Whatman, СМ-52) проводили в колонке (2,5×30 см), уравновешенной 0,05 М аммоний-ацетатным буфером с рН 6. Для очистки наносили 200 мг пептида, растворенного в 5–7 мл исходного буферного раствора. Элюирование осуществляли сначала 100 мл исходного буферного раствора, а затем градиентом молярности от 0,05 М (400 мл в смесителе) до 0,5 М (400 мл) со скоростью 60–100 мл/ч, собирая фракции через каждые 5 мин. Оптическое поглощение растворов определяли на спектрофотометре СФ-4А при 260 нм. Фракции, содержащие нужный материал, соединяли и лиофилизировали. Выход пептидов составлял 35–50%.

б) Очистка пептидов на окиси алюминия или силикагеле. Очистку проводили в колонке (2,5×30 см), нанося раствор пептида в метаноле и элюируя метанолом. Контроль фракций проводили тонкослойной хроматографией. Фракции, содержащие нужный материал, соединяли, растворитель удаляли в вакууме, а остаток растирали с эфиром или петролейным эфиром.

Определение свертывающей активности тромбина. Приготовление раствора фибриногена, исходного раствора тромбина, а также буферных растворов для определения свертывающей активности тромбина осуществляли в соответствии с методикой [18]. Смесь 0,3 мл фосфатного буфера пон-

ной силы 0,15 М (0,05 М фосфатный буфер и 0,1 М NaCl, pH 7), 0,3 мл 0,1% раствора фибриногена (Calbiochem) в исходном фосфатном буфере и 0,1 мл раствора исследуемого пептида (10^{-2} – 10^{-6} М) в фосфатном буфере, pH 7, термостатировали 5 мин при 29°, прибавляли 0,1 мл раствора тромбина (0,5 NIH*-ед/мл) и определяли время, необходимое для образования видимого сгустка. Антитромбиновую активность пептидов определяли графически, выражая ее в виде концентрации пептида, при которой время свертывания фибриногена тромбином увеличивается в 2 раза по сравнению с временем свертывания без ингибитора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Blombäck B., Blombäck M., Edman P., Hessel B. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **115**, 371–396.
2. Blombäck B., Blombäck M., Hessel B., Iwanaga S. (1967) *Nature*, **215**, 1445–1448.
3. Liem R. K. H., Andreatta R. H., Scheraga H. A. (1971) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **147**, 201–213.
4. Liem R. K. H., Scheraga H. A. (1973) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **158**, 387–395.
5. Liem R. K. H., Scheraga H. A. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **160**, 333–339.
6. Blombäck B., Blombäck M., Olsson P., Svendsen L., Aberg G. (1969) *J. Clin. Lab. Invest.*, **24**, Suppl. 107, 59–64.
7. van Nispen J. W., Hageman Th. F., Scheraga H. A. (1977) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **182**, 227–243.
8. Lobo A. P., Was J. D., Sherman M. Yu., Lawson W. B. (1976) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **177**, 235–244.
9. Bajusz S., Barabás E., Szell E., Bagdy D. (1975) in: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology. Proceedings of the Fourth American Peptide Symposium* (Walter R., Meinhofer J., eds.), Ann. Arbor Science, Publishers Inc., pp. 603–608.
10. Федоряк Д. М., Кибирев В. К., Серейская А. А., Серебряный С. Б. (1977) в сб.: *Молекулярная биология*, т. 2, с. 64–75, «Наукова думка», Киев.
11. Пояркова С. А., Кибирев В. К., Серебряный С. Б. (1978) *Химия природн. соедин.*, № 3, 423–424.
12. Филатова М. Н., Крит Н. А., Сучкова Г. С., Равдель Г. А., Иванов В. Т. (1976) *Биоорг. химия*, **1**, 437–451.
13. Weygand F., Hoffman D., Wunsch E. (1966) *Z. Naturforsch.*, **21b**, 426.
14. Svendsen L., Blombäck B., Blombäck M., Olsson P. J. (1972) *Thromb. Res.*, **1**, 267–285.
15. Овчинников Ю. А., Иванов В. Т. (1969) в кн.: *Современные проблемы химии пептидов и белков*, с. 118–133, «Наука», М.
16. Shemyakin M. M., Ovchinnikov Yu. A., Ivanov V. T. (1969) *Angew. Chem.*, **81**, 523–529.
17. Серейская А. А., Кибирев В. К., Федоряк Д. М., Пояркова С. А., Серебряный С. Б. (1977) *Докл. АН УССР*, сер. Б, 346–349.
18. Perlman B. E., Lorand L. (1970) *Methods in Enzymology*, «Proteolytic Enzymes», vol. 19, pp. 145–157, Acad. Press, New York, London.

Поступила в редакцию
20.IX.1978

SYNTHESIS AND STUDIES ON ANTITHROMBOTIC ACTIVITY OF ARGININE CONTAINING PEPTIDES

POYARKOVA S. A., KIBIREV V. K., FEDORYAK D. M.,
SEREBRYANY S. B.

*Institute of Molecular Biology and Genetics, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev*

A series of stereoisomeric oligopeptides which correspond to the fragments of fibrinogen $\alpha(A)$ -chain were synthesized by classical methods of peptide chemistry. The antithrombotic activity of these compounds was assayed in the reaction of fibrinogen clotting at pH 7.0 and 29°. The I_{50} values ranged from 6 to 9 mmol for *DD*-, *LL*-, *DL*-, and *LD* isomers of N-tosylvalylarginine. The lengthening of peptide chain causes the growth of clotting-inhibiting effect for the compounds under study. The *retro-D*-tetrapeptide Tos-*D*-Val-*D*-Ala-*D*-Arg-*D*-Phe-OMe was found to be the most potent inhibitor ($I_{50}=9.4 \cdot 10^{-6}$ M).

* Единица активности тромбина, предложенная в институте «National Institute of Health» (США).

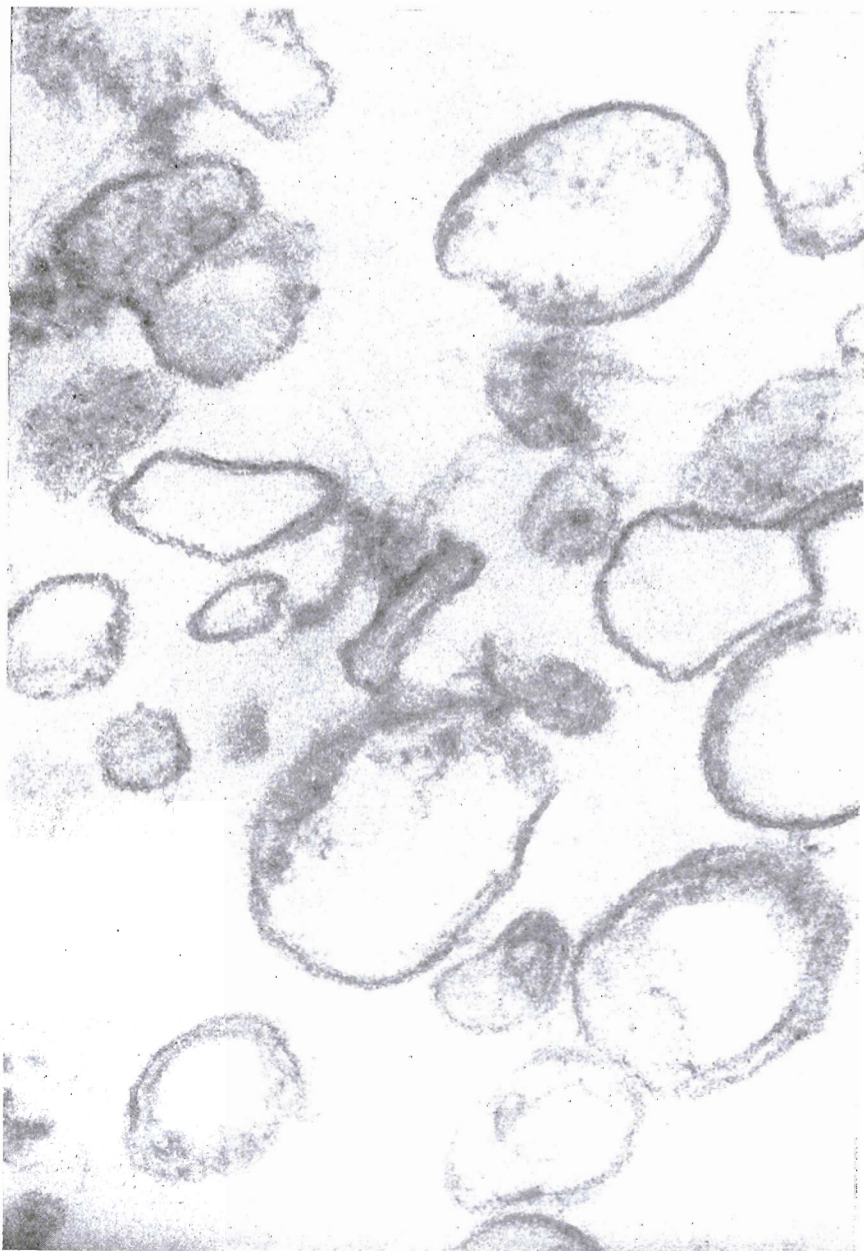


Рис. 1. Электронная микрофотография субклеточных фракций млекопитающих: *a* – фракция плазматических мембран ($\times 75\,000$)

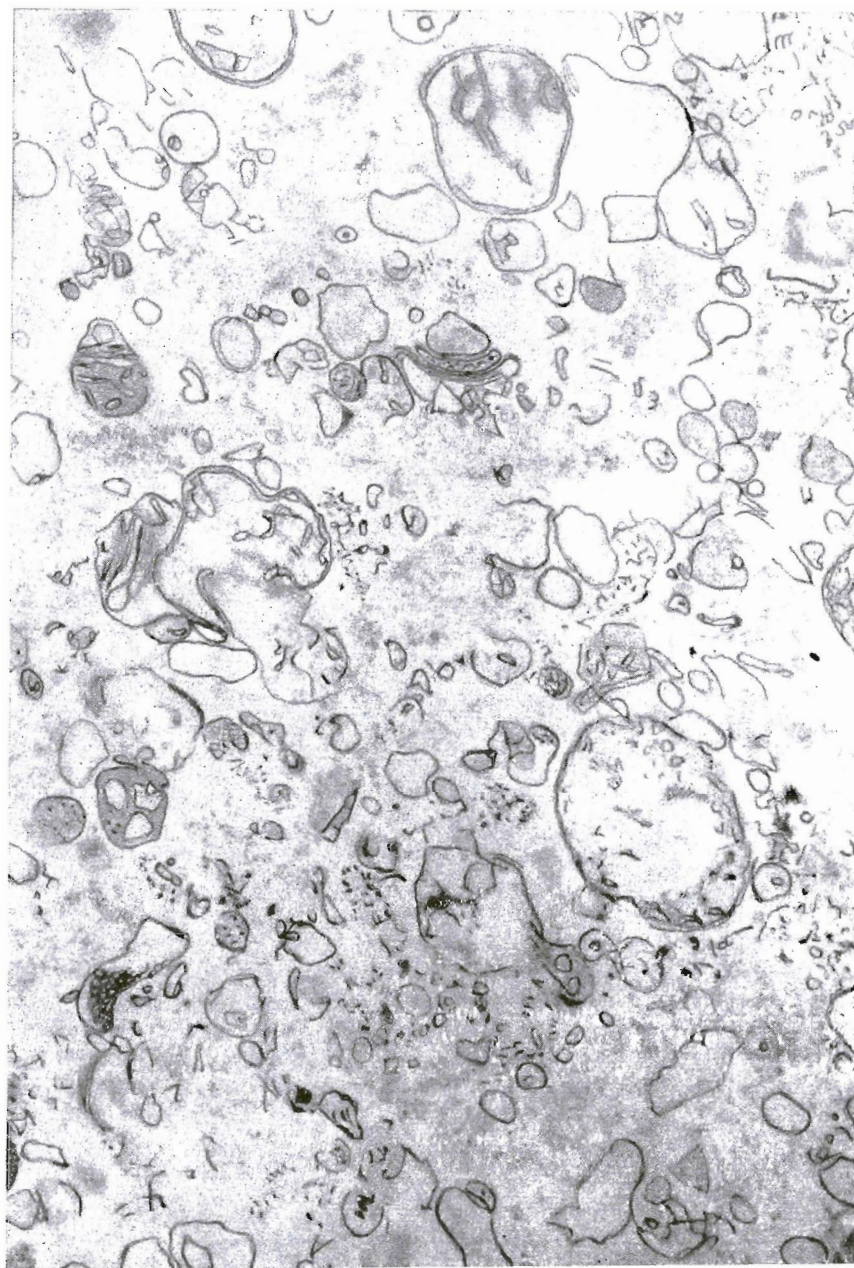


Рис. 1. б – фракция саркоплазматического ретикулума (×40 000)

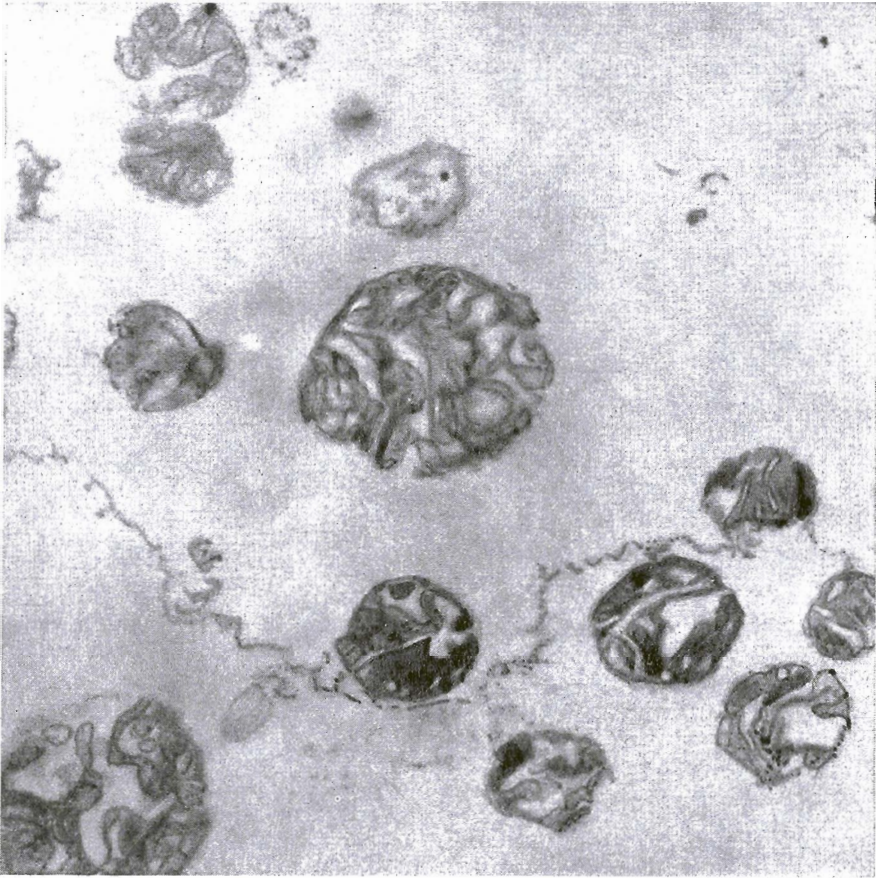


Рис. 1. в – митохондриальная фракция (×35 000)