# **ROBERTA NOGUCI DA SILVA**

# Síntese e ensaio de análogos estruturais de prolina no estudo da interação com trombina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo 2013

# **ROBERTA NOGUCI DA SILVA**

# Síntese e ensaio de análogos estruturais de prolina no estudo da interação com trombina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. Robson Lopes de Melo

Versão corrigida: a versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

#### DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

#### reprodução não autorizada pelo autor

Silva, Roberta Noguci da.

Síntese e ensaio de análogos estruturais de prolina no estudo da interação com trombina / Roberta Noguci da Silva. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Robson Lopes de Melo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Aminoácidos não naturais.

Versão do título para o inglês: Synthesis and assay of structural analogues of proline in the study of interaction with thrombin.

1. Aminoácidos 2. Análogos de prolina 3. Bivalirudina 4. Inibidores de trombina 5. Peptídeos 6. Resistência à hidrólise I. Melo, Prof. Dr. Robson Lopes de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0173/2013

#### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a):	Roberta Noguci da Silva.
Título da Dissertação:	Síntese e ensaio de análogos estruturais de prolina no estudo da interação com trombina.
Orientador(a):	Prof. Dr. Robson Lopes de Melo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de	e Defesa da	Dissertação de N	lestrado,
em sessão pública realizada a		/, cons	siderou
( ) Aprovado(a)	() Re	eprovado(a)	

Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505 ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 14 de março de 2012.

Protocolo: I-1034/13

Dr. Robson Lopes de Melo Laboratório Especial I – Toxinologia Aplicada Instituto Butantan

Referente Projeto: "Síntese e Ensaio de Análogos Estruturais de Prolina no Estudo da Interação com Trombina".

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

Dr. Marcelo Larami Santoro Coordenador da CEUAIB

Para o meu pai Izabelino (in memorian).

#### AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aqui a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus familiares por todo incentivo e suporte financeiro. Mãe, obrigada por acreditar em todos os meus sonhos e por me ajudar a torná-los realidade. Te amo do fundo do meu coração!

Ao professor Carlindo Baeta por me apresentar ao Instituto Butantan. Professor Carlindo, sua disposição e dedicação inspiram as pessoas que o cercam!

Agradeço ao meu orientador, Dr. Robson Lopes de Melo, por todo ensinamento e pelo voto de confiança em minha pessoa para a realização desse projeto.

Ao Dr. Pedro Ismael do Laboratório de Química de Proteínas por conceder o uso de seus equipamentos fluorimétricos. Agradeço aos alunos Ivan, Katiê, Bié e Luana pela amizade e colaboração.

À Dra. Solange Serrano por aceitar oficialmente o meu ingresso no Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada.

À Milene, Ana Karina e André pela colaboração nos ensaios de agregação plaquetária e na interpretação dos espectros de massas.

Aos funcionários do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada por compartilhar os momentos de alegria. — Regiane, Zezé, Dona Cida, Dona Vera e Isaías.

Aos funcionários da secretaria do Programa Interunidades em Biotecnologia, Fábia e Marcos, por terem esclarecido todas as dúvidas e cuidado de minha documentação. Obrigada por toda atenção!

Finalmente, agradeço aos órgãos CNPq e FAPESP pelo auxílio financeiro para a realização desse projeto.

"A ciência é a aproximação progressiva do homem com o mundo real".

Max Planck

#### RESUMO

SILVA, R. N. **Síntese e ensaio de análogos estruturais de prolina no estudo da interação com trombina.** 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A trombina é uma serino peptidase que atua como o principal agente da cascata de coagulação, exibindo propriedades pró-coagulantes, assim como propriedades anticoagulantes e antifibrinolíticas. A atividade de trombina pode ser inibida pela ligação de inibidores aos seus três domínios: o sítio ativo e seus dois exosítios. O desafio deste trabalho foi o emprego de aminoácidos não naturais que pudessem ser reconhecidos por trombina e proporcionassem resistência à hidrólise quando inseridos em uma determinada sequência peptídica, gerando inibidores de alta afinidade. Dentre os 20 L-aminoácidos naturais codificados, a prolina é o único aminoácido capaz de conferir restrição conformacional ao peptídeo ao qual está inserida, além de ser reconhecida como sítio de hidrólise por um subgrupo de peptidases muito específicas denominadas prolil-peptidases. Rotas sintéticas foram empregadas no grupo funcional ligado ao carbono da posição 4 do anel pirrolidínico da trans-4-hidroxi-L-prolina para a obtenção de quatro análogos de prolina com amino e guanido grupos nesta posição e isomeria espacial cis e trans. Adicionalmente, a 4-guanidino fenilalanina, por possuir características de aromaticidade e caráter catiônico, foi comparada com os análogos de prolina em todos os ensaios realizados. Estes aminoácidos foram empregados na síntese de análogos de bivalirudina. Entre os inibidores de trombina atualmente disponíveis no mercado, a bivalirudina caracteriza-se estruturalmente como um inibidor de 20 aminoácidos que pode ser clivado na posição Arg-Pro e que tem elementos que interagem com o sítio ativo e o exosítio I, apresentando uma constante de inibição entre 1.9 - 2.3 nM. Para uma prévia verificação da interação dos análogos gerados com o sítio ativo de trombina, foi realizada uma simulação computacional por docking molecular com cada um dos análogos. Ensaios de inibição competitiva e de agregação plaquetária demonstraram que os análogos apresentam atividade inibitória e são resistentes à hidrólise quando incubados com trombina humana. Entre os análogos de prolina sintetizados, o peptídeo contendo a trans-4-guanidino-L-prolina destacou-se dos demais nos ensaios de inibição competitiva, com uma constante de inibição de 168 nM. Entretanto, o peptídeo sintetizado com o aminoácido 4-guanidino-L-fenilalanina apresentou a melhor atividade inibitória em comparação com os análogos de prolina, com uma constante de inibição de 6,2 nM. Estes análogos de bivalirudina podem, em futuros trabalhos, ter seu efeito inibitório potencializado através de novas modificações nos grupos funcionais ligados aos análogos de prolina. Novas modificações ainda podem ser realizadas para a obtenção de análogos não peptídicos no desenvolvimento de inibidores de trombina administrados por via oral.

**Palavras-chave:** Aminoácidos. Análogos de prolina. Bivalirudina. Inibidores de trombina. Peptídeos. Resistência à hidrólise.

#### ABSTRACT

SILVA, R. N. Synthesis and assay of structural analogues of proline in the study of interaction with thrombin. 2013. 82 p. Dissertation (Masters thesis in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Thrombin is a serine peptidase that acts as the main agent of the coagulation cascade, with procoagulant properties as well as anticoagulant and antifibrinolytic properties. The activity of thrombin can be inhibited by the binding of inhibitors to its three domains: the active site and its two exosites. The challenge of this work was the use of unnatural amino acids that could be recognized by thrombin and confer hydrolysis resistance when inserted in a given peptide sequence, generating high-affinity inhibitors. Among the 20 natural L-amino acids encoded, proline is the unique amino acid able to confer conformational constraint to the peptide wherein is inserted, and is recognized as a site of hydrolysis by a highly specific subgroup of peptidases denominated prolylpeptidases. Synthetic routes were employed in the functional group attached to the carbon in position 4 of the pyrrolidinic ring of trans-4-hydroxy-L-proline to obtain four proline analogues containing amino and guanidino groups in this position with *cis* and trans spatial isomerism. Additionally, the 4-guanidino phenylalanine, known by possess characteristics of aromaticity and cationic character, was compared with the analogues of proline in all tests. These amino acids were employed in the synthesis of bivalirudin analogues. Among the thrombin inhibitors presently available on the market, bivalirudin is structurally characterized as an inhibitor of 20 amino acids that can be cleaved at Arg-Pro position and has elements that interact with the active site and exosite I, presenting an inhibition constant between 1.9 - 2.3 nM. For a preview check of the interaction between the analogues generated with the active site of thrombin, a computer simulation was performed by molecular docking with each analogue. Assays of competitive inhibition and platelet aggregation have demonstrated that the analogues present inhibitory activity and resistance to hydrolysis when incubated with human thrombin. Among the proline analogues synthesized, the peptide containing trans-4-guanidino-Lproline stood out from the others in competitive inhibition assays, with an inhibition constant of 168 nM. However, the synthesized peptide with the amino acid 4-guanidino-L-phenylalanine presented the highest inhibitory activity in comparison to proline analogues, with an inhibition constant of 6,2 nM. In future works, these analogues of bivalirudin may have the inhibitory effect improved through new changes in the functional groups attached to the proline analogues. Furthermore, modifications can be made to obtain non-peptide analogues in the development of thrombin inhibitors administered orally.

**Keywords:** Amino acids. Analogues of proline. Bivalirudin. Thrombin inhibitors. Peptides. Hydrolysis resistance.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da L-prolina e da <i>trans</i> -4-hidroxi-L-prolina	19
Figura 2 – Aminoácidos não naturais análogos de L-prolina com isomeria <i>cis/trans</i>	20
Figura 3 – Análogos de L-lisina e L-arginina	21
Figura 4 – Estrutura do Gnf (L-4-guanidino-fenilalanina)	22
<b>Figura 5</b> – Estrutura tridimensional da $\alpha$ -trombina humana em complexo covalente com	
d-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona	23
Figura 6 – Cascata da coagulação	25
Figura 7 – Sequência peptídica da bivalirudina	29
Figura 8 – Preparação dos precursores <i>cis/trans</i> a partir da <i>trans</i> -4-hidroxi-L-prolina	33
Figura 9 – Síntese dos análogos de prolina com isomeria <i>cis</i>	36
Figura 10 – Síntese dos análogos de prolina com isomeria <i>trans</i>	39
<b>Figura 11</b> – Docking molecular da estrutura de $\alpha$ -trombina humana com os ligantes	
análogos	49
Figura 12 – Ensaio de inibição da agregação plaquetária induzida pela trombina	
humana (2 nM) com a bivalirudina e seus análogos	52
Figura 13 – Caracterização da bivalirudina incubada com trombina humana	54
Figura 14 – Análises do análogo de bivalirudina com Gnf incubado com trombina	
humana	55
Figura 15 – Análises do análogo de bivalirudina com tgP incubado com trombina	
humana	56
Figura 16 – Análises do análogo de bivalirudina com cgP incubado com trombina	
humana	57
Figura 17 – Análises do análogo de bivalirudina com taP incubado com trombina	
humana	58
Figura 18 – Análises do análogo de bivalirudina com caP incubado com trombina	
humana	59

#### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Substituições realizadas na posição P1 da bivalirudina	41
<b>Tabela 2</b> – Concentrações dos peptídeos (µM) utilizados nos ensaios de agregação	
plaquetária	47
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros intermoleculares das conformações classificadas energeticamente	48
<b>Tabela 4</b> – Constantes de inibição ( $K_i$ ) da bivalirudina e seus análogos com substituições na	i
posição P1 da sequência d-FPXPGGGGNGDFEEIPEEYL-OH	50

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACN acetonitrila
- Boc terc-butiloxicarbonil
- Bzl Benzil
- caP-cis-4-amino-L-prolina
- Cbz Carbobenzoxi
- cgP-cis-4-guanidino-L-prolina
- CLAE cromatografia líquida de alta eficiência
- Da Dalton
- DBU-1,8-diazaciclo[5.4.0]undec-7-eno
- DCC diciclohexilcarbodiimida
- DCM diclorometano
- DMF dimetilformamida
- ECA Enzima conversora de angiotensina I
- EDT 1,2-etanoditiol
- Fmoc Fluorenilmetoxicarbonil
- Fmoc-OSu N-(9-fluorenilmetoxicarboniloxi)succinimida
- Gnf-4-guanidino-L-fenilalanina
- HHT hexahidrotirosol
- HPLC high pressure liquid chromatography (cromatografia líquida de alta pressão)
- K<sub>i</sub> constante de inibição
- Kiapp constante de inibição aparente
- K<sub>m</sub> constante de Michaelis Menten
- LC liquid chromatography (cromatografia líquida)
- M-Molar
- m/z razão entre massa e carga
- MCA 7-amino-4-metilcumarina
- MS mass spectrometry (espectrometria de massas)
- MSH melanocyte-stimulating hormones (hormônios estimulantes de melanócitos)
- NMM n-metil morfolina
- NMP n-metil pirrolidona
- ODS octadecilsilano
- OtBu terc-butil ester

- PAR protease-activated receptor (receptores ativados por proteases)
- PDB Protein Data Bank
- PMC 2,2,5,7,8-pentametil-cromo-6-sulfonil
- pNA para-nitroanilina
- PRP plasma rico em plaquetas
- taP-trans-4-amino-L-prolina
- TBS tris buffered saline (tampão salino tris)
- TBTU O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronio tetrafluoroborato
- tBu-terc-butil
- TFA ácido trifluoracético
- tgP-trans-4-guanidino-L-prolina
- THF tetrahidrofurano
- Tos Tosil
- Trt tritil
- UV ultra violeta
- $Z\text{-}OSu N^{\alpha}\text{-}(benziloxicarboniloxi) succinimida$

#### LISTA DE ABREVIATURAS DOS AMINOÁCIDOS

- Asp (D) ácido aspártico
- Glu (E) ácido glutâmico
- Ala (A) alanina
- Arg (R) arginina
- Asn (N) asparagina
- Cys (C) cisteína
- Phe (F) fenilalanina
- Gly (G) glicina
- Gln (Q) glutamina
- His (H) histidina
- Ile (I) isoleucina
- Leu (L) leucina
- Lys (K) lisina
- Met (M) metionina
- Pro (P) prolina
- Ser (S) serina
- Tyr (Y) tirosina
- Thr (T) treonina
- Trp (W) triptofano
- Val (V) valina

<b>1 INTRODUÇÃO</b>
1.1 Análogos de prolina
1.2 L-4-guanidino-fenilalanina
<b>1.3 Trombina</b>
1.4 Inibidores de trombina
<b>2 OBJETIVOS</b>
2.1 Objetivo geral
2.2 Objetivos específicos
3 MATERIAIS E MÉTODOS
3.1 Simulação da interação enzima-ligante por docking molecular
3.2 Solventes e reagentes
3.3 Extração de solventes
<b>3.4 Análises</b>
3.5 Síntese dos análogos de prolina
3.5.1 Síntese dos precursores cis/trans
3.5.1.1 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -cbz- <i>trans</i> -4-hidroxi-L-prolina34
<u>3.5.1.2 Procedimento para o preparo da N<sup><math>\alpha</math></sup>-cbz-<i>trans</i>-4-hidroxi-L-prolina benzil éster34</u>
3.5.1.3 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -cbz- <i>trans</i> -4[(p-toluenosulfonil)oxi]-L-prolina
benzil éster
3.5.1.4 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -cbz- <i>cis</i> -4-cloro-L-prolina benzil éster35
3.5.2 Síntese dos análogos cis
3.5.2.1 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -cbz- <i>cis</i> -4-azido-L-prolina benzil éster
3.5.2.2 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -cbz- <i>cis</i> -4-amino-L-prolina benzil éster36
3.5.2.3 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -Fmoc- <i>cis</i> -4-N-Boc-amino-L-prolina
3.5.2.4 Procedimento para o preparo da $N^{\alpha}$ -cbz- <i>cis</i> -4-N,N'-di-boc-guanidino-L-prolina benzil
<u>éster</u>
3.5.2.5 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -Fmoc- <i>cis</i> -4-N,N'-di-boc-guanidino-L-prolina 38
3.5.3 Síntese dos análogos trans
3.5.3.1 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -cbz- <i>trans</i> -4-azido-L-prolina benzil éster
3.5.3.2 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -cbz- <i>trans</i> -4-amino-L-prolina benzil éster
3.5.3.3 Procedimento para o preparo da N <sup><math>\alpha</math></sup> -Fmoc- <i>trans</i> -4-N-Boc-amino-L-prolina40
3.5.3.4 Procedimento para guanidização do peptídeo com o análogo taP40

# SUMÁRIO

3.5.4 Síntese de peptídeos em fase sólida	41
3.6 Síntese do substrato Boc-Val-Pro-Arg-MCA	42
3.6.1 Procedimento para o preparo de Boc-Val-OSu	
3.6.2 Procedimento para o preparo de Boc-Val-Pro-OH	43
3.6.3 Procedimento para o preparo de Boc-Arg(di-Z)-MCA	43
3.6.4 Procedimento para o preparo de Boc-Val-Pro-Arg-MCA	43
3.7 Determinação da constante de inibição ( $K_i$ ) para inibição competitiv	a linear simples
com trombina	44
3.8 Preparo da suspensão de plaquetas lavadas (SLP)	45
3.9 Ensaio de agregação plaquetária	46
3.10 Determinação do ponto de clivagem	47
4 RESULTADOS	
4.1 Docking molecular	
4.2 Caracterização dos aminoácidos análogos de prolina	
4.3 Ensaios de inibição competitiva	
4.4 Inibição da agregação plaquetária	51
4.5 Determinação do ponto de clivagem	53
4.5.1 Incubação de trombina com bivalirudina	53
4.5.2 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com Gnf	55
4.5.3 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com tgP	56
4.5.4 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com cgP	57
4.5.5 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com taP	58
4.5.6 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com caP	59
5 DISCUSSÃO	
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE – Figuras dos espectros de massa dos aminoácidos não natu	ırais análogos de
prolina sintetizados	77

#### 1 INTRODUÇÃO

Os aminoácidos não naturais têm sido, há muitos anos, empregados em pesquisa e no desenvolvimento de novas moléculas e em especial na inibição de peptidases e na interação com diversos tipos de receptores (IIZUKA et al., 1988; LEONARD et al., 1965). Alguns destes aminoácidos não naturais são capazes de conferir restrição conformacional ("constrained amino acids") nos peptídeos aos quais estão incorporados, além de mimetizar aminoácidos naturais e propiciar diferentes modos de interação com alvos moleculares. Estes aminoácidos têm sido largamente utilizados para o entendimento da interação de peptídeos com proteínas e receptores (O'REILLY et al., 2012). Casos clássicos como a síntese de agonistas e antagonistas de gonadorelina humana e desenvolvimento de análogos de encefalina são exemplos que se apoiam na utilização desta estratégia (HRUBY et al., 2002).

O uso de aminoácidos não naturais é uma parte integrante do repertório de desenvolvimento de peptídeos miméticos. O emprego desta metodologia, com ou sem o apoio de modelos *in silico*, é parte do arsenal de desenvolvimento de novas moléculas largamente empregado na pesquisa acadêmica e farmacêutica. O uso de aminoácidos não naturais em inibidores de calicreína tecidual humana explorado por Melo et al. (2001) permitiu o desenvolvimento de uma interessante série de inibidores por esta estratégia.

Outro aspecto importante a ser realçado no emprego destes aminoácidos é o seu efeito na conformação global do peptídeo no qual está inserido. Este aspecto reflete-se nos ângulos de torção. Considerando-se que as características da estrutura ou do "backbone" de um peptídeo são afetadas pelos ângulos de torção  $\phi$ ,  $\psi$ ,  $\omega \in \chi$  então estes ângulos controlam o espaço conformacional do peptídeo (BARRETT; ELMORE, 1998). A substituição de aminoácidos não naturais em sequências peptídicas reconhecidas por determinados alvos moleculares podem resultar em variações na atividade biológica devido a demandas estéricas ou mudanças conformacionais resultantes da interação dos análogos com o alvo em questão (MAGAFA et al., 2010). A prolina distingue-se por ser um alfa aminoácido natural capaz de conferir rigidez ao ângulo de torção  $\chi$  (chi) (GIBSON et al., 1999). Portanto, os análogos estruturais de prolina deste projeto partilham estas características sendo interessantes na geração de moléculas com características estruturais distintas.

#### 1.1 Análogos de prolina

Dentre os vinte alfa-aminoácidos naturais codificados pelo DNA humano, a prolina é o único capaz de restringir conformação em peptídeos e proteínas. Em ligações peptídicas, aminoácidos naturais predominantemente formam ligações com isomeria *trans*, com exceção da prolina, que é capaz de formar ligações *cis* (BREZNIK et al., 2001). Sua estrutura cíclica de cinco membros constringe o ângulo  $\phi$  à -65°+/-15°, impedindo a formação de alfa hélices e favorecendo a formação de folhas beta (GENTILUCCI; DE MARCO; CERISOLI, 2010). Além disso, cálculos de energia sugerem que a barreira de energia de ativação para a isomerização *cis/trans* é menor para a prolina: 13 kcal/mol, comparado com 20 kcal/mol em outras ligações peptídicas (MACARTHUR; THORNTON, 1991).

Na biossíntese de aminoácidos, a prolina é um derivado cíclico do glutamato, sendo que, na primeira etapa de síntese, o ATP reage com o grupo carboxila do glutamato, formando um acil-fosfato, que é reduzido por NADPH ou NADH. Como intermediário, é produzido o  $\gamma$ -semialdeído do glutamato, que espontaneamente é ciclizado e novamente é reduzido para produzir prolina (NELSON; COX, 2011).

A capacidade de hidrólise, por peptidases, da ligação de prolina a outros aminoácidos fica restrita a enzimas específicas, tais como as prolil-peptidases que, embora amplamente distribuídas, são mais abundantemente encontradas no tecido nervoso de animais superiores (GEISS-FRIEDLANDER et al., 2009).

A inserção de grupos funcionais aos carbonos da cadeia lateral de prolina pode gerar aminoácidos com simetria *cis* ou *trans* dependendo da rota sintética empregada. Esta simetria *cis* ou *trans* pode ser de grande valor para um correto posicionamento dos grupos substituintes frente a um alvo molecular de interesse (SUGASE et al., 2004). Assim, análogos estruturais de prolina contendo diferentes substituintes ligados a sua cadeia lateral são uma interessante ferramenta para o desenvolvimento de peptídeos miméticos com restrição conformacional.

Como ponto de partida para os aminoácidos não naturais estudados neste trabalho, foi utilizado um análogo natural de prolina, a *trans*-4-hidroxi-L-prolina, um alfa aminoácido natural que possui na posição 4 do seu anel pirrolidínico um grupo álcool que pode ser modificado quimicamente para a obtenção de uma interessante série de análogos (figura 1).



Figura 1 - Estrutura química da L-prolina e da trans-4-hidroxi-L-prolina

Em 1902, Hermann Emil Fisher isolou a hidroxiprolina da gelatina e em 1905 foi sintetizada pela primeira vez por Hermann Leuchs (GAUDRY; GODIN, 1954). O colágeno é a proteína encontrada em maior abundância no corpo humano e distingue-se quimicamente de outras proteínas devido seu alto teor de hidroxiprolina (PATCHETT; WITKOP, 1957). No colágeno, os resíduos de hidroxiprolina desempenham a fundamental função de conferir estabilidade conformacional à tripla hélice da proteína (JENKINS et al., 2003).

A *trans*-4-hidroxi-L-prolina possui dois centros quirais com funções bem versáteis (álcool e ácido carboxílico) e um imino grupo básico, o que possibilita uma boa variedade de modificações sintéticas para a obtenção de moléculas com diferentes isomerias. A conversão do grupo 4-hidroxi em um bom grupo de saída como tosila, fornece a oportunidade de uma troca direta por uma boa variedade de nucleófilos (REMUZON, 1996). Portanto, neste projeto a *trans*-4-hidroxi-L-prolina foi empregada como estrutura precursora para toda a série de aminoácidos não naturais descritos.

A obtenção da coleção de moléculas representadas na figura 2 é descrita por diferentes rotas na literatura e elas ainda não foram reunidas, de forma sistemática, para o estudo de inibidores de peptidases (SUGASE et al., 2004; TAMAKI; HAN, HRUBY, 2001; WEBB; EIGENBROT, 1991). Tamaki, Han e Hruby (2001) desenvolveram rotas sintéticas alternativas para a obtenção de 4-aminoprolinas e 4-guanidinoprolinas com isomeria *cis* e *trans*. O processo inicial envolve a obtenção dos precursores para a síntese dos análogos *cis* e *trans* a partir da *trans*-4-hidroxi-L-prolina.

<sup>(\*)</sup> carbono assimétrico. (A) L-Prolina. (B) *trans*-4-hidroxi-L-prolina. Fonte: Modificado de Remuzon (1996)



Figura 2 – Aminoácidos não naturais análogos de L-prolina com isomeria cis/trans

(A)  $-N^{\alpha}$ -Fmoc-*cis* -4-N-Boc-amino-L-prolina. (B)  $N^{\alpha}$ -Fmoc-*cis*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina. (C)  $N^{\alpha}$ -Fmoc-*trans*-4-N-Boc-amino-L-prolina. (D)  $N^{\alpha}$ -Fmoc-*trans*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina. Fonte: Modificado de Tamaki, Han e Hruby (2001)

Uma vez obtidas as moléculas precursoras, para ambas as conformações, múltiplos passos reacionais são empregados na geração dos aminoácidos não naturais. O precursor dos aminoácidos com isomeria *trans* é obtido através da reação de Mitsunobu, mediante mecanismos de substituição do tipo SN2. Estes aminoácidos são protegidos com o grupo Fmoc (fluorenilmetoxicarbonil) para seu adequado emprego na síntese de peptídeos em fase sólida (SUGASE et al., 2004; TAMAKI; HAN, HRUBY, 2001; WEBB; EIGENBROT, 1991).

Zanuy et al. (2009) publicaram o emprego dos análogos da figura 3 com n= 2 e 3. A ideia foi promover resistência contra a degradação proteolítica de um pentapeptídeo (Cys-Arg-Glu-Lys-Ala) e a análise realizada levou a um peptídeo com uma flexibilidade significativamente menor, com uma energia de conformação mais baixa e alta similaridade com a conformação bioativa do pentapeptídeo. Este é um pentapeptídeo de endereçamento para tumores de mama que pode servir para tratamento e diagnóstico (SIMBERG et al., 2007). Zanuy et al. (2009) realizaram estudos *in silico* e o resultado da troca de arginina por estes análogos *in vitro* ainda não foi publicado.

#### Figura 3 - Análogos de L-lisina e L-arginina



(\*) carbono assimétrico no qual as conformações *cis* e *trans* são obtidas dependendo da rota sintética empregada. Fonte: Modificado de Zanuy et al. (2009)

Trabalhos descritos na literatura têm obtido êxito empregando estruturas com base no anel pirrolidínico de prolina para a obtenção de inibidores de enzima conversora de angiotensina I (como captopril, enalapril, ramiprilat), antibióticos (como ceftazidine), inibidores de trombina entre outras classes terapêuticas (HANESSIAN et al., 2008).

QU et al. (2009) desenvolveram outro trabalho interessante, que ilustra o recente emprego destes análogos com n = 0 (figura 3) para a geração de análogos de *gama*-MSH, um neuropeptídeo encontrado em fibras nervosas assim como em granulócitos neutrofílicos da pele humana, sendo envolvido na patogênese da hiperpigmentação pós-inflamatória e melanomas (SLOMINSKI et al., 1992). Estes análogos são testados com receptores de melanocortina sendo possível selecionar estruturas de razoável seletividade entre os 4 receptores testados.

Outro emprego a ser citado foi obtido no desenho racional de antagonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina pela geração de análogos de prolina em peptídeos miméticos de  $\alpha$ -Conotoxina, sendo que, análogos de prolina com substituintes aromáticos ou hidrofóbicos apresentaram moderada atividade antagonista no receptor (ARMISHAW et al., 2009).

Portanto, análogos de prolina têm sido empregados em diversos trabalhos no desenvolvimento de moléculas bioativas. Por serem aminoácidos restritores conformacionais e terem funções aceptoras de prótons em seu grupo funcional posicionado no carbono 4, os análogos de prolina apresentados na figura 2 foram empregados neste presente trabalho para o desenvolvimento de inibidores de trombina, com o propósito de se obter peptídeos resistentes à hidrólise, além de serem reconhecidos por trombina.

#### 1.2 L-4-guanidino-fenilalanina

A L-4-guanidino-fenilalanina (Gnf) é um aminoácido não natural análogo de fenilalanina com caráter básico em sua cadeia lateral (figura 4). O produto é originado a partir da para-nitro-fenilalanina, que após a proteção de seu alfa amino grupo é reduzida para a conversão do nitro grupo a amino grupo e o produto resultante é reagido com um agente guanidizante, como o "1-guanidino-3,5-dimethylpyrazole nitrate" (RIGBI et al., 1978).

Figura 4 – Estrutura do Gnf (L-4-guanidino-fenilalanina)



Fonte: Modificado de Rigbi et al. (1978)

Wysocka et al. (2007) desenvolveram substratos cromogênicos para catepsina G e entre os aminoácidos não naturais testados o Gnf destacou-se com o maior valor de constante de especificidade (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>), demonstrando ser o substrato mais ativo.

Melo et al. (2001) observaram que o Gnf, quando inserido em sequências peptídicas de substratos reconhecidos por calicreína tecidual humana, é capaz de conferir resistência à hidrólise. Por possuir esse histórico de resistência à hidrólise e ter caráter básico em sua cadeia lateral, o Gnf, preparado previamente para outros estudos pelo Dr. Robson Lopes de Melo, foi testado e comparado com os análogos de prolina.

#### 1.3 Trombina

As peptidases desempenham funções essenciais nos organismos vivos. Os eventos dessa classe de enzimas são fundamentais nos processos de ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário, formação óssea, desenvolvimento neuronal, apresentação de antígenos, regulação do ciclo celular, cicatrização, angiogênese e apoptose (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008; PUENTE et al., 2003). No passado costumava-se pensar que algumas enzimas dessa classe, as "proteinases", hidrolisavam somente moléculas de alta massa molecular e outras eram responsáveis por hidrolisar apenas moléculas pequenas. Entretanto, no decorrer do tempo foi observado que a massa molecular do substrato não é relevante e que a interação

das peptidases é determinada pela especificidade de seu centro de catálise (DIXON; WEBB, 1979). De acordo com o mecanismo de catálise, as peptidases podem ser classificadas em seis classes: aspártico, glutâmico, metalo, cisteíno, serino e treonino peptidases (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

Mais de um terço de todas as peptidases conhecidas são serino peptidases. Acima de 26000 serino peptidases são agrupadas em clãs baseados no mecanismo catalítico e famílias com ancestralidade em comum (BARRETT; RAWLINGS, 1995; PAGE; DI CERA, 2008). Entre todas as peptidases, a classe das serino peptidases foi uma das primeiras a ser estudada extensivamente e originalmente é distinta das demais por sua tríade catalítica com os resíduos Asp-His-Ser. Posteriormente, novas serino peptidases foram descobertas com diferentes tríades ou díades catalíticas, tais como Ser-His-Glu, Ser-Lys/His e His-Ser-His (BEYNON; BOND, 2001; HEDSTROM, 2002; PERONA; CRAIK, 1995). As serino peptidases participam de importantes processos fisiológicos, como digestão (tripsina, quimotripsina), respostas imunes (fatores de complemento B, C e D), coagulação sanguínea (fatores IIa, VIIa, IXa, Xa, XIIa), fibrinólise (uroquinase, ativador tecidual de plasminogênio, plasmina, calicreína) e reprodução (acrosina) (PAGE; DI CERA, 2008; POLGÁR, 2005).

Sendo a última peptidase da cascata de coagulação, a trombina (figura 5) pertence à classe das serino peptidases e sua estrutura é composta por uma cadeia de 36 resíduos (cadeia A), interligada covalentemente por ponte dissulfeto a uma cadeia maior de 259 resíduos (cadeia B). Além da ligação covalente entre os resíduos Cys1 e Cys122, as cadeias A e B são interligadas por pontes de hidrogênio e grupos carregados das cadeias laterais dos resíduos (BODE; TURK; KARSHIKOV, 1992; BUTKOWSKI et al., 1977).

Figura 5 – Estrutura tridimensional da α-trombina humana em complexo covalente com D-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona



A figura demonstra a estrutura da  $\alpha$ -trombina humana (código PDB: 1PPB) em complexo covalente com o inibidor d-Phe-Pro-Arg-clorometilcetona (modelo de bastão). A cadeia A é representada em vermelho, a cadeia B em cinza e o íon de Na<sup>+</sup> como uma esfera amarela. Fonte: Modificado de Bode; Turk e Karshikov (1992)

Em seu bolsão de especificidade S1 destaca-se a presença do resíduo Asp189 devido o seu caráter ácido e especificidade no reconhecimento de resíduos de arginina na posição P1, segundo a nomenclatura de Schechter e Berger (KIKELJ, 2004). A nomenclatura de Schechter e Berger foi introduzida em 1967 e seu sistema designa os resíduos dos aminoácidos pertencentes ao substrato que se ligam em subsítios da enzima. Convenientemente, os subsítios na peptidase são chamados S (subsítios) e os resíduos de aminoácidos do substrato são chamados P (para peptídeo). Os resíduos de aminoácidos do lado N-teminal da ligação peptídica do substrato que é hidrolisada pela peptidase são numerados Pn, P(n-1), ..., P3, P2, P1 e os resíduos do lado C-terminal são numerados P1', P2', P3', ..., P(n-1) ', Pn'. Durante a hidrólise, o substrato é clivado pela peptidase entre os resíduos P1-P1'. Os subsítios na peptidase que complementam os resíduos do substrato ligado são numerados Sn, S(n-1), ..., S3, S2, S1, S1',S2', S3', ..., S(n-1) ', Sn' (SCHECHTER; BERGER, 1967).

Na entrada do sítio ativo de trombina, localiza-se o resíduo Glu192, responsável pela especificidade no reconhecimento de ligantes que interagem com trombina (BODE, 2006). Além disso, sua estrutura é composta por mais dois exosítios de caráter básico. O exosítio I desempenha fundamental importância no reconhecimento de fibrinogênio e o exosítio II é conhecido como o sítio de ligação de heparina (HUNTINGTON, 2005).

A especificidade do centro de catálise da trombina é determinada entre os subsítios  $S_3$ ao S'<sub>3</sub>. Sendo uma arginil-hidrolase, a arginina é praticamente essencial no sítio primário (P<sub>1</sub>) enquanto que prolina é preferido na posição P<sub>2</sub> e serina em P'<sub>1</sub>. Um estudo sistemático das interações dos subsítios S'<sub>2</sub>-P'<sub>2</sub> e S'<sub>3</sub>-P'<sub>3</sub> mostra que S'<sub>2</sub> tem marcada preferência por aminoácidos hidrofóbicos de cadeia aromática (fenilalanina) e S'<sub>3</sub> por aminoácidos carregados positivamente, enquanto que o ácido aspártico nas duas posições (P'<sub>2</sub> e P'<sub>3</sub>) gera inibidores da enzima (LE BONNIEC et al., 1996).

Na via extrínseca da cascata de coagulação, a geração de trombina inicia-se quando o rompimento da integridade vascular possibilita o contato dos fatores de coagulação do plasma com o fator tecidual extracelular, uma proteína presente no tecido subendotelial. Em contrapartida, na via intrínseca a geração começa quando o complexo de cininogênio de alto peso molecular e pré-calicreína circulante no plasma liga-se ao fator XII, permitindo uma ativação mútua e a subsequente ativação dos demais fatores da cascata de coagulação. Após a iniciação do processo de coagulação por sua via intrínseca/extrínseca, uma série de zimogênios são convertidos em suas formas ativas por precursores da cascata de coagulação (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; MÜLLER-ESTERL; IWANAGA; NAKANISHI,

1986; WOLBERG, 2007), a ativação do fator V por trombina ocorre através da clivagem proteolítica nos resíduos Arg709 e Arg1545 e o fator VIII é ativado pela clivagem nos resíduos Arg372, Arg740, Arg1648 e Arg1689 (KALAFATIS et al., 1994). Por sua vez, a trombina ativa (fator IIa) é gerada pela clivagem proteolítica de seu zimogênio (protrombina ou fator II) pelo fator Xa na presença do fator Va, íons de cálcio e uma camada fosfolipídica (figura 6). A produção de trombina é uma etapa necessária no processo de coagulação para a conversão de fibrinogênio em fibrina, o que forma uma rede hemostática, após a ação do fator XIIIa, para a agregação de plaquetas e a formação do trombo (BERRY; CHAN, 2013; DEGEN; DAVIE, 1987; FENTON; FASCO; STACKROW, 1977; WEITZ et al., 1990).





TPL – tromboplastina tecidual. APM – alto peso molecular. PL – fosfolipídeos. Fonte: Modificado de Blaya et al. (1998)

Além disso, a regulação alostérica permite que a trombina tenha dupla função nos processos de promoção e interrupção da coagulação através da ativação do sistema anticoagulante pela proteína C. A trombina existe em duas formas conformacionais: uma é estabilizada pelo íon de sódio e tem alta especificidade para converter fibrinogênio em fibrina e a outra forma conformacional, que predomina na ausência de sódio, tem baixa especificidade para a conversão de fibrinogênio, mas alta especificidade para ligar-se à trombomodulina e ativar a proteína C. Dessa forma, a trombina desempenha funções anti e pró-coagulantes (BORISSOFF et al., 2010; DI CERA et al., 1995; JAKUBOWSKI; OWEN, 1989; LEW; WEAVER, 2008).

Na fisiologia a trombina desempenha um caráter multifuncional, apresentando no mínimo 13 ações e estabelece uma ligação entre os processos de coagulação e inflamação atuando na iniciação PAR-dependente de diferentes respostas pró-inflamatórias em plaquetas, células endoteliais, macrófagos e em células musculares lisas vasculares (BORISSOFF et al., 2009; CONNOLLY et al., 1996).

A sinalização de trombina no endotélio resulta em várias mudanças fenotípicas como alterações na forma de uma célula, permeabilidade, migração, síntese de DNA, angiogênese e hemostasia. No endotélio, a sinalização por trombina é mediada por uma família de receptores acoplados à proteína G conhecidos como receptores PAR (*protease-activated receptors*). Entre os quatro membros da família PAR identificados, nas plaquetas humanas são expressos os receptores PAR-1 e PAR-4 e a ativação de ambos inicia a secreção e a agregação plaquetária (CRISTOFARO; CANDIA, 2003; MINAMI et al., 2004). Nas plaquetas, a ativação dos receptores PAR ocorre quando a trombina cliva o amino-terminal em um determinado ponto de seu domínio extracelular e o segmento remanescente realiza uma acoplagem intermolecular com o próprio receptor para que ocorra a sinalização o principal receptor devido sua alta afinidade por trombina, sendo ativado a uma concentração consideravelmente menor do que a necessária para ativar PAR-4 (BRITO; TRICOCI, 2013).

#### 1.4 Inibidores de trombina

Entre os grupos de drogas antitrombóticas existentes, de acordo com a ação terapêutica, pode-se destacar: anticoagulantes que inibem a geração e a atividade de trombina; inibidores de agregação plaquetária; e agentes fibrinolíticos que desfazem o trombo formado (KUDRYAVTSEV et al., 2011; SIKKA; BINDRA, 2010). Por desempenhar importantes funções na regulação da hemostasia e trombose, a trombina é um atrativo alvo no desenvolvimento de antitrombóticos e anticoagulantes (KARLE; KNECHT; XUE, 2012; MONTOYA; GAJRA, 2012; XU et al., 2013).

Os agentes inibidores de trombina podem bloquear sua ação ligando-se a um ou mais pontos de seus três sítios: o sítio ativo ou sítio catalítico, o exosítio 1, conhecido também como sítio de reconhecimento do fibrinogênio, que assegura a adequada orientação dos substratos e o exosítio 2, o sítio de ligação para inibidores indiretos de trombina como o complexo de heparina e anti-trombina-III (GURM; BHATT, 2005). A regulação da atividade de trombina pode ser mediada por uma inibição direta ou indireta. No caso dos inibidores indiretos, o efeito anticoagulante é atingido limitando-se a geração e ativação de trombina através de inibidores como a heparina e antagonistas de vitamina K. Inibidores diretos como hirudina, bivalirudina, argatroban e dabigatran ligam-se diretamente à trombina, sem a presença de intermediários como a antitrombina III, prevenindo a interação com substratos (ADAMS; BIRD, 2009; WEITZ, 2003). Inibidores diretos de trombina apresentam vantagens sobre a heparina não fracionada, pois não ativam plaquetas e são capazes de se ligar à trombina livre ou à trombina em complexo com o coágulo. Em contraste, a heparina apresenta diversas desvantagens: ela é dependente dos níveis de antitrombina III circulantes no sangue; é uma mistura heterogênea de moléculas com considerável variabilidade em farmacocinética e farmacodinâmica; é inibida pelo fator plaquetário IV; e não inibe a trombina ligada ao trombo (BECKER, 2005; BLAYA et al., 1998; BREIK; TADROS; DEVITT, 2013; CHEN; LINCOFF, 2005; MARKWARDT, 2002).

O primeiro inibidor direto de trombina disponibilizado para uso clínico foi a hirudina, encontrada nas glândulas salivares da sanguessuga medicinal (*Hirudo medicinalis*) e posteriormente produzida na forma recombinante (CORRAL-RODRÍGUEZ et al., 2010; MARKWARDT, 1994). A hirudina é composta por uma cadeia polipeptídica de 65 resíduos de aminoácidos com três pontes dissulfeto e sua interação com trombina ocorre de forma bivalente entre o sítio ativo e o exosítio I (GIRNYS; PORTER; MOSBERG, 2011). Sua constante de inibição (K<sub>i</sub>) é de 22 fM e é reconhecido como um inibidor irreversível e altamente seletivo, sem atividade inibitória contra outras serino peptidases (DAS; KIMBALL, 1995; STRAUB; ROEHRIG; HILLISCH, 2011). Desde a descoberta e o isolamento da hirudina em 1950, o desenvolvimento de inibidores baseados em sua estrutura gerou uma família de análogos conhecidos como hirugens ou hirullins (LEFKOVITS; TOPOL, 1994).

Em casos de pacientes que correm o risco de desenvolver trombocitopenia (redução do número de plaquetas) induzida por heparina ao serem submetidos à angioplastia coronária, argatroban, um pequeno inibidor de 527 Da, é administrado por via intravenosa para a profilaxia e tratamento da trombose (KATHIRESAN; SHIOMURA; JANG, 2002; LEWIS et al., 2001; NUTESCU; WITTKOWSKY, 2004). Derivado sinteticamente da L-arginina, o argatroban é um inibidor que se liga reversivelmente ao sítio ativo de trombina com uma constante de inibição de 39 nM (KAPLAN; FRANCIS, 2002; WEITZ; HIRSH; SAMAMA, 2004). Seu tempo de meia vida no plasma é de 45 minutos, a metabolização ocorre por via hepática resultando em quatro metabólitos inativos e sua dosagem não precisa ser regulada em

pacientes com disfunções renais (AKIMOTO et al., 2011; MADABUSHI et al., 2011; RÖSSIG et al., 2011)

Outro inibidor direto aprovado e atualmente administrado em casos de acidente vascular cerebral e embolia sistêmica é o dabigatran, disponível como a pró-droga etexilato de dabigatrana. Em mais de 50 países o dabigatran também foi aprovado para a profilaxia do tromboembolismo após cirurgias ortopédicas de substituição da articulação do joelho ou quadril (HÄRTTER et al., 2012; HE et al., 2013; VERMA, 2010). O dabigatran é um inibidor oral, de baixa massa molecular (472 Da) que se liga de forma competitiva e reversível ao sítio ativo de trombina, com uma constante de inibição de 4,5 nM (ALBAN, 2008; NAGARAKANTI; ELLIS, 2012). Sua estrutura peptideomimética foi desenvolvida com base no complexo de trombina com o inibidor N-2-naftil-sulfonil-glicil-D-para-amidino-fenil-alanil-piperidina (SPINLER, 2013).

Aprovada para uso clínico em dezembro de 2000, a bivalirudina surgiu como um alternativo agente antitrombótico para pacientes submetidos à angioplastia coronariana primária. A bivalirudina também é conhecida como hirulog e comercializada como Angiomax (The Medicines Company, Parsippany, NJ., U.S.A.). O uso da bivalirudina como alternativa à heparina reduz o risco de trombocitopenia e agregação plaquetária, associada à administração de heparina. Nesse comparativo, a bivalirudina diferencia-se por inibir a agregação plaquetária, além de apresentar atividade inibitória contra trombina (BITTL et al., 2001; HUET et al., 2012; LINCOFF et al., 2003; MEHRAN et al., 2009; PIERI et al., 2013; SCHWENKGLENKS et al., 2012; STONE et al., 2008).

Semelhantemente à hirudina, a bivalirudina é um inibidor direto bivalente que forma uma ligação entre o sítio ativo e o exosítio I, porém, é hidrolisada por trombina na ligação Arg-Pro e a função do sítio ativo da enzima pode ser restaurada após a clivagem (DI NISIO; MIDDELDORP, BÜLLER, 2005; LEE; ANSELL, 2011; OLIVEIRA; FRANCO, 2001; WITTING et al., 1992). Com uma constante de inibição entre 1,9 - 2,3 nM, a bivalirudina é um peptídeo com 20 resíduos de aminoácidos (2180 Da) e sua estrutura é baseada na sequência da hirudina. A sequência une o dodecapeptídeo C-terminal da hirudina nativa, entre os resíduos 53-64, com o tetrapeptídeo (d-Phe-Pro-Arg-Pro) do N-terminal que se liga ao sítio ativo de trombina. As duas sequências são interligadas por quatro glicinas que desempenham a função de espaçadores, conforme demonstrado na figura 7 (CANNON et al., 1993; MARAGANORE et al., 1990; WARKENTIN, 2004).

Figura 7 – Sequência peptídica da bivalirudina



Fonte: Modificado de Warkentin (2004)

Estudos sobre a estrutura-função da bivalirudina já foram reportados por outros grupos que realizaram modificações como: uso de  $\beta$ -homoarginina na ligação cindível para a promoção de resistência à hidrólise; aumento da afinidade pelo exosítio I através da sulfatação do resíduo de tirosina; e estudo da especificidade através da troca de D-Phe por D-ciclohexilalanina (BOURDON et al., 1991; KLINE et al., 1991; MARAGANORE, 1993; QIU et al., 1992; WITTING et al., 1992). Chen et al. (2003) desenvolveram análogos de bivalirudina com resíduos ácidos na posição P1 pertencente à arginina e como resultado, obtiveram a inibição da expressão do fator tecidual e a redução da reestenose, que vem a ser o estreitamento anormal do vaso sanguíneo. Por ser um proeminente inibidor direto e alvo de vários grupos de estudo, neste trabalho, a sequência peptídica da bivalirudina foi escolhida como modelo para a inserção dos aminoácidos não naturais sintetizados e testados contra trombina.

#### **2 OBJETIVOS**

#### 2.1 Objetivo geral

Em termos gerais, neste presente trabalho, os aminoácidos não naturais análogos de prolina sintetizados e o Gnf foram inseridos na sequência peptídica da bivalirudina com o propósito de se obter peptídeos análogos que pudessem ser reconhecidos por trombina e que ao mesmo tempo fossem resistentes à clivagem.

#### 2.2 Objetivos específicos

- Simular pelo método computacional de docking molecular os aminoácidos não naturais com o sítio ativo de trombina para uma prévia avaliação das interações com o resíduo de reconhecimento (Asp189);
- Sintetizar os aminoácidos não naturais 4-amino-L-prolina e 4-guanidino-L-prolina com isomerias *cis* e *trans*;
- Preparar estes aminoácidos não naturais através da proteção do amino grupo com o grupo protetor fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc) para a sua inserção em peptídeos;
- Sintetizar e caracterizar os peptídeos análogos de bivalirudina contendo os aminoácidos não naturais (taP, caP, tgP, cgP e Gnf);
- Determinar a constante de inibição desses peptídeos análogos contra trombina através de ensaios fluorimétricos de inibição competitiva;
- Avaliar a atividade inibitória de trombina mediada por esses peptídeos análogos na presença de plaquetas através de ensaios de agregação plaquetária;
- Avaliar a resistência à hidrólise dos peptídeos análogos quando incubados com trombina.

#### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 3.1 Simulação da interação enzima-ligante por docking molecular

Todas as simulações por docking molecular foram realizadas através do programa AutoDock 4.2 e AutoDock Tools 1.5.4 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA., U.S.A.).

As coordenadas da estrutura cristalográfica foram obtidas através do site Protein Data Bank (RCSB, 1998), utilizando-se a estrutura de α-trombina humana depositada com o código 1NZQ.

Para a validação do método, foi realizada uma simulação da sequência d-Phe-Pro-Arg, responsável pela interação com o sítio ativo de trombina. As demais simulações por docking molecular foram realizadas com os aminoácidos análogos substituídos na posição P1. Como o software apresenta uma limitação quanto ao número de ligações flexíveis no ligante, optou-se por restringir a simulação aos resíduos que se ligam ao sítio ativo, apenas para a verificação da interação dos aminoácidos não naturais com o sítio ativo de trombina.

As conformações mais prováveis foram selecionadas através de um algoritmo genético, parametrizado para classificar em 25 milhões de avaliações as 50 conformações mais prováveis de acordo com a energia livre de ligação entre o complexo enzima-ligante. O campo de força de energia livre semi-empírica do AutoDock é baseado no campo de força da mecânica molecular e leva em consideração interações/repulsões hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, eletrostáticas, desolvatação e entropia torsional (COSCONATI et al., 2010). O campo de força avalia as interações em duas etapas. Na primeira etapa, os valores energéticos intramoleculares são estimados no estado de transição em que o ligante e a enzima não ligados passam para um estado em que o complexo é formado. Em uma segunda etapa, os valores energéticos intermoleculares são avaliados levando-se em consideração o complexo enzima-ligante formado (HUEY et al., 2007).

A fórmula 1 expressa esta relação, sendo que, (A) refere-se às avaliações energéticas conformacionais do campo de força, (P) à proteína, (L) o ligante,  $\Delta G$  à variação de energia livre e  $\Delta S_{conf}$  à variação da entropia conformacional liberada em decorrência da ligação formada:

Fórmula (1)

$$\Delta G = \left(A_{\text{ligado}}^{\text{L}-\text{L}} - A_{\text{não ligado}}^{\text{L}-\text{L}}\right) + \left(A_{\text{ligado}}^{\text{P}-\text{P}} - A_{\text{não ligado}}^{\text{P}-\text{P}}\right) + \left(A_{\text{ligado}}^{\text{P}-\text{L}} - A_{\text{não ligado}}^{\text{P}-\text{L}} + \Delta S_{\text{conf}}\right)$$

Fonte: Modificado de Huey et al. (2007)

#### 3.2 Solventes e reagentes

Os reagentes e solventes utilizados foram obtidos de fornecedores especializados, sendo empregados na síntese sem purificação prévia, salvo menção em contrário nas etapas de síntese que exigiam um meio reacional anidro. A piridina foi tratada com KOH por destilação simples. O tetrahidrofurano (THF) foi tratado com LiAlH<sub>4</sub> em refluxo para a remoção de água e peróxidos.

A resina Fmoc-Leu-wang, os Fmoc-aminoácidos e o agente de acoplamento O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronio tetrafluoroborato (TBTU) foram adquiridos da Novabiochem (Novabiochem Inc., Darmstadt, DA., Alemanha). Os Fmoc-aminoácidos com cadeia lateral protegida foram: Arg(PMC), Tyr(tBu), Glu(OtBu), Asp(OtBu) e Asn (Trt).

#### 3.3 Extração de solventes

Para a remoção dos solventes orgânicos das soluções, ao final de cada etapa da síntese do dos intermediários e dos produtos finais, foi utilizado um sistema rotavapor Büchi – R-205 (BÜCHI Labortechnik AG, Zurich, ZH., Suíça).

A remoção da água das soluções que continham os peptídeos sintetizados foi realizada com o uso de um liofilizador Thermo-Savant Modulyo (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA., U.S.A.).

#### 3.4 Análises

A caracterização dos intermediários sintéticos, dos aminoácidos e dos peptídeos obtidos neste projeto foi obtida empregando técnicas cromatográficas (HPLC e cromatografia em camada delgada) e análises por espectrometria de massas LC-MS.

As análises foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu LC-10AD-VP, utilizando uma coluna analítica Shim-pack ODS (4,6 x 250 mm;  $\emptyset = 5 \mu$ m), os solventes H<sub>2</sub>O/TFA 1000:1 (solvente A) e acetonitrila/H<sub>2</sub>O/TFA 900:100:1 (solvente B), em gradiente de 5 a 90% do solvente B em 25 minutos e o detector de UV acoplado em linha ajustado para monitoramento em  $\lambda = 214$  nm.

Na obtenção dos espectros de massas foi utilizado um espectrômetro de massas Finnigan Surveyor MSQ Plus (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA., U.S.A.), mediante os seguintes parâmetros de análise:

- Solventes: A (H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 1000:1)

## B (ACN/ H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 800:200:1) C (MeOH/ H<sub>2</sub>O 800:200)

- Voltagem do cone: 40 eV
- Temperatura: 150 °C
- Gás de arraste: nitrogênio
- Tipo de injeção: direta (sem coluna)

#### 3.5 Síntese dos análogos de prolina

#### 3.5.1 Síntese dos precursores cis/trans

Para a obtenção dos precursores *cis/trans*, o imino grupo e o ácido carboxílico da *trans*-4-hidroxi-L-prolina foram protegidos, respectivamente, com os grupos Cbz e Bzl. Passos reacionais empregados no grupo ligado ao carbono 4 resultaram nos precursores *cis/trans* (TAMAKI; HAN; HRUBY, 2001; WEBB; EIGENBROT, 1991). A figura 8 apresenta resumidamente os aminoácidos intermediários de cada etapa reacional realizada para a obtenção dos precursores.





(1) *trans*-4-hidroxi-L-prolina; (2)  $N^{\alpha}$ -cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina; (3)  $N^{\alpha}$ -cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina benzil éster; (3a)  $N^{\alpha}$ -cbz-*cis*-4-cloro-L-prolina benzil éster (4)  $N^{\alpha}$ -cbz-*trans*-4-[(p-toluenosulfonil)oxi]-L-prolina benzil éster.

Fonte: Modificado de Tamaki, Han e Hruby (2001)

#### 3.5.1.1 Procedimento para o preparo da N<sup>a</sup>-cbz-trans-4-hidroxi-L-prolina

Em um balão de uma boca, sob sistema aberto, dissolveu-se a *trans*-4-hidroxi-Lprolina (40 g; 238,7 mmol) e o bicarbonato de sódio (60 g; 714,2 mmol) em água (545 mL), sendo aguardada a liberação de todo o gás. O balão foi gelado à 0 °C e com o auxílio de um funil gotejou-se o Z-OSu (88,96 g; 358,05 mmol) dissolvido em dioxano (235 mL). Ao término da adição do Z-OSu, o banho de gelo foi retirado e a reação ficou sob agitação por dois dias à temperatura ambiente. O solvente foi extraído em roto-evaporador e a mistura reacional foi extraída com éter dietílico (3 x 200 mL). A fase orgânica combinada foi seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e concentrada a pressão reduzida.

Obteve-se o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina como um mel amarelo (43,48 g; 46% de rendimento). LC-MS: *m*/*z* calculada para C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup> = 264,26, encontrada = 264,39.

#### 3.5.1.2 Procedimento para o preparo da N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina benzil éster

O brometo de benzila (21,49 mL; 180,41 mmol) foi adicionado em porções sobre o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina (43,48 g; 164,01 mmol) previamente dissolvido em THF (164,08 mL), contido em um balão de uma boca gelado à 0 °C. Com o balão sob agitação e em banho de gelo, adicionou-se a trietilamina (25,36 mL; 180,41 mL) e a reação foi mantida à temperatura ambiente por uma noite. A mistura reacional foi extraída com diclorometano, as fases combinadas foram tratadas (2 x 100 mL HCl 1M; 2 x 100 mL NaHCO<sub>3</sub> 5%; 1 x 100 mL H<sub>2</sub>O), secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentradas em roto-evaporador.

Após a etapa de extração, o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina benzil éster apresentou-se como um mel amarelo (58,25 g; 77% de rendimento). LC-MS: *m/z* calculada para C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 356,14, encontrada = 356,28.

### 3.5.1.3 Procedimento para o preparo da N<sup>α</sup>-cbz-*trans*-4[(p-toluenosulfonil)oxi]-L-prolina benzil éster

Dissolveu-se o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina benzil éster (20 g; 56,3 mmol) em piridina (70 mL). Em porções, o cloreto de tosila (11,77 g; 61,93 mmol) foi adicionado à 0 °C. A reação ficou sob agitação à temperatura ambiente por 4 dias. Após a concentração do solvente, o material foi extraído em acetato de etila e tratado (3 x 250  $\mu$ L

HCl 0,5 M; 3 x 100 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5%; 3 x 100 mL H<sub>2</sub>O). O produto foi purificado por cromatografia flash eluindo-se com uma mistura de hexano/acetato de etila (7:3).

Como produto obteve-se um mel amarelo (24,01 g; 84% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>27</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>7</sub>S [M+H]<sup>+</sup> = 510,15, encontrada = 510,28.

#### 3.5.1.4 Procedimento para o preparo da N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-cloro-L-prolina benzil éster

Em um balão de uma boca, o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina benzil éster (10 g; 28,16 mmol) foi dissolvido em DCM (30 mL) e CCl<sub>4</sub> (71 mL). A trifenilfosfina (16 g; 59,42 mmol) foi adicionada lentamente ao balão reacional em banho de gelo. Após 24 horas de reação, o produto bruto foi purificado por cromatografia flash em sílica gel, utilizando os solventes éter dietílico/hexano em uma razão de 1:3.

Como produto obteve-se um sólido amarelo (7,76 g; 74% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>ClNO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 374,11, encontrada = 374,30.

#### 3.5.2 Síntese dos análogos cis

Os análogos de prolina foram obtidos através da rota sintética empregada por Tamaki, Han e Hruby (2001), sendo que, o intermediário N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-[(p-toluenosulfonil)oxi]-Lprolina benzil éster foi o precursor para os aminoácidos com isomeria *cis*. A rota sintética empregada para a geração dos análogos *cis* é demonstrada na figura 9.


Figura 9 – Síntese dos análogos de prolina com isomeria cis

(I) Proteção do aminogrupo 4-N com Boc<sub>2</sub>O; (II) Hidrogenação catalítica com carvão paladiado; (III) Proteção do aminogrupo N<sup> $\alpha$ </sup> com Fmoc-OSu. (1) N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-[(p-toluenosulfonil)oxi]-L-prolina benzil éster; (2) N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-azido-L-prolina benzil éster; (3) N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-amino-L-prolina benzil éster; (3a) (2S, 4S)-N<sup> $\alpha$ </sup>-Fmoc-*cis*-4-N-Boc-amino-L-prolina; (4) N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina benzil éster; (4a) N<sup> $\alpha$ </sup>-Fmoc-*cis*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina benzil éster; (4a) N<sup> $\alpha$ </sup>-Fmoc-*cis*-4-N,N'-di

Fonte: Modificado de Tamaki, Han e Hruby (2001)

### 3.5.2.1 Procedimento para o preparo da N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-cis-4-azido-L-prolina benzil éster

Em um balão de uma boca, dissolveu-se o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4[(p-toluenosulfonil)oxi]-L-prolina benzil éster (24,01 g; 47,2 mmol) em dimetilformamida (100 mL). Em seguida, adicionou-se a azida de sódio (12,3 g; 188,8 mmol) e a reação ficou sob refluxo à 70 °C por 8 horas. O produto foi extraído com acetato de etila (3 x 150 mL) e as lavagens foram efetuadas com NaCl saturado (3 x 50 mL). Por fim, o material foi cristalizado com uma mistura de hexano/acetato de etila (8:2).

O produto cristalizado formou um pó branco (11,38 g; 63% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 381,15, encontrada = 381,27.

# 3.5.2.2 Procedimento para o preparo da N<sup>a</sup>-cbz-cis-4-amino-L-prolina benzil éster

Em um balão de uma boca, o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-azido-L-prolina benzil éster (10,38 g; 27,3 mmol) foi dissolvido em THF (123 mL) e em seguida, adicionou-se a trifenilfosfina (14,3 g; 54,6 mmol) e a água (983 µL). A reação foi mantida em refluxo à 75 °C por 26 horas e sob agitação. Após a extração do solvente, a mistura reacional foi dissolvida

em éter dietílico (372 mL) e HCl 0,1 N (248 mL). A fase aquosa foi lavada com éter dietílico (2 x 150 mL) e o pH foi ajustado com NaHCO<sub>3</sub> 5% até a solução ser neutralizada. O material pôde ser extraído com diclorometano e o solvente foi concentrado em roto-evaporador.

Obteve-se o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-amino-L-prolina benzil éster como um óleo amarelo claro (7,84 g; 81% de rendimento). LC-MS: *m/z* calculada para C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 355,17, encontrada = 355,26.

# 3.5.2.3 Procedimento para o preparo da N<sup>a</sup>-Fmoc-*cis*-4-N-Boc-amino-L-prolina

O aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-amino-L-prolina benzil éster (3,92 g; 11,1 mmol) foi dissolvido em dioxano (25 mL) e a n-metilmorfolina foi gotejada sobre o meio reacional à 0 °C. O di-tert-butil-dicarbonato foi dissolvido em dioxano (5 mL) e gotejado lentamente sobre a reação. O banho de gelo foi removido e a reação permaneceu sob agitação por uma noite. Após a extração do solvente, o material bruto foi purificado em coluna de sílica gel, utilizando os solventes hexano/acetato de etila em uma proporção 7:3.

Extraído o solvente, o aminoácido (4,36 g; 9,6 mmol) foi dissolvido em metanol (27 mL). O carvão paladiado (438 mg) foi adicionado e a mistura reacional ficou sob agitação em atmosfera de gás hidrogênio durante 7 horas. A mistura reacional foi filtrada e o solvente extraído em rotoevaporador.

O aminoácido (530 mg; 2,30 mmol) e o carbonato de sódio foram dissolvidos em água (30 mL) e mantidos à 0 °C. O Fmoc-OSu (1,03 g; 3,05 mmol) foi dissolvido em dioxano (30 mL) e gotejado lentamente sobre a mistura reacional. A reação foi mantida à temperatura ambiente durante uma noite. O produto bruto foi purificado por cromatografia flash em sílica gel (hexano/acetato de etila 7:3).

O produto cristalizado adquiriu a forma de pó branco (1,01 g; 93% de rendimento). LC-MS m/z calculada para C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M-H]<sup>-</sup> = 451,20, encontrada = 451,42.

# 3.5.2.4 Procedimento para o preparo da N<sup>α</sup>-cbz-*cis*-4-N,N'-di-boc-guanidino-L-prolina benzil éster

Dissolveu-se a di-boc-praxadina (3,79 g; 12,21 mmol) em diclorometano (60 mL) em um balão de uma boca. Sobre essa solução, adicionou-se a trietilamina (1,5 mL; 11,1 mmol) à 0 °C. O aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-amino-L-prolina benzil éster (3,92 g; 11,1 mmol) foi dissolvido em diclorometano (20 mL) e vertido sobre a solução contida no balão em banho de

gelo e sob forte agitação. A reação foi mantida em temperatura ambiente durante uma noite. O produto bruto foi purificado por cromatografia flash eluindo-se com os solventes hexano/acetato de etila (7:3).

Após a etapa de purificação obteve-se o produto na forma de um mel amarelo (6,27 g; 95% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>31</sub>H<sub>41</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 597,29, encontrada = 597,57.

# 3.5.2.5 Procedimento para o preparo da N<sup>α</sup>-Fmoc-*cis*-4-N,N'-di-boc-guanidino-L-prolina

Em um balão de duas bocas, o aminoácido N<sup>α</sup>-cbz-*cis*-4-N,N'-di-boc-guanidino-Lprolina benzil éster (6,27 g; 10,5 mmol) foi dissolvido em metanol (38 mL) e sobre a solução, adicionou-se o carvão paladiado 10% (630 mg). Um fluxo de nitrogênio foi passado para a remoção do oxigênio contido no sistema de hidrogenação. Em uma atmosfera de gás hidrogênio, a reação foi mantida por 3 dias à temperatura ambiente e sob agitação. O produto bruto foi centrifugado e filtrado, sem a necessidade de purificação. Em um balão de uma boca, dissolveu-se em água (90 mL) o produto bruto (3,52 g; 9,5 mmol) e o carbonato de sódio (2 g; 19 mmol), reservando essa solução em banho de gelo. Uma solução de Fmoc-OSu (4,8 g; 14,25 mmol) em DMF (90 mL) foi gotejada à 0 °C e sob forte agitação a solução reagiu por 1 hora. Após a extração do solvente em roto-evaporador, a mistura reacional foi dissolvida em água (200 mL) e teve seu pH ajustado para 2 com uma solução de HCl 6 M. O material foi extraído com acetato de etila (3 x 100 mL) e lavado com água (1 x 200 mL).

Após a extração do solvente, obteve-se o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-Fmoc-cis-4-N,N<sup>2</sup>-di-bocguanidino-L-prolina como um pó branco (319,7 mg; 6% de rendimento). LC-MS: *m/z* calculada para C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 595,28, encontrada = 595,56.

#### 3.5.3 Síntese dos análogos trans

Conforme o método descrito por Tamaki, Han e Hruby (2001), os análogos *trans* foram obtidos através de rotas sintéticas empregadas a partir do precursor N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-cloro-L-prolina benzil éster. Devido ao baixo rendimento, a introdução do guanido grupo no análogo tgP foi realizada após a inserção do análogo N<sup> $\alpha$ </sup>-Fmoc-trans-4-N-boc-amino-L-prolina na sequência peptídica. A figura 10 apresenta a rota sintética empregada na obtenção dos análogos *trans*.



Figura 10 – Síntese dos análogos de prolina com isomeria trans

(I) Proteção do aminogrupo 4-N com Boc<sub>2</sub>O; (II) Hidrogenação catalítica com carvão paladiado; (III) Proteção do aminogrupo N<sup> $\alpha$ </sup> com Fmoc-OSu. (1) N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-cloro-L-prolina benzil éster; (2) N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-azido-L-prolina benzil éster; (3) N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-amino-L-prolina benzil éster; (3a) N<sup> $\alpha$ </sup>-Fmoc-*trans*-4-N-Boc-amino-L-prolina; (4) N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina benzil éster; (4a) N<sup> $\alpha$ </sup>-Fmoc-*trans*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina. Fonte: Modificado de Tamaki, Han e Hruby (2001)

## 3.5.3.1 Procedimento para o preparo da N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-azido-L-prolina benzil éster

O aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*cis*-4-cloro-L-prolina benzil éster (6,87 g; 18,41 mmol) foi dissolvido em DMF (44 mL) e a azida de sódio (8,02 g; 123,35 mmol) foi adicionada em porções. Após 24 horas de reação à temperatura ambiente, o produto bruto foi extraído em acetato de etila (3 x 150 mL) e tratado com NaCl saturado (2 x 100 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub> e o solvente extraído sob vácuo.

O material obtido apresentou-se na forma de um sólido branco (6,85 g; 96% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 381,15, encontrada = 381,41.

# 3.5.3.2 Procedimento para o preparo da N<sup>a</sup>-cbz-trans-4-amino-L-prolina benzil éster

Em um balão de uma boca, o aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-azido-L-prolina benzil éster (6,85 g; 18,01 mmol) foi dissolvido em THF (90 mL). Em seguida, adicionou-se a trifenilfosfina (9,45 g; 36,02 mmol) e a água (6 mL). A reação foi refluxada à 75 °C por 26 horas.

Após a extração do solvente, a mistura reacional foi dissolvida em éter dietílico (245 mL) e HCl 0,1 N (164 mL). A fase aquosa foi lavada com éter dietílico (2 x 150 mL) e o pH foi ajustado com NaHCO<sub>3</sub> 5% até a solução ser neutralizada. O material pôde ser extraído com diclorometano e o solvente foi concentrado em roto-evaporador.

Como produto obteve-se um mel amarelo (5,85 g; 99,2% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 355,16, encontrada = 355,42.

# 3.5.3.3 Procedimento para o preparo da N<sup>a</sup>-Fmoc-*trans*-4-N-Boc-amino-L-prolina

O aminoácido N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-*trans*-4-amino-L-prolina benzil éster (2,88 g; 8,13 mmol) foi dissolvido em dioxano (10 mL) e a solução foi mantida à 0 °C. A base NMM (2,7 mL; 24,6 mmol) foi adicionada e o di-tert-butil dicarbonato (2,7 g; 12,20 mmol) dissolvido em dioxano (10 mL) foi gotejado lentamente sobre o meio reacional. Após 24 horas de reação à temperatura ambiente, o material foi extraído em hexano/acetato de etila (7:3) e tratado com HCl 0,5 M.

Em um balão de duas bocas, o aminoácido (3,42 g; 7,53 mmol) foi dissolvido em metanol (10 mL). O carvão paladiado (800 mg) foi adicionado e a reação permaneceu sob fluxo de hidrogênio por 24 horas. A mistura reacional foi filtrada e o solvente extraído sob vácuo.

O aminoácido (550 mg; 2,39 mmol) e o bicarbonato de sódio (602,3 mg; 7,17 mmol) foram dissolvidos em água (7 mL) e resfriados à 0 °C. O Fmoc-OSu (806,1 mg; 2,39 mmol) foi dissolvido em dioxano (12 mL) e gotejado sobre o meio reacional. Após 24 horas de reação à temperatura ambiente, o produto bruto foi purificado por cromatografia flash em sílica gel (hexano/acetato de etila 7:3).

Como produto obteve-se um sólido branco (2 g; 95% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 453,19, encontrada = 453,31.

## 3.5.3.4 Procedimento para guanidização do peptídeo com o análogo taP

Em um balão, a bivalirudina modificada com o análogo taP (20,2 mg; 8,56  $\mu$ mol) foi dissolvida em THF (500  $\mu$ L) e mantida à 0 °C. O N,N'-Bis(tert-butoxicarbonil)-1H-pirazol-1- carboxamidina (2,9 mg; 9,42  $\mu$ mol) foi dissolvido separadamente em THF (500  $\mu$ L) e gotejado lentamente sobre o balão reacional. A base NMM (500  $\mu$ L) foi adicionada e a reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente durante uma noite.

O produto foi purificado por cromatografia líquida de alta pressão HPLC – Shimadzu LC6-AD em uma coluna de fase reversa semi-preparativa Shim-Pack Prep-ODS (20 x 250 mm;  $\emptyset = 5 \ \mu$ m). Foram utilizados como solventes soluções de H<sub>2</sub>O/TFA 1000:1 (solvente A) e acetonitrila/H<sub>2</sub>O/TFA 900:100:1 (solvente B).

## 3.5.4 Síntese de peptídeos em fase sólida

O resíduo de arginina referente à posição P1 da sequência peptídica da bivalirudina foi substituído pelos aminoácidos não naturais empregados nesse trabalho (taP, caP, tgP, cgP e Gnf), conforme demonstrado na tabela 1.

Sequência peptídica da	Aminoácidos não naturais substituídos na posição P1 (X)		
bivalirudina	Sigla	Estrutura	
d-FPXPGGGGNGDFEEIPEEYL-OH	taP	NH <sub>2</sub> HN OH	
	caP	HNOH	
	tgP		
	cgP		
	Gnf	$H_2N - CH - C - OH$ $CH_2$ $H_2N - H_2$ $H_2N - H_1$ $H_2N - H_1$	

Tabela 1 – Substituições realizadas na posição P1 da bivalirudina

O sintetizador Shimadzu PSSM-8 (Shimadzu Co., Kyoto, KYT., Japão) foi empregado na síntese dos peptídeos utilizados nos ensaios. Os aminoácidos não-naturais foram empregados na síntese de peptídeo em fase sólida utilizando a metodologia de síntese por Fmoc (Fluorenilmetoxicarbonil), escolhida para a geração das moléculas testadas. Esta metodologia é largamente empregada para obtenção de peptídeos e miméticos, em pesquisa e produção em larga escala (ATHERTON e SHERPPARD, 1990).

A etapa de desproteção dos resíduos foi realizada com uma solução de DMF/morfolina/DBU 50:50:2, programada para reagir duas vezes por 6 minutos.

Cada aminoácido teve seu ácido carboxílico ativado durante 5 minutos pelo agente acilante TBTU dissolvido em DMF. O acoplamento de cada aminoácido reagiu por 30 minutos em uma solução de NMM/DMF/NMP na proporção percentual 11:67:22, sob borbulhamento de gás nitrogênio.

Ao término da síntese, os peptídeos ligados às resinas foram lavados em DMF e etanol. O processo de clivagem, que corresponde ao desligamento do peptídeo da resina e a desproteção das cadeias laterais, foi realizado com 1 mL da solução TFA/EDT/H<sub>2</sub>O/tioanisol 87,5:2,5:55 (v/v) para cada peptídeo sintetizado. Após 4 horas, o líquido foi filtrado e o sólido lavado com TFA (3x). O eluído evaporado com gás inerte foi precipitado com éter e centrifugado. O sólido obtido foi dissolvido em ACN/H<sub>2</sub>O e liofilizado.

O material bruto foi purificado por cromatografia líquida de alta pressão HPLC – Shimadzu LC6-AD em uma coluna de fase reversa semi-preparativa Shim-Pack Prep-ODS (20 x 250 mm;  $\emptyset = 5 \mu m$ ). Foram utilizados como solventes soluções de H<sub>2</sub>O/TFA 1000:1 (solvente A) e acetonitrila/H<sub>2</sub>O/TFA 900:100:1 (solvente B). A caracterização dos peptídeos finais foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas LC-MS.

#### 3.6 Síntese do substrato Boc-Val-Pro-Arg-MCA

#### 3.6.1 Procedimento para o preparo de Boc-Val-OSu

Em um balão de uma boca, dissolveu-se o Boc-Val-OH (5 g; 23mmol) e a Nhidroxisuccinimida (2,65 g; 23 mmol) em dioxano (40 mL). O DCC (4,74 g; 23 mmol) foi suspenso em dioxano (40 mL) e, sob agitação, adicionado sobre o primeiro, reagindo por uma noite em sistema aberto e temperatura ambiente. O precipitado formado foi filtrado em funil de placa porosa, concentrado em roto-evaporador e cristalizado em presença de isopropanol. Os cristais apresentaram-se como partículas brancas (3,4 g; 47% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 315,15, encontrada = 315,39.

#### 3.6.2 Procedimento para o preparo de Boc-Val-Pro-OH

Sob agitação em um balão de uma boca, a Pro-OH (366 mg; 3,18 mmol) foi adicionada em porções sobre o bicarbonato de sódio (267 mg; 3,18 mmol) previamente dissolvido em água (6 mL). Em seguida, gotejou-se o Boc-Val-OSu (1 g; 3,18 mmol) suspenso em dioxano (7 mL) sobre o balão de reação. O material reagiu em sistema aberto, à temperatura ambiente por 24 horas. O solvente orgânico foi concentrado e a mistura reacional (0 °C) teve seu pH ajustado para 2 com uma solução de HCl 1 M. Protonado, o material precipitado pôde ser decantado com água gelada.

Obteve-se um sólido branco como precipitado (578,5 mg; 58% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 315,38, encontrada = 315,41.

#### 3.6.3 Procedimento para o preparo de Boc-Arg(di-Z)-MCA

Em um balão de uma boca, a 7-amino-4-metilcumarina (322,33 mg; 1,84 mmol), adquirida da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO., U.S.A.), foi dissolvida em piridina tratada (40 mL). Separadamente, dissolveu-se o Boc-Arg(di-Z)-OH (1 g; 1,84 mmol) e o DCC (379,37 mg; 1,84 mmol) em diclorometano (40 mL) e em seguida, essa solução foi adicionada à primeira, deixando reagir por 24 horas à temperatura ambiente e sob agitação. O solvente orgânico foi concentrado, a mistura reacional foi suspensa em acetato de etila e tratada com NaHCO<sub>3</sub> 5% (3 x 100 mL) e NaCl saturado (1 x 100 mL). O pH foi neutralizado com HCl 1 M gelado para finalizar com uma última lavagem com H<sub>2</sub>O (1 x 100 mL).

O solvente orgânico foi concentrado em roto-evaporador e como produto obteve-se um sólido castanho (1,01 g; 78% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>  $[M+H]^+ = 700,75$ , encontrada = 700,36.

### 3.6.4 Procedimento para o preparo de Boc-Val-Pro-Arg-MCA

Previamente, o Boc-Arg(di-Z)-MCA (1,01 g; 1,44 mmol) teve seu alfa-aminogrupo desprotegido com uma solução de HCl/Dioxano 4 M (50 mL) em uma reação que ficou sob agitação durante 2 horas. O material foi precipitado com éter, seco em roto-evaporador e liofilizado.

A sequência Boc-Val-Pro-OH teve seu ácido carboxílico ativado com uma solução de TBTU (590,8 mg; 1,84 mmol) e NMM (808  $\mu$ L; 7,36 mmol) dissolvidos em DMF (16 mL). A solução foi agitada por 5 minutos e adicionada sobre Arg(di-Z)-MCA (922,46 mg; 1,54 mmol). Após reagir por 1 noite, o solvente orgânico foi concentrado e o mel amarelo suspenso em acetato de etila foi tratado com HCl 1 M gelado (3 x 100 mL), NaHCO<sub>3</sub> 5% (3 x 100 mL) e NaCl saturado (1 x 100 mL).

O mel amarelo obtido foi dissolvido em metanol (80 mL) e submetido à hidrogenação catalítica em presença de carvão paladiado para a remoção do grupos protetores benziloxicarbonil (Z), em uma reação que durou 6 horas, sob agitação e fluxo de hidrogênio. O meio reacional foi centrifugado, filtrado e solvente foi concentrado em roto-evaporador.

Após a finalização da secagem por liofilização obteve-se um sólido branco (1,6 g; 69% de rendimento). LC-MS: m/z calculada para C<sub>31</sub>H<sub>45</sub>N<sub>7</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup> = 628,73, encontrada = 628,77.

# 3.7 Determinação da constante de inibição (K<sub>i</sub>) para inibição competitiva linear simples com trombina

Os ensaios de inibição dos análogos de bivalirudina sobre a atividade enzimática de  $\alpha$ trombina humana Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO., U.S.A.) foram realizados em triplicata e determinados com a incubação de 2 nM da enzima em tampão 1x TBS, 50 mM Tris.HCl, pH 7,4 e 150 mM NaCl com PEG 8000. A reação foi iniciada após a adição do substrato Boc-VPR-MCA, com Km = 4,6  $\mu$ M medido experimentalmente nas mesmas condições dos ensaios. Três diferentes concentrações de substrato foram testadas (0,2  $\mu$ M, 2,1  $\mu$ M e 4,2  $\mu$ M) contra concentrações dos inibidores que variaram de 0,306 a 1224 nM.

A hidrólise do substrato foi monitorada a 25 °C, conforme descrito por Maraganore et al. (1990). Tentativas realizadas a 37 °C resultaram na instabilidade da enzima e falta de linearidade nos gráficos. As leituras foram realizadas em um espectrofluorímetro Victor<sup>3</sup> (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA., U.S.A.) com comprimentos de onda ajustados para  $\lambda ex = 340$  nm e  $\lambda em = 460$  nm.

A determinação de  $K_i$  foi estabelecida de acordo com a técnica descrita por Salvesen e Nagase (1990). Esse método consiste na determinação da taxa de inibição relativa sobre a hidrólise de um substrato sob condições tais que: (i) a hidrólise seja linear e não haja inativação espontânea da enzima; (ii) o inibidor esteja realmente em excesso molar em relação à enzima (pelo menos 20 vezes) e a concentração de substrato seja constante ao longo do experimento, o que equivale a manter o nível de hidrólise inferior a 5% do total de substrato adicionado no início do experimento. Para estas condições pode-se determinar um valor de K<sub>iapp</sub>, ou seja, K<sub>i</sub> na presença do substrato que é regido pela fórmula 2:

Fórmula (2)

$$\frac{V_0}{V_i} = 1 + \frac{[I]}{K_{i_{app}}}$$

O valor de  $K_{iapp}$  é obtido a partir da concentração de inibidor e a relação entre duas velocidades, que podem ser expressas em quaisquer unidades arbitrárias. Para garantir a fidelidade do valor obtido, este experimento dever ser repetido para diferentes concentrações de inibidor. Desta maneira uma curva relacionando ( $V_o/V_i$ )-1 em função de [I] gera uma reta cujo coeficiente angular é o inverso de  $K_{iapp}$ , conforme a fórmula rearranjada 3.

Fórmula (3)

$$\left(\frac{V_0}{V_i} - 1\right) = \frac{1}{K_{i_{app}}} \times [I]$$

A seguinte relação determina o valor de K<sub>i</sub>, a constante verdadeira do equilíbrio :

Fórmula (4)

$$K_i = \frac{K_{i_{app}}}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

Deste modo, em uma condição em que a concentração de substrato empregada na determinação do valor de  $K_{iapp}$  é significativamente inferior ao valor de  $K_M$  deste substrato para esta enzima, tem-se que  $K_i \cong K_{iapp}$ . Os dados gráficos e cinéticos para o cálculo de  $K_i$ , de acordo com esta técnica descrita, foram obtidos através do programa GraFit versão 4.09 (Erithacus Software Ltda., Londres, RU., Inglaterra).

## 3.8 Preparo da suspensão de plaquetas lavadas (SLP)

Um volume de 10 ml de sangue total foi coletado através de punção da veia braquial de voluntários saudáveis em tubo apropriado contendo solução ACD (ácido cítrico 78 mM, citrato de sódio 117 mM e dextrose 282 mM), na proporção 1:7 v/v ACD/sangue total. Somente doadores que não tinham feito uso de medicamentos que interferissem na agregação

plaquetária por um período de 10 dias foram aceitos para este estudo. A centrifugação foi realizada em duas etapas de 15 min a 200 *g* a 37 °C, para obtenção de plasma rico em plaquetas (PRP) livre de contaminantes leucocitários.

Ao PRP foi adicionado prostaglandina E1 (PGE<sub>1</sub>) Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO., U.S.A.) 200  $\mu$ g/mL (preparada em etanol absoluto) na concentração final de 0,2  $\mu$ g/mL e este foi centrifugado por 60 s a 10000 g. O *pellet* formado foi ressuspendido em solução de Tyrode (NaCl 134 mM, KCl 2,9 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM, HEPES [ácido 4-(2hidroxietilpiperazina-1-etanosulfônico)] 20 mM, glicose anidra 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e 0,05  $\mu$ g/mL de PGE<sub>1</sub>) com pH ajustado para 6,2 e centrifugado por 60 s a 10000 g (ANTUNES et al., 2010). Esta etapa foi repetida por duas vezes. Na última etapa, o *pellet* foi ressuspendido cuidadosamente em solução de Tyrode com pH ajustado para 7,4 contendo 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> na ausência de prostaglandina.

As amostras de cada doador foram processadas separadamente sendo unidas em um *pool* na ultima etapa.

A contagem de plaquetas foi realizada com o auxilio de uma câmara de *Neubauer*, onde uma alíquota de plaquetas lavadas foi diluída em solução *Unopette* (Oxalato de Amônio 0,08 M, Timerosal 0,2 mM, 0,664 mM de PBS 10x (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 0,73 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,131 M e NaCl 0,77 M) preparado em 100 mL de água MilliQ na proporção 1:200 (v:v). Após limpeza da câmara de *Neubauer* com etanol 70 % e fixação da lamínula, foram aplicados 10 µL da solução plaquetária diluída em solução *Unopette*. A contagem de plaquetas se deu em 2 quadrantes externos perpendiculares com o uso de microscópio óptico Nikon Eclipse TS100 (Nikon Instruments Inc., Melville, NY., U.S.A.) com objetiva ajustada para 20x.

Como o volume de cada quadrante é de  $0,1 \text{ mm}^3$  (1 µl) contamos o número total de plaquetas de um quadrante e assim temos o número de plaquetas em 1 µl. Assim, utilizando a fórmula a seguir temos:

Fórmula 5

N° de plaquetas = (soma das plaquetas contadas) x 200 (fator de diluição) x 10 (n° de plaquetas em 1  $\mu$ l) 2 (n° de campos contados)

O volume foi ajustado para atingir concentração de  $200 \times 10^9$ /L.

## 3.9 Ensaio de agregação plaquetária

Os ensaios de agregação plaquetária foram monitorados em agregômetro Chrono-log modelo 490 (Crono-log Corporation, Havertown, PA., U.S.A.) com quatro canais, utilizando

400  $\mu$ L de suspensão de plaquetas lavadas (200 x 10<sup>9</sup>/L) sob agitação de 1200 rpm, a temperatura constante de 37 °C e monitorados durante 8 min após adição do peptídeo inibidor (ver tabela 2) seguido da adição de 2 nM de trombina humana Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO., U.S.A.). Os resultados foram expressos em porcentagem de agregação através de medidas ópticas de turbidez utilizando a solução de Tyrode como branco.

Os ensaios foram realizados em triplicata, com uma concentração de 2 nM de trombina humana. A bivalirudina e seus análogos foram incubados em diferentes concentrações (Tabela 2).

Peptídeo	Concentração 1	Concentração 2	Concentração 3	Concentração 4
Bivalirudina	0,044	0,088	_	_
Análogo (Gnf)	0,044	0,183	0,229	0,459
Análogo (tgP)	0,044	0,183	0,229	0,459
Análogo (cgP)	0,044	0,183	0,229	0,459
Análogo (taP)	0,044	0,183	0,229	0,459
Análogo (caP)	0,044	0,183	0,229	0,459

Tabela 2 - Concentrações dos peptídeos (µM) utilizados nos ensaios de agregação plaquetária

#### 3.10 Determinação do ponto de clivagem

Para a determinação do ponto de clivagem, a bivalirudina e seus análogos foram incubados por 15 horas em concentrações que variaram de 0,306 a 1224 nM a 37 °C com 2 nM de trombina humana em um tampão 1x TBS, 50 mM Tris.HCl, pH 7,4 e 150 mM NaCl. Os fragmentos foram isolados por HPLC e identificados por espectrometria de massas (FOGAÇA et al., 2004; WITTING et al., 1992). As análises de espectrometria de massas foram realizadas em um instrumento Q-ToF Ultima API (Micromass UK Ltda., Manchester, RU., Inglaterra). As amostras foram ressuspendidas em 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O/ácido fórmico 0,1%, carregadas automaticamente em uma coluna capilar com resina C18 nanoACQUITY (Waters Co., Milford, MA., U.S.A.) HSS T3 (1,8  $\mu$ m, 150  $\mu$ m x 100 mm) e analisadas em modo positivo, sob um gradiente linear de 5 a 80% de ACN em ácido fórmico 0,1% durante 20 minutos. O controle do equipamento e aquisição dos dados foram realizados pelo software MassLynx v 4.0, pertencente ao pacote de programas do equipamento.

#### **4 RESULTADOS**

#### 4.1 Docking molecular

As simulações computacionais por docking molecular foram realizadas com a sequência peptídica d-Phe-Pro-Arg e posteriormente com os aminoácidos não-naturais substituídos na posição P1 da mesma sequência (ver 3.1).

Com o uso do programa AutoDock Tools (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) dados como constante de inibição (K<sub>i</sub>), pontes de hidrogênio entre o ligante e a macromolécula e distância de ligação entre os resíduos de interesse foram considerados de acordo com as conformações classificadas energeticamente pelo campo de força, conforme demonstrado na tabela 3. A figura 11 apresenta os ligantes em complexo com o sítio ativo de trombina.

Aminoácido substituído na posição P1	Energia de ligação (kcal/mol)	$K_i(nM)^1$	Número de pontes de hidrogênio <sup>2</sup>	Distância de ligação -Asp189 (Å) <sup>3</sup>
Arg	-9,53	103,93	5	2.15/1.90
Gnf	-10,73	13,66	5	1.64/2.02
tgP	-9,28	157,64	3	1.68/1.91
cgP	-9,47	114,28	2	-
taP	-10,24	31,11	1	2.19
caP	-9,3	152,72	3	-

Tabela 3 – Parâmetros intermoleculares das conformações classificadas energeticamente

<sup>1</sup>Constante de inibição.

<sup>2</sup>Número de pontes de hidrogênio entre o ligante e a macromolécula.

<sup>3</sup>Distância de ligação entre o resíduo Asp189 pertencente ao sítio ativo da macromolécula e o amino/guanido grupo da cadeia lateral da posição P1 do ligante.



Figura 11 – Docking molecular da estrutura de  $\alpha$ -trombina humana com os ligantes análogos

Conformações classificadas energeticamente com os ligantes: (A) d-Phe-Pro-Arg. (B) d-Phe-Pro-Gnf. (C) d-Phe-Pro-tgP. (D) d-Phe-Pro-cgP. (E) d-Phe-Pro-taP. (F) d-Phe-Pro-caP. Os ligantes estão representados em verde e os resíduos do sítio ativo em cinza. Os pontilhados verdes representam as ligações de hidrogênio.

As formas cgP e caP não interagiram com Asp189, sendo que, o ligante está inversamente orientado no espaço da cavidade do sítio ativo, formando interações com resíduos não correspondentes ao teoricamente esperado.

#### 4.2 Caracterização dos aminoácidos análogos de prolina

Todos os aminoácidos análogos de L-prolina e seus intermediários foram submetidos à etapas de tratamento e purificação que envolveram desde extrações em fase orgânica até cromatografia flash em sílica gel (ver 3.5).

A identidade de cada aminoácido foi confirmada por espectrometria de massas (ver 3.4), considerando os valores da relação m/z monoisotópicas. Os espectros de massas dos aminoácidos intermediários e os produtos finais estão contidos nas figuras suplementares de A1 a A12 no Apêndice.

#### 4.3 Ensaios de inibição competitiva

Os peptídeos contendo a sequência original de bivalirudina e suas variantes com os aminoácidos análogos na posição P1 foram analisados como inibidores competitivos de  $\alpha$ -trombina humana (ver 3.7). Os valores das constantes de inibição estão apresentados na Tabela 4.

Aminoácido substituído na posição P1	$K_i(\mu M)$
Arg	0,00106 ± 0,0004
Gnf	$0,0062 \pm 0,0008$
tgP	$0,168 \pm 0,005$
taP	$1,\!16\pm0,\!9$
cgP	$1{,}79\pm0{,}3$
caP	$3,6 \pm 0,4$

Tabela 4 – Constantes de inibição (Ki) da bivalirudina e seus análogos com substituições na posiçãoP1 da sequência d-FPXPGGGGNGDFEEIPEEYL-OH.

## 4.4 Inibição da agregação plaquetária

Os ensaios de agregação plaquetária foram realizados em triplicata com diferentes concentrações dos inibidores (0,044-0,459  $\mu$ M). Como parâmetro de comparação, as porcentagens de inibição dos análogos tiveram como referência as taxas de inibição observadas nos ensaios realizados competitivamente com a bivalirudina.

Em menor concentração (0,044 µM), a bivalirudina inibiu aproximadamente 98,8% da agregação plaquetária, o análogo com Gnf inibiu 48%, com tgP 8% e cgP 2,8%. Nessa mesma concentração, os análogos com taP e caP não apresentaram atividade inibitória da agregação plaquetária.

Com uma concentração de 0,088 µM, a bivalirudina foi capaz de inibir 100% da agregação. Portanto, essa foi a concentração limite para o ensaio com a bivalirudina.

A inibição completa da agregação (100%) com o análogo com Gnf foi atingida a uma concentração de 0,459  $\mu$ M. Nessa mesma concentração, o análogo com tgP inibiu 50,3% e os demais análogos (cgP, taP e caP) apresentram taxas de inibição abaixo de 14%. A figura 12 apresenta as taxas de inibição plaquetária da bivalirudina e de seus análogos.

Figura 12 - Ensaio de inibição da agregação plaquetária induzida pela trombina humana (2 nM) com a bivalirudina e seus análogos



Taxas de inibição da agregação plaquetária. (A) bivalirudina, (B) análogo com Gnf, (C) análogo com tgP, (D) análogo com cgP, (E) análogo com taP e (F) análogo com caP.

#### 4.5 Determinação do ponto de clivagem

A bivalirudina e seus análogos com aminoácidos não naturais foram incubados por 15 horas, purificados por CLAE e submetidos à análise de espectrometria de massas para a identificação das frações coletadas (ver 3.10). Devido à alta resolução do espectrômetro de massas Q-TOF, foi possível caracterizar as frações pelo valor de m/z das espécies carregadas. Nos espectros de massas, os picos vizinhos das formas carregadas das sequências identificadas são correspondentes à fragmentação proporcionada pela energia de colisão da técnica espectrométrica.

Em todos os fracionamentos realizados por CLAE houve a presença de componentes eluídos com 5, 9 e 54% de ACN, que não foram conclusivamente identificados quando analisados por espectrometria de massas. Devido às análises cromatográficas realizadas apenas com o tampão e a enzima incubada isoladamente, sem a presença do inibidor, atribuise a esses dois componentes os picos eluídos com tempos de retenção de 4,5, 9,7 e 17,8 min.

#### 4.5.1 Incubação de trombina com bivalirudina

Com base nas análises das frações isoladas, foi possível observar que a bivalirudina, quando incubada com trombina, cliva na posição R-P, resultando em um fragmento aminoterminal d-FPR e um fragmento correspondente ao carboxi-terminal PGGGGNGDFEEIPEEYL-OH. Parte da bivalirudina permaneceu íntegra, conforme demonstrado na figura 13.

Na fração eluída a 24% de acetonitrila por CLAE, o fragmento amino-terminal com massa teórica de 418,2329 Da foi identificado como o íon monocarregado com o valor de m/z de 419,2505 e picos vizinhos com diferença de massa aproximadamente igual à 1, característico de íons monocarregados.

O espectro de massas referente à fração eluída a 43% de ACN apresenta íons mono  $([M+H]^+, m/z = 1780,6926)$  e duplamente  $([M+2H]^{2+}, m/z = 890,8312)$  carregados. A diferença dos valores de m/z dos picos vizinhos que determinam o número de cargas é aproximadamente igual a 1 e 0,5, respectivamente, correspondentes a íons com uma e duas cargas do fragmento carboxi-terminal com massa teórica de 1779,8106 Da.

A bivalirudina íntegra, que possui massa teórica de 2180,2853 Da, foi identificada na fração eluída a 44% de ACN com íons dupla ( $[M+2H]^{2+}$ , m/z = 1090,9213) e triplamente ( $[M+3H]^{3+}$ , m/z = 727,6551) carregados.



Figura 13 – Caracterização da bivalirudina incubada com trombina humana

(A) Cromatograma do isolamento por CLAE. (B) Espectro de massas correspondente ao fragmento d-FPR. (C) Íons mono e duplamente carregados do fragmento PGGGGNGDFEEIPEEYL-OH. (D) Espectro de massas da fração correspondente à bivalirudina íntegra.

Os picos referentes ao fragmento carboxi terminal e à bivalirudina íntegra foram eluídos em tempos de retenção próximos, com uma razão de 43 e 44% de ACN, respectivamente. Por não haver uma boa resolução cromatográfica para o isolamento dos picos referentes ao carboxi terminal e à bivalirudina íntegra, nos espectros de massas foi possível encontrar sinais menos abundantes de ambas sequências referentes ao pico vizinho.

#### 4.5.2 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com Gnf

A incubação de trombina com o peptídeo análogo com Gnf resultou em um pico eluído a 43% de ACN. O espectro de massas apresentou os íons dupla  $([M+2H]^{2+}, m/z = 1114,8671)$  e triplamente  $([M+3H]^{3+}, m/z = 743,6428)$  carregados, referentes ao peptídeo análogo com Gnf íntegro com massa molecular de 2228,3281 Da. A figura 14 apresenta o cromatograma do isolamento por CLAE e o espectro de massas do análogo com Gnf incubado com trombina humana.





(A) Cromatograma do isolamento por CLAE. (B) Íons  $[M+2H]^{2+}$  e  $[M+3H]^{3+}$  correspondentes ao análogo com Gnf íntegro.

O cromatograma de isolamento e as análises de espectrometria de massas não apresentaram a presença de fragmentos provenientes da hidrólise por trombina.

#### 4.5.3 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com tgP

Sem a presença de fragmentos da hidrólise por trombina, o pico isolado a 43% de ACN foi identificado como o peptídeo análogo com tgP íntegro, com massa molecular de 2178,2694 Da. No espectro de massas o peptídeo íntegro foi caracterizado pelos íons dupla  $([M+2H]^{2+}, m/z = 1089,4789)$  e triplamente  $([M+3H]^{3+}, m/z = 727,0338)$  carregados. O isolamento e a caracterização do análogo com tgP estão demonstrados na figura 15.





(A) Cromatograma da purificação por CLAE. (B) Íons  $[M+2H]^{2+}$  e  $[M+3H]^{3+}$  correspondentes ao análogo com tgP íntegro.

#### 4.5.4 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com cgP

O espectro de massas do pico isolado a 43% de ACN apresenta os íons com duas  $([M+2H]^{2+}, m/z = 1089,9559)$  e três  $([M+3H]^{3+}, m/z = 727,0835)$  cargas, referentes à ionização do análogo com cgP íntegro, que possui massa molecular de 2178,2694 Da, conforme demonstrado na figura 16.



Figura 16 – Análises do análogo de bivalirudina com cgP incubado com trombina humana

(A) Cromatograma da purificação por CLAE. (B) Íons  $[M+2H]^{2+}$  e  $[M+3H]^{3+}$  correspondentes ao análogo com cgP íntegro.

No isolamento e caracterização foi possível observar que a incubação com trombina não resultou na fragmentação do peptídeo análogo com cgP.

#### 4.5.5 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com taP

O análogo de bivalirudina com o aminoácido não natural taP permaneceu íntegro após o período de incubação com trombina. O peptídeo análogo com taP foi eluído cromatograficamente a 42,7% de ACN e os espectros de massas confirmaram a presença dos íons dupla ( $[M+2H]^{2+}$ , m/z = 1068,9309) e triplamente ( $[M+3H]^{3+}$ , m/z = 713,0188) carregados, correspondentes à ionização do peptídeo íntegro que possui massa molecular de 2136,2295 Da (figura 17). Não foi identificada a presença de fragmentação decorrente da incubação com trombina.



Figura 17 – Análises do análogo de bivalirudina com taP incubado com trombina humana

(A) Cromatograma da purificação por CLAE. (B) Íons  $[M+2H]^{2+}$  e  $[M+3H]^{3+}$  correspondentes ao análogo com taP íntegro.

#### 4.5.6 Incubação de trombina com o peptídeo análogo com caP

O espectro de massas do pico eluído a 42,7% de ACN apresenta o peptídeo análogo com caP íntegro, com duas ( $[M+2H]^{2+}$ , m/z = 1068,9309) e três ( $[M+2H]^{3+}$ , m/z = 713,0168 cargas, correspondentes à ionização do peptídeo íntegro, que possui massa molecular de 2136,2295 Da (figura 18). No cromatograma de isolamento dos componentes não houve a presença de picos correspondentes à clivagem por trombina.

Figura 18 – Análises do análogo de bivalirudina com caP incubado com trombina humana



(A) Cromatograma da purificação por CLAE. (B) Íons  $[M+2H]^{2+}$  e  $[M+3H]^{3+}$  correspondentes ao análogo com caP íntegro.

## **5 DISCUSSÃO**

O presente estudo teve início com a síntese dos aminoácidos não naturais análogos de prolina, sintetizados por meio de modificações no grupo funcional ligado ao carbono posicionado na posição 4 da estrutura da *trans*-4-hidroxi-L-prolina. As rotas sintéticas empregadas propiciaram a obtenção dos análogos *cis* e *trans* de 4-aminoprolina e 4-guanidinoprolina.

A síntese de análogos de L-prolina tem sido empregada com frequência em diversos grupos de pesquisa. El-Ashry e Nemr (2003) sintetizaram análogos que incluíam 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina, 3,4-dihidroxiprolina, 2-hidroximetil-3-hidroxipirrolidina e 2-hidroximetil-pirrolidina-3,4-diol. Entre várias outras atividades biológicas, esses análogos desenvolvidos por El-Ashry e Nemr (2003) exibiram atividade inibitória contra glicosidases. Reger et al. (2010) desenvolveram análogos de prolina com grupos funcionais heterocíclicos na posição 4, capazes de atuar como antagonistas de VLA-4, uma molécula de adesão membro da família das integrinas. Entretanto, ainda não há descrito na literatura trabalhos que tenham utilizado análogos de prolina na sequência peptídica da bivalirudina.

Os aminoácidos obtidos neste trabalho foram incorporados na sequência peptídica da bivalirudina, no entanto, estas mesmas moléculas podem também ser empregadas no desenvolvimento de estruturas não peptídicas como elementos fundamentais de interação para diversas aplicações. Os análogos de bivalirudina foram gerados e comparados com a própria bivalirudina tal como ela é comercialmente para que fosse traçada uma relação das alterações realizadas na posição P1 do peptídeo, em termos de sua interação, afinidade e resistência/susceptibilidade à hidrólise nos ensaios com trombina.

Durante a etapa de síntese dos aminoácidos precursores, a rota sintética da reação de Mitsunobu, que teoricamente deveria converter o grupo hidroxila do carbono 4 em um grupo haleto, não resultou na formação do produto esperado (MITSUNOBU, 1981). A conversão do grupo hidroxila em haleto foi possível aplicando-se a reação de Appel, com o uso de trifenilfosfina e tetracloreto de carbono (APPEL, 1975). Webb e Eigenbrot (1990) sintetizaram análogos de L-prolina adotando a reação de Appel como passo reacional para a conversão de hidroxilas em haletos e obtiveram 76% de rendimento do produto final.

O método de tratamento e purificação descrito por Webb e Eigenbrot (1990) foi eficaz na remoção completa do óxido de trifenilfosfina, um subproduto gerado pela reação, e após as etapas de extração por fase orgânica e cromatografia flash em sílica gel obteve-se o precursor dos análogos *trans* com 74% de rendimento.

Cada etapa de síntese envolve o uso e descarte de considerável quantidade de reagentes e solventes, seja no processo de síntese ou no tratamento e purificação das misturas reacionais. Como medida alternativa e devido ao baixo rendimento do aminoácido na forma *trans*, a guanidização após a síntese dos peptídeos foi adotada para a obtenção do análogo de bivalirudina com o aminoácido *trans* 4-guanidinoprolina. A técnica de guanidização direta em peptídeos ou proteínas desempenha grande importância em trabalhos na área de química de proteínas (WARWOOD et al., 2006).

O valor da constante de inibição da bivalirudina apresentado nos ensaios de inibição competitiva (1,1 nM) encontra-se abaixo do valor encontrado na literatura, entre 1,9 – 2,3 nM (WARKENTIN, 2004). Nos ensaios de inibição competitiva com a bivalirudina, Maraganore et al. (1990) utilizaram o substrato H-D-HHT-Ala-Arg-pNA.2AcOH, porém, neste presente trabalho optou-se pela utilização do substrato Boc-Val-Pro-Arg-MCA, por sua viabilidade sintética e alta sensitividade por peptidases da cascata de coagulação (KAWABATA et al., 1988). É possível levantar a hipótese de que o valor da constante de inibição da bivalirudina tenha se diferenciado da literatura devido o uso de um substrato alternativo nos ensaios de inibição competitiva.

Os resultados dos ensaios de inibição competitiva e agregação plaquetária puderam ser correlacionados com os dados previamente observados na simulação computacional por docking molecular. Com base nos ensaios realizados, verificou-se que valores como constante de inibição e energia de ligação, obtidos através da simulação por docking molecular, não corresponderam com a ordem de classificação dos melhores inibidores. Ao se correlacionar os resultados dos ensaios de inibição com os dados observados na simulação por docking molecular, é possível constatar que o número de pontes de hidrogênio e a interação iônica do amino/guanido grupo com o resíduo Asp189 são fatores determinantes para a seleção dos ligantes mais promissores. Em um estudo sobre a seletividade mediada por modificações na posição P1, Lange et al. (2003) desenvolveram peptídeos miméticos com guanido grupos e através da cristalografia por raio-X elucidaram as interações inibidor-enzima, destacando a fundamental importância da atração por interação iônica formada com Asp189. Nas simulações por docking molecular, foi possível observar que os inibidores que continham as amino-L-prolinas possuíam o menor número de interações ou não estavam devidamente orientados na cavidade do sítio ativo e essa fraca interação pôde ser observada nos ensaios de inibição competitiva e de agregação plaquetária, em que os peptídeos com os análogos taP e caP não apresentaram as melhores taxas de inibição, com valores de K<sub>i</sub> de 1,2 e 3,6 µM, respectivamente. Em contrapartida, os peptídeos análogos que possuíam o Gnf e o tgP em sua sequência, nos ensaios de inibição competitiva, apresentaram constantes de inibição significativas de 6,2 e 168 nM, respectivamente. De acordo com Karle, Knecht e Xue (2012), a interação de amidinas básicas com o carboxilato de Asp189 é formada por uma forte ponte salina bidentada, o que torna esta a principal interação para que um inibidor tenha afinidade com trombina. Com esta mesma lógica, inibidores diretos de trombina desenvolvidos até hoje, como o Dabigatran, Melagatran e Argatroban, foram desenhados com um grupo amidínico básico em suas estruturas (ALBAN, 2008; KATHIRESAN; SHIOMURA; JANG, 2002). Apesar do peptídeo análogo com cgP possuir um guanido grupo na posição P1, na simulação computacional esta variante não interagiu com o Asp189 e nos ensaios de inibição competitiva apresentou uma constante de inibição de 1,8 µM, considerada uma baixa afinidade para um peptídeo de 20 resíduos que se liga bivalentemente à trombina. Na literatura, ainda não há relatos de trabalhos que tenham empregado análogos de prolina com configurações cis/trans em moléculas inibidoras de trombina. Entretanto, os experimentos realizados nesse trabalho evidenciaram que a configuração trans e o guanido grupo são duas características relevantes para que análogos de prolina tenham uma maior afinidade com o sítio ativo de trombina.

Nos ensaios de agregação plaquetária induzida por trombina, observou-se que todos os análogos perderam parte de seu potencial de inibição, sendo necessário trabalhar com concentrações maiores dos peptídeos. O fato de o ensaio ter sido realizado com plaquetas lavadas elimina a possibilidade dos inibidores terem interagido com outros componentes do plasma. Em contrapartida, há a hipótese de que proteínas transmembranares presentes nas plaquetas possam interagir com a bivalirudina. Nas plaquetas humanas são expressos os receptores PAR1 e PAR4, pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G, e a ativação de ambos está envolvida na secreção e agregação plaquetária (COUGHLIN, 2000). Kimmelstiel et al. (2011) realizaram testes em pacientes administrados com a bivalirudina quando submetidos à angioplastia coronária e observaram a supressão da agregação plaquetária com a evidência de que a inibição de trombina mediada pela bivalirudina protege a integridade do receptor PAR1. Apesar de estudos *in vivo* comprovarem que a agregação plaquetária é inibida com o uso da bivalirudina (ANAND et al., 2007) seus efeitos nas funções plaquetárias ainda não foram bem definidos (HOLINSTAT et al., 2013).

A substituição do resíduo de arginina por análogos de prolina na posição P1 da bivalirudina ainda foi capaz de conferir resistência à hidrólise, conforme observado nos ensaios de incubação com trombina. Zanuy et al. (2009) fizeram um estudo *in silico* dos análogos de prolina como substituintes de arginina em um pentapeptídeo (Cys-Arg-Glu-Lys-

Ala) e os resultados sugeriram que características da prolina, como a proporção de menor energia conformacional e a redução da flexibilidade conformacional, seriam mantidas nos análogos de prolina, o que em seu trabalho conduziria à integridade do peptídeo de endereçamento de tumor de mama mediante à proteólise enzimática. Qiu et al. (1992) substituíram a arginina da ligação cindível da bivalirudina por  $\beta$ -homoarginina e um estudo cristalográfico presumiu que este análogo seria resistente à hidrólise devido à presença de um grupo metileno adicional, que proporcionaria um impedimento de acesso do resíduo Ser195 de trombina à porção clivável do peptídeo. O emprego de aminoprolinas ou β-homoargininas como substituintes na sequência peptídica da bivalirudina gera a capacidade de resistência à hidrólise, porém, em cada um dos casos a estabilidade estrutural do peptídeo é proporcionada por um mecanismo diferente, característico de cada aminoácido. Assim como os análogos de prolina, o Gnf conferiu resistência à hidrólise por trombina. Melo et al. (2000) utilizaram o Gnf na posição P1 de uma sequência peptídica reconhecida por calicreína tecidual humana e a resistência à hidrólise foi observada nos ensaios realizados. Segundo Tsunematsu et al. (1985), a trombina tende a hidrolisar na posição P1 peptídeos que contenham um grupo metileno na cadeia lateral do resíduo, ao invés de um anel benzênico, como no caso do Gnf. Em um trabalho de desenvolvimento de substratos com o uso do Gnf com o nitrogênio alfa tosilado, Klausner et al. (1978) observaram a resistência a hidrólise e presumiram que a cadeia lateral do aminoácido liga-se à trombina mas a ligação peptídica de seu lado carbonil não pode ser hidrolisada.

Sob um ponto de vista contextual, os inibidores idealizados, desenhados e sintetizados neste trabalho apresentaram taxas de inibição próximas ou menores em relação à bivalirudina e através deste estudo ainda foi possível constatar que os aminoácidos não naturais aqui empregados (taP, caP, tgP, cgP e Gnf) são capazes de conferir estabilidade estrutural e proporcionam a integridade da sequência peptídica da bivalirudina quando em contato com trombina. Entretanto, a estabilidade conformacional/resistência à hidrólise por trombina originada pela incorporação desses aminoácidos gera duas vertentes para o estudo e desenvolvimento de novos inibidores de trombina. Uma primeira viabilidade seria a busca de modificações que potencializassem o efeito inibitório contra trombina. Novas alterações no carbono 4 da hidroxi-L-prolina, como a incorporação de um grupo metileno adicional com o objetivo de estender o grupo funcional guanido em direção ao aminoácido de reconhecimento (Asp189), podem ser realizadas em futuras sínteses para a obtenção de análogos de bivalirudina com maior afinidade com trombina. Webb e Eigenbrot (1990) desenvolveram análogos de guanidinoprolinas com um grupo metileno adicional na posição 4. Outra

possibilidade de estudo seria o desenvolvimento de inibidores não peptídicos baseados na estrutura dos análogos de bivalirudina desenvolvidos neste trabalho. De acordo com Gentilucci, De Marco e Cerisoli (2010), peptídeos naturais são susceptíveis à hidrólise, o que resulta na curta duração da atividade in vivo e a baixa biodisponibilidade, portanto, quanto menos características de um peptídeo uma molécula possuir, maior será sua estabilidade mediante à clivagem por peptidases. Segundo Hruby (2002), ligantes não peptídicos podem ser originados através da restrição conformacional e a deleção de resíduos de peptídeos bioativos, com o uso de técnicas como scans de alanina e substituições por D-aminoácidos. Desta forma, os análogos de bivalirudina seriam submetidos a modificações com a finalidade de se obter inibidores análogos univalentes, sem interação com o exosítio I, e com alta afinidade pelo sítio ativo de trombina. Contudo, este trabalho buscou inovação no desenvolvimento de análogos de bivalirudina com o emprego destes aminoácidos não naturais análogos de L-prolina, ainda não testados por outros grupos na sequência peptídica deste inibidor de trombina. Considerando todos os resultados obtidos nos ensaios realizados com a bivalirudina e seus análogos, é possível constatar que análogos de L-prolina podem ser portadores de grupos substituintes reconhecidos por trombina e que sua inserção nessa sequência peptídica gera a dupla funcionalidade de reconhecimento e estabilidade estrutural, características relevantes para novas modificações no desenho de futuros inibidores de trombina.

# **6 CONCLUSÕES**

Analisando conjuntamente os resultados obtidos neste estudo, é possível concluir que:

- Entre os análogos de prolina sintetizados, o tgP destacou-se dos demais com uma constante de inibição de 168 nM;

- Entre os aminoácidos não naturais substituídos na posição P1 da bivalirudina, o Gnf apresentou a menor constante de inibição (6,2 nM);

- Nos ensaios de inibição competitiva e agregação plaquetária, os análogos que se destacaram (Gnf e tgP) apresentaram na simulação por docking molecular o maior número de pontes de hidrogênio com o sítio ativo de trombina em relação aos demais, além de estarem corretamente orientados na cavidade da enzima;

- Os análogos de prolina estudados (taP, caP, tgP e cgP) e o Gnf são capazes de conferir resistência à hidrólise por trombina.

# **REFERÊNCIAS\***

ADAMS, R. L. C.; BIRD, R. J. Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. **Nephrology**, v. 14, n. 5, p. 462-470, 2009.

AKIMOTO, K.; KLINKHARDT, U.; ZEIHER, A.; NIETHAMMER, M.; HARDER, S. Anticoagulation with argatroban for elective percutaneous coronary intervention: population pharmacokinects and pharmacokinect-pharmacodynamic relationship of coagulation parameters. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 6, p. 805-818, 2011.

ALBAN, S. Pharmacological strategies for inhibition of thrombin activity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 12, p. 1152-1175, 2008.

ANAND, S. X.; KIM, M. C.; KAMRAN, M.; SHARMA, S. K.; KINI, A. S.; FAREED, J.; HOPPENSTEADT, D. A.; CARBON, F.; CAVUSOGLU, E.; VARON, D.; VILES-GONZALES, V.; BADIMON, J. J.; MARMUR, J. D. Comparison of platelet function and morphology in patients undergoing percutaneous coronary intervention receiving bivalirudin versus unfractionated heparin versus clopidrogrel pretreatment and bivalirudin. **The American Journal of Cardiology**, v. 100, p. 417-424, 2007.

ANTUNES, T. C.; YAMASHITA, K. M.; BARBARO, K. C.; SAIKI, M.; SANTORO, M. L. Comparative analysis of newborn and adult Bothrops jararaca snake. **Toxicon**, v. 56, n. 8, p. 1443-1458, 2010.

APPEL, R. Tertiary phosphane/tetrachloromethane, a versatile reagent for chlorination, dehydration, and P-N linkage. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 14, n. 12, p. 801-811, 1975.

ARMISHAW, C.; JENSEN, A. A.; BALLE, T.; CLARK, R. J.; HARPSOE, K.; SKONBERG, C.; LILJEFORS, T.; STROMGAARD, K. Rational design of alpha-conotoxin analogues targeting alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: improved antagonistic activity by incorporation of proline derivatives. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 14, p. 9498-9512, 2009.

ATHERTON, E.; SHEPPARD, R. C. Solid phase peptide synthesis - a practical approach. **IRL Press,** Oxford, p. 75-160, 1989.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 318, n. 2, p. 247-250, 1995.

BARRETT, G. C.; ELMORE, D. T. Amino acids and peptides. Cambridge University Press, Cambridge, p. 20-26, 1998.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BECKER, R. C. Novel constructs for thrombin inhibition. American Heart Journal, v. 149, n. 1, p. 61-72, 2005.

BERRY, L. R.; CHAN, A. K. C. Thrombin generation. Haemostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, v. 992, p. 139-154, 2013.

BEYNON, R.; BOND, J. S. Proteolitic enzymes: a practical approach. **Oxford University Press**, Oxford, p. 78-79, 2001.

BITTL, J. A.; CHAITMAN, B. R.; FEIT, F.; KIMBALL, W.; TOPOL, E. J. Bivalirudin versus heparin during coronary angioplasty for unstable or postinfarction angina: final report reanalysis of the bivalirudin angioplasty study. **American Heart Journal**, v. 142, n. 6, p. 952-959, 2001.

BLAYA, C.; PRATI, C.; BONETI, C.; BONAMIGO, D. R.; KRUMENAUER, R. C. P.; ROSITO, G. A. Análise da utilização dos novos inibidores da trombina na prática médica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia,** v. 71, n. 2, p. 163-167, 1998.

BODE, W. Structure and interaction modes of thrombin. Blood Cells, Molecules, and Diseases, v. 36, n. 2, p. 122-130, 2006.

BODE, W.; TURK, D.; KARSHIKOV, A. The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of d-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human  $\alpha$ -thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. **Protein Science**, v. 1, n. 4, p. 426-471, 1992.

BORISSOFF, J. I.; HEENEMAN, S.; KILINÇ, E.; KASSÁK, P.; OERLE, R. V.; WINCKERS, K.; GOVERS-RIEMSLAG, J. W. P.; HAMULYÁK, K.; HACKENG, T. M.; DAEMEN, M. J. A. P.; CATE, H. T.; SPRONK, H. M. H. Early atherosclerosis exhibits an enhanced procoagulant state. **Circulation**, v. 122, n. 8, p. 821-830, 2010.

BORISSOFF, J. I.; SPRONK, H. M. H.; HEENEMAN, S.; CATE, H. T. Is thrombin a key player in the "coagulation-atherogenesis" maze? **Cardiovascular Research**, v. 82, n. 3, p. 392-403, 2009.

BOURDON, P.; JABLONSKI, J.; CHAO, B. H.; MARAGANORE, J. M. Structure-function relationships of hirulog peptide interactions with thrombin. **FEBS Letters**, v. 294, n. 3, p. 163-166, 1991.

BREIK, O.; TADROS, R.; DEVITT, P. Thrombin inhibitors: surgical considerations and pharmacology. **ANZ Journal of Surgery**, v. 83, n. 4, p. 215-221, 2013.

BREZNIK, M.; GRDADOLNIK, S. G.; GIESTER, G.; LEBAN, I.; KIKELJ, D. Influence of chirality of the preceding acyl moiety on the *cis/trans* ratio of the proline peptide bond. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 21, p. 7044-7050, 2001.

BRITO, F. S.; TRICOCI, P. Novel anti-platelet agents: focus on thrombin receptor antagonists. Journal of Cardiovascular Translational Research, v. 123, n.7, fev. 2013. Disponível em: <a href="http://www.link.springer.com/">http://www.link.springer.com/</a>. Acesso em: 01 mar. 2013.

BUTKOWSKI, R. J.; ELION, J.; DOWNING, M. R.; MANN, K. G. Primary structure of human prethrombin 2 and  $\alpha$ -thrombin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 14, p. 4942-4957, 1977.

CANNON, C. P.; MARAGANORE, J. M.; LOSCALZO, J.; MCALLISTER, A.; EDDINGS, K.; GEORGE, D.; SELWYN, A. P.; ADELMAN, B.; FOX, I.; BRAUNWALD, E.; GANZ, P. Anticoagulant effects of hirulog, a novel thrombin inhibitor, in patients with coronary artery disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 71, n. 10, p. 778-782, 1993.

CHEN, M. S.; LINCOFF, A. M. Direct thrombin inhibitors. **Current Cardiology Reports,** v. 7, n. 4, p. 255-259, 2005.

CHEN, X.; REN, S.; MA, M. G.; DHARMALINGAM, S.; LU, L.; XUE, M.; DUCAS, J.; SHEN, G. X. Hirulog-like peptide reduces restenosis and expression of tissue factor and transforming growth factor- $\beta$  in carotid artery of atherosclerotic rabbits. **Atherosclerosis**, v. 169, n. 1, p. 31-40, 2003.

CONNOLLY, A. J.; ISHIHARA, H.; KAHN, M. L.; FARESE, R. V. J.; COUGHLIN, S. R. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. **Nature**, v. 381, n. 6582, p. 516-519, 1996.

CORRAL-RODRÍGUEZ, M. A.; MACEDO-RIBEIRO, S.; PEREIRA, P. J. B.; FUENTES-PRIOR, P. Leech-derived thrombin inhibitors: from structures to mechanisms to clinical applications. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 3847-3861, 2010.

COSCONATI, S.; FORLI, S.; PERRYMAN, A. L.; HARRIS, R.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. Virtual screening with AutoDock: theory and practice. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 597-607, 2010.

COUGHLIN, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. **Nature**, v. 407, p. 258-264, 2000.

CRISTOFARO, R.; CANDIA, E. Thrombin domains: structure, function and interaction with platelet receptors. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, v. 15, n. 3, p. 151-163, 2003.

DAS, J.; KIMBALL, S. D. Thrombin active site inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 8, p. 999-1007, 1995.

DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K.; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. **Biochemistry**, v. 30, n. 43, p. 10363-10370, 1991.

DEGEN, S. J. F.; DAVIE, E. W. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. **Biochemistry**, v. 26, n. 19, p. 6165-6177, 1987.

DI CERA, E.; GUINTO, E. R.; VINDIGNI, A.; DANG, Q. D.; AYALA, Y. M.; WUYI, M.; TULINSKY, A. The Na<sup>+</sup> site of thrombin. **The Journal of Biological Chemistry,** v. 270, n. 38, p. 22089-22092, 1995.

DI NISIO, M.; MIDDELDORP, S. BÜLLER, H. R. Direct thrombin inhibitors. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 10, p. 1028-1040, 2005.

DIXON, M.; WEBB, E. C. Enzymes. Academic Press, New York San Francisco, p. 226, 1979.

EL-ASHRY, E. H.; NEMR, A. E. Synthesis of mono- and di-hydroxylated pralines and 2-hydroxymethylpyrrolidines from non-carbohydrate precursors. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 22, p. 2265-2290, 2003.

FENTON, J. W.; FASCO, M. J.; STACKROW, A. B. Human thrombins: production, evaluation and properties of  $\alpha$ -thrombin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 11, p. 3587-3598, 1977.

FOGAÇA, S. E.; MELO, R. L.; PIMENTA, D. C.; HOSOI, K.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. Differences in substrate and inhibitor sequence specificity of human, mouse and rat tissue kallikreins. **Biochemical Society Journal**, v. 380, n. 3, p. 775-781, 2004.

GAUDRY, R.; GODIN, C. New syntheses of hydroxyproline. Journal of the American Chemical Society, v. 76, n. 1, p. 139-143, 1954.

GEISS-FRIEDLANDER, R.; PARMENTIER, N.; MÖLLER, U.; URLAUB, H.; VAN DEN EYNDE, B. J.; MELCHIOR, F. The cytoplasmic peptidase DPP9 is rate-limiting for degradation of proline-containing peptides. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 40, p. 27211-27219, 2009.

GENTILUCCI, L.; DE MARCO, R.; CERISOLI, L. Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 28, p. 3185-3203, 2010.

GIBSON, S. E.; GUILLO, N.; TOZER, M. J. Towards control of  $\chi$ -space: conformationally constrained analogues of Phe, Tyr, Trp and His. **Tetrahedron**, n. 55, p. 585-615, 1999.

GIRNYS, E. A.; PORTER, V. R.; MOSBERG, H. I. Conformationally restricted analogs of the direct thrombin inhibitor FM 19. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 24, p. 7425-7434, 2011.

GURM, H. S.; BHATT, D. L. Thrombin, an ideal target for pharmacological inhibition: A review of direct thrombin inhibitors. **American Heart Journal**, v. 149, n. 1S, p. 43-53, 2005.

HANESSIAN, S.; AUZZAS, L. The practice of ring constraint in peptidomimetics using bicyclic and polycyclic amino acids. Accounts of Chemical Research, v. 41, n. 10, p. 1241-1251, 2008.

HÄRTTER, S.; SENNEWALD, R.; NEHMIZ, G.; REILLY, P. Oral bioavailability of dabigatran etexilate (Pradaxa) after co-medication with verapamil in healthy subjects. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, n. 4, p. 1053-1062, 2012.

HE, S.; WALLEN, H.; BARK, N.; BLOMBACK, M. In vitro studies using a global hemostasis assay to examine the anticoagulation effects in plasma by the direct thrombin inhibitors: dabigatran and argatroban. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, v. 35, n. 2, p. 131-139, 2013.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. Chemical Reviews, v. 102, n. 12, p. 4501-4523, 2002.

HOLINSTAT, M.; COLOWICK, N. E.; HUDSON, W. J.; BLAKEMORE, D.; CHEN, Q.; HAMM, H. E.; CLEATOR, J. H. Dichotomous effects of exposure to bivalirudin in patients undergoing percutaneous coronary intervention on protease-activated receptor-mediated platelet activation. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, v. 35, n. 2, p. 209-222, 2013.

HRUBY, V. J. Designing peptide receptor agonists and antagonists. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 847-858, 2002.

HUET, R. C. G. G.; CERNAK, V.; VRIES, A. J.; LISMAN, T. Bivalirudin is inferior to heparin in preservation of intraoperative autologous blood. **Thrombosis Research**, v. 130, n. 2, p. 163-165, 2012.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **Journal of Computational Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 1145-1152, 2007.

HUNTINGTON, J. A. Molecular recognition mechanisms of thrombin. Journal of Thrombosis and Haemostasis, v. 3, n. 8, p. 1861-1872, 2005.

IIZUKA, K.; KAMIJO, T.; KUBOTA, T.; AKAHANE, K.; UMEYAMA, H.; KISO, Y. New human renin inhibitors containing an unnatural amino acid, norstatine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 701-704, 1988.

JAKUBOWSKI, H. V.; OWEN, W. G. Macromolecular specificity determinants on thrombin for fibrinogen and thrombomodulin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 19, p. 11117-11121, 1989.

JENKINS, C. L.; BRETSCHER, L. E.; GUZEI, I. A.; RAINES, R. T. Effects of 3hydroxyproline residues on collagen stability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 21, p. 6422-6427, 2003.

KALAFATIS, M.; SWORDS, N. A.; RAND, M. D.; MANN, K. G. Membrane-dependent reactions in blood coagulation: role of the vitamin K-dependent enzyme complexes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1227, n. 3, p. 113-129, 1994.

KAPLAN, K. L.; FRANCIS, C. W. Direct thrombin inhibitors. **Seminars in Hematology,** v. 39, n. 3, p. 187-196, 2002.

KARLE, M.; KNECHT, W.; XUE, Y. Discovery of benzothiazole guanidines as novel inhibitors of thrombin and trypsin IV. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** v. 22, n. 14, p. 4839-4843, 2012.

KATHIRESAN, S.; SHIOMURA, J.; JANG, I. Argatroban. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, v. 13, n. 1, p. 41-47, 2002.

KAWABATA, S.; MIURA, T.; MORITA, T.; KATO, H.; FUJIKAWA, K.; IWANAGA, S.; TAKADA, K.; KIMURA, T.; SAKAKIBARA, S. Highly sensitive peptide-4-

methylcoumaryl-7-amide substrates for blood-clotting proteases and trypsin. European Journal of Biochemistry, v. 172, n. 1, p. 17-25, 1988.

KIKELJ, D. Peptidomimetic thrombin inhibitors. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 33, n. 5-6, p. 487-491, 2004.

KIMMELSTIEL, C.; ZHANG, P.; KAPUR, N. K.; WEINTRAUB, A.; KRISHNAMURTHY, B.; CASTANEDA, V.; COVIC, L.; KULIOPULOS, A. Bivalirudin is a dual inhibitor of thrombin and collagen-dependent platelet activation in patients undergoing percutaneous coronary intervention. Journal of the American Heart Association, v. 4, p. 171-179, 2011.

KLAUSNER, Y. S.; RIGBI, M.; TICHO, T.; JONG, P. J.; NEGINSKY, E. J.; RINOTT, Y. The interaction of  $\alpha$ -N-(*p*-toluenesulphonyl)-*p*-guanidino-L-phenylalanine methyl ester with thrombin and trypsin. **Biochemical Journal**, v. 169, p. 157-167, 1978.

KLINE, T.; HAMMOND, C.; BOURDON, P.; MARAGANORE, J. M. Hirulog peptides with scissile bond replacements resistant to thrombin cleavage. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 177, n. 3, p. 1049-1055, 1991.

KUDRYAVTSEV, K. V.; SHULGA, D. A.; CHUPAKHIN, V. I.; CHURAKOV, A. V.; DATSUK, N. G.; ZABOLOTNEV, D. V.; ZEFIROV, N. S. Design of small-molecule thrombin inhibitors based on the *cis*-5-phenylproline scaffold. **Russian Chemical Bulletin**, v. 60, n. 4, p. 685-693, 2011.

LANGE, U. E. W.; BAUCKE, D.; HORNBERGER, W.; MACK, H.; SEITZ, W.; HÖFFKEN, W. d-Phe-Pro-Arg type thrombin inhibitors: unexpected selectivity by modification of the P1 moiety. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 12, p. 2029-2033, 2003.

LE BONNIEC, B. F.; MYLES, T.; JOHNSON, T.; KNIGHT, C. G.; TAPPARELLI, C.; STONE, S. R. Characterization of the P2' and P3' specificities of thrombin using fluorescence-quenched substrates and mapping of the subsites by mutagenesis. **Biochemistry**, v. 35, n. 22, p. 7114-7122, 1996.

LEE, C. J.; ANSELL, J. E. Direct thrombin inhibitors. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 581-592, 2011.

LEFKOVITS, J.; TOPOL, E. J. Direct thrombin inhibitors in cardiovascular medicine. **Circulation**, v. 90, n. 3, p. 1522-1536, 1994.

LEONARD, F.; WAJNGURT, A.; TSCHANNEN, W.; BLOCK, F. B. Unnatural amino acids: 3-carboxytyrosine derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 812-815, 1965.

LEW, W. K.; WEAVER, F. A. Clinical use of topical thrombin as a surgical hemostat. **Biologics: Targets & Therapy**, v. 2, n. 4, p. 593-599, 2008.

LEWIS, B. E.; WALLIS, D. E.; BERKOWITZ, S. D.; MATTHAI, W. H.; FAREED, J.; WALENGA, J. M.; BARTHOLOMEW, J.; SHAM, R.; LERNER, R. G.; ZEIGLER, Z. R.; RUSTAGI, P. K.; JANG, I. K.; RIFKIN, S. D.; MORAN, J.; HURSTING, M. J.; KELTON,
J. G. Argatroban anticoagulant therapy in patients with heparin-induced thrombocytopenia. **Circulation**, v. 103, p. 1838-1843, 2001.

LINCOFF, A. M.; BITTL, J. A.; HARRINGTON, R. A.; FEIT, F.; KLEIMAN, N. S.; JACKMAN, J. D.; SAREMBOCK, I. J.; COHEN, D. J.; SPRIGGS, D.; EBRAHIMI, R.; KEREN, G.; CARR, J.; COHEN, E.A.; BETRIU, A.; DESMET, W.; KEREIAKES, D. J.; RUTSCH, W.; WILCOX, R. G.; FEYTER, P. J.; VAHANIAN, A.; TOPOL, E. J. Bivalirudin and provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with heparin and planned glycoprotein IIb/IIIa blockade during percutaneous coronary intervention. **The Journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 7, p. 853-1638, 2003.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433-30437, 2008.

MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. Influence of proline residues on protein conformation. Journal of Molecular Biology, v. 218, p. 397-412, 1991.

MADABUSHI, R.; COX, D. S.; HOSSAIN, M.; BOYLE, D. A.; PATEL, B. R.; YOUNG, G.; CHOI, Y.; GOBBURU, J. V. S. Pharmacokinect and pharmacodynamic basis for effective argatroban dosing in pediatrics. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 51, n. 1, p. 19-28, 2011.

MAGAFA, V.; BOROVICKOVÁ, L.; SLANINOVÁ, J.; CORDOPATIS, P. Synthesis and biological activity of oxytocin analogues containing unnatural amino acids in position 9: structure activity study. **Amino Acids**, v. 38, n. 5, p. 1549-1559, 2010.

MARAGANORE, J. M. Hirudin and hirulog: advances in antithrombotic therapy. **Perspectives in Drug Discovery and Design,** v. 1, n. 3, p. 461-478, 1993.

MARAGANORE, J. M.; BOURDON, P.; JABLONSKI, J.; RAMACHANDRAN, K. L.; FENTON, J. W. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. **Biochemistry**, v. 29, n. 30, p. 7095-7101, 1990.

MARKWARDT, F. Historical perspective of the development of thrombin inhibitors. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis,** v. 32, n. 3, p. 15-22, 2002.

MARKWARDT, F. The development of hirudin as an antithrombotic drug. **Thrombosis Research**, v. 74, p. 1-23, 1994.

MEHRAN, R.; LANSKY, A. J.; WITZENBICHLER, B.; GUAGLIUMI, G.; PERUGA, J. Z.; BRODIE, B. R.; DUDEK, D.; KORNOWSKI, R.; HARTMANN, F.; GERSH, B. J.; POCOCK, S. J.; WONG, S. C.; NIKOLSKY, E.; GAMBONE, L.; VANDERTIE, L.; PARISE, H.; DANGAS, G. D.; STONE, G. W. Bivalirudin in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction (horizons-ami): 1-year results of a randomized controlled trial. **The Lancet**, v. 374, n. 9696, p. 1149-1159, 2009.

MELO, R. L.; POZZO, R. C. B.; PIMENTA, D. C.; PERISSUTTI, E.; CALIENDO, G.; SANTAGADA, V.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A. Human tissue kallikrein  $S_1$  subsite recognition of non-natural basic amino acids. **Biochemistry**, v. 40, n. 17, p. 5226-5232, 2001.

MINAMI, T.; SUGIYAMA, A.; WU, S.; ABID, R.; KODAMA, T.; AIRD, W. C. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology,** v. 24, n. 1, p. 41-53, 2004.

MITSUNOBU, O. The use of diethyl azodicarboxylate and triphenylphosphine in synthesis and transformation of natural products. **Synthesis**, v. 1, p. 1-28, 1981.

MONTOYA, R. C.; GAJRA, A. Current status of new anticoagulants in the management of venous thromboembolism. Advances in Hematology, v. 2012, p. 1-7, 2012.

MÜLLER-ESTERL, W.; IWANAGA, S.; NAKANISHI, S. Kininogens revisited. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 11, n. 8, p. 336-339, 1986.

NAGARAKANTI, R.; ELLIS, C. R. Dabigatran in clinical practice. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 10, p. 2051-2060, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011, p. 860-861.

NUTESCU, E. A.; WITTKOWSKY, A. K. Direct thrombin inhibitors for anticoagulation. **The Annals of Pharmacotherapy**, v. 38, n. 1, p. 99-109, 2004.

O'REILLY, E.; PES, L.; ORTIN, Y.; MÜLLER-BUNZ, H.; PARADISI, F. Synthesis of a conformationally constrained  $\delta$ -amino acid building block. **Amino Acids**, v. 44, n. 2, p. 511-518, 2012.

OLIVEIRA, L. C. O.; FRANCO, R. F. Novas drogas anticoagulantes. Hemostasia e Trombose, v. 34, n. 6, p. 276-281, 2001.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PATCHETT, A. A.; WITKOP, B. Studies on hydroxyproline. Journal of the American Chemical Society, v. 79, n. 1, p. 185-192, 1957.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, v. 4, p. 337-360, 1995.

PIERI, M.; AGRACHEVA, N.; BONAVEGLIO, E.; GRECO, T.; DE BONIS, M.; COVELLO, R. M.; ZANGRILLO, A.; PAPPALARDO, F. Bivalirudin versus heparin as an anticoagulant during extracorporeal membrane oxygenation: a case-control study. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 27, n. 1, p. 30-34, 2013.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 62, p. 2161-2172, 2005.

PUENTE, X. S.; SÁNCHEZ, L. M.; OVERALL, C. M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 544-558, 2003.

QIU, X.; PADMANABHAN, K. P.; CARPEROS, V. E.; TULINSKY, A.; KLINE, T.; MARAGANORE, J. M.; FENTON, J. W. Structure of the hirulog 3-thrombin complex and nature of the S' subsites of substrates and inhibitors. **Biochemistry**, v. 31, n. 47, p. 11689-11697, 1992.

QU, H.; CAI, M.; MAYOROV, A. V.; GRIECO, P.; ZINGSHEIM, M.; TRIVEDI, D.; HRUBY, V. J. Substitution of arginine with proline and proline derivatives in melanocytestimulating hormones leads to selectivity for human melanocortin 4 receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 3627-3635, 2009.

RCSB Protein data bank. Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, 1998. Disponível em: <a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/</a>. Acesso em: 15 Jan 2011.

REGER, T. S.; ZUNIC, J.; STOCK, N.; WANG, B.; SMITH, N. D.; MUNOZ, B.; GREEN, M. D.; GARDNER, M. F.; JAMES, J. P.; CHEN, W.; ALVES, K.; SI, Q.; TREONZE, K. M.; LINGHAM, R. B.; MUMFORD, R. A. Heterocycle-substituted proline dipeptides as potent VLA-4 antagonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 3, p. 1173-1176, 2010.

REMUZON, P. *Trans*-4-hydroxy-L-proline, a useful and versatile chiral starting block. **Tetrahedron**, v. 52, n. 44, p. 13803-13835, 1996.

RIGBI, M.; KLAUSNER, Y.; LEFRANCIER, P.; SACHE, E. Derivatives of para-guanidino-L-phenylalanine and methods of preparing them. **United States Patent**, US4118575, 1978.

RÖSSIG, L.; GENTH-ZOTZ, S.; RAU, M.; HEYNDRICKX, G. R.; SCHNEIDER, T.; GULBA, D. C. L.; DESAGA, M.; BUERKE, M.; HARDER, S.; ZEIHER, A. M. Argatroban for elective percutaneous coronary intervention: the Arg-E04 multi-center study. **International Journal of Cardiology**, v. 148, n. 2, p. 214-219, 2011.

SALVESEN, G.; NAGASE, H. Proteolytic Enzymes – a pratical approach, **IRL Press**, Oxford, p. 83-105, 1990.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 27, n. 2, p. 157-162, 1967.

SCHWENKGLENKS, M.; TOWARD, T. J.; PLENT, S.; SZUCS, T. D.; BLACKMAN, D. J.; BAUMBACH, A. Cost-effectiveness of bivalirudin versus heparin plus glycoprotein IIb/IIIa inhibitor in the treatment of acute ST-segment elevation myocardial infarction. **Heart**, v. 98, n. 7, p. 544-551, 2012.

SIKKA, P.; BINDRA, V. K. Newer antithrombotic drugs. Indian Journal of Critical Care Medicine, v. 14, n. 4, p. 188-195, 2010.

SILVA, R. N. **Síntese e ensaio de análogos estruturais de prolina no estudo da interação com trombina.** 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SIMBERG, D.; DUZA, T.; PARK, J. H.; ESSLER, M.; PILCH, J.; ZHANG, L.; DERFUS, A. M.; YANG, M.; HOFFMAN, R. M.; BHATIA, S.; SAILOR, M. J.; RUOSLAHTI, E.

Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. **Proceedings of the National** Academy of Sciences of the United States of America, v. 104, n. 3, p. 932-936, 2007.

SLOMINSKI, A.; CONSTANTINO, R.; WORTSMAN, J.; PAUS, R.; LING, N. Melanotropic activity of gamma MSH peptides in melanoma cells. **Life Sciences**, v. 50, n. 15, p. 1103-1108, 1992.

SPINLER, S. The pharmacology and therapeutic use of dabigatran etexilate. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 53, n. 1, p. 1-13, 2013.

STONE, G. W.; WITZENBICHLER, B.; GUAGLIUMI, G.; PERUGA, J. Z.; BRODIE, B. R.; DUDEK, D.; KORNOWSKI, R.; HARTMANN, F.; GERSH, B. J.; PHIL, D.; POCOCK, S. J.; DANGAS, G.; WONG, C.; KIRTANE, A. J.; PARISE, H.; MEHRAN, R. Bivalirudin during primary PCI in acute myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 21, p. 2218-2230, 2008.

STRAUB, A.; ROEHRIG, S.; HILLISCH, A. Oral, direct thrombin and factor Xa inhibitors: the replacement of warfarin, leeches, and pig intestines? **Angewandte Chemie**, v. 50, n. 20, p. 4574-4590, 2011.

SUGASE, K.; HORIKAWA, M.; SUGIYAMA, M.; ISHIGURO, M. Restriction of a peptide turn conformation and conformational analysis of guanidino group using arginine-proline fused amino acids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 489-492, 2004.

TAMAKI, M.; HAN, G. X.; HRUBY, V. J. Pratical and efficient synthesis of orthogonally protected constrained 4-guanidinoprolines. **Journal of Organic Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 1038-1042, 2001.

TSUNEMATSU, H.; ANDO, K.; HATANAKA, Y.; MIZUSAKI, K.; ISOBE, R.; MAKISUMI, S. A new  $\beta$ -naphthylamide substrate of *p*-guanidino-L-phenylalanine for trypsin and related enzymes. **The Journal of Biochemistry**, v. 98, n. 6, p. 1597-1602, 1985.

VERMA, A. K. Dabigatran etexilate: a new thrombin inhibitor. **The Medical Journal of Australia**, v. 192, n. 7, p. 407-412, 2010.

WARKENTIN, T. E. Bivalent direct thrombin inhibitors: hirudin and bivalirudin. Best Practice & Research Clinical Haematology, v. 17, n. 1, p. 105-125, 2004.

WARWOOD, S.; MOHAMMED, S.; CRISTEA, I. M.; EVANS, C.; WHETTON, A. D.; GASKELL, S. J. Guanidination chemistry for qualitative and quantitative proteomics. **Rapid** communications in mass spectrometry, v. 20, n. 21, p. 3245-3256, 2006.

WEBB, T. R.; EIGENBROT, C. Conformationally restricted arginine analogs. Journal of Organic Chemistry, v. 56, n. 9, p. 3009-3016, 1991.

WEITZ, J. I. A novel approach to thrombin inhibition. **Thrombosis Research,** v. 109, p. 17-22, 2003.

WEITZ, J. I.; HIRSH, J.; SAMAMA, M. M. New anticoagulant drugs. Chest Journal, v. 126, n. 3, p. 265-286, 2004.

WEITZ, J. I.; HUDOBA, M.; MASSEL, D.; MARAGANORE, J.; HIRSH, J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 86, n. 2, p. 385-391, 1990.

WITTING, J. I.; BOURDON, P.; BREZNIAK, D. V.; MARAGANORE, J. M.; FENTON, J. W. Thrombin-specific inhibition by and slow cleavage of hirulog-1. **Biochemical Journal**, v. 283, n. 3, p. 737-743, 1992.

WITTING, J. I.; BOURDON, P.; MARAGANORE, J. M.; FENTON, J. W. Hirulog-1 and - B2 thrombin specificity. **Biochemical Journal**, v. 287, n. 2, p. 663-664, 1992.

WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**, v. 21, n. 3, p. 131-142, 2007.

WYSOCKA, M.; LEGOWSKA, A.; BULAK, E.; JASKIEWICZ, A.; MIECZNIKOWSKA, H.; LESNER, A.; ROLKA, K. New chromogenic substrates of human neutrophil cathepsin G containing non-natural aromatic amino acid residues in position P<sub>1</sub> selected by combinatorial chemistry methods. **Molecular Diversity**, v. 11, n. 2, p. 93-99, 2007.

XU, Y.; WU, W.; WANG, L.; CHINTALA, M.; PLUMP, A. S.; OGLETREE, M. L.; CHEN, Z. Differential profiles of thrombin inhibitors (heparin, hirudin, bivalirudin, and dabigatran) in the thrombin generation assay and thromboelastography *in vitro*. **Blood Coagulation and Fibrinolysis**, v. 24, n. 3, p. 332-338, 2013.

ZANUY, D.; FLORES-ORTEGA, A.; JIMENEZ, A. I.; CALAZA, M. I.; CATIVIELA, C.; NUSSINOV, R.; RUOSLAHTI, E., ALEMAN, C. In silico molecular engineering for a targeted replacement in a tumor-homing peptide. **Journal of Physical Chemistry**, v. 113, n. 22, p. 7879-7889, 2009.

## APÊNDICE – Figuras dos espectros de massas dos aminoácidos não naturais análogos de prolina sintetizados



Figura A1 - Espectro de massas do aminoácido N<sup>α</sup>-cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina

Figura A2 - Espectro de massas do aminoácido N<sup>a</sup>-cbz-*trans*-4-hidroxi-L-prolina benzil éster





Figura A3 - Espectro de massas do aminoácido  $N^{\alpha}$ -cbz-*trans*-4[(p-toluenosulfonil)oxi]-L-prolina benzil éster

Figura A4 - Espectro de massas do aminoácido N<sup>α</sup>-cbz-*cis*-4-azido-L-prolina benzil éster





Figura A5 - Espectro de massas do aminoácido  $N^{\alpha}$ -cbz-cis-4-amino-L-prolina benzil éster

Figura A6 - Espectro de massas do aminoácido N<sup>a</sup>-Fmoc-cis-4-N-Boc-amino-L-prolina





Figura A7 - Espectro de massas do aminoácido  $N^{\alpha}$ -cbz-*cis*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina benzil éster

Figura A8 - Espectro de massas do aminoácido N<sup>α</sup>-Fmoc-*cis*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-Lprolina





Figura A9 - Espectro de massas do aminoácido N<sup>α</sup>-cbz-*cis*-4-cloro-L-prolina benzil éster

Figura A10 - Espectro de massas do aminoácido (2S,4R)-N<sup> $\alpha$ </sup>-cbz-4-azidoprolina benzil éster



Figura A11 - Espectro de massas do aminoácido  $N^{\alpha}\text{-}cbz\text{-}trans\text{-}4\text{-}amino\text{-}L\text{-}prolina benzil éster$ 



Figura A12 - Espectro de massas do aminoácido  $N^{\alpha}$ -Fmoc-*trans*-4-N-boc-amino-L-prolina

