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).

São Paulo
2013

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 prolyl- peptidases. 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-L-proline 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.

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 ϕ, ψ, ω e χ 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 χ (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 ϕ à -65º+/-15º, 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).

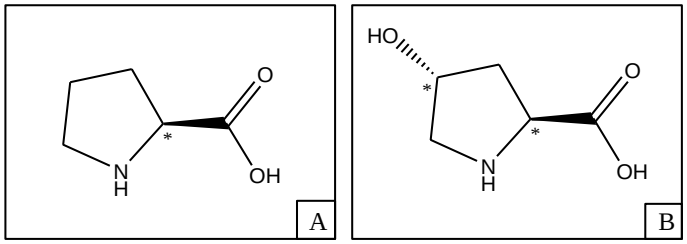
Na biossíntese de aminoácidos, a prolina é um derivado cíclico do glutamato, sendo que, na primeira etapa de síntese, o ATP reage com o grupo carboxila do glutamato, formando um acil-fosfato, que é reduzido por NADPH ou NADH. Como intermediário, é produzido o γ-semialdeído do glutamato, que espontaneamente 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



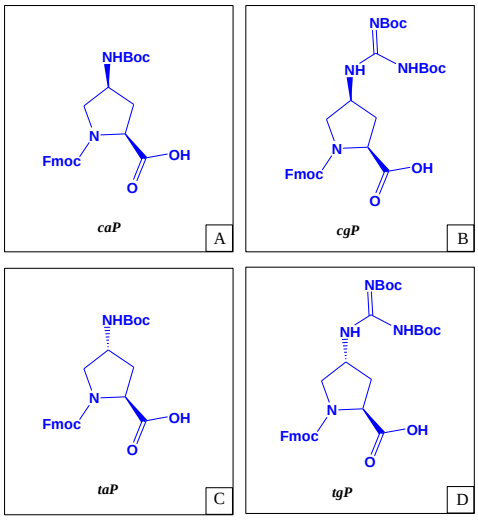
(*) carbono assimétrico. (A) L-Prolina. (B) *trans*-4-hidroxi-L-prolina.
Fonte: Modificado de Remuzon (1996)

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.

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

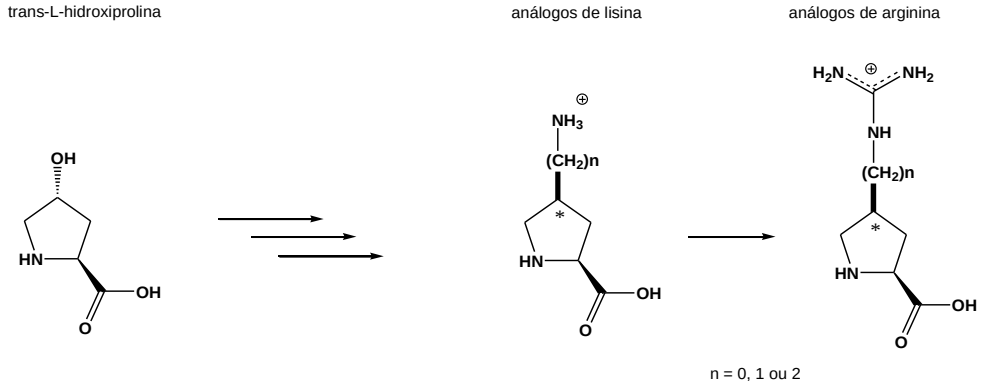


(A) -N$^{\alpha}$-Fmoc-*cis* -4-N-Boc-amino-L-prolina. (B) N$^{\alpha}$-Fmoc-*cis*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina. (C) N$^{\alpha}$-Fmoc-*trans*-4-N-Boc-amino-L-prolina. (D) N$^{\alpha}$-Fmoc-*trans*-4-N,N'-di-Boc-guanidino-L-prolina.
Fonte: Modificado de Tamaki, Han e Hruby (2001)

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.

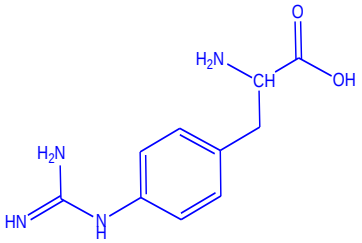
Outro emprego a ser citado foi obtido no desenho racional de antagonistas de receptores nicotínicos de acetilcolina pela geração de análogos de prolina em peptídeos miméticos de α-Conotoxina, sendo que, análogos de prolina com substituintes aromáticos ou hidrofóbicos apresentaram moderada atividade antagonista 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_{cat}/K_m), 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

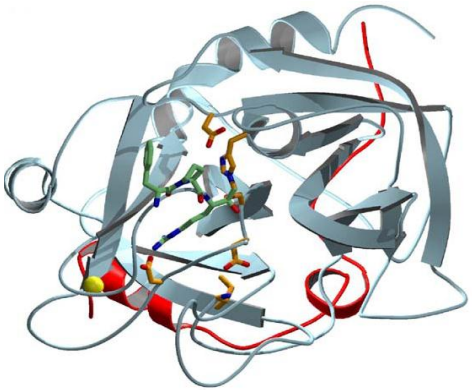
As peptidases desempenham funções essenciais nos organismos vivos. Os eventos dessa classe de enzimas são fundamentais nos processos de ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário, formação óssea, desenvolvimento neuronal, apresentação de antígenos, regulação do ciclo celular, cicatrização, angiogênese 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 α-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^+ 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).

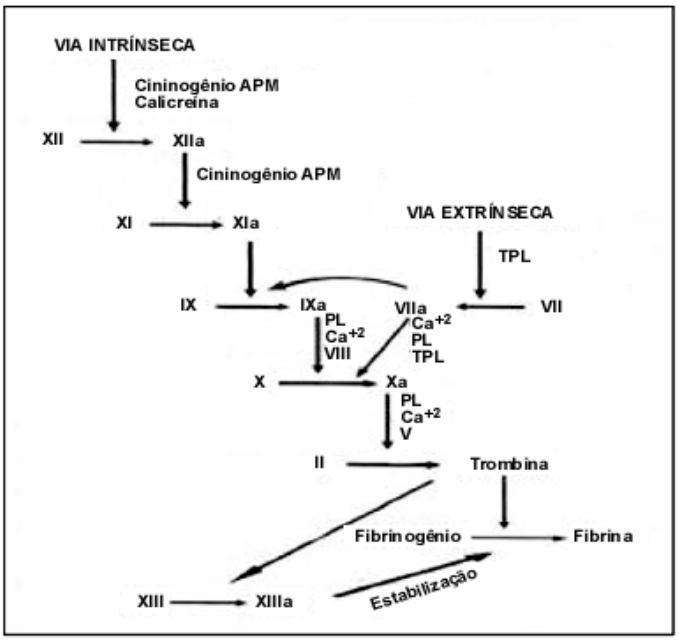
Na entrada do sítio ativo de trombina, localiza-se o resíduo Glu192, responsável pela especificidade no reconhecimento de ligantes que interagem com trombina (BODE, 2006). Além disso, sua estrutura é composta por mais dois exosítios de caráter básico. O exosítio I desempenha fundamental importância no 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'_3. Sendo uma arginil-hidrolase, a arginina é praticamente essencial no sítio primário (P_1) enquanto que prolina é preferido na posição P_2 e serina em P'_1. Um estudo sistemático das interações dos subsítios S'_2-P'_2 e S'_3-P'_3 mostra que S'_2 tem marcada preferência por aminoácidos hidrofóbicos de cadeia aromática (fenilalanina) e S'_3 por aminoácidos carregados positivamente, enquanto que o ácido aspártico nas duas posições (P'_2 e P'_3) 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).

Figura 6 – Cascata da coagulação



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 transmembrana (COUGHLIN, 2000). Contudo, nas plaquetas humanas PAR-1 é considerado 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_i) 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

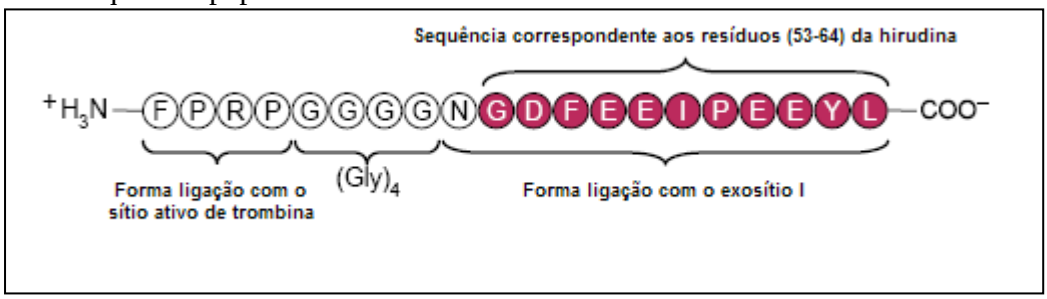
pacientes com disfunções renais (AKIMOTO et al., 2011; MADABUSHI et al., 2011; RÖSSIG et al., 2011)

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 β-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.

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-Ǻ X-ray crystal structure of d-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human α-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: <http://www.link.springer.com/>. Acesso em: 01 mar. 2013.

BUTKOWSKI, R. J.; ELION, J.; DOWNING, M. R.; MANN, K. G. Primary structure of human prethrombin 2 and α-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-β 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^+ 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 α-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 χ–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 3-hydroxyproline 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 α-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 δ-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 melanocyte-stimulating 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: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do/>. 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 β-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_1 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.