

HEMIJA NOVIJIH INHIBITORA AGREGACIJE TROMBOCITA I FIBRINOLITIKA

SOTE VLADIMIROV, DANICA AGBABA

*Institut za farmaceutsku hemiju i analitiku lekova, Farmaceutski fakultet, Vojvode Stepe 450,
11221 Beograd*

REZIME

Oboljenja kardiovaskularnog sistema kao što su infarkt miokarda, različiti oblici tromboza i embolija, predstavljaju najznačajnije uzročnike mortaliteta i morbiteta. U savremenoj antikoagulantnoj terapiji pored klasičnih peroralnih antiagregatika kao što su: *aspirin*, *dipiridamol* i *sulfinpirazon*, i ne selektivnih inhibitora tkivnog faktora plazminogena, prečišćenog bakterijskog proteina, *streptokinaze*, *reteplaze* i *urokinaze* za parenteralnu primenu, su uvedeni selektivniji aktivatori plazminogena: *alteplaza* i *tenekteplaza* koji predstavljaju proizvode rekombinantne DNK tehnologije.

Pored razvoja parenteralnih fibrinolitika, proizvoda rekombinantne tehnologije, sulfonskih polisaharidnih anjona male molekulske mase sa aktivnim pantasaharidnim sulfonatim anjonima, u prevenciji i terapiji postoperativno se koriste i peroralni antagonisti faktora koagulacije kao što je *varfarin* i njegovi derivati koji predstavljaju antagoniste vitamina K.

U savremenoj terapiji učinjen je napredak u prevenciji i terapiji embolija i dubokih tromboza uvođenjem u kliničku praksu lekova iz grupe malih molekula poznatih pod nazivom *peptidomimetika*.

Dizajniranje peptidomimetika je omogućeno razvojem molekularne biologije, genetskog inženjeringa, imunohemije, biohemije i fiziologije. Razvoj ovih naučnih disciplina doveo je do utvrđivanja preciznih

bioloških mehanizama koji regulišu hemostazu. Na osnovu rezultata naučnih istraživanja u području savremenog *drug dizajna* biološki aktivnih molekula u terapiji su uvedeni fibrinolitici i antitrombotici za parenteralnu i per-os primenu. U kliničkoj praksi su uvedeni antitrombotici koji deluju kao inhibitorni ligandi za veliki broj trombocitnih receptora ili inhibitori trombina kao što su: *torofibran*, *eptifibatid*, *ksimelagatran*, *melagatran*, *argatromban*, *napsagatran*, *klopidogrel*, *tiklopidin* i drugi.

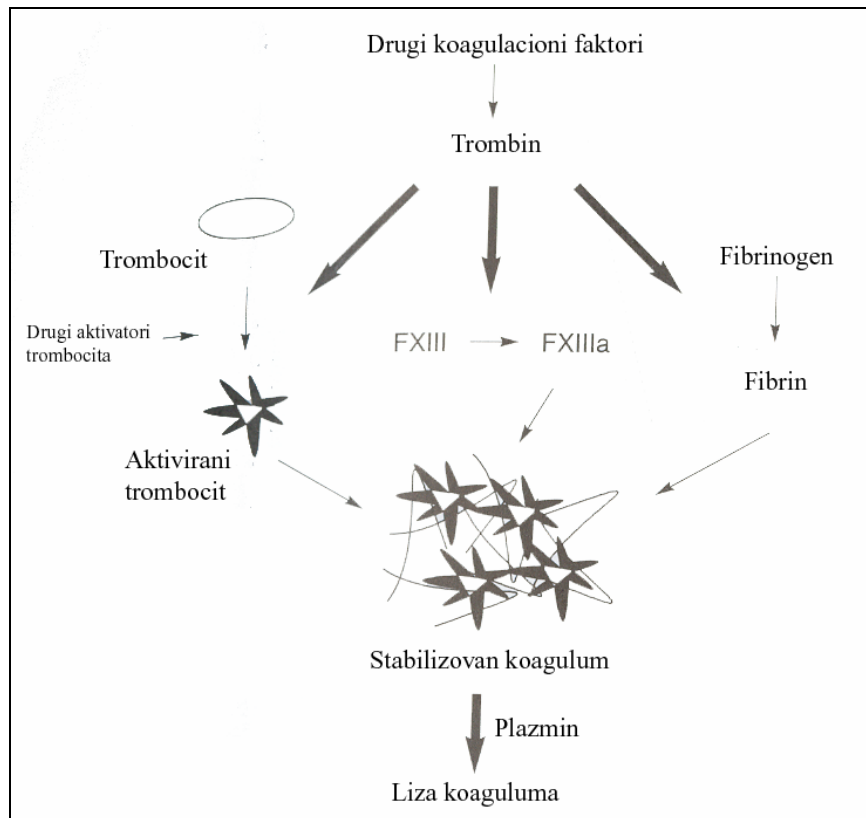
U skoroj budućnosti očekuje se i primena novih lekova u ovoj farmakoterpijskoj grupi koji su trenutno u različitim fazama kliničkih ispitivanja.

FIZIOLOŠKI I BIOHEMIJSKI MEHANIZMI KOAGULACIJE

Održavanje i regulacija protoka krvi kroz vaskularni sistem je visoko uređen fiziološki proces u kome su uključeni komplementarni i antagonistički kontrolni mehanizmi, odnosno cirkulacija krvi kroz vaskularni sistem je precizno izbalansiran i uravnotežen proces pozitivnim i negativnim kaskadnim procesima. U ovim procesima učestvuju trombociti, različiti endogeni i egzogeni aktivatori koagulacije, fosfolipidi, glikoproteini i receptori odgovorni za vezivanje različitih liganada koji su locirani na membrani trombocita. U vaskularnom sisemu je permanentno prisutna dinamička ravnoteža između procesa fluidnosti odnosno protoka krvi kroz arterije i vene i procesa koagulacije koji može pod određenim uslovima da se aktivira kao zaštni mehanizam za sprečavanje hemoragičnih procesa npr. u slučaju traumatskih povreda. Pored zaštitne uloge, proces koagulacije može da se aktivira i pod uticajem razvoja patofizioloških procesa kao što su različiti tipovi oštećenja endotela (aterosleroza) krvnih sudova, zastoja u cirkulaciji ili nastanka disbalansa između pojedinih regulatornih endogenih biohemijskih faktora.

Prema tome ovaj proces pored fiziološke uloge, veoma je značajan i u etiopatogenezi velikog broja kardiovaskularnih oboljenja kao što su: infarkt miokarda, duboke venske tromboze, plućne embolije, cerebralnog insulta i drugih kardiovaskularnih oboljenja. Formiranje koaguluma krvi kao zaštitnog mehanizma od razvoja hemoragije je kontrolisan proces, da

bi se omogućio i dalje proces cirkulacije krvi, nastali koagulum može pod određenim uslovima da bude liziran npr *plazminom*. Shematski prikaz procesa koagulacije i faktora koji učestvuju u tom procesu predstavljen je na slici 1.



Slika 1 Shema formiranja koaguluma u čiju sastav ulaze aktivirani trombociti i fibrin

Figure 1 The scheme of forming the clot in which composition enter the activated platelets and fibrin

U procesu koagulacije, pored procesa aktivacije trombocita koji primarno karakteriše arterijski sistem, veoma značajnu ulogu u koagulaciji krvi pre svega u dubokom venskom sistemu ima enzim trombin.

Faktori koji se biosintetišu u jetri zajedno sa drugim tkivnim faktorima koji se oslobađaju u toku patofizioloških procesa koji su

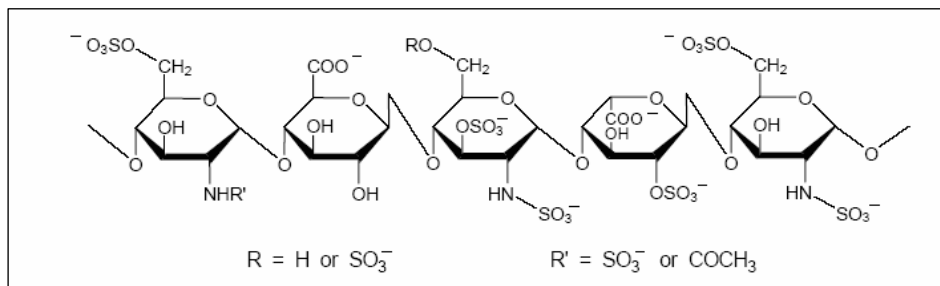
odgovorni za proces aktivacije trombina i trombocita, imaju ključnu ulogu u koagulaciji krvi.

Veoma značajnu ulogu u koagulaciji krvi ima tkivni faktor (TF), koji se luči pri aterosklerotskim procesima, koji aktivira faktore koagulacije (VII i faktor X). Aktivirani faktori Xa i Va i kompleksi sa fosfolipidom transformišu protrombin u trombin. Trombin, je tripsinu sličan enzim koji pripada grupi *serinproteaza*. Trombin ima ključnu ulogu u kaskadnom biohemijском procesu koagulacije krvi (1). Aktivnost trombina se javlja kao posledica terminalnog enzimskog procesa u koagulaciji krvi pošto katalizuje konverziju fibrinogena u fibrin koji unakrsnim vezivanjem sa drugim elementima krvi (npr. trombocitima) gradi koagulum. Trombin je takođe veoma aktivan stimulans agregacije trombocita.

Aktivacija trombina je dvostruko regulisana kako pozitivnom tako i negativnom povratnom spregom. Tako je ne fiziološka prekomerna aktivnost trombina regulisana *trombomodulinom* koji gradi proteinski kompleks sa trombinom, pri čemu dolazi do promene stepena specifičnosti trombina prema supstratu odnosno faktorima koagulacije V i VIII. U povratnoj sprezi inaktivacije trombina učestvuje i *protein C*.

Aktivnost trombina ima ključnu ulogu u razvoju odnosno patogenezi tromboembolijskih oboljenja. U procesu aktivacije protrombina, učestvuju i druge proteinske molekule kao što su protein C, faktor VIII i IX. Aktivacija trombocita odnosno mehanizmi koji aktiviraju njihovu agregaciju u arterijskoj cirkulaciji takođe imaju veoma značajnu ulogu u procesu koagulacije krvi. Proces aktivacije trombocita, pored aktiviranog trombina uslovljava stvaranje stabilnog koaguluma, koji može pod uticajem drugih faktora da se lizira.

Lekovi koji se koriste kao antitrombotici inhibiraju biosintezu, proces aktivacije trombina i trombocita i njihove agregacije. Heparin i njegovi derivati male molekulske mase predstavljaju heterogenu smešu polianjonskih polisaharida. Aktivni strukturni fragment ove smeše polisaharida je pentasaharidni fragment koji se vezuje za endogeni protein antitrombin koji ima ulogu inaktivatora trombina i FXa koji pripada serinproteazama kojima pripadaju i drugi koagulacioni enzimi. Pentasaharidni polianjonski lanac je predstavljena na slici 2.

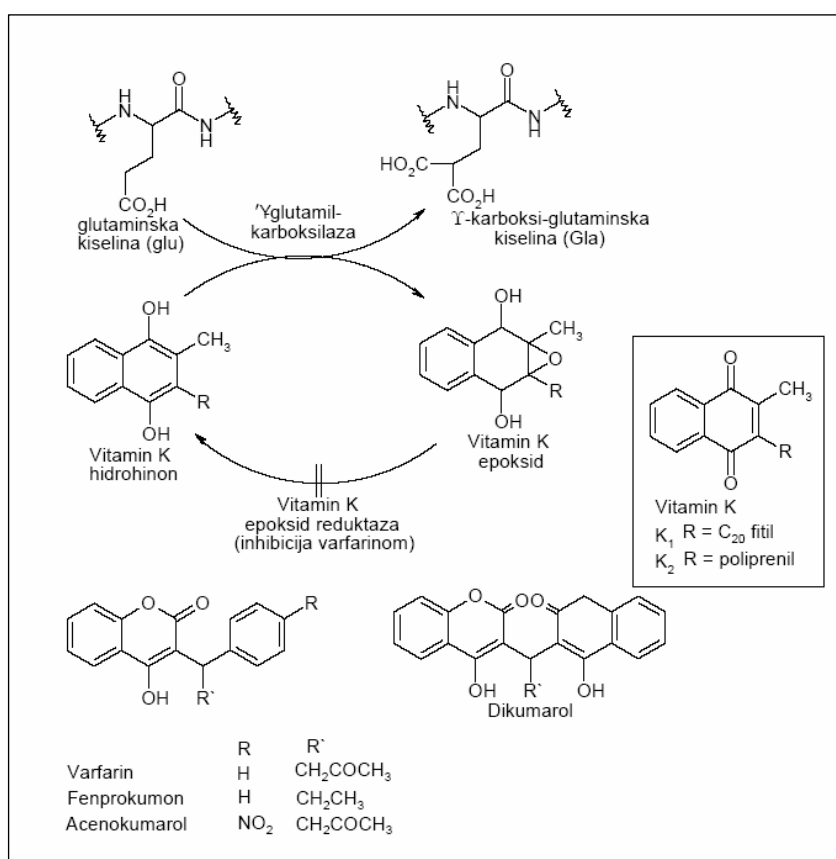


Slika 2 Hemijska struktura aktivnog pentasaharidnog anjonskog fragmenta heparina i njegovih derivate male molekulske mase

Figure 2 The chemical structure of the active pentasaharides anionic fragment of heparin and its low molecular derivatives

Heparin (heparinska kiselina) je glikozaminoglikan koji predstavlja smešu sulfonskih polianjonskih polisaharida relativne molekulske mase od 6000 do 30000 koji se biosintetiše u mastocitima jetre, pluća i intersticijalnoj mukozi. Ovaj molekul predstavlja *model molekul* za dizajniranje anjonskih sulfonatnih pentasaharida relativno male molekulske mase od 4000 do 5000 kao što su: ***fondaparinoks, tinzaparin, enoksaparin, dalteparin*** koji su dobijeni hemijskom ili enzimskom depolimerizacijom heparina. Za razliku od heparina, ovi lekovi imaju manje neželjena dejstva i povoljnije farmakokinetičke osobine. Heparin i njegovi derivati deluju trombolitički vezivanjem i aktivacijom *antitrombina III*, plasma proteina koji inhibira nekoliko enzima u koagulacionoj kaskadi. Heparini male molekulske mase imaju manji neželjeni hemoragijski potencijal u terapijskim koncentracijama koje deluju trombolitički. U terapiji se koristi u obliku soli natrijuma, kalcijuma i magnezijuma. Parenteralni rastvori kojima se dodaju konzervansi kao što su hlorbutanol ili fenol su stabilni oko godinu dana na sobnoj temperaturi. Terapijski se koriste u lečenju dubokih venskih tromboza, embolije pluća, diseminovane intravaskularne koagulacije i nekih oblika infarkta miokarda. Vršu se biofarmaceutska istraživanja koja će omogućiti terapijsku primenu preparata derivata heparina *per-os* ili na drugi način. Za razliku od derivata heparina koji se isključivo daju parenteralno, ***varfarin*** i njegovi derivati se daju *per-os*. Varfarin indirektno inhibira aktivnost trombina i drugih koagulacionih proteina

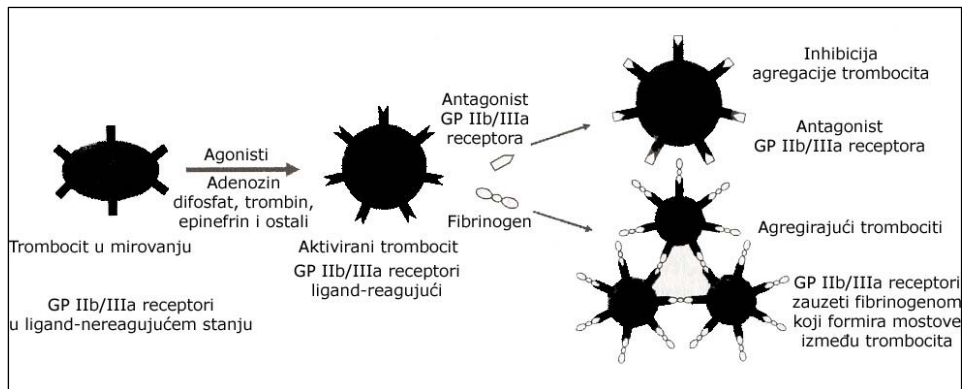
inhibicijom fiziološke uloge vitamina K u njegovoj postranslacionoj modifikaciji koja predhodi procesu aktivacije. Biohemijska uloga vitamina K je u procesu γ -karboksilacije peptidnog fragmenta glutaminske kiseline u kojoj učestvuje enzim γ -glutamylkarboksilaza koja je inhibirana pod dejstvom antagonista K vitamina kao što su: **varfarin**, **fenprokumon**, **acenokumarol**, **dikumarol etilbiskumacetat** i drugi. Inhibicija ovog enzima je visoko stereospecifična i samo (S)-stereoisomer varfarina poseduje inhibitornu aktivnost. Shematski prikaz inaktivacije ovog enzima oralnim antikoagulansima, antagonistima vitamina K je predstavljena na slici 3 ,



Slika 3 Shema inaktivacije γ -glutamylkarboksilaze u prisustvu antagonista K vitamina

Figure 3 The scheme of γ -glutamylcarboxylase inactivation in the presence of the vitamin K antagonists

Utvrđena je kvalitativna razlika u fiziologiji i biohemiji procesa koagulacije u arterijskom i venskom sistemu. Mehanizam aktivacije trombocita i receptorska mesta, na kojima se vezuju različiti aktivatori može se predstaviti na sledeći način:



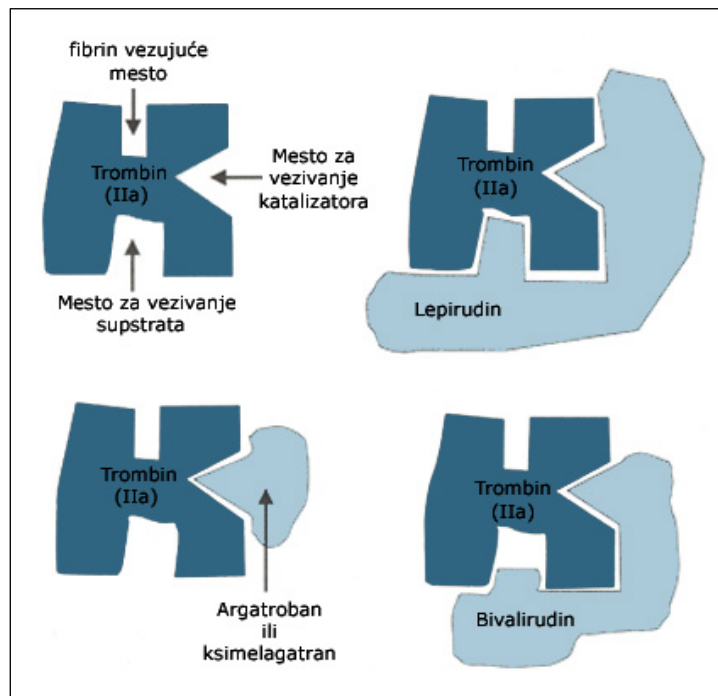
Slika 4 Faktori aktivacije za vezivanje liganada u procesu aktivacije trombocita

Figure 4 The factors of platelet activation for binding of various ligands

Na membrani trombocita su prisutni brojni receptori za vezivanje liganada kao što su: trombin, adenosindifosfat, tromboksan, adrenalin, serotonin, faktor aktivacije trombocita (PAF) i drugi. Struktura, njihova gustina kao i način vezivanja liganada za pojedine receptore je utvrđena obeležavanjem sa radionukleidima (npr. radioaktivnim iridijumom). Receptori kao što su: PAR-1 PAR-4 za trombin, P2Y₁, P2Y₁₂ za adenosindifosfat, A₂, agrenergični, serotoniniski receptori i aktivatori kolagena, fibrinogena COX-1 enzima, von Villebrandovog faktora i fosfolipida imaju primarnu ulogu u procesu aktivacije trombocita i formiranje koaguluma u patofiziološkim procesima.

DIREKTINI TROMBINSKI INHIBITORI

Direktni i selektivni inhibitori trombina iz grupe malih molekula poznatih kao petidomimetici imaju relativno povoljnu bioraspoloživost i mogu da se daju per-os za razliku od proteinskih i peptidnih inhibitora.

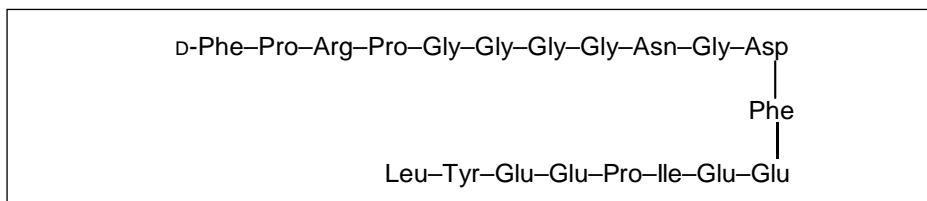


Slika 5 Shema vezivanja različitih aktivirajućih i dezaktivirajućih agenasa za trombin

Figure 5 The scheme of the binding the different activates and deactivates agents for thrombin

Kako je prikazano na slici utvrđeni su mehanizmi i aktivni centri vezivanja hirudina i njegovih derivata kao što su: rekombinantni antikoagulantni protein *lepirudin* i sinteski peptid *bivaluridin* koji pripada grupi bivalentnih inhibitora trombina (2).

Hirudin je direktni antikoagulantni protein izolovan iz salivarnih žlezdi medicinskih pijavica. Strukturno predstavlja polipeptid koji sadrži 65 amino kiselina, relativne molekulske mase oko 7000. Za razliku od drugih inhibitora trombina, aktivnost hirudina nije zavisna od drugih faktora koagulacije. *Desirudin* je derivat hirudina koji predstavlja *63-desulfohirudin* koji predstavlja izoformu hirudina, koja za razliku od hirudina ne sadrži sulfatnu grupu na Tirozinu koji je 63. aminokiselina u primarnoj strukturi peptida. Dobija se rekombinantnom DNK tehnologijom.



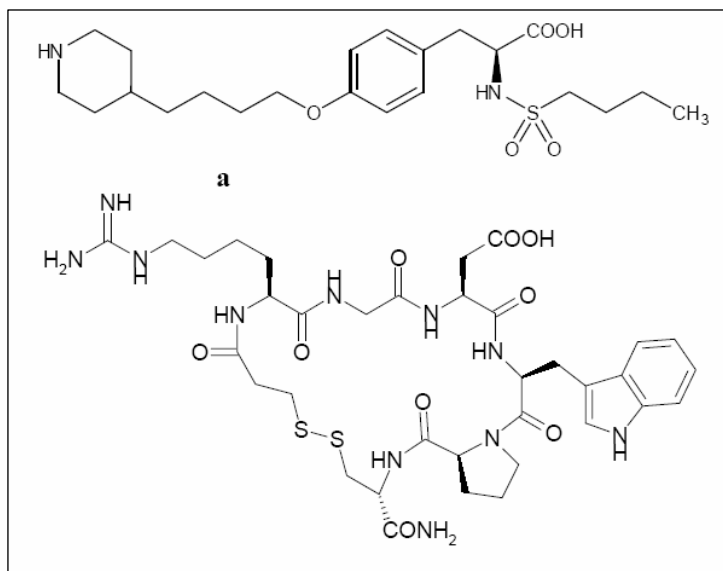
Slika 6 Hemijska struktura peptida Bivaluridina

Figure 6 The chemical structure of bivaluridin peptide

U primarnoj strukturi bivaluridina od 20 aminokiselina sadrži *D*-fenilalanin i tetrapeptidni fragment koji sadrži 4 ostatka glicina koji predstavlja mesto vezivanja peptida za trombin.

ANTAGONISTI FIBRONEGENA

Sintetski antagonisti agregacije trombocita **tirofiban**, **eptifibatid** i monoklonska antitela **abciximab**, zaustavljaju proces agregacije trombocita vezivanjem za specifični glikoproteinski receptor trombocita, označen kao GP IIb/IIIa-receptor, kojim u fiziološkim uslovima je receptor za endogeni fibrinogen. Hemijska struktura tirofibana je *N*-(butilsulfonyl)-*O*-[4-(4-piperidinil)butil]-*L*-tirozin. U terapiji nestabilne angine pectoris se koristi u obliku hidrohlorida.



Slika 7 Hemijska struktura tirofibana (a) i eptifibatida (b)

Figure 7 The chemical structure of tirofiban (a) and eptifibatide (b)

Eptifibatid hemijski predstavlja N^6 (aminoiminometil)- N^2 -(3-merkaptio-1-oksopropil)- L -lisilglicil- L - α -aspartil- L -triptofil- L -prolil- L -cisteinamid ciklični (1 \rightarrow 6)-disulfid je specifični antagonist glikoproteinskog receptora trombocita GP IIb/IIIa koji ima cikličnu heptapeptidnu strukturu. U strukturi sadrži disulfidni most koji je podložan cepanju pod uticajem nekih enzima (*barbourin* enzim zmijskog otrova nekih vrsta otrovnih zvečarki) ili promenom pH vrednosti sredine. Sadrži sekvencu aminokiselina *Lys-Gly-Asp* koja predstavlja modifikaciju tripeptida *Arg-Gly-Asp* koji je mesto prepoznavanja prema aktivnom centru proteina..

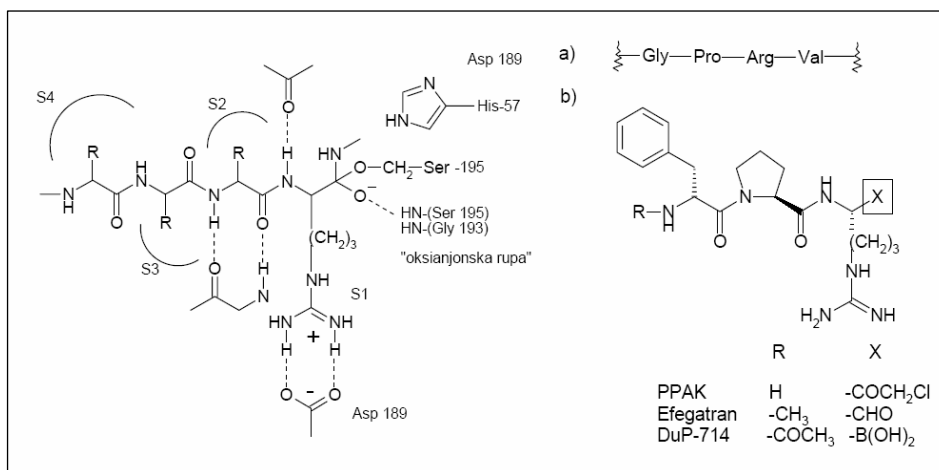
Monoklonsko antitelo **Abciximab** je anti-(human integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) imunoglobulin G1 Fab fragment. Fab fragment of himerično humanomišje antitelo c7E3 koje se direktno vezuje za humani agregacioni glikoproteinski GP IIb/IIIa receptor. Himerični fragment se sastoji od varijabilnog regiona **7E3** koji je modeliran sa konstantnim humanim Fab fragmentom i ima relativnu molekulsku masu oko 47600.

PEPTIDOMIMETICI INHIBITORI TROMBINA

Inhibicija aktivnosti trombina specifičnim agensima odnosno lekovima je značajan terapijski cilj u lečenju različitih oblika tromboza kao i komplikacija koje prouzrokuje ovo oboljenje (2). Pored paranteralnih preparata u poslednjih nekoliko godina vrše se intenzivna biofarmaceutska istraživanja sa osnovnim ciljem dobijanja efikasnih, peroralnih inhibitora trombina sa povoljnom bioraspoloživostu i selektivnošću, relativno male molekulske mase, koji su dizajnirani tako da ihibiraju prostetične grupe enzima (3) koji u trodimenzionalnoj strukturi sadrži nekoliko prostornih kompartmenta koji se označenih sa P1, P2 i P3 u kojima mogu da se vezuju razliliti ligandi (peptidomimetici).

Na slici 8 je predstavljen način vezivanja antagonista trombina. U aktivnom centru trombina koji sadrži izrazito bazne ostatake amino kiseline arginina, kao i preko peptidnih veza se grade vodonične veze sa parcijalno hidriranim heterobicikličnim strukturama ili izostera arginina koji ulaze u sastav malih molekula (peptidomimetika).

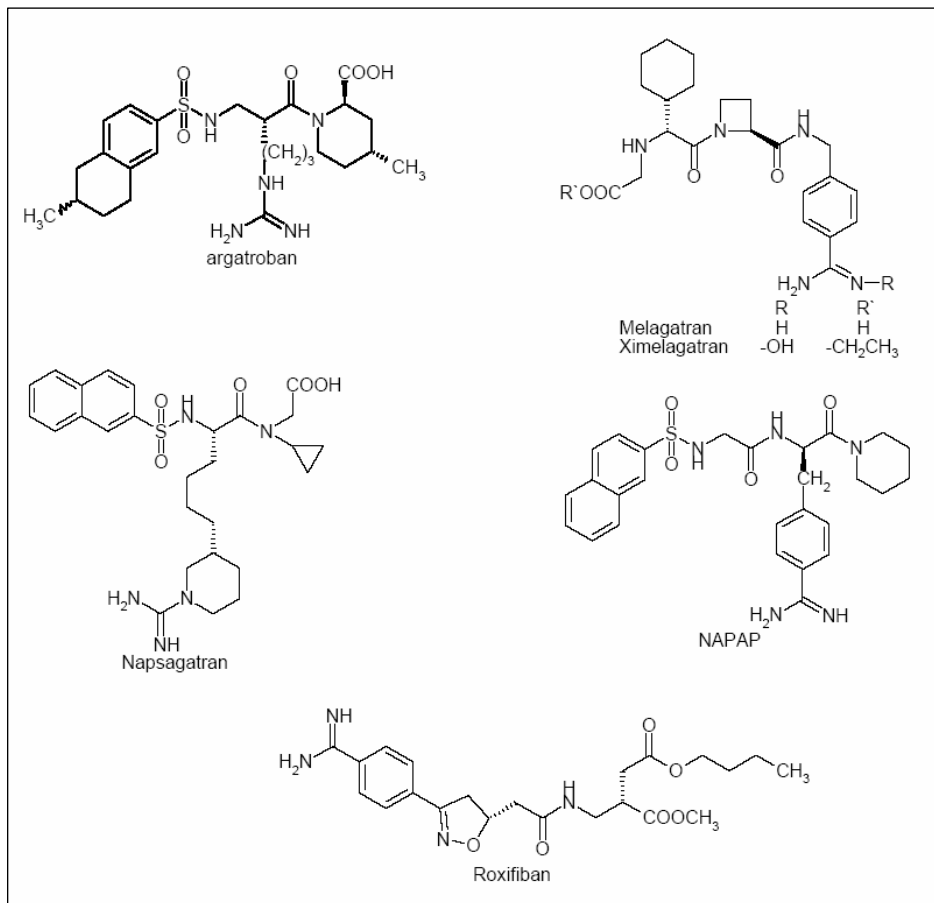
Trombin učestvuje u cepanju peptidne veze *-Arg-Val-* proteina Fibrinogena A (Slika 8)



Slika 8 Shematski prikaz vezivanja inhibitornih liganada trombina
Figure 8 The scheme of the binding inhibitory ligands of thrombin

Opšti pristup u strategiji dizajniranja tripeptidomimetičnih inhibitora trombina se sastoji u zameni pojedinih aminokiselina u tripeptidu *D-Phe-Pro-Arg* sa sa osnovnim ciljem da se očuva njihova mimetična aktivnost, i optimizuje aktivnost sa aspekta selektivnosti u kombinaciji sa aktivnošću u odnosu na poznate slične enzime iz grupe serinskih proteaza kao što je tripsin, koji zadržavaju aktivnost pri *per-os* uzimanju.

Reverzibilni inhibitori trombina kao što su *argatromban* i prodrug *ksimelagatran*, su razvijeni na obnovu osobine navedenih malih molekula da se vezuju za tripeptid *D-Phe-Pro-Arg*, koji su odgovorni za mimetičnu aktivnost odnosno imitiraju strukturni deo prirodnog supstrata *fibrinogena A* koji sadrži aminokiseline *-Gly - Pro - Arg - Val-*. PPAK je derivat ovog tripeptida koji se ireverzibilno vezuje za trombin i koristi se kao dijagnostički reagens u biohemijskim postupcima za određivanje trombina.



Slika 9 Sintetski peptidomimetički antagonisti trombina

Figure 9 Synthetics peptidomimethics thrombin's antagonists

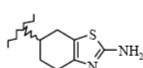
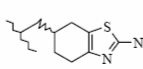
Argatroban je (2*R*,4*R*)-4-metil-1-[*N*2-(3-metil-1,2,3,4-tetrahidro-8-hinolinsulfonil)-*L*-arginil]-2-piperidinkarboksilna kiselina (*argipidin*) reverzibilno inaktivira trombin vezivanjem za region aktivnog centra trombina. Sintetisani su stereoizomeri argatrombana, pri čemu je utvrđeno da 2*R*, 4*R*-stereoizomer je najaktivniji. Biološko poluvreme eliminacije je od 39 do 51 min. U metaboličkim reakcijama se odvijaju reakcije hidroksilacije i aromatiozacije hinolinskog heterociklusa.

U strukturi peptidomimetika su prisutne izrazito bazne grupe: gvanidin koji ulazi u sastav arginina ili amidin. Navedena jedinjenja imaju amfoterne osobine, mogu da grade i cviterjonske strukture.

Iz literaturnih podataka (3,4,5) je evidentno da i sintetski derivati prolina koji su supstituisani delimitno hidriranim heterocikličnim sistemima imaju antagonističku aktivnost prema serinskim proteazama. Neki od njih pokazuju visoku selektivnost prema trombinu u odnosu na tripsin. Konstante inhibicije i stepen selktivnosti su prikazani u tabeli 1.

Tabela 1 Inhibitorna aktivnost i selektivnost nekih heterocikličnih derivata prolina

Table 1 The inhibition activity and selectivity of some heterocyclic derivatives of proline

Jedinjenje	R ⁴	R ³	R ²	R ¹	Ki (μM)			Selektivnost Trombin/ Tripsin
					Trombin	Tripsin	Fxa	
1	SO ₂ CH ₂ Ph	H	Ph		0.128	43.8	>75.4	342
2	SO ₂ CH ₂ Ph	H	Ph		0.370	39.9	65.4	108

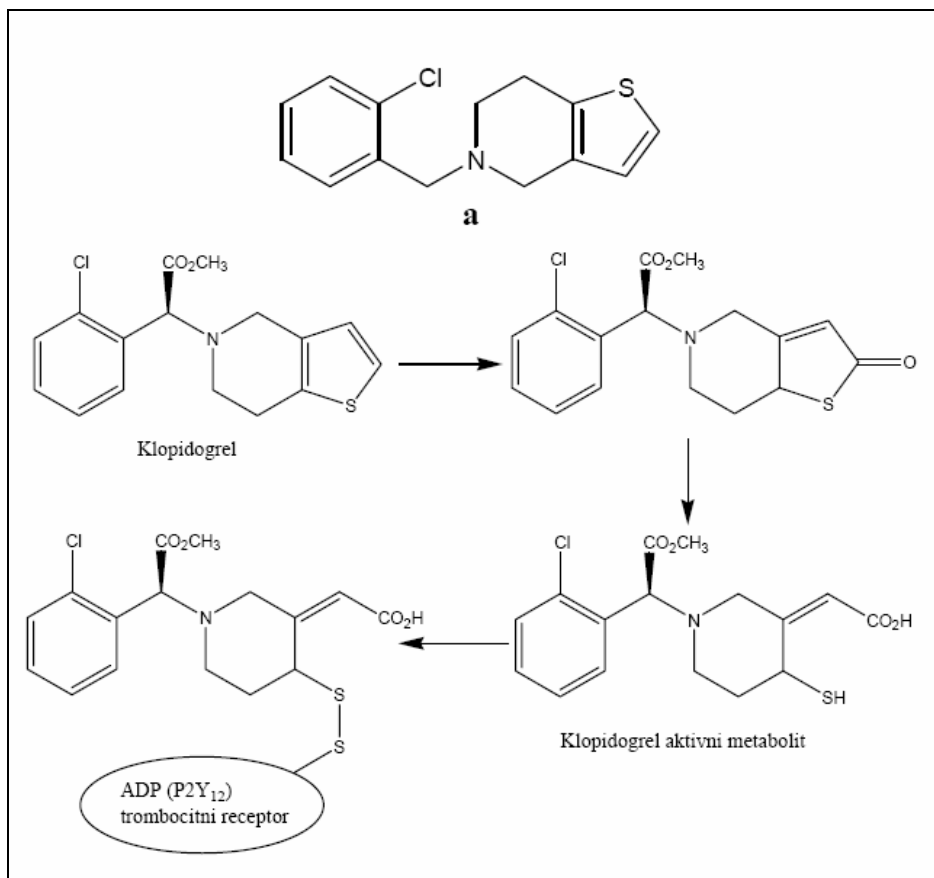
Inhibitorna aktivnost kao i mehanizam vezivanja za trombin jedinjenja **2** je određena rentgeno strukturnom analizom

INHIBITORI AGREGACIJE TROMBOCITA

Pored klasičnih inhibitora agregacije trombocita kao što je aspirin, dipiridamol i sulfpirazon, razvijeni su o drugi antiagregacijski lekovi kao što su *tiklopidin* i *klopidogrel*, derivati 4,5,6,7-tetrahidrotieno[3,2-*c*]piridina. koji inhibiraju pojedine receptore na membrani trombocita.

Tiklopidin hemijski predstavlja 5-[(2-hlorfenil)metil]-4,5,6,7-tetrahidrotieno[3,2-*c*]piridin, koristi se u terapiji u obliku soli hidrohlorida

Na slici 10 je predstavljena hemijska formula tiklopidina (**a**) i mehanizam metaboličke aktivacije klopidogrela koji je derivat tiklopidina, kao i način vezivanja aktivnog metabolita za P2Y₁₂ receptor trombocita



Slika 10 Mehanizam aktivacije tiklopidina (**a**) i klopidogrela
Figure 10 The mechanism of ticlopidine (**a**) and clopidogrel activation

ZAKLJUČAK

Heparin u savremenoj trombolitičnoj terapiji je zamenjen alteranativnim i pouzdanijim perenteralnim preparatima kao što su: *fondaparinuks*, *leperudin*, *bivalirudin* i *argatromban*. Ovi lekovi imaju niz terapijskih prednosti u odnosu na heparin kao što je povoljnije farmakinetičke osobine i veća terapijska bezbednost, čime se eliminiše ili smanjuje praćenje faktora koagulacije i potencijalni rizik od nastanka trombocitopenije. Novi sintetski proizvodi, male molekule (peptidomimetici) su direktni inhibitori trombina i FXa-faktora i u završnim su fazama kliničkih ispitivanja i predstavljaju značajan napredak u ovoj terapiji, pored oralnih antikaogulanasa, derivata varfarina.

THE CHEMISTRY OF NOVEL ANTITHROMBICS AND FIBRINOLYTICS

SOTE VLADIMIROV, DANICA AGBABA

*Institute of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis, Faculty of Pharmacy,
Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade*

Summary

Heparin is being replaced in many of its applications by currently available alternative parenteral agents such as *fondaparinux*, *leperudin*, *bivalirudin* and *argatromban*. These alternative agents offer advantages in terms of more predictable pharmacokinetics and improved safety, reducing or eliminating the need for patient monitoring and reducing or eliminating the risk of heparin induced thrombocytopenia. Orally bioavailable direct thrombin and FXa inhibitors now under development, seem poised to become available over the next years and will represent a viable alternative to both the parenteral anticoagulants and some currently available oral anticoagulants such as warfarin, fenprocumol and acenocumarol.

Literatura

1. Abraham D.J.: *Burger's medicinal Chemistry & Drug Discovery*, Vol.3, Cardiovascular Agenst and Endocrines, VIth Ed., John Wiley & Sons, Inc. 2003.
2. Dipiro T.J., Talbert L.R., Yee C.G., Matzke R.G., Wells G.B., Posey M.L., *Pharmacotherapy a pathophysiological Approach*, Vth Ed., McGraw-Hill, 2002
3. Eriksson, B. I.; Carlsson, S.; Halvarsson, M.; Risberg, B.; Mattsson, C. *Thromb. Haemostasis*, 78, (1997)404.
4. Gustaffson, D., Antonsson, T., Bylund, R.; Erik et al. *Thromb. Haemostasis* 79,(1998) 110.
5. Peterlin-Mašič L.; Jurca, A., Kikelj, D. et al. *Tetrahedron* 57(2001) 7073.