

УДК 615.011.4

АНТИАГРЕГАНТЫ НА ОСНОВЕ ФТОРФЕНИЛЗАМЕЩЕННЫХ 2-ИЗОКСАЗОЛИН-5-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ

Ковганко Н. Н., Пархач М. Е., Борисевич С. Н., Глинник С. В., Принькова Т. Ю.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Изучена антиагрегантная активность синтезированных фторфенилзамещенных 2-изоксазолин-5-карбонových кислот и их производных. Все соединения проявили способность к подавлению агрегационной способности тромбоцитов. Увеличение концентрации активного вещества с 5 до 10 мкмоль/л привело к возрастанию ингибирующей силы эфферторов. Метилловые эфиры в сравнении с производными со свободной карбоксильной группой проявили более сильную способность к подавлению перехода тромбоцитарных рецепторов GPIIb/IIIa в активное состояние, в котором они способны связываться с фибриногеном и, соответственно, в дальнейшем подвергаться агрегации.

Ключевые слова: антиагреганты, гетероцикл, 2-изоксазолин, тромбоциты.

Введение. Тромбоциты играют важную роль в предотвращении кровопотери в ответ на травму, но они также ответственны за образование патогенных тромбов, вызывающих острые проявления сосудистых атеротромботических заболеваний, таких как острые коронарные синдромы, нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда, ишемическая атака и симптоматическое заболевание периферических артерий [1]. Активация тромбоцитов имеет решающее значение для гемостаза и развития патологического тромбоза и может быть опосредована несколькими путями (агонисты: арахидоновая кислота, аденозиндифосфат (АДФ), фактор активации тромбоцитов, тромбин, тромбоксан A₂, коллаген и др.) [2].

В последние годы было показано, что тромбоциты участвуют не только в артериальном тромботическом процессе, но и играют активную роль в воспалительном процессе (растворимый лиганд CD40 (sCD40L), RANTES и растворимый P-селектин (sP-селектин)) атерогенеза в начале и в прогрессировании заболевания [3]. Более того, после разрыва атероматозной бляшки происходит адгезия тромбоцитов к стенке сосуда, высвобождается содержимое гранул тромбоцитов с последующей их агрегацией и образованием тромбов [4]. Эта активация представляет собой динамический процесс, который может привести к периодическому или постоянному затруднению кровотока, что

вызывает ишемическое повреждение тканей и дисфункции органов [5].

Ацетилсалициловая кислота была препаратом выбора для длительного лечения гиперактивности тромбоцитов, особенно для снижения риска серьезных ишемических событий при некоторых сердечно-сосудистых заболеваниях, включая инсульт, инфаркт миокарда, нестабильную стенокардию, и после операции аортокоронарного шунтирования. Однако использование данного лекарственного средства ограничено формированием устойчивости и рядом побочных эффектов, таких как желудочное кровотечение. Клопидогрел и тиклопидин также имеют значительные ограничения по механизму действия и эффективности. Таким образом, поиск более мощных и безопасных «неаспириновых» ингибиторов агрегации тромбоцитов является актуальной и практически значимой задачей. Многие соединения, полученные из природных источников различного происхождения, ранее были выделены, охарактеризованы и оценены как антиагреганты, например фенольные соединения, выделенные из формозских болотных растений, оксигенированные ксантоны, выделенные из зверобоя геминифлорума, дитерпены, выделенные из морских бурых водорослей, и алкалоиды разнообразного химического строения, проявляющие мощную антиагрегантную активность. Также были предприняты попытки синтезировать антиагреганты с высокой активностью, например замещенные

аналоги пиперазина, 1,4-дигидропиридины, связанные с 1,2-бензизотиазол-3-онами. Было установлено, что эти соединения в опыте *in vivo* на мышах ингибируют агрегацию тромбоцитов, индуцированную коллагеном в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП), и, как следствие, защищают животных от экспериментального тромбоза. Ряд пирроло[3,2-с]пиридинов, изостеров антитромботического препарата тиклопидина, был синтезирован и оценен *in vitro* на способность ингибировать агрегацию ОТП человека, индуцированную АДФ. Ранее было описана антитромботическая активность соединений, содержащих изоксазолный фрагмент [6]. Антиагрегантная активность меченого производного изоксазола обусловлена антагонистическим механизмом гликопротеина IIb/IIIa. Производные изоксазола проявили высокую антиагрегантную активность в опытах *in vivo* на собаках. Соединения с изоксазолным фрагментом были синтезированы с использованием реакции Бейлиса–Хиллмана, оценена их антитромботическая активность *in vitro* и установлен механизм действия. Также описана антитромботическая эффективность изоксазолинов и изоксазолов как ингибиторов фактора Ха, который катализирует выработку тромбина из протромбина и находится на стыке внутреннего и внешнего путей каскада свертывания крови. Эти и другие данные продемонстрировали эффективность изоксазолного кольца в антиагрегантной активности.

Цель работы – изучить способность синтезированных фторфенилзамещенных 2-изоксазолин-5-карбоновых кислот и их производных ингибировать АДФ-зависимую агрегацию тромбоцитов.

Материалы и методы. ИК-спектры записаны в растворах на приборе Specord 75 IR. УФ-спектры растворов получены на приборе Specord M40. Спектры ЯМР растворов записаны на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 400 (400 МГц). Химические сдвиги приведены в шкале δ , внутренний стандарт тетраметилсилан, растворитель CDCl_3 . Контроль за ходом реакций и индивидуальностью полученных соединений осуществлялся методом ТСХ на пластинках Silufol UV-254.

Целевые соединения 1-6 получены по следующему методу: оксим (10 ммоль) в дихлорметане (20 мл) при 0 °С по каплям добавляли к смеси акриловой кислоты (или метилакрилата) (10 ммоль), 1,5 мл триэтиламина (11 ммоль) и 5%-ного водного раствора

гипохлорита натрия (20 мл). После перемешивания в течение 60 минут в ледяной воде смесь экстрагировали дихлорметаном (3–15 мл) и отделяли водный слой. Органические экстракты объединили, высушили над сульфатом натрия и растворитель отогнали при пониженном давлении. Полученное твердое вещество перекристаллизовывали из пропан-2-ола.

1. 3-(2-Фторфенил)-2-изоксазолин карбоновая кислота. Выход 83 %. $T_{\text{пл.}}$ 181–183 °С. ИК спектр (KBr, cm^{-1}): 3100, 3093 (C–H_{аром.}), 1807, 1260 (COO), 1649 (C=N), 1600, 1508 (C=C_{аром.}). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 277. $^1\text{H NMR}$: δ 2,96 (2H, dd, $J=15,5, 7,4$ Hz), 5,31 (1H, dd, $J=7,9, 6,8$ Hz), 7,14–7,35 (2H, 7,20 (ddd, $J=8,3, 1,1, 0,5$ Hz), 7,28 (ddd, $J=7,9, 7,3, 1,1$ Hz)), 7,43–7,59 (2H, 7,49 (ddd, $J=7,9, 1,5, 0,5$ Hz), 7,52 (ddd, $J=8,3, 7,3, 1,5$ Hz)). $^{13}\text{C NMR}$: δ 41,8 (1C, s), 81,2 (1C, s), 115,5 (1C, s), 126,7 (1C, s), 128,4 (1C, s), 129,3 (1C, s), 131,3 (1C, s), 155,5 (1C, s), 159,7 (1C, s), 175,2 (1C, s).

2. 3-(3-Фторфенил)-2-изоксазолин карбоновая кислота. Выход 85 %. $T_{\text{пл.}}$ 191–193 °С. ИК-спектр (KBr, cm^{-1}): 3095, 3085 (C–H_{аром.}), 1805, 1265 (COO), 1651 (C=N), 1605, 1510 (C=C_{аром.}). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 275. $^1\text{H NMR}$: δ 2,79 = 3,04 (2H, 2,87 (dd, $J=15,5, 6,8$ Hz), 2,96 (dd, $J=15,5, 7,9$ Hz)), 5,26 (1H, dd, $J=7,9, 6,8$ Hz), 7,04 = 7,27 (2H, 7,10 (ddd, $J=8,1, 1,4, 1,2$ Hz), 7,22 (ddd, $J=1,7, 1,4, 0,5$ Hz)), 7,45 (1H, ddd, $J=8,1, 7,7, 0,5$ Hz), 7,65 (1H, ddd, $J=7,7, 1,7, 1,2$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$: δ 41,8 (1C, s), 81,2 (1C, s), 115,0 = 115,1 (2C, 115,0 (s), 115,1 (s)), 127,3 (1C, s), 130,2 (1C, s), 132,1 (1C, s), 155,7 (1C, s), 161,2 (1C, s), 175,2 (1C, s).

3. 3-(4-Фторфенил)-2-изоксазолин карбоновая кислота. Выход 82 %. $T_{\text{пл.}}$ 217–219 °С. ИК-спектр (KBr, cm^{-1}): 3105, 3085 (C–H_{аром.}), 1800, 1255 (COO), 1645 (C=N), 1605, 1515 (C=C_{аром.}). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 272. $^1\text{H NMR}$: δ 2,94 (2H, dd, $J=15,5, 7,4$ Hz), 5,30 (1H, dd, $J=7,9, 6,8$ Hz), 7,04 (2H, ddd, $J=8,7, 1,0, 0,6$ Hz), 7,93 (2H, ddd, $J=8,7, 1,6, 0,6$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$: δ 41,8 (1C, s), 81,2 (1C, s), 115,4 (2C, s), 125,3 (1C, s), 128,6 (2C, s), 155,7 (1C, s), 162,5 (1C, s), 175,2 (1C, s).

4. Метилловый эфир 3-(2-фторфенил)-2-изоксазолинкарбоновой кислоты. Выход 87 %. $T_{\text{пл.}}$ 158–160 °С. ИК спектр (KBr, cm^{-1}): 3110, 3090 (C–H_{аром.}), 1798, 1271 (COO), 1653 (C=N), 1603, 1504 (C=C_{аром.}). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 275. $^1\text{H NMR}$: δ 2,97 (2H, dd, $J=15,5, 7,4$ Hz), 3,75 (3H, s), 5,29 (1H, dd, $J=7,9, 6,8$ Hz), 7,14–7,35 (2H, 7,20 (ddd, $J=8,3, 1,1, 0,5$ Hz), 7,28 (ddd, $J=7,9, 7,3, 1,1$ Hz)), 7,52 (1H, ddd, $J=8,3, 7,3, 1,5$ Hz), 7,72 (1H, ddd, $J=7,9, 1,5, 0,5$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$: δ 41,8 (1C, s), 52,2 (1C, s), 77,8 (1C, s), 115,5 (1C, s), 126,7 (1C,

s), 128,4 (1C, s), 129,3 (1C, s), 131,3 (1C, s), 155,5 (1C, s), 159,7 (1C, s), 170,2 (1C, s).

5. Метилловый эфир 3-(3-фторфенил)-2-изоксазолинкарбоновой кислоты. Выход 86 %. $T_{пл}$. 165–167 °C. ИК-спектр (KBr, cm^{-1}): 3107, 3096 (C–H_{аром.}), 1802, 1263 (COO), 1653 (C=N), 1607, 1509 (C=C_{аром.}). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 273. ¹H NMR: δ 2,92 (2H, dd, J=15,5, 7,4 Hz), 3,75 (3H, s), 5,28 (1H, dd, J=7,9, 6,8 Hz), 7,04–7,27 (2H, 7,10 (ddd, J=8,1, 1,4, 1,2 Hz), 7,22 (ddd, J=1,7, 1,4, 0,5 Hz)), 7,45 (1H, ddd, J=8,1, 7,7, 0,5 Hz), 7,64 (1H, ddd, J=7,7, 1,7, 1,2 Hz). ¹³C NMR: δ 41,8 (1C, s), 52,2 (1C, s), 77,8 (1C, s), 115,0–115,1 (2C, 115,0 (s), 115,1 (s)), 127,3 (1C, s), 130,2 (1C, s), 132,1 (1C, s), 155,7 (1C, s), 161,2 (1C, s), 170,2 (1C, s).

6. Метилловый эфир 3-(4-фторфенил)-2-изоксазолинкарбоновой кислоты. Выход 84 %. $T_{пл}$. 171–173 °C. ИК-спектр (KBr, cm^{-1}): 3101, 3092 (C–H_{аром.}), 1806, 1263 (COO), 1651 (C=N), 1603, 1507 (C=C_{аром.}). УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 271. ¹H NMR: δ 2,94 (2H, dd, J=15,5, 7,4 Hz), 3,75 (3H, s), 5,27 (1H, dd, J=7,9, 6,8 Hz), 7,04 (2H, ddd, J=8,7, 1,0, 0,6 Hz), 7,93 (2H, ddd, J=8,7, 1,6, 0,6 Hz). ¹³C NMR: δ 41,8 (1C, s), 52,2 (1C, s), 77,8 (1C, s), 115,4 (2C, s), 125,3 (1C, s), 128,6 (2C, s), 155,7 (1C, s), 162,5 (1C, s), 170,2 (1C, s).

Исследование способности ингибировать агрегацию тромбоцитов осуществляли методом проточной цитометрии [7]. Для этого в 100 мкл плазмы, обогащенной тромбоцитами, вносили раствор АДФ (конечная концентрация 12 мкмоль/л) и соответствующее синтезированное вещество в 10 мкл ДМСО (конечная концентрация 5 и 10 мкмоль/л соответственно). В качестве образца для сравнения использовали плазму, в которую вносили 10 мкл ДМСО без эффектора. Активация тромбоцитов добавлением АДФ приводит к изменению конформации мембранных рецепторов GPIIa/IIIb, ответственных за дальнейшую агрегацию. Образцы ОТП с внесенными эффекторами выдерживали 15 минут при комнатной температуре, потом добавляли раствор меченых антител (CD 41a-FITC и CD61-PE). Дальнейший анализ поверхностных маркеров тромбоцитов GPIIa (CD41a) и GPIIb (CD61) проводили с помощью проточного цитофлюориметра Perlong FC2060 (Perlong Medical Equipment, КНР). В качестве образца для контроля способности тромбоцитов к агрегации использовался метилловый эфир (+)-(S)-альфа-(о-хлорфенил)-6,7-дигидротиено[3.2-

с]пиридин-5(4H)-уксусной кислоты (клопидогрел), используемый в настоящее время как антиагрегант (конечная концентрация 5 и 10 мкмоль/л соответственно).

Результаты и их обсуждение. Все изученные соединения проявили способность к подавлению агрегационной способности тромбоцитов (таблица 1). Увеличение концентрации вещества с 5 до 10 мкмоль/л привело к возрастанию ингибирующей силы эффекторов.

Таблица 1 – Ингибирование агрегационной способности тромбоцитов

Эффектор	Ингибирование агрегации в зависимости от концентрации вещества, %	
	5 мкмоль/л	10 мкмоль/л
1	25	31
2	27	33
3	21	29
4	37	43
5	39	46
6	31	38
Клопидогрел	67	77

Следует отметить, что метилловые эфиры в сравнении с веществами со свободной карбоксильной группой проявили более сильную способность к подавлению перехода тромбоцитарных рецепторов GPIIa/IIIb в активное состояние, в котором они далее способны связываться с фибриногеном и, соответственно, подвергаться агрегации. Сравнение с используемым в настоящее время антиагрегантом клопидогрелем указывает на необходимость дальнейшего поиска новых соединений, что может выразиться в модификации ароматического заместителя в структуре новых веществ.

Закключение. Установлено, что 3-арил-2-изоксазолин-5-карбоновые кислоты и их метилловые эфиры, содержащие один атом фтора в арильном фрагменте, проявляют способность к подавлению активации тромбоцитарных рецепторов GPIIa/IIIb.

Это открывает перспективы использования изученных соединений в качестве синтетических фрагментов при дизайне структуры и синтезе новых антиагрегантов.

Список цитированных источников

1. Mechanisms of platelet activation: Need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis / L. Jennings [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2009. – Vol. 102, N 3. – P. 248–257.
2. Platelet thrombin receptor antagonism and atherothrombosis / D. Angiolillo [et al.] // Eur. Heart J. – 2010. – Vol. 31, N 5. – P. 17–28.
3. Role of platelets as mediators that link inflammation and thrombosis in atherosclerosis / Q. E. Fuentes [et al.] // Platelets. – 2012. – Vol. 6, N 7. – P. 1–8.
4. Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis / J. F. Viillard [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 99, N 5. – P. 2612–2614.
5. Mechanisms initiating platelet thrombus formation / Z. M. Ruggeri [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 1997. – Vol. 78, N 9. – P. 611–616.
6. Synthesis and antiplatelet effects of an isoxazole series of glycoprotein IIb/IIIa antagonist / C. B. Xue [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 1998. – Vol. 15, N 12. – P. 3499–3504.
7. Measurement of platelet aggregation, independently of patient platelet count: a flow-cytometric approach / P. J. Vinholt [et al.] // J. Thromb. Haemost. – 2017. – Vol. 15, N 6. – P. 1191–1202.

**Antiaggregants based on fluorophenyl substituted
2-isoxazoline-5-carboxylic acids and their derivatives**

*Kauhanka M. M., Parkhach M. E., Borisevich S. N., Glinnik S. V., Prinkova T. Yu.
Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

The antiplatelet activity of synthesized fluorophenyl-substituted 2-isoxazoline-5-carboxylic acids and their derivatives has been studied. All compounds have demonstrated the ability to suppress platelet aggregation. Increasing the concentration of the active substance from 5 to 10 $\mu\text{mol/l}$ increases the inhibitory strength of the effectors. Methyl esters compared to carboxylic acids demonstrated the stronger ability to suppress the transition of platelet receptors GPIIa/IIIb to an active state, in which they are then able to bind to fibrinogen and, accordingly, further undergo aggregation.

Keywords: antiplatelet agent, 2-isoxazoline, heterocycle, platelet.

Поступила 05.06.2024