

УДК 577.32'17.012:543.422.25

**А. А. Крысько, Б. М. Чугунов, С. А. Андронати, Т. А. Кабанова,
И. М. Ракипов, А. В. Мазепа**Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины
65080, Одесса, Люстдорфская дорога, 86**СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ RGDF МИМЕТИКОВ НА ОСНОВЕ
4-(ИЗОИНДОЛИН-5-ИЛ)АМИНО-4-ОКСОБУТАНОВОЙ КИСЛОТЫ,
ОБЛАДАЮЩИХ АНТИАГРЕГАЦИОННОЙ АКТИВНОСТЬЮ
ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ**

Изучение антиагрегационной активности показало, что полученные соединения проявляют пероральную активность в опытах *ex vivo* на мышах с использованием богатой тромбоцитами плазмы крови человека.

Ключевые слова: RGDF миметик, агрегация тромбоцитов, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ ^{1*}.

Заболевания сердечно-сосудистой системы занимают существенное место в клинике внутренних заболеваний. Достаточно часто причиной таких заболеваний является расстройство системы гемостаза. Процесс тромбообразования считается на сегодняшний день одной из основных причин инфаркта миокарда, инсульта, он является ответственным за развитие периферической артериальной ишемии и паралича [1]. Основной причиной снижения кровотока в сосудах является образование тромбов благодаря стенозу и повреждению сосудов.

Для профилактики лечения тромбозов применяют антикоагулянты, фибринолитики и антиагреганты. Наибольший интерес среди антиагрегантов привлекают антагонисты фибриногеновых рецепторов. Фибриногеновые рецепторы (GP IIb/IIIa или $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$) представляют собой гликопротеиновые комплексы, относящиеся к группе интегринов. Образование супрамолекулярных комплексов фибриноген — интегрин $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ приводит к агрегации тромбоцитов, образованию тромбоцитарных тромбов. Ответственной за связывание фибриногена с его рецептором является RGD (Arg-Gly-Asp) последовательность. К антагонистам $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$, препятствующим этому процессу, относят некоторые моноклональные антитела, RGDF или RGDS содержащие пептиды, RGD миметики. RGDF миметики вызывают большой интерес исследователей как перспективные и доступные синтетически антагонисты $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$. Дизайн RGDF миметиков базируется на биоизостерной замене компонентов RGDF последовательности различными фрагментами — миметиками этих компонентов. В обзорах [2, 3] описаны принципы дизайна молекул антагонистов $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ и использованные при этом заменители фрагментов RGDF последовательности. Некоторые из $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ антагонистов применяются в клинике.

* Сокращения: БТП — богатая тромбоцитами плазма, FAB — fast atom bombardment, FITC-Fg — меченный флуоресцеинизотиоцианатом фибриноген.

Ранее нами на основе 4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутановой кислоты, моделирующей остаток Arg-Gly, синтезированы линейные миметики (I, II) (Рисунок). Asp-Phe участок заменён остатками β-аланина или β-фенил-β-аланина. Миметики (I, II) проявили высокую антиагрегационную активность в опытах *in vitro* и аффинитет к $\alpha_{IIb}\beta_3$ на суспензии отмытых тромбоцитов человека [4].

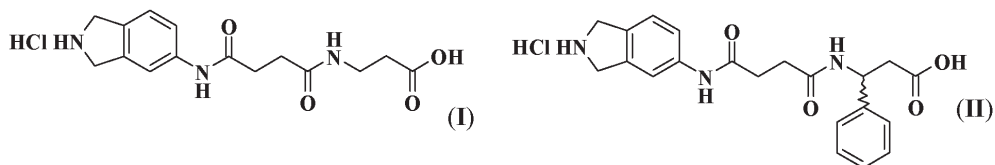


Рис. Структуры RGDf миметиков (I) и (II) на 4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутановой кислоты

Однако относительно низкая биодоступность RGD миметиков при пероральном применении затрудняет их широкое применение в клинической практике для профилактики и лечения хронических тромбозов. Хотя на проявление эффекта лекарства при пероральном введении влияют различные факторы, основной причиной низкой пероральной активности RGD пептидов и их миметиков является их ограниченное проникновение через биомембраны из-за наличия заряженных группировок и высокой полярности. Вторым, не менее важным фактором, снижающим биодоступность некоторых RGD пептидов и RGD миметиков, является метаболическая лабильность в присутствии протеаз и пептидаз. Наиболее простой подход к получению пролекарств основан на “маскировании” нежелательных физико-химических характеристик (заряд, полярность) концевых функциональных групп молекулы. Одним из наиболее распространенных методов создания перорально активных RGD миметиков, является превращение карбоксильной группы в сложноэфирную [3, 5].

Целью настоящего исследования является получение RGDf миметиков — производных 4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутановой кислоты, обладающих антиагрегационной активностью при пероральном введении.

В качестве исходного соединения для построения целевых продуктов мы использовали 5-нитроизоиндолин (III) (Схема). Блокирование аминогруппы 5-нитроизоиндолина (III), восстановление в полученном N-Вос-5-нитроизоиндолине (IV) нитрогруппы и последующие ацилирование янтарным ангидридом, приводило к 4-(N-Вос-изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутановой кислоте (V) [4]. Активацию кислоты V проводили при помощи *изо*-бутилхлорформиата. Конденсация смешанного ангидрида с натриевыми солями или этиловыми эфирами β-аминокислот приводила к Вос-производным (VI — XI). На последней стадии удаляли Вос-защиту и получали целевые соединения (I, II, XII — XV). RGDf миметики (I, II, XII) были получены по ранее описанному методу [6].

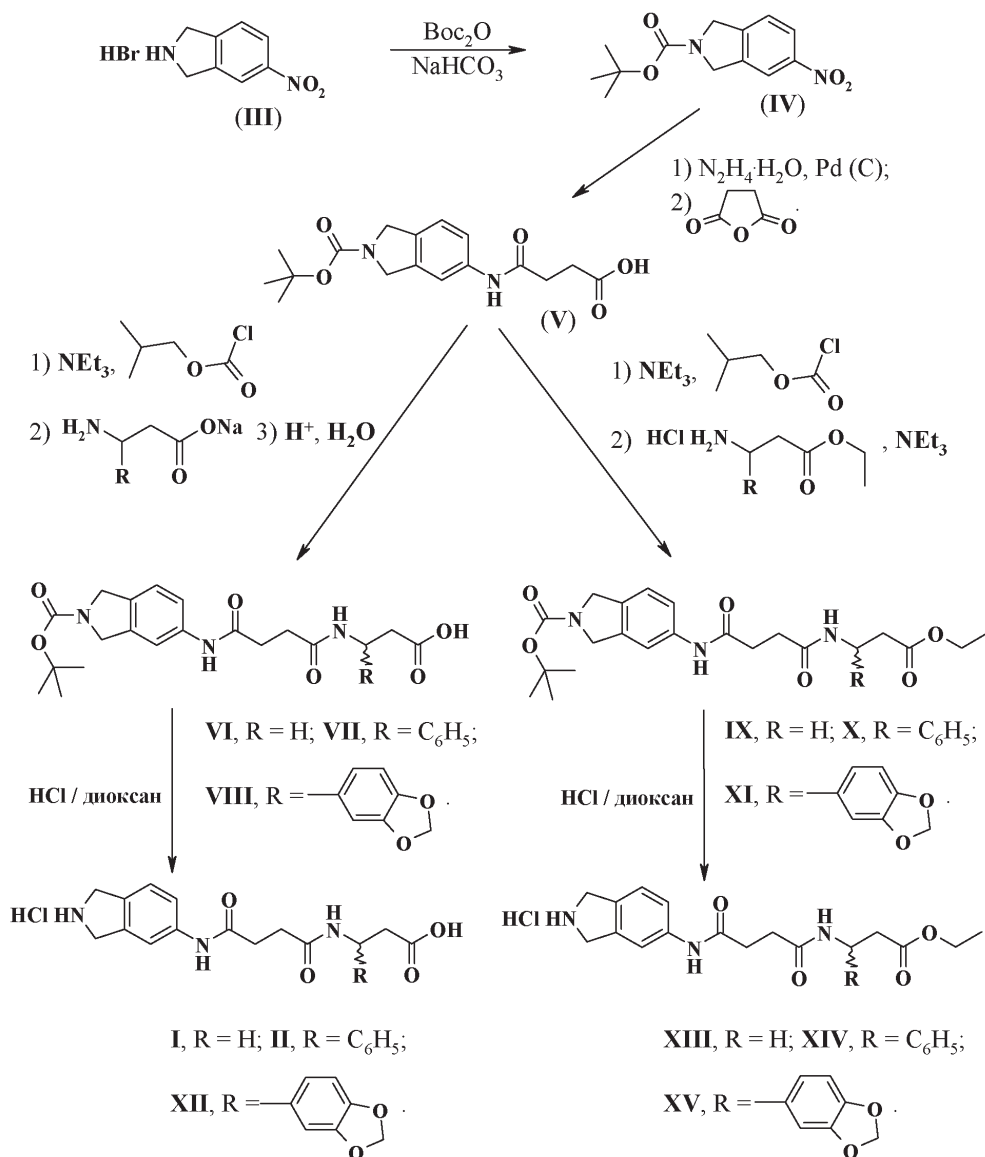


Схема. Синтез целевых соединений

Использование “временной” защиты на аминокомпонентах, при построении скелета RGDF миметиков (**I**, **II**, **XII**), позволяет сократить одну стадию, по сравнению с ранее описанной нами схемой синтеза [4], а также получить продукты с высокими выходами и высокой степенью чистоты, без применения хроматографической очистки.

Структура полученных соединений была подтверждена с помощью методов масс-спектрометрии и спектроскопии ¹H-ЯМР. В спектрах ¹H-ЯМР

полученных соединений присутствовали все характерные сигналы протонов с соответствующими интегральными интенсивностями.

Полученные соединения (I, II, XII — XV) являются химически стабильными веществами при нормальных условиях. Производные (I, II, XII — XV) имеют высокую растворимость в воде, что важно для *in vitro* и *ex vivo* исследований [7].

Целевые пролекарства (XIII — XV) проявили высокую антиагрегационную активность в опытах *ex vivo* (Таблица). Введение фенила в β -положение остатка β -аланина [соединение (XIV)] привело к увеличению антиагрегационной активности, при пероральном введении в два раза по сравнению с незамещенным производным (XIII). Использование фрагмента β -(3,4-метилendioкси)фенил- β -аланина в качестве Asp-Phe-суррогата, соединение (XV), привело к двукратному повышению активности по сравнению с пролекарством (XIV). Динамика изменения показателей ID_{50} для соединений (XIII — XV), аналогична изменению показателей IC_{50} для миметиков (I, II, XII) (Таблица). Так антиагрегационная активность в опытах *in vitro* на богатой тромбоцитами плазме (БТП) крови человека и аффинитет к $\alpha_{IIb}\beta_3$ производного (II) примерно в два раза выше, чем для миметика (I). Производное β -(3,4-метилendioкси)фенил- β -аланина (XII) отличается высокой антиагрегационной активностью и аффинитетом к фибриногеновым рецепторам. Значение IC_{50} для антиагрегационной активности миметика (XII) показателя миметика (II) в 27 раз, а показатель IC_{50} для ингибирования связывания FITC-Fg с $\alpha_{IIb}\beta_3$ для соединения (XII) в 37 раз выше, чем для производного (II).

Таблица

Свойства производных 4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутановой кислоты

Соединение	Антиагрегационная активность в опытах <i>in vitro</i> на БТП крови человека, IC_{50} , мкМ	Ингибирование связывания FITC-Fg с $\alpha_{IIb}\beta_3$ на поверхности активированных тромбоцитов человека, IC_{50} , мкМ	Антиагрегационная активность в опытах <i>ex vivo</i> , ID_{50} , мг/кг
I	2.760 ± 0.370	0.01400 ± 0.00210	NT
II	0.860 ± 0.120	0.00830 ± 0.00137	NT
XII	0.031 ± 0.006	0.00022 ± 0.00004	NT
XIII	NT	NT	3.70 ± 0.82
XIV	NT	NT	1.56 ± 0.45
XV	NT	NT	0.81 ± 0.23

Полученные экспериментальные данные по антиагрегационной активности в опытах *ex vivo* позволяют рассматривать новые пролекарства на основе 4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксо-бутановой кислоты как перорально доступные и эффективные ингибиторы агрегации тромбоцитов, биологический эффект которых обусловлен их биотрансформацией с образованием активных метаболитов, RGDF миметиков являющиеся антагонистами $\alpha_{IIb}\beta_3$ рецепторов.

Экспериментальная часть

Спектры ^1H -ЯМР записаны в растворах $\text{DMSO-}d_6$ (99.9%) на приборе Varian WXP-300 (Varian, Германия), с рабочей частотой 299.95 МГц, внутренний стандарт — тетраметилсилан, при температуре 25 °С. Масс-спектры FAB записаны на приборе VG 7070 (VG, Великобритания) с использованием глицериновой матрицы, ионизация осуществлялась пучком атомов Хе с энергией 8 кВ. ТСХ осуществляли на пластинках Silufol (Kavalier, Чехия) и Kieselgel 60 (Merck, Германия) в следующих системах растворителей: бензол-ацетон-уксусная кислота, 100:50:1 (А); метанол- NH_4OH , 4:1 (Б); хлороформ-этилацетат-метанол, 9:3:2 (В); хлороформ-этилацетат-метанол-уксусная кислота, 9:3:2:1 (Г). Проявление хроматограмм осуществляли с помощью нингидринового и хлор-толуидинового реактивов.

N-трет-Бутилоксикарбонил-5-нитро-изоиндолин (IV). 1 г (4.08 ммоль) гидробромида 5-нитро-изоиндолина суспендировали в 10 мл 5 % раствора Na_2CO_3 . К полученной суспензии добавляли раствор 0.873 г (4 ммоль) ди-трет-бутоксипирокарбоната, растворенного в 30 мл хлороформа. Реакционную смесь перемешивали 5 ч при комнатной температуре. Затем к реакционной смеси добавляли 50 мл хлороформа. Органический слой отделяли. Водный слой промывали (2 × 50 мл) хлороформом. Объединенные органические вытяжки последовательно промывали 50 мл 1 М раствора HCl и 50 мл воды. Органический слой сушили безводным Na_2SO_4 . Сушитель отфильтровывали, а растворитель упаривали на роторном испарителе. Полученный маслообразный остаток перекристаллизовывали из 20 мл гексана. Выход 1.01 г (94 %), $R_f = 0.61$ (А), т.пл. 159–162 °С. Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMSO-}d_6$), δ , м.д.: 1.47 с (9 H), 4.67 с (4 H), 7.59 дд (1 H, J 2.5 Hz, J 8.4 Hz), 8.18 дд (1 H, J 1.9 Hz, J 8.4 Hz), 8.23 с (1 H). Масс-спектр (FAB), $[M+H]$ 265.

4-(N-Вос-изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутановая кислота (V). Растворили 5 г (18.9 ммоль) соединения IV в 50 мл диоксана и добавляли 0.3 г 3 % Pd на угле. Затем к полученной суспензии при 60 °С по каплям прибавляли 9.4 мл (18.9 ммоль) 50 % раствора гидразингидрата, реакционную смесь перемешивали при той же температуре до прекращения выделения газа. Затем растворитель упаривали в вакууме. Маслянистый остаток сушили 3 ч при температуре 60 °С и давлении 3 мм рт. ст. После этого остаток растворяли в 50 мл хлороформа. К полученному раствору прибавляли раствор 1.96 г (18.9 ммоль) янтарного ангидрида в 30 мл хлороформа. Полученный раствор кипятили 30 мин. Затем оставляли на 6 ч при комнатной температуре. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали 30 мл хлороформа. Осадок сушили при температуре 60 °С. Выход 4.45 г (72%), $R_f = 0.6$ (В), т.пл. 205–207 °С. Спектр ЯМР ^1H ($\text{DMSO-}d_6$), δ , м.д.: 1.49 с (9 H), 2.62–2.70 м (4 H), 4.58 дд (4 H, J 5.9 Hz, J 10.0 Hz), 7.26 дд (1 H, J 4.8 Hz, J 9.1 Hz), 7.53 д (1 H, J 9.1 Hz), 7.75 д (1 H, J 9.1 Hz), 10.12 с (1 H). Масс-спектр (FAB), $[M+H]$ 335.

N-[4-(N-Вос-изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]- β -аланин (VI). К охлажденному до –10 °С раствору 0.50 г (1.5 ммоль) соединения V в 5 мл

ДМФА прибавляли 0.21 мл (1.5 ммоль) триэтиламина, затем 0.2 мл (1.5 ммоль) *изо*-бутилхлороформиата. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем прибавляли 0.19 г (1.7 ммоль) натриевой соли β -аланина. Смесь перемешивали 30 мин при $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем ещё 2 ч при комнатной температуре. По окончании реакции реакцию смесь разбавляли водой, подкисляли 1 М раствором HCl до кислой реакции, продукт реакции экстрагировали хлороформом (3 \times 50 мл). Объединенные органические вытяжки промывали водой (30 мл) и сушили безводным Na_2SO_4 . Хлороформ отгоняли на роторном испарителе, маслянистый остаток растирали с эфиром. Выход 0.49 г (82%), R_f 0.70 (Г), т.пл. 142–148 $^{\circ}\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (DMFA- d_7), δ , м.д.: 1.49 с (9 H), 2.47–2.56 м (4 H), 2.67 т (2 H, J 6.8 Гц), 3.40 к (2 H, J 6.8 Гц), 4.58 дд (4 H, J 6.7, 9.4 Гц), 7.26 м (1 H), 7.53 д (1 H, J 8.1 Гц), 7.75 д (1 H, J 8.1 Гц), 7.97 т (1 H, J 5.6 Гц), 10.10 с (1 H). Масс-спектр (FAB), m/z : 406 [$M+H$], 428 [$M+Na$].

N-[4-(N-Вос-изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-D,L- β -фенил- β -аланин (VII) получали по аналогичной методике. Выход 0.61 г (84%), R_f 0.81 (Г), т. пл. 138–141 $^{\circ}\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (DMFA- d_7), δ , м.д.: 1.49 с (9 H), 2.57–2.69 м (4 H), 2.83 м (2 H), 4.58 т (4 H, J 6.1 Гц), 5.39 к (1 H, J 7.5 Гц), 7.21–7.45 м (6 H), 7.53 д (1 H, J 8.1 Гц), 7.72 д (1 H, J 8.1 Гц), 8.46 д (1 H, J 8.1 Гц), 10.07 с (1 H). Масс-спектр (FAB), m/z : 482 [$M+H$], 504 [$M+Na$].

N-[4-(2-Вос-изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-D,L- β -(3,4-метилendioксифенил)- β -аланин (VIII) получали по аналогичной методике. Выход 0.59 г (76%), R_f 0.63 (Г). т.пл. 129–132 $^{\circ}\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (DMSO- d_6), δ , м.д.: 1.49 с (9 H), 2.54–2.70 м (4 H), 2.78–2.87 м (2 H), 4.57 т (4 H, J 6.5 Гц), 5.14 к (1 H, J 7.6 Гц), 6.02 с (2 H), 6.79–6.90 м (2 H), 6.99 с (1 H), 7.23–7.27 м (1 H), 7.51 д (1 H, J 7.8 Гц), 7.72 д (1 H, J 7.8 Гц), 8.38 д (1 H, J 8.4 Гц), 10.05 с (1 H). Масс-спектр (FAB), m/z : 526 [$M+H$], 548 [$M+Na$].

Этиловый эфир N-[4-(N-Вос-изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]- β -аланина (IX). К суспензии 1 г (2.99 ммоль) соединения V в хлороформе прибавляли 0.9 мл (6.58 ммоль) триэтиламина. Полученную смесь охлаждали до температуры $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ и прибавляли к ней *изо*-бутилхлороформиат. Реакционную смесь перемешивали 30 мин при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем прибавляли 0.459 г (3.29 ммоль) гидрохлорида этилового эфира β -аланина. Реакционную смесь перемешивали 15 мин при температуре $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ и 1 ч при комнатной температуре, далее разбавляли 100 мл хлороформа, последовательно промывали 50 мл 1 М раствора HCl, 50 мл 5 % раствора NaHCO_3 , 50 мл воды. Органический раствор сушили безводным Na_2SO_4 . Осушитель отфильтровывали, а растворитель упаривали на роторном испарителе. Выход 0.91 г (70%), R_f 0.55 (B), т.пл. 148–150 $^{\circ}\text{C}$. Спектр ЯМР ^1H (DMSO- d_6), δ , м.д.: 1.18 т (3H, J 7.1 Гц), 1.45 с (9H), 2.35–2.45 м (4H), 2.52–2.55 м (2H), 3.26 к (2H, J 6.3 Гц), 4.05 к (2H, J 7.1 Гц), 4.53 т (4H, J 7.3 Гц), 7.20–7.24 м (1H), 7.37–7.44 м (1H), 7.62 д (1H, J 18.7 Гц), 7.08 т (1H, J 5.1 Гц), 9.98 с (1H). Масс-спектр (FAB), m/z : 434 [$M+H$]⁺, 456 [$M+Na$]⁺.

Этиловый эфир N-[4-(N-Вос-изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-β-фенил-β-аланина (X) получали по аналогичной методике. Выход 1.28 г (84%), R_f 0.71 (B), т.пл. 134–137 °С. Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д.: 1.11 т (3H, J 6.8 Гц), 1.45 с (9H), 2.40–2.44 м (2H), 2.51–2.55 м (2H), 2.69 д (2H, J 7.8 Гц), 3.97–4.04 м (2H), 4.53 т (4H, J 7.2 Гц), 5.22 к (1H, J 7.8 Гц), 7.20–7.44 м (7H), 7.61 д (1H, J 20.2 Гц), 8.46 д (1H, J 8.4 Гц), 9.97 с (1H). Масс-спектр (FAB), m/z : 510 $[M+H]^+$, 532 $[M+Na]^+$.

Этиловый эфир N-[4-(2-Вос-изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-D,L-β-(3,4-метилендиоксифенил)-β-аланина (XI) получали по аналогичной методике. Выход 1.44 г (87%), R_f 0.75 (B), т.пл. 122–125 °С. Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д.: 1.10 т (3H, J 7.1 Гц), 1.45 с (9H), 2.41–2.46 м (2H), 2.52–2.54 м (2H), 2.69 д (2H, J 7.0 Гц), 4.00 к (2H, J 6.8 Гц), 4.50–4.55 м (4H), 5.14 к (1H, J 7.0 Гц), 5.98 с (2H), 6.75–6.83 м (2H), 6.91 с (1H), 7.20–7.23 м (1H), 7.40 д (1H, J 10.3 Гц), 7.61 д (1H, J 17.7 Гц), 8.37 д (1H, J 7.8 Гц), 9.96 с (1H). Масс-спектр (FAB), m/z : 554 $[M+H]^+$, 576 $[M+Na]^+$.

Гидрохлорид N-[4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-β-аланина (I). 0.20 г (0.49 ммоль) соединения VI суспендировали в 10 мл, 4 М раствора HCl в диоксане и перемешивали 1 ч при комнатной температуре, затем упаривали. Твердый остаток сушили 5 ч при 40 °С и давлении 3 мм рт. ст. Выход 0.16 г (98 %), R_f 0.60 (B), т.пл. 197–200 °С. Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д.: 2.35–2.41 м (4 H), 2.53–2.61 м (2 H), 3.23 к (2 H, J 6.2 Гц), 4.40–4.48 м (4 H), 7.29 д (1 H, J 8.2 Гц), 7.48 д (1 H, J 8.2 Гц), 7.75 с (1 H), 8.02 т (1 H, J 4.7 Гц), 10.06 с (2 H), 10.22 с (1 H). Масс-спектр (FAB), m/z : 306 $[M+H]$, 328 $[M+Na]$.

Гидрохлорид N-[4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-D,L-β-фенил-β-аланина (II) получали по аналогичной методике. Выход 0.17 г (99%), R_f 0.63 (B), т.пл. 150–153 °С. Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д.: 2.42–2.56 м (4 H), 2.6–2.69 м (2 H), 4.40–4.47 м (4H), 5.39 к (1 H, J 7.3 Гц), 7.19–7.34 м (6 H), 7.47 д (1 H, J 8.1 Гц), 7.74 с (1 H), 8.51 д (1 H, J 8.1 Гц), 10.05 т (2 H, J 5.4 Гц), 10.20 с (1 H). Масс-спектр (FAB), m/z : 382 $[M+H]$, 404 $[M+Na]$.

Гидрохлорид N-[4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-D,L-β-(3,4-метилендиоксифенил)-β-аланина (XII) получали по аналогичной методике. Выход 0.67 г (95%), R_f 0.70 (B), т.пл. 135–138 °С. Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д.: 2.39–2.44 м (2 H), 2.53–2.56 м (2 H), 2.61–2.65 (2 H), 4.40–4.47 м (4 H), 5.10 к (1 H, J 7.7 Гц), 5.97 с (2 H), 6.75–6.90 м (3 H), 7.29 д (1 H, J 8.2 Гц), 7.45 д (1 H, J 8.2 Гц), 7.74 с (1 H), 8.39 д (1 H, J 9.0 Гц), 9.90 с (2 H), 10.15 с (1 H). Масс-спектр (FAB), m/z : 426 $[M+H]$.

Гидрохлорид этилового эфира N-[4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-β-аланина (XIII) получали по аналогичной методике. Выход 0.16 г (95%), R_f 0.30 (B), вещество гигроскопично. Спектр ЯМР ^1H (DMSO-d_6), δ , м.д.: 1.18 т (3H, J 7.0 Гц), 2.36–2.45 м (4H), 2.52–2.57 м (2H), 3.24–3.26 м (2H), 4.06 к (2H, J 7.0 Гц), 4.40–4.47 м (4H), 7.29 д (1H, J 7.9 Гц), 7.47 д (1H, J 7.9 Гц), 7.74 с (1H), 8.01 с (1H), 9.97 с (2H), 10.18 с (1H). Масс-спектр (FAB), m/z : 334 $[M+H]^+$.

Гидрохлорид этилового эфира N-[4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-β-фенил-β-аланина (XIV) получали по аналогичной методике. Выход 0.17 г (97%), вещество гигроскопично, R_f 0.52 (Б). Спектр ЯМР ^1H (DMSO- d_6), δ , м.д.: 1.10 т (3H, J 7.1 Гц), 2.41–2.47 м (2H), 2.52–2.56 м (2H), 2.73 д (2H, J 7.9 Гц), 4.00 к (2H, J 7.1 Гц), 4.41–4.47 м (4H), 5.22 к (1H, J 7.9 Гц), 7.20–7.34 м (6H), 7.46 дд (1H, J 1.0 Гц, J 8.1 Гц), 7.73 с (1H), 8.50 д (1H, J 7.9 Гц), 9.90 т (2H, J = 4.5 Гц), 10.15 с (1H). Масс-спектр (FAB), m/z : 410 $[M+H]^+$.

Гидрохлорид этилового эфира N-[4-(изоиндолин-5-ил)амино-4-оксобутирил]-D,L-β-(3,4-метилendioксифенил)-β-аланина (XV) получали по аналогичной методике. Выход 0.16 г (93%), вещество гигроскопично, R_f 0.57 (Б). Спектр ЯМР ^1H (DMSO- d_6), δ , м.д.: 1.11 т (3H, J 7.1 Гц), 2.42 т (2H, J 6.8 Гц), 2.52 — 2.55 м (2H), 2.69 дд (2H, J 2.0 Гц, J 7.9 Гц), 4.00 к (2H, J 7.1 Гц), 4.4–4.47 м (4H), 5.13 к (1H, J 7.9 Гц), 5.97 с (2H), 6.74–6.83 м (2H), 6.90–6.93 м (1H), 7.29 д (1H, J 8.3 Гц), 7.45 дд (1H, J 1.2 Гц, J = 8.3 Гц), 7.73 с (1H), 8.39 д (1H, J 8.5 Гц), 9.81 с (2H), 10.12 с (1H). Масс-спектр (FAB), m/z : 454 $[M+H]^+$.

Фармакологическая часть. Изучение агрегации тромбоцитов проводилось БТП [8], полученной из цитратной крови человека центрифугированием при 200 g в течение 15 мин. Агрегацию тромбоцитов измеряли по увеличению светопропускания на агрегометре “Thromlite 1006A” фирмы “Биохиммак” (Москва), присоединенному к записывающему устройству. БТП (250 мкл) инкубировали с различными концентрациями исследуемых веществ при 37 °C в течение 1 мин перед добавлением АДФ (конечная концентрация 10 мкМ). Агрегацию тромбоцитов измеряли в течение 2 мин (максимальная агрегация). Для количественной характеристики биологической активности RGDF миметиков использовалась величина IC_{50} — концентрация вещества, при которой максимальная амплитуда агрегации тромбоцитов составляет 50 % от исходного уровня.

Исследование антиагрегационной активности в опытах *ex vivo* на мышцах проводилось по методике Weller с сотр. [9]. Исследуемым мышам-самцам (25–30 г) перорально вводили исследуемые соединения (пролекарства) в дозе 100 мг/кг в водных растворах, при помощи зонда. Плазму получали через 1 и 3 часа. Готовили серию разведений полученной мышной плазмы и, в количестве 100 мкл, смешивали в кювете агрегометра с 300 мкл БТП крови человека. Богатую тромбоцитами плазму получали из крови здоровых доноров, взятой из локтевой вены натощак. После 60 сек инкубации агрегацию тромбоцитов индуцировали АДФ (10 мкМ). По кривой доза-эффект находили объем плазмы, необходимый для ингибирования агрегации тромбоцитов на 50 %. Исходя из найденного значения, вычисляли фактор разведения для плазмы каждой мыши. Учитывая фактор разведения, рассчитывали значение ID_{50} , т.е. дозу, при пероральном введении приводящую к 50 %-ному ингибированию АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови человека.

Литература

1. Collier B. S. // Circulation. 1995. V. 92. P. 2373–2380.
2. Andronati S. A., Krysko A. A., Kabanov V. M., Karaseva T. L., Kabanova T. A. // Acta Poloniae Pharmaceutica — Drug Research. 2000. V. 57. P. 15–21.
3. Andronati S. A., Karaseva T. L., Krysko A. A. // Current Medicinal Chemistry. 2004. V. 11. P. 1183–1211.
4. Krysko A. A., Chugunov B. M., Malovichko O. L., Andronati S. A., Kabanova T. A., Karaseva T. L., Kiriya A. V. // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2004. V. 14. P. 5533–5535.
5. Wang W., Borchardt R. T., Wang B. // Current Medicinal Chemistry. 2000. V. 7. P. 437–453.
6. Андронаті С. А., Крисько А. А., Чугунов Б. М., Кабанова Т. А., Артёмченко А. Г. // ЖОрХ. 2006. Т.42. С. 1195 — 1202.
7. Eldred C. D., Evans B., Hindley S., Judkins B. D., Kelly H. A., Kitchin J., Luley P., Porter B., Ross B. C., Smith K. J., Taylor N. R., Wheatcroft J. R. // J. Med. Chem. 1994. V. 37, P. 3882–3885.
8. Born G. V.R. // Nature. 1962. V. 194. P. 927–929.
9. Weller T., Alig L., Beresini M., Blackburn B., Bunting S., Hadvary P., Muller M. H., Knopp D., Levetrafit B., Lipari M. T., Modi N. B., Muller M., Refino C. J., Schmitt M., Schonholzer P., Weiss S., Steiner B. // J. Med. Chem. 1996. V. 39. P. 3139–3147.

**A. A. Крисько, Б. М. Чугунов, С. А. Андронаті,
Т. А. Кабанова, І. М. Ракіпов, О. В. Мазепа**

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України
65080, Одеса, Люстдорфська дорога, 86

СИНТЕЗ ПОХІДНИХ RGDF-МІМЕТИКІВ НА ОСНОВІ 4-(ІЗОІНДОЛІН-5-ІЛ)АМІНО-4-ОКСОБУТАНОВОЇ КИСЛОТИ, ЩО ПРОЯВЛЯЮТЬ АНТИАГРЕГАЦІЙНУ АКТИВНІСТЬ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМУ ВВЕДЕННІ

Резюме

Синтезовано етилові ефіри *N*-[4-(ізоіндолін-5-іл)аміно-4-оксобутирил]-*D,L*- β -заміщених- β -аланінів. Вивчення антиагрегаційної активності показало, що отримані сполуки проявляють пероральну активність у дослідях *ex vivo* на мишах з використанням багатой на тромбоцити плазми крові людини.

Ключові слова: RGDF-міметик, агрегація тромбоцитів, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$.

**A. A. Krysko, B. M. Chugunov, S. A. Andronati,
T. A. Kabanova, I. M. Rakipov and A. V. Mazepa**

A. V. Bogatsky Physico-chemical Institute of National Academy of Science of Ukraine
65080, Odessa, 86 Lustdorfskaya doroga

THE SYNTHESIS OF RGDF MIMETIC DERIVATIVES BASED ON 4-(ISOINDOLINE-5-YL)AMINO-4-OXOBUTYRIC ACID WITH THE ORAL ANTIAGGREGATIVE ACTIVITY

Summary

Ethyl ethers of *N*-[4-(isoindoline-5-yl)amino-4-oxobutyryl]-*D,L*- β -substituted- β -alanines were synthesized. Estimation of antiaggregatory activity of the compounds obtained has showed that the compounds possess an oral activity *ex vivo* in mice with the use of human rich platelet plasma.

Key words: RGDF mimetic, platelet aggregation, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$.