

Антикоагулянты на основе фторзамещенных 2-изоксазолинов

М. Е. Пархач, Н. Н. Ковганко, С. В. Глинник, Е. Н. Галюк, С. Н. Борисевич

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

Введение. Тромботические осложнения остаются ведущей причиной инвалидизации и смертности во всем мире. Ключевую роль в патогенезе венозных тромбозов, тромбоэмболии легочной артерии и ишемических инсультов играет гиперактивация коагуляционного каскада, кульминацией которой является образование фибринового сгустка. В отличие от антиагрегантов, воздействующих на тромбоцитарное звено, антикоагулянты направлены на плазменные факторы свертывания. Среди них особое место занимает фактор Ха (FXa) — ключевой фермент, обеспечивающий амплификацию коагуляционного сигнала и образование тромбина. Синтетические ингибиторы FXa (ривароксабан, апексабан) рассматриваются как более безопасная альтернатива прямым ингибиторам тромбина, поскольку они обладают предсказуемой фармакокинетикой и более широким терапевтическим окном.



Цель работы. Изучить антикоагулянтную активность фторзамещенных 3-фенил-2-изоксазолин-5-карбоксамидов *in vitro*, оценить их влияния на протромбиновое время (МНО), а также установление зависимости «структура-активность» для направленного дизайна новых ингибиторов FXa.

Материалы и методы. Объектами исследования служили 10 новых соединений — фторзамещенных 3-фенил-2-изоксазолин-5-карбоксамидов, синтезированных по методике [3+2]-диполярного циклоприсоединения соответствующих гидроксиминоилхлоридов к акриламиду (рис. 1). Строение синтезированных соединений подтверждено с помощью ИК- и ЯМР-спектроскопии.

Оценку антикоагулянтной активности проводили на цитратной плазме здоровых доноров. Для определения протромбинового времени (МНО) использовали стандартный тромбопластиновый реагент (набор Coagulochek PT) на коагулометре Solar CGL 2110. Результаты выражали в виде международного нормализованного отношения (МНО) и процента удлинения времени по сравнению с контролем.

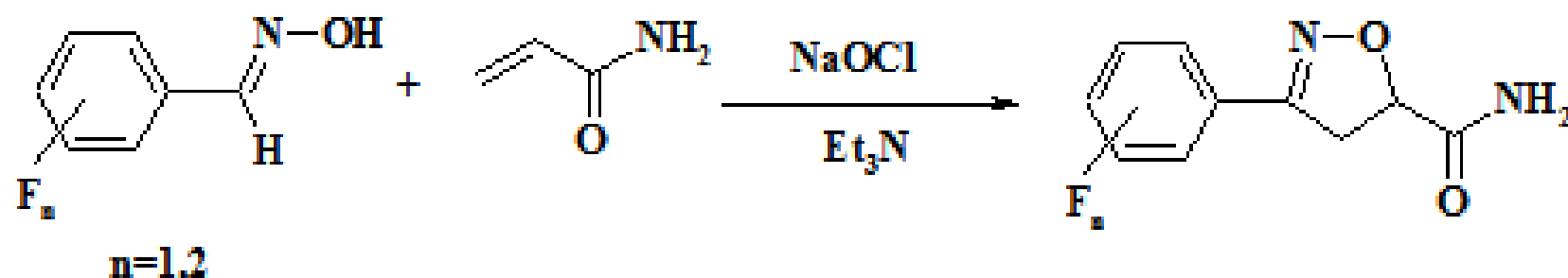


Рисунок 1 Схема синтеза целевых 2-изоксазолинов

Анти-Ха активность определяли хромогенным методом с использованием коммерческого набора BIOPHEN Heparin Anti-Xa (HYPHEN BioMed) на микропланшетном ридере при длине волны 405 нм. В качестве прямого ингибитора FXa сравнения использовали ривароксабан. Эксперименты выполняли в диапазоне концентраций 0,1–50 мкМ (кратно ниже, чем для антиагрегантов, что соответствует наномолярной аффинности к FXa). Каждая точка измерялась в трех повторностях.

Результаты и обсуждение. Впервые проведен систематический скрининг антикоагулянтной активности фторзамещенных 2-изоксазолинов. Установлено, что все исследованные соединения способны удлинять протромбиновое время и ингибировать активность фактора Ха в дозозависимом режиме. При этом выявлены структурные закономерности, определяющие эффективность и селективность ингибирования:

1. Влияние степени фторирования фенильного заместителя на аффинность к FXa. Обнаружено, что соединения с электронно-акцепторными заместителями в ароматическом кольце демонстрируют более высокую анти-Ха активность. Максимальное удлинение МНО (до 2,8 при 50 мкМ) зафиксировано для соединения с пентафторфенильным заместителем, что сопоставимо с ривароксабаном (МНО = 3,1). Высокую активность также показали тетрафторпроизводные с атомами фтора в положениях 2,3,5,6 и 2,3,4,5. Для них прирост МНО составил 85–90% относительно контроля. В то же время монофторзамещенные соединения оказались значительно менее активными (прирост МНО 20–35%), что согласуется с литературными данными о необходимости множественного фторирования для эффективного связывания с S1-карманом активного центра FXa

2. Замена карбоксамидной группы ($-\text{CONH}_2$) на метиловый эфир ($-\text{COOMe}$) или свободную кислоту ($-\text{COOH}$) в серии 3-(2,3,4-трифторфенильных) производных привела к снижению анти-Ха активности на 40–60%. Это объясняется способностью первичного амида образовывать две водородные связи с ключевыми аминокислотными остатками в области S4-кармана FXa (например, с Gly216 и Gly218), тогда как эфиры и кислоты реализуют лишь одну такую связь. Данный результат коррелирует с известными патентами на изоксазолиновые ингибиторы FXa, где карбоксамидный фрагмент позиционируется как биоизостер сульфонамидных групп.

3. В изученном концентрационном диапазоне ни одно из соединений не вызывало достоверного изменения активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), что указывает на избирательное ингибирование именно внешнего пути активации (фактор VIIa-тканевой фактор), опосредованного FXa, без воздействия на внутренний путь и контактную фазу. Это свидетельствует о высоком профиле селективности и потенциально меньшем риске неконтролируемых кровотечений по сравнению с прямыми ингибиторами тромбина.

Таким образом, полученные данные формируют четкое правило для дизайна антикоагулянтов на основе 2-изоксазолина: высокая степень фторирования ароматического кольца и наличие карбоксамидной группы в положении 5 цикла являются минимальными требованиями для достижения субмикромольной ингибирующей активности в отношении FXa.

Заключение. В результате проведенного исследования впервые продемонстрирована возможность использования фторзамещенных 3-фенил-2-изоксазолин-5-карбоксамидов в качестве эффективных и селективных ингибиторов фактора Ха. Установленные зависимости «структура-активность» (критическая роль полифторирования и амидной группы) создают методологическую основу для дальнейшей оптимизации соединений с целью создания новых пероральных антикоагулянтов с предсказуемым фармакокинетическим профилем.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения (Рег. № НИОК(Т)Р 20240516).