

Ингибирование прокоагулянтной активности тромбоцитов крови винил-сульфонилпроизводными пирролидин-2-карбоновой кислоты

К. В. Кудряцев,^{а*} Н. А. Подоплелова,^б А. А. Новикова,^б
М. А. Пантелеев,^{б,в} Д. В. Заболотнев,^а Н. С. Зефирова^а

^аМосковский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Химический факультет,
Российская Федерация, 119991 Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3.

Факс: (495) 932 8846. E-mail: kudr@org.chem.msu.ru

^бЦентр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук,
Российская Федерация, 117977 Москва, ул. Косыгина, 4

^вГематологический научный центр Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации,
Российская Федерация, 125167 Москва, Новый Зыковский пр-д, 4

Новые производные 4-(винилсульфонил)пирролидин-2-карбоновых кислот подавляют экспонирование фосфатидилсерина тромбоцитами при активации тромбином. Гетероциклические ингибиторы синтезированы при помощи 1,3-диполярного циклопри-соединения дивинилсульфона к азометиновым илидам и последующей модификации эндоциклического атома азота.

Ключевые слова: тромбоциты, тромбоз, цистеиновые протеазы, низкомолекулярные ингибиторы, винилсульфоны.

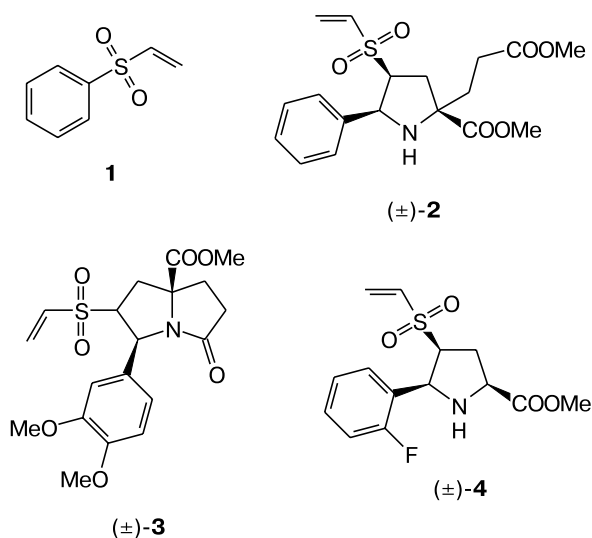
Тромбоциты крови представляют собой маленькие (2–5 мкм) дисковидные клеточные фрагменты, циркулирующие в кровотоке в концентрации 150–400 тыс · мкл⁻¹. Тромбоциты являются центральным элементом в системе гемостаза, которая отвечает за остановку кровотечения при ранениях: они способны прикрепляться к месту повреждения и друг к другу, образуя гемостатическую пробку, препятствующую кровопотере. Тромбоциты также способны проходить через специализированный процесс изменения, называемый активацией, под действием химических веществ и механических воздействий¹. При активации связывание тромбоцитов становится необратимым; кроме того, они секретируют факторы свертывания и экспонируют фосфатидилсерин на внешнем слое клеточной мембраны. Поддержание delicateго баланса между текучим и нетекучим состояниями крови представляет собой нетривиальную задачу для организма, и поэтому нарушения системы гемостаза являются лидирующей причиной смертности и инвалидности в современном мире. Наиболее пагубными из них являются тромбозы, представляющие собой формирование кровяных сгустков внутри сосудов, что угрожает нарушением кровоснабжения органов. Тромбозы возникают при самых различных заболеваниях и состояниях, включая атеросклероз, травму, инфаркт, инсульт, рак, сепсис, операционные вмешательства и т.п. Например, до 70% так называемых внезапных сердечных смертей обусловлено тромбозами², а от данного синдрома только в США умирает ежегодно около 400 000 человек³. Таким образом, разработка новых, эффективных и при этом

безопасных, антитромботических препаратов является задачей исключительной актуальности.

Экспонирование фосфатидилсерина при активации, как правило, сосредоточенное в одной тромбоцитарной субпопуляции^{4,5}, представляет собой важнейшую часть прокоагулянтной активности тромбоцитов. Оно ведет к появлению сайтов связывания для белков системы свертывания и драматическому (на несколько порядков) ускорению реакций системы гемостаза. Исследования механизма действия одного из наиболее успешных антитромботических препаратов клопидогрела (торговое наименование Плавикс) установили тесную связь между воздействием препарата и ингибированием фосфатидилсерин-положительной субпопуляции тромбоцитов⁶. Ранее было показано, что компоненты клубней картофеля, ингибирующие цистеиновые протеазы, также способны подавлять экспонирование фосфатидилсерина тромбоцитами⁷. Обнаруженная активность ингибиторов цистеиновых протеаз может быть связана с их влиянием на фактор XIIIa, трансглутаминазу коагуляционного каскада, ферментативная активность которой обусловлена цистеином в активном сайте⁸. Ферменты, содержащие цистеин в активном центре, относятся к различным семействам: протеазы, трансглутаминазы, транспептидазы, фосфатазы и т.п., в зависимости от выполняемой функции. Однако с химической точки зрения начальная стадия взаимодействия цистеинового фермента с пептидным субстратом для первых трех семейств заключается в нуклеофильной атаке сульфгидрильной группы по карбонильному атому углерода пептидной (амидной) связи субстрата и образовании активированного

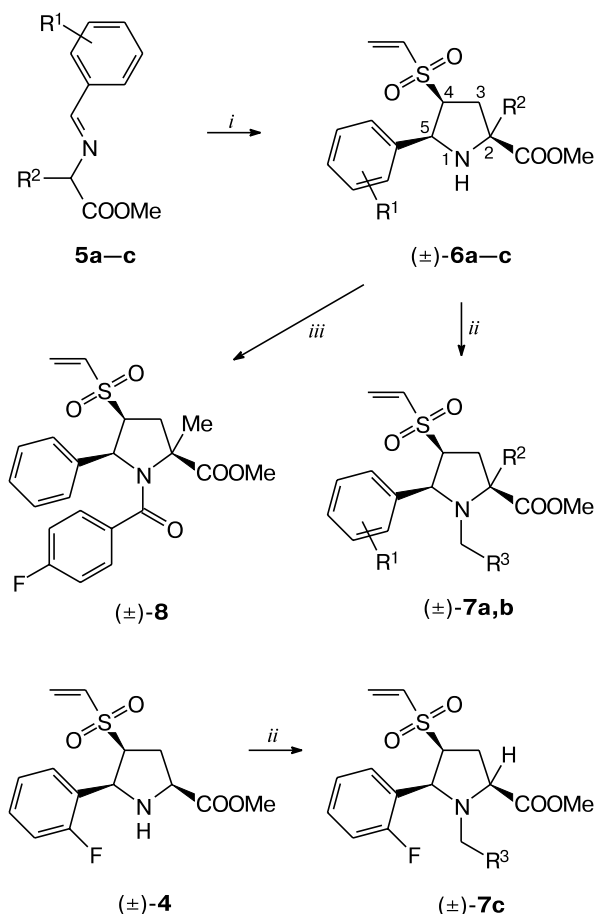
сложного тиоэфира. Далее, в зависимости от реакции активированного сложного тиоэфира с внешним нуклеофилом, происходит либо его гидролиз (протеазы: нуклеофил — молекула воды), либо образование новой пептидной связи (трансглутаминаза: нуклеофил — ω -аминогруппа лизинового аминокислотного остатка; транспептидаза: нуклеофил — α -аминогруппа конечного аминокислотного остатка). Одной из стратегий ингибирования функций ферментов является ковалентная модификация их активного сайта⁹. Упомянутый выше клопидогрел трансформируется в организме в активный метаболит, который необратимо ингибирует P2Y₁₂ — пуриноцептор, ковалентно связывая цистеин активного сайта⁹. Эффективными ингибиторами цистеиновых протеаз являются акцепторы Михаэля¹⁰, в частности винилсульфоны¹¹. Одним из соавторов в ходе предыдущих исследований были получены новые производные 4-(винилсульфонил)пирролидин-2-карбоновых кислот и изучена их ингибирующая способность по отношению к сортазе А золотистого стафилококка, представляющей собой цистеиновую транспептидазу^{12,13}. При помощи масс-спектрометрии секвенированных фрагментов была установлена ковалентная модификация Cys184-аминокислотного остатка активного сайта сортазы А одним из ингибиторов¹³. В настоящей работе было изучено влияние известных¹³ и новых пирролидинилвинилсульфонов на экспонирование фосфатидилсерина тромбоцитами.

Для установления специфичности взаимодействия гетероциклических винилсульфонов с тромбоцитами в качестве функционального аналога был также изучен фенилвинилсульфон (**1**). Фенилвинилсульфон (**1**) проявляет ингибирующие свойства по отношению к сортазе А *S. aureus*¹⁴, подавляет адгезию клеток *S. aureus* к покрытой фибронектином поверхности¹⁴, а также инактивирует различные протеиновые тирозинные фосфатазы при помощи ковалентной необратимой модификации цистеина S γ в активном сайте ферментов¹⁵. Пирролидинилвинилсульфоны **2—4** также необратимо ингибируют сортазу А *S. aureus*, причем наибольшую активность проявляет соединение **4** (см. лит.¹³).



Для установления взаимосвязи между структурой низкомолекулярных производных 4-(винилсульфонил)пирролидин-2-карбоновых кислот и их биологической активностью были также синтезированы новые аналоги **6—8**, отличающиеся от ранее полученных арильным заместителем в положении 5 пирролидинового цикла, заместителем R² в положении 2 и заместителем при атоме азота (схема 1).

Схема 1



R¹ = 4-Br, R² = H (**5a**, **6a**, **7a,b**); R¹ = H, R² = Me (**5b**, **6b**);
R¹ = 3-F, R² = CH₂Ph (**5c**, **6c**); R¹ = 2-F, R² = H (**7c**);
R³ = Et (**7a**), CH=CHPh (**7b,c**);.

i. Дивинилсульфон, AgOAc, Et₃N, толуол; *ii.* R³CH₂CHO, NaBH(OAc)₃, CH₂Cl₂; *iii.* 4-FC₆H₄COCl, TFA, Et₃N.

Циклоприсоединение дивинилсульфона к азометиновым илидам, генерируемым из иминоэфиров **5** под действием кислот Льюиса, протекает стереоселективно с образованием рацемических пирролидинов **6**, в которых метоксикарбонильная и винилсульфоновая функции и 5-арильный заместитель расположены по одну сторону пирролидинового цикла (см. схему 1)^{12,16}. Модификация эндоциклического атома азота пирролидинового кольца проведена введением алкильного заместителя при помощи восстановительного аминирования с пропаналем и коричным альдегидом (соединения **7**) и бензоилированием 4-фторбензоилхлоридом (соединение **8**) (см. схему 1). Все

полученные соединения охарактеризованы при помощи спектроскопии ЯМР ^1H и ^{13}C (вырожденность некоторых сигналов в спектрах ЯМР ^1H может быть обусловлена тем, что одна из КССВ близка к нулю), а заключения о пространственном строении сделаны путем сопоставления спектральных данных ЯМР с характеристиками аналогов, для которых структура установлена при помощи РСА^{12,16}. Чистота и состав пирролидинилвинилсульфонов **6–8** подтверждены данными элементного анализа.

Экспонирование фосфатидилсерина тромбоцитами приводит к образованию популяции так называемых «укутанных» тромбоцитов, характеризующихся высоким содержанием фосфатидилсерина на поверхности клеток. Эти клетки эффективно связывают флуоресцентно меченный аннексин V, что позволяет

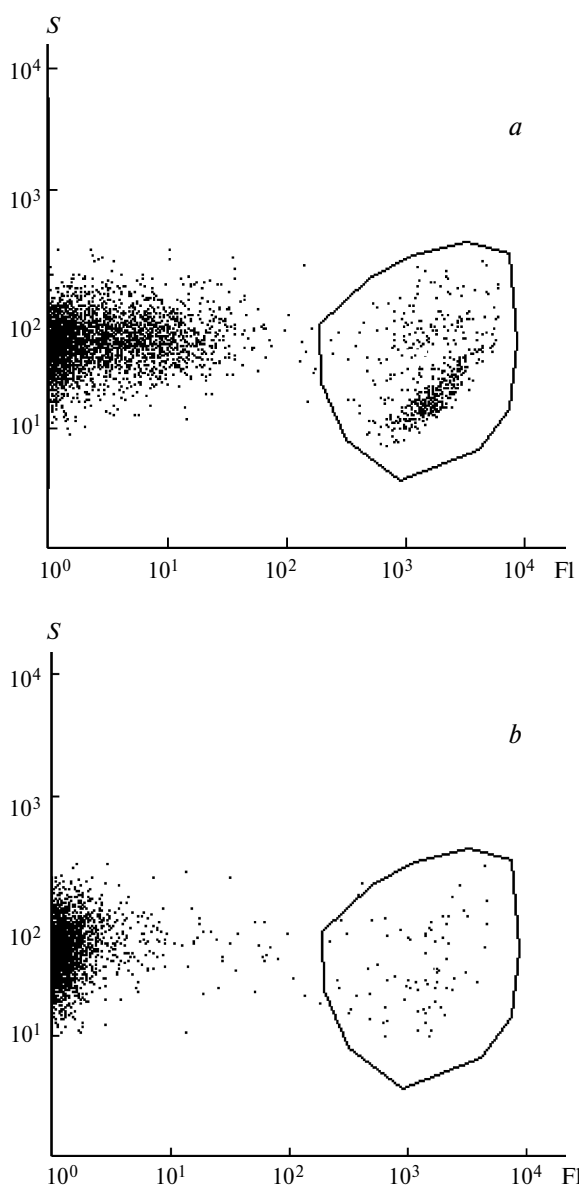


Рис. 1. Проточно-цитометрическое исследование образования популяции «укутанных» тромбоцитов при активации тромбоином без ингибиторов (а) и в присутствии винилсульфона **7a** (b). S — боковое светорассеивание, FI — флуоресценция FITC-аннексина.

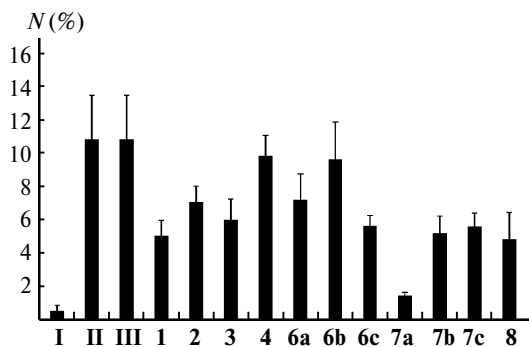


Рис. 2. Влияние винилсульфонов на формирование «укутанных» тромбоцитов при активации тромбоином. Представлены средние величины \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$): I — неактивированные тромбоциты; II — контроль; III — ДМСО. N — количество аннексин-V-положительных тромбоцитов.

количественно оценить долю «укутанных» тромбоцитов в популяции с помощью проточной цитометрии (рис. 1). После активации отмытых тромбоцитов тромбоином винилсульфоны **1–4**, **6–8** в различной степени снижают долю «укутанных» тромбоцитов (рис. 1 и 2). Исследованные ингибиторы добавляли в концентрации, указанной в таблице 1. Максимальным эффектом, при котором происходило уменьшение количества «укутанных» тромбоцитов в 10 раз по сравнению с контролем, обладает пирролидинилвинилсульфон **7a** (см. рис. 2). Добавление данного соединения практически полностью нивелирует активирующее действие тромбоина на тромбоциты. Биологическая активность исследованных винилсульфонов не связана или слабо связана с ингибированием тромбоина, что показано исследованием ингибирования гидролиза тромбоином специфического субстрата в присутствии соединений **6** и **7** (см. табл. 1).

Несмотря на небольшой набор изученных соединений (10 гетероциклических винилсульфонов и ком-

Таблица 1. Концентрации соединений **1–4**, **6–8** при тестировании и данные по ингибированию тромбоина в буферном растворе

Соединение	M	c		I (%)
		ммоль \cdot л $^{-1}$	мг \cdot мл $^{-1}$	
1	168.22	0.594	0.100	15.2
2	381.45	0.163	0.062	9.1
3	409.46	0.049	0.020	–3.1
4	313.35	0.172	0.054	–3.9
6a	374.26	0.096	0.036	–10
6b	309.39	0.149	0.046	–0.9
6c	403.48	0.099	0.040	–1.3
7a	416.34	0.086	0.036	–6.5
7b	490.42	0.159	0.078	20.4
7c	429.51	0.112	0.048	7.5
8	431.49	0.102	0.044	—

Примечание: M — молекулярная масса соединения; c — конечная концентрация соединения в пробе; I — ингибирование тромбоина в буферном растворе при указанной концентрации соединения.

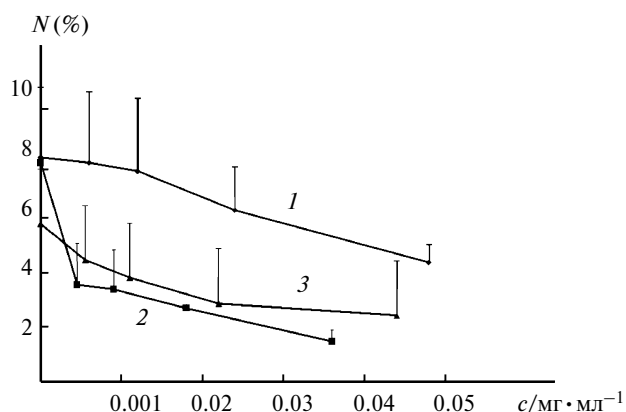


Рис. 3. Дозозависимое снижение количества «укутанных» тромбоцитов в присутствии ингибиторов **7с** (**1**), **7а** (**2**) и **8** (**3**). N — количество аннексин-V-положительных тромбоцитов, c — концентрация винилсульфонов. Даны средние величины \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3$). Значения IC_{50} для этих веществ, полученные с помощью нелинейного метода наименьших квадратов в предположении гиперболической зависимости ингибирования, составляют: 0.0487 ± 0.007 мг·мл $^{-1}$ для винилсульфона **7с**, 0.0094 ± 0.00028 мг·мл $^{-1}$ для винилсульфона **7а**, 0.028 ± 0.005 мг·мл $^{-1}$ для винилсульфона **8**.

мерчески доступный фенилвинилсульфон), можно сделать предварительное заключение о взаимосвязи структура—активность для данного класса активных веществ. Во-первых, все соединения, содержащие винилсульфоновый фрагмент, обладают влиянием на экспонирование фосфатидилсерина тромбоцитами, и данная активность обусловлена именно этим структурным фрагментом. Во-вторых, гетероциклические винилсульфоны проявляют сопоставимую или пониженную активность по сравнению с фенилвинилсульфоном (**1**), за исключением соединения **7а** (см. рис. 2). Таким образом, присутствие небольшого по объему алкильного заместителя на эндоциклическом атоме азота, по-видимому, является критическим для ингибирования активации тромбоцитов. Для замещенных эфиров 4-(винилсульфонил)пирролидин-2-карбоновых кислот **7а**, **7с** и **8** также была изучена зависимость биологической активности от концентрации ингибитора (рис. 3).

Наиболее интересным результатом данной работы для дальнейших практических приложений представляется обнаружение нового класса эффективных ингибиторов прокоагулянтной активности тромбоцитов, действующих в микромолярном диапазоне концентраций ($IC_{50} = 20$ мкмоль·л $^{-1}$ и $IC_{100} = 90$ мкмоль·л $^{-1}$ для пирролидинилвинилсульфона **7а**). Подавление экспрессии фосфатидилсерина тромбоцитами представляет собой перспективное направление в профилактике и лечении тромбозов, что подтверждают данные по исследованию препаратов-антагонистов рецептора P2Y $_{12}$, клопидогрела, прасугрела и кангрелора¹⁷. Отметим, что наши эксперименты по тестированию проводились в буферном растворе, имитирующем плазму по ряду показателей, включая наличие альбумина. В связи с этим можно пред-

полагать, что такие же эффекты в аналогичных концентрациях винилсульфонов будут проявляться и в цельной крови.

Экспериментальная часть

Синтетические исследования

В работе использованы дивинилсульфон, ароматические альдегиды, ацетат серебра(**1**), 4-фторбензоилхлорид, коричный альдегид и силикагель производства Lancaster. Контроль за ходом реакций и чистотой соединений осуществляли с использованием ТСХ-пластин Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ, элюент $CHCl_3$ —MeOH (10 : 1). Спектры ЯМР 1H и ^{13}C регистрировали на приборе «Bruker Avance 400» (1H — 400 МГц, ^{13}C — 100 МГц) при температуре 303 К в растворах в $DMCO-d_6$ или $CDCl_3$ с использованием остаточных сигналов растворителей в качестве внутренних стандартов.

Синтез пирролидинилвинилсульфонов **2—4** описан ранее^{12,13,16}. Пирролидинилвинилсульфоны **6** получены в соответствии с методом, использованным для синтеза соединения **2** (см. лит.¹⁶).

(2S*,4S*,5S*)-Метил-5-(4-бромфенил)-4-(винилсульфонил)пирролидин-2-карбоксилат (6а). Получен из дивинилсульфона и иминоэфира **5а**. Выход 24%. Бесцветные кристаллы, т.пл. 158—159 °С. Спектр ЯМР 1H ($DMCO-d_6$, δ , м.д., $J/Гц$): 2.37 (д.д., 1 H, H(3), $J = 14.0, J = 8.0, J = 6.6$); 2.51—2.57 (м, 1 H, H(3)); 3.50 (т, 1 H, NH, $J = 7.7$); 3.70 (с, 3 H, $COOCH_3$); 3.90 (к, 1 H, H(2), $J = 8.2$); 4.05—4.10 (м, 1 H, H(4)); 4.52 (т, 1 H, H(5), $J = 7.5$); 5.74 (д, 1 H, $CH_2=CH$, $J = 16.5$); 5.85 (д, 1 H, $CH_2=CH$, $J = 9.9$); 6.28 (д.д., 1 H, $CH_2=CH$, $J = 16.5, J = 9.9$); 7.38 (д, 2 $H_{аром}$, $J = 8.6$); 7.48 (д, 2 $H_{аром}$, $J = 8.6$). Спектр ЯМР ^{13}C ($DMCO-d_6$, δ , м.д.): 30.36, 52.40, 57.72, 62.42, 65.05, 120.91, 129.15, 130.75 (2 C), 131.15 (2 C), 136.50, 137.97, 173.12. Найдено (%): C, 45.18; H, 4.35; N, 3.63. $C_{14}H_{16}BrNO_4S$. Вычислено (%): C, 44.93; H, 4.31; N, 3.74.

(2S*,4S*,5S*)-Метил-4-(винилсульфонил)-2-метил-5-фенилпирролидин-2-карбоксилат (6б). Получен из дивинилсульфона и иминоэфира **5б**. Выход 73%. Бесцветные кристаллы, т.пл. 73—75 °С. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., $J/Гц$): 1.56 (с, 3 H, CH_3); 2.33 (д.д., 1 H, H(3), $J = 14.8, J = 8.2$); 3.13 (д.д., 1 H, H(3), $J = 14.8, J = 5.0$); 3.78 (д.д., 1 H, H(4), $J = 8.2, J = 6.3, J = 5.0$); 3.85 (с, 3 H, $COOCH_3$); 4.74 (д, 1 H, H(5), $J = 6.3$); 5.38 (д.д., 1 H, $CH_2=CH$, $J = 16.4, J = 10.0$); 5.59 (д, 1 H, $CH_2=CH$, $J = 10.0$); 5.90 (д, 1 H, $CH_2=CH$, $J = 16.4$); 7.30—7.38 (м, 3 $H_{аром}$); 7.40—7.43 (м, 2 $H_{аром}$). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 27.46, 37.69, 52.83, 62.95, 64.35, 68.18, 128.17 (2 C), 128.37 (3 C), 129.45, 134.89, 136.22, 175.29. Найдено (%): C, 58.38; H, 6.27; N, 4.66. $C_{15}H_{19}NO_4S$. Вычислено (%): C, 58.23; H, 6.19; N, 4.53.

(2S*,4S*,5S*)-Метил-2-бензил-4-(винилсульфонил)-5-(3-фторфенил)пирролидин-2-карбоксилат (6с). Получен из дивинилсульфона и иминоэфира **5с**. Выход 64%. Маслообразное вещество. Спектр ЯМР 1H ($DMCO-d_6$, δ , м.д., $J/Гц$): 2.39 (д.д., 1 H, H(3), $J = 14.4, J = 8.3$); 2.75 (д.д., 1 H, H(3), $J = 14.4, J = 6.0$); 3.06 (с, 2 H, CH_2); 3.40 (д, 1 H, NH, $J = 8.5$); 3.67 (с, 3 H, $COOCH_3$); 4.16 (к, 1 H, H(4), $J = 6.9$); 4.82 (т, 1 H, H(5), $J = 7.6$); 5.72 (д, 1 H, $CH_2=CH$, $J = 16.5$); 5.82 (д, 1 H, $CH_2=CH$, $J = 9.9$); 6.24 (д.д., 1 H, $CH_2=CH$, $J = 16.5, J = 9.9$); 7.06—7.15 (м, 2 $H_{аром}$); 7.18—7.36 (м, 7 $H_{аром}$). Спектр ЯМР ^{13}C ($DMCO-d_6$, δ , м.д., $J/Гц$): 34.99, 44.37, 52.46, 61.23, 65.47, 68.75, 114.72 (д, $J = 21.0$), 115.72 (д, $J = 22.0$), 124.91, 127.16, 128.60 (2 C), 129.07, 129.85 (д, $J = 8.0$), 130.27

(2 С), 136.37, 137.11, 141.46 (д, $J = 6.6$), 162.20 (д, $J = 242.0$), 174.11. Найдено (%): С, 62.35; Н, 5.37; N, 3.69. $C_{21}H_{22}FNO_4S$. Вычислено (%): С, 62.52; Н, 5.50; N, 3.47.

Восстановительное аминирование пирролидинилвинилсульфона 6 (общая методика). К раствору 1.5 ммоль пирролидинилвинилсульфона **6** в 20 мл CH_2Cl_2 добавляли 1.65 ммоль альдегида. При перемешивании добавляли порциями 0.444 г (2.10 ммоль) $NaBH(OAc)_3$. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 8 ч, затем добавляли 10 мл насыщенного раствора $NaHCO_3$. Органическую фазу отделяли, водную фазу экстрагировали 2×10 мл CH_2Cl_2 , объединенную органическую фазу сушили Na_2SO_4 . Осадок отфильтровывали, фильтрат сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюент — $CHCl_3$; $CHCl_3$ — $MeOH$, 10 : 1.

(2S*,4S*,5S*)-Метил-5-(4-бромфенил)-4-(винилсульфонил)-1-пропилпирролидин-2-карбоксилат (7a). Получен по общей методике из винилсульфона **6a** и пропаналя. Выход 53%. Бесцветные кристаллы, т.пл. 102—103 °С. Спектр ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., $J/Гц$): 0.64 (т, 3 Н, CH_3 , $J = 7.3$); 1.06—1.25 (м, 2 Н, CH_2); 2.28—2.47 (м, 3 Н, CH_2N , Н(3)); 2.54—2.61 (м, 1 Н, Н(3)); 3.55 (д.д., 1 Н, Н(4), $J = 9.6$, $J = 6.8$); 3.70 (с, 3 Н, $COOCH_3$); 4.18—4.23 (м, 2 Н, Н(5), Н(2)); 5.82 (д, 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 16.4$); 5.94 (д, 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 9.9$); 6.28 (д.д., 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 16.4$, $J = 9.9$); 7.44—7.48 (м, 4 $H_{аром}$). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.94, 20.81, 30.65, 52.43, 56.11, 64.20, 64.36, 66.84, 121.19, 130.10, 130.62 (2 С), 132.27 (2 С), 136.19, 139.49, 173.44. Найдено (%): С, 49.16; Н, 5.34; N, 3.53. $C_{17}H_{22}BrNO_4S$. Вычислено (%): С, 49.04; Н, 5.33; N, 3.36.

(2S*,4S*,5S*)-Метил-5-(4-бромфенил)-4-(винилсульфонил)-1-цинамилпирролидин-2-карбоксилат (7b). Получен по общей методике из винилсульфона **6a** и коричневого альдегида. Выход 90%. Маслообразное вещество. Спектр ЯМР 1H ($CDCl_3$, δ , м.д., $J/Гц$): 2.56 (т, 2 Н, $CH_2CH=CH$, $J = 8.5$); 3.30 (д.д., 1 Н, Н(3), $J = 14.4$, $J = 8.0$); 3.54 (д.д., 1 Н, Н(3), $J = 14.4$, $J = 5.8$); 3.64 (т, 1 Н, Н(2), $J = 8.0$); 3.70 (с, 3 Н, $COOCH_3$); 3.82 (к, 1 Н, Н(4), $J = 8.8$); 4.32 (д, 1 Н, Н(5), $J = 8.8$); 5.61 (д.д., 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 16.4$, $J = 9.9$); 5.82 (д, 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 9.9$); 6.02 (д, 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 16.4$); 6.06—6.13 (м, 1 Н, $CH_2CH=CH$); 6.40 (д, 1 Н, $CH_2CH=CH$, $J = 15.9$); 7.24—7.32 (м, 5 $H_{аром}$); 7.49—7.54 (м, 4 $H_{аром}$). Спектр ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$, δ , м.д.): 30.41, 52.32, 54.16, 62.92, 65.99, 66.11, 122.46, 124.06, 126.35 (2 С), 127.81, 128.59 (2 С), 130.81, 131.19 (2 С), 131.87 (2 С), 134.15, 134.35, 136.42, 136.65, 172.78. Найдено (%): С, 56.56; Н, 5.07; N, 2.58. $C_{23}H_{24}BrNO_4S$. Вычислено (%): С, 56.33; Н, 4.93; N, 2.86.

(2S*,4S*,5S*)-Метил-4-(винилсульфонил)-5-(2-фторфенил)-1-цинамилпирролидин-2-карбоксилат (7c). Получен по общей методике из винилсульфона **4** и коричневого альдегида. Выход 71%. Бесцветные кристаллы, т.пл. 122—123 °С. Спектр ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., $J/Гц$): 2.38 (д.т., 1 Н, Н(3), $J = 12.9$, $J = 8.8$); 2.51—2.57 (м, 1 Н, Н(3)); 3.30 (д.д., 1 Н, $CH_2CH=CH$, $J = 14.5$, $J = 8.0$); 3.39—3.44 (м, 1 Н, $CH_2CH=CH$); 3.57 (с, 3 Н, $COOCH_3$); 3.62 (д.д., 1 Н, Н(2), $J = 8.8$, $J = 7.3$); 4.19 (к, 1 Н, Н(4), $J = 8.6$); 4.53 (д, 1 Н, Н(5), $J = 8.8$); 5.76 (д, 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 16.4$); 5.93 (д, 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 9.9$); 6.14 (д.д., 1 Н, $CH_2CH=CH$, $J = 16.0$, $J = 8.0$, $J = 6.3$); 6.34 (д, 1 Н, $CH_2CH=CH$, $J = 16.0$); 6.40 (д.д., 1 Н, $CH_2=CH$, $J = 16.4$, $J = 9.9$); 7.01—7.06 (м, 1 $H_{аром}$); 7.17—7.24 (м, 2 $H_{аром}$); 7.25—7.33 (м, 5 $H_{аром}$); 7.71—7.75 (м, 1 $H_{аром}$). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д., $J/Гц$): 30.40, 52.34, 54.22, 59.30, 63.05 (2 С), 114.97 (д, $J = 21.0$), 123.97, 124.85 (д, $J = 12.0$), 125.53, 126.62 (2 С), 128.03, 128.99 (2 С), 130.00 (д, $J = 8.0$), 130.32, 131.82, 133.25, 136.11, 136.83, 161.48 (д, $J = 245.0$), 173.03. Найдено (%): С, 64.45; Н, 5.57; N, 3.55. $C_{23}H_{24}FNO_4S$. Вычислено (%): С, 64.32; Н, 5.63; N, 3.26.

(2S*,4S*,5S*)-Метил-4-(винилсульфонил)-2-метил-5-фенил-1-(4-фторбензоил)пирролидин-2-карбоксилат (8). В 20 мл ТГФ растворили 0.272 г (0.88 ммоль) винилсульфона **6b** и добавили 0.135 мл (0.098 г, 0.97 ммоль) Et_3N . При перемешивании добавляли по каплям 0.117 мл (0.154 г, 0.97 ммоль) 4-фторбензоилхлорида. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 12 ч, затем добавили 20 мл насыщенного раствора NH_4Cl . Через 10 мин добавили 100 мл CH_2Cl_2 , органическую фазу отделили и сушили Na_2SO_4 . Осадок отфильтровали, фильтрат сконцентрировали в вакууме. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюент — гексан— $AcOEt$, 2 : 1. Получили 0.352 г бесцветного маслообразного вещества, закристаллизовавшегося при хранении в холодильнике. Выход 93%. Бесцветные кристаллы, т.пл. 167—168 °С. Спектр ЯМР 1H (ДМСО- d_6 , δ , м.д., $J/Гц$): 1.69 (с, 3 Н, CH_3); 2.31 (д.д., 1 Н, Н(3), $J = 12.3$, $J = 6.2$); 2.62 (т, 1 Н, Н(3), $J = 13.3$); 3.80 (с, 3 Н, $COOCH_3$); 4.73 (д.д., 1 Н, Н(4), $J = 14.2$, $J = 8.2$, $J = 6.2$); 5.41 (д, 1 Н, Н(5), $J = 8.2$); 5.74—5.80 (м, 1 Н, $CH_2=CH$); 5.88—5.93 (м, 2 Н, $CH_2=CH$); 6.95—7.05 (м, 4 $H_{аром}$); 7.10—7.17 (м, 3 $H_{аром}$); 7.29—7.32 (м, 2 $H_{аром}$). Спектр ЯМР ^{13}C (ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 20.89, 36.82, 53.04, 62.80, 64.74, 65.68, 115.11, 115.33, 127.85 (2 С), 128.37, 128.47, 128.56, 129.68 (2 С), 131.72, 133.34, 134.65, 137.61, 161.22, 168.07, 172.98. Найдено (%): С, 61.48; Н, 5.18; N, 3.51. $C_{22}H_{22}FNO_5S$. Вычислено (%): С, 61.24; Н, 5.14; N, 3.25.

Биохимические исследования

Материалы. В работе были использованы фенилвинилсульфон («Lancaster», Великобритания), тромбин («Haemotologic Technologies», США); простагландин E1 («MP Biochemicals», США); флуоресцеин (FITC)-конъюгированный аннексин V («Southern Biotech», США). Остальные реагенты для биохимических исследований были фирмы «Sigma» (США).

Выделение тромбоцитов. Тромбоциты получали из крови здоровых доноров, заготовленной на 3.8%-ном растворе цитрата натрия, pH 5.5. Соотношение кровь:цитрат составляло 9 : 1. Для предотвращения активации тромбоцитов в исходную кровь добавляли простагландин E1 (1 мкмоль·л $^{-1}$) и апиразу (0.1 ед·мл $^{-1}$). Кровь центрифугировали при 100 g и комнатной температуре в течение 8 мин. После центрифугирования крови отбирали слой, обогащенный тромбоцитами плазмы, и для предотвращения агрегации клеток добавляли в нее 3.8%-ный раствор цитрата натрия, pH 5.5 (в соотношении плазма : цитрат = 3 : 1). Тромбоциты концентрировали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин при комнатной температуре, ресуспендировали в 300 мкл буфера А (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.4 mM NaN_2PO_4 , 5 mM глюкозы, 0.5%-ный бычий сывороточный альбумин, pH 7.4) и окончательно очищали от белков плазмы с помощью гель-хроматографии на колонке ($d \times h = 1 \times 6$), заполненной Сефарозой CL-2B и уравновешенной буфером А.

Определение влияния ингибиторов на формирование гетерогенности тромбоцитов при активации. Гель-фильтрованные тромбоциты в концентрации 20 тыс·мкл $^{-1}$ активировали в течение 15 мин при комнатной температуре в отсутствие (контроль) или в присутствии ингибиторов. Концентрация ингибиторов подбиралась так, чтобы конечная концентрация DMSO была 0.2%. Клетки активировали, добавляя 100 нМ тромбин в буфере А в присутствии 2.5 mM $CaCl_2$ и 0.2% флуоресцентно меченного аннексина V. Степень активации оценивали по количеству клеток, связывающих флуоресцентно меченный аннексин V, на проточном цито-

метре FACSCalibur (BD Biosciences), используя программу WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 09-04-00232-а, 10-01-91055-а, 11-03-00630-а, 11-03-91375-СТ-а), Российской академии наук (программа фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология») и Совета по грантам при Президенте Российской Федерации (программа государственной поддержки ведущих научных школ РФ и молодых кандидатов наук МК-155.2010.4).

Список литературы

1. J. W. Heemskerk, E. M. Bevers, T. Lindhout, *Thromb. Haemost.*, 2002, **88**, 186.
2. M. J. Davies, *Heart*, 2000, **83**, 361.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.*, 2002, **51**, 123.
4. G. L. Dale, P. Friese, P. Batar, S. F. Hamilton, G. L. Reed, K. W. Jackson, K. J. Clemetson, L. Alberio, *Nature*, 2002, **415**, 175.
5. M. A. Pantelev, N. M. Ananyeva, N. J. Greco, F. I. Ataulakhanov, E. L. Saenko, *J. Thromb. Haemost.*, 2005, **3**, 2545.
6. N. B. Norgard, S. Saya, C. L. Hann, T. A. Hennebry, E. Schechter, G. L. Dale, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 2008, **52**, 536.
7. Я. Н. Котова, Е. А. Костанова, М. А. Розенфельд, Е. И. Синауридзе, М. А. Пантелеев, Ф. И. Атауллаханов, *Биологические мембраны*, 2009, **26**, 514.
8. L. Lorand, *J. Thromb. Haemost.*, 2005, **3**, 1337.
9. M. H. Potashman, M. E. Duggan, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 1231.
10. M. M. M. Santos, R. Moreira, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2007, **7**, 1040.
11. D. C. Meadows, J. Gervay-Hague, *Med. Res. Rev.*, 2006, **26**, 793.
12. К. В. Кудрявцев, М. Ю. Центалович, *Вестник МГУ, Серия 2. Химия*, 2007, **48**, 308 [*Moscow Univ. Chem. Bull.*, 2007, **62**, 252].
13. K. V. Kudryavtsev, M. L. Bentley, D. G. McCafferty, *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, **17**, 2886.
14. B. A. Frankel, M. Bentley, R. G. Kruger, D. G. McCafferty, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 3404.
15. S. Liu, B. Zhou, H. Yang, Y. He, Z.-X. Jiang, S. Kumar, L. Wu, Z.-Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8251.
16. К. В. Кудрявцев, Н. В. Нуколова, О. В. Кокорева, Е. С. Смолин, *Журн. орган. химии*, 2006, **42**, 424 [*Russ. J. Org. Chem. (Engl. Transl.)*, 2006, **42**, 412].
17. A. D. Michelson, *Nature Rev. Drug Discov.*, 2010, **9**, 154.

Поступила в редакцию 15 марта 2011