

新型喹喔啉类蛋白酶激活受体 4 (PAR4) 拮抗剂的设计、合成及抗血小板活性研究

谢柔洁, 刘尚德, 袁 铎, 李杉杉, 朱 雄*

(中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要: 基于文献报道的喹喔啉类 PAR4 抑制剂, 本文设计合成了 25 个新型具有抗血小板活性的喹喔啉类化合物, 结构通过 ^1H NMR、 ^{13}C NMR、MS 进行确证。对化合物进行抗血小板活性评价、构效关系研究和 FLIPER 钙流检测。结果表明, 化合物 **14a**、**14g**、**13i**、**13p** 的活性较好且都具有 PAR4 选择性。特别是化合物 **14g** ($\text{IC}_{50} = 0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 相对先导化合物 **A** ($\text{IC}_{50} = 1.73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 活性提高了 6.7 倍。本文发现的以 2,3-二氢萘[2,3-g]二噁唑[1,4]喹喔啉和[1,3]二噁唑[4,5-g]喹喔啉为母核的衍生物是一类具有潜力的新型抗血小板化合物, 值得进一步研究, 以开发出高效的新型 PAR4 选择性拮抗剂。

关键词: 喹喔啉母核; PAR4 拮抗剂; 选择性; 抗血小板活性

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)03-0731-10

Design, synthesis and antiplatelet activity evaluation of novel quinoxaline antagonists of protease activated receptor 4 (PAR4)

XIE Rou-jie, LIU Shang-de, YUAN Duo, LI Shan-shan, ZHU Xiong*

(China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Twenty-five compounds of novel quinoxaline-based scaffold with antiplatelet activity were designed and synthesized on the basis of previous quinoxaline analogues, and the structures were confirmed by ^1H NMR, ^{13}C NMR, and MS. The antiplatelet activity was evaluated, structure-activity relationship (SAR) study was summarized and the selectivity of PAR4 was confirmed by calcium mobilization assays. It was indicated that compound **14a**, **14g**, **13i**, **13p** showed moderate activity against PAR4, especially, the activity of compound **14g** ($\text{IC}_{50} = 0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was 6.7 times than the lead compound **A** ($\text{IC}_{50} = 1.73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Therefore, 2,3-dihydro-[1,4]dioxino[2,3-g]quinoxaline and [1,3]dioxolo[4,5-g]quinoxaline derivatives are promising compounds for the discovery of novel antiplatelet agents. It is worthy of further research to develop highly effective and selective PAR4 antagonists.

Key words: quinoxaline; protease activated receptor 4 antagonist; selectivity; antiplatelet activity

动脉粥样硬化形成的血栓性疾病, 例如缺血性脑卒中和心肌梗死是全球发病率和死亡率较高的疾病之一, 血小板的异常活化和聚集是主要原因^[1]。抗血小板治疗在临床治疗和预防动脉粥样硬化中有重要意义。目前, COX-1 抑制剂阿司匹林、P2Y₁₂ 拮抗剂氯吡

格雷、GPIIb/IIIa 受体拮抗剂替罗非班等广泛用于抗血小板治疗^[2,3]。氯吡格雷与阿司匹林联合用药是临床上抗血小板治疗的标准方法, 可以有效抑制血小板的活化, 但同时也影响了正常的止血^[4]。为优化抗血小板药物的治疗效果, 减少其出血不良反应, 新型抗血小板药物的研究需求日益凸显。

凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶, 目前最强的血小板活化激动剂^[5]。它通过与蛋白酶激活受体 (protease

收稿日期: 2021-08-25; 修回日期: 2021-10-20.

*通讯作者 Tel: 86-25-83271261, E-mail: cpuzx@foxmail.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1236

activated receptor, PARs) 结合发挥作用。目前共发现了 PAR1、PAR2、PAR3 和 PAR4 四种 PARs 受体。其中, 人和哺乳动物血小板表达 PAR1 和 PAR4, 小鼠和大鼠等啮齿动物表达 PAR3 和 PAR4^[6]。人体内凝血酶切割 PAR1 和 PAR4 的 N 端, 产生一个新的锁系配体, 从而激活血小板, 使其发挥作用。1999 年, 文献^[7]报道了人和小鼠的 PAR4 氨基酸序列同源性约 60%。2001 年, Sambrano 等^[8]发现敲除小鼠 PAR-4 基因会使血小板对凝血酶反应完全丧失。这启发了研究者们可以通过阻断 PARs 来预防或治疗血栓疾病。除激活 PARs 受体外, 凝血酶还促进纤维蛋白的形成和蛋白 C 的激活, 所以 PARs 受体拮抗剂可以在保留凝血酶其他功能的同时, 阻断凝血酶活化血小板^[9,10]。因此, PARs 小分子拮抗剂在抗血小板治疗中可能有更大的治疗指数^[11]。

PAR1 包含一个类似水蛭素的结构区域, 使其可以以很低的浓度与凝血酶结合, 是凝血酶的高亲和力受体。Vorapaxar (结构见图 1) 是第一个上市的 PAR1 小分子拮抗剂, 2014 年被 FDA 批准用于预防心肌梗塞和治疗周围动脉疾病^[12]。然而, 因为其可增加有中风史或短暂脑缺血发作史的患者颅内出血的风险, 2016 年 8 月默沙东宣布停止在美国继续推广 Vorapaxar^[13]。随后, PAR4 因和 PAR1 的结构和功能有很大差异而逐渐得到更多的关注。PAR4 缺乏水蛭素样凝血酶结合位点, 使得 PAR4 对凝血酶的敏感度相对较低, 而 PAR4 在凝血酶裂解位点的下游有一个 PAR1 不具备的阴离子序列, 该阴离子序列使得 PAR4 释放更持久的凝血酶信号^[14,15]。PAR4 和 PAR1 在介导凝血酶活化血小板过程中发挥了不同的作用。PAR1 激活和驱动快速的初始信号, 而 PAR4 激活引起较慢但持久的响应^[16,17]。PAR4 主要负责维持血小板分泌和血小板促凝功能^[18]。PAR4 拮抗剂通过抑制血小板活化后期的磷脂酰丝氨酸的暴露和血小板促凝功能预防血栓形成^[19]。这些结果表明, PAR4 拮抗剂可以抑制血栓形成, 同时出血风险相对 PAR1 拮抗剂更低。PAR4 拮抗剂可能成为一种安全有效的抗血小板药物。

迄今为止, 已报道的 PAR4 小分子拮抗剂包括吡啶、吡啶、咪唑并噻二唑、喹啉和喹啉衍生物^[20]。但只有 Bristol-Myers Squibb (BMS) 公司的 BMS-986120 和 BMS-986141 (结构见图 1) 进入了临床试验阶段, 其他化合物均处于临床前研究。2016~2019 年, BMS 的多篇专利报道了以喹啉为结构骨架的衍生物具有抗血小板活性。其中, 先导化合物 A 是专利 WO20171019828 中活性最好的结构, 如图 2 所示。课题组前期实验中, 保留先导化合物 A 的喹啉环, 然后用氧杂环代替 2-甲基得化合物 13i, 发现此类结构仍具有抗血小板活

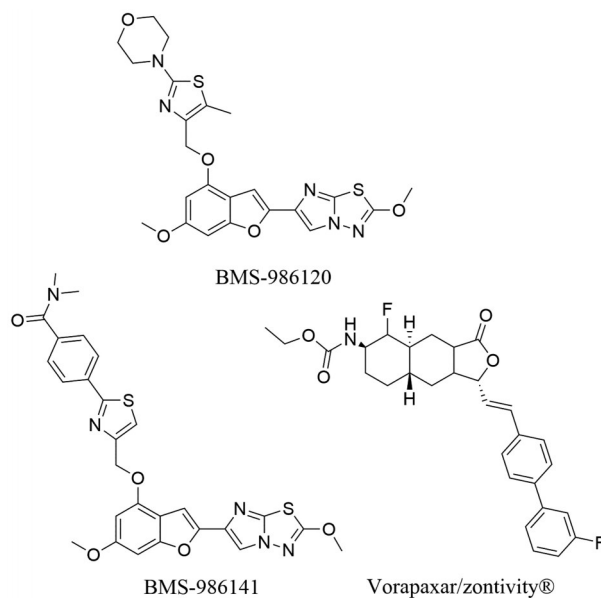


Figure 1 Structures of compounds BMS-986120, BMS-986141, vorapaxar

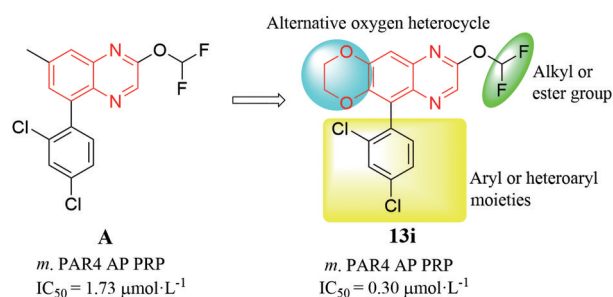


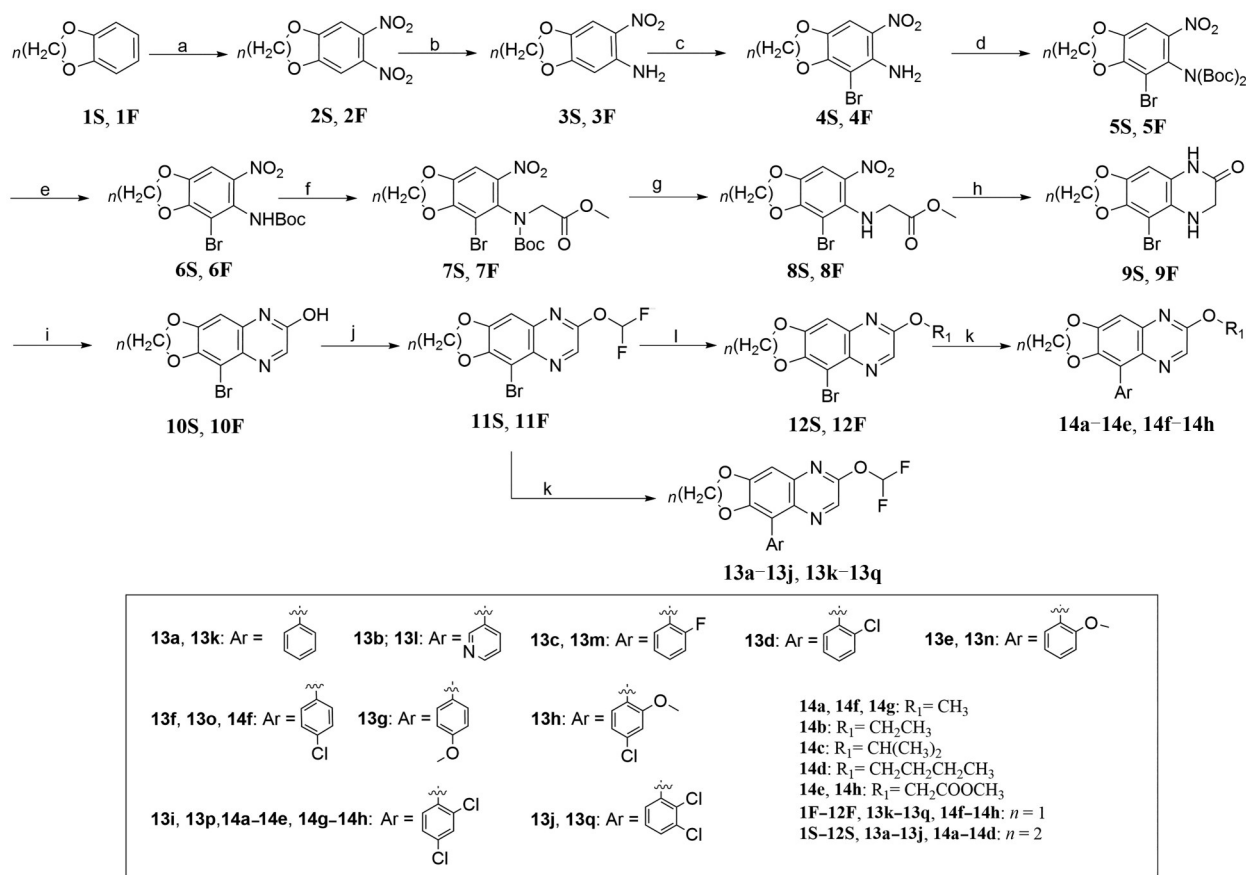
Figure 2 Design of target compounds

性。为继续探究新型 PAR4 小分子拮抗剂, 本文将 8-(二氟甲氧基)-5-芳香基-2,3-二氢萘[2,3-g][1,4]二噁英作为母核, 依次探究 5 位芳香基、8 位烷基、氧杂环对活性的影响。基于以上思路设计合成了 25 个化合物, 并对化合物的生物活性进行评价和构效关系研究。

结果与讨论

1 化学合成

目标化合物的制备方法如路线 1 所示。以 1,4-苯并二噁英或 1,3-亚甲二氧基苯作为起始原料经硝化反应得双硝化产物 2S、2F, 硝基选择性还原产物再经溴代, 氨基的 Boc 保护得中间体 5S、5F, 然后在三氟乙酸作用下脱去一分子 Boc 得中间体 6S、6F, 中间体 6S、6F 在碱性条件下与溴乙酸甲酯进行烷基化, 然后在酸性条件下氨基脱保护得中间体 8S、8F, 再经二氯化锡还原、关环得中间体 9S、9F, 碱性条件下氧化得喹啉环, 羟基亲核取代得中间体 11S、11F, 中间体 11S、11F 再经过烷基化得中间体 12S、12F, 最后, 中间体 11S、



Scheme 1 Synthetic route of compounds. Reagents and conditions: (a) 1) $c.\text{HNO}_3$, AcOH, rt, 0.5 h; 2) Fuming HNO_3 , AcOH, 80 °C, 0.5 h; (b) Fe, AcOH, reflux, 1.5 h; (c) Br_2 , AcOH, rt, 0.5 h; (d) 4-DMAP, (Boc)₂O, THF, rt, 6.0 h; (e) TFA, DCM, rt, 1.0 h; (f) $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_3$, Cs_2CO_3 , DMF, rt, 5.0 h; (g) HCl/EA, rt, 3.0 h; (h) SnCl_2 , $c.\text{HCl}$, MeOH, 70 °C, 2.5 h; (i) H_2O_2 , NaOH, MeOH/ H_2O , 85 °C, 4.5 h; (j) $\text{ClF}_2\text{CCOONa}$, K_2CO_3 , DMF, reflux, 1.0 h; (k) Ar-B(OH)₂, Pd(dppf)Cl₂, Na₂CO₃, toluene/EtOH, reflux, 2.0 h; (l) NaH, R₁-OH, THF, rt, 0.5 h

11F, 12S, 12F与相应的硼酸经 Suzuki-Miyaura 偶联得目标产物, 反应路线共 12 步。阳性药 BMS-986120 参照专利 WO2013163279 合成, 先导化合物 **A** 参照专利 WO20171019828 合成。

25 个目标化合物经检索均未见文献报道, 并采用 ¹H NMR、¹³C NMR、MS 进行结构确证, 见表 1~3。

2 生物活性评价

以 BMS-986120 为阳性药, 本实验合成了 BMS-986120, 并测得其 *m.* PAR4 AP PRP IC₅₀ (以下简称 IC₅₀) 为 0.088 μmol·L⁻¹。小鼠动脉血纯化后得到的富血小板血浆 (platelet-rich plasma, PRP) 用光电比浊法检测目标化合物对 PAR4 激动肽 (agonist peptide, AP) AYPGKF-NH₂ 诱导的血小板聚集的影响, 测得目标化合物的 IC₅₀ 值如表 2、3。

PAR1 和 PAR4 与 G 蛋白 G_q 偶联, G_q 在受体激活时会使细胞钙离子外流增加。人类胚胎肾 (human embryonic kidney, HEK) 293 细胞稳定表达人源 PARs, 可用于筛选 PARs 拮抗剂活性。通过 HEK293 细胞的

荧光成像平板阅读器 (fluorescent imaging platerreader, FLIPR) 钙流实验可检测化合物对人源 PAR1、PAR4 的抑制活性, 从而验证代表性化合物对 PAR1/PAR4 的选择性。测得代表性化合物的 PARs FLIPR IC₅₀ 值如表 4。

2.1 抗血小板活性构效关系 用六元氧杂环代替先导化合物 **A** (IC₅₀ = 1.73 μmol·L⁻¹) 的 2-甲基, 合成了化合物 **13i** (IC₅₀ = 0.30 μmol·L⁻¹), 化合物 **13i** 的活性强于先导化合物 **A**, 说明 8-(二氟甲氧基)-5-芳香基-2,3-二氢萘[2,3-*g*][1,4]二噁英类衍生物具有成为新型抗血小板化合物的潜能。为进一步探究该母核的抗血小板活性, 合成了化合物 **13a**~**13h**、**13j**, 结构与活性见表 1。首先, Ar 选用简单的苯基和吡啶基, 合成了化合物 **13a** (IC₅₀ = 1.89 μmol·L⁻¹)、**13b** (IC₅₀ > 2.00 μmol·L⁻¹), 活性相对较差, 其中苯环的活性略强于吡啶环。为提高活性, 在苯环上引入不同的取代基。比较化合物 **13a** (IC₅₀ = 1.89 μmol·L⁻¹) 和化合物 **13c**~**13g** 可得, 在苯环上引入合适的基团有利于提高活性, 不同的基团对活性影响较大。特别是化合物 **13d** (IC₅₀ = 0.75 μmol·L⁻¹)

Table 1 Spectral data of compounds

Compd	Chemical formula	¹ H NMR, ¹³ C NMR, MS
13a	C ₁₇ H ₁₂ F ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.52 (s, 1H), 7.82 (t, <i>J</i> _{HF} = 72.0 Hz, 1H), 7.51–7.27 (m, 6H), 4.43 (s, 2H), 4.36 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 151.89, 148.34, 143.09, 135.31, 135.09, 134.99, 133.69, 131.80, 127.94, 127.70, 126.38, 115.09, 111.07, 64.61, 64.51. MS (ESI): <i>m/z</i> 331.0 [M+H] ⁺ .
13b	C ₁₆ H ₁₁ F ₂ N ₃ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.60 (s, 1H), 8.12–7.57 (m, 2H), 7.57–7.47 (m, 3H), 7.40 (s, 1H), 4.46 (s, 2H), 4.40 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 152.07, 151.92, 148.63, 148.37, 143.47, 139.31, 135.65, 135.19, 134.80, 129.58, 123.28, 122.71, 115.09, 111.72, 64.71, 64.64. MS (ESI): <i>m/z</i> 332.1 [M+H] ⁺ .
13c	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, chloroform- <i>d</i>) δ 8.41 (d, <i>J</i> = 4.9 Hz, 1H), 7.75 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, <i>J</i> = 15.5, 7.0 Hz, 3H), 7.27 (dq, <i>J</i> = 22.1, 8.6, 7.6 Hz, 2H), 4.43 (s, 2H), 4.38 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 135.66, 135.02, 134.99, 133.74, 133.71, 130.43, 130.36, 124.25, 124.23, 121.56, 120.33, 115.79, 115.62, 115.13, 111.77, 64.68. MS (ESI): <i>m/z</i> 349.1 [M+H] ⁺ .
13d	C ₁₇ H ₁₁ ClF ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.53 (s, 1H), 7.94 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.1 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.43 (s, 4H), 4.41 (d, <i>J</i> = 16.4 Hz, 4H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 148.26, 143.53, 135.60, 134.99, 134.15, 133.39, 133.34, 129.91, 129.42, 127.11, 123.78, 115.13, 111.69, 64.73, 64.63. MS (ESI): <i>m/z</i> 365.0 [M+H] ⁺ .
13e	C ₁₈ H ₁₄ F ₂ N ₂ O ₄	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.52 (s, 1H), 7.93 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.0 Hz, 1H), 7.75–7.50 (m, 3H), 7.48–7.29 (m, 2H), 4.41 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.84 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 157.12, 155.91, 150.85, 145.14, 139.85, 133.03, 131.28, 130.55, 129.95, 125.50, 123.57, 122.08, 116.06, 111.69, 105.53, 63.56, 63.47, 55.80. MS (ESI): <i>m/z</i> 325.1 [M+H] ⁺ .
13f	C ₁₇ H ₁₁ ClF ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, Chloroform- <i>d</i>) δ 8.41 (s, 1H), 7.74 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.1 Hz, 1H), 7.49 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 2H), 7.45–7.23 (m, 3H), 4.42 (s, 2H), 4.38 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 151.97, 148.35, 143.15, 135.44, 135.13, 134.79, 133.69, 132.67, 132.48, 128.02, 124.92, 115.09, 111.37, 64.62.
13g	C ₁₈ H ₁₄ F ₂ N ₂ O ₄	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.53 (s, 1H), 7.83 (t, <i>J</i> _{HF} = 71.9 Hz, 1H), 7.40–7.28 (m, 3H), 7.03 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 3.84 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 159.07, 151.87, 151.85, 151.82, 148.37, 143.07, 135.15, 135.11, 133.04, 126.19, 125.56, 115.10, 113.49, 110.74, 64.61, 64.48, 55.58. MS (ESI): <i>m/z</i> 361.1 [M+H] ⁺ , 383.0 [M+Na] ⁺ , 399.0 [M+K] ⁺ .
13h	C ₁₈ H ₁₃ ClF ₂ N ₂ O ₄	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.49 (s, 1H), 7.81 (t, <i>J</i> _{HF} = 71.9 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.21 (s, 2H), 7.10 (s, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.66 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 159.07, 148.37, 143.07, 135.15, 135.11, 133.04, 126.19, 125.56, 115.10, 113.49, 110.74, 64.61, 64.48, 55.58. MS (ESI): <i>m/z</i> 395.0 [M+H] ⁺ , 417.0 [M+Na] ⁺ , 433.0 [M+K] ⁺ .
13i	C ₁₇ H ₁₀ Cl ₂ F ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.54 (d, <i>J</i> _{HF} = 5.6 Hz, 1H), 7.93 (dd, <i>J</i> _{HF} = 72.0, 5.5 Hz, 1H), 7.78–7.68 (m, 1H), 7.63–7.48 (m, 1H), 7.47–7.35 (m, 2H), 4.41 (d, <i>J</i> = 18.3 Hz, 4H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 155.91, 150.67, 143.05, 139.85, 136.76, 133.56, 133.03, 131.89, 131.66, 131.28, 130.85, 127.64, 121.48, 116.06, 108.40, 63.56, 63.47. MS (ESI): <i>m/z</i> 400.0 [M+H] ⁺ .
13j	C ₁₇ H ₁₀ Cl ₂ F ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.53 (s, 1H), 8.13–7.54 (m, 2H), 7.45 (s, 2H), 7.36 (s, 1H), 4.44 (s, 2H), 4.38 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 152.13, 148.27, 143.48, 135.92, 135.81, 135.01, 134.74, 132.31, 132.14, 131.96, 130.42, 128.25, 123.29, 115.12, 111.98, 64.74. MS (ESI): <i>m/z</i> 400.0 [M+H] ⁺ .
13k	C ₁₆ H ₁₀ F ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.57 (s, 1H), 7.93 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.0 Hz, 1H), 7.61 (d, <i>J</i> = 6.9 Hz, 2H), 7.48 (dd, <i>J</i> = 14.4, 6.8 Hz, 3H), 7.33 (s, 1H), 6.30 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 151.92, 151.80, 147.53, 137.84, 136.31, 133.81, 132.25, 131.42, 128.29, 128.27, 117.79, 115.18, 103.35, 103.02. MS (ESI): <i>m/z</i> 317.0 [M+H] ⁺ .
13l	C ₁₅ H ₉ F ₂ N ₃ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.83 (s, 1H), 8.68–8.58 (m, 2H), 8.06 (d, <i>J</i> = 9.5 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.63–7.51 (m, 1H), 7.39 (s, 1H), 6.34 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 152.09, 151.87, 151.52, 149.12, 148.01, 138.73, 137.88, 136.04, 134.09, 128.35, 123.55, 115.17, 114.25, 103.67, 103.60. MS (ESI): <i>m/z</i> 318.1 [M+H] ⁺ .
13m	C ₁₆ H ₉ F ₃ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.56 (s, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.0 Hz, 1H), 7.75–7.49 (m, 3H), 7.48–7.29 (m, 2H), 6.32 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 158.89, 156.87, 155.91, 150.10, 147.08, 139.85, 133.03, 131.28, 130.73, 129.53, 124.43, 121.24, 118.21, 116.97, 116.17, 113.92, 104.90, 101.74. MS (ESI): <i>m/z</i> 335.1 [M+H] ⁺ .
13n	C ₁₇ H ₁₂ F ₂ N ₂ O ₄	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.52 (s, 1H), 7.93 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.0 Hz, 1H), 7.75–7.50 (m, 3H), 7.48–7.29 (m, 2H), 6.32 (s, 2H), 3.84 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 157.12, 155.91, 149.95, 148.33, 139.85, 133.03, 131.28, 130.55, 129.95, 125.50, 122.08, 119.84, 116.06, 111.69, 102.66, 101.74, 55.80. MS (ESI): <i>m/z</i> 311.1 [M+H] ⁺ .
13o	C ₁₆ H ₉ ClF ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.58 (s, 1H), 7.93 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.0 Hz, 1H), 7.66 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 2H), 7.57 (d, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (s, 1H), 6.31 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 151.99, 151.84, 147.64, 137.86, 136.06, 133.90, 133.21, 133.14, 131.07, 128.38, 116.33, 113.13, 103.51, 103.30. MS (ESI): <i>m/z</i> 352.0 [M+H] ⁺ .
13p	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ F ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, chloroform- <i>d</i>) δ 8.40 (s, 1H), 7.72 (d, <i>J</i> _{HF} = 72.2 Hz, 2H), 7.50–7.32 (m, 2H), 7.28 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 1H), 6.21 (s, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, chloroform- <i>d</i>) δ 151.14, 147.46, 137.76, 135.37, 135.24, 133.80, 133.26, 129.90, 129.70, 127.02, 113.79, 104.04, 102.73. MS (ESI): <i>m/z</i> 385.9 [M+H] ⁺ .

Continued

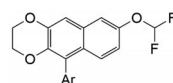
Compd	Chemical formula	¹ H NMR, ¹³ C NMR, MS
13q	C ₁₆ H ₈ Cl ₂ F ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.54 (s, 1H), 8.12–7.66 (m, 2H), 7.62–7.30 (m, 3H), 6.31 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz, 2H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 151.77, 147.85, 137.49, 136.42, 134.25, 132.42, 132.28, 131.88, 130.97, 128.45, 115.18, 115.02, 103.88. MS (ESI): <i>m/z</i> 385.9 [M+H] ⁺ .
14a	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.31 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.50 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.39 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 4.39 (s, 2H), 4.34 (s, 2H), 3.99 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 157.20, 147.31, 141.81, 137.27, 136.00, 135.29, 134.65, 133.55, 132.98, 128.93, 127.28, 111.77, 64.69, 64.60, 53.93. MS (ESI): <i>m/z</i> 364.0 [M+H] ⁺ .
14b	C ₁₈ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.28 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.38 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 4.56–4.38 (m, 4H), 4.38–4.24 (m, 2H), 1.39 (t, <i>J</i> = 6.9 Hz, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 156.82, 147.26, 141.74, 137.36, 136.03, 135.30, 134.65, 133.54, 133.00, 132.90, 128.92, 127.27, 122.54, 111.75, 64.68, 64.60, 62.34, 14.69. MS (ESI): <i>m/z</i> 378.0 [M+H] ⁺ .
14c	C ₁₉ H ₁₆ Cl ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.27 (s, 1H), 7.42 (m, 4H), 5.34 (s, 1H), 4.31 (m, 4H), 1.37 (m, 6H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 156.34, 147.21, 141.62, 137.66, 136.01, 135.21, 134.58, 133.59, 132.86, 132.66, 128.89, 127.31, 122.50, 111.67, 69.26, 64.66, 64.58, 22.00. MS (ESI): <i>m/z</i> 392.0 [M+H] ⁺ .
14d	C ₂₀ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.29 (s, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.58–7.10 (m, 3H), 4.39 (d, 6H), 1.76 (s, 2H), 1.47 (q, 2H), 0.95 (t, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 155.72, 150.67, 143.05, 141.35, 136.76, 133.56, 133.06, 132.27, 131.89, 131.66, 130.85, 127.64, 121.48, 108.40, 66.69, 63.56, 63.47, 31.49, 19.50, 13.78. MS (ESI): <i>m/z</i> 406.1 [M+H] ⁺ .
14e	C ₁₉ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.43 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.52 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.40 (d, <i>J</i> = 8.2 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.38 (d, <i>J</i> = 16.2 Hz, 4H), 3.71 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 169.52, 155.95, 150.67, 143.05, 141.12, 136.76, 133.87, 133.56, 131.89, 131.86, 131.66, 130.85, 127.64, 121.48, 108.40, 65.79, 63.56, 63.47, 52.24. MS (ESI): <i>m/z</i> 422.0 [M+H] ⁺ .
14f	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.36 (s, 1H), 7.66 (s, 2H), 7.54 (s, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.25 (s, 2H), 4.01 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 157.10, 150.85, 145.91, 138.60, 135.33, 133.68, 133.24, 132.91, 131.55, 128.27, 116.56, 103.37, 102.95, 53.85. MS (ESI): <i>m/z</i> 316.0 [M+H] ⁺ .
14g	C ₁₆ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.32 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.52 (q, <i>J</i> = 8.3 Hz, 2H), 7.34 (s, 1H), 6.25 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 2H), 3.99 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 157.23, 150.76, 146.20, 138.22, 135.59, 135.22, 134.57, 134.19, 134.17, 131.38, 129.22, 127.52, 114.50, 103.90, 103.28, 53.92. MS (ESI): <i>m/z</i> 350.0 [M+H] ⁺ .
14h	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₃	¹ H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 8.45 (s, 1H), 7.53 (t, <i>J</i> _{HF} = 77.6 Hz, 4H), 6.26 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 3.72 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 169.19, 155.69, 151.02, 146.64, 137.75, 135.20, 135.09, 134.76, 134.57, 134.25, 131.25, 123.24, 127.57, 114.45, 103.81, 103.42, 62.74, 52.39. MS (ESI): <i>m/z</i> 408.0 [M+H] ⁺ .
A	C ₁₆ H ₁₀ Cl ₂ F ₂ N ₂ O	¹ H NMR (300 MHz, chloroform- <i>d</i>) δ 8.47 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.42 (d, <i>J</i> = 25.0 Hz, 3H), 7.23 (d, <i>J</i> = 57.3 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 156.79, 140.92, 140.00, 137.84, 134.85, 134.61, 134.14, 133.41, 133.02, 131.50, 130.21, 128.00, 127.43, 127.12, 116.06, 21.59. MS (ESI): <i>m/z</i> 399.1 [M+H] ⁺ .
BMS-986120	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O ₅ S ₂	¹ H NMR (300 MHz, chloroform- <i>d</i>) δ 7.85 (s, 1H), 7.06 (s, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.22 (s, 1H), 3.86 (s, 1H), 3.83 (t, <i>J</i> = 4.7 Hz, 4H), 3.61–3.43 (m, 4H), 2.38 (s, 3H). ¹³ C NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ 169.92, 168.17, 159.13, 155.97, 152.45, 149.59, 143.21, 141.92, 134.94, 121.24, 112.76, 111.68, 98.46, 96.40, 89.50, 65.87, 64.69, 60.89, 56.21, 48.61, 11.11. MS (ESI): <i>m/z</i> 514.2 [M+H] ⁺ .

和 **13e** ($IC_{50} = 0.88 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 活性较化合物 **A** 分别提高了 2.3 倍和 2.0 倍, 说明苯环的 2 位引入氯原子和甲氧基利于提高活性。化合物 **13f** ($IC_{50} = 1.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、**13g** ($IC_{50} = 1.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的活性与化合物 **A** 相当, 低于化合物 **13d** 和 **13e**, 说明苯环单取代时 2 位取代较 4 位取代更利于提高活性。苯环上进行双取代得化合物 **13h**~**13j**, 结果表明苯环 2、4 位二氯取代可使活性显著提高, 化合物 **13i** ($IC_{50} = 0.30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较化合物 **A** 提高了 5.8 倍。

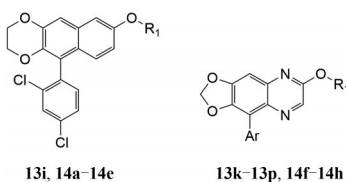
固定 Ar 为 2,4-二氯苯基, 探究 R₁ 对活性的影响, 合成了化合物 **14a**~**14e**。R₁ 的结构及化合物活性见表 2。由化合物 **13i**、**14a**~**14e** 的活性可得, R₁ 为较小的烷基时更利于提高活性。增大烷基的体积, 如异丙

基取代化合物 **14c**、丁基取代化合物 **14d**, IC_{50} 都大于 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 活性显著降低。另外, 将烷基变为酯基如化合物 **14e**, IC_{50} 也大于 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最后, 将母核的六元氧杂环变为五元氧杂环, 合成了化合物 **13k**~**13q** 和 **14f**~**14h**, 结构和活性见表 2。由化合物 **13a**~**13c** 和 **13k**~**13m** 的活性可得, 五元氧杂环的活性与六元氧杂环相当。活性较好的化合物 **13i** ($IC_{50} = 0.30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、**13p** ($IC_{50} = 0.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、**14a** ($IC_{50} = 0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、**14g** ($IC_{50} = 0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 IC_{50} 见图 3。

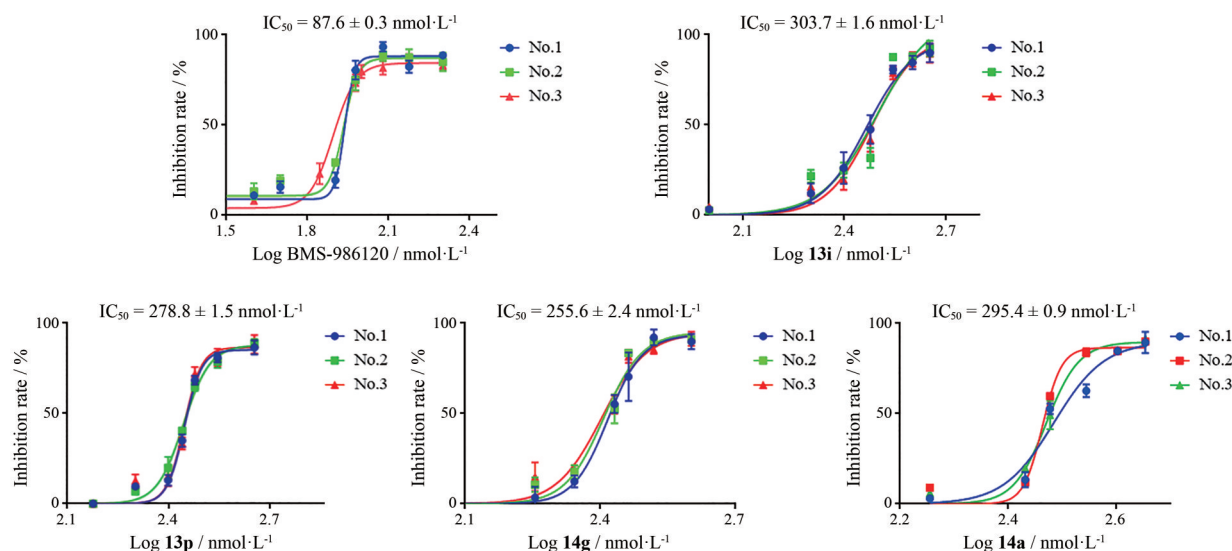
2.2 FLIPR 钙流检测 利用 FLIPR 钙离子外流实验检测代表性化合物 **13i**、**13p**、**14a** 和 **14g** 对人源 PAR1、PAR4 的抑制活性, 以验证代表性化合物对 PAR1/PAR4 的选择性。实验数据如表 4 所示。阳性药 BMS-

Table 2 SAR of 8-(difluoromethoxy)-5-aryl-2,3-dihydronaphtho[2,3-*b*][1,4]dioxine analogues

Compd.	Ar	<i>m.</i> PAR4 AP PRP IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Compd.	Ar	<i>m.</i> PAR4 AP PRP IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
13a	Phenyl	1.89	13f	4-Chlorophenyl	1.58
13b	3-Pyridyl	> 2	13g	4-Methoxyphenyl	1.36
13c	2-Fluorophenyl	1.76	13h	4-Chloro-2-methoxyphenyl	> 2
13d	2-Chlorophenyl	0.75	13i	2,4-Dichlorophenyl	0.30
13e	2-Methoxyphenyl	0.88	13j	2,3-Dichlorophenyl	1.64
BMS-986120		0.088	A		1.73

Table 3 Structures and activities of **13i**, **13k–13p**, **14a–14h**

Compd.	R ₁	Ar	<i>m.</i> PAR4 AP PRP IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	Compd.	R ₁	Ar	<i>m.</i> PAR4 AP PRP IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
13i	CHF ₂	2,4-Dichlorophenyl	0.30	14a	CH ₃	2,4-Dichlorophenyl	0.29
13k	CHF ₂	Phenyl	1.80	14b	CH ₂ CH ₃	2,4-Dichlorophenyl	0.44
13l	CHF ₂	3-Pyridyl	1.97	14c	CH(CH ₃) ₂	2,4-Dichlorophenyl	2.13
13m	CHF ₂	2-Fluorophenyl	1.65	14d	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	2,4-Dichlorophenyl	2.95
13n	CHF ₂	2-Methoxyphenyl	1.86	14e	CH ₂ COOCH ₃	2,4-Dichlorophenyl	2.46
13o	CHF ₂	4-Chlorophenyl	1.43	14f	CH ₃	4-Chlorophenyl	1.20
13p	CHF ₂	2,4-Dichlorophenyl	0.28	14g	CH ₃	2,4-Dichlorophenyl	0.26
13q	CHF ₂	2,3-Dichlorophenyl	1.35	14h	CH ₂ COOCH ₃	2,3-Dichlorophenyl	2.42

**Figure 3** The IC₅₀ of positive control compound BMS-986120 and several optimized compounds. Data are presented as the mean ± SD (*n* = 3)

986120 和代表化合物 **13i**、**13p**、**14a** 及 **14g** 的 PAR4 FLIPR IC₅₀ 值皆在 2~7 nmol·L⁻¹, 而 PAR1 FLIPR IC₅₀ 皆大于 3 000 nmol·L⁻¹, 表明代表性化合物对人源 PAR4 有抑制活性, 但对人源 PAR1 无抑制活性, 说明代表性化合物对 PAR4 有选择性。

3 小结

PAR4 拮抗剂可以有效抑制血栓的形成, 同时不易引起出血并发症, 使其可能成为一种安全有效的抗血小板药物。本文设计了一类具有抗血小板活性的新噻啶母核, 并合成了 25 个目标化合物。以处于临床 I

Table 4 *In vitro* selectivity of BMS-986120 and **13i**, **13p**, **14a**, **14g** in the calcium mobilization assays

Compd.	PARs FLIPR IC ₅₀ values/nmol·L ⁻¹		<i>m</i> . PAR4 AP PRP
	PAR4	PAR1	IC ₅₀ /nmol·L ⁻¹
BMS-986120	0.70 ± 0.05	> 3 000	87.6 ± 0.3
13i	6.32 ± 0.08	> 3 000	303.7 ± 1.6
13p	2.24 ± 0.14	> 3 000	278.8 ± 1.5
14a	5.91 ± 0.23	> 3 000	295.4 ± 0.9
14g	2.04 ± 0.11	> 3 000	255.6 ± 2.4

期的BMS-986120为阳性药,对设计合成的化合物进行抗血小板活性评价、构效关系研究和PAR1/PAR4选择性验证。结果表明,5位苯基单取代时2位的取代优于4位取代,当取代基为2-甲氧基苯基和2-氯苯基时活性提高了2.3和2.0倍;双取代时以2,4-二氯苯基为最佳,活性提高了5.8倍。R₁为较小的烷基时对活性有利。7-烷氧基-4-芳香基-[1,3]二噁唑[4,5-*g*]喹啉类衍生物和8-烷氧基-5-芳香基-2,3-二氢萘[2,3-*b*][1,4]二噁英类衍生物的活性相当。最终得活性较好的化合物**14a**、**14g**、**13i**、**13p**。特别是化合物**14g**,活性是先导化合物**A**的6.7倍,但其活性只是BMS-986120的十分之三。最后验证了代表性化合物**14a**、**14g**、**13i**、**13p**的PAR4选择性。本文发现的以2,3-二氢萘[2,3-*g*]二噁唑[1,4]喹啉和[1,3]二噁唑[4,5-*g*]喹啉为母核的衍生物值得进一步研究,以开发出高效的新型PAR4选择性拮抗剂。

实验部分

实验中所用的试剂及溶剂均为市售分析纯,¹H和¹³C NMR核磁共振以DMSO-*d*₆或CDCl₃为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标,分别采用Bruker AV-300和Bruker AV-500型核磁共振仪测定。MS采用Agilent 1260-6230 TOF LC-MS液质联用仪测定。薄层色谱(TLC)采用烟台华阳新材料科技有限公司的HSGF254硅胶板。血小板聚集测定使用北京泰利康信医疗科技有限公司的AG400型半自动血小板聚集仪;ICR小鼠由南京青龙山动物繁殖场或扬州大学实验动物提供中心提供,动物实验经过中国药科大学实验动物伦理委员会批准;AYPGKF-NH₂、SFLLRR-NH₂采购于肽佳生物科技有限公司。Tyrode缓冲液采购于雷根生物。除有特别注明外,所有试剂和溶剂均直接使用。

1 目标化合物的合成

6,7-二硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英(2S) 60%浓硝酸(90 mL)和冰醋酸(45 mL)充分搅拌混合后冰浴降至0℃,缓慢滴加化合物2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英(**1S**)(20 g, 146.90 mmol),加入完毕后升至室温反应30 min。TLC监测反应。原料反应完后,反应液倾

入冰水中,搅拌30 min后抽滤,滤饼冰水洗涤,烘干。烘干后的中间体溶于冰醋酸(100 mL),缓慢小心滴加冰浴冷却后的发烟硝酸(30 mL)和浓硫酸(4 mL)的混合溶液。滴加完毕后,升至室温反应30 min,后缓慢加热至80℃,剧烈搅拌反应2 h。TLC监测反应。中间体反应完后,反应液降至室温,倾入冰水中,搅拌30 min后抽滤,滤饼冰水洗涤,烘干。干燥后的滤饼加入DCM/乙醚的混合溶液加热重结晶,冷却析晶后过滤得化合物**6,7-二硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英(2S)** 33 g,为淡黄色固体,产率99.3%。中间体(单硝化产物):¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.84~7.76(m, 2H), 6.95(d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 4.35(d, *J* = 6.0 Hz, 4H)。产物(**2S**):¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.46(s, 2H), 4.43(s, 4H)。类似方法合成化合物**2F**。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.31(d, *J* = 13.8 Hz, 2H), 6.29(s, 2H)。

7-硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6-胺(3S) 氮气气氛下,化合物**6,7-二硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英(2S)**(33 g, 145.93 mmol)溶于冰醋酸(200 mL),回流30 min,移除油浴,分批加入还原铁粉(24.5 g, 3.0 eq)。TLC监测反应。原料反应完后,反应液冷却至室温后倾入冰水中,搅拌30 min后过滤产物,滤饼冰水洗涤。洗涤后的滤饼溶于冰醋酸(200 mL),回流10 min,趁热过滤,滤液倾入冰水中,搅拌30 min后过滤产物,滤饼水洗,干燥,得化合物**7-硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6-胺(3S)** 15.5 g,为黄色固体,产率54.1%。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.70(s, 1H), 6.25(s, 1H), 4.33(d, *J* = 3.8 Hz, 2H), 4.27~4.20(m, 2H)。类似方法合成化合物**3F**。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.55(d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 6.33(s, 2H), 6.24(s, 1H), 6.00(d, *J* = 5.7 Hz, 2H)。

5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6-胺(4S) 冰醋酸(50 mL)中加入液溴(13.9 g, 1.1 eq),室温下搅拌10 min。化合物**7-硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6-胺(3S)**(15.5 g, 79.0 mmol)溶于冰醋酸(100 mL)中,室温下滴加液溴的冰醋酸溶液。滴加完成后室温下再搅拌30 min。TLC监测反应。原料反应完后,反应液倾入冰水中,搅拌30 min。抽滤,滤饼水洗,烘干,少量异丙醚打浆,得化合物**5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6-胺(4S)** 18.6 g,为淡黄色固体,产率77.2%。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.80(s, 1H), 6.54(s, 2H), 4.49(m, 2H), 4.25(m, 2H)。类似方法合成化合物**4F**。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ 7.62(s, 1H), 6.85(s, 2H), 6.10(d, *J* = 3.6 Hz, 2H)。

2,2'-(5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[*b*][1,4]二噁英-6)氮杂二基)甲酸叔丁酯(5S) 室温下,化合物**5-溴-7-硝**

基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-胺 (**4S**) (18.6 g, 62.76 mmol) 和 4-二甲氨基吡啶 (1.6 g, 0.2 eq) 溶于 THF, 加入二碳酸二叔丁酯 (36.9 g, 145 mmol), 室温搅拌 2.5 h。TLC 监测反应。反应完成后, 反应液浓缩, PE:EA = 3:1 打浆, 得化合物 2,2'-((5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6) 氮杂二基) 甲酸叔丁酯 (**5S**) 27.9 g。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (s, 1H), 4.50 (dd, *J* = 5.3, 2.5 Hz, 2H), 4.38 (dd, *J* = 5.0, 2.7 Hz, 2H), 1.43 (s, 18H)。类似方法合成化合物 **5F**。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.54 (s, 1H), 6.25 (s, 2H), 1.44 (s, 18H)。

(5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基) 氨基甲酸叔丁酯 (**6S**) 室温下, 化合物 2,2'-((5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6) 氮杂二基) 甲酸叔丁酯 (**5S**) 27.9 g 溶于二氯甲烷 (DCM, 50 mL), 缓慢滴加三氟乙酸 (9 mL), 滴加完成后室温下再搅拌 10 min。TLC 监测反应。反应完成后, 反应液中缓慢加入饱和碳酸氢钠水溶液中和, DCM (100 mL×3) 萃取, 有机相合并, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 得化合物 (5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基) 氨基甲酸叔丁酯 (**6S**) 31.4 g, 为棕色固体, 无需纯化直接下一步 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (s, 1H), 4.50~4.44 (m, 2H), 4.36~4.30 (m, 2H), 1.50 (s, 9H)。类似方法合成化合物 **6F**。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (s, 1H), 6.20 (s, 2H), 1.50 (s, 9H)。

N-((5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-*N*-(叔丁氧基羰基) 甘氨酸甲酯 (**7S**) 化合物 (5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基) 氨基甲酸叔丁酯 (**6S**) (27.9 g, 74.36 mmol) 溶于 DMF (150 mL), 加入碳酸铯 (72.7 g, 3.0 eq), 降至 0 °C, 搅拌 10 min, 缓慢滴加溴乙酸甲酯 (22.8 g, 2.0 eq), 氮气保护。反应液升至室温搅拌 1 h。TLC 监测反应。原料反应完后, 加水, EA (100 mL×3) 萃取, 有机相合并, 冰水洗 3 次, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 异丙醚打浆得化合物 *N*-((5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-*N*-(叔丁氧基羰基) 甘氨酸甲酯 (**7S**) 棕色固体 22.3 g。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (s, 1H), 4.48 (dd, *J* = 7.6, 3.2 Hz, 2H), 4.42~4.31 (m, 2H), 3.73 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 1.38 (s, 9H)。类似方法合成化合物 **7F**。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (s, 1H), 6.24 (d, *J* = 14.8 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 1.47 (d, *J* = 41.3 Hz, 9H)。

(5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基) 甘氨酸甲酯 (**8S**) 化合物 *N*-((5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基)-*N*-(叔丁氧基羰基) 甘氨酸甲酯

(**7S**) (21.7 g) 中滴加 4 mol·L⁻¹ 氯化氢的 EA (50 mL), 室温搅拌 1 h。TLC 监测反应。反应完成后, 反应液浓缩, 加入 EA 复溶后浓缩至干, 异丙醚打浆, 得化合物 (5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基) 甘氨酸甲酯 (**8S**) 橙色固体 18.6 g。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.67 (s, 1H), 4.53~4.46 (m, 2H), 4.39 (s, 2H), 3.58 (d, *J* = 2.8 Hz, 3H), 3.33 (s, 2H)。类似方法合成化合物 **8F**。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.58 (s, 1H), 6.23 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 3.62 (s, 3H)。

10-溴-2,3,8,9-四氢-[1,4]二噁英[2,3-*g*]喹啉-7(6*H*)-酮 (**9S**) 化合物 (5-溴-7-硝基-2,3-二氢苯并[b][1,4]二噁英-6-基) 甘氨酸甲酯 (**8S**) (18.6 g, 53.58 mmol) 溶于甲醇 (150 mL), 滴加浓盐酸 (6 mL), 再分批加入二水合氯化亚锡 (40.7 g, 4.0 eq), 室温下搅拌 10 min, 升温至 70 °C 搅拌 2.5 h。原料反应完后, 反应液降至室温, 滤液缓慢倒入饱和氢氧化钠溶液中, 加入 DCM 溶液有二氯化锡化合物析出, 过滤, 萃取, 有机相水洗。得化合物 10-溴-2,3,8,9-四氢-[1,4]二噁英[2,3-*g*]喹啉-7(6*H*)-酮 (**9S**), 棕色固体 10.0 g。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.18 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 5.31 (s, 1H), 4.19 (d, *J* = 29.2 Hz, 4H), 3.69 (s, 2H)。类似方法合成化合物 **9F**。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.19 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.95 (s, 2H), 5.38 (s, 1H), 3.67 (s, 2H)。

10-溴-2,3-二氢-[1,4]二噁英[2,3-*g*]喹啉-7-醇 (**10S**) 室温下, 化合物 10-溴-2,3,8,9-四氢-[1,4]二噁英[2,3-*g*]喹啉-7(6*H*)-酮 (**9S**) 10 g 溶于甲醇 (50 mL), 加入 4.0 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠水溶液 (30 mL), 缓慢滴加 30% 的过氧化氢水溶液 (80 mL), 室温下搅拌 10 min, 后升至 60 °C 搅拌反应 20 min。升至 85 °C 搅拌反应 1 h, 降至室温, 反应液浓缩至小体积, 加水 (20 mL), 滴加 1 mol·L⁻¹ 盐酸调节 pH = 2~3, 冰浴降温至 0 °C 搅拌 20 min, 抽滤, 滤饼水洗, 少量丙酮:乙醚 = 1:1 的混合溶液洗涤, 烘干, 得化合物 10-溴-2,3-二氢-[1,4]二噁英[2,3-*g*]喹啉-7-醇 (**10S**) 白色固体 10 g。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.31 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 6.77 (s, 1H), 4.39 (d, 4H)。类似方法合成化合物 **10F**。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.07 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.26 (s, 2H)。

5-溴-8-(二氟甲氧基)-2,3-二氢-[1,4]二氧杂[2,3-*g*]喹啉 (**11S**) 化合物 10-溴-2,3-二氢-[1,4]二噁英[2,3-*g*]喹啉-7-醇 (**10S**) (10.0 g, 35.33 mmol) 和无水碳酸钾 (29.3 g) 溶于 DMF (100 mL), 100 °C 下搅拌反应 5 min, 分批加入二氟氯乙酸钠 (26.9 g), 100 °C 下搅拌反应 20 min。TLC 监测反应。原料反应完后, 反应液降至室温, 加水稀释, EA (20 mL×3) 萃取, 有机相合并, 冰

水洗3次,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,浓缩,硅胶柱色谱(PE:DCM = 10:1-2:1),异丙醚打浆,得化合物5-溴-8-(二氟甲氧基)-2,3-二氢-[1,4]二氧杂[2,3-g]啉啉(**11S**) 600 mg,白色固体,产率51.2%。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.70 (s, 1H), 7.81 (t, J_{HF} = 71.7 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 4.54 (dd, J = 5.2, 2.2 Hz, 2H), 4.50~4.44 (m, 2H)。类似方法合成化合物**11F**。¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.68 (s, 1H), 7.80 (t, J_{HF} = 71.7 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 6.42 (s, 2H)。

5-溴-8-烷氧基-2,3-二氢-[1,4]二氧杂[2,3-g]啉啉(12S**)合成通法** 冰浴加入60%氢氧化钠和相应的醇(2 mL)溶于DMF,室温下搅拌30 min,再加入5-溴-8-(二氟甲氧基)-2,3-二氢-[1,4]二氧杂[2,3-g]啉啉(**11S**) 0.5 g,室温反应,TLC监控反应。原料反应完后,加水稀释,EA(20 mL×3)萃取,有机相合并,冰水洗3次,饱和食盐水洗,无水硫酸钠干燥,硅胶柱色谱分离。产率70%~80%,皆为白色固体。

目标化合物合成通法 化合物**12Sa**~**12Sf**、**12Fa**、**12Ff**(0.5 g, 1.0 eq)和不同的硼酸(4.0 eq)溶于甲苯(3 mL)和乙醇(1 mL),严格氮气保护,加入[1,1'-双(二苯基膦基)二茂铁]二氯化钡(0.02 eq)和2 mol·L⁻¹碳酸钠水溶液(3.0 eq),升温回流反应30 min~12 h,TLC监测反应。反应完后,反应液降至室温,加EA/H₂O分液,有机相无水硫酸钠干燥,浓缩,硅胶柱色谱得目标化合物,少量异丙醚打浆后得到纯品。产率40%~70%,皆为白色固体。

2 生物活性测试

2.1 小鼠PRP制备 健康ICR小鼠腹腔注射5%水合氯醛,以6 mL·kg⁻¹的剂量麻醉大约5~10 min。此时小鼠呼吸变缓,呼吸方式以腹式呼吸为主,肌肉不再紧绷且眼脸反射消失,对严重刺激都不产生有害反射,表示小鼠已经麻醉。将麻醉好的小鼠固定在纸板上,沿着腹部中央剪开皮肤与腹膜,使腹腔暴露。左手轻柔地将小鼠内脏剥到左侧,暴露腹部主动脉。右手持吸有0.1 mL抗凝剂的2.5 mL注射器,针孔朝下30°角刺入腹主动脉,然后将针头放平,右手固定针管和针头不动,左手缓缓拉注射器活塞,使得血液缓慢进入注射器中,直到有阻力使其停止。拔出注射器,轻柔上下颠匀注射管中的血液和抗凝剂。将全血收集于抗凝剂润洗过的15 mL硅烷化管中,并置于37 °C水浴锅中保温,直至血样采集完毕。小鼠全血用生理盐水稀释(血/生理盐水 = 3:1)后,1 080 r·min⁻¹离心10 min,取上层血浆即PRP(platelet-rich plasma)于生理盐水润洗过的硅烷化管,37 °C水浴静置备用。吸取PRP后剩余部分3 000 r·min⁻¹离心5 min,上层即为PPP(platelet-poor

plasma),吸取PPP于生理盐水润洗后的15 mL硅烷化管中,37 °C水浴静置备用。

2.2 血小板聚集实验 吸取300 μL Tyrode's buffer于干净的测试杯中,置于血小板聚集测试区调零(仪器需要提前预热至37 °C)。再准确吸取270 μL PRP(已用PPP调整血小板数量级每毫升3×10⁸个)悬液于预热槽中,分别加入20 μL生理盐水或者不同浓度的待测样品,37 °C孵育5 min后置于测试区,向测试杯中依次加入磁珠和10 μL AYPGKF-NH₂诱导剂后立即开始测试其聚集率,最终聚集仪显示5 min内血小板的最大聚集率。抑制率(%) = [(阴性组血小板最大聚集率 - 样品组血小板最大聚集) / 阴性组血小板最大聚集率]。使用软件Graphpad Prism 7.0,以不同浓度下样品抑制率计算IC₅₀。

2.3 HEK293细胞的荧光成像平板阅读器(FLIPR)钙流检测实验 HEK293/ga15/PAR1和a PAR1 AP(SFFLRR-NH₂)用于检测PAR1的抑制活性。HEK293/ga15/PAR4和a PAR4 AP(AYPGKF-NH₂)用于检测PAR4的抑制活性。将培育好的细胞基质液按每孔30 mL加入至384孔透明底黑板中,30 min后离心1 min。用细胞解离液消化HEK293/Ga15/PARs细胞。然后每孔45 000个细胞铺板,37 °C、5% CO₂孵育24 h。孵育完成后,去除培养基将配置好的缓冲液以每孔100 μL的量迅速加入,37 °C、5% CO₂避光继续孵育60 min。将样品化合物溶解在DMSO中,用HBSS缓冲液将浓度稀释到4%,再每孔添加25 μL稀释液,空白组加入25 μL的HBSS,室温下避光孵育15 min。孵育完成后,将384孔板置于FlexStation读板仪(Molecular Devices Co., USA)上,每孔加入25 μL的PAR AP溶液,测定各孔的相对荧光强度,计算样品化合物的抑制率。通过测定不同浓度下的抑制率,可通过GraphPad Prism 7.0进行数据处理,计算其IC₅₀。

作者贡献: 所有作者都对化合物的设计做出了贡献;朱雄是本文的通讯作者;谢柔洁是本文的第一作者,负责实施实验、整理数据及撰写稿件;刘尚德负责提出研究思路、设计实验方案和整体把关、修改稿件;袁铎和李杉杉负责指导稿件的撰写和修改。

利益冲突: 本文的研究内容无任何利益冲突。

References

- [1] Michelson, Lan DA. Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9: 154.
- [2] Franchi F, Angiolillo DJ. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome [J]. Nat Rev Cardiol, 2015, 12: 30-47.

- [3] Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S, et al. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y₁₂ antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin [J]. *Eur Heart J*, 2006, 27: 1038-1047.
- [4] Li SS, Zhu X. Research progress on protease-activated receptor antagonists in the field of antiplatelet [J]. *J Pharm Res (药学研究)*, 2019, 38: 543-549.
- [5] Connolly TM, Condra C, Feng DM, et al. Species variability in platelet and other cellular responsiveness to thrombin receptor-derived peptides [J]. *J Thromb Haemost*, 1994, 72: 627-633.
- [6] Gemma V, Manuel G, Monika A, et al. Intracellular platelet signalling as a target for drug development [J]. *Vasc Pharmacol*, 2018, 111: 22-25.
- [7] Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96: 11023-11027.
- [8] Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, et al. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis [J]. *Nature*, 2001, 413: 74-78.
- [9] Judge HM, Jennings LK, Moliterno DJ, et al. PAR1 antagonists inhibit thrombin-induced platelet activation whilst leaving the PAR4-mediated response intact [J]. *Platelets*, 2015, 26: 236.
- [10] French SL, Arthur JF, Lee H, et al. Inhibition of protease-activated receptor 4 impairs platelet procoagulant activity during thrombus formation in human blood [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14: 1642-1654.
- [11] Bulani Y, Sharma S. Therapeutic potential of targeting protease activated receptors in cardiovascular diseases [J]. *Curr Pharm Design*, 2015, 21: 4392-4399.
- [12] Poole RM, Elkinson S. Vorapaxar: first global approval [J]. *Drugs*, 2014, 74: 1153-1163.
- [13] Vranckx P, White HD, Huang Z, et al. Validation of BARC bleeding criteria in patients with acute coronary syndromes [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67: 2135-2144.
- [14] Covic L, Gresser AL, Kuliopulos A. Biphasic kinetics of activation and signaling for PAR1 and PAR4 thrombin receptors in platelets [J]. *Biochemistry*, 2000, 39: 5458-5467.
- [15] Hosokawa K, Ohnishi T, Miura N, et al. Antithrombotic effects of PAR1 and PAR4 antagonists evaluated under flow and static conditions [J]. *Thromb Res*, 2014, 133: 66-72.
- [16] Wong PC, Seiffert D, Bird JE, et al. Blockade of protease-activated receptor-4 (PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding [J]. *SciTransl Med*, 2017, 9: f5294.
- [17] Covic L, Singh C, Smith H, et al. Role of the PAR4 thrombin receptor in stabilizing platelet-platelet aggregates as revealed by a patient with Hermansky-Pudlak syndrome [J]. *J Thromb Haemost*, 2002, 87: 722-727.
- [18] Jacques SL, Kuliopulos A. Protease-activated receptor-4 uses dual prolines and an anionic retention motif for thrombin recognition and cleavage [J]. *Biochem J*, 2003, 376: 733.
- [19] Su X, Su W, He Z, et al. Tripeptide SQL inhibits platelet aggregation and thrombus formation by affecting PI3K/Akt signaling [J]. *Cardiovasc Pharmacol*, 2015, 66: 254-260.
- [20] Liu S, Li S, Yuan D, et al. Protease activated receptor 4 (PAR4) antagonists: research progress on small molecules in the field of antiplatelet agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 209: 112893.