

具有四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡嗪骨架 凝血酶抑制剂的设计合成及生物活性研究

陈东星¹, 施锦渝², 陈秋芳², 张 芮²,
龚国清², 徐云根^{1,2}, 朱启华^{1,2}

(1. 中国药科大学江苏省药物分子设计与成药性优化重点实验室, 2. 药学院, 南京 210009)

摘要 以具有四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡嗪新骨架的凝血酶抑制剂 **1** 为先导化合物, 设计合成了 14 个氨基甲酸酯衍生物 (**2a~6a**, **2b~6b** 和 **7~10**). 同时, 在化合物 **1** 结构的基础上, 引入具有抗血栓活性的川芎醇 (HTMP), 设计合成了新型结构的化合物 **11**. 目标化合物的结构均经 ¹H NMR, ¹³C NMR 和 HRMS 确证. 生物活性测试结果显示, 所有目标化合物对凝血酶诱导的血小板聚集均有一定的抑制活性, 其中化合物 **4b** 的抑制活性 [$IC_{50} = (0.11 \pm 0.08) \mu\text{mol/L}$] 强于对照药达比加群酯 [$IC_{50} = (0.60 \pm 0.05) \mu\text{mol/L}$]. 在体内抗血栓活性测试中, 化合物 **4b** 能以剂量依赖的方式减少大鼠静脉血栓的形成. 化合物 **11** 对凝血酶诱导的血小板聚集的抑制活性较弱, 但其抑制大鼠静脉血栓形成的作用与达比加群酯相当, 这可能是由于化合物 **11** 在体内水解为川芎醇和化合物 **1**, 两者协同产生抗血栓作用所致.

关键词 苯并咪唑; 凝血酶抑制剂; 抗血栓

中图分类号 O626 **文献标志码** A

血栓性疾病严重危害着人类健康, 已成为全球致死率最高的疾病^[1]. 凝血酶抑制剂作为新型的抗凝药物, 在临床抗血栓应用中发挥着越来越重要的作用^[2-7]. 达比加群酯 (DE) 是一种前药, 口服吸收后可在体内转化为具有直接抗凝血活性的达比加群 (Dabigatran) 而发挥药效. 作为口服直接凝血酶抑制剂, 达比加群酯疗效显著、耐受性良好, 与其它抗凝药物相比具有明显优势, 如无需细胞色素 P450 酶或其它氧化还原酶参与代谢, 与其它药物及食物间相互作用小, 用药安全性高等^[8-13]. 本课题组^[14-17]通过生物电子等排、骨架迁越及杂合等原理, 设计合成了一系列达比加群 (酯) 类似物, 丰富了该类化合物抗血栓的构效关系. 其中, 化合物 **1** 在将达比加群分子中的苯并咪唑骨架替换为 1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡嗪骨架的同时, 为了进一步提高分子的生物活性和成药性, 减少分子中的杂原子数, 根据达比加群酯类化合物的构效关系^[11,17], 再将分子中的吡啶环替换为苯环, 得到结构新颖的凝血酶抑制剂. 体外药理筛选结果显示, 化合物 **1** 具有与达比加群相当的凝血酶抑制活性.

本文以化合物 **1** 为先导物, 对其分子中的脒基和羧基进行前药化修饰, 期望改善其药效和药代动力学性质, 设计得到了系列衍生物 **2a~6a** 和 **2b~6b** (如 Scheme 1 所示). 为考察吡嗪环上 2-NH 的氢原子对活性的影响, 对化合物 **1** 进行甲基化修饰, 得到化合物 **7**, 再对化合物 **7** 进行前药化修饰得到衍生物 **8~10** (如 Scheme 1 所示). 川芎嗪 (TMP) 是一种中草药有效成分, 其在生物体内的活性代谢产物川芎醇 (HTMP) 具有抗血小板聚集、抗凝和抗血栓形成的作用^[18]. 将化合物 **1** 与 HTMP 制成孪药化合物 **11** (如 Scheme 2 所示), 期望在体内通过抑制凝血酶和抗血小板聚集而产生协同作用. 对各目标化合物的体外凝血酶抑制活性进行了研究, 在此基础上测定了部分目标化合物的体内抗血栓活性, 并进行了初步的构效关系分析.

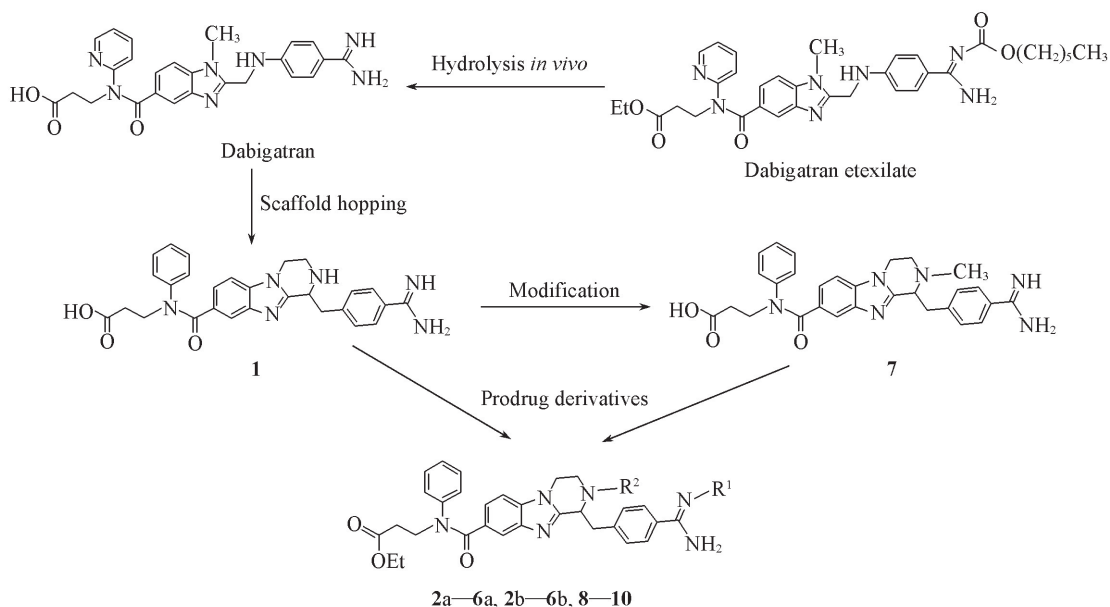
收稿日期: 2016-11-16. 网络出版日期: 2017-05-23.

基金项目: 国家自然科学基金 (批准号: 21272277) 和江苏高等学校优秀科技创新团队 (2015 年) 资助.

联系人简介: 徐云根, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事抗肿瘤、镇痛抗炎和心血管疾病方面的研究.

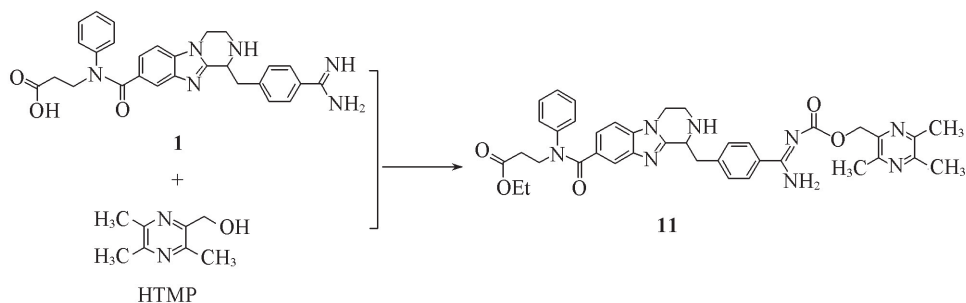
E-mail: xyg@cpu.edu.cn

朱启华, 男, 博士, 副教授, 主要从事抗肿瘤和心血管疾病方面的研究. E-mail: zhuqihua@cpu.edu.cn



$R^1 = \text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (2a, 2b); $\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (3a, 3b); $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$ (4a, 4b, 8); $\text{COO}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ (5a, 5b); $\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ (6a, 6b, 10); $\text{COO}(\text{CH}_2)_5\text{CH}_3$ (9); $R^2 = \text{H}$ (2a, 3a, 4a, 5a, 6a); $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ (2b); $\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (3b); $\text{COOC}(\text{CH}_3)_3$ (4b); $\text{COO}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ (5b); $\text{COOCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ (6b); CH_3 (8, 9, 10)

Scheme 1 Design and structures of dabigatran etexilate, dabigatran and compounds 1—10



Scheme 2 Design and structure of compound 11

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

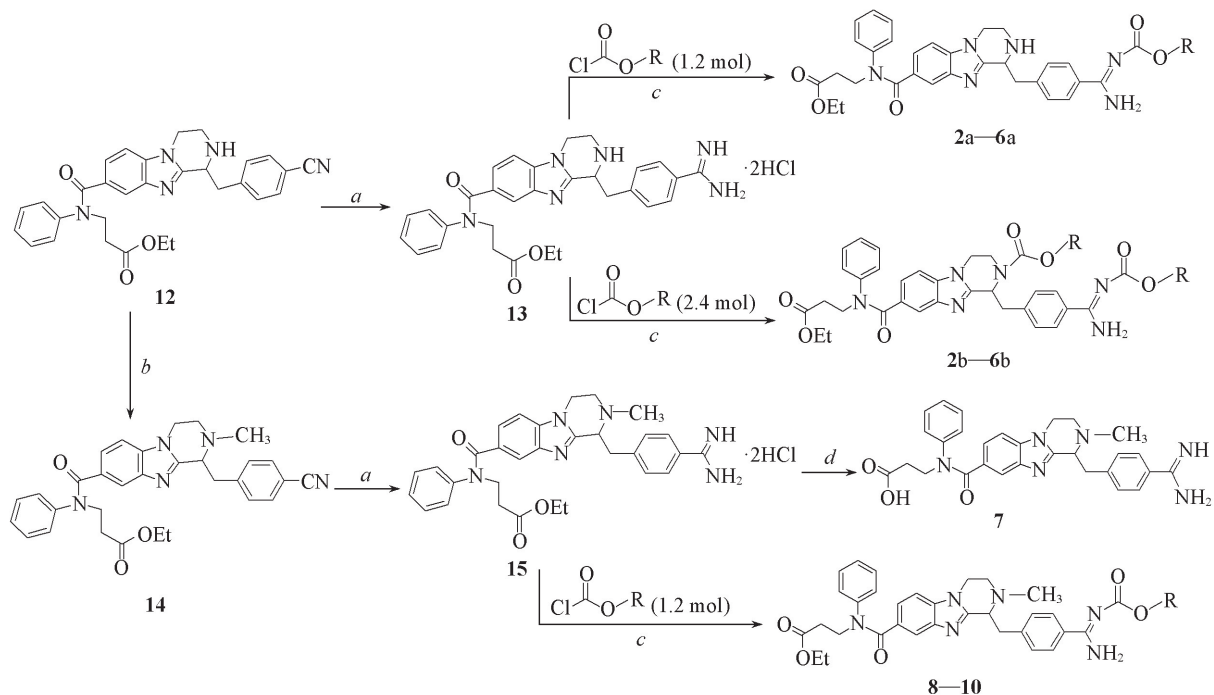
实验所用试剂均为分析纯或化学纯.

RY-1 型熔点仪 (天津市分析仪器厂); Nicolet Impact 410 型红外光谱仪 (美国 Nicolet 公司); AVANCE AV-30 型核磁共振波谱仪 (瑞士 Bruker 公司); Agilent 1100 系列 LC/MSD Trap SL (美国 Agilent 公司); HSGF254 型高效薄层板 (烟台市化学工业研究所); 柱层析硅胶 (试剂级, 200~300 目, 安徽良辰硅源有限公司).

1.2 实验过程

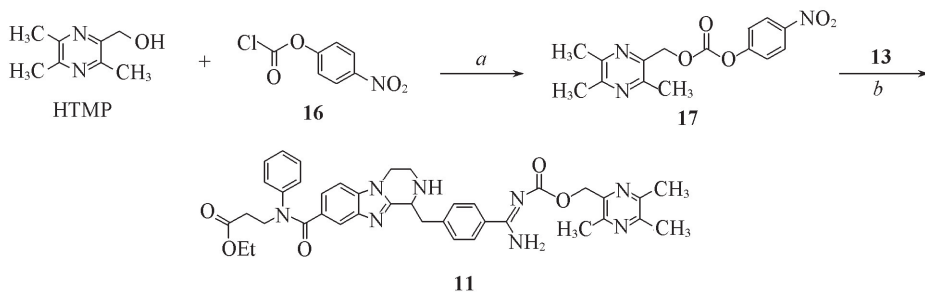
目标化合物的合成路线如 Scheme 3 和 Scheme 4 所示.

1.2.1 中间体 **13** 的合成 参照文献[17]方法合成中间体 **13**, 白色固体, 产率 38.7%, m. p. 186~188 °C. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6), δ : 9.22 (s, 2H), 8.90 (s, 2H), 7.70 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.43 (s, 1H), 7.30~7.24 (m, 1H), 7.22 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.18~7.14 (m, 2H), 7.14~7.12 (m, 1H), 7.12~7.07 (m, 1H), 4.32~4.22 (m, 1H), 4.08 (t, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.04~3.99 (m, 1H), 3.96 (q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.91~3.81 (m, 1H), 3.58~3.47 (m, 1H), 3.27~3.18 (m, 1H), 3.08~2.92 (m, 2H), 2.58 (t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.11 (t, $J=7.2$ Hz, 3H).



Scheme 3 Synthetic routes of target compounds 2a—6a, 2b—6b, 7—10

Reagents and conditions: a. i: HCl, EtOH, $-5-0^{\circ}\text{C}$, 6 h; ii: $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, EtOH, 25°C , 12 h, 38.7%; b. CH_3I , K_2CO_3 , DMF, r. t., 88.6%; c. K_2CO_3 , THF/ H_2O , $0-25^{\circ}\text{C}$, 1 h, 40.3%—66.0%; d. i: LiOH, EtOH, H_2O , 2 h; ii: $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, pH=6.0, 29.9%.



Scheme 4 Synthetic routes of target compound 11

Reagents and conditions: a. Pyridine, CH_2Cl_2 , 0°C to r. t., 12 h, 82.1%; b. K_2CO_3 , THF/ H_2O , 0°C to r. t., 12 h, 35.7%.

1.2.2 中间体 **14** 的合成 向 100 mL 单颈瓶中加入中间体 **12** (2.00 g, 3.94 mmol)、碘甲烷 (0.60 g, 4.30 mmol)、碳酸钾 (1.10 g, 8.20 mmol) 和丙酮 35.0 mL, 室温 (25°C) 下搅拌反应 12 h, 过滤、浓缩, 残留物经柱层析 [$V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=50:1$] 分离得淡黄色固体 1.82 g, 收率 88.6%, m. p. $72-74^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3), δ : 7.71 (s, 1H), 7.60 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.34~7.28 (m, 1H), 7.23~7.15 (m, 2H), 7.15~7.03 (m, 4H), 4.38 (dd, $J=10.2, 3.6$ Hz, 1H), 4.31~4.20 (m, 2H), 4.07 (q, $J=7.2$ Hz, 2H), 4.03~3.92 (m, 2H), 3.76 (dd, $J=14.2, 3.4$ Hz, 1H), 3.45~3.33 (m, 1H), 3.26~3.02 (m, 2H), 2.80~2.67 (m, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.22 (t, $J=7.1$ Hz, 3H).

1.2.3 中间体 **15** 的合成 以中间体 **14** (1.00 g, 1.92 mmol) 为原料, 采用与中间体 **13** 类似的制备方法, 得白色固体 0.47 g, 收率 41.3%, m. p. $124-126^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$), δ : 9.29 (s, 2H), 9.13 (s, 2H), 7.62 (d, $J=8.1$ Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.32 (d, $J=7.9$ Hz, 2H), 7.29~7.08 (m, 7H), 4.17~4.10 (m, 1H), 4.07 (t, $J=7.0$ Hz, 2H), 4.05~3.98 (m, 2H), 3.96 (q, $J=7.0$ Hz,

2H), 3.86~3.75(m, 1H), 3.27~3.18(m, 1H), 3.18~3.10(m, 1H), 2.91~2.74(m, 1H), 2.57(t, $J=6.6$ Hz, 2H), 2.39(s, 3H), 1.11(t, $J=7.1$ Hz, 3H).

1.2.4 中间体 **17** 的合成 向 100 mL 三颈瓶中加入 HTMP(0.30 g, 1.97 mmol)、氯甲酸对硝基苯酯(0.44 g, 2.17 mmol)和二氯甲烷 30.0 mL, 冰浴冷却至 0 °C, 缓慢滴加 10.0 mL 吡啶(0.23 g, 2.96 mmol)的二氯甲烷溶液后, 将温度缓慢升至室温, 继续反应 12 h. 反应液依次用饱和碳酸氢钠溶液和 NaCl 溶液洗涤, 有机相用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 浓缩至干, 残留物经柱层析[$V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=2:1$]分离得淡黄色固体 0.50 g, 收率 82.1%, m. p. 50~52 °C. $^1\text{H NMR}(300 \text{ MHz}, \text{DMSO}-d_6)$, δ : 8.33(d, $J=9.1$ Hz, 2H), 7.59(d, $J=9.1$ Hz, 2H), 5.40(s, 2H), 2.47(s, 6H), 2.42(s, 3H).

1.2.5 目标化合物 **2a** 的合成 向 100 mL 茄形瓶中加入中间体 **13**(0.50 g, 0.84 mmol)、碳酸钾(0.69 g, 5.02 mmol)、四氢呋喃(25.0 mL)和水(5.0 mL), 冰浴(0 °C)下搅拌反应 30 min 后, 加入氯甲酸乙酯(0.11 g, 1.00 mmol), 于 25 °C 搅拌反应 30 min, 静置分层, 取四氢呋喃层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 残留物经柱层析[$V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=50:1$]分离, 得 0.22 g 白色固体 **2a**, 收率 44.2%. 参照化合物 **2a** 的合成方法, 采用相应的氯甲酸酯制得化合物 **3a~6a**, 以中间体 **15** 和相应的氯甲酸酯为原料, 参考化合物 **2a** 的合成方法制得化合物 **8~10**.

1.2.6 目标化合物 **2b** 的合成 向 100 mL 茄形瓶中加入中间体 **13**(0.50 g, 0.84 mmol)、碳酸钾(0.92 g, 6.70 mmol)、四氢呋喃(25.0 mL)和水(10.0 mL), 冰浴(0 °C)下搅拌反应 30 min 后, 加入氯甲酸乙酯(0.22 g, 2.00 mmol), 于 25 °C 下搅拌反应 30 min, 静置分层, 取四氢呋喃层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 残留物经柱层析[$V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=70:1$]分离, 得 0.27 g 白色固体 **2b**, 收率 48.3%. 参照化合物 **2b** 的合成方法, 采用相应的氯甲酸酯制得化合物 **3b~6b**.

1.2.7 目标化合物 **7** 的合成 参照文献[19]方法合成目标化合物 **7**. 向 50 mL 茄形瓶中加入中间体 **15**(0.20 g, 0.33 mmol)、LiOH(0.06 g, 1.47 mmol)、乙醇(1.5 mL)和水(1.5 mL), 在 25 °C 下搅拌反应 2 h, 反应结束后, 减压浓缩除去乙醇, 于 0~5 °C 用冰醋酸调节 pH=6, 析出固体, 过滤, 用少量水洗涤, 得 0.05 g 白色固体 **7**, 收率 29.9%.

1.2.8 目标化合物 **11** 的合成 参照文献[20]方法合成目标化合物 **11**. 向 100 mL 茄形瓶中加入中间体 **13**(0.50 g, 0.84 mmol)、碳酸钾(0.69 g, 5.02 mmol)、四氢呋喃(25.0 mL)和水(5.0 mL), 冰浴(0 °C)下搅拌反应 30 min 后, 加入中间体 **17**(0.32g, 1.00 mmol), 在 25 °C 下搅拌反应 12 h, 静置分层, 取四氢呋喃层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 残留物经柱层析[$V(\text{二氯甲烷}):V(\text{甲醇})=50:1$]分离, 得 0.21 g 黄色固体 **11**, 收率 35.7%.

目标化合物 **2a~6a**, **2b~6b** 和 **7~11** 的表征结果见表 1 和表 2.

Table 1 Appearance, yields, melting points and HRMS data of target compounds **2a~6a**, **2b~6b** and **7~11**

Compd.	Appearance	Yield(%)	m. p./°C	HRMS(calcd.), $m/z[M+H]^+$
2a	White solid	44.2	114—116	597.2823(597.2820)
2b	White solid	48.3	106—108	669.3044(669.3031)
3a	White solid	40.3	108—110	625.3148(625.3133)
3b	White solid	44.6	94—96	725.3673(725.3657)
4a	White solid	48.0	160—162	625.3141(625.3133)
4b	White solid	66.0	148—150	725.3662(725.3657)
5a	White solid	42.6	108—110	639.3287(639.3289)
5b	White solid	47.4	88—90	753.3978(753.3970)
6a	White solid	43.7	130—132	659.2979(659.2976)
6b	White solid	54.3	120—122	793.3354(793.3344)
7	White solid	29.9	> 250	511.2453(511.2452)
8	White solid	57.4	112—114	639.3295(639.3289)
9	White solid	59.6	82—84	667.3603(667.3602)
10	White solid	54.5	94—96	673.3145(673.3133)
11	Yellow solid	35.7	104—106	703.3356(703.3351)

Table 2 ^1H NMR and ^{13}C NMR data of target compounds 2a—6a, 2b—6b and 7—11

Compd.	^1H NMR (300 MHz), δ^a	^{13}C NMR (75 MHz), δ^b
2a	9.14(brs, 2H), 7.87(d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.43(s, 1H), 7.38(d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.32—7.21(m, 2H), 7.21—7.06(m, 5H), 4.34—4.24(m, 1H), 4.15—3.99(m, 5H), 3.96(q, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.91—3.81(m, 1H), 3.57—3.45(m, 1H), 3.29—3.20(m, 1H), 3.07—2.84(m, 2H), 2.58(t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.18(t, $J=6.9$ Hz, 3H), 1.11(t, $J=7.1$ Hz, 3H)	171.08, 170.63, 167.19, 163.87, 152.30, 142.83, 141.49, 140.86, 134.73, 132.51, 129.67, 129.05(2C), 128.78(2C), 127.33(2C), 127.28(2C), 126.19, 122.90, 119.95, 107.88, 60.78, 60.07, 55.29, 46.34, 42.50, 40.98, 38.95, 32.10, 13.93, 13.61
2b	9.59(brs, 2H), 7.85—7.59(m, 3H), 7.26—7.02(m, 9H), 5.89—5.63(m, 1H), 4.65—4.44(m, 1H), 4.41—3.80(m, 11H), 3.62—3.27(m, 2H), 2.76(t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.36(t, $J=6.8$ Hz, 3H), 1.32—1.18(m, 6H)	171.12, 170.38, 166.89, 164.02, 154.40, 150.11, 142.91, 141.21, 141.00, 134.20, 132.49, 130.10, 129.33(2C), 128.79(2C), 127.36(2C), 126.94(2C), 126.21, 123.18, 120.30, 107.95, 61.68, 60.89, 60.08, 53.49, 46.34, 41.36, 38.73, 36.87, 32.12, 13.91(2C), 13.62
3a	9.07(brs, 2H), 7.89(d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.46(s, 1H), 7.40(d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.34—7.21(m, 3H), 7.21—7.18(m, 2H), 7.18—7.15(m, 1H), 7.15—7.10(m, 1H), 4.38—4.19(m, 1H), 4.11(t, $J=7.0$ Hz, 2H), 4.07—4.03(m, 1H), 3.99(q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.94—3.85(m, 1H), 3.81(d, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.60—3.44(m, 1H), 3.31—3.20(m, 1H), 3.08—2.87(m, 2H), 2.61(t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.99—1.81(m, 1H), 1.14(t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.91(d, $J=6.7$ Hz, 6H)	171.12, 170.64, 167.26, 164.34, 152.41, 142.93, 141.48, 140.98, 134.80, 132.90, 129.69, 129.11(2C), 128.78(2C), 127.35(2C), 127.23(2C), 126.16, 122.92, 120.06, 107.83, 71.25, 60.07, 55.42, 46.36, 42.65, 41.11, 39.04, 32.13, 27.33, 18.77(2C), 13.62
3b	9.07(brs, 2H), 7.88(s, 2H), 7.51(s, 1H), 7.35(d, $J=8.6$ Hz, 1H), 7.31—7.27(m, 1H), 7.27—7.21(m, 3H), 7.21—7.18(m, 2H), 7.18—7.04(m, 2H), 5.69—5.38(m, 1H), 4.45—4.27(m, 1H), 4.24—4.15(m, 1H), 4.11(t, $J=7.2$ Hz, 2H), 3.99(q, $J=7.1$ Hz, 3H), 3.81(d, $J=6.6$ Hz, 2H), 3.76—3.66(m, 1H), 3.60—3.51(m, 1H), 3.49—3.39(m, 1H), 3.33—3.24(m, 2H), 2.61(t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.97—1.81(m, 1H), 1.63—1.45(m, 1H), 1.14(t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.91(d, $J=6.6$ Hz, 6H), 0.83(s, 3H), 0.68(s, 3H)	171.10, 170.36, 166.91, 164.15, 154.56, 150.06, 142.91, 141.22, 140.77, 134.20, 132.77, 130.10, 129.32(2C), 128.79(2C), 127.36(2C), 126.98(2C), 126.21, 123.16, 120.30, 107.96, 71.85, 71.30, 60.06, 53.58, 46.33, 41.31, 39.21, 37.24, 32.11, 27.30(2C), 18.75(2C), 18.50(2C), 13.62
4a	9.03(brs, 2H), 7.83(d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.43(s, 1H), 7.36(d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.31—7.19(m, 3H), 7.18—7.15(m, 2H), 7.15—7.08(m, 2H), 4.32—4.20(m, 1H), 4.08(t, $J=7.1$ Hz, 2H), 4.04—4.00(m, 1H), 3.96(q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.91—3.81(m, 1H), 3.56—3.45(m, 1H), 3.28—3.18(m, 1H), 3.04—2.86(m, 2H), 2.58(t, $J=7.1$ Hz, 2H), 1.42(s, 9H), 1.11(t, $J=7.1$ Hz, 3H)	171.20, 170.63, 166.66, 162.89, 152.33, 142.95, 141.35, 140.93, 134.78, 132.98, 129.68, 129.16(2C), 128.80(2C), 127.36(2C), 127.19(2C), 126.16, 123.00, 120.11, 107.85, 79.37, 60.10, 55.42, 46.37, 42.63, 41.12, 39.01, 32.09, 27.69(3C), 13.64
4b	9.05(brs, 2H), 7.94(d, $J=5.6$ Hz, 2H), 7.50(s, 1H), 7.39—7.10(m, 9H), 5.60—5.43(m, 1H), 4.44—4.28(m, 1H), 4.26—4.15(m, 1H), 4.11(t, $J=6.7$ Hz, 2H), 3.99(q, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.94—3.83(m, 1H), 3.57—3.39(m, 1H), 3.30—3.20(m, 2H), 2.61(t, $J=7.2$ Hz, 2H), 1.45(s, 9H), 1.34—1.19(m, 3H), 1.14(t, $J=7.1$ Hz, 3H), 1.12—0.99(m, 6H)	171.13, 170.40, 166.19, 162.93, 153.23, 150.49, 142.94, 141.26, 140.97, 134.26, 132.62, 130.03, 129.38(2C), 128.81(2C), 127.37(2C), 126.96(2C), 126.21, 123.15, 120.26, 107.98, 80.74, 79.50, 60.07, 53.66, 46.35, 41.43, 39.11, 36.29, 32.12, 27.69(6C), 13.63
5a	9.18(brs, 2H), 7.89(d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.46(s, 1H), 7.40(d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.35—7.21(m, 3H), 7.21—7.15(m, 3H), 7.15—7.10(m, 1H), 4.32—4.21(m, 1H), 4.10(t, $J=6.9$ Hz, 2H), 4.07—3.94(m, 5H), 3.94—3.82(m, 1H), 3.59—3.47(m, 1H), 3.31—3.20(m, 1H), 3.06—2.88(m, 2H), 2.61(t, $J=6.9$ Hz, 2H), 1.67—1.54(m, 2H), 1.37—1.27(m, 4H), 1.14(t, $J=7.1$ Hz, 3H), 0.88(t, $J=7.0$ Hz, 3H)	171.18, 170.65, 167.21, 164.06, 152.19, 142.85, 141.48, 140.88, 134.74, 132.63, 129.69, 129.18(2C), 128.81(2C), 127.35(2C), 127.28(2C), 126.21, 122.99, 120.05, 107.90, 65.19, 60.13, 55.38, 46.36, 42.49, 41.09, 38.96, 32.07, 28.03, 27.57, 21.91, 13.64, 13.50
5b	9.13(brs, 2H), 7.90(s, 2H), 7.50(s, 1H), 7.39—7.28(m, 2H), 7.28—7.22(m, 3H), 7.22—7.07(m, 4H), 5.65—5.41(m, 1H), 4.46—4.29(m, 1H), 4.28—4.16(m, 1H), 4.11(t, $J=6.7$ Hz, 2H), 4.05—3.86(m, 5H), 3.76—3.61(m, 1H), 3.61—3.41(m, 2H),	171.16, 170.39, 166.71, 164.36, 154.57, 150.08, 142.97, 141.28, 140.90, 134.24, 132.77, 130.15, 129.37(2C), 128.82(2C), 127.39(2C), 126.93(2C), 126.22, 123.22, 120.37, 107.95, 65.94,

Continued

Compd.	¹ H NMR (300 MHz), δ ^a	¹³ C NMR (75 MHz), δ ^b
5b	3.32—3.22(m, 2H), 2.61(t, <i>J</i> =7.0 Hz, 2H), 1.68—1.52(m, 2H), 1.39—1.17(m, 8H), 1.14(t, <i>J</i> =7.1 Hz, 3H), 1.11—0.95(m, 2H), 0.95—0.72(m, 6H)	65.18, 60.10, 53.61, 46.37, 41.37, 39.24, 37.12, 32.16, 28.05, 27.97, 27.60, 27.49, 21.91, 21.79, 13.66, 13.48, 13.45
6a	9.06(brs, 2H), 7.90(d, <i>J</i> =7.9 Hz, 2H), 7.46(s, 1H), 7.44—7.36(m, 5H), 7.36—7.32(m, 1H), 7.33—7.27(m, 2H), 7.27—7.21(m, 2H), 7.21—7.10(m, 4H), 5.10(s, 2H), 4.33—4.22(m, 1H), 4.10(t, <i>J</i> =7.0 Hz, 2H), 4.06—4.03(m, 1H), 3.99(q, <i>J</i> =7.0 Hz, 2H), 3.94—3.80(m, 1H), 3.59—3.47(m, 1H), 3.31—3.20(m, 1H), 3.09—2.82(m, 2H), 2.61(t, <i>J</i> =7.0 Hz, 2H), 1.14(t, <i>J</i> =7.1 Hz, 3H)	171.13, 170.64, 167.43, 163.97, 152.34, 142.95, 141.67, 140.96, 136.18, 134.78, 132.67, 129.74, 129.17(2C), 128.79(2C), 127.88(2C), 127.67(2C), 127.42, 127.36(2C), 127.23(2C), 126.16, 122.96, 120.08, 107.84, 66.66, 60.08, 55.38, 46.38, 42.61, 41.08, 39.05, 32.13, 13.64
6b	9.15(brs, 2H), 7.87(d, <i>J</i> =8.3 Hz, 2H), 7.50(s, 1H), 7.44—6.97(m, 19H), 5.69—5.47(m, 1H), 5.12(s, 2H), 4.97(s, 2H), 4.70—4.56(m, 1H), 4.42—4.24(m, 1H), 4.23—4.15(m, 1H), 4.11(t, <i>J</i> =6.8 Hz, 2H), 3.99(q, <i>J</i> =7.1 Hz, 2H), 3.68—3.37(m, 2H), 3.29—3.11(m, 1H), 2.61(t, <i>J</i> =7.2 Hz, 2H), 1.14(t, <i>J</i> =7.1 Hz, 3H)	171.14, 170.36, 166.19, 162.93, 153.23, 149.93, 142.92, 141.22, 140.83, 136.15, 135.79, 134.18, 132.52, 130.16, 129.30(2C), 128.80(2C), 128.03(2C), 127.89(2C), 127.69(2C), 127.63(2C), 127.59, 127.44, 127.37(2C), 126.96(2C), 126.22, 123.22, 120.33, 107.97, 66.70, 66.37, 60.09, 53.73, 46.35, 41.33, 39.19, 37.16, 32.14, 13.64
7	9.40(s, 2H), 9.20(s, 2H), 7.81(d, <i>J</i> =7.7 Hz, 2H), 7.62(d, <i>J</i> =7.9 Hz, 2H), 7.58—7.43(m, 2H), 7.32—7.24(m, 2H), 7.24—7.19(m, 2H), 7.19—7.15(m, 1H), 7.15—7.10(m, 1H), 5.11(brs, 1H), 4.42(brs, 2H), 4.10—3.99(m, 2H), 3.66(brs, 2H), 3.49(brs, 2H), 2.77(s, 3H), 2.60—2.52(m, 2H)	172.53, 169.36, 165.24, 148.40, 143.25, 143.03, 140.55, 133.80, 131.25, 129.87(2C), 129.23(2C), 128.10(2C), 127.99(2C), 126.74, 126.22, 123.82, 118.56, 110.43, 60.70, 49.68, 46.27, 38.45, 37.94, 37.90, 32.10
8	9.05(brs, 2H), 7.70(d, <i>J</i> =8.2 Hz, 2H), 7.47(s, 1H), 7.33—7.14(m, 9H), 4.16—4.12(m, 1H), 4.10(t, <i>J</i> =7.1 Hz, 2H), 4.06—4.03(m, 1H), 3.99(q, <i>J</i> =7.1 Hz, 2H), 3.92—3.77(m, 1H), 3.39—3.37(m, 1H), 3.28—3.15(m, 2H), 2.92—2.77(m, 1H), 2.61(t, <i>J</i> =6.9 Hz, 2H), 2.40(s, 3H), 1.44(d, <i>J</i> =4.8 Hz, 9H), 1.14(t, <i>J</i> =7.1 Hz, 3H)	171.18, 170.63, 166.73, 160.39, 152.10, 144.01, 142.89, 141.10, 134.40, 131.26, 129.62, 129.39(2C), 128.79(2C), 127.36(2C), 126.47(2C), 126.19, 122.80, 119.94, 107.84, 79.78, 62.11, 60.09, 48.88, 46.35, 41.98, 39.94, 36.84, 32.09, 27.64(3C), 13.64
9	8.94(brs, 2H), 7.74(d, <i>J</i> =8.3 Hz, 2H), 7.47(s, 1H), 7.37—7.00(m, 9H), 4.17—4.05(m, 3H), 4.06—3.92(m, 5H), 3.91—3.75(m, 1H), 3.55(d, <i>J</i> =27.6 Hz, 1H), 3.27—3.13(m, 2H), 2.94—2.75(m, 1H), 2.61(t, <i>J</i> =6.8 Hz, 2H), 2.40(s, 3H), 1.68—1.49(m, 2H), 1.36—1.25(m, 6H), 1.14(t, <i>J</i> =7.1 Hz, 3H), 0.86(t, <i>J</i> =6.6 Hz, 3H)	171.18, 170.58, 167.28, 161.05, 152.07, 142.97, 142.29, 141.20, 134.47, 131.79, 129.62, 129.38(2C), 128.78(2C), 127.35(2C), 126.43(2C), 126.13, 122.81, 120.06, 107.80, 65.14, 62.15, 60.08, 48.88, 46.35, 41.95, 39.84, 36.91, 32.09, 31.04, 28.30, 25.13, 22.07, 13.65, 13.55
10	9.15(brs, 2H), 7.89(d, <i>J</i> =8.2 Hz, 2H), 7.53—7.35(m, 4H), 7.35—7.28(m, 1H), 7.29—7.22(m, 3H), 7.22—7.17(m, 3H), 7.17—7.14(m, 2H), 7.15—7.05(m, 2H), 5.13(s, 2H), 4.34—4.23(m, 1H), 4.12(t, <i>J</i> =6.7 Hz, 2H), 4.08—4.04(m, 1H), 4.01(t, <i>J</i> =6.7 Hz, 2H), 3.94—3.85(m, 1H), 3.57—3.49(m, 2H), 3.06—2.90(m, 2H), 2.69(t, <i>J</i> =7.2 Hz, 2H), 2.42(s, 3H), 0.87(t, <i>J</i> =6.5 Hz, 3H)	171.18, 170.81, 167.63, 164.43, 152.41, 142.94, 141.60, 141.19, 137.74, 134.89, 132.95, 129.62, 129.43(2C), 128.83(2C), 127.87(2C), 127.67(2C), 127.37(2C), 127.23, 126.46(2C), 126.19, 123.10, 120.06, 107.88, 64.69, 61.82, 60.11, 48.82, 46.30, 41.93, 40.76, 37.08, 31.05, 13.56
11	9.55(brs, 2H), 7.81(d, <i>J</i> =7.9 Hz, 2H), 7.72(s, 1H), 7.34(d, <i>J</i> =8.4 Hz, 2H), 7.31(d, <i>J</i> =1.3 Hz, 1H), 7.25—7.18(m, 2H), 7.16—7.05(m, 4H), 5.30(s, 2H), 4.47—4.35(m, 1H), 4.34—4.22(m, 2H), 4.09(q, <i>J</i> =7.3 Hz, 2H), 4.05—3.96(m, 2H), 3.80—3.71(m, 1H), 3.47—3.37(m, 1H), 3.22—3.05(m, 2H), 2.80—2.71(m, 2H), 2.60(s, 3H), 2.51(s, 3H), 2.49(s, 3H), 1.23(t, <i>J</i> =7.1 Hz, 3H)	171.09, 170.65, 167.46, 163.62, 152.37, 150.41, 148.61, 148.19, 144.86, 142.75, 141.48, 140.82, 134.72, 132.45, 129.59, 128.96(2C), 128.79(2C), 127.36(2C), 127.32(2C), 126.22, 122.87, 119.89, 107.92, 65.43, 60.09, 55.30, 46.32, 42.49, 40.99, 38.93, 32.06, 21.09, 20.81, 20.08, 13.61

a. Solvent for compounds **2b** and **11**: CDCl₃, for others: DMSO-d₆; *b.* solvent for compound **7**: DMSO-d₆, for others: CDCl₃.

1.3 体外对凝血酶抑制活性的测试

参照文献[16]方法, 测试目标化合物 **2a~6a**, **2b~6b** 和 **7~11** 体外对凝血酶的抑制活性。

1.4 体内抗血栓活性测试(对 FeCl₃致大鼠下腔静脉血栓模型的影响实验)

参照文献[16]方法, 测试化合物 **8** 和 **11** 的体内抗血栓活性.

2 结果与讨论

2.1 中间体的合成

中间体 **13** 和 **15** 的合成以中间体 **12** 和 **14** 为原料, 通过 Pinner 反应制得亚氨酯的盐酸盐, 再经胺化成脒得到(见 Scheme 1). 由于中间体 **12** 或 **14** 的分子中存在酰胺键, 长时间在饱和的氯化氢/乙醇溶液中反应, 会产生酰胺键断裂成酯的副产物, 因此, 选择在冰浴条件下搅拌反应 6 h, 此时中间体 **12** 或 **14** 并未反应完全, 但酰胺键断裂的副产物相对较少, 而未反应的原料 **12** 或 **14** 可通过回收再利用.

2.2 体外凝血酶诱导的血小板聚集实验

以达比加群酯为阳性对照药, 对化合物 **2a~6a**, **2b~6b** 和 **7~11**(除了化合物 **7** 外, 其它化合物均预先用肝微粒体酶处理)进行了体外凝血酶诱导的血小板聚集实验, 实验结果见表 3.

Table 3 Rabbit thrombin-induced platelet aggregation assay*

Compd.	R ¹	R ²	R ³	IC ₅₀ /(μmol · L ⁻¹)
2a		H	Et	11.00±0.70
2b			Et	0.32±0.10
3a		H	Et	2.96±0.28
3b			Et	2.70±0.14
4a		H	Et	1.86±0.32
4b			Et	0.11±0.08
5a		H	Et	1.03±0.25
5b			Et	0.57±0.11
6a		H	Et	3.16±0.22
6b			Et	0.47±0.06
7	H	CH ₃	H	0.59±0.03
8		CH ₃	Et	7.82±0.81
9		CH ₃	Et	4.21±0.26
10		CH ₃	Et	76.80±1.40
11		H	Et	3.66±0.17
Dabigatran etexilate	—	—	—	0.60±0.05

* ; IC₅₀: drug concentration to achieve half-maximal inhibition of rabbit platelet aggregation induced by thrombin.

体外筛选结果显示, 所测试化合物对凝血酶诱导的血小板聚集均具有一定的抑制活性, 其中化合物 **2b** [$IC_{50} = (0.32 \pm 0.10) \mu\text{mol/L}$], **5b** [$IC_{50} = (0.57 \pm 0.11) \mu\text{mol/L}$], **6b** [$IC_{50} = (0.47 \pm 0.06) \mu\text{mol/L}$] 和 **7** [$IC_{50} = (0.59 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$] 的抑制活性与达比加群酯 ($IC_{50} = 0.597 \mu\text{mol/L}$) 相当, 而化合物 **4b** [$IC_{50} = (0.60 \pm 0.05) \mu\text{mol/L}$] 的活性明显优于达比加群酯. 三前药 (化合物 **2b**, **4b**, **5b** 和 **6b**) 的体外抑制活性比其对应的双前药 (化合物 **2a**, **4a**, **5a** 和 **6a**) 的活性普遍要好, 并与阳性药达比加群酯相当. 四氢吡嗪环的 2-NCH₃ 衍生物虽然也具有一定的活性, 但均弱于相对应的四氢吡嗪环 2-NH 衍生物, 即化合物 **8** 弱于化合物 **4a**, 化合物 **10** 弱于化合物 **6a**. 此外, 季药化合物 **11** [$IC_{50} = (3.66 \pm 0.17) \mu\text{mol/L}$] 也显示出一定的抗凝血酶诱导的血小板聚集活性, 但弱于达比加群酯.

2.3 体内的抗血栓活性

基于以上初步的体外筛选结果, 选取化合物 **4b**, **9** 和 **11** 进行体内抗血栓实验 (大鼠下腔静脉血栓) 研究, 结果见图 1.

图 1 结果显示, 所测试的 3 个化合物均有不同程度的抗血栓作用, 且都呈现出剂量依赖性. 其中化合物 **4b** 高剂量组 (20 mg/kg) 的抗血栓活性与阳性药达比加群酯 (20 mg/kg) 相当; 四氢吡嗪环的 2-NCH₃ 衍生物 **9** 的体内抗血栓作用较弱, 说明四氢吡嗪环 2 位的仲胺氢可能与凝血酶存在相互作用, 甲基化后导致活性下降; 化合物 **11** 表现出较好的体内抗血栓活性, 推测可能是其在体内水解产生了化合物 **1** 和具有抗血小板聚集活性的 HTMP, 两者协同发挥抗血栓作用所致.

3 结 论

以含有全新的 1,2,3,4-四氢苯并[4,5]咪唑并[1,2-a]吡嗪骨架的三环类新型凝血酶抑制剂 **1** 为先导物, 经过结构修饰设计合成了 15 个新的化合物. 目标化合物对凝血酶诱导的血小板聚集都具有一定的抑制活性, 三前药的体外抑制活性比其对应的双前药的活性普遍较好, 并与阳性药达比加群酯相当. 四氢吡嗪环 2 位仲胺基甲基化会导致活性降低, 推测吡嗪环 2 位的仲胺氢与凝血酶可能存在一定的相互作用. 季药化合物 **11** 虽然对体外凝血酶诱导的血小板聚集的抑制活性弱于达比加群酯, 但其在体内的大鼠下腔静脉血栓模型实验中显示出较好的抗血栓作用, 高剂量下的抗血栓作用与达比加群酯相当, 推测可能是由于化合物 **11** 在体内水解产生了化合物 **1** 与 HTMP, 两者协同发挥抗血栓作用所致. 本研究进一步拓宽了凝血酶抑制剂类抗血栓药物的结构类型, 对新型抗血栓药物的研究具有指导意义.

参 考 文 献

- [1] Fu Y., Wang D. W., *Chinese J. Clin.*, **2006**, 34 (8), 51—53 (付研, 王大为. 中国临床医生, **2006**, 34 (8), 51—53)
- [2] Mackman N., Becker R. C., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2010**, 30(3), 369—371
- [3] Rupin A., Marx I., Vallez M. O., Mennecier P., Gloanec P., de Nanteuil G., Verbeuren T. J., *J. Thromb. Haemost.*, **2011**, 9(7), 1375—1382
- [4] Xiao Z., Theroux P., *Circulation*, **1998**, 97(3), 251—256
- [5] Ishibashi H., Koide M., Obara S., Kumasaka Y., Tamura K., *J. Stroke. Cerebrovasc. Dis.*, **2013**, 22 (5), 656—660
- [6] Di Nisio M., Middeldorp S., Buller H. R., *N. Engl. J. Med.*, **2005**, 353(10), 1028—1040
- [7] Yang H. R., Ren Y. J., Gao X. D., Gao Y. H., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2016**, 32 (6), 973—978
- [8] Connolly S. J., Ezekowitz M. D., Yusuf S., Eikelboom J., Oldgren J., Parekh A., Pogue J., Reilly P. A., Themeles E., Varrone J., Wang S., Alings M., Xavier D., Zhu J., Diaz R., Lewis B. S., Darius H., Diener H. C., Joyner C. D., Wallentin L., *Engl. J. Med.*, **2009**, 361(12), 1139—1151

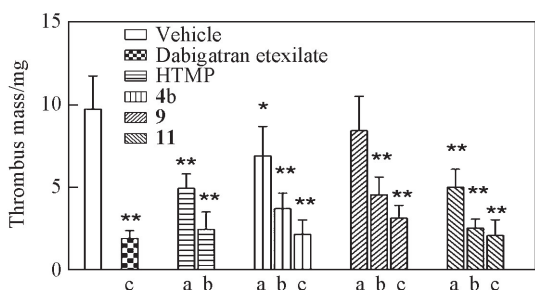


Fig.1 Antithrombotic effect of tested compounds, dabigatran etexilate and HTMP in vivo

Average thrombus mass is the mean \pm SD from eight independent experiments. Statistical significance compared with the vehicle group is * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Dose/(mg \cdot kg⁻¹): a. 1; b. 5; c. 20.

- [9] Grave S., *Aust. Nurs. J.*, **2011**, 19(6), 30—33
- [10] Martins H. S., Scalabrini-Neto A., Velasco I. T., *Lancet*, **2007**, 370(9604), 2002—2003
- [11] Huel N. H., Nar H., Priepe H., Ries U., Stassen J. M., Wiene W., *J. Med. Chem.*, **2002**, 45(9), 1757—1766
- [12] Halton J. M., Lehr T., Cronin L., Lobmeyer M. T., Haertter S., Belletrutti M., Mitchell L. G., *Thromb. Haemost.*, **2016**, 116(3), 461—471
- [13] Imberti D., Pomero F., Benedetti R., Fenoglio L., *Intern. Emerg. Med.*, **2016**, 11(7), 895—900
- [14] Yang X. Z., Yang W. H., Xu Y. G., Diao X. J., He G. W., Gong G. Q., *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, 57, 21—28
- [15] Yang X. Z., Diao X. J., Yang W. H., Li F., He G. W., Gong G. Q., Xu Y. G., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, 23(7), 2089—2092
- [16] Wang S. C., Dai P., Xu Y. G., Chen Q. F., Zhu Q. H., Gong G. Q., *Arch. Pharm.*, **2015**, 348(8), 595—605
- [17] Chen D. X., Wang S. C., Diao X. J., Zhu Q. H., Shen H. L., Han X. Q., Wang Y. W., Gong G. Q., Xu Y. G., *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, 23(23), 7405—7416
- [18] Li M., Handa S., Ikeda Y., Goto S., *Thromb. Res.*, **2001**, 104(1), 15—28
- [19] Liu J. B., Li Y. X., Chen Y. W., Wu C. C., Wan Y. Y., Wei W., Xiong L. X., Zhang X., Yu S. J., Li Z. M., *Chem. Res. Chinese Universities*, **2016**, 32(1), 41—48
- [20] Jia C. Q., Yang D. Y., Che C. L., Ma Y. Q., Rui C. H., Yan X. J., Qin Z. H., *Chem. J. Chinese Universities*, **2016**, 37(5), 892—901 (贾长青, 杨冬燕, 车传亮, 马永强, 芮昌辉, 闫晓静, 覃兆海. 高等学校化学学报, **2016**, 37(5), 892—901)

Design, Synthesis and Biological Evaluation of Thrombin Inhibitors with 1,2,3,4-Tetrahydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrazine Nucleus[†]

CHEN Dongxing¹, SHI Jinyu², CHEN Qiufang², ZHANG Rui²,
GONG Guoqing², XU Yungen^{1,2*}, ZHU Qihua^{1,2*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Drug Design and Optimization,

2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract Compound **1**, a new thrombin inhibitor with 1,2,3,4-tetrahydrobenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrazine nucleus, was selected as lead compound, and fourteen carbamate derivatives derivatives (**2a—6a**, **2b—6b**, **7—10**) were designed and prepared. Furthermore, a twin drug (**11**) was synthesized by coupling compound **1** with 2-hydroxymethyl-3,5,6-trimethylpyrazine (HTMP). The structures of all the target compounds were confirmed by ¹H NMR, ¹³C NMR and HRMS. Preliminary biological activity test results indicated that all of the tested compounds exhibit a certain degree of inhibitory effect on thrombin-induced platelet aggregation, among which compound **4b** [$IC_{50} = (0.11 \pm 0.08) \mu\text{mol/L}$] show better anti-platelet aggregation activity than dabigatran etexilate [$IC_{50} = (0.60 \pm 0.05) \mu\text{mol/L}$]. The *in vivo* experimental results in rat venous thrombosis model demonstrated compound **4b** can significantly reduce thrombosis in a dose-response manner. Compound **11**, which showed weak inhibitory effect on thrombin-induced platelet aggregation, also displayed comparable inhibitory effect on rat venous thrombosis with dabigatran etexilate. The study points out that the enhanced potency of compound **11** may be the synergetic effect of HTMP and compound **1** which are generated by hydrolysis *in vivo*.

Keywords Benzimidazole; Thrombin inhibitors; Antithrombosis

(Ed.: P, H, S, K)

[†] Supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 21272277) and the Outstanding Scientific and Technological Innovation Team Projects of Jiangsu Province of China(2015).