

· 论 文 ·

阿哌沙班衍生物的合成及 Xa 因子抑制活性

邢峻豪¹, 张媛¹, 胡晓雯^{2*}, 周金培¹, 张惠斌^{1**}(¹中国药科大学新药研究中心, 南京 210009; ²南京医科大学基础医学院, 南京 210029)

摘 要 在阿哌沙班的结构基础上, 保持其 P₁ 部分不变, 对其 P₄ 部分进行结构改造, 用一系列芳香酰胺基团代替 2-氮己酮, 合成了一系列未见报道的吡唑并吡啶酮类化合物。所合成化合物结构均经 IR, ¹H NMR 和 MS 确证, 并对这些化合物的 Xa 因子抑制活性进行了测定, 结果表明所有化合物均表现出一定的 Xa 因子抑制活性, 但活性均低于阳性药阿哌沙班。

关键词 阿哌沙班; 衍生物; 合成; Xa 因子抑制剂

中图分类号 R914.5 **文献标志码** A **文章编号** 1000–5048(2013)04–0289–07

doi:10.11665/j.issn.1000–5048.20130401

Synthesis and factor Xa inhibitory activity of apixaban derivatives

XING Junhao¹, ZHANG Yuan¹, HU Xiaowen^{2*}, ZHOU Jinpei¹, ZHANG Huibin^{1**}¹Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009;²School of Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract Based on the current structure-activity relationship of apixaban, keeping P₁ portions unchanged and replace δ -valerolactam in P₄ portions with aromatic amide group, a series of dihydropyrazolopyridinones not reported were designed and synthesized. The structures of all the synthesized derivatives were identified by IR, ¹H NMR and MS. And then their anti-factor Xa activity was tested. The results showed that all the tested compounds exhibited factor Xa inhibitory activity, but with less potency than that of apixaban.

Key words apixaban; derivatives; synthesis; factor Xa inhibitors

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2013ZX09301303-002); the Cooperative Innovation Foundation of Jiangsu Province — a Project of Prospective United Study of Jiangsu Province (No. BY2011158); and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JKY2011092)

Xa 因子是一个维生素 K 依赖的丝氨酸蛋白酶, 其占据了凝血瀑布反应中的中心位置, 可以由内源性和外源性凝血途径激活^[1], 主要催化 II 因子(凝血酶原)向 II a 因子(凝血酶)转化, 抑制 1 mol Xa 因子可以抑制 1 000 mol 凝血酶的产生。研究表明, 抑制 Xa 因子, 可以延长滞后期的剂量依赖效应。因此 Xa 因子是一个很好的抗凝靶点^[2]。

Xa 因子结构中含有 S₁ ~ S₄ 口袋、催化区域、

阳离子空洞、二硫桥口袋等, 其中 S₁ 和 S₄ 口袋是药物结合的主要口袋^[3]。目前上市的选择性 Xa 因子抑制剂有利伐沙班(rivaroxaban, **1**)^[4]、阿哌沙班(apixaban, **2**)^[5]和依度沙班(edoxaban, **3**)^[6]。

阿哌沙班(商品名: Eliquis)是由百时美-施贵宝公司和辉瑞公司联合开发的新型抗凝药, 于 2011 年 5 月获准在欧盟上市, 用于预防接受择期髋关节或膝关节置换术的成年患者出现静脉血栓栓塞症(VTE)事件^[7], 是全球首个获批用于该适

* 收稿日期 2013-04-15 通信作者 * Tel: 025–89862900 E-mail: xw-hu@126.com

** Tel: 025–83271302 E-mail: zhanghb80@163.com

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2013ZX09301303-002); 江苏省产学研联合创新资金-前瞻性联合研究项目资助(No. BY2011158); 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. JKY2011092)

应证的药物,有望取代使用时间已长达 50 年的抗凝剂华法林,为静脉血栓栓塞提供一种更安全有效的临床治疗选择。另外,美国 FDA 于 2012 年 12 月 28 日正式批准阿哌沙班用于降低非瓣膜性房颤患者的卒中和全身性栓塞风险^[8]。本研究结合现

有 Xa 因子的构效关系,保持阿哌沙班骨架结构不变的情况下,对其 P₄ 部分进行了结构改造,得到了一系列吡唑并吡啶酮结构的化合物,并对其进行了 Xa 因子抑制活性的研究,以期获得具有深入研究价值的活性化合物。

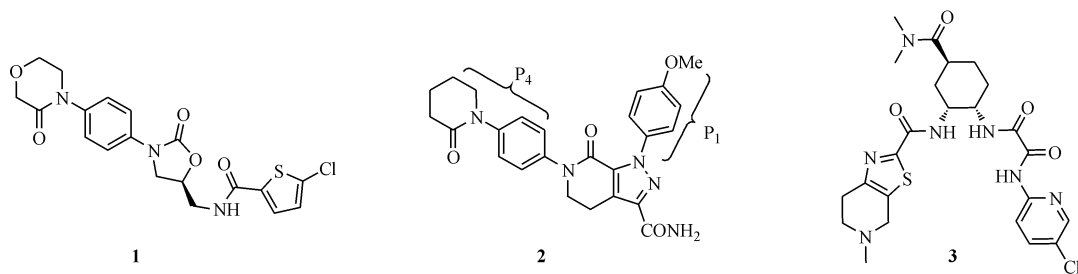


Figure 1 Structures of rivaroxaban(1), apixaban(2) and edoxaban(3)

1 合成路线

关于阿哌沙班的合成,已有很多文献和专利报道^[5,9-14],本研究采取了如路线 1 所示的合成方法,参照文献[5,9-10,15-20],将对硝基苯胺(4)与 5-氯代戊酰氯反应得到化合物 5,化合物 5 和五氯化磷反应得到中间体 6,得到产物后未经纯化直接与吗啡啉反应得到化合物 7。对甲氧基苯胺(8)重氮化后得到与 2-氯代乙酰乙酸乙酯发生 Japp-Klingemann 反应得到中间体 9,化合物 7 与中间体 9 反应后经酸处理得到化合物 11,化合物 11 经还原得到重要中间体 12,一方面,化合物 12 与 5-氯代戊酰氯反应后经酰胺化后得到化合物 2,另一方面,化合物 12 与相应的羧酸反应得到 14a ~ 14j 后经酰胺化得到目标物 15a ~ 15j。

2 化学合成

2.1 仪器和试剂

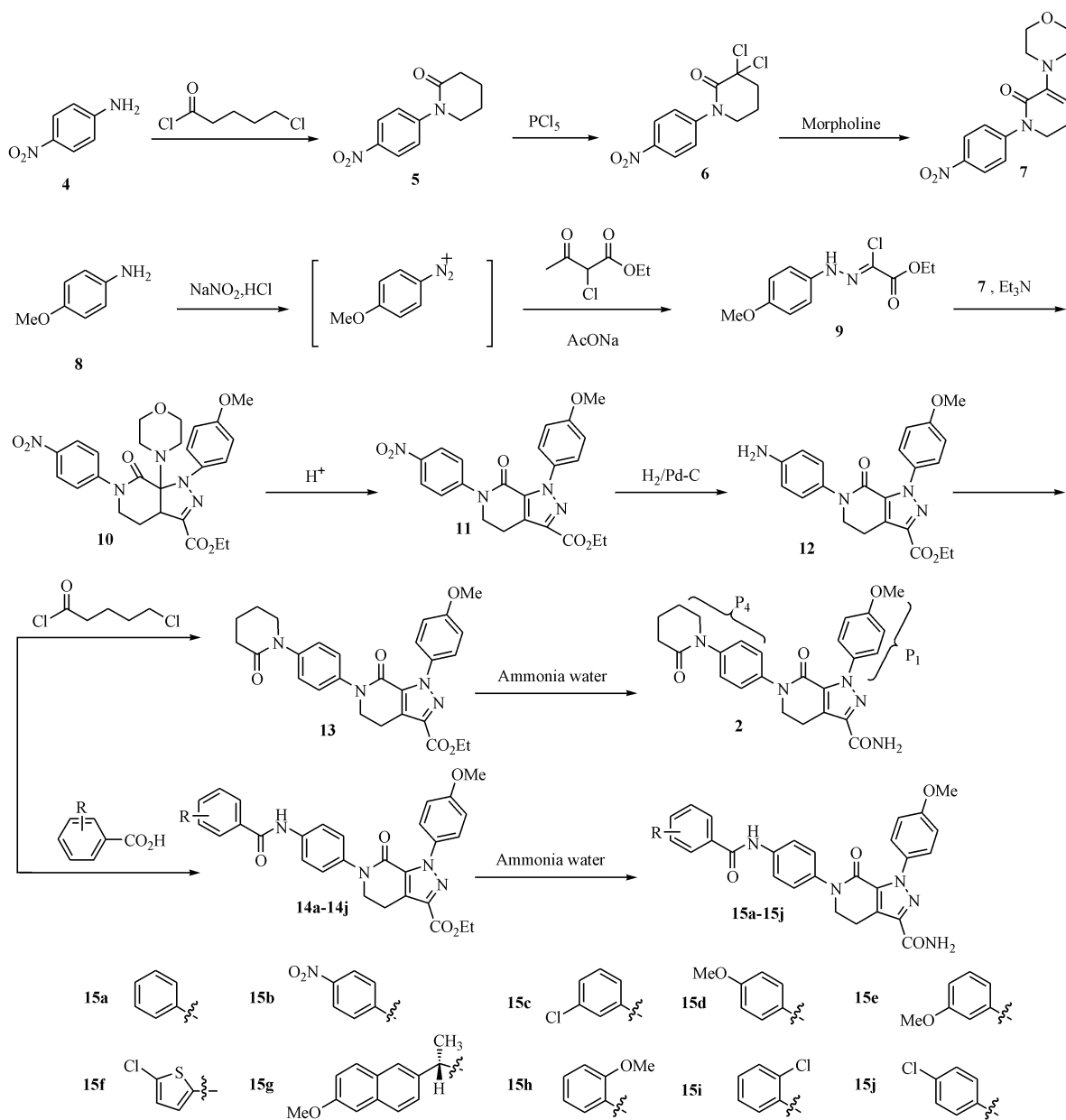
实验中所用到的溶剂或试剂均为市售分析纯或化学纯产品,除特别说明外,未经处理直接使用,熔点用天津市分析仪器厂 RY-1 型熔点仪测定,温度计未校正。红外光谱以 KBr 压片,经 Shimadzu FTIR-8400S 型红外光谱仪记录。磁共振谱以 TMS 为内标,用 Bruker AV-300 型核磁共振仪测定。质谱用 Agilent 110 LC-MS 或 Q-Tof micro 四极杆飞行时间串联质谱仪测定。所有反应用高效 TLC 在 254 nm 下检测,所用展开剂为石油醚/乙酸乙酯或 DCM/MeOH。

2.2 合成部分

1-(4-硝基苯基)-2-吡啶酮(5) 对硝基苯胺(11.04 g, 0.08 mol),三乙胺(22 mL,0.16 mol),5-氯代戊酰氯(16 mL, 18.6 g,0.12 mol),NaH(5.76 g,0.24 mol),参考文献[9]中的合成方法制得淡黄色晶体 5(15.59 g,88.49%),mp:96 ~ 98 °C。¹H NMR(CDCl₃,300 MHz) δ:8.22(2H,d,J=7.92 Hz, Ar-H), 7.49 (2H, d, J = 7.92 Hz, Ar-H), 3.73 (2H, t, CH₂ CH₂CO), 2.61(2H,t,CH₂ CH₂N), 1.99(4H,m)。

5,6-二氢-3-(4-吗啉基)-1-(4-硝基苯基)-2(1H)-吡啶酮(7) 化合物 5(13.2 g,0.06 mmol),五氯化磷(37.4 g, 0.18 mmol),吗啡啉 30 mL,参考文献[9]中的合成方法制得淡黄色片状晶体(13.66 g,75.06%),mp:114 ~ 117 °C。¹H NMR(CDCl₃,300 MHz) δ:8.25(2H,d,J=9.42 Hz, Ar-H), 7.56 (2H, d, J = 9.42 Hz, Ar-H), 5.74 (1H, t, CH₂ CHC), 3.84 (6H, m), 2.89 (4H, m), 2.55 (2H, m, CH₂CH₂N)。

[(4-甲氧基苯基)胍基]氯乙酸乙酯(9) 0 ~ 5 °C 搅拌下将对甲氧基苯胺(8)(25 g,0.20 mol)加入到由盐酸溶液(浓盐酸 49.1 mL,水 100 mL 组成的溶液)反应液用冰盐浴降至 -5 °C 以下,缓慢滴加由 NaNO₂(16.83 g)与水 50 mL 所组成的溶液,加毕,在 0 °C 下反应 60 min 得到重氮盐溶液。在另外一个三颈瓶中加入经乙酸乙酯 209 mL 溶解的 2-氯代乙酰乙酸乙酯(33.41 g),温度降到 0 ~ 5 °C,将乙酸钠的水溶液(乙酸钠:38.3 g,水:83 mL)加入其中。然后 0 °C 下搅拌,加入上述制好的重氮盐,0 ~ 5 °C 反应 0.5 h,然后室温反应 4.5 h。停止反应,分出有机层,然后依次用水、饱和碳酸氢钠和饱和氯化钠水溶液各洗 3 次(60 mL × 3),无水硫酸钠干燥。抽滤,滤液减压旋除溶剂,得到油状物,无需纯化直接进行下一步反应。



Scheme 1 Synthesis of the intermediates, apixaban (2) and it derivatives

4,5,6,7-四氢-1-(4-甲氧基苯基)-6-(4-硝基苯基)-7-氧代-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯(11) 化合物7 (1.42 g, 4 mmol), 10 (1.13 g, 4.4 mmol), 三乙胺 (8.8 mmol), 按照文献[10]中的方法得到中间体10后, 将体系温度降至0~5℃, 缓慢加入4 mol/L的盐酸8.67 mL, 加毕室温反应1.5 h, 反应结束后, 往其中加水, 有机层依次用水、饱和氯化钠水溶液各洗两次(10 mL×2), 有机层无水硫酸钠干燥过夜, 过滤旋干有机层, 乙酸乙酯5 mL洗涤, 抽滤, 干燥, 得到淡黄色固体1.05 g, 两步总收率为60%。mp: 135~138℃。¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ: 8.22 (2H, d, J=8.85 Hz, Ar-H), 7.49 (4H, dd, J=8.91, 8.73 Hz, Ar-

H), 6.93 (2H, d, J=8.85 Hz, Ar-H), 4.46 (2H, m, OCH₂CH₃), 4.20 (2H, t, J=6.21 Hz, CH₂CH₂N), 3.82 (3H, s, OCH₃), 3.39 (2H, t, J=6.21 Hz, CH₂CH₂N), 1.43 (3H, t, J=7.02 Hz, OCH₂CH₃)。

4,5,6,7-四氢-1-(4-甲氧基苯基)-6-(4-氨基苯基)-7-氧代-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯(12) 化合物11 (2 g, 4.58 mmol), 10% Pd/C (0.2 g), 足量的氢气, 按照文献[21]中报道的方法, 得到淡黄色固体1.68 g, 产率90%。mp: 145~147℃。¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ: 7.41 (2H, d, J=8.88 Hz, Ar-H), 6.92 (4H, dd, J=8.37, 8.91 Hz, Ar-H), 6.59 (2H, d, J=8.88 Hz, Ar-H), 4.38 (2H, m,

OCH_2CH_3), 3.98 (2H, t, $J = 6.61$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.72 (3H, s, OCH_3), 3.21 (2H, t, $J = 6.61$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.34 (3H, t, $J = 6.92$ Hz, OCH_2CH_3)。

4,5,6,7-四氢-1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代-1-哌啶基)苯基]-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**13**) 将化合物 **12** (1.68 g, 4.12 mmol) 溶于 NMP 7 mL 中, 将温度降至 0 °C, 缓慢加入 5-氯代戊酰氯 (0.59 mL, 4.53 mmol), 加毕反应 30 min, 然后将反应降至 0 °C, 加入 NaH (0.49 g, 12.36 mmol), 室温反应 20 h。将体系温度降至 0 °C, 缓慢加入冰水 7 mL, 此时已有大量固体析出, 再在 0~5 °C 搅拌 30 min, 抽滤, 滤饼用异丙醇 3 mL 洗涤, 干燥, 得白色固体 (1.33 g), 两步的产率为 65%, mp: 178~180 °C。¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 7.48 (2H, d, $J = 8.91$ Hz, Ar-H), 7.31 (4H, dd, $J = 8.76, 8.7$ Hz, Ar-H), 7.00 (2H, d, $J = 8.91$ Hz, Ar-H), 4.34 (2H, m, OCH_2CH_3), 4.09 (2H, t, $J = 5.79$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.80 (3H, s, OCH_3), 3.59 (2H, t, $J = 6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.21 (2H, t, $J = 5.79$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.38 (2H, t, $J = 9.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.84 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.32 (3H, t, $J = 7.08$ Hz, OCH_2CH_3)。

4,5,6,7-四氢-1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氧代-1-哌啶基)苯基]-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (**2**)

将化合物 **13** (1.00 g, 2.05 mmol), 甲醇 10 mL 和 25% 氨水 5 mL 加入到封管中, 60 °C 反应 36 h。抽滤, 滤饼用异丙醇 2 mL 洗涤, 干燥, 乙醇重结晶, 得到白色晶体 0.66 g, 产率 70%, mp: 256~257 °C。¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 7.73 (1H, s, CONH_2), 7.50 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, Ar-H), 7.45 (1H, s, CONH_2), 7.31 (4H, dd, $J = 8.73, 8.7$ Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, Ar-H), 4.05 (2H, t, $J = 12$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 3.80 (3H, s, OCH_3), 3.58 (2H, t, $J = 6$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3.20 (2H, t, $J = 12$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 2.38 (2H, t, $J = 9.0$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 1.84 (4H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14a**) 将苯甲酸 (0.14 g, 1.11 mmol) 溶于二氯甲烷 1 mL 中, 加入两滴 DMF, 然后将温度降至 0 °C, 缓慢加入草酰氯 0.31 mL, 室温反应 1 h, 将溶液旋干备用。将化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol) 溶于 NMP 1.5 mL 中, 将温度降至 0 °C, 缓慢加入上述所制酰氯, 加毕室温反应 30 min, 缓慢加入饱和碳酸氢钠水溶液 2 mL, 此时有固体析出, 将温度降至 0 °C, 搅拌 30 min, 抽滤, 滤饼依次用少量水和异丙醇洗涤, 干燥, 得白色粉末状固体 0.32 g, 产率 85%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(4-硝基-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14b**) 对硝基苯甲酸 (0.19 g, 1.11 mmol), 化合物 **12**

(0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到淡黄色粉末状固体 0.34 g, 产率 82%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(3-氯-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14c**) 间氯苯甲酸 (0.17 g, 1.11 mmol), 化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到白色粉末状固体 0.32 g, 产率 80%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(4-甲氧基-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14d**) 对甲氧基苯甲酸 (0.17 g, 1.11 mmol), 化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到白色粉末状固体 0.34 g, 产率 86%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(3-甲氧基-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14e**) 间甲氧基苯甲酸 (0.17 g, 1.11 mmol), 化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到白色粉末状固体 0.32 g, 产率 80%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(5-氯-噻吩甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14f**) 将 5-氯-噻吩-2-羧酸 (0.18 g, 1.11 mmol), 化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到白色粉末状固体 0.31 g, 产率 75%。

(S)-1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-(6-甲氧基-苯丙酰氨基)苯基)-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14g**) S-奈普生 (0.26 g, 1.11 mmol), 化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到白色粉末状固体 0.31 g, 两步的产率为 68%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-甲氧基-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14h**) 邻甲氧基苯甲酸 (0.17 g, 1.11 mmol), 化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到白色粉末状固体 0.33 g, 产率 82%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氯-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14i**) 2-氯苯甲酸 (0.17 g, 1.11 mmol), 化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到白色粉末状固体 0.34 g, 产率 84%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(4-氯-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-羧酸乙酯 (**14j**) 4-氯苯甲酸 (0.17 g, 1.11 mmol), 化合物 **12** (0.3 g, 0.74 mmol), 按照化合物 **14a** 的制备方法得到白色粉末状固体 0.30 g, 产率 74%。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (**15a**) 化合物 **14a** (0.32 g, 0.63 mmol), 按照化合物 **2** 的制备方法得到白色固体粉末 0.20 g, 产率 65%。IR (KBr, ν): 3 125,

1 670, 1 600, 1 399, 833 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.31 (1H, s, -CONH-), 7.96 (2H, d, J = 6.9 Hz, Ar-H), 7.78 (2H, d, J = 6.9 Hz, Ar-H), 7.72 (1H, s, -CONH₂), 7.79 ~ 7.60 (5H, m, Ar-H), 7.44 (1H, s, -CONH₂), 7.34 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 4.04 (2H, t, J = 6.4 Hz, -NCH₂-), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 3.21 (2H, t, J = 6.4 Hz, -CH₂C = C-). MS (ESI, m/z): 482.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 504.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(4-硝基-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (15b) 化合物 14b (0.34 g, 0.61 mmol), 按照化合物 2 的制备方法得到淡黄色固体粉末 0.21 g, 产率为 66%。IR (KBr, ν): 3 125, 1 668, 1 604, 1 513, 1 399, 834 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.62 (1H, s, -CONH-), 8.38 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 8.20 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.95 (1H, s, -CONH₂), 7.79 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.72 (1H, s, -CONH₂), 7.51 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 7.37 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 4.05 (2H, t, J = 6.4 Hz, -NCH₂-), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 3.21 (2H, t, J = 6.4 Hz, -CH₂C = C-). MS (ESI, m/z): 527.2 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 549.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(3-氯-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (15c)

化合物 14c (0.32 g, 0.59 mmol), 按照化合物 2 的制备方法得到白色固体粉末 0.19 g, 产率 61%。IR (KBr, ν): 3 155, 1 671, 1 602, 1 514, 1 399, 833, 741 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.41 (1H, s, -CONH-), 7.96 (2H, d, J = 6.9 Hz, Ar-H), 7.78 (2H, d, J = 6.9 Hz, Ar-H), 7.72 (1H, s, -CONH₂), 7.79 ~ 7.60 (5H, m, Ar-H), 7.44 (1H, s, -CONH₂), 7.34 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 4.04 (2H, t, J = 6.4 Hz, -NCH₂-), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 3.21 (2H, t, J = 6.4 Hz, -CH₂C = C-). MS (ESI, m/z): 516.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(4-甲氧基-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (15d) 化合物 14d (0.34 g, 0.64 mmol), 按照化合物 2 的制备方法得到白色固体粉末 0.23 g, 产率 71%。IR (KBr, ν): 3 127, 1 670, 1 605, 1 513, 1 399, 1 250 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.15 (1H, s, CONH), 7.97 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.77 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.72 (1H, s, CONH₂), 7.51 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 7.45 (1H, s, CONH₂), 7.34 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 4.04 (2H, t, J = 6.4 Hz, NCH₂), 3.84 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.21 (2H, t, J = 6.4 Hz, CH₂C = C)。MS (ESI, m/z): 512.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 534.0 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(3-甲氧基-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (15e) 化合物 14e (0.32 g, 0.59 mmol), 按照化合物 2 的制备方法得到白色固体粉末 0.21 g, 产率 68%。IR (KBr, ν): 3 128, 1 676, 1 513, 1 400 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.27 (1H, s, CONH), 7.78 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.71 (1H, s, CONH₂), 7.53 (4H, m, Ar-H), 7.46 (1H, d, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.42 (1H, s, CONH₂), 7.34 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.16 (1H, dd, J = 1.8, 8.1 Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, J = 9.0 Hz, Ar-H), 4.05 (2H, t, J = 6.3 Hz, NCH₂), 3.85 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.22 (2H, t, J = 6.3 Hz, CH₂C = C)。MS (ESI, m/z): 512.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 534.2 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(5-氯-噻吩甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (15f) 化合物 14f (0.31 g, 0.56 mmol), 按照化合物 2 的制备方法得到白色固体粉末 0.19 g, 产率 64%。IR (KBr, ν): 3 158, 1 677, 1 598, 1 515, 1 397, 828 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.36 (1H, s, CONH), 7.92 (2H, d, J = 4.1 Hz, -ClC = CH-CH), 7.70 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 7.69 (1H, s, CONH₂), 7.50 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 7.44 (1H, s, CONH₂), 7.34 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.27 (2H, d, J = 4.1 Hz, -ClC = CH-CH), 7.70 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 7.00 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 4.04 (2H, t, J = 6.5 Hz, NCH₂), 3.80 (3H, s, OCH₃), 3.20 (2H, t, J = 6.5 Hz, CH₂C = C)。MS (ESI, m/z): 521.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 543.9 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

(S)-1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-(6-甲氧基-萆丙酰氨基)苯基)-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (15g) 化合物 14g (0.31 g, 0.50 mmol), 按照化合物 2 的制备方法得到白色固体粉末 0.22 g, 产率 74%。IR (KBr, ν): 3 125, 1 676, 1 604, 1 513, 1 399, 1 251, 834 cm^{-1} ; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.16 (1H, s, CONH), 7.79 (3H, m, Ar-H), 7.71 (1H, s, CONH₂), 7.60 (2H, d, J = 8.8 Hz, Ar-H), 7.51 (2H, d, J = 8.2 Hz, Ar-H), 7.45 (2H, d, J = 10.7 Hz, Ar-H), 7.27 (1H, s, CONH₂), 7.26 (2H, d, J = 8.91 Hz, Ar-H), 7.14 (1H, dd, J = 2.3, 8.9 Hz, Ar-H), 6.99 (2H, d, J = 8.9 Hz, Ar-H), 4.00 (2H, t, J = 6.4 Hz, NCH₂), 3.86 (3H, s, OCH₃), 3.79 (3H, s, OCH₃), 3.18 (2H, t, J = 6.4 Hz, CH₂C = C)。MS (ESI, m/z): 590.1 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 612.1 $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-甲氧基-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1H-吡唑并[3,4-C]吡啶-3-甲酰胺 (15h) 化合物 14h (0.33 g, 0.61 mmol), 按照化合物 2 的制备方法得到白色固体粉末 0.22 g, 产率 70%。IR (KBr, ν): 3 139, 1 674, 1 601, 1 515, 1 400, 831, 758 cm^{-1} ; ^1H NMR

(DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.16 (1H, s, CONH), 7.75 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.71 (1H, s, CONH₂), 7.65 (1H, dd, J_1 = 1.8, 7.5 Hz, Ar-H), 7.51 (3H, m, Ar-H), 7.43 (1H, s, CONH₂), 7.32 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.18 (1H, d, J = 8.1 Hz, Ar-H), 7.08 (1H, d, J = 7.5 Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 4.04 (2H, t, J = 6.6 Hz, NCH₂), 3.90 (3H, s, OCH₃), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.21 (2H, t, J = 6.6 Hz, CH₂C = C)。MS (ESI, m/z): 512.2 [M + H]⁺, 534.2 [M + Na]⁺。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(2-氯-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1*H*-吡唑并[3,4-*C*]吡啶-3-甲酰胺 (**15i**)

化合物 **14i** (0.34 g, 0.62 mmol), 按照化合物 **2** 的制备方法得到白色固体粉末 0.20 g, 产率 63%。IR (KBr, ν): 3 127, 1 676, 1 513, 1 400 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.55 (1H, s, CONH), 7.73 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.72 (1H, s, CONH₂), 7.60 (2H, m, Ar-H), 7.53 (4H, m, Ar-H), 7.43 (1H, s, CONH₂), 7.34 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, J = 9.0 Hz, Ar-H), 4.04 (2H, t, J = 6.6 Hz, -NCH₂-), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 3.22 (2H, t, J = 6.6 Hz, -CH₂C = C-)。MS (ESI, m/z): 516.1 [M + H]⁺, 538.1 [M + Na]⁺。

1-(4-甲氧基苯基)-7-氧代-6-[4-(4-氯-苯甲酰氨基)苯基]-4,5,6,7-四氢-1*H*-吡唑并[3,4-*C*]吡啶-3-甲酰胺 (**15j**)

化合物 **14j** (0.30 g, 0.56 mmol), 按照化合物 **2** 的制备方法得到白色固体粉末 0.19 g, 产率 68%。IR (KBr, ν): 3 128, 1 667, 1 606, 1 513, 1 399 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ : 10.38 (1H, s, CONH), 8.00 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.78 (2H, d, J = 9.0 Hz, Ar-H), 7.70 (1H, s, CONH₂), 7.61 (2H, d, J = 8.4 Hz, Ar-H), 7.51 (4H, d, J = 9.0 Hz, Ar-H), 7.43 (1H, s, CONH₂), 7.35 (2H, d, J = 8.7 Hz, Ar-H), 7.01 (2H, d, J = 9.0 Hz, Ar-H), 4.05 (2H, t, J = 6.6 Hz, -NCH₂-), 3.81 (3H, s, -OCH₃), 3.22 (2H, t, J = 6.6 Hz, -CH₂C = C-)。MS (ESI, m/z): 516.1 [M + H]⁺, 538.1 [M + Na]⁺。

3 结果和讨论

对所合成的目标化合物进行了药理活性测试, 测试结果如图 2 所示。所合成的吡唑并吡啶酮类化合物均表现了一定的抗 Xa 因子活性, 但所有化合物的活性均低于阿哌沙班。

初步构效关系分析表明: ①苯环上为吸电子基团时活性降低, 如化合物 **15d** 的抑制活性大于化合物 **15b** 和 **15c**; ②苯环上对位取代的活性比邻位和间位高 (**15d** vs **15e**, **15h** and **15j** vs **15c**, **15i**); ③在 P₄ 部分, 随着基团的增大活性逐渐减

弱, 如化合物 **15g** 的活性最差, 而具有五元环结构的 **15f** 活性最强, 这可能是由于当 P₄ 部分增大时, 不利于与 S₄ 口袋结合。进一步的结构改造正在进行中。

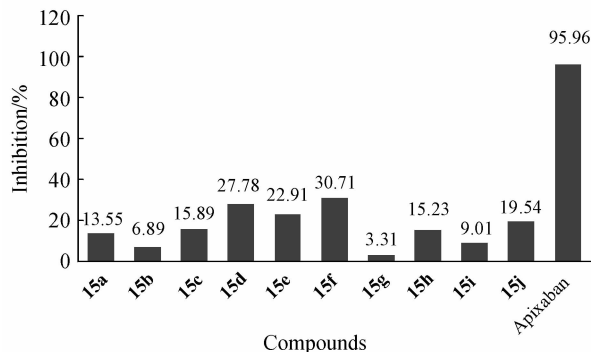


Figure 2 Factor Xa Inhibitory activities of compounds **15a-15j** at 100 nmol/L

4 分子对接

阿哌沙班与 Xa 因子的作用模式已有文献[5]报道, 为了考察本文所报道化合物与 Xa 因子的结合模式, 选取活性最好的化合物 **15f** 与 Xa 因子 (PDB code: 2p16) 利用 Discovery Studio version 2.5 (DS 2.5) 中的 CDOCKER 进行对接。为了确保所选用的对接方式能很好预测配体和受体的结合模式, 首先将阿哌沙班与受体蛋白进行对接, 将对接结果中的最优构象与晶体复合物中的构象进行比对, 结果如图 3 所示, 结果显示 RMSD = 0.712 7 Å, 这说明所选用的方法能很好预测阿哌沙班与受体蛋白的结合模式。

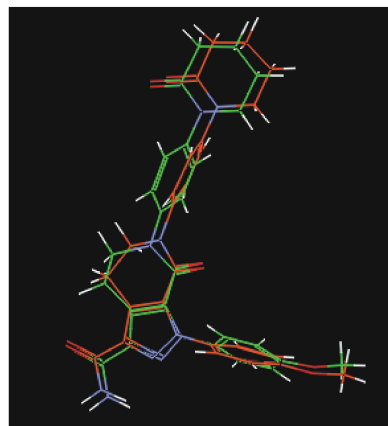


Figure 3 Overlay of binding conformations of apixaban from docking (carbons: green; nitrogens: blue; hydrogens: gray; oxygens: red) and crystallographic determination (showed in pure color of red) (RMSD 0.712 7 Å)

然后选用 CDOCKER 将化合物 **15f** 与 Xa 因子进行对接,对接结果如图 4 所示,从图 4 看出:①对甲氧基苯基与 S₁ 口袋结合,但未与受体蛋白形成任何作用力;②骨架结构中的酰胺基中的羰基氧分别与一分子水和 Gly216 的 NH 形成了氢键;③吡唑 3 位碳相连的酰胺中的 NH₂ 与 Glu146 的羰基现成了氢键作用;④噻吩环与 Tyr99 的苯环形成了 π - π 作用。

对比阿哌沙班与 Xa 因子的作用模式发现,化合物 **15f** 吡唑 2 位的 N 未与 Glu192 的骨干形成相互作用,并且阿哌沙班 P₄ 部分的 2-氮环己酮中的羰基氧与一分子水形成了氢键,也许正是少了这两个作用力,才使得化合物 **15f** 活性上逊于阿哌沙班。

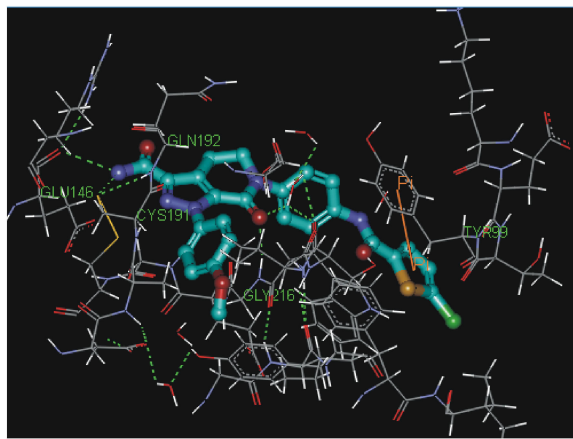


Figure 4 Docking model of compound **15f** to binding site of FXa

参考文献

- [1] Jiang K, Zhou JP, Zhang HB, *et al.* Recent advances in the development of factor Xa [J]. *Chin New Drug J* (中国新药杂志), 2012, **21**(20): 2 380 – 2 387.
- [2] Büller HR. Factor Xa is a superior target to factor IIa for antithrombotic therapies [J]. *Semin Thromb Hemost*, 2003, **29** (Suppl 1): 37.
- [3] Perzborn E. Factor Xa inhibitors — new anticoagulants for secondary haemostasis [J]. *Hamostaseologie*, 2009, **29**(3): 260 – 267.
- [4] Roehrig A, Straub J, Pohlmann T, *et al.* Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro- N-(((5S)-2-oxo-3-[4-(3-oxomorpholin-4-yl) phenyl]-1,3-oxazolidin-5-yl) methyl) thiophene-2-carboxamide (BAY 59-7939): an oral, direct factor Xa inhibitor [J]. *J Med Chem*, 2005, **48**(19): 5 900 – 5 908.
- [5] Pinto DJ, Orwat MJ, Koch S, *et al.* Discovery of 1-(4-methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl) phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-C]pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562 247), a highly potent, selective, efficacious, and orally

- bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa [J]. *J Med Chem*, 2007, **50**(22): 5 339 – 5 356.
- [6] Furugohri T, Isobe K, Honda Y, *et al.* DU-176b, a potent and orally active factor Xa inhibitor; *in vitro* and *in vivo* pharmacological profiles [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, **6**(9): 1 542 – 1 549.
- [7] Deeks ED. Apixaban: a review of its use in the prevention of venous thromboembolism after knee or hip replacement surgery [J]. *Drugs*, 2012, **72**(9): 1 271 – 1 291.
- [8] Hohnloser SH, Hijazi Z, Thomas L, *et al.* Efficacy of apixaban when compared with warfarin in relation to renal function in patients with atrial fibrillation; insights from the ARISTOTLE trial [J]. *Eur Heart J*, 2012, **33**(22): 2 821 – 2 830.
- [9] East China University of Science and Technology. The preparation of anti-thrombotic drugs apixaban; CN, 101967145 [P]. 2011-02-09 [2013-03-26].
- [10] Zhou JC, Oh LM, Ma P, *et al.* Synthesis of 4,5-dihydro-pyrazolo [3,4-C] pyrid-2-ones; US, 2003181466A1 [P]. 2003-09-25 [2013-03-26].
- [11] Gant TG, Shahbaz MM. Pyrazole carboxamide inhibitors of factor Xa; US, 20 10130543A1 [P]. 2010-05-27 [2013-03-26].
- [12] Mimi Q, Michael O, Long LY, *et al.* Lactam-containing compounds and derivatives thereof as factor Xa inhibitors; WO, 03026652A1 [P]. 2003-04-03 [2013-03-26].
- [13] Zhou JC, Oh LM, Ma P, *et al.* Synthesis of 4,5-dihydro-pyrazolo [3,4-C] pyrid-2-ones; WO, 030 49681A2 [P]. 2003-06-19 [2013-03-26].
- [14] Gant TG, Shahbaz MM. Pyrazole carboxamide inhibitors of factor Xa; WO, 2010030983A2 [P]. 2010-03-18 [2013-03-26].
- [15] Heusgen R. Mechanism of 1,3-dipolar cycloadditions. Reply [J]. *J Org Chem*, 1968, **33**(6): 2 291 – 2 297.
- [16] Surman MD, Freeman EE, Grabowski JF, *et al.* 5-(pyridinon-1-yl) indazoles and 5-(furopyridinon-5-yl) indazoles as MCH-1 antagonists [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, **20**(23): 7 015 – 7 019.
- [17] Bessard Y. Process development of 5-methoxy-1H-indole-2-carboxylic acid from ethyl 2-methylmalonate [J]. *Org Process Res Dev*, 1998, **2**(4): 214 – 220.
- [18] Atlan V, Kaim LE, Supiot C. New versatile approach to α -hydrazonoesters and amino acid derivatives through a modified Japp-Klingemann reaction [J]. *Chem Commun*, 2000, **15**: 1 385 – 1 386.
- [19] Ramirez A, Mudryk B, Rossano L, *et al.* A mechanistic study on the amidation of esters mediated by sodium formamide [J]. *J Org Chem*, 2012, **77**(1): 775 – 779.
- [20] Elmore C, Maxwell B. 10th international symposium on the synthesis and applications of isotopes and isotopically labelled compounds-applications of isotopes in pharmacology, clinical and medical research [J]. *J Labelled Comp Radiopharm*, 2010, **53**(5/6): 355 – 367.