·综 述·

蛋白酶激活受体-4 拮抗剂的研究进展

解晓帅[1]，路 楠[2*]，黄长江[3]，许佑君[2]，刘登科[3]
1. 天津市第一中心医院 药学部，天津 300192
2. 沈阳药科大学 制药工程学院，辽宁 沈阳 110016
3. 天津药物研究院，天津 300193

摘 要：蛋白酶激活受体-4（PAR-4）是一个由 300 个氨基酸经过 7 次跨膜形成的 G 蛋白偶联受体，它可通过与凝血酶的结合诱导血小板聚集，参与凝血过程。因此，PAR-4 受体可以作为抗血小板药物的新靶点。近年来研究者发现了 3 种不同结构类型的小分子 PAR-4 受体拮抗剂，分别含有吲唑、吲哚和咪唑并噻二唑结构。对这几种拮抗剂的结构、药理活性等方面的研究进展进行综述。

关键词：蛋白酶激活受体-4；抗血小板药物；PAR-4 受体拮抗剂；吲唑；吲哚；咪唑并噻二唑
中图分类号：R973 **文献标志码：**A **文章编号：**1674 - 5515(2017)12 - 2529 - 05
DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.12.052

Research progress on PAR-4 inhibitors

XIE Xiao-shuai[1], LU Nan[2], HUANG Chang-jiang[3], XU You-jun[2], LIU Deng-ke[3]
1. Department of Pharmacy, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China
2. School of Pharmaceutical Engineering, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China
3. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Protease-activated receptor-4 (PAR-4) is a G protein-coupled receptor formed by 300 amino acids through 7 transmembrane. It can induce platelet aggregation by binding to the thrombin, and participate in the process of blood coagulation. As a result, PAR-4 can be considered as a very valuable potential treatment of antiplatelet target. In recent years, three type of small molecules PAR-4 inhibitors, including indazoles, indoles, and imidazothiadiazoles have been developed. Research progress on the structure and pharmacological activities of PAR-4 inhibitors are reviewed in this paper.

Key words: protease-activated receptor-4 (PAR-4); antiplatelet drugs; PAR-4 inhibitors; indazoles; indoles; imidazothiadiazoles

急性冠状动脉综合征（ACS）是以冠状动脉粥样硬化斑块破裂或侵袭，继发完全或不完全闭塞性血栓形成为病理基础的一组临床综合征。血小板激活介导的血栓形成是 ACS 的主要病理生理机制，血小板的黏附、激活、聚集过程在动脉血栓的发展中也起着关键作用。因此，抗血小板药物在 ACS 的治疗中尤为重要[1-2]。近年来，临床上多以阿司匹林联合氯吡格雷的双联抗血小板治疗为基础手段[3]。美国食品和药品管理局（FDA）分别在 2009 和 2011 年批准了新型口服 P2Y12 受体抑制剂普拉格雷和替格瑞洛的临床应用。上述药物起效更快，作用更强，预测性更好，但其出血风险也相应增加[4-5]。为优化抗血小板药物的治疗效果，减少其出血副作用，新型抗血小板药物的研究需求日益凸显。

凝血酶不仅参与血液凝固过程，同时也是最强的血小板激活物[6]。它通过与蛋白酶激活受体（PARs）结合发挥作用。PARs 是细胞表面的一种 G-蛋白偶联受体，迄今为止已有 4 个 PARs 被发现，分别为 PAR-1、PAR-2、PAR-3 和 PAR-4[7-8]。2001 年，Sambrano 等[9]发现敲除小鼠 PAR-4 基因会使血小板

收稿日期：2017-09-15
作者简介：解晓帅（1981—），女，主管药师，研究方向为临床药学。Tel: (022)23626417 E-mail: hsxiexiaoshuai@163.com
*通信作者 路 楠（1988—），女，博士，主要从事心脑血管药物的设计与合成。Tel: (022)23006856 E-mail: lunantj@126.com

对凝血酶反应完全丧失。这就启发了研究者们通过阻断 PARs 来预防或治疗血栓疾病。人类血小板表达 PAR-1 和 PAR-4，凝血酶切割 PAR-1 和 PAR-4 的 N-端部分，从而激活血小板，使其发挥作用。PAR-1 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[10-11]。FDA 已批准 vorapaxar 为首创型 PAR-1 拮抗剂上市，用于治疗心肌梗死、中风等心血管疾病。但其临床试验表明使用 vorapaxar 会导致颅内出血[12]，这就限制了它的使用。从半最大效应浓度（EC_{50}）的数值来看，PAR-1（约 0.2 nmo/L）与 PAR-4（约 5 nmo/L）存在数量级的差别，这表明 PAR-4 在受损部位与凝血酶的结合需要一个较高的凝血酶浓度[10, 13]。已有研究者证明对于凝血酶引起的血小板聚集，PAR-4 相比 PAR-1 发挥了更重要的作用[6]。因此，研究者们开始更多的关注 PAR-4 靶点，致力于找到有效且安全的新型抗血小板药物。

PAR-4 于 1998 年由 Xu 等[14]首次克隆，是 PARs 家族最新被克隆出的成员。它是一个由 300 个氨基酸经过 7 次跨膜形成的 G 蛋白偶联受体，并保留了 PARs 家族其他受体的核心特征。PAR-4 受体 N-末端包含一个疏水性信号多肽区，此区域中存在一个 Ser^{17}/Gly^{18} 的裂解位点。胞外氨基酸末端还包含一个重要的有受体激活作用的蛋白酶裂解位点 Arg^{47}/Gly^{48}。这一位点上 $Arg^{47}\rightarrow Ala$ 的突变则会导致其完全失去蛋白水解的激活作用。这一特殊位点的裂解会暴露一段隐藏的配基序列（GYPGQV），从而引起信号肽段与第二胞外环的结合。这一受体构象的改变会引发胞内 G 蛋白（G_q、G_i、$G_{12/13}$）信号传输[15-16]，从而发生血小板活化、Ca^{2+}释放、血管中细胞旁通透性改变等一系列生理反应[17]。

对于 PAR-4 生理作用的进一步研究有赖于其特异且有效的激动剂和拮抗剂的发现，这一特定的受体结构和激活机制又在一定程度上限制了其拮抗剂的研究发现。但近年来仍有不少研究人员克服重重阻碍，设计合成或通过高通量筛选技术发现了 3 种不同结构类型的小分子 PAR-4 受体拮抗剂，分别包含吲唑、吲哚和咪唑并噻二唑结构。本文对这几种拮抗剂的结构、药理活性等进行综述，以期为研究新型抗血小板药物提供有价值的参考。

1 吲唑结构类化合物

2001 年，Lee 等[18]设计并合成了一系列含吲唑结构的化合物，并对它们的抗血小板活性进行筛选。发现其中 YD-3 对由凝血酶诱发的血小板聚集有很强的抑制性（IC_{50}＝29.3 μmol/L），而对花生四烯酸（AA）、胶原蛋白、血小板活化因子（PAF）诱发的血小板聚集没有或有很低抑制作用。在深入的研究中研究者又发现 YD-3 是一种非 PAR-1 凝血酶受体拮抗剂，而仅对由一种 PAR-4 激动肽 GYPGKF 诱发的血小板聚集有很好的抑制活性（IC_{50}＝0.13±0.02 μmol/L）[19-20]。由此产生了第 1 个非肽类小分子 PAR-4 拮抗剂，YD-3 为进一步研究 PAR-4 的生理功能提供了可能。但是，在新鲜的人血中，YD-3 对血小板聚集的抑制作用还是比较温和，所以研究者们开始了对它的修饰和改造。YD-3 的化学结构见图 1。

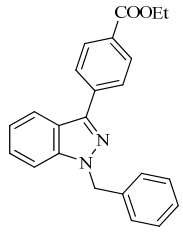

图 1 YD-3 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of YD-3

如前所述，为能找到比 YD-3 活性更优的化合物，研究者以 YD-3 为先导化合物，试图对其吲唑环 N_1、N_2[21-22]及 C_3[22]位上取代基进行修饰。研究发现：（1）4″位乙酯基和 1 位苄基是 YD-3 对抗 PAR-4 活性和选择性有效的重要基团；（2）4″位乙酯基如果被其他酯基、酰胺或羧酸取代，则活性会下降；（3）在 1 位苄基苯环上引入卤素或甲基可以保留它的活性及选择性。其中 1 位苄基苯环上有 Cl 取代的 4-(1-(3-氯-1-苄基)-1*H*-吲唑-3-)苯甲酸乙酯（**1**）表现出对 GYPGKF 比 YD-3 更强的抑制活性（IC_{50}＝0.08±0.01 μmol/L），而以吡啶环替代苯环得到的 4-(-1-(吡啶-2-甲基)-1*H*-吲唑-3-)苯甲酸乙酯（**2**，IC_{50}＝0.29±0.03 μmol/L）易制成盐酸盐形式，比较易于后续开发。4-(-1-(苯基)-1*H*-吲唑-3-)苯甲酸乙酯（**3**）则对胶原蛋白（IC_{50}＝4.81±0.14 μmol/L）和 GYPGKF（IC_{50}＝2.64±0.29 μmol/L）引起的聚集均有抑制作用。这些发现都为进一步研究提供了基础。化合物 **1**～**3** 的化学结构见图 2。

2 吲哚结构类化合物

Young 等[23]和 Wen 等[24]在 YD-3 的基础上展开了对 PAR-4 拮抗剂的研究。他们首先将 YD-3 结构中吲唑环改为吲哚环，合成了 4-(-1-(苯基)-1*H*-吲哚-

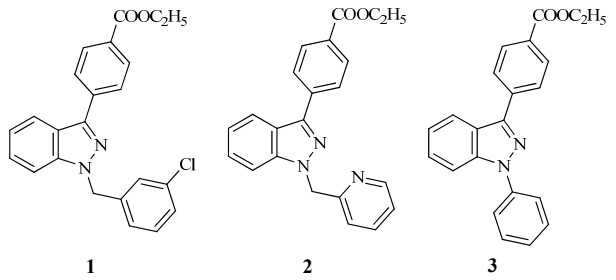

图 2 化合物 1～3 的化学结构

Fig. 2 Chemical structures of compounds 1 — 3

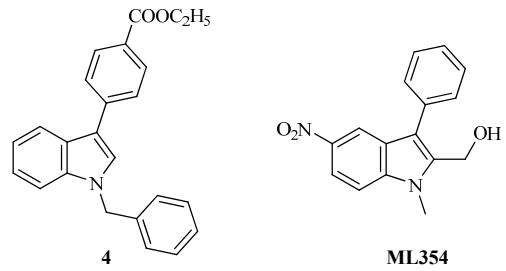

图 3 化合物 4 和 ML354 的化学结构

Fig. 3 Chemical structures of compound 4 and ML354

3-)苯甲酸乙酯（**4**），不仅在化学合成上降低了难度，同时还得到了更优的活性数据，对 PAR-4 的 IC_{50} 为 66 nmol/L，对 PAR-1 的 IC_{50}＞10 μmol/L。接下来，他们在 Vanderbilt 大学的样品库中寻找出与化合物 **4** 类似结构的 160 多个化合物进行初步筛选，通过筛选发现了化合物 ML354，对 PAR-4 的 IC_{50} 为 140 nmol/L，对 PAR-1 的 IC_{50} 为 10 mmol/L。但是对于 ML354 所含硝基苯结构相关的毒理学以及药动学数据中缺陷的考虑，研究者们决定以 ML354 为一类结构类型的先导化合物，对其进行修饰研究。但遗憾的是，无论是针对吲哚 N_1 位、3 位苯环或替换硝基取代都没有能够得到理想的结果。化合物 **4** 和 ML354 的化学结构见图 3。

3 咪唑并噻二唑结构类化合物

与此同时，施贵宝公司也展开了对 PAR-4 拮抗剂的研究工作[25-29]。经过对大量含有咪唑并噻二唑结构化合物的合成筛选，现已成功发现 BMS-986141、BMS-986120、UDM-001651 和 UDM-002555 等化合物，并已进入临床试验阶段，其化学结构见图 4。其中，UDM-002555 抑制 PAR-4 激动剂引起的血小板聚集的 IC_{50} 值分别为 2.3、1.0 nmol/L（人、猴全血）；在短尾猴的血栓形成和出血模型中，口服给药，0.02～2.5 mg/kg，单独或与阿司匹林联合用药 4.0 mg/(kg·h)，与口服标准的抗血小板药物氯吡格雷 0.3 mg/kg 和阿司匹林相比，其表现出有效的抗血栓活性及低的出血反应。2016 年 3 月完成 BMS-986120 的Ⅰ期临床试验，其公布的临床前研究结果表明，BMS-986120 可以有效地减少血栓的形成，在大鼠、狗、短尾猴上的生物利用度分别为 98%、19%、29%，且与氯吡格雷比较，BMS-986120 出血少。

巧合的是，Temple 等[30-31]在不断修饰 ML354 的过程中也引入了咪唑并噻二唑结构，并发现含有该结构的 1-(2-氯-1-苄基)-3-(2-甲氧基[2,1-b][1,3,4]咪唑并噻二唑-6-)-5-三氟甲氧基-1*H*-吲哚-2-)-甲醇（**6**）比

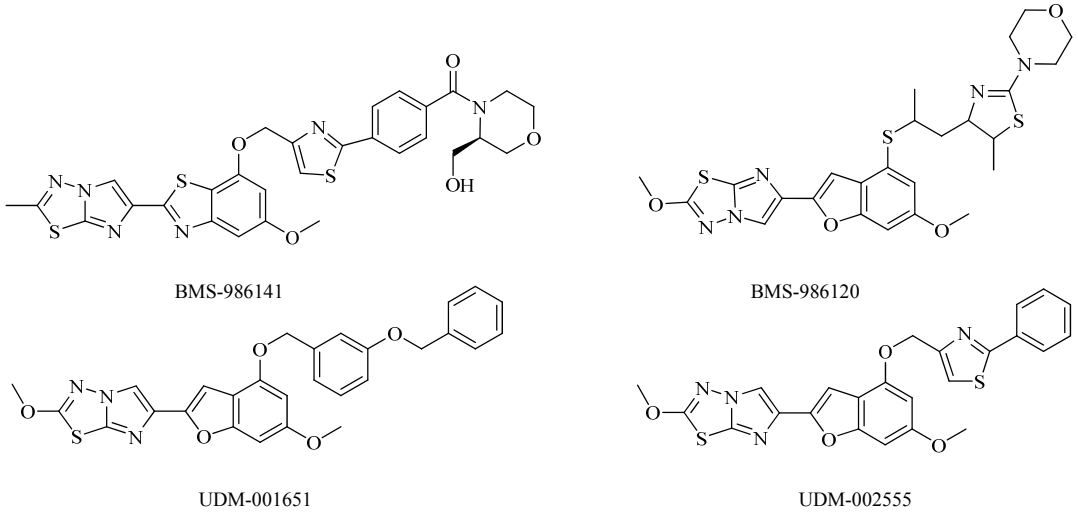

图 4 施贵宝公司进入临床研究的 PAR4 拮抗剂

Fig. 4 PAR4 agonist under clinical study from BMS company

其他由 ML354 修饰得到的化合物 1-(2-氯-1-苄基)-3-(6-甲氧基-3-吡啶)-5-三氟甲氧基-1*H*-吲哚-2-)-甲醇（**5**）有更优的药理活性和体内药动学参数。在试图寻找 PAR-4 拮抗剂最小药效团的过程中，Temple 等[31]经过对化合物 **6** 的修饰，找到相对分子质量适中，且对 γ-thrombin 有很好抑制作用的 2-甲氧基-6-(1-甲基-5-(三氟甲氧基)-1*H*-吲哚-2-)- [1,2,4]三氮唑并[5,1-b][1,3,4]噻二唑（**7**），对 PAR4 活性肽的 IC_{50} 为 20 nmol/L，对 PAR4 γ-thrombin 的 IC_{50} 为 1.0 μmol/L。为后期研究发现在药理活性、药动学参数以及成药性各方面均有良好表现的化合物做好了铺垫。化合物 **5**～**7** 的化学结构见图 5。

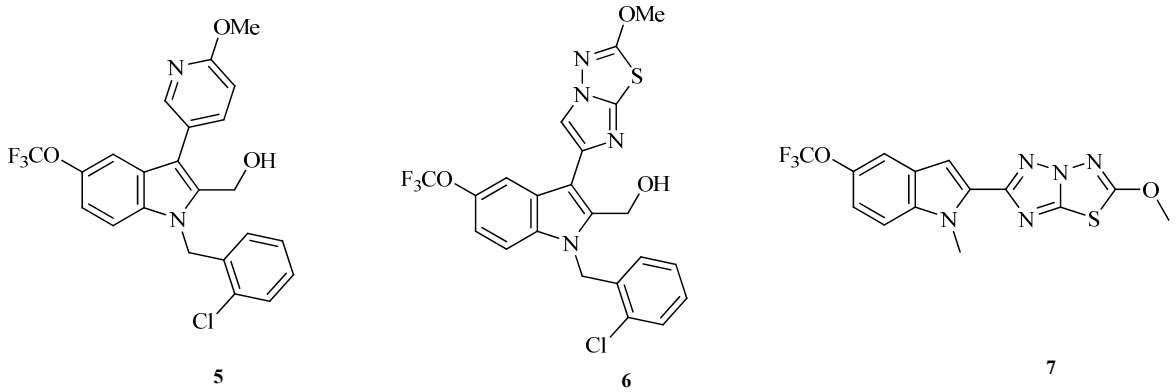

图 5 化合物 5～7 的化学结构

Fig. 5 Chemical structures of 5 — 7

4 结语

自科学家发现 PAR4 这一有潜力的靶点至今虽已有 15 年，但对其各方面的了解还相对较少，对这一靶点小分子拮抗剂的研究还不够广泛和深入。在目前研究的几种拮抗剂中，还存在着一些问题，如药动学参数不理想、成药性差强人意、生物利用度有待提高以及用 PAR4 活性肽和 γ-thrombin 评价出化合物的 IC_{50} 值的差别等等。目前为止，仅有施贵宝公司的化合物 BMS-986120 进入Ⅱ期临床试验。但由于临床需求和研究者们对 PAR-4 这一新颖靶点的兴趣日益增长，相信该领域将有长足发展。

参考文献

[1] Franchi F, Angiolillo D J. Novel antiplatelet agents in acute coronary syndrome [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2014, 12(1): 30-47.

[2] Davì G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(24): 2482-2494.

[3] Angiolillo D J, Ueno M, Goto S. Basic principles of platelet biology and clinical implications [J]. *Circ J*, 2010, 74(4): 597-607.

[4] Angiolillo D J. The evolution of antiplatelet therapy in the treatment of acute coronary syndromes: from aspirin to the present day [J]. *Drugs*, 2012, 72(16): 2087-2116.

[5] Ferreiro J L, Angiolillo D J. New directions in antiplatelet therapy [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2012, 5(3): 433-445.

[6] Lindahl T L, Macwan A S, Ramström S. Protease-activated receptor 4 is more important than protease-activated receptor 1 for the thrombin-induced procoagulant effect on platelets [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14(8): 1639-1641.

[7] Cunningham M, McIntosh K, Bushell T, *et al*. Proteinase-activated receptors (PARs) as targets for antiplatelet therapy [J]. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(2): 606-612.

[8] Wu C C, Wu S Y, Liao C Y, *et al*. The roles and mechanisms of PAR4 and P2Y12/ phosphatidylinositol 3-kinase pathway in maintaining thrombin-induced platelet aggregation [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 161(3): 643-658.

[9] Sambrano G R, Weiss E J, Zheng Y W, *et al*. Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis [J]. 2001, *Nature*, 413(6851): 74-78.

[10] Arachiche A, Mumaw M M, de la Fuente M, *et al*. Protease-activated receptor 1 (PAR1) and PAR4 heterodimers are required for PAR1-enhanced cleavage of PAR4 by α-thrombin [J]. *J Biol Chem*, 2013, 228(45): 32553-32562.

[11] Vu T K, Wheaton V I, Hung D T, *et al*. Domains specifying thrombin-receptor interaction [J]. *Nature*, 1991, 353(6345): 674-677.

[12] Tricoci P, Huang Z, Held C, *et al*. Thrombin-receptor antagonist vorapaxar in acute coronary syndromes [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(1): 20-33.

[13] Bevers E M, Comfurius P, van Rijn J L, *et al*. Generation

of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets [J]. *Eur J Biochem*, 1982, 122(2): 429-436.

[14] Xu W F, Andersen H, Whitmore T E, *et al*. Cloning and characterization of human protease-activatedreceptor 4 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998: 95: 6642-6646.

[15] Coughlin S R. Thrombin signalling and protease-activated receptors [J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 258-264.

[16] Faruqi T R, Weiss E J, Shapiro M J, *et al*. Structure-function analysis of protease-activated receptor 4 tethered ligand peptides. Determinants of specificity and utility in assays of receptor function [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(26): 19728-19734.

[17] French S L, Hamilton J R. Protease-activated receptor 4: from structure to function and back again [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(20): 2952-2965.

[18] Lee F Y, Lien J C, Huang L J, *et al*. Synthesis of 1-benzyl-3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)indazole analogues as novel antiplatelet agents [J]. *J Med Chem*, 2001, 44: 3746-3749.

[19] Wu C C, Hwang T L, Liao C H, *et al*. Selective inhibition of protease-activated receptor 4-dependent platelet activation by YD-3 [J]. *Thromb Haemost*, 2002, 87(6): 1026-1033.

[20] Wu C C, Huang S W, Hwang T L, *et al*. YD-3, a novel inhibitor of protease-induced platelet activation [J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 130(6): 1289-1296.

[21] Huang L J, Shih M L, Chen H S, *et al*. Synthesis of N_2-(substituted benzyl)-3-(4-methylphenyl) indazoles as novel anti-angiogenic agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(2): 528-536.

[22] Chen H S, Kuo S C, Teng C M, *et al*. Synthesis and antiplatelet activity of ethyl 4-(1-benzyl-1*H*-indazol-3-yl)benzoate (YD-3) derivatives [J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(3): 1262-1278.

[23] Young S E, Duvernay M T, Schulte M L, *et al*. Synthesis of indole derived protease-activated receptor 4 antagonists and characterization in human platelets [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65528.

[24] Wen W, Young S E, Duvernay M T, *et al*. Substituted indoles as selective protease activated receptor 4 (PAR-4) antagonists: discovery and SAR of ML354 [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(19): 4708-4713.

[25] E.S.普里斯特利, S.L.波西, F.特伦布莱, 等. 作用于治疗血小板聚集的蛋白酶激活受体 4(PAR4)抑制剂的咪唑并噻二唑和咪唑并哒嗪衍生物 [P]. 中国: 201380033473, 2013-04-24.

[26] M.劳伦斯 R, M.米勒 M, A.塞菲尔特 D, 等. 作用于治疗血小板聚集的作为蛋白酶激活受体 4(PAR4)抑制剂的咪唑并噻二唑衍生物 [P]. 中国: 201380033512, 2013-04-24.

[27] E.S.普里斯特利, S.L.波西, F.特伦布莱, 等. 作为蛋白酶激活受体 4(PAR4)抑制剂用于治疗血小板聚集的咪唑并噻二唑和咪唑并吡嗪衍生物 [P]. 中国: 201380032304, 2013-04-24.

[28] Jacques B. Imidazopyridazine and imidazothiadiazole compounds [P]. WO: 2016134450(A), 2016-09-01.

[29] Ruediger E H; Deon D H; Gagnon M, *et al*. Benzothiazole and benzothiophne compounds [P]. WO: 2016138199(A_1), 2016-09-01.

[30] Temple K J, Duvernay M T, Young S E, *et al*. Development of a series of (1-benzyl-3-(6-methoxypyrimidin-3-yl)-5-(trifluoromethoxy) 1*H*-indol-2-yl)methanols as selective protease activated receptor 4 (PAR4) antagonists with *in vivo* utility and activity against γ-thrombin [J]. *J Med Chem*, 2016, 59(16): 7690.

[31] Temple K J, Duvernay M T, Maeng J G, *et al*. Identification of the minimum PAR4 inhibitor pharmacophore and optimization of a series of 2-methoxy-6-arylimidazo [2,1-b] [1,3,4] thiadiazoles [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26(22): 5481-5486.