

## Xa 因子抑制剂的 research 进展

陈鑫, 张惠斌\*, 黄文龙\*\*, 江凯

(中国药科大学新药研究中心, 南京 210009)

**摘要** Xa 因子是一种丝氨酸蛋白酶, 在凝血过程中起关键作用, 是临床上预防和治疗凝血的新靶点, 在口服抗凝剂的开发中扮演着重要角色, 近年来引起药学工作者的广泛关注。本文综述了几类主要的直接 Xa 因子抑制剂及其构效关系的最新研究进展, 特别是利用现有抑制剂-酶复合物晶体 X-衍射研究得到的 Xa 因子结合位点的重要结构信息, 从结构上进一步分析 Xa 因子与多种不同类型的药物分子相结合的作用机制, 从而总结出抑制剂-酶紧密结合的重要分子间相互作用, 为基于结构的药物设计以获得新型 Xa 因子抑制剂提供较好的理论依据。

**关键词** Xa 因子抑制剂; 构效关系; 研究进展

**中图分类号** R973 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2010)02-0104-08

## Advances in the research of factor Xa inhibitors

CHEN Xin, ZHANG Hui-bin\*, HUANG Wen-long\*\*, JIANG Kai

Center of Drug Discovery, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Factor Xa is a trypsin-like serine protease playing a pivotal role in the blood coagulation cascade. Factor Xa and its inhibitors are of great importance in the development of orally active antithrombotic agents and have aroused considerable attention from the pharmaceutical industry sector over the years. In this review, the structural characteristics of the factor Xa binding site are discussed and the X-ray information available together with the published structure-activity relationship data is used to identify the molecular interactions that are most important for tight enzyme-inhibitor binding, which would be useful in the structure-based drug design of novel factor Xa inhibitors.

**Key words** factor Xa inhibitor; structure-activity relationship; research advances

This study was the National Natural Science Foundation of China(No. 30973638); and China National Key Hi-Tech Innovation Project for the R&D or Novel Drugs(No. 2009ZX09103-094)

尽管人们在预防和治疗血栓方面已经作出了巨大的努力, 但动脉和静脉血栓仍然是造成死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。当前防治血栓形成的治疗方法包括使用阿司匹林作为预防及慢性治疗动脉血栓的主要用药, 而噻氯匹定和氯吡格雷对阿司匹林有增效作用。肝素和华法林分别为急性和慢性血栓性疾病的抗凝剂<sup>[3]</sup>。但是, 由于出血、血小板减少等明显的不良反应, 这些抗凝剂的使用受到限制, 并且需要对患者进行血液监测。因此, 具有宽治疗域的抗血栓药物在医疗上有更广泛的需求。在过去几年里, 研究工作的重点在凝血级联途径的特定酶, 如凝血酶、Xa 因子和

TF/VIIa 因子<sup>[4]</sup>。凝血酶(凝血因子 II a)在凝血反应中起核心作用, Xa 因子是外源性和内源性凝血途径的交汇处, 二者都是抗凝药物的主要作用靶点。新型抗凝药物主要是针对凝血酶(凝血因子 II a)和 Xa 因子的抑制剂。Xa 因子抑制剂可选择性抑制 Xa 因子, 延长凝血时间, 减少凝血酶生成而达到抗血栓作用, 与常用药物及食物间的相互作用很小, 无需调整剂量和用药监控<sup>[5]</sup>。本文对 Xa 因子的 X-衍射晶体结构和目前几类具有开发前景的 Xa 因子抑制剂的发现过程及构效关系研究等进行综述。

\* 收稿日期 2010-03-11 通讯作者 \* Tel:025-83271302 E-mail: zhanghb80@163.com

\*\* Tel:025-83271480 E-mail: ydhuangwenlong@126.com

**基金项目** 国家自然科学基金资助项目(No. 30973638); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 2009ZX09103-094)

1 Xa 因子的结构功能

Xa 因子是一种丝氨酸蛋白酶,Brandstette 等<sup>[6]</sup>测定了人类 Xa 因子的 X-衍射晶体结构(图 1),发现它和凝血酶类似,有 S1、S2、S3 和 S4 四部分。S1 是 Xa 因子的特异性结合口袋,也是决定底物特异性的主要因素之一,其为一狭窄的裂缝,底部有一个天冬氨酸残基;S4 是 Xa 因子的芳香性口袋,由残基 Phe174、Tyr99 和 Trp215 所形成,这一口袋比凝血酶中含残基 Leu99 和 Ile174 的相应区域具更大的芳香性;被称为“阴离子洞”的 S2 是另一个识别因子,位于 S4 后面,由 Glu97 和 Lys96 的羧基和结构水分子形成,能与碱性带电基团作用。与凝血酶的相应区域相比,Xa 因子 S2 的空间很小。在凝血酶原转化为凝血酶的过程中,Xa 因子处于连接内源性和外源性激活途径共同通路的中心位置,故 Xa 因子抑制剂既能阻断内源性凝血亦能抑制外源性凝血的发生<sup>[7]</sup>。由于在这一过程中还存在生物信号的放大,估计一个 Xa 因子抑制剂分子能抑制 138 个凝血酶分子的生理效应,因此 Xa 因子抑制剂可能较凝血酶抑制剂更为有效<sup>[8]</sup>。此外,使用 Xa 因子抑制剂比使用凝血酶抑制剂的出血危险小。对 Xa 因子抑制剂的设计及结构改造,主要集中于在分子中引入能特异性作用于 Xa 因子的亲脂性口袋 S4 和 S1 的亚基,且两亚基通过满足与 S1 和 S4 相互作用所需距离的中心支架相连。

2 Xa 因子抑制剂

由于 Xa 因子在凝血级联中的核心和独特的地位,过去 10 年一直是药物干预的主要焦点。Xa 因子抑制剂抗凝血药的发现和发展已经取得了重大进展,几个小分子 Xa 因子抑制剂已进入Ⅲ期临床试验。其中第 1 个口服 Xa 因子抑制剂利伐沙班(rivaroxaban),最近获准在多个国家和地区用于静脉血栓预防。

2.1 利伐沙班

利伐沙班(化合物 5)为噁唑烷酮类化合物,由拜耳/强生公司研发。其于 2008 年在加拿大和欧盟获得批准上市,又于 2009 年在澳大利亚上市,现已在中国正式上市,商品

名为拜瑞妥。利伐沙班是全球首个口服直接 Xa 因子抑制剂,对 Xa 因子具有高度的选择性,除了可以抑制呈游离状态的 Xa 因子外,还可抑制结合状态的 Xa 因子,对血小板聚集没有直接作用。利伐沙班具有生物利用度高,治疗疾病谱广,量效关系稳定,抗凝效果可预测,抗凝活性无需监控,与食物和药物相互作用小,临床使用方便等特点。临床试验表明,利伐沙班既可预防和治疗静脉血栓,又可预防和治疗动脉血栓。

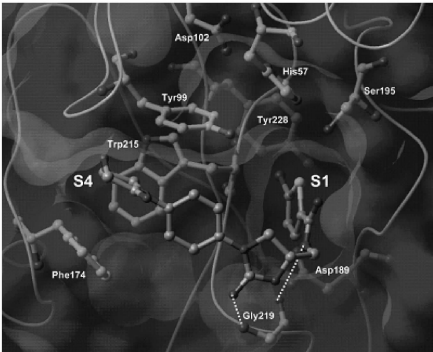
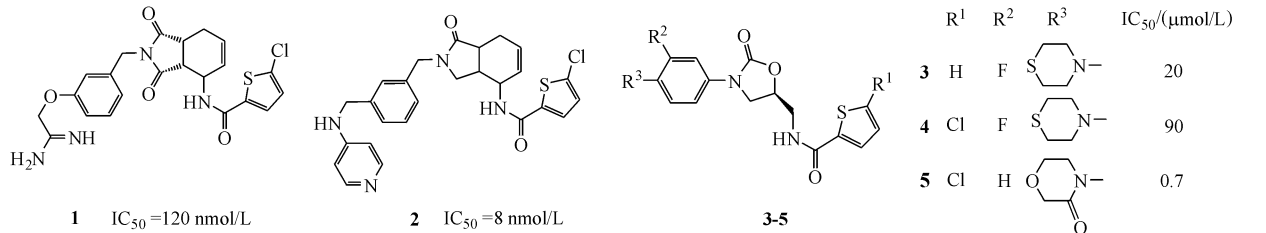


Figure 1 X-ray crystal structure of rivaroxaban in complex with human factor Xa. Essential amino acids and binding pockets are indicated;the two hydrogen bonds between rivaroxaban and Gly219 are shown as dotted lines<sup>[9]</sup>

2.1.1 发现过程和构效关系 利伐沙班的发现起源于由高通量筛选(HTS)得到的先导化合物 1,经优化得到异吡啶啉酮类(如化合物 2),是一类强效的 Xa 因子抑制剂,但普遍生物利用度较低。噁唑烷酮(3)是一个非常弱的 Xa 因子抑制剂,运用对异吡啶啉酮系列的经验,将化合物 3 的噁吩基团换成 5-氯噁吩,得到的化合物 4 活性提高超过 200 倍。另外又研究发现噁唑烷酮核心(S)-构型显示出对 Xa 因子特定的相互作用。先导化合物 4 给口服 Xa 因子抑制剂的优化提供了一个极好的出发点:不包含高碱性基团,如脒基或其他带正电荷基团;这些虽被认为是与 Xa 因子相互作用所必不可少的,但它们会影响口服吸收<sup>[10]</sup>;此外,噁唑烷酮类有良好的药动学特性<sup>[11]</sup>。

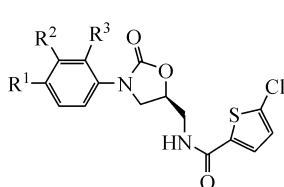


优化首先是从硫代吗啉基团开始的。吗啉衍生物 6 及不含氟化合物 7,吡咯烷衍生物 8 使 Xa 因子抑制作用得到一些改善。相比之下,二甲氨基衍生物 9 和哌嗪衍生物 10

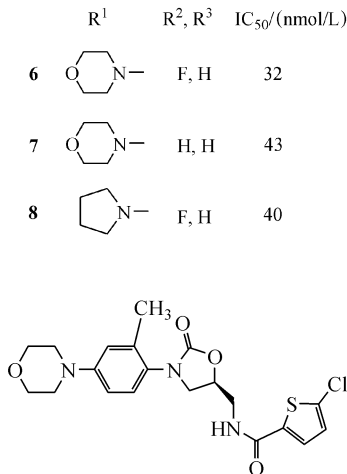
的抑制作用下降。与化合物 8 相比,吡咯烷酮衍生物 11 的作用效果改善明显。结合这些结果催生了吗啉酮衍生物 5 的设计,实现抗 Xa 因子作用显著增强(IC<sub>50</sub>=0.7 nmol/L;

$K_i = 0.4 \text{ nmol/L}$ )。取代 3-芳位有较好的耐受性而有类似的效力,如 3-氟衍生物 **12**, 3-三氟甲基衍生物 **13** 和 3-氨基衍生物 **14**。2-芳位取代是不利的;如 2-甲基衍生物 **15** 与未

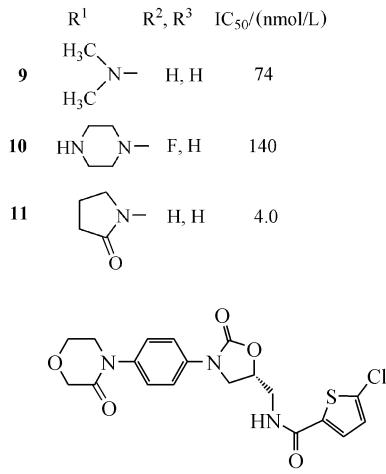
取代的化合物 **7** 相比抑制作用下降至 1/30。另外,恶唑烷酮环的正确构型(*S*)-型是必需的[(*S*)-对映体 **5** 的  $IC_{50}$  为  $0.7 \text{ nmol/L}$ ; (*R*)-对映体 **16** 的  $IC_{50}$  为  $2.3 \mu\text{mol/L}$ ]。



<b>12</b> R=F	$IC_{50} = 1.4 \text{ nmol/L}$
<b>13</b> R=CF <sub>3</sub>	$IC_{50} = 1.0 \text{ nmol/L}$
<b>14</b> R=NH <sub>2</sub>	$IC_{50} = 2.5 \text{ nmol/L}$



**15**  $IC_{50} = 1.26 \mu\text{mol/L}$

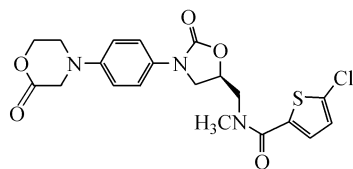
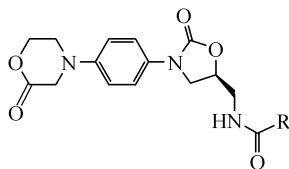


**16**  $IC_{50} = 2.3 \mu\text{mol/L}$

亲脂性氯代噻吩基会减少非结合分数和水溶性,以亲脂性较低的基团替代氯噻吩会导致作用效果的急剧减小。这类化合物中除化合物 **5** 外,仅 5-溴噻吩衍生物 **17** 为唯一的亚纳摩尔抑制剂。5-甲基噻吩衍生物 **18** 显示效果下降。5-溴噻吩换成 5-溴咪唑导致抑制作用降低至 1/65 (化合物 **19**)。密切相关的 4-氯苯衍生物 **20** 比化合物 **5** 弱,作用约为 1/30,移动氯取代至芳环的 3-或 2-位造成效力进一步严重下

降(化合物 **21,22**)。另外对噻吩环更多极性变化是不利的,如衍生物 **23** 有一个额外的 4-氨基,抑制作用只有化合物 **5** 的 1/12,化合物 **24,25,26** 的抑制作用都大大减弱。

因此 5-氯噻吩基团被确定为最佳片段,同时酰胺连接也被证明是最优的。取代酰胺是不利的,甲基化后效力只有原来的 1/280 (化合物 **27**)。相应的磺胺类药物 **28** 效果更低。

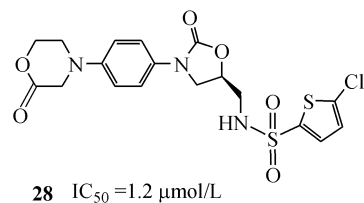


R	$IC_{50}/(\text{nmol/L})$
<b>17</b>	0.4
<b>18</b>	4.2
<b>19</b>	26
<b>20</b>	20

R	$IC_{50}/(\text{nmol/L})$
<b>21</b>	1 170
<b>22</b>	2 000
<b>23</b>	8.5

R	$IC_{50}/(\text{nmol/L})$
<b>24</b>	290
<b>25</b>	29
<b>26</b>	94

**27**  $IC_{50} = 197 \text{ nmol/L}$



**28**  $IC_{50} = 1.2 \mu\text{mol/L}$

总的来说,吗啉酮和 5-氯噻吩 2-内酰胺基的结合是恶唑烷酮类 **Xa** 因子抑制剂具有体外亚纳摩尔效力的关键。

各项实验数据表明,吗啉酮衍生物 **5** 具有较好的体外、体内抗凝血活性<sup>[12]</sup>,同时具有最佳的整体药动学特征:如较低的血浆清除率,合适的半衰期以及较高口服生物利

用度。

化合物 **5** 在浓度高达  $20 \mu\text{mol/L}$  也不影响相关丝氨酸蛋白酶类(如凝血酶、胰蛋白酶、纤溶酶、**VIa** 因子、**IXa** 因子、**XIa** 因子、尿激酶和活化蛋白 C),对 **Xa** 因子比其他丝氨酸蛋白酶类显示了高出 1 万倍以上的选择性。因此,综合其在体

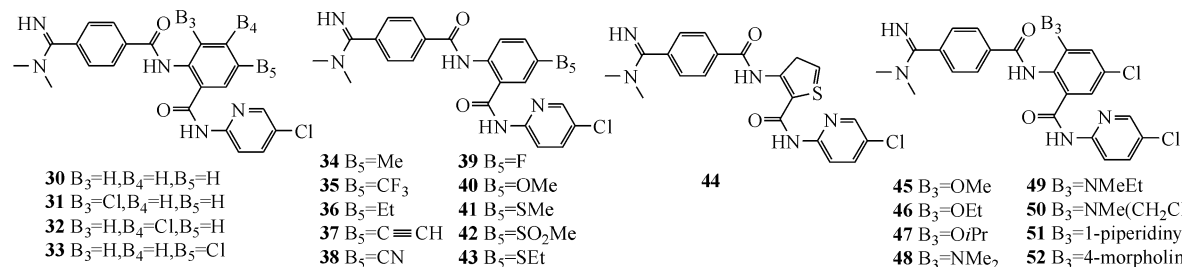
内外优良的疗效及良好的药动学特征,化合物**5**(利伐沙班)被确定为重要的候选药,并选定进行临床研究。

**2.1.2 利伐沙班和 Xa 因子的 X 衍射晶体学** 利伐沙班和人体 Xa 因子结合的 X-衍射晶体结构,分辨率  $2.08 \text{ \AA}$ ,明确了结合的模式和观察到的噻唑烷酮类高亲和力的严格要求。

利伐沙班和人体 Xa 因子与 Gly219 形成两个氢键:噻唑烷酮核心羰基氧与 Gly219 形成强烈的氢键( $2.0 \text{ \AA}$ ),而氯噻吩甲酰胺的 NH 基团与之形成较弱的氢键( $3.3 \text{ \AA}$ )(图1)。由这两个氢键支持,(S)-噻唑烷酮的核心给出了与 Xa 因子结合所需的 L 形。它作为一个中央模板指示其取代基进入 S1 和 S4 次位点,形成直接 Xa 因子抑制剂的典型结合模式。正如 X 射线结构显示,噻唑烷酮核心和芳环共面。2-芳位取代往往迫使两环成为一个不利的扭曲排布,亲和力降低。实验表明 2-甲基取代衍生物**15**的效力只有其未取代类似物**7**的 1/30。

S4 口袋是一个狭窄的疏水槽,由芳香环 Tyr99、Phe174 和 Trp215 组成。利伐沙班的非极性芳环跨越 Trp215 表面,而吗啉酮基元插入 Tyr99 和 Phe174 之间。吗啉酮羰基似乎没有直接与 Xa 因子作用,而是影响吗啉酮环的平面化,并使之与芳环垂直。这种作用反映在含吗啉酮利伐沙班的效力是其吗啉衍生物**7**的 60 倍。

利伐沙班和 Xa 因子在 S1 口袋关键的相互作用涉及氯噻吩基元:其氯取代基在 S1 口袋底部与 Tyr228 所在芳环相互作用。在其他 Xa 因子抑制剂及凝血酶和胰岛素抑制剂中也报道了类似结合模式。在 S1 口袋中由于氯原子与 Tyr228 的相互作用,高碱基团如脒基或其他带正电荷的基团对于高亲和力就不必要了。因此 Cl-Tyr228 作用使无碱基的利伐沙班结合高效且有良好的口服生物利用度。

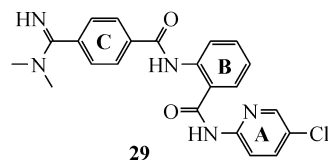


将化合物**33**与 Xa 因子的活性部位对接,显示 B 环的 3,4 位处于开放区,因此 B 环 3,4 位的取代对化合物的效应影响较小;而 B 环 5 位有小的疏水性基团可以提高抑制剂与 Xa 因子的结合亲和力。基于这种假设,设计了化合物**34~43**,每个化合物的 B<sub>5</sub> 位为憎水基团。这些化合物表现出了强大的抗 Xa 因子的活性,IC<sub>50</sub> 位于  $0.5 \sim 1.5 \text{ nmol/L}$  区间。通过对化合物**44**进行分析,发现是苯环的 B 环被噻吩取代后仍然保持着良好的抗 Xa 因子活性。对接研究表明 C 环的取代可以承受,尤其是羰基旁边 C<sub>2</sub> 的取代。

## 2.2 Betrixaban

Betrixaban(化合物**40**),一种邻氨基苯甲酰胺类结构化合物,口服直接 Xa 因子抑制剂,最早由 Millennium (Take-da)开发,后转让给美国 Portola 制药公司。主要用于预防和治疗深部静脉血栓形成和矫形外科手术后的肺部栓塞,同时还能用于预防房颤导致的脑卒中,此外还可作为心肌梗死和脑卒中的二线预防用药。目前处于 II 期临床阶段。

**2.2.1 Betrixaban 的发现过程及构效关系** 邻氨基苯甲酰胺类结构化合物 *N*-(5-氯-2-吡啶基)-2-[4-(*N,N*-二甲脒基)-苯甲酰胺基]苯甲酰胺(**29**)作为一个潜在的 Xa 因子抑制剂(IC<sub>50</sub> =  $3 \text{ nmol/L}$ ; K<sub>i</sub> =  $1.4 \text{ nmol/L}$ )<sup>[13-17]</sup>,通过检测凝血酶生成,发现该化合物有很强的抗凝血活性及很好的口服利用度。该化合物中的 4-(*N,N*-二甲脒基)-苯甲酰胺基序与 Xa 因子的 S4 口袋结合,该信息表明最有效的 Xa 因子抑制活性来自 *N*-端取代苯甲酰胺。通过进一步系统地对该化合物中的芳环 A, B, C 的结构研究,可获得该类 Xa 因子抑制剂的构效关系。



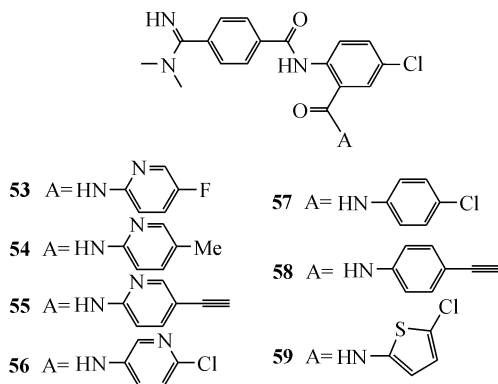
B 环改造: B 环中 3,4,5 位被氯取代,得化合物**31~33**,结果显示 5 位氯代物**33**的 IC<sub>50</sub> 很低( $0.5 \text{ nmol/L}$ ),同时也远低于未取代的化合物**30**,5 位氯代物成为很有潜力的抑制剂。当 5 位被甲基或者三氟甲基取代分别得到化合物**34**和**35**,IC<sub>50</sub> 分别为  $0.7$  和  $1.3 \text{ nmol/L}$ 。这表明 B 环的取代受电性效应的影响比较小。

值得注意的是,化合物**37**和**41**的 IC<sub>50</sub> 均较低,然而它们的药动学指标不及化合物**33**,它们的血浆清除率太快。因此实验选择了 B<sub>5</sub> 位取代为氯时(化合物**33**)最佳,其表现出很好的药动学性质及良好的 Xa 因子结合活性。

B<sub>5</sub> 位氯取代确定为最佳取代,为了获得具有更好的药动学活性的药物,分别设计了 B<sub>3</sub> 位有不同取代基的化合物**45~52**,结果显示在小鼠实验中的药动学参数并没有提高。例如:化合物**45**和**50**的生物利用度分别为  $11.2\%$  和  $8.1\%$ ,与化合物**33**的  $26.1\%$  有很大的差别。因此, B 环取

代中,仅含5位取代且5位为氯时为最佳。

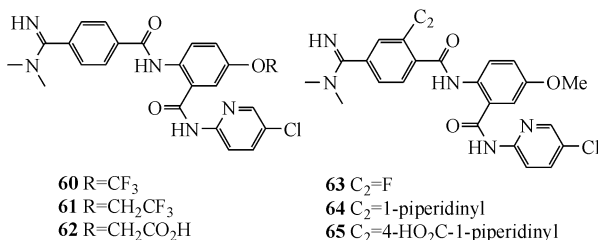
A环改造:固定B<sub>5</sub>位为氯,研究A环与S1位点结合而设计了化合物**53**~**59**,当吡啶环上的氯分别被氟和甲基取代时(**53**,**54**),会稍微降低化合物的与Xa因子的作用活性。可能是因为与228位酪氨酸的相互作用减弱。当氯被乙炔基取代时,化合物**55**保留优良的抗Xa因子的活性。尽管其在小鼠和人体外肝脏代谢实验中显示较好的稳定性,然而在药动学研究过程中,其显示出很高的清除率及很短的半衰期( $CL > 100 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ;  $t_{1/2} = 6.3 \text{ h}$ )。将A环中的N原子向其邻位移动,得到化合物**56**,其IC<sub>50</sub>为3 nmol/L,与化合物**33**相比降低了与Xa因子的作用能力。A环部分分别为4-氯苯胺和4-乙炔基苯胺得到化合物**57**和**58**。考虑到苯胺的潜在毒性,而2-氨基-5-氯吡啶是比苯胺更好的S1位点结合基团。将氯吡啶换成氯嘧啶(**59**),结果显著降低了与Xa因子的作用能力。



C环改造:以化合物**33**为起点,改造C环,设计了一系列化合物。与化合物**33**相比,C环为吡啶环和嘧啶环均会轻微降低该类化合物与Xa因子的作用能力。C<sub>2</sub>被氟取代显示了很强的与Xa因子的亲和效能以及良好的药动学性质,其余的C<sub>2</sub>取代化合物的药动学性质不是很理想。另外,通过比较体外抗Xa因子活性,发现N,N-二甲基苄胺为最好的对位取代片段。

在所述化合物中,化合物**40**(hERG K<sub>i</sub> = 1.8 μmol/L)的hERG活性明显低于其他化合物(hERG K<sub>i</sub> ≤ 0.5 μmol/L)。以化合物**40**(Xa因子 K<sub>i</sub> = 117 pmol/L)为基础,为了平衡Xa因子活性和hERG亲和力,设计了化合物**60**~**65**。C<sub>2</sub>-氟取代类似物**63**(IC<sub>50</sub> = 0.7 nmol/L; Xa因子 K<sub>i</sub> = 105 pmol/L)与化合物**40**展现出类似的弱hERG活性(hERG K<sub>i</sub> = 2.1 μmol/L),化合物**62**和**65**的hERG活性虽然大大降低,但大鼠的口服生物利用度太低(<5%)。

经过系统的构效关系探究,化合物**40**和**63**被选定做进一步评价,它们都具有较好的体外抗凝活性。根据全部的生物学、毒理学和PK-PD资料,hERG不利因素和生产成本,最后,化合物**40**(betrixaban)被选为这类基于2-氨基苯甲酰胺的Xa因子抑制剂的临床候选药。



2.2.2 GLOD对接<sup>[18]</sup> 将化合物**33**与Xa因子的活性部位对接(如图2):氯吡啶环伸入到S1位点,其氯原子位于Xa因子228位酪氨酸苯环之上,占据了由190甘氨酸和213位缬氨酸,228位缬氨酸构成的疏水性口袋。N,N-二甲胺基片段受到S4芳基结合口袋中99位酪氨酸和174位的苯丙氨酸的苯环基团从侧面进攻。其N=C键位于平行于苯环平面,及一个甲基插入位于174位的苯丙氨酸及215位色氨酸苯环间的疏水性裂口。一个π阳离子可能在质子化的氨基酸基团及苯环之间产生作用。此外,图2显示:B环的3,4位位于开放区,远离活性结合口袋,因此B环3,4位的取代对化合物的效价影响较小。B环5位氯指向一个小的疏水性口袋,位于191及220位的半胱氨酸的二硫桥旁边。因此B<sub>5</sub>处小的疏水性基团可以提高抑制剂与Xa因子的结合亲和力。另外,对接研究表明C环的取代可以承受,尤其是羰基旁边C<sub>2</sub>的取代。

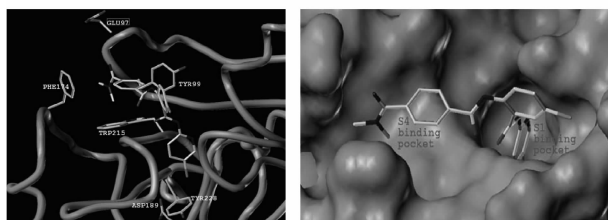


Figure 2 Computer modeling of compound **33** docked in factor Xa active enzyme pocket<sup>[19]</sup>

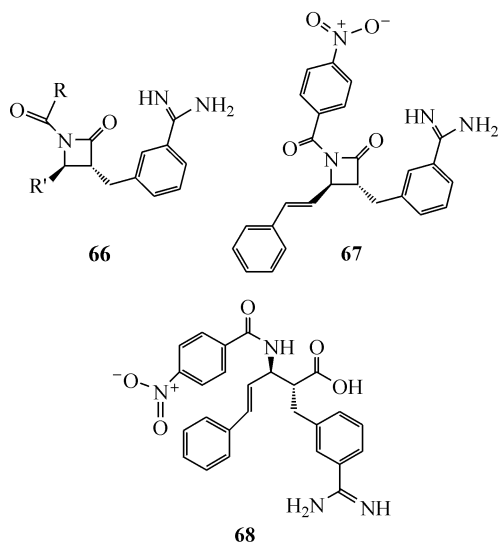
## 2.3 奥米沙班

另一种高选择性并且可逆的凝血酶因子Xa抑制剂奥米沙班(otamixaban,化合物**77**),由赛诺菲-安万特公司研发,目前处于Ⅲ期临床阶段。和其他药物比较,奥米沙班静脉给药耐受良好,不受性别年龄限制。静脉给药后药物充分暴露于血浆中,因而带有靶向作用,清除迅速,与其他药物的相互作用较少,可协同用药。

### 2.3.1 β-氨基酸酯类化合物**69a**的发现

1994年Rhône-Poulenc Rorer公司就开始了拮抗Xa因子的化合物进行搜寻。起初经很多探索,依然无法筛选出可行的先导化合物结构。基于丝氨酸蛋白酶弹性酶的β-内酰胺类抑制剂的成功发现,公司转向对β-内酰胺类Xa因子抑制剂的研究。他们认为:β-内酰胺结构,例如化合物**66**(β-内酰胺类化合物)可能通过自杀性抑制而起作用,该结构同时为新型的Xa因子抑制剂的开发提供了有用的模

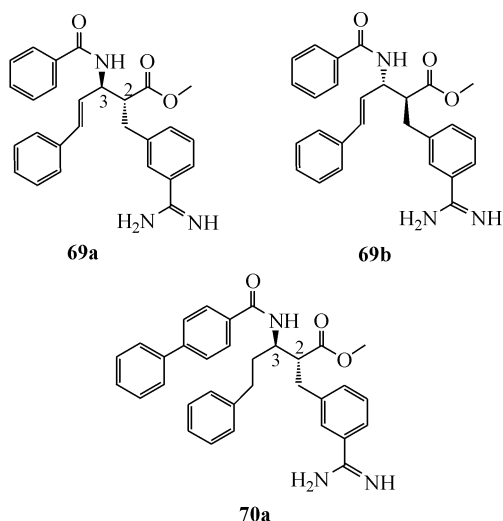
入点。起初设计的 $\beta$ -内酰胺类化合物**67**,邻位含有苯甲脒基,该基团可以很好地与S1口袋的酸性残基(189位天冬氨酸)结合,另外,*N*-对硝基苯甲酰基是一个缺电子的 $\pi$ 电子体系,可以很好地与S4口袋的 $\pi$ -正离子穴结合。



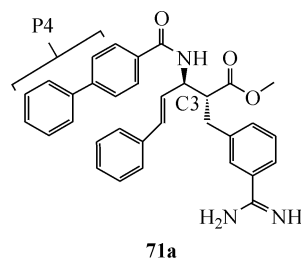
在化合物**67**的合成过程当中,由于形成的 $\beta$ -内酰胺环的稳定性欠佳,得到了开环产物**68**—— $\beta$ -氨基酸。意外的是这个化合物的对Xa因子的抑制常数为 $2.4 \mu\text{mol/L}$ 。为了追踪这个重大的发现,开始研究化合物**68**的酯类似物**69**(缺少了硝基基团)。化合物**69**对Xa因子的 $K_i$ 为 $0.34 \mu\text{mol/L}$ ,通过手性柱拆分,可以得到化合物**69a**和**69b**。进行药理学活性分析,结构发现化合物**69b**没有Xa因子的抑制活性,化合物**69a**的活性相比化合物**69**提高了将近1倍, $K_i$ 为 $0.16 \mu\text{mol/L}$ 。藉此,发现了对映选择性抑制,并且以化合物**69a**为先导结构进行进一步的优化和设计研究。

研究人员发现,有活性的化合物**69a**的 $C_2, C_3$ 的绝对立体构型为 $2R, 3R$ 。随着构效关系研究的发展,研究人员将化合物**69a**的3位的酰胺边链用联苯取代,同时3位的苯乙烯基被还原时,得到 $\beta$ -氨基酸酯衍生物**70a**,这个化合物也具有良好的Xa因子抑制作用。

**2.3.2  $\beta$ -内酰胺酯类化合物的构效关系**  $C_2, C_3$ 的绝对立体构型必须是(*R,R*)构型;最好是形成甲酯,这是因为甲酯能很好地插入由191及220位半胱氨酸形成的二硫键及由219位甘氨酸,192位谷氨酰胺147位精氨酸所形成的裂口中。Xa因子活性位点很大程度上受位于S1和S4结合口袋的高碱性或/和带正电荷的官能团的调节。S1识别口袋含有一个酸性残基(189位为天冬氨酸)然而S4口袋含有一个独特的开放的盒状芳基结合区域,这个区域有174位苯丙氨酸和99位酪氨酸及215位色氨酸确定,该位点是潜在的 $\pi$ 正离子相互作用的位点。



把化合物**71a**的苯甲脒基团放入S1结合位点进行建模研究,结果发现该基团能够很好地与S1位点结合。同样地,将联苯基体系与S4口袋结合,结果发现也有很好的结合。既然苯甲脒基团和联苯基团能够分别与S1, S4结合,那么 $C_3$ 位的苯乙烯基到底起什么作用?为了进一步研究这个模型, $C_3$ 支链的构效关系表明:小的烷基基团(如甲基),及大的疏水性基团传递了很好的效能<sup>[20]</sup>。



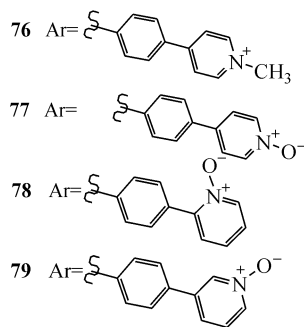
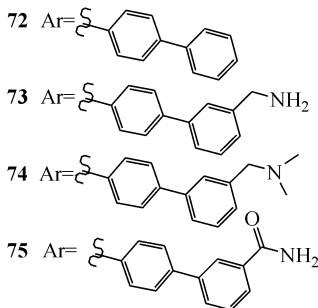
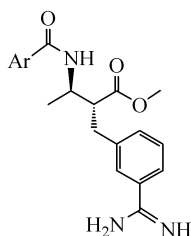
各式各样的P4配体进一步提高了这类化合物对Xa因子效能及选择性<sup>[21]</sup>。通过往联苯或者联芳基团上掺入带电荷的、缺电子的或者碱性基团来对S4亚位点阳离子穴区域进行探究,研究人员成功发现了化合物**73**和**74**,这两个化合物显示了比母体化合物**72**更加具有成为Xa因子抑制剂效能。然而化合物**75**的对接结果显示:除了 $\pi$ 正离子相互作用之外,S4口袋中Xa因子与氨甲酰之间的氢键作用也会提高化合物的效能。

改变P4片段远端环显示了很好的耐受性,对远端环进行结构优化可以产生一系列临床候选化合物。阳离子穴在一些相关的丝氨酸蛋白酶如:胰岛素、凝血酶、活性蛋白C纤溶酶中并没有发现。这使得Xa因子抑制剂能够提高对Xa因子的抑制效能及对Xa因子的选择性而对其他相关的丝氨酸蛋白酶的影响较小。

结构相关的抑制剂中,掺入缺电子的苯基-*N*甲基-吡啶(**76**)及同分异构的苯基吡啶*N*氧化物(**77, 78, 79**)与母体化合物相比显示很大程度提高化合物的活性。化合物**77**

(奥米沙班, otamixaban) 在体外显示了良好的生物活性, 因此该化合物被进一步用于与体内各种血栓模型的相互作用

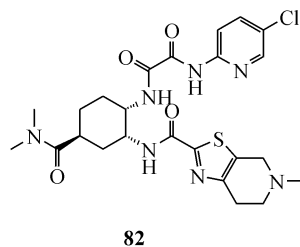
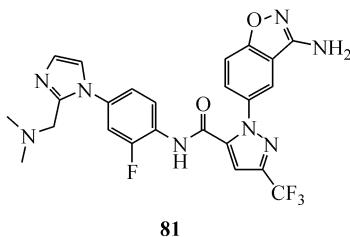
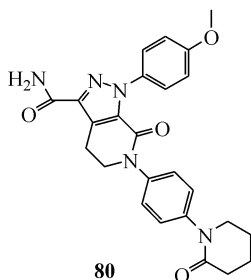
的研究, 最终通过生物活性、药理学、药动学性质的研究确定为候选药物。



## 2.4 其他

阿哌沙班(apixaban, **80**)由百时美-施贵宝公司研发, 属于氨基苯并噻唑类化合物, 是一种高选择性、可逆的 Xa 因子抑制剂, 因此该药物在晚期血栓的治疗上仍然有较好疗效。安全性上同肝素和华法林比较, 阿哌沙班总出血率明显较低。本品口服有效, 目前处于 III 期临床阶段。

阿哌沙班是以雷扎沙班(**81**)为基础设计而来的一种口服的直接 Xa 因子抑制剂, 雷扎沙班由于疗效欠佳而中断研究, 努力找到一个合适的后续化合物主要集中在对酰胺链的修饰<sup>[22]</sup>。环化酰胺链构成二环四氢吡唑吡啶支架, 修饰 P1 部分, 优化末端 P4 环有额外的 Xa 因子结合活性<sup>[23]</sup>。



## 3 结论和展望

通过对 Xa 因子抑制剂构效关系研究和晶体结构分析, 特异性结合口袋 S1 和芳香性口袋 S4 被认为是起抑制作用的关键位点。仅通过对这两个位点相互作用的优化就能够实现纳摩尔级的结合亲和力。抑制剂和 Xa 因子其他部位的作用若促进其与 S1 和 S4 的结合, 可进一步降低 IC<sub>50</sub>。近年来, X-衍射晶体学获得的 Xa 因子与所结合的抑制剂相互作用的有关信息不断增加, Xa 因子抑制剂发现途径也越来越多。Xa 因子抑制剂用于抗凝治疗的安全性与其选择性密切相关。从不同的 Xa 因子复合物晶体结构中得到的酶-抑制剂之间重要的相互作用, 能为新型 Xa 因子抑制剂的设计提供有利依据。相信通过对 Xa 因子和相关活性化合物构效关系的进一步深入研究, 人类终将开发出更加安

全有效的抗凝药物。这 3 种修饰导致 1-(4-甲氧基苯基)-7-氧-6-(4-(2-氧哌啶-1-基)苯基)-4,5,6,7-四氢-1-氢-吡唑[3,4-c]吡啶-3-甲酰胺的出现, 也就是众所周知的阿哌沙班。阿哌沙班呈现出高度的 Xa 因子活性, 同时相对有一个改进的药动学特征且无出血的危险<sup>[24]</sup>。阿哌沙班相对于 Xa 因子的选择性高于其他凝血酶 3 万倍<sup>[25]</sup>。

依杜沙班(edoxaban, **82**)是一种口服的直接 Xa 因子抑制剂, 由日本第一制药三共株式会社开发, 用于脑卒中及急性肺动脉栓塞。同口服维生素 K 拮抗剂华法林比较, II 期临床中表现出极好的耐受性和安全性。

全有效的抗凝药物。

## 参考文献

- [1] Beaglehole R, Bonita R. Global public health; a scorecard[J]. *Lancet*, 2008, **372**(9 654): 1 988 - 1 996.
- [2] Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030 [J]. *PLoS Med*, 2006, **3**(11): e442.
- [3] Saiah E, Soares C. Small molecule coagulation cascade inhibitors in the clinic[J]. *Curr Top Med Chem*, 2005, **5**(16): 1 677 - 1 695.
- [4] Abbenante G, Fairlie DP. Protease inhibitors in the clinic[J]. *Med Chem*, 2005, **1**(1): 71 - 104.
- [5] Borensztajn K, Peppelenbosch MP, Spek CA. Factor Xa; at the

- crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease[J]. *Trends Mol Med*, 2008, **14**(10):429–440.
- [6] Brandstetter H, Kuhne A, Bode W, *et al.* X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(47):29 988–29 992.
- [7] Daure EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation [J]. *Biochemistry*, 1991, **30**(43):10 363–10 370.
- [8] Ansell J. Factor Xa or thrombin; is factor Xa a better target [J]? *J Thromb Haemost*, 2007, **5**(Suppl 1):60–64.
- [9] Roehrig S, Straub A, Pohlmann J, *et al.* Discovery of the novel antithrombotic agent 5-chloro-*N*-(4-(5*S*)-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.
- [10] Lam PY, Clark CG, Li R, *et al.* Structure-based design of novel guanidine/benzamidine mimics: potent and orally bioavailable factor Xa inhibitors as novel anticoagulants [J]. *J Med Chem*, 2003, **46**(21):4 405–4 418.
- [11] Hilgers AR, Smith DP, Biermacher JJ, *et al.* Predicting oral absorption of drugs: a case study with a novel class of antimicrobial agents [J]. *Pharm Res*, 2003, **20**(8):1 149–1 155.
- [12] Perzborn E, Strassburger J, Wilmen A, *et al.* *In vitro* and *in vivo* studies of the novel antithrombotic agent BAY 59-7939—an oral, direct factor Xa inhibitor [J]. *J Thromb Haemost*, 2005, **3**(3):514–521.
- [13] Zhang P, Bao L, Fan J, *et al.* Anthranilamide-based *N,N*-dialkylbenzamidines as potent and orally bioavailable factor Xa inhibitors: P4 SAR [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, **19**(8):2 186–2 189.
- [14] Kochanny MJ, Alder M, Ewing J, *et al.* Substituted thiophene-anthranilamides as potent inhibitors of human factor Xa [J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, **15**(5):2 127–2 146.
- [15] Ye B, Arniaz DO, Chuo YL, *et al.* Thiophene-anthranilamides as highly potent and orally available factor Xa inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2007, **50**(13):2 967–2 980.
- [16] Mendel D, Marquart AL, Joseph S, *et al.* Anthranilamide inhibitors of factor Xa [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17**(17):4 832–4 836.
- [17] Corte JR, Fang T, Pinto DJ, *et al.* Structure-activity relationships of anthranilamide-based factor Xa inhibitors containing piperidine and pyridinone P4 moieties [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**(9):2 845–2 849.
- [18] Jones G, Willett P, Glen RC, *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking [J]. *J Mol Biol*, 1997, **267**(3):727–748.
- [19] Zhang P, Huang W, Wang L, *et al.* Discovery of betrixaban (PRT054021), *N*-(5-chloropyridin-2-yl)-2-(4-(*N,N*-dimethyl-carbamimidoyl) benzamido)-5-methoxybenzamide, a highly potent, selective, and orally efficacious factor Xa inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, **19**(8):2 179–2 185.
- [20] Czekaj M, Klein SI, Guertin KR, *et al.* Optimization of the beta-aminoester class of factor Xa inhibitors. Part I: P(4) and side-chain modifications for improved *in vitro* potency [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, **12**(12):1 667–1 670.
- [21] Guertin KR, Choi YM. The discovery of the factor Xa inhibitor otamixaban: from lead identification to clinical development [J]. *Curr Med Chem*, 2007, **14**(23):2 471–2 481.
- [22] Wong PC, Crain EJ, Watson CA, *et al.* Razaxaban, a direct factor Xa inhibitor, in combination with aspirin and/or clopidogrel improves low-dose antithrombotic activity without enhancing bleeding liability in rabbits [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2007, **24**(1):43–51.
- [23] 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-1*H*-pyrazolo[3,4-*c*] pyridine-3-carboxamide (apixaban, BMS-562247), 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.
- [24] Jiang X, Crain EJ, Luetgten JM, *et al.* Apixaban, an oral direct factor Xa inhibitor, inhibits human clot-bound factor Xa activity *in vitro* [J]. *Thromb Haemost*, 2009, **101**(4):780–782.
- [25] Wong PC, Crain EJ, Xin B, *et al.* Apixaban, an oral, direct and highly selective factor Xa inhibitor; *in vitro*, antithrombotic and antithrombotic studies [J]. *J Thromb Haemost*, 2008, **6**(5):820–829.