

凝血酶受体拮抗剂的研究进展

郭亚华, 方浩*

山东大学 药学院, 山东 济南 250000

摘要: 血栓栓塞性疾病严重威胁人类健康, 应用抗血小板药物是当前主要的治疗手段之一。研究证明, 凝血酶受体(又称蛋白酶激活受体-1, PAR-1)被凝血酶激活后, 可诱导血小板活化。此外, PAR-1 主要参与病理性血栓的形成, 对人体正常的止血过程影响很小。因此, PAR-1 已成为抗血小板药物研发的新兴靶点。目前, 已有多个 PAR-1 拮抗剂如 vorapaxar、F16618、F16357、ML161、RWJ-58259、PZ-128 已上市或进入临床研究。综述了 PAR-1 的结构和作用机制以及小分子拮抗剂和多肽类拮抗剂的研究进展。

关键词: 凝血酶受体拮抗剂; 血栓栓塞性疾病; vorapaxar

中图分类号: R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2016)12 - 2067 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2016.12.045

Research progress on thrombin receptor antagonists

GUO Ya-hua, FANG Hao

School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250000, China

Abstract: Thromboembolic disease threatened human health seriously, and the antiplatelet therapy is one of the most important strategies. Protease-activated receptor (PAR)-1, which is activated by thrombin, represents a novel promising approach in the treatment of atherothrombotic disease. Moreover, PAR-1 inhibition has been proved exerts little effect on physiological hemostasis, but on pathological thrombus formation. So far, several PAR-1 antagonists such as vorapaxar, F16618, F16357, ML161, RWJ-58259, and PZ-128 have been reported. This paper reviews the progress in the study of structure and mechanism of PAR-1 as well as the development of Small molecular and peptides PAR-1 antagonists.

Key words: PAR-1 antagonists; thromboembolic disease; vorapaxar

近年来, 血栓栓塞性疾病的发病率呈不断上升趋势, 且表现出致死率高和致残率高的特点。抗血小板药物通过抑制血小板聚集, 防止血栓形成, 在该类疾病的预防和治疗中发挥重要作用。根据作用靶点的不同, 常用抗血小板药物主要包括环氧合酶(COX-1)抑制剂(如阿司匹林)、P2Y₁₂抑制剂(如氯吡格雷)以及血小板 GP II_b/III_a受体拮抗剂(如阿昔单抗)等。然而, 大量临床研究表明上述药物的有效性和安全性存在不足。因此开发结构新颖、安全性和有效性更佳的抗血小板药物已成为该领域研发的重要目标。

1991年, Coughlin等^[1]首先克隆了人体血小板凝血酶受体(thrombin receptor), 并揭示了该受体被凝血酶激活的独特机制, 这为抗血栓药物的研发提供了新的靶标。由于凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶, 凝血酶受体也因此被称为蛋白酶激活受体-1(protease-activated receptor-1, PAR-1), 后续研究又相继发现 PAR-2、PAR-3、PAR-4等亚型。研究表明, 凝血酶通过 PAR-1、PAR-4介导人体的血小板活化, 其中 PAR-1起主要作用^[2-3]。因此, 凝血酶受体拮抗剂的开发主要以 PAR-1为作用靶点。目前已有多个拮抗剂被报道, 其中口服小分子药物 vorapaxar

收稿日期: 2016-09-29

作者简介: 郭亚华(1991—), 男, 硕士研究生。Tel: (0531)88382019 E-mail: 18954545969@163.com

*通信作者 方浩(1974—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事基于靶点结构的药物合理设计、合成及生物活性研究。

sulfate 已上市, 多肽类药物 PZ-128 正在进行 II 期临床试验。

PAR-1 由染色体 F2R 基因编码, 其一级结构由 425 个氨基酸残基构成。该受体 C-端位于细胞内, N-端位于细胞外, 其二级结构还包括 7 个跨膜螺旋结构域 (TM1-7)、3 个细胞内 loop 区 (intracellular loop, ICL1-3) 和 3 个细胞外 loop 区 (extracellular loop, ECL1-3)。PAR-1 的活化是一种特殊的、不可逆的“自身激活”过程^[1]。具体而言, 凝血酶首先

特异性识别 PAR-1 的水蛭素样序列 (K⁵¹YEPF⁵⁵), 该序列对两者的结合中发挥至关重要的作用^[4]。然后, 位于 PAR-1 上的 N 端序列 41Arg-42Ser(R⁴¹-S⁴²) 被凝血酶水解, 肽键断裂并暴露出一个起始序列为 S⁴²FLLRN⁴⁷ 的新 N 端。最后, 该末端作为一个“栓配体” (tethered ligand) 与自身胞外 loop 区 ECL2 发生分子内反应, 促使 PAR-1 构象发生改变, 进而引发细胞内的信号级联放大反应, 最终导致血小板的聚集, 见图 1。

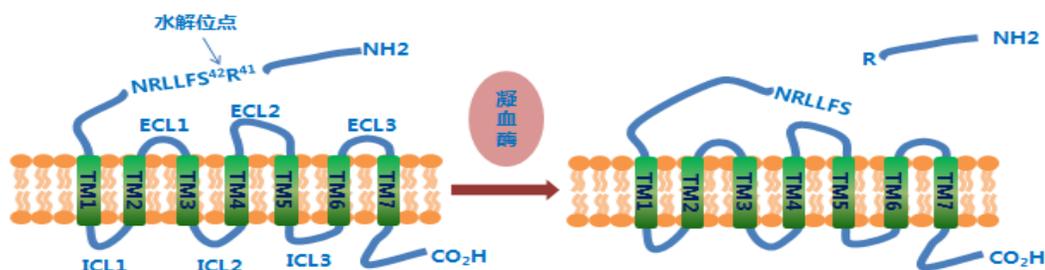


图 1 PAR-1 的活化机制

Fig. 1 Mechanism of PAR-1

按结构特点, PAR-1 拮抗剂可分为小分子拮抗剂和多肽类拮抗剂两大类。

1 小分子 PAR-1 拮抗剂

目前已报道的 PAR-1 小分子拮抗剂包括 vorapaxar、atopaxar、F16618、F16357、ML161 等。vorapaxar 在 2014 年 5 月被 FDA 批准上市, 主要用于有心脏病发作史患者以及动脉栓塞患者, 以降低心脏病进一步发作、中风等死亡危险; atopaxar 的临床研究主要针对患有急性冠状动脉综合症 (acute coronary syndrome, ACS) 或高危冠状动脉疾病 (coronary artery disease, CAD) 的患者, 但遗憾的是其 II 期临床试验已宣告终止; F16618、F16357、ML161 仍处在临床前研究阶段。

1.1 vorapaxar

vorapaxar 商品名为 Zonitivity, 是先灵葆雅公司基于天然产物 himbacine 结构改造后首创的口服、选择性、竞争性 PAR-1 拮抗剂。临床前研究表明: vorapaxar 在体外可有效抑制由 10 nmol/L 凝血酶和 15 μmol/L 高亲和力凝血酶受体活化肽 (high affinity thrombin receptor activated peptide, haTRAP) 诱导的血小板聚集反应 (IC₅₀ 分别为 47、25 nmol/L)。但该药对其他血小板活化剂如 ADP、胶原蛋白、PAR-4 活化肽和血栓素模拟物 U46619 诱导的血小板聚集反应无明显影响^[5]。

I 期和 II 期的临床试验结果表明, vorapaxar 可有效降低心肌梗死的发生率, 且未导致中重度出血等不良反应^[6-8]。随后开展的 III 期临床试验分别评价了 vorapaxar 联用阿司匹林和氯吡格雷对 ACS 患者的有效性和安全性 (TRA·CER 试验) 和 vorapaxar 作为动脉粥样硬化疾病二级预防辅助药物的有效性和安全性 (TRA 2P-TIMI 50 试验)。然而, 两项临床试验均发现 vorapaxar 组出现了更多的出血事件, 颅内出血风险也有所上升。尽管如此, vorapaxar 还是表现出一定疗效: 在 TRA·CER 试验中, 治疗组的心肌梗死发生率明显下降 (11.1% vs 12.5%, $P < 0.05$); 而在 TRA 2P-TIMI 50 试验中, 包括心血管原因死亡、心肌梗死和中风在内的主要临床终点发生率也明显降低 (9.3% vs 10.5%, $P < 0.001$), 次要终点发生率也有所下降^[9-10]。基于上述试验结果, vorapaxar 于 2014 年被 FDA 批准上市, 成为首个作用于 PAR-1 靶点的口服抗血栓药物。

最近 Chelliah 等^[11-12]报道了一系列 vorapaxar 衍生物 1~3, 与 vorapaxar 比较, 这些化合物对 PAR-1 的体外拮抗活性相当或稍强, 药动学性质有所改善。Knight 等^[13]对 C-9 位置进行了羰基化, 得到化合物 4, 该化合物表现出接近于 Vorapaxar 的体外 PAR-1 拮抗活性。见图 2。

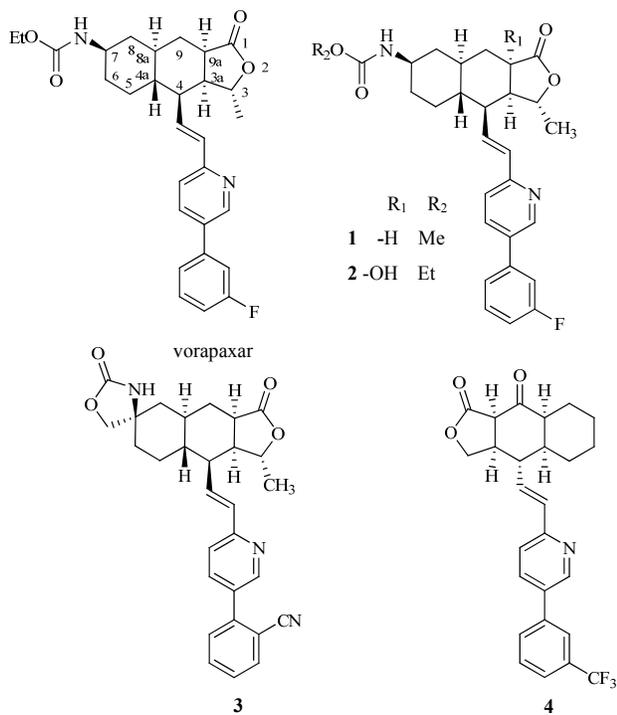


图2 vorapaxar 及其衍生物
Fig. 2 Structures of vorapaxar and derivatives

1.2 atropaxar

atropaxar 又名 E5555, 是由日本卫材株式会社开发的可逆性口服 PAR-1 拮抗剂, 结构见图 3。该化合物经 CYP3A4 代谢, 通过胃肠道消除^[14]。临床前研究表明 atropaxar 可强效抑制凝血酶和凝血酶受体激活肽 (TRAP) 诱导的血小板聚集反应 (IC_{50} 分别为 0.064、0.031 $\mu\text{mol/L}$)^[15]。I 期临床试验证实 atropaxar 在各个治疗组的有效性, 且并未发生明显的出血不良反应。后续开展的 4 项 II 期临床试验评价了 atropaxar 应用于 ACS 和 CAD 患者的安全性。结果表明, 治疗组和安慰剂组在总出血概率方面未呈现统计学差异。相对于安慰剂组, 治疗组总的主要心血管不良事件发生概率也未有增加。然而, 在各项试验的高剂量组, 均发现了肝功能异常和 QT 间期延长的现象, 且该药缺乏明确的量效关系^[16-18], 因此日本卫材株式会社已终止了 atropaxar 的开发。

1.3 F16618 和 F16357

F16618、F16357 是由法国 Pierre Fabre 研究中心基于肉桂哌嗪结构开发的 PAR-1 拮抗剂, 结构见图 4。体外活性测试表明 F16618、F16357 可有效抑制 TRAP 诱导的人血小板聚集反应。为进一步证明化合物的体内活性, 研究者构建了大鼠的体外动静脉分流模型, 以 TRAP 诱导的血小板聚集抑制率和

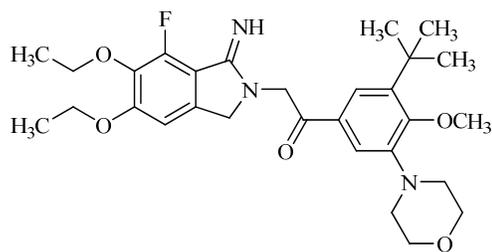


图3 atropaxar 的结构
Fig. 3 Structure of atropaxar

血管堵塞时间增加率为指标, 分别评价经静脉给药 (1.25 mg/kg) 和口服给药 (40 mg/kg) 后化合物的抗血小板聚集活性。结果表明, 相对于对照药 atropaxar ($pK_b=8.18$), F16618 ($pK_b=5.30$)、F16357 ($pK_b=5.52$) 均略低。但是, 两者更有效地延长了堵塞时间。总之, 在该模型中, F16618、F16357 均表现出一定的抗血栓活性^[19]。此外, F16618、F16357 对 PAR-1 具有一定的选择性, 且对出血时间没有明显影响。加之 F16618、F16357 的药动学性能良好, 合成简单, 使其具有一定的开发潜能。

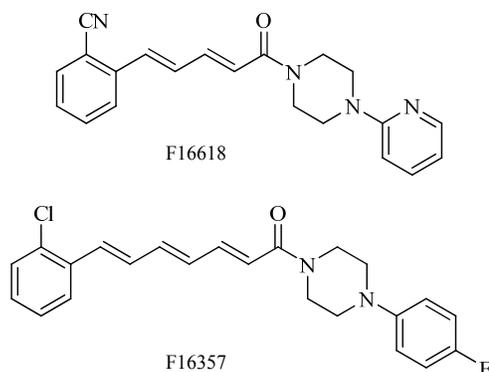


图4 F16618 和 F16357 结构
Fig. 4 Structures of F16618 and F16357

1.4 ML161

2012 年, Dockendorff 等^[20]通过高通量筛选发现了新型 PAR-1 拮抗剂 ML161。构效关系研究表明, 化合物结构中的 1,3-苯二胺骨架对活性发挥着关键的影响, 结构见图 5。体外 PAR-1 拮抗活性测试表明, ML161 能够显著抑制由 TARP 诱导的人血小板表面 P-selectin 蛋白的表达, 且对 PAR-1 具有一定的选择性。此外, ML161 可能以一种全新的“别构调节”机制拮抗 PAR-1, 即选择性调节下游的 G 蛋白信号通路。在 TARP 诱导的人血小板聚集反应测试中, 研究者发现 ML161 仅抑制了血小板的分泌

反应, 对血小板形状改变没有影响^[20]。这种独特的作用机制有可能减少临床上出血等不良反应的发生, 值得后续深入研究。

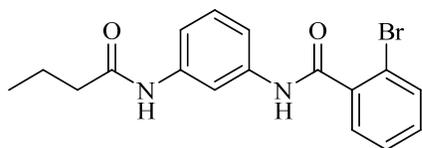


图 5 ML161 的结构

Fig. 5 Structure of ML161

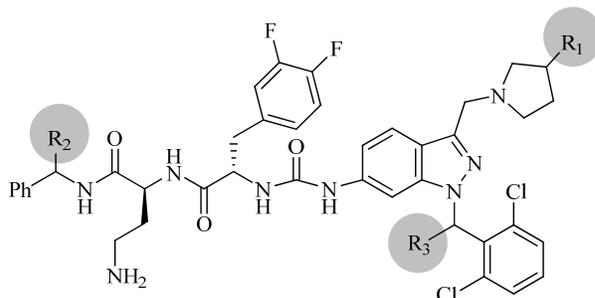
2 多肽类 PAR-1 拮抗剂

多肽类拮抗剂包括 RWJ-58259、PZ-128 等。

RWJ-58259 是早期研发的 PAR-1 选择性拮抗剂, 目前主要作为生物探针应用于 PAR-1 领域的研究; PZ-128 由塔芙茨医疗中心开发, 目前正处于临床 II 期试验阶段。

2.1 RWJ-58259

RWJ-58259 是由强生公司研发的一种选择性 PAR-1 拮抗剂, 结构见图 6。在人体血小板的体外活性测试中, 该药可强效抑制由凝血酶介导的血小板活化作用 ($IC_{50}=0.37 \mu\text{mol/L}$)。在非人类灵长类动物血栓形成模型中, RWJ-58259 也能产生有效的抑制效果。然而, 人肝微粒体代谢测试发现, RWJ-58259 的半衰期 ($t_{1/2}$) 仅为 9.2 min; 大鼠静脉给药后的 $t_{1/2}$ 也仅为 19.2 min^[21]。药理学性质的缺陷使得 RWJ-58259 的研究止步于临床前研究。目前, 该化合物主要作为生物探针应用于相关方面。



	R ₁	R ₂	R ₃
RWJ-58259	-H	-H	-H
5	-OH	-H	-H
6	-(R)F	-H	-H
7	-(S)F	-H	-H
8	-H	-(R)Me	-H
9	-H	-(S)Me	-H
10	-H	-H	-Me

图 6 RWJ-58259 及其衍生物的结构

Fig. 6 Structures of RWJ-58259 and derivatives

近期, Robinson 等^[22]合成了一系列 RWJ-58259 的类似物, 见图 6, 旨在保留化合物活性的同时改善其药理学性质。研究者首先通过计算机模拟, 预测出 RWJ-58259 的代谢活性位点; 随后在活性位点引入不同基团, 以“封闭”活性位点, 减少化合物的代谢分解。最终, 经细胞内 Ca^{2+} 水平测试, 研究者发现了与 RWJ-58259 活性相当或稍强的化合物 5~10, 同时这些化合物的代谢稳定性也得到改善。

2.2 PZ-128

PZ-128 是由塔芙茨医疗中心开发的一种高效、可逆转的新型 PAR-1 拮抗剂, 该药的结构来源于靶点蛋白 ICL3 和 TM6 之间的氨基酸序列, 见图 7。

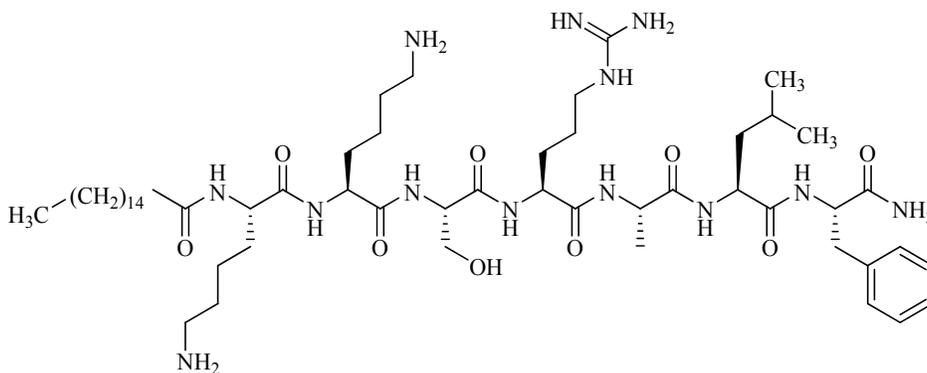


图 7 PZ-128 的结构

Fig. 7 Structure of PZ-128

该区域在 PAR-1 与 G 蛋白之间信号转导中发挥重要作用^[23]。实验证明, PZ-128 可迅速高效地定位于细胞膜表面, 并穿过磷脂双分子层进入细胞内部, 通过稳定或模拟非活性状态下的 PAR-1, 进而抑制

激活态 PAR-1 介导的血小板聚集。该机制不同于传统 PAR-1 拮抗剂的作用方式, 因此 PZ-128 有望成为治疗冠状动脉疾病的新型药物^[24]。临床前研究证明 PZ-128 经静脉注射可迅速起效, 抑制 PAR-1

介导的血小板聚集以及动脉血栓生成，且与氯吡格雷有着强烈的协同效应。

PZ-128 的 I 期临床试验旨在评价该药对 CAD 患者的有效性、安全性以及药动学性质^[25]。研究表明 PZ-128 对由 TRAP (8 μmol/L) 诱发的血小板聚集效应抑制效果明显，且呈现出剂量相关性。此外，该药能够专一性地抑制 PAR-1 诱导的血小板聚集反应，对 ADP、胶原蛋白诱导的血小板聚集反应无抑制作用。而且 PZ-128 对凝血、心电图等重要参数未产生明显影响。目前 PZ-128 的 II 期临床试验正在进行，以进一步评价其针对非紧急经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 患者的有效性和安全性。

3 小结

针对 PAR-1 的作用机制及其拮抗剂的研究已取得较大进展。vorapaxar 作为首个被批准的口服小分子 PAR-1 抑制剂，已被用于有心脏病发作史患者以及动脉栓塞患者。但出血风险增加等不良反应限制了该药物的进一步应用。而新近出现的多肽类拮抗剂 PZ-128 在保留了抗血小板活性的同时表现出专一性强、安全性好等优点。相信在不久的将来，经过广大药学工作者的艰苦努力，更加安全有效的新型 PAR-1 拮抗剂一定能用于临床，造福广大患者。

参考文献

- [1] Vu T K, Hung D T, Wheaton V, *et al.* Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation [J]. *Cell*, 1991, 64(6): 1057-1068.
- [2] Kahn M L, Nakanishi-matsui M, Shapiro M J, *et al.* Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103(6): 879-887.
- [3] Ramachandran R, Noorbakhsh F, Defea K, *et al.* Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2012, 11(1): 69-86.
- [4] Adams M N, Ramachandran R, Yau M K, *et al.* Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 130(3): 248-282.
- [5] Chackalamannil S, Wang Y, Greenlee WJ, *et al.* Discovery of a novel, orally active himbacine-based thrombin receptor antagonist (SCH 530348) with potent antiplatelet activity [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(11): 3061-3064.
- [6] Becker R C, Moliterno D J, Jennings L K, *et al.* Safety and tolerability of SCH 530348 in patients undergoing non-urgent percutaneous coronary intervention: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase II study [J]. *Lancet*, 2009, 373(9667): 919-928.
- [7] Goto S, Yamaguchi T, Ikeda Y, *et al.* Safety and exploratory efficacy of the novel thrombin receptor (PAR-1) antagonist SCH530348 for non-ST-segment elevation acute coronary syndrome [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17(2): 156-164.
- [8] Shinohara Y, Goto S, Doi M, *et al.* Safety of the novel protease-activated receptor-1 antagonist vorapaxar in Japanese patients with a history of ischemic stroke [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2012, 21(4): 318-324.
- [9] 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.
- [10] Morrow D A, Braunwald E, Bonaca M P, *et al.* Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(15): 1404-1413.
- [11] Chelliah M V, Chackalamannil S, Xia Y, *et al.* Himbacine-derived thrombin receptor antagonists: c7-aminomethyl and c9a-hydroxy analogues of vorapaxar [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 5(2): 183-187.
- [12] Chelliah M V, Eagen K, Guo Z, *et al.* Himbacine-derived thrombin receptor antagonists: c7-spirocyclic analogues of vorapaxar [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5(5): 561-565.
- [13] Knight E, Robinson E, Smoktunowicz N, *et al.* Synthesis of novel and potent vorapaxar analogues [J]. *Org Biomol Chem*, 2016, 14(12): 3264-3274.
- [14] Rollini F, Tello-Montoliu A, Angiolillo D J. Atopaxar: a review of its mechanism of action and role in patients with coronary artery disease [J]. *Future Cardiol*, 2012, 8(4): 503-511.
- [15] Kogushi M, Matsuoka T, Kawata T, *et al.* The novel and orally active thrombin receptor antagonist E5555 (Atopaxar) inhibits arterial thrombosis without affecting bleeding time in guinea pigs [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 657(1-3): 131-137.
- [16] O'Donoghue M L, Bhatt D L, Wiviott S D, *et al.* Safety and tolerability of atopaxar in the treatment of patients with acute coronary syndromes: the lessons from antagonizing the cellular effects of Thrombin-Acute Coronary Syndromes Trial [J]. *Circulation*, 2011, 123(17): 1843-1853.
- [17] Wiviott S D, Flather M D, O'Donoghue M L, *et al.* Randomized trial of atopaxar in the treatment of patients with coronary artery disease: the lessons from antagonizing the cellular effect of Thrombin-Coronary Artery Disease Trial [J]. *Circulation*, 2011, 123(17): 1854-1863.
- [18] Goto S, Ogawa H, Takeuchi M, *et al.* Double-blind, placebo-controlled Phase II studies of the protease-activated

- receptor 1 antagonist E5555 (atopaxar) in Japanese patients with acute coronary syndrome or high-risk coronary artery disease [J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(21): 2601-2613.
- [19] Perez M, Lamothe M, Maraval C, *et al.* Discovery of novel protease activated receptors 1 antagonists with potent antithrombotic activity *in vivo* [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(19): 5826-5836.
- [20] Dockendorff C, Aisiku O, Verplank L, *et al.* Discovery of 1,3-diaminobenzenes as selective Inhibitors of platelet activation at the PAR1 receptor [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3(3): 232-237.
- [21] Damiano B P, Derian C K, Maryanoff B E, *et al.* RWJ-58259: a selective antagonist of protease activated receptor-1 [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2003, 21(4): 313- 326.
- [22] Robinson E, Knight E, Smoktunowicz N, *et al.* Identification of an active metabolite of PAR-1 antagonist RWJ-58259 and synthesis of analogues to enhance its metabolic stability [J]. *Org Biomol Chem*, 2016, 14(12): 3198-3201.
- [23] Covic L, Gresser A L, Talavera J, *et al.* Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(2): 643-648.
- [24] Zhang P, Gruber A, Kasuda S, *et al.* Suppression of arterial thrombosis without affecting hemostatic parameters with a cell-penetrating PAR1 pepducin [J]. *Circulation*, 2012, 126(1): 83-91.
- [25] Gurbel P A, Bliden K P, Turner S E, *et al.* Cell-penetrating pepducin therapy targeting PAR1 in subjects with coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(1): 189-197.