

抗血小板药物研究进展及新靶点药物的发现

孙双勇, 靳 京, 孔晓华, 商 倩, 张士俊, 黄长江, 刘 巍*

天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300301

摘要: 抗血小板药物是预防和治疗心肌梗死和缺血性脑卒中等动脉血栓疾病的主要药物, 目前应用的该类药物主要包括阿司匹林、P2Y₁₂受体拮抗剂、糖蛋白 IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) 受体拮抗剂和蛋白酶激活受体 (PAR1) 拮抗剂等。尽管已有抗血小板药物能够在一定程度上降低动脉血栓疾病的发生, 但出血副作用不容忽视。随着对血小板相关机制研究的不断深入, 越来越多抗血小板药物新靶点被发现, 包括蛋白酶激活受体 (PARs)、血小板糖蛋白 VI (GPVI)、磷脂酰肌醇激酶 (PI3K β) 和蛋白二硫键异构酶 (PDI) 等。综述了已上市的抗血小板药物、目前临床应用存在的问题以及以新靶点研发的研究状况。

关键词: 抗血小板药物; 新靶点; 蛋白酶激活受体; 血小板糖蛋白 VI; 磷脂酰肌醇激酶; 蛋白二硫键异构酶

中图分类号: R973 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2021) 01-0213-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.01.030

Research progress and discovery of new targets in antiplatelet drugs

SUN Shuangyong, JIN Jing, KONG Xiaohua, SHANG Qian, ZHANG Shijun, HUANG Changjiang, LIU Wei

Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

Abstract: Antiplatelet drugs are the main drugs for the prevention and treatment of arterial thrombosis including myocardial infarction and ischemic stroke. Antiplatelet drugs already available mainly include aspirin, P2Y₁₂ receptor antagonists, glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) receptor antagonists and protease activated receptor 1 (PAR1) antagonists. Although the existing antiplatelet drugs can reduce the incidence of arterial thrombotic diseases to a certain extent, their bleeding side effects should not be ignored. With the development of platelet related mechanism, more and more new targets of antiplatelet drugs have been revealed, including protease activated receptor (PARs), platelet glycoprotein VI (GPVI), phosphatidylinositol kinase (PI3K β) and protein disulfide isomerase (PDI). This paper reviews the research and development of antiplatelet drugs, the existing problems in clinical application and the research status of antiplatelet drugs with new targets.

Key words: antiplatelet drugs; new targets; protease activated receptors; platelet glycoprotein VI; phosphatidylinositol kinase; protein disulfide isomerase

在全球范围内, 心血管疾病仍然是居民的主要死因。2016年, 全球约有1 790万人死于心血管疾病, 占全球死亡人数的31%^[1]。中国心肌梗死和脑卒中的年发病率分别为0.001 09%和0.001 2%, 仅缺血性脑血管病患者就超过700万^[2]。血管内皮损伤部位的血小板活化在动脉粥样硬化血栓形成过程中起关键作用, 随着疾病的进展, 可导致血管阻塞, 进而造成器官功能受损。目前, 抗血小板药物

是临床上预防和治疗动脉血栓栓塞性疾病的基础药物, 常用的药物主要有氯吡格雷、替格瑞洛和阿司匹林等, 随着临床研究不断深入, 该类物质被发现仍然存在很多问题, 如药物抵抗现象和出血风险增加等。如何合理利用已有的抗血小板药物, 同时寻找新的靶点以开发疗效更佳、安全性更好的新型药物, 是目前亟待解决的问题。本文就已上市的抗血小板药物、目前临床应用中存在的问题以及抗血

收稿日期: 2020-07-06

基金项目: 天津市第二批特支计划青年拔尖人才基金(TJZJH-QNBJRC-2-7); 天津市科技计划项目(19YFZCSY00620)

第一作者: 孙双勇, 男, 副研究员, 博士, 主要从事心脑血管新药研发工作。E-mail: sunsy@tipr.com.cn

*通信作者: 刘 巍, 男, 研究员, 博士, 主要从事新药设计与评价。E-mail: liuw@tipr.com.cn

血小板药物新靶点的研究状况进行综述,以期合理用药与新药研发提供依据。

1 已上市的抗血小板药物

目前,在临床上应用的抗血小板药物主要包括4类:阿司匹林、P2Y₁₂受体拮抗剂、糖蛋白IIb/IIIa(glycoprotein IIb/IIIa, GPIIb/IIIa)受体拮抗剂和蛋白酶激活受体(protease activated receptor 1, PAR1)拮抗剂。

1.1 阿司匹林

流行病学研究发现患者在服用抗炎药物阿司匹林后,患心血管疾病的概率大幅度降低,研究证明阿司匹林可以有效抑制血小板的活化和聚集^[3]。阿司匹林通过不可逆地乙酰化血小板环氧化酶而抑制血栓素A₂(thromboxane A₂, TXA₂)的合成,进而发挥抗血小板和抑制血栓生成作用。1974年,Elwood等^[3]通过临床试验证实了阿司匹林可有效降低心肌缺血患者死亡率,从此以后阿司匹林作为首个抗血小板药物,被单独使用或者与其他抗凝药物联合使用,到目前为止,阿司匹林仍然是最常使用的抗血小板药物之一。阿司匹林存在着“阿司匹林抵抗”现象,患者在使用该药物的5年内有血栓复发事件发生,发生率约为10%~20%,可能与阿司匹林对血栓素的生物合成不敏感,阿司匹林处方用量不恰当、药物之间相互反应、患者用药依从性不够好等多种因素相关^[4]。

1.2 P2Y₁₂受体拮抗剂

P2Y₁₂受体参与完成ADP诱导的血小板聚集过程,这个过程由P2Y₁₂受体激活开始,血小板激活、分泌、聚集,最终形成稳定的血栓。在该过程中,P2Y₁₂受体主要参与ADP释放导致的瀑布效应,在1期凝血中发挥着重要作用。

1972年,一种用于抗炎的噻吩并吡啶类药物被发现有一定的抗血小板活性,在此基础上,开发出了第一代噻吩并吡啶类抗血小板药物噻氯匹定,该药于1991年被批准用于卒中的首次和二次预防以及支架植入术中血栓的预防^[5]。第二代噻吩并吡啶类药物氯吡格雷于1997年获FDA批准,它是一种前药,本身并无活性,口服经肠道吸收后大约85%被代谢成为无活性的氯吡格雷羧酸,剩余不足20%经肝脏细胞色素P450酶经两步代谢成为活性巯基代谢物,进而起到抗血小板聚集作用。由于需要经过多次代谢发挥作用,因此氯吡格雷起效缓慢^[6]。同时,随着氯吡格雷的广泛使用,部分患者(约30%)在治疗期间出现疗效下降甚至“抵抗”现象,目前研究认为

氯吡格雷的抵抗性与服用者CYP2C19基因多态性密切相关^[7]。鉴于氯吡格雷的局限性,研究开发出了第三代噻吩并吡啶类抗血小板药物普拉格雷,该药于2009年被FDA批准。普拉格雷也是一种前药,但仅需细胞色素P450酶的一步转化即可产生活性代谢产物,因此起效更快。

替格瑞洛和坎格雷洛属于新型可逆性P2Y₁₂受体拮抗剂。替格瑞洛是一种口服ATP结构类似物,与ADP竞争性地与P2Y₁₂受体结合,它在2010年在欧洲被批准上市,2011年获FDA批准。与氯吡格雷相比,替格瑞洛起效更快,与P2Y₁₂受体可逆性结合,使得停药后接受手术的等待时间更短,同时受个体基因差异影响较小。坎格雷洛是一种快速可逆与P2Y₁₂受体结合的药物,通过静脉途径给药,于2015年获FDA批准。口服P2Y₁₂受体拮抗剂常被用于治疗冠状动脉疾病(coronary artery disease, CAD),尤其适用于经皮冠状动脉介入(percutaneous coronary intervention, PCI)后血栓形成的预防,临床上常采用与阿司匹林合用的双联抗血小板疗法。

1.3 GPIIb/IIIa受体拮抗剂

血小板活化后,会使GPIIb/IIIa转化成为活化位点,通过与纤维蛋白原或其他配体相结合的方式介导血小板的聚集。第一个以GPIIb/IIIa为靶点的抗血小板的单克隆抗体药物是阿昔单抗,于1994年获FDA批准^[8]。已上市作用于GPIIb/IIIa受体的药物还包括依替巴肽(一种环状拟肽)和替罗非班(一种酪氨酸的非肽衍生物),这些药物均采用静脉注射给药,用于防止PCI后的血栓形成,尤其适用于ST段升高的心肌缺血患者。虽然GPIIb/IIIa受体拮抗剂是有效的抗血栓药物,但它们会导致多达50%的病人出现出血并发症。由于它们阻碍了所有循环血小板的产生,因此增加了出血风险。GPIIb/IIIa受体拮抗剂曾被尝试开发成为口服药物,但均由于受试者过高的死亡率而宣告失败^[9]。

1.4 PAR1拮抗剂

凝血酶通过裂解PAR1和PAR4激活血小板,PAR1和PAR4均有希望成为抗血小板药物的作用靶点。沃拉帕沙是一种来自天然产物的口服、慢性可逆的PAR1拮抗剂,它可以降低心肌梗死史和外周动脉疾病(peripheral artery disease, PAD)史患者的血栓相关心血管事件。沃拉帕沙最主要的副作用依然是出血,约25%的服用者会发生出血事件,尤其是颅内出血会明显增加(NCT00526474)。沃

拉帕沙的第二项临床试验用于治疗急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS),由于有卒中史的受试者颅内出血明显增加,在开展初期即终止研究(NCT00527943)。沃拉帕沙参与的部分临床试验采用了三重抗血小板治疗,药物疗效增强的同时会造成出血的增加。尽管如此,FDA通过审查认为沃拉帕沙在临床试验中的收益大于出血风险,在2014年被批准用于CAD或PAD的二次预防,采用单独抗血小板或双联抗血小板开展治疗(有卒中史的患者除外)。尽管获得FDA批准,沃拉帕沙并未在临床上获得广泛使用,推测与其存在较高的出血风险有关。阿托帕沙(atopaxar)是另一种口服可逆的PAR1拮抗剂,已开展了多项临床II期试验,然而由于较强的肝脏毒性,对它的开发已被迫终止(NCT01000727;NCT00312052)^[10]。

2 抗血小板药物的临床应用

2.1 适应症

根据给药途径的不同,抗血小板药物可分为口服和非口服药物。非口服抗血小板药物,如GPIIb/IIIa受体拮抗剂或坎格雷洛,通常用于预防或治疗急性血栓形成。口服抗血小板药物,如阿司匹林或P2Y₁₂受体拮抗剂,通常采用单一抗血小板治疗的方法用于稳定型CAD、PAD、非心源性卒中或短暂性脑缺血发作(transient ischaemic attack, TIA)的二级预防。ACS和(或)接受PCI的患者通常接受短期抗凝治疗(肝素或比伐芦定等非口服直接凝血酶抑制剂)后,给予双重抗血小板治疗(dual antiplatelet therapy, DAPT),即阿司匹林和P2Y₁₂拮抗剂联合应用进行二级预防。氯吡格雷曾经是DAPT中最常用的P2Y₁₂拮抗剂,但现在正被更有效的药物普拉格雷和替格瑞洛所取代。GPIIb/IIIa拮抗剂偶尔会被用于ACS和(或)PCI,但这些药物由于出血风险较高使用量已有明显的下降。

2.2 出血副作用及逆转策略

已有抗血小板药物的作用机制一般为阻止产生第二信使(如TXA₂),抑制由可溶性激动剂(如P2Y₁₂、PAR1)激活的受体,或者是阻断纤维蛋白原和其他配体与GPIIb/IIIa的结合。然而,由于在正常生理止血过程中依赖上述途径,现有抗血小板药物的主要副作用依然是出血。在使用阿司匹林或P2Y₁₂拮抗剂时,大出血(通常指需要医疗护理的出血)的发生率约为每年1%^[11]。一般情况下,抗血小板药物如果比阿司匹林疗效更好,或者采用更有效的联合抗血小板治疗时,相应的出血也会更加严

重。抗血小板药物的逆转目前尚无指导方案,在理论上,输注足够数量的正常血小板能替代活性受到抑制的血小板,达到止血的效果。然而,在临床应用中,血小板输注通常无法逆转阿司匹林和P2Y₁₂拮抗剂(如氯吡格雷和普拉格雷)的抗血小板作用,尽管这些药物的代谢半衰期较短,但它们均以不可逆的方式与相应的靶点结合,其抑制作用可持续至血小板生命终点。血小板输注亦无法逆转替格瑞洛的效果,因为替格瑞洛与P2Y₁₂的结合是可逆的,对新输注的血小板仍然具有抑制作用,因此停药后血小板功能恢复仍需要4~5 d。此外,Baharoglu等^[12]通过对190名受试者的观察,发现与标准护理组相比,血小板输注会导致死亡率升高,在临床应用中血小板输注不应作为逆转抗血小板药物的推荐方法。替格瑞洛是目前唯一具有逆转剂的抗血小板药物,它的逆转剂PB2453是一种单克隆抗体片段,与替格瑞洛及其代谢物具有高度亲和力,可快速而持续地逆转替格瑞洛的抗血小板活性^[13]。

2.3 血小板反应差异性

当前抗血小板治疗的一个关键问题是患者血小板反应性的差异性。多项研究表明,患者在接受氯吡格雷治疗时存在明显的个体差异。2型糖尿病患者血小板反应性增加,使得抗血小板药物的疗效降低。尽管普拉格雷和替格瑞洛的差异性低于氯吡格雷,但与氯吡格雷相比,普拉格雷发生大出血的概率更高,而替格瑞洛易发生非冠状动脉搭桥手术相关的出血。此外,这两种药物的治疗费用都明显高于氯吡格雷,由此所引发的停药率也相应增加。因此,目前氯吡格雷仍然是临床上最常用的P2Y₁₂拮抗剂,占2016年经皮冠状动脉介入治疗后开具处方的50%以上^[14]。

个体血小板的反应性也存在着广泛的区别,这使得医生难以选用最佳的药物和确定使用剂量。随着医疗检测技术的发展,针对血小板反应性的即时检验(point-of-care testing, POCT)已经成为可能,POCT使用无需处理的全血,检测快速便捷。10项包含4 213名受试者的临床试验荟萃分析显示,在血小板反应性检测的基础上,与标准抗血小板治疗相比,氯吡格雷采用强化治疗方案可显著降低心血管死亡率、支架血栓形成和心肌梗死^[15]。为更好地使用抗血小板药物,血小板反应性POCT仍需要进一步改进。改进抗血小板药物使用的另一种方法是采用基因检测。研究表明,少数欧洲血统的患者携带CYP2C19功能丧失等位基因,该现象与血小板

对氯吡格雷的反应性降低有关^[16]。氯吡格雷基因-疗效相关性首次报道于2007年,后续十几年间又开展了多项相关临床试验。结果显示,对于初次接受PCI的患者,在12个月时在基因型指导下开展氯吡格雷治疗的效果并不比替格瑞洛或普拉格雷差,同时出血率更低,因此,在抗血小板治疗中使用CYP2C19基因检测指导给药可改善临床使用效果,基因型指导策略在抗血小板药物临床实践中应获得更广泛的应用。

2.4 疗程

抗血小板治疗的另一个关键问题是确定ACS患者,特别是接受冠状动脉内支架手术的患者开展DAPT的最佳时间。对于第一代药物洗脱支架,由于有报告称支架血栓形成较晚,因此推荐长期或终身使用DAPT。随着新一代药物洗脱支架的出现,血管愈合得到改善,支架血栓形成的发生率降低,DAPT的持续时间相应缩短,特别对于出血风险高的患者。2016年美国心脏病学会(American College of Cardiology, ACC)/美国心脏协会(American Heart Association, AHA)指南重点更新了冠心病患者DAPT的持续时间,建议在接受冠状动脉支架手术的稳定性冠心病患者中使用6个月的DAPT,在接受内科治疗或冠状动脉内支架治疗的ACS患者中使用12个月的DAPT。2017年欧洲指南与ACC/AHA指南相似,建议稳定性冠心病患者使用1~6个月(取决于出血风险)的DAPT,ACS患者使用12个月。最近的几项研究提供了更多的证据,证明1个月的DAPT对高出血风险稳定CAD患者是足够的^[17]。ACS患者DAPT的持续时间是否可以缩短到1年以内仍需进一步研究。

2.5 其他问题

抗血小板药物临床使用的其他问题还包括:高达30%的患者对氯吡格雷无反应;普拉格雷禁用于年龄 ≥ 75 岁、体质量 < 60 kg或有卒中病史的患者;替格瑞洛可引起呼吸困难,禁用于有颅内出血史的患者^[14]。

3 正在开发中的抗血小板药物

现有抗血小板药物在临床应用中存在着诸多问题,促使医药工作者积极寻找新的药物靶点,一系列抗血小板药物正在开展临床试验,有望为血栓疾病患者提供更佳的治疗方案。

3.1 凝血酶介导血小板活化拮抗剂

凝血酶活化血小板主要通过G蛋白偶联的蛋白酶活化受体(protease-activated receptors, PARs)介

导。人类血小板表面表达PAR1与PAR4两种受体,凝血酶能连接并切割PAR1或PAR4,暴露新的N-末端,后者作为一个固定配基与受体进行分子内结合,从而激发跨膜信号转导,引起血小板聚集、释放以及膜糖蛋白的一系列改变。PAR1可以被低浓度的凝血酶激活,产生快速而短暂的信号,PAR4激活需要比PAR1高10倍以上的凝血酶浓度,介导产生更持久的信号形成稳固的血栓。目前正在开发的该类药物主要为快速可逆的PAR1受体拮抗剂以及可能对出血影响更小的PAR4受体拮抗剂。需要注意的是,PAR1和PAR4在血管系统内包括内皮细胞在内的很多种类细胞内表达,因此,抑制PAR1和PAR4可能会对血小板以外的其他组织细胞产生一定的作用^[14]。

3.1.1 PAR1受体拮抗剂 PZ-128是一种新型PAR1受体拮抗剂,它的作用机制不同于传统的PAR1受体拮抗剂的作用方式,该药的结构来源于靶蛋白ICL3和TM6之间的氨基酸序列,该区域在PAR1与G蛋白之间信号转导中发挥着重要的作用。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,通过模拟非活性状态下的PAR1,进而抑制激活状态下的PAR1介导的血小板聚集^[18]。PZ-128计划开发成为快速、可逆的抗血小板药物,防止PCI相关血栓事件的发生。在I期临床试验中,研究者招募了31名患有冠脉疾病或携带多种易感冠脉疾病风险因子的受试者(NCT01806077),结果表明,静脉注射PZ-128能够显著抑制PAR1依赖的血小板激活,而对其他激动剂(如ADP)诱导的血小板激活无明显抑制作用,并且不会产生明显的出血^[19]。在后续的临床试验中,PZ-128项目计划招募高风险罹患冠心病的受试者以及进行过PCI的ACS患者开展相关研究。

parmodulins是一种PAR1受体变构拮抗剂,它的作用靶点在细胞内区域,选择性地干扰Gaq蛋白的活性,对PAR1的Ga12/13下游信号通路没有作用。parmodulins不仅抑制PAR1介导的血小板活化和聚集,对内皮细胞的促炎症信号通路也具有抑制作用,从而对内皮细胞也产生保护作用,该药物的临床试验尚未见报道^[20]。

3.1.2 PAR4受体拮抗剂 同PAR1相比较,PAR4与凝血酶的结合需要更高浓度的凝血酶。已有研究证明,对于凝血酶引起的血小板聚集,PAR4相比PAR1发挥了更重要的作用。因此,研究者们开始更多地关注PAR4,致力于找到更加安全有效的新

型抗血小板药物。

BMS-986120 是一种潜在可逆 PAR4 特异性小分子拮抗剂,能够抑制 γ -凝血酶或 PAR4 活性肽诱导的血小板激活。在一项食蟹猴动脉血栓模型中,BMS-986120 的抗血栓形成作用与氯吡格雷相当,同时它的出血风险更小^[21]。在 I 期临床试验中,口服 BMS-986120 的生物半衰期为 4 h,它可选择性地抑制 PAR4 介导的血小板活化,显著降低血栓的形成,药效作用与阿司匹林或氯吡格雷接近,受试者均未出现自发性的出血(NCT02439190)^[22]。

BMS-986141 是一种比 BMS-986120 更具潜力的小分子拮抗剂, I 期临床试验已完成(NCT02341638)。在 II 期临床试验中,主要临床终点为:与安慰剂组比较,对于近期患有卒中或 TIA 的患者,BMS-986141 能否够降低卒中复发的风险,所有受试者在接受 BMS-986141 治疗的同时服用阿司匹林。然而,由于未披露的原因该项目已提前终止(NCT02671461)。

以 PAR4 为靶点的蛋白激酶和一种单克隆抗体已经被研发出来,但均未进入临床试验阶段^[23-24]。

3.2 糖蛋白 VI 胶原介导血小板活化拮抗剂

糖蛋白 VI(glycoprotein VI, GPVI)是具有良好的开发前景的新的抗血小板药物靶点,它的主要激动剂是胶原。GPVI 主要介导血小板与胶原之间的黏附、信号转导和血小板活化。GPVI-IX-V 与血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)结合引发 GPVI 与胶原结合,协同介导血小板的黏附。当血液处于高剪切力状态时,GPVI-IX-V 与 vWF 起主导地位,在低剪切力时,GPVI 的活化也发挥着重要的作用。GPVI 的配体-胶原是强效的促凝物质,引发血小板内部的磷脂酰丝氨酸外翻至血小板膜表面,暴露的磷脂酰丝氨酸激活前凝血素酶,进而促进血栓的形成。GPVI 缺陷者除非同时患有中度到重度血小板减少症,通常情况下仅表现出轻微的出血倾向。此外,敲除 GPVI 或 Fc 受体的小鼠以及通过药物所致 GPVI 功能缺陷的小鼠几乎没有或者仅有轻微的出血倾向。原因可能为正常血液循环中胶原以外的凝血酶等足以激活血小板其他受体完成止血过程,而在生理止血过程中不同于正常生理状态,此时 GPVI 在血栓形成中占据着主导地位。在动物血栓模型中,GPVI 缺陷小鼠能有效减少血栓的生成。同时,作用于 GPVI 的药物能够降低因动脉粥样硬化斑块破裂所致的血栓生成,与传统抗血小板药物相比,该类药物有更少的出血倾向。

3.2.1 GPVI-胶原/纤维蛋白相互作用拮抗剂 目前有 2 个 GPVI 功能拮抗剂正在开发当中,分别为 Revacept 和 ACT017,它们的作用靶点不同,前者的作用靶点是 GPVI 配体胶原,后者的作用靶点是 GPVI 自身。

Revacept 是一种融合蛋白,含有融合到人 Fc 免疫球蛋白区域的 GPVI 胞外结构域,通过与胶原中串联甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸(GPO)基序结合,竞争性抑制体内 GPVI 与胶原的结合,抑制胶原介导的血小板活化与聚集,发挥抗血栓作用。在小鼠卒中模型中,Revacept 能够增强 tPA 的溶栓活性,并且不导致出血增加^[25]。在 I 期临床试验中,Revacept 剂量相关地抑制胶原诱导血小板激活,对凝血功能无显著影响(NCT01042964)^[26]。在 II 期临床试验中,研究者对 Revacept 治疗症状性颈动脉狭窄、一时性黑蒙、短暂性脑缺血以及卒中的疗效进行观察,该项试验结果尚未见报道(NCT01645306)。此外,另外一项 II 期临床试验也在开展当中,观察 2 个剂量的 Revacept(160、80 mg)与安慰剂相比对接受 PCI 的 CAD 患者的影响(NCT03312855),主要疗效终点为 48 h 内受试者的死亡和心肌损伤情况^[14]。

ACT017 是一种高亲和力人源化抗体片段(Fab),特异性地与 GPVI 结合。ACT017 的适应症为急性缺血性脑卒中,用于溶栓和血栓切除术的辅助治疗或不适合溶栓治疗患者的独立治疗。在临床前研究中,ACT017 静脉注射入恒河猴体内后,可剂量相关性地抑制由胶原诱导的血小板活化,并且不会诱导血小板减少和出血。在 I 期临床试验中,ACT017 在健康受试者身上开展了药动学、药效学、安全性以及耐受性试验,结果表明该药具有良好的安全性和耐受性,能够有效抑制胶原所致血小板聚集,对血小板计数和血小板 GPVI 表达均无明显影响,此外,该药对血小板的作用是迅速和特异性的,并且在 24 h 内可被逆转(NCT03803007)^[27]。

3.2.2 vWF-GPIIb 介导血小板活化拮抗剂 血小板激活后,暴露在细胞外基质上的糖蛋白 IIb(glycoprotein IIb, GPIIb)和 vWF 相互作用使其在血管损伤部位被捕获,发生血小板黏附、聚集进而形成血栓。临床前研究表明,抑制 vWF-GPIIb 相互作用可产生促溶栓活性,改善脑部血液循环,减少脑缺血/再灌注损伤。目前正在研究的 vWF 拮抗剂包括 ARC1779, 2 个单克隆抗体(AJW200 和 82D6A3)和 2 个二价纳米体(卡帕珠单抗和 ALX-0681)。

ARC1779是一种基于DNA的适配子,对vWF的A1端具有高亲和力,阻断其与糖蛋白的相互作用,进而抑制vWF的促血栓生成功能。I期临床试验结果表明,ARC1779在体内剂量相关地抑制血小板活化(NCT00432770),在II期临床试验中,它能够有效降低颈动脉内膜切除术者发生缺血性卒中的风险,血栓减少量与vWF抑制程度呈正相关(NCT0742612)^[28]。

卡帕珠单抗是一种抗vWF人源化二价可变结构域免疫球蛋白片段,可抑制vWF多聚体与血小板之间的相互作用,用于治疗血栓性血小板减少性紫癜和血栓形成。在已开展的2项I期临床试验中,卡帕珠单抗耐受性良好,未产生明显的出血(NCT0289733、NCT03172208)。在III期临床试验中,与安慰剂组相比,卡帕珠单抗组的血栓性血小板减少性紫癜(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)复发率降低了67%,受试者需要更少的血浆置换,住院时间更短^[29]。2019年2月,卡帕珠单抗被FDA批准用于成年患者获得性TTP的治疗,与血浆置换和免疫疗法联合使用。

与以vWF A1区域为靶点的药物研究相比,以GP1b α 为靶点的药物研究开展得较缓慢。正在开发中的GP1b α 拮抗剂包括两种抗GP1b α 抗体(SZ2和h6B4-Fab)、一种蛇毒多肽安菲博肽(anfibatide)和一种含有GP1b α 氨基末端与人IgG1 Fc融合的融合蛋白^[30-31]。需要注意的是,GP1b α 受到抑制后,可能会导致血小板脱乙酰化增加和急性血小板减少,因此。在开发以GP1b α 为靶点的药物时应避免对血小板数量造成影响。

尽管以vWF或GP1b α 为靶点的药物被相继开发出来,它们作为抗血小板药物对脑血管疾病(cerebrovascular disease, CVD)的疗效尚未开展,在今后的临床试验中,观察该类药物是否对CVD具有治疗作用值得研究。

3.3 PI3K β 拮抗剂

磷脂激酶PI3K家族的磷脂酰肌醇3-激酶- β (Phosphoinositide 3-kinase- β , PI3K β)在各种血小板受体下游的信号传导中起着重要作用,在剪切应力下,起到稳定血小板黏附的作用。遗传学研究表明,p110 β 缺陷小鼠动脉血栓的发病率更低^[32]。正在开发中的PI3K β 拮抗剂主要有AZD6482和MIPS-9922。

AZD6482是一种高效选择性ATP竞争性的PI3K β 拮抗剂,对血小板有剂量相关性的抑制作用。

临床前研究中,AZD6482在犬体内不增加出血时间和出血量的情况下发挥抗血栓作用。在临床试验中,健康受试者对AZD6482具有良好的耐受性,与阿司匹林合用时,同氯吡格雷相比AZD6482展现出更强的抗血小板活性和更少的出血^[33]。AZD6482只能静脉注射给药,且半衰期很短,因此目前正在开展工作,使其拥有更好的药动学性质和更佳的作用选择性。

MIPS-9922是一种高选择性的PI3K β 拮抗剂,可有效抑制ADP诱导的血小板聚集,防止小鼠电刺激所致血栓生成,不会导致增加出血^[34]。PI3K β 是否能够成为抗血小板药物有效靶标还需要更加深入的研究。

3.4 PDI拮抗剂

蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)是一种具有催化蛋白质二硫键氧化、还原与异构功能的酶,在体内血栓形成过程中扮演了重要角色,具有调控血小板聚集、黏附和颗粒释放的功能,抑制PDI的酶活性可防止血小板聚集和纤维蛋白生成,所以PDI是一种有潜在开发价值的抗血栓药物研究靶点。异槲皮素是首个发现的具有抗血栓活性的PDI拮抗剂。多项动物试验表明,异槲皮素对血栓形成的有抑制作用^[35]。因为异槲皮素通常存在于水果、蔬菜和食物中,具有良好的使用安全性,所以很快进入I期临床试验(NCT01722669)。后续的II期临床试验表明,异槲皮素可有效降低晚期癌症患者血浆中的D-二聚体和可溶性P-选择素水平,减低血栓的生成,没有受试者出现深静脉血栓(NCT02195232)^[36]。

3.5 其他抗血小板药物

3.5.1 GPIIb/IIIa受体拮抗剂 血小板的聚集可以通过多种信号途径转导,但最后都通过一个共同通路产生作用,表现为使血小板膜上GPIIb/IIIa活化,暴露结合位点,纤维蛋白原通过桥联方式,两端分别与不同GPIIb/IIIa结合,最终导致血小板聚集。GPIIb/IIIa作为血小板聚集的最终通路,被认为是具有潜力的抗血小板药物靶点。Schwarz等^[37]针对GPIIb/IIIa设计了一系列人源单链抗体(single-chain antibody fragment, scFV),在小鼠三氯化铁致血栓模型中,这些scFVs能达到与构象非特异性拮抗剂替罗非班和依替巴特相似的抗血栓作用,同时不会延长出血时间。Hanjaya-Putra等^[38]设计了一种作用于GPIIb/IIIa的重组融合蛋白SCE5-TAP,由单链抗体SCE5和蜱抗凝血肽(tick anticoagulant peptide,

TAP)组成,在小鼠颈动脉和下腔静脉血栓模型中,SCE5-TAP可血小板靶向性地抑制血栓生成,对止血没有显著影响。

3.5.2 12(S)-脂氧合酶(12-LOX)抑制剂 血小板含有一种高表达的称为12-LOX的氧合酶,可将磷脂释放的花生四烯酸转化为生物活性代谢物12(S)-氢过氧二十碳四烯酸和氢二十碳四烯酸。12-LOX可调节各种血小板反应,包括在胶原或凝血酶作用下整合素的激活和分泌。此外,FcγRIIa受体的激活会导致免疫介导的血栓生成,在肝素诱导的血小板减少症或脓毒症患者中该过程的发生常危及生命。12-LOX在调节FcγRIIa介导血栓形成中发挥着重要作用,它有望成为限制免疫介导血栓形成的潜在治疗靶点。ML355是一种高效、选择性12-LOX抑制剂,对其他脂氧化酶和环氧化酶无明显抑制作用。在体外试验中,ML355能够剂量相关性地抑制不同诱导剂所致的人血小板聚集,在动脉剪应力下显著抑制血小板活性。在小鼠试验中,ML355对微血管动脉血栓形成有抑制作用,而对尾出血没有影响^[39]。

3.5.3 BTK抑制剂 布鲁顿酪氨酸激酶(Bruton's tyrosine kinase, BTK)在血小板中表达,是GPVI下游信号传导的重要组成部分。依鲁替尼是一种口服的不可逆小分子BTK拮抗剂,用于治疗B细胞恶性肿瘤。依鲁替尼的副作用之一是轻微出血事件,发生率约35%。依鲁替尼通过抑制GPIIb和GPVI信号通路转导抑制动脉粥样硬化斑块上血小板血栓的形成,同时保留了血小板的止血功能^[40]。BTK抑制剂有望开发成为口服抗血小板药物,该类药物对血小板功能的影响目前正在研究中。

4 结语

抗血小板药物是防治心脑血管疾病的基础,通过多年发展已有己一系列相关药物上市,目前临床上经常使用的包括阿司匹林、氯吡格雷和替格瑞洛等。抗血小板药物的应用一定程度上降低了心脑血管疾病的发病率,对动脉血栓疾病的预防起到了积极的作用。随着研究的不断深入,己有抗血小板药物仍然不能完全满足临床需求,主要表现在药效不足、出血副作用严重以及存在药物抵抗等。鉴于该种现状,医药科学家们致力于寻找更加安全有效的抗血小板药物,一系列新的作用靶点逐渐被发现,包括PAR、GPVI、vWF、PI3Kβ、PDI等。针对这些新的作用靶点,开发出了一系列新的药物,包括小分子、抗体、蛋白以及适配子等,部分药物已进入

临床研究阶段,表现出良好的成药可能性,但均尚未正式上市。

除研发新的抗血小板药物外,个性化治疗在脑血管疾病中也起着重要的作用。根据患者的基因相似性和功能测定情况进行相应的抗血小板治疗,对取得最佳效果起着重要的作用。新的挑战因素还包括开展全球流行病学调查,包括肥胖、代谢综合征和糖尿病等,这些疾病对血小板反应性及抗血小板药物的治疗存在着重要的影响。新型抗血小板治疗方案建立的另一项挑战是如何证明新的药物或治疗方案与己有的相比具有优效性,以及大规模的临床试验所需的高额费用。此外,在证明一个新的药物比原有药物具有更少出血的同时,该药物的抗血小板活性是否降低也应该被慎重考虑。

尽管存在着很多的挑战和顾虑,新型抗血小板药物依然有着光明的前景,正在开展当中的临床试验结果值得共同期待。相信随着对血小板病理生理研究的不断深入和对抗血小板药物研发工作的不断开展,未来将会有更多的新型抗血小板药物应用于临床。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Tscharré M, Michelson A D, Gremmel T. Novel antiplatelet agents in cardiovascular disease [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2020, 25(3): 191-200.
- [2] 陈丹丹, 于楠. 新型抗血小板药物的研究进展 [J]. 海峡药学, 2018, 30(1): 95-98.
Chen D D, Yu N. Research progress of new antiplatelet drugs [J]. Strait Pharma J, 2018, 30(1): 95-98.
- [3] Elwood P C, Cochrane A L, Burr M L, et al. A randomized controlled trial of acetyl salicylic acid in the secondary prevention of mortality from myocardial infarction [J]. Br Med J, 1974, 1(5905): 436-440.
- [4] 鲁苗. 抗血小板药物研究新进展 [J]. 云南化工, 2017, 44(9): 10-12.
Lu M. New developments in antiplatelet drugs [J]. Yunnan Chem Technol, 2017, 44(9): 10-12.
- [5] Janzon L, Bergqvist D, Boberg J, et al. Prevention of myocardial infarction and stroke in patients with intermittent claudication; effects of ticlopidine. results from STIMS, the Swedish Ticlopidine Multicentre Study [J]. J Intern Med, 1990, 227(5): 301-308.
- [6] Nguyen T A, Diodati J G, Pharand C. Resistance to clopidogrel: a review of the evidence [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(8): 1157-1164.

- [7] Pettersen A A, Arnesen H, Opstad T B, et al. The influence of CYP 2C19*2 polymorphism on platelet function testing during single antiplatelet treatment with clopidogrel [J]. *Thromb J*, 2011, 9: 4.
- [8] Collier B S. Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions [J]. *Thromb Haemost*, 2001, 86(1): 427-443.
- [9] Chew D P, Bhatt D L, Topol E J. Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: why don't they work? [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2001, 1(6): 421-428.
- [10] 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.
- [11] Serebruany V L, Malinin A I, Eisert R M, et al. Risk of bleeding complications with antiplatelet agents: meta-analysis of 338,191 patients enrolled in 50 randomized controlled trials [J]. *Am J Hematol*, 2004, 75(1): 40-47.
- [12] Baharoglu M I, Cordonnier C, Al-Shahi Salman R, et al. Platelet transfusion versus standard care after acute stroke due to spontaneous cerebral haemorrhage associated with antiplatelet therapy (PATCH): a randomised, open-label, phase 3 trial [J]. *Lancet*, 2016, 387(10038): 2605-2613.
- [13] Bhatt D L, Pollack C V, Weitz J I. Antibody-based ticagrelor reversal agent in healthy volunteers reply [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(6): 586.
- [14] Mackman N, Bergmeier W, Stouffer G A, et al. Therapeutic strategies for thrombosis: new targets and approaches [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(5): 333-352.
- [15] Aradi D, Komocsi A, Price M J, et al. Efficacy and safety of intensified antiplatelet therapy on the basis of platelet reactivity testing in patients after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 167(5): 2140-2148.
- [16] Hulot J S, Bura A, Villard E, et al. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects [J]. *Blood*, 2006, 108(7): 2244-2247.
- [17] Watanabe H, Domei T, Morimoto T, et al. Very short dual antiplatelet therapy after drug-eluting stent implantation in patients with high bleeding risk: insight from the STOPDAPT-2 trial [J]. *Circulation*, 2019, 140(23): 1957-1959.
- [18] 解晓帅, 路楠, 黄长江, 等. 蛋白酶激活受体-4拮抗剂的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(12): 2529-2533.
- Xie X S, Lu N, Huang C J, et al. Research progress on PAR-4 inhibitors [J]. *Drugs Clin*, 2017, 32(12): 2529-2533.
- [19] Gurbel P A, Bliden K P, Turner S E, et al. Cell-penetrating peptidomimetic therapy targeting PAR1 in subjects with coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(1): 189-197.
- [20] De Ceunynck K, Peters C G, Jain A, et al. PAR1 agonists stimulate APC-like endothelial cytoprotection and confer resistance to thromboinflammatory injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(5): E982-E991.
- [21] Wong P C, Seiffert D, Bird J E, et al. Blockade of protease-activated receptor-4 (PAR4) provides robust antithrombotic activity with low bleeding [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(371): eaaf5294.
- [22] Wilson S J, Ismat F A, Wang Z, et al. PAR4 (protease-activated receptor 4) antagonism with BMS-986120 inhibits human ex vivo thrombus formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(2): 448-456.
- [23] Covic L, Misra M, Badar J, et al. Peptidomimetic-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation [J]. *Nat Med*, 2002, 8(10): 1161-1165.
- [24] French S L, Thalmann C, Bray P F, et al. A function-blocking PAR4 antibody is markedly antithrombotic in the face of a hyperreactive PAR4 variant [J]. *Blood Adv*, 2018, 2(11): 1283-1293.
- [25] Reimann A, Li Z, Goebel S, et al. Combined administration of the GPVI-Fc fusion protein revacept with low-dose thrombolysis in the treatment of stroke [J]. *Heart Int*, 2016, 11(1): e10-e16.
- [26] Ungerer M, Rosport K, Bultmann A, et al. Novel antiplatelet drug revacept (Dimeric Glycoprotein VI-Fc) specifically and efficiently inhibited collagen-induced platelet aggregation without affecting general hemostasis in humans [J]. *Circulation*, 2011, 123(17): 1891-1899.
- [27] Voors-Pette C, Lebozec K, Dogterom P, et al. Safety and tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ACT017, an antiplatelet GPVI (glycoprotein VI) fab [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(5): 956-964.
- [28] Markus H S, Mccollum C, Imray C, et al. The von willebrand inhibitor ARC1779 reduces cerebral embolization after carotid endarterectomy: a randomized trial [J]. *Stroke*, 2011, 42(8): 2149-2153.
- [29] Scully M, Cataland S R, Peyvandi F, et al. Caplacizumab treatment for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(4): 335-346.
- [30] Firbas C, Siller-Matula J M, Jilma B. Targeting von willebrand factor and platelet glycoprotein Ib receptor [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8(12): 1689-1701.

- [31] Lei X, Rehem A, Hou Y, et al. Anfibatide, a novel GPIIb complex antagonist, inhibits platelet adhesion and thrombus formation *in vitro* and *in vivo* in murine models of thrombosis [J]. Thromb Haemost, 2014, 111(2): 279-289.
- [32] Martin V, Guillemet-Guibert J, Chicanne G, et al. Deletion of the p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation *in vitro* and *in vivo* [J]. Blood, 2010, 115(10): 2008-2013.
- [33] Nylander S, Wagberg F, Andersson M, et al. Exploration of efficacy and bleeding with combined phosphoinositide 3-kinase beta inhibition and aspirin in man [J]. J Thromb Haemost, 2015, 13(8): 1494-1502.
- [34] Zheng Z, Pinson J A, Mountford S J, et al. Discovery and antiplatelet activity of a selective PI3Kbeta inhibitor (MIPS-9922) [J]. Eur J Med Chem, 2016, 122: 339-351.
- [35] Jasuja R, Passam F H, Kennedy D R, et al. Protein disulfide isomerase inhibitors constitute a new class of antithrombotic agents [J]. J Clin Invest, 2012, 122(6): 2104-2113.
- [36] Zwicker J I, Schlechter B L, Stopa J D, et al. Targeting protein disulfide isomerase with the flavonoid isoquercetin to improve hypercoagulability in advanced cancer [J]. JCI Insight, 2019, 4(4): e125851.
- [37] Schwarz M, Meade G, Stoll P, et al. Conformation-specific blockade of the integrin GPIIb/IIIa: a novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets [J]. Circ Res, 2006, 99(1): 25-33.
- [38] Hanjaya-Putra D, Haller C, Wang X, et al. Platelet-targeted dual pathway antithrombotic inhibits thrombosis with preserved hemostasis [J]. JCI Insight, 2018, 3(15): e99329.
- [39] Adili R, Tourdot B E, Mast K, et al. First selective 12-LOX inhibitor, ML355, impairs thrombus formation and vessel occlusion *in vivo* with minimal effects on hemostasis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(10): 1828-1839.
- [40] Busygina K, Jamasbi J, Seiler T, et al. Oral Bruton tyrosine kinase inhibitors selectively block atherosclerotic plaque-triggered thrombus formation in humans [J]. Blood, 2018, 131(24): 2605-2616.

[责任编辑 李红珠]