

凝血因子 XI 抑制剂研究进展

任燊红, 毛自敏, 孔毅*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京 211198)

摘要: 近十几年来血栓性疾病发病率上升, 严重危害人类的健康。目前临床使用的抗血栓药物存在易出血等不良反应。大量临床资料表明, 先天缺乏凝血因子 XI (factor XI, FXI) 的患者患缺血性脑卒中及深静脉血栓的比率明显降低, 且一般无自发性出血。由于 FXI 的这一特点, 对新抗凝方案探索的目光聚焦到了 FXI 抑制剂的开发上。以 FXI 为靶点的抗血栓新药研究已取得一定进展。本文就 FXI 抑制剂的研究进展做一综述, 以期研究新的抗血栓药物提供思路。

关键词: 血栓性疾病; 抗血栓药物; 凝血因子 XI; 抑制剂; 出血风险

中图分类号: R966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2019)06-0991-09

Research progress on the inhibitors against factor XI

REN Shen-hong, MAO Zi-min, KONG Yi*

(School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: The incidence of thrombotic diseases has increased in the past decade, a factor endangering human health. Currently, antithrombotic drugs used in the clinic have side effects such as inducing bleeding. Data from clinical observation indicate that congenital deficiency of factor XI (FXI) gene decreases the incidence of stroke and deep venous thrombosis, without causing spontaneous bleeding. This unique property of FXI makes it a potential new target for antithrombotic drugs development. Many studies have focused on the discovery of novel inhibitors targeting FXI. This review summarizes the research progress in searching for the inhibitors against FXI.

Key words: thrombotic disease; antithrombotic drug; factor XI; inhibitor; bleeding

近年来心脑血管疾病发病率呈逐年增高趋势, 其高致残率和高死亡率对人民健康构成严重威胁并给社会带来沉重负担。2017 年中国心血管病报告显示, 心血管病死亡占全部死因的比率超过了 40%, 居各疾病首位^[1]。心血管疾病主要包括急性冠状动脉综合征、心肌梗死、脑卒中、不稳定型心绞痛、短暂性脑缺血和动脉粥样硬化等。能够引发心血管疾病的常见因素有吸烟、高血压、高血清总胆固醇和糖尿病等, 而血栓则是诱发心血管疾病最直接的因素。目前临床常用的用来防治血栓的药物主要分为 3 类: 抗血小板药物、抗凝药物和溶解血栓药物。抗血小板药物^[2], 如血小板表面

蛋白酶激活受体 1 (protease-activated receptor 1, PAR1) 拮抗剂 vorapaxar、P2Y₁₂ 拮抗剂氯吡格雷、GPIIb/IIIa 拮抗剂阿昔单抗、血栓烷素 A2 抑制剂阿司匹林和磷酸二酯酶抑制剂西洛他唑等; 抗凝药物^[2,3], 如华法林、肝素, 以及新上市的凝血因子 Xa (factor Xa, FXa) 抑制剂 (利伐沙班、阿哌沙班等) 和凝血酶抑制剂 (达比加群酯、水蛭素等); 溶栓类药物^[4] 包括尿激酶、阿替普酶、瑞替普酶等。这些药物对于减少血栓形成均有较好的临床效果, 但都存在一定的出血风险^[5,6]。目前接受抗凝药物治疗的患者, 发生颅内出血的比率为 0.1%~0.3%^[7,8], 颅内出血的患者死亡率高达 50%^[9-11]。还有一些患者本身就患有可能会导致出血倾向的其他疾病而不适合使用目前市面上的抗凝药, 如心房颤动患者、胃穿孔患者和严重肾病的患者。这些临床问题清楚地

收稿日期: 2019-03-02; 修回日期: 2019-04-04.

*通讯作者 Tel: 86-25-83271282, E-mail: yikong@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0148

表明,研究者需要研发不影响或最小限度影响人体正常生理止血功能的药物。因此,研发出血不良反应小的抗栓药物具有重要价值。

1953年 Rosenthal 等^[12]首次报道 FXI 缺陷症,其是一种常染色体隐性遗传性出血病,曾被称为血友病 C。与血友病 A、B 相比,FXI 缺陷症患者发病无性别差异,且一般无自发性出血,少有出现关节和肌肉内出血,在高纤溶活性部位的创伤或外科手术可能出现出血倾向,如口腔、鼻和泌尿系统等,而其他如整形外科、阑尾切除、包皮环割或皮肤切口等外科创伤极少出现过量出血^[13]。FXI 缺陷患者的临床表现使得研究人员开始关注 FXI 在凝血系统中的作用。人们首先对小鼠进行体内敲除 FXI 基因的研究,发现 FXI 基因敲除小鼠能健康存活,且繁殖力、止血功能与野生小鼠无异,并且表现出活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT) 延长而凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 正常^[14];同时在 FeCl₃ 诱导的小鼠颈总动脉血栓形成模型中,FXI 基因敲除小鼠相比野生型小鼠也具有良好的抗栓效果^[15],这为 FXI 作为出血风险小的抗栓治疗新靶点提供依据。除动物实验对于 FXI 作为新靶点的支持,临床资料显示,先天缺乏 FXI 的患者中,缺血性脑卒中及深静脉血栓 (deep venous thrombosis, DVT) 的发病率明显降低^[16],同时人们发现,高 FXI 水平人群的 DVT 发病率是其他人群的 2.2 倍,表明 FXI 水平与 DVT 的发生呈正相关^[17]。这些研究表明,FXI 是出血风险小的抗栓防治新靶点。目前已在研的 FXI 抑制剂主要包括反义寡核苷酸类 (antisense oligonucleotides, ASOs)、小分子抑制剂和蛋白类抑制剂 (含抗体和天然产物中分离的蛋白) 等。本文以 FXI 的生理结构和作用机制为基础,综述凝血因子 XI 抑制剂的相关研究进展,期望为出血风险小的抗栓新药研发提供参考。

1 凝血因子 XI 的结构

FXI 是一种产自肝脏的丝氨酸蛋白酶原,单体分子质量在 80 kD 左右,同源二聚体分子质量为 160 kD^[18]。人 FXI 和血浆前激肽酶的氨基酸序列具有 58% 的相似性^[19]。Papagrigoriou 等^[20]首次阐明全长 FXI 的晶体结构。该蛋白由二硫键连接的 2 个完全相同亚基构成,其中每条多肽链上含 607 个氨基酸。每个亚基分为重链 (N 端催化区域) 和轻链 (C 端催化区域),其中重链为 4 个 AP 结构域 (apple domain, A1~A4)^[21,22]。在凝血瀑布中,4 个 AP 结构域是 FXI 与其他分子相互作用的部位: A1 结合凝血酶; A2 结合高分子量激肽原 (HK); A3 结合凝血因子 IX (factor IX, FIX)、糖蛋白 Ib 和肝素; A4 结合活化的凝血因子 XII (FXIIa)。4 个 AP

结构域并列形成中央有空腔的杯碟状平台,这个空腔主要由碱性和带正电荷的芳香性侧链组成。基于 4 个 AP 结构域形成的“杯与碟”结构更加利于 FXI 的催化功能^[23]。

2 凝血因子 XI 的作用机制

1964 年 Macfarlane^[24]发表了他们关于凝血级联系统的假说,内外源凝血途径得以修正,人们关于凝血系统的认知得到进一步的改善。凝血级联反应的初始是由损伤血管壁暴露的组织因子 (外源途径) 或者活化的 FXII 因子 (内源途径) 触发的。外源途径中最强的激动剂是暴露在损伤血管壁上的组织因子,在病理条件下,组织因子会结合 FVIIa 形成复合物然后催化 FX 的活化,接下来 FXa 会切割凝血酶原产生凝血酶进一步引起凝血^[25]。当血液暴露在阴离子表面或者粗糙表面时,凝血酶和纤维蛋白会通过一系列反应而产生,这个过程被称为接触激活。接触激活系统中包含 2 个关键的酶原 (前激肽释放酶和 FXII) 和 1 个辅因子 HK^[26]。FXII 与多阴离子化合物结合会触发 FXII 的自我活化产生 FXIIa,FXIIa 在 HK 存在时催化前激肽释放酶 (PK) 转化为激肽释放酶 (KK),同时 KK 会活化更多的 FXII。FXIIa 在 HK 帮助下进一步活化 FXI 产生 FXIa,FXIa 可激活 FIX 产生 FIXa。最后 FIXa 偶联凝血因子 VIIIa 触发凝血因子 X 的活化和凝血酶的产生。除了 FXIIa 以外,FXI 也可以通过凝血酶来反馈激活,两者相互作用,加快形成纤维蛋白^[27]。

研究表明,FXIa 也可以水解组织因子抑制剂从而促进外源途径的激活^[28]。另外,在这个过程中,血小板也辅助 FXIa 参与止血。有趣的是,独立于 FXIIa 和接触激活途径,血小板依赖的多聚磷酸可以增强 FXI 的活化,并且短链的 polyP 能够增强 FXIa 钝化组织因子途径抑制剂 (TFPI) 的能力,这进一步证明了血小板 polyP 和 FXIa 在止血过程中的联合作用。因此,FXI 在凝血系统和血栓形成中扮演着关键的角色^[29,30]。

3 凝血因子 XI 抑制剂

市面上现有的抗凝药都有一定的不良反应,如影响正常生理止血。因此,研究人员致力于寻找能够减少血栓形成而不影响止血的安全抗凝药。在逐渐了解凝血系统后,人们发现体内 FXI 放大路径对正常止血必要性不大,但对血栓形成有更重要的作用,新抗凝方案探索的目光聚焦到 FXI。目前已发现的抑制剂主要包括 ASOs、小分子抑制剂和蛋白类抑制剂等。研究表明,注射给药 FXI ASOs 效果显著且不良反应较小,但将 FXI 的浓度降低到治疗窗的范围需要 3~4 周注射期,这一点大大限制 FXI ASOs 用于治疗已经出现的血栓或者急性血栓^[31]。小分子抑制剂可以用于治疗急性

或慢性血栓,起作用迅速但消退也迅速,需每天多次口服或注射。抗体抑制剂表现出显著的优势,药物反应迅速,且药效维持时间长,给药次数少^[32]。不同抑制剂的作用特点见表 1^[33-42]。

3.1 ASOs

反义治疗是基于碱基互补配对,高度特异的 ASOs 结合到它们的互补目标 mRNA 上,随后,目标 mRNA 选择性裂解导致靶蛋白表达减少^[43]。目前已有多种 FXI ASOs 的抗栓研究正在进行(表 2)^[33-35,44-46]。

利用 FXI ASOs 降低凝血因子 XI 表达水平的方法在动物模型中广泛应用。Zhang 等^[34]于 2010 年第 1 次发表应用反义寡核苷酸技术选择性针对 FXI 所进行的动物实验,结果显示 ASOs 在多种血栓模型中均显示出剂量依赖的抗凝活性。其抗凝效果与华法林及伊诺肝素治疗组类似,而出血低于后两者。Younis 等^[44]用 ASOs 治疗 2~5 岁的亚洲猕猴,发现在尾部部分切除术或牙龈、皮肤切开后,出血时间及出血量并没有大幅上升,而应用伊诺肝素组出血时间及出血量却较正常增加 2~3 倍。Crosby 等^[35]在狒狒体内给药 ASOs,发现血小板过度聚集导致血栓形成的比例相比对照组降低约 40%,而出血时间与对照组差异无统计学意义。Yau 等^[45]在兔子血栓模型发现 ASOs 兔子组导管出现血栓时间明显延长,约为对照组的 2 倍。在 4 周龄雄性 *ApoE* 基因敲除的 C57BL/6 小鼠体内给药 ASOs,给药组相比对照组能有效降低血栓形成及纤维蛋白沉积,而两组的出血时间基本相同^[46]。

除了动物实验,健康人安全试验也证明 FXI 特异性 ASOs 可引起 FXI 活性显著降低。Büller 等^[33]利用第二代 FXI ASOs (ISIS416858) 对 300 例初次进行单侧全膝关节置换术的患者进行了临床试验。患者们被随机分配到 ASOs 给药组 (200 mg 及 300 mg 剂量组) 和伊诺肝素组 (40 mg, 每天 1 次)。应用 300 mg ASOs 给药组的抗栓效果和安全性均优于伊诺肝素处理组。而伊诺肝素处理组注射部位相关不良反应的发生率 (3%) 低于 200 mg ASOs 给药组 (22%, $P < 0.001$) 及 300 mg ASOs 给药组 (32%, $P < 0.001$)。

应用反义寡核苷酸技术抑制 FXI 的表达,尤其是在动物模型中,具有明显抗凝作用且不增加出血风险,该结果在初步的临床试验中也得到验证。但是 FXI ASOs 的应用仍然存在一些不容忽视的问题,如怎样确定最佳的起效浓度来抑制血栓形成而不显著增加出血风险、注射点相关不良反应的发生和达到治疗窗的给药时间过长等。因此,FXI ASOs 用于治疗血栓性疾病还需要更多前瞻性临床试验及动物实验来进一步验证。

3.2 小分子抑制剂

随着对 FXIa 蛋白结构的揭示以及抗血栓功能研究的不断深入,目前已设计和合成出多种结构不同的 FXIa 抑制剂,以下列举几类重要的小分子抑制剂。

3.2.1 共价抑制剂 FXIa 上保守的 Ser195 已被证明是活性必需氨基酸^[47]。Lin 等^[48]报告的一系列酮噻唑类化合物,如化合物 1 对 FXIa 的半数抑制浓度 (half

Table 1 Comparison of the characteristic of the various factor XI (FXI) directed anticoagulant therapies. ASO: Antisense oligonucleotides

Characteristic	ASOs ^[33-35]	Small molecular ^[36-40]	Antibodies ^[41,42]
Mechanism	Reduce hepatic synthesis of FXI	Reversible active site inhibition	Bind and block its activation FXI or FXIa
Administration	Subcutaneous	Oral or intravenous	Subcutaneous or intravenous
Onset of action	Slow	Rapid	Rapid
Offset of action	Slow	Rapid	Slow
Dosing frequency	High	High	Low
Indications	Chronic	Acute or chronic	Acute or chronic

Table 2 Synthesis of studies on antisense therapy against coagulation factor XI

Author	Cohort	Dosage	Maximum plasma factor XI reduction	Clinical endpoint
Zhang et al ^[34]	Mice	50 g·kg ⁻¹	Activity: >90%; concentration: >90%	Antithrombotic activity was similar to that of warfarin or enoxaparin; lower bleeding than enoxaparin or warfarin
Younis et al ^[44]	Cynomolgus monkey	4-40 mg·kg ⁻¹	Activity: 75%	None
Crosby et al ^[35]	Baboon	25 mg·kg ⁻¹	Activity: 70%; concentration: 70%	Platelet accumulation in propagated thrombus reduced by 40%; no major bleeding compared with placebo
Yau et al ^[45]	Rabbit	15 mg·kg ⁻¹	Activity: 99%; concentration: 6%	Prolongation of mean time of jugular vein catheter occlusion
van Montfoort et al ^[46]	Mice	50 mg·kg ⁻¹	Activity: 64%	Decreased thrombus propagation and fibrin deposition after carotid plaque rupture; no major bleeding compared with placebo
Büller et al ^[33]	Human	200-300 mg	Activity (200 mg): 59% Activity (300 mg): 78%	The antithrombotic effect and safety of 300 mg ASO group were better than enoxaparin; marginally but not significantly lower bleeding than enoxaparin

maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 达到 $12 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其选择性高于凝血酶 100 倍, 高于 FXa 1 000 倍, 在大鼠血栓模型中也确有效果。百时美施贵宝公司报告的 β -内酰胺类化合物 BMS-262084 (化合物 **2**^[36,49], $IC_{50} = 2.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 是一种有效的共价 FXIa 抑制剂。与其他相关丝氨酸蛋白酶 (如凝血酶、FXa、FIXa、FXIIa、TF/VIIa、组织纤溶酶原激活剂、尿激酶和纤溶酶) 相比, 化合物 **2** 对 FXIa 的选择性提高了 70 倍以上, 但对类胰蛋白酶和胰蛋白酶选择性不好。同时在大鼠或兔的血栓形成模型中均能观察到化合物 **2** 的抗血栓作用。Buchanan 等^[50]对海绵 *marine sponge* 中分离并提取出生物活性溴酚生物碱 clavatidine A (化合物 **3**, $IC_{50} = 1.3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 也是 FXIa 的共价抑制剂。化合物 **1**、**2** 和 **3** 结构见图 1。

3.2.2 变构抑制剂 变构抑制剂的特点是不与 FXIa 催化区的活性位点结合, 其通过与 FXIa 上多个阴离子变构位点结合, 从而达到抑制作用。Al-Horani 等^[37]已经发表了一系列的硫酸化五吡喃葡萄糖苷作为 FXIa 的变构抑制剂, 其中化合物 **4** 的 K_i 为 $521 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 选择性是其他相关酶的 200 倍。Argade 等^[51]报告的变构单硫苯并咪唑二聚体和三聚体也是 FXIa 抑制剂。其中化合物 **5** 可与 FXIa 的 Apple 3 域结合, 其 IC_{50} 达到 $820 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。目前已公开 FXIa 变构抑制剂没有能达到与可逆抑制剂同样的活性水平。然而, 变构抑制为抑制 FXIa 提供了一种替代方法, 为进一步研究更加有效的小分子抑制剂提供了可能。化合物 **4** 和 **5** 结构见图 2。

3.2.3 非循环可逆抑制剂 非循环可逆抑制剂是 FXI 小分子抑制剂中数量最多的, 主要包括苯丙氨酸类、四氢喹啉类等。

Bayer 公司发现苯丙氨酸类衍生物对 FXIa 具有抑制活性^[52], 化合物 **6** 和 **7** 对 FXIa 的抑制活性较好 (IC_{50} 分别为 0.9 和 $0.34 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。该类化合物预期可用于

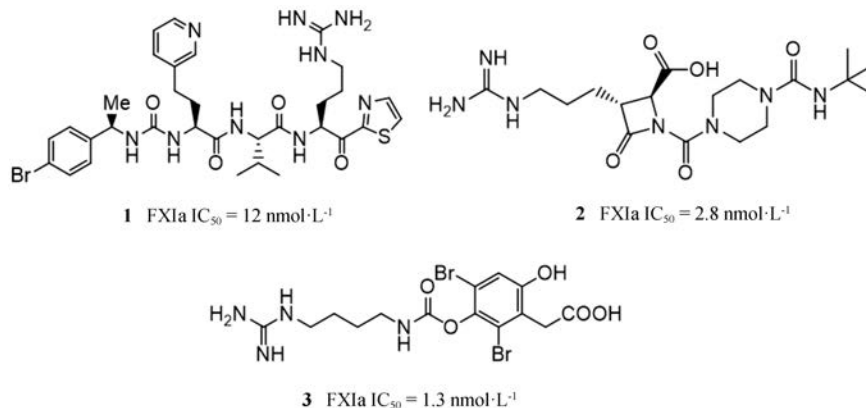
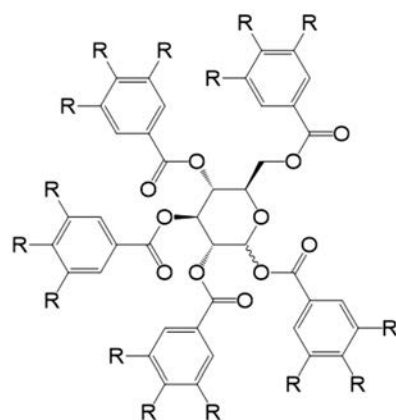
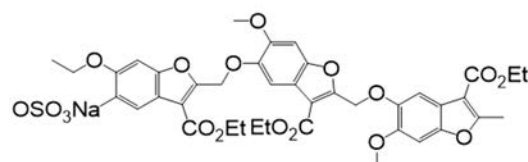


Figure 1 Covalent inhibitors of FXIa. IC_{50} : Half maximal inhibitory concentration



4 R=OSO₃Na or OH FXIa $K_i = 521 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$



5 FXIa $IC_{50} = 820 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$

Figure 2 Allosteric inhibitors of FXIa. K_i : Inhibition constant

治疗高纤维蛋白溶解性病症、心脏手术失血和器官移植等。

2014 年 BMS 公司通过筛选发现四氢异喹啉类 FXIa 抑制剂。BMS-962212 (化合物 **8**^[53,54]) 是 BMS 公司在 2017 年报道的一类可逆的并具有高度选择性的 FXIa 抑制剂。BMS-962212 具有良好的 FXIa 结合亲和力 ($K_i = 0.71 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、抗凝血活性 (APTT $EC_{1.5} = 0.30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和大于 3 000 倍的选择性 (相对于广泛的丝氨酸蛋白酶, 如 FVIIa、FIXa、FXa、FXIIa、凝血酶、胰蛋白酶、活化蛋白 C、纤溶酶、TPA、尿激酶和糜蛋白酶)。在家兔动静脉旁路分流模型中效果显著, 对血栓形成有 83% 的抑制作用 (剂量为 $0.23 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 静脉推注 + $1.55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 静脉滴注)。在兔表皮出血模型

中, 2 倍于动静脉旁路分流剂量的情况下, 出血时间没有增加。与安慰剂相比, 单独使用或与阿司匹林合用时, 出血时间未见增加, 耐受性良好且无严重不良反应。化合物 **6**、**7** 和 **8** 结构见图 3。

3.2.4 大环类抑制剂 大环已被公认为药物开发中的一个重要结构类别, 与相应的无环前体相比, 大环可改善一个或多个结合亲和力、选择性、代谢稳定性和药代动力学特性。BMS 公司基于无环苯并咪唑化合物 **9** 的 X 射线晶体结构, 设计了一系列新的大环 FXIa 抑制剂如化合物 **10** 和 **11**, 他们对 FXIa 亲和力强 ($K_i = 0.16 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $K_i = 0.03 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 且两种化合物均具有良好的 APTT 效价 ($\text{EC}_{1.5X} = 0.27$ 和 $0.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[55]。虽然大环酰胺键对 FXIa 的抑制作用至关重要, 但也导致了不良的药代动力学特征, 大环 FXIa 抑制剂的优化以解决口服生物利用度差的问题将在后续研究中作为重点。化合物 **9**、**10** 和 **11** 结构见图 4。

3.2.5 结构未披露的抑制剂 尚有几个结构未公布的 FXIa 抑制剂^[47]。ONO 制药公司披露了化合物 ONO-8610539^[47], 它是一种可注射的选择性小分子 FXIa 抑制剂 ($K_i = 0.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。据报道, ONO-8610539 能够抑制家兔和猴的血栓形成, 而不影响失血量。另一种化合物 ONO-7750512^[47], 不仅具有良好的 FXIa 抑制活性 ($K_i = 3.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 而且在大鼠中口服生物利用度良好 ($F = 22\%$)。在深静脉血栓形成模型中, ONO-775051 2 在 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 剂量下显著抑制血栓形成,

在兔耳出血模型中未观察到出血增加。同时还提供了口服生物可利用小分子 ONO-5450598^[47] 的数据, 该化合物的 FXIa $K_i = 2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 并且在多个物种中显示出较高的口服生物利用度。在猴血栓模型中, 它在高于 $0.097 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的静脉注射剂量下抑制血栓形成, 并且在口服 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量的猴指甲切开模型中没有延长出血时间。日本住友制药有限公司报道的 DSR 130787 是一个口服的 FXIa 抑制药物, 其 IC_{50} 值小于 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在兔体内的抗栓效果与 FXa 抑制剂利伐沙班相当, 但出血风险并不显著^[47]。

多项研究显示, FXIa 小分子抑制剂在治疗血栓疾病中具有较好的抗栓效果且相对较低的出血风险, 但仍需解决其代谢过快和多次给药等问题。相信随着对 FXI 蛋白结构、作用机制、生物学活性测试方法等方面研究的深入, FXIa 小分子抑制剂的研究会得以快速发展。

3.3 抗体

本部分将列举已报道的 FXI 抗体及其药理学研究结果, 部分抗体已进入临床研究 (表 3)^[41,42,56-60]。

Gruber 等^[56]首先在狒狒动静脉血栓模型中, 发现抗人 FXI 的多克隆抗体具有抗栓效果, 延长 APTT 可与肝素相当, 但出血时间明显缩短。因多克隆抗体专一靶向效果不好, 后续人们将研究方向更多专注于抑制 FXI 不同活性位点的单克隆抗体。如选择性作用于 FXI/FXIa 的轻链而抑制 FXa 和 FXIa 活化的抗体

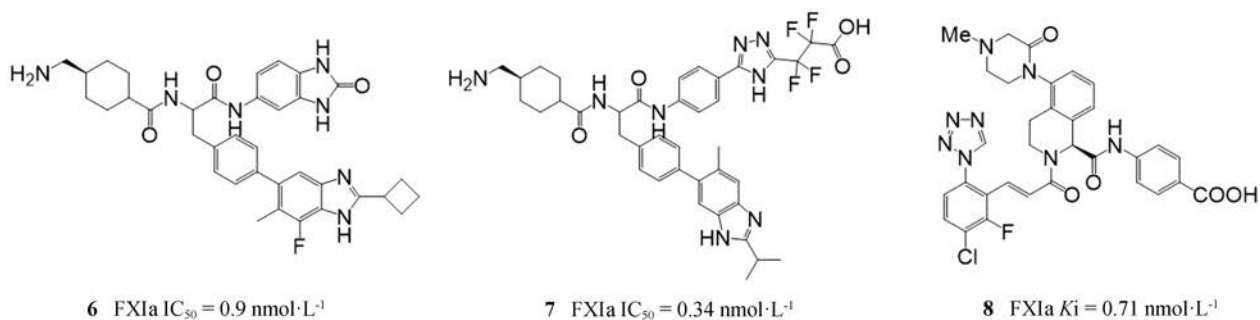


Figure 3 Acyclic reversible FXIa inhibitors

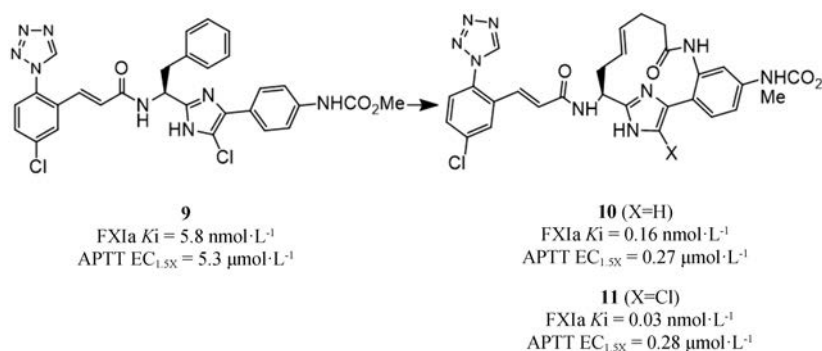


Figure 4 Macrocyclic FXIa inhibitors

XI-5108^[57]; 结合 FXI A3 结构域的抗体 aXIMab^[41]; 作用于 FXI A2 结构域的抗体 14E11^[42]。另外, David 等^[58]设计合成了一系列人免疫球蛋白 Gs (IgGs), 能抑制 FXIa 活性, 但不与 FXI 酶原或其他凝血蛋白酶结合, 其中效果最强的 IgGs 是 C24 和 DEF。为预防抗体活性过剩, 研究人员还设计合成了一种逆转剂 IgG, 可在人血浆和兔体内快速逆转 DEF 活性。van Montfoort 等^[59]设计了两种抗人 FXI 的抗体 α FXI-175 和 α FXI-203, 其中 α FXI-175 可与 FXI 的 A4 结构域结合, α FXI-203 与 A2 结构域结合。前述几种针对 FXI 靶点的抗体能抑制鼠、兔和狒狒等动物的血栓形成, 也均有出血风险小的优势。

目前已有两种抗体进入临床 II 期试验, 分别是拜耳制药研发的 FXIa 抗体 BAY121379^[60]和诺华制药在研的 FXI 抗体 MAA868^[60]。

利用专一性抗体可使 FXI 的活性大大下降, 能在动物或人体内显著抑制血栓形成, 但单抗往往价格昂贵, 且各种抗体的抗栓阈值还有待明确, 使得这些抗体目前均还处于临床前或候选药物研究阶段。同时, 过量的抗体也需要适合的逆转剂与之配合。

3.4 天然产物中分离的蛋白抑制剂

除上文中提及的 FXI 抗体, 尚有很多 FXIa 的蛋白抑制剂从天然产物中分离得到。如 Ma 等^[61]从蝙蝠唾液腺中对比并重组表达得到蛋白 desmolaris, 体外活性显示该蛋白是一个 FXIa 缓慢的紧密的非竞争性抑制剂 ($K_i = 12.35 \pm 1.09 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。从带状金环蛇 *Bungarus*

fasciatus 的毒液分离得到一个特殊的 FXIa 抑制剂, 名叫 fasxiator, 经重新构建后得到的突变体 N17R 和 L19E 在 FeCl_3 诱导的血栓形成模型中可延长小鼠颈动脉闭塞时间^[62]。另外, 微管连接蛋白酶 2 的 kunitz 蛋白酶抑制剂 (kunitz protease inhibitor, KPI) 结构域 (57 个氨基酸) 也被发现是强效的专一 FXIa 抑制剂 ($K_i = 0.5 \pm 1.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[63]。上述几种蛋白均能在动物体内较好地抑制血栓的形成且出血风险较低。Gan 等^[64]从线虫 *Ancylostoma duodenale* 中克隆表达并确证一个新的抗凝蛋白—AduNAP4。该蛋白是一个 FXa ($K_i = 7.34 \pm 1.74 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 FXIa ($K_i = 42.45 \pm 3.25 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 抑制剂, 可显著延长 APTT, 但并未进行动物体内实验。天然产物分离得到的蛋白抑制剂的具体信息见表 4^[61–66]。

研究人员已从多种天然来源的物质中分离得到 FXI 的抑制蛋白, 不仅能够诠释天然产物如蛇毒的抗凝机制, 并且对蛋白进行结构优化或改造, 也为新的 FXI 蛋白抑制剂的研究发展提供了一条新的思路。

4 结语与展望

先天缺乏 FXI 的患者患缺血性脑卒中及 DVT 的比率明显降低, 且一般无自发性出血, 提示体内 FXI 对正常止血必要性不大, 但对血栓形成有更为重要的作用, 多项研究表明抑制 FXI 活性可明显降低血栓形成且出血风险较小^[67]。因此, FXI 是研究新抗血栓药物的重要靶点。

目前已有多种抑制剂在研, ASOs 效果显著且出血

Table 3 Comparison of the features of the FXI antibodies. APTT: Activated partial thromboplastin time; PT: Prothrombin time; BT: Bleeding time; DVT: Deep venous thrombosis; TKA: Total knee arthroplasty

Compound	Feature	<i>In vivo</i> analyses	Reference
aFXI	Prolongs the APTT, but the PT and BT are unaffected.	Reduces intraluminal thrombogenesis in baboons arterio-venous shunts model.	[56]
XI-5108	Binds selectively to human and rabbit FXI and not to other coagulation factors, increases APTT by more than two-fold, but does not affect PT.	Inhibits arterial thrombus formation in rabbit iliac arteries and rabbit models of DVT.	[57]
aXIMAb	Binds to FXI/XIa apple 3 domain. Inhibits FXI activation and FXIa activation of factor IX.	Inhibits thrombus formation in baboon arterio-venous shunt model.	[41]
14E11	Binds to FXI apple 2 domain. Inhibits FXI activation by FXIIa, but does not affect FXI activation by thrombin, or FXIa activation of factor IX.	Inhibits thrombus formation in baboon vascular graft model, and consumptive coagulopathy in a mouse peritonitis model.	[42]
C24 and DEF	Block FXIa active-site function but do not bind FXI zymogen or other coagulation proteases.	Prevent FeCl_3 -induced carotid artery occlusion in FXI-deficient mice reconstituted with human FXI and in thread-induced venous thrombosis in rabbits.	[58]
α FXI-175 and α FXI-203	Binds to FXI apple domain 4 and domain 2, respectively.	Inhibit FeCl_3 -induced inferior vena cava thrombosis model in mice. α FXI-175 inhibits thrombin generation with lower levels of tissue factor.	[59]
BAY 1213790	Binds to the FXIa catalytic domain.	Reduces thrombus weight in rabbit FeCl_3 arterial thrombosis model. No effect on bleeding times. Phase I studies in healthy adult males. Phase II trials ongoing in TKA.	[60]
MAA868	Binds to the FXIa catalytic domain.	Prolongs APTT in primates for >30 days. Phase II studies announced in atrial fibrillation and TKA.	[60]

Table 4 Comparison of the characteristics of the FXI protein inhibitors

Compound	Source	Structure	Molecularweight (AA)	Inhibition type	Animal experiment	Administration route (dosage)	Ref.
Desmolaris	<i>Desmodus rotundus</i>	Kunitz-type protease inhibitor	21.5 kD (189 AA)	A slow, tight, and noncompetitive inhibitor of FXIa	FeCl ₃ -induced carotid artery thrombus in BALB/c mice	Tail vein injection 0.01 or 0.1 mg·kg ⁻¹	[61]
Fasxiator	<i>Bungarus fasciatus</i>	Kunitz-type protease inhibitor	7 529.40 ± 0.85 D (62 AA)	High selectivity, slow-type inhibitor of FXIa	FeCl ₃ -induced carotid artery thrombus in BALB/c mice	Tail vein injection 0.2 mg per mice 0.3 mg per mice	[62]
Kunitz protease inhibitor (KPI) domain of protease nexin-2 (PN2)	<i>Homo sapiens</i>	Kunitz-type protease inhibitor	6.3 kD (57 AA)	Highly specific inhibitor of FXIa	Murine model of FeCl ₃ -induced carotid artery thrombosis	Tail vein injection 0.2 mL per mice	[63] [65,66]
AduNAP4	<i>Ancylostoma duodenale</i>		9437.7 D (81 AA)	An inhibitor of both FXa and FXIa			[64]

风险较小,但起效慢且不易控制,注射点可能出现不良反应等;小分子抑制剂作用迅速但半衰期较短,需每天多次口服或注射,患者依从性较差;抗体类抑制剂在预防和治疗急性或慢性血栓性疾病中起效迅速且作用时间长,临床使用可靠,但其成本较高,仍需考虑成本-效益比率。我国具有丰富的天然药物资源,研究人员已从多种天然产物中分离得到许多抗栓或抗凝的组分,推动抗栓药的发展。如从*Hirudo medicinalis*中分离得到的凝血酶抑制剂水蛭素^[68],但水蛭素是凝血酶的不可逆抑制剂。美国Medicines制药公司根据水蛭素蛋白序列设计合成了凝血酶可逆抑制剂比伐卢定,用于经皮冠状动脉成形术患者^[69]。因此,进一步从天然药物资源中寻找以FXI为靶点的抗血栓药物,并可以依据其活性位点进行改造,研究出更加安全、有效且应用范围更广的抗血栓药物,将可能对血栓性疾病的防治发挥重要的作用。

References

- [1] Chen WW, Gao RL, Liu LS, et al. Summary of China cardiovascular disease report 2017 [J]. Chin Circ J (中国循环杂志), 2017, 33: 1-8.
- [2] Mega JL, Simon T. Pharmacology of antithrombotic drugs: an assessment of oral antiplatelet and anticoagulant treatments [J]. Lancet, 2015, 386: 281-291.
- [3] Zhu H, Lv YJ, Han XW, et al. Comparison of structural characteristics and anticoagulation activity of enoxaparin sodium with different degree of 1,6-anhydro derivatives [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2014, 49: 1049-1053.
- [4] Ali MR, Salim Hossain M, Islam MA, et al. Aspect of thrombolytic therapy: a review [J]. ScientificWorldJournal, 2014, 2014: 586510.
- [5] Balamuthusamy S, Arora R. Hematologic adverse effects of clopidogrel [J]. Am J Ther, 2007, 14: 106-112.
- [6] Elcioglu OC, Ozkok A, Akpinar TS, et al. Severe thrombocytopenia and alveolar hemorrhage represent two types of bleeding tendency during tirofiban treatment: case report and literature review [J]. Int J Hematol, 2012, 96: 370-375.
- [7] Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials [J]. Lancet, 2014, 383: 955-962.
- [8] Steiner T, Weitz JI, Veltkamp R. Anticoagulant-associated intracranial hemorrhage in the era of reversal agents [J]. Stroke, 2017, 48: 1432-1437.
- [9] Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation [J]. N Engl J Med, 2009, 361: 1139-1151.
- [10] Patel MR, Mahaffey KW, Garg J, et al. Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation [J]. N Engl J Med, 2011, 365: 883-891.
- [11] Granger CB, Alexander JH, McMurray JJ, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation [J]. N Engl J Med, 2011, 365: 981-992.
- [12] Rosenthal RL, Dreskin OH, Rosenthal N. New hemophilia-like disease caused by a third plasma thromboplastin factor [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1953, 82: 171-174.
- [13] Seligsohn U. Factor XI deficiency in humans [J]. J Thromb Haemost, 2009, 7 Suppl 1: 84-87.
- [14] Renne T, Oschatz C, Seifert S, et al. Factor XI deficiency in animal models [J]. J Thromb Haemost, 2009, 7 Suppl 1: 79-83.
- [15] Wang X, Cheng Q, Xu L, et al. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice [J]. J Thromb Haemost, 2005, 3: 695-702.
- [16] Salomon O, Steinberg DM, Koren-Morag N, et al. Reduced incidence of ischemic stroke in patients with severe factor XI deficiency [J]. Blood, 2008, 111: 4113-4117.

- [17] Meijers JC, Tekelenburg WL, Bouma BN, et al. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342: 696-701.
- [18] Osterud B, Bouma BN, Griffin JH. Human blood coagulation factor XI, purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XII [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252: 6432-6437.
- [19] Fujikawa K, Chung DW, Hendrickson LE, et al. Amino acid sequence of human factor XI, a blood coagulation factor with four tandem repeats that are highly homologous with plasma prekallikrein [J]. *Biochemistry*, 1986, 25: 2417-2424.
- [20] Papagrigoriou E, McEwan PA, Walsh PN, et al. Crystal structure of the factor XI zymogen reveals a pathway for transactivation [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13: 557-558.
- [21] McMullen BA, Fujikawa K, Davie EW. Location of the disulfide bonds in human coagulation factor XI: the presence of tandem apple domains [J]. *Biochemistry*, 1991, 30: 2056-2060.
- [22] Gailani D, Smith SB. Structural and functional features of factor XI [J]. *J Thromb Haemost*, 2009, 7: 75-78.
- [23] Emsley J, McEwan PA, Gailani D. Structure and function of factor XI [J]. *Blood*, 2010, 115: 2569-2577.
- [24] Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier [J]. *Nature*, 1964, 202: 498-499.
- [25] Schumacher WA, Luetzgen JM, Quan ML, et al. Inhibition of factor XIa as a new approach to anticoagulation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: 388-392.
- [26] Long AT, Kenne E, Jung R, et al. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity [J]. *J Thromb Haemost*, 2016, 14: 427-437.
- [27] Fredenburgh JC, Gross PL, Weitz JI. Emerging anticoagulant strategies [J]. *Blood*, 2017, 129: 147-154.
- [28] Puy C, Rigg RA, McCarty OJ. The hemostatic role of factor XI [J]. *Thromb Res*, 2016, 141: S8-S11.
- [29] Geng Y, Verhamme IM, Smith SB, et al. The dimeric structure of factor XI and zymogen activation [J]. *Blood*, 2013, 121: 3962-3969.
- [30] Choi SH, Smith SA, Morrissey JH. Polyphosphate is a cofactor for the activation of factor XI by thrombin [J]. *Blood*, 2011, 118: 6963-6970.
- [31] Chen YH, Liu D, Peng LF. Research progress of coagulation factor XI as a new target of anti-thrombotic therapy [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2015, 31: 619-622.
- [32] Weitz JI. Factor XI and factor XII as targets for new anticoagulants [J]. *Thromb Res*, 2016, 141: S40-S45.
- [33] Büller HR, Bethune C, Bhanot S, et al. Factor XI antisense oligonucleotide for prevention of venous thrombosis [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372: 232-340.
- [34] Zhang H, Lowenberg EC, Crosby JR, et al. Inhibition of the intrinsic coagulation pathway factor XI by antisense oligonucleotides: a novel antithrombotic strategy with lowered bleeding risk [J]. *Blood*, 2010, 116: 4684-4692.
- [35] Crosby JR, Marzec U, Revenko AS, et al. Antithrombotic effect of antisense factor XI oligonucleotide treatment in primates [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33: 1670-1678.
- [36] Wong PC, Crain EJ, Watson CA, et al. A small-molecule factor XIa inhibitor produces antithrombotic efficacy with minimal bleeding time prolongation in rabbits [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2011, 32: 129-137.
- [37] Al-Horani RA, Desai UR. Designing allosteric inhibitors of factor XIa. Lessons from the interactions of sulfated pentagalloylglucopyranosides [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 4805-4818.
- [38] Al-Horani RA, Ponnusamy P, Mehta AY, et al. Sulfated pentagalloylglucoside is a potent, allosteric, and selective inhibitor of factor XIa [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 867-878.
- [39] Deng H, Bannister TD, Jin L, et al. Synthesis, SAR exploration, and X-ray crystal structures of factor XIa inhibitors containing an alpha-ketothiazole arginine [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 3049-3054.
- [40] Quan ML, Wong PC, Wang C, et al. Tetrahydroquinoline derivatives as potent and selective factor XIa inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 955-969.
- [41] Tucker EI, Marzec UM, White TC, et al. Prevention of vascular graft occlusion and thrombus-associated thrombin generation by inhibition of factor XI [J]. *Blood*, 2009, 113: 936-944.
- [42] Cheng Q, Tucker EI, Pine MS, et al. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation *in vivo* [J]. *Blood*, 2010, 116: 3981-3989.
- [43] Bennett CF, Swayze EE. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2010, 50: 259-293.
- [44] Younis HS, Crosby J, Huh JL, et al. Antisense inhibition of coagulation factor XI prolongs APTT without increased bleeding risk in cynomolgus monkeys [J]. *Blood*, 2012, 119: 2401-2408.
- [45] Yau JW, Liao P, Fredenburgh JC, et al. Selective depletion of factor XI or factor XII with antisense oligonucleotides attenuates catheter thrombosis in rabbits [J]. *Blood*, 2014, 123: 2102-2107.
- [46] van Montfoort ML, Kuijpers MJ, Knaup VL, et al. Factor XI regulates pathological thrombus formation on acutely ruptured atherosclerotic plaques [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34: 1668-1673.
- [47] Quan ML, Pinto DJP, Smallheer JM, et al. Factor XIa inhibitors as new anticoagulants [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 7425-7447.
- [48] Lin J, Deng HF, Jin L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of peptidomimetic inhibitors of factor XIa as novel anticoagulants [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 7781-7791.
- [49] Schumacher WA, Seiler SE, Steinbacher TE, et al. Antithrombotic and hemostatic effects of a small molecule factor XIa inhibitor in rats [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 570: 167-174.
- [50] Buchanan MS, Carroll AR, Wessling D, et al. Clavatadine A, a natural product with selective recognition and irreversible inhibi-

- tion of factor XIa [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 3583-3587.
- [51] Argade MD, Mehta AY, Sarkar A, et al. Allosteric inhibition of human factor XIa: discovery of monosulfated benzofurans as a class of promising inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 3559-3569.
- [52] Wang L, Yang H, Zhao LH, et al. Research progress in small molecular inhibitors of coagulation factor XIa [J]. *Prog Pharm Sci (药学进展)*, 2018, 42: 62-68.
- [53] Pinto DJP, Orwat MJ, Smith LM, et al. Discovery of a parenteral small molecule coagulation factor XIa inhibitor clinical candidate (BMS-962212) [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 9703-9723.
- [54] Perera V, Luetzgen JM, Wang Z, et al. First-in-human study to assess the safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of BMS-962212, a direct, reversible, small molecule factor XIa inhibitor in non-Japanese and Japanese healthy subjects [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2018, 84: 876-887.
- [55] Corte JR, Fang T, Osuna H, et al. Structure-based design of macrocyclic factor XIa inhibitors: discovery of the macrocyclic amide linker [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 1060-1075.
- [56] Gruber A, Hanson SR. Factor XI-dependence of surface- and tissue factor-initiated thrombus propagation in primates [J]. *Blood*, 2003, 102: 953-955.
- [57] Yamashita A, Nishihira K, Kitazawa T, et al. Factor XI contributes to thrombus propagation on injured neointima of the rabbit iliac artery [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4: 1496-1501.
- [58] David T, Kim YC, Ely LK, et al. Factor XIa-specific IgG and a reversal agent to probe factor XI function in thrombosis and hemostasis [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 353ra112.
- [59] van Montfoort ML, Knaup VL, Marquart JA, et al. Two novel inhibitory anti-human factor XI antibodies prevent cessation of blood flow in a murine venous thrombosis model [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 110: 1065-1073.
- [60] Tillman BF, Gruber A, McCarty OJT, et al. Plasma contact factors as therapeutic targets [J]. *Blood Rev*, 2018, 32: 433-448.
- [61] Ma D, Mizurini DM, Assumpcao TC, et al. Desmolaris, a novel factor XIa anticoagulant from the salivary gland of the vampire bat (*Desmodus rotundus*) inhibits inflammation and thrombosis *in vivo* [J]. *Blood*, 2013, 122: 4094-4106.
- [62] Chen W, Carvalho LP, Chan MY, et al. Fasxiator, a novel factor XIa inhibitor from snake venom, and its site-specific mutagenesis to improve potency and selectivity [J]. *J Thromb Haemost*, 2015, 13: 248-261.
- [63] Wu W, Li H, Navaneetham D, et al. The kunitz protease inhibitor domain of protease nexin-2 inhibits factor XIa and murine carotid artery and middle cerebral artery thrombosis [J]. *Blood*, 2012, 120: 671-677.
- [64] Gan W, Deng L, Yang C, et al. An anticoagulant peptide from the human hookworm, *Ancylostoma duodenale* that inhibits coagulation factors Xa and XIa [J]. *FEBS Lett*, 2009, 583: 1976-1980.
- [65] Navaneetham D, Jin L, Pandey P, et al. Structural and mutational analyses of the molecular interactions between the catalytic domain of factor XIa and the Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin 2 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 36165-36175.
- [66] Navaneetham D, Sinha D, Walsh PN. Mechanisms and specificity of factor XIa and trypsin inhibition by protease nexin 2 and basic pancreatic trypsin inhibitor [J]. *J Biochem*, 2010, 148: 467-479.
- [67] Yu HW, Ye H. Coagulation factor XI--a new target for antithrombotic therapy [J]. *Prac J Med Pharm (实用医药杂志)*, 2014, 31: 170-172.
- [68] Corral-Rodriguez MA, Macedo-Ribeiro S, Pereira PJ, et al. Leech-derived thrombin inhibitors: from structures to mechanisms to clinical applications [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 3847-3861.
- [69] Warkentin TE, Greinacher A, Koster A. Bivalirudin [J]. *Thromb Haemost*, 2008, 99: 830-839.