

化学药品 1 类

内源性凝血通路（FVIIIa）抑制剂 F9-2002



南京中瑞药业有限公司

2023 年 1 月

内源性凝血通路（FVIIIa）抑制剂 F9-2002

一、研究背景

血栓性疾病又称血栓栓塞性疾病，是一类由血栓形成和血栓栓塞两种病理过程所引起的疾病的统称，具有高发病率、高致残率和高致死率的特点，严重危害着人类的健康而且也带来了沉重的经济和社会负担。心血管疾病的三大杀手——心肌梗死、脑卒中和静脉血栓栓塞症，均与之密切相关。在全球范围内，每四例死亡中，就会有一例与之相关。

近年来，随着老龄化趋势的加剧，血栓性疾病在我国的发病率不断上升，并且呈年轻化趋势。2011 年首届中国神经介入大会发布的报告称，脑卒中已超越冠心病、恶性肿瘤等疾病成为威胁我国居民健康的“头号杀手”。2013 年国家卫生计生委脑卒中防治工程委员会(脑防委)的统计数据显示，我国 40 岁以上罹患脑卒中的人群高达 1036 万人，65 岁以下人群约占 50%，其中 10~15% 的患者年龄甚至在 45 岁以下。

鉴于血栓性疾病具有发病急、后果严重的特点，服用抗凝血药物抑制血栓的形成是应对此类疾病获益最高、风险最小的策略。近年来已经有 4 个新型的口服抗凝血药物上市(表 1)，它们与传统口服抗凝药华法林的药效相近甚至略优，但起效更快、出血风险更低、不需要频繁监测凝血功能并调整剂量以及受食物和药物影响更小，迅速获得了医学界的认可。欧洲各医学会的指南推荐对于房颤卒中预防的最佳

选择是新型口服抗凝药，美国指南推荐对于 INR 难以维持在目标水平的患者首选新型口服抗凝药，2015 版《中国心房颤动患者卒中防治指导规范》对新型抗凝药的推荐级别为 I 类推荐，B 级证据。

虽然已上市的抗凝血药物较华法林的出血风险更低却不能完全避免出血^[1]，促使制药公司开发特异性的拮抗剂，但这导致患者经济负担增加的同时还带来新的药物不良反应(表 1)。因此，开发新型、安全性更高的抗凝血药物对与患者仍具有重要的价值。

表 1. 抗凝血药物作用机制及拮抗剂

药品名	作用机制	拮抗剂
肝素(iv)	促进抗凝血酶 III 对凝血因子 IIa、XIIa、XIa、IXa、Xa 的灭活	鱼精蛋白
华法林	抑制维生素 K 依赖性凝血因子 II、VII、IX 和 X 的功能化	维生素 K ₁
达比加群酯	凝血酶(FIIa)抑制剂	Praxbind (idarucizumab) ^[2]
利伐沙班	Xa 因子(FXa)抑制剂	Andexanet ^[3]
阿哌沙班	Xa 因子抑制剂	
依度沙班	Xa 因子抑制剂	

我公司在研发脑卒中新药泰瑞拉奉的过程中，认识到预防血栓形成对降低卒中发生的重要价值。调查发现，临床上血栓性疾病主要是由内源性凝血途径造成的，而市售抗凝药物均是作用于下游的凝血共同通路，这可能是导致它们引起出血风险的诱因。研究还表明，由于凝血过程存在逐级放大的级联正反馈效应，所以对上游位点进行抑制将获得更好的抗凝效果、更宽的治疗窗口和更低的出血风险，这在 FXa 抑制剂和凝血酶抑制剂的开发中已经得到证实^[4, 5]。因此，开发

选择性抑制内源性凝血通路的新型抗凝药物有助于对血栓性疾病的精准化治疗。

二、凝血机制简介

在凝血通路中，从凝血启动到形成凝血酶之前，依据 X 因子被激活的路径不同，凝血过程分为外源性和内源性两个途径。

外源性凝血途径是指凝血启动子(即组织因子，TF)位于血管外，血管壁由于外伤破裂导致组织因子进入血液，激活凝血 VII 因子并形成 FVIIa/TF 复合物进而激活 X 因子，引发下游凝血过程。与外源性凝血途径不同，内源性凝血途径中参与凝血过程的凝血因子全部来自于血管内，为血液的单独过程。内源性凝血途径中的凝血因子不仅能单独引发内源性凝血过程，而且是外源性凝血过程迅速扩增放大的必需因素。

三、市场价值分析

静脉血栓的临床发病率比动脉血栓多 4 倍，且主要是由内源性凝血途径造成的，因此选择性内源性凝血抑制剂可以为多种血栓性疾病提供更加安全有效的治疗选择，特别是心肌梗死、缺血性心脏病，以及如经皮冠状动脉介入治疗、血液透析、血液分离、心脏瓣膜置换术等需要体外循环支持系统的抗凝治疗^[6]。

四、F9-2002 研究进展

4.1、体外抗凝活性测试

凝血酶原时间(PT)是反映外源性凝血是否正常的主要指标,而活化部分凝血酶原时间(APTT)则主要反映内源性凝血是否正常。在体外实验中(表 2 和 3),利伐沙班对 PT 与 APTT 的均有明显作用,而化合物 F9-2002 对 APTT 的延长与利伐沙班相当,而对 PT 基本无影响,表明 F9-2002 能够选择性抑制内源性凝血机制的发生。

表 2: F9-2002 不同浓度 PT 和 APTT 结果

组别	浓度 nM	PT(s)	APTT(s)
溶媒对照	—	6.6±0.1	18.8±0.4
	5	9.7±0.4	30.3±2.3*
F9-2002	10	7.0±2.0	30.6±7.7*
	20	8.2±0.6	29.2±2.7*
利伐沙班	10	24.5±1.0*	24.6±4.2

注:与溶媒组相比, *P<0.01.

表 3: F9-2002 不同浓度 PT 和 APTT 复测结果

组别	浓度 nM	PT(s)	APTT(s)
溶媒对照	—	6.5±0.2	18.9±0.2
	5	9.7±0.4	31.6±3.8*
F9-2002	10	10.1±1.9	34.7±4.9*
	20	8.8±0.8	29.2±4.9*
利伐沙班	10	20.1±3.3*	25.9±5.4

注:与溶媒组相比, *P<0.01.

4.2、F9-2002 对兔血浆 FVIIIa 活性的影响

4.2.1. 制备血浆

新西兰兔,体重 2.5-3.5 Kg。将新西兰兔仰卧固定于兔台上,

用剪刀将心前区毛剪去，用碘酒、酒精消毒此处皮肤，站立于新西兰兔右侧，用左手拇指抵住右胸壁往左推，食指中指触摸胸骨左缘第3～4肋间隙，选择心脏跳动最明显处作穿刺点，右手持注射器垂直于胸壁，将针头插入胸腔，通过针头感到心脏跳动时，再将针头刺进心脏，然后抽出血液，血样置于3.2%枸橼酸钠抗凝的真空管中，在4℃条件下，3000rpm/min离心15 min收集血浆。

4.2.2. 制备含药血浆

取药物溶液10 μ l加入至240 μ l血浆中，漩涡混匀器混匀，放置于37℃水浴孵育2 min（产生作用的浓度分别是4、2、1nM），并设溶媒对照。

4.2.3. 血浆FVIIIa活性检测方法

a. 样品处理

① 稀释含药血浆：将含药血浆用FVIIIa分析缓冲液（下称缓冲液）稀释10倍，即得含药血浆稀释液。

② 配制FVIIIa标准品溶液：将2.6 μ g的FVIIIa标准品，加入52 μ l缓冲液，混匀后取2 μ l，加入至198 μ l缓冲液中，即得FVIIIa标准溶液(0.5 ng/ μ l)。

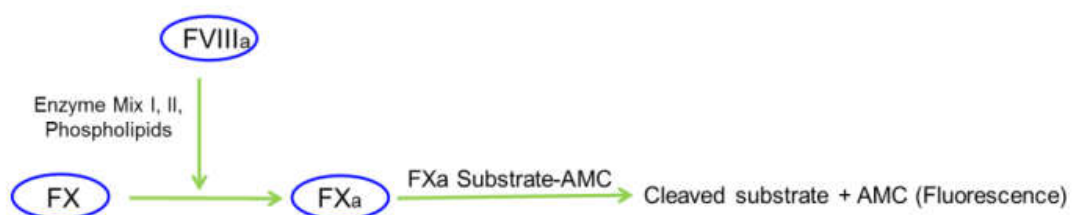
③ 配制酶混合液：按顺序将2 μ l酶混合物I、6 μ l磷脂质、2 μ l酶混合物II混合。

b. 加样

取 5 μ l 含药血浆稀释液以及 0、2、4、6、8 和 10 μ l 的 FVIIIa 标准溶液，加至 96 孔板中，再用缓冲液将所有孔的体积调整到 10 μ l。另设空白组。向空白组、含 FVIIIa 酶标准品和含药血浆组中加入 10 μ l 的酶混合物。使用缓冲液将每孔体积调整到 98 μ l/孔，上下移液混合均匀，37 $^{\circ}$ C 孵化 15 分钟，加入 2 μ l FXa 底物-AMC，混合均匀。

c. 测量

在酶标仪的动力学模式下每 10min 左右测一次荧光度 (Ex/Em=360/450 nm)，连续测量 100 min，并获得相应的吸光度值。



d. 计算

从所有吸光度值中减去空白组的吸光度值，从采样信号中减去背景信号。根据各时间点测得的吸光度值，求得加药组各时间点反应速率 v_t 和空白对照组各时间点反应速率 v_0 。计算样品中 F9-2002 对新西兰兔血浆 FVIIIa 的抑制率为：

$$\text{Inhibition ratio} = [1 - (v_t/v_0)] \times 100\%$$

4.4.4、实验结果

实验结果显示， F9-2002 在 2nM 和 4nM 浓度下显著抑制兔血浆 FVIIIa 活性，在 1 nM 浓度下对兔血浆 FVIIIa 活性无明显影响。结果见表 4。

表 4： F9-2002 对新西兰兔血浆 FVIIIa 的抑制率影响 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, n=3)

Time (min)	4 nM	2 nM	1 nM
15	63.95 $\pm$ 1.16	59.67 $\pm$ 5.89	-2.66 $\pm$ 0.61
22	54.69 $\pm$ 4.13	50.01 $\pm$ 4.93	-5.68 $\pm$ 6.85
28	52.17 $\pm$ 0.94	43.15 $\pm$ 5.48	4.69 $\pm$ 0.59
36	46.80 $\pm$ 2.80	39.04 $\pm$ 0.21	-0.33 $\pm$ 21.58
45	42.60 $\pm$ 3.76	27.41 $\pm$ 2.44	0.11 $\pm$ 1.63
53	37.33 $\pm$ 2.57	43.66 $\pm$ 1.14	-14.59 $\pm$ 7.92
59	44.56 $\pm$ 4.24	30.51 $\pm$ 13.09	3.86 $\pm$ 7.30
66	44.80 $\pm$ 4.55	38.53 $\pm$ 2.23	-4.43 $\pm$ 2.46
77	44.36 $\pm$ 3.36	33.35 $\pm$ 6.22	-17.94 $\pm$ 6.63
83	32.35 $\pm$ 2.78	25.12 $\pm$ 3.83	0.63 $\pm$ 3.00
90	24.24 $\pm$ 11.28	27.87 $\pm$ 13.85	-6.15 $\pm$ 4.14
97	32.06 $\pm$ 0.39	24.89 $\pm$ 0.59	0.72 $\pm$ 11.87
104	30.43 $\pm$ 1.89	19.67 $\pm$ 5.85	-5.32 $\pm$ 4.90

4.3、体内活性测试

4.3.1、大鼠下腔静脉血栓模型

SD 大鼠适应性饲养 7 天后，按体重随机分为 6 组：阴性对照组、利伐沙班阳性对照组、F9-2002 低剂量组、F9-2002 中剂量组、F9-2002 高剂量组、F9-2002P 组，每组动物 10 只。利伐沙班给药浓度为 0.4 mg/ml (1.2 mg/kg)；F9-2002 给药浓度为 0.2mg/ml、0.4mg/ml、0.8 mg/ml (0.6 mg/kg、1.2 mg/kg、2.4 mg/kg)；F9-2002P 给药浓度为 0.8 mg/ml (2.4 mg/kg)；阴性对照组给予等体积的溶媒，灌胃体积为 3 ml/kg。所有的大鼠自由进食、饮水。

大鼠术前 12 h 禁食不禁水，所有器械及用具均消毒。各组大鼠灌胃给药，60 min 后 10 %水合氯醛（3.5 ml/kg）腹腔注射麻醉。将麻醉大鼠做腹部正中切口，小肠牵至视野左侧，充分暴露下腔静脉，打开后腹膜，在左肾静脉下方 2 mm 处，用非吸收性外科 5-0 缝线结扎下腔静脉。静脉血流阻断，血栓形成。用可吸收外科 5-0 缝线缝合腹壁，于结扎 6 h 后，打开腹腔，在结扎位置下方 2 cm 处用止血钳夹闭管腔，纵行剪开血管腔，将该段血管内血液吸尽，取出血栓，放置在生理盐水中洗净表面浮血，并用滤纸沾去血栓表面的生理盐水，1 min 后称湿重。

大鼠下腔静脉血栓模型实验结果显示，与阴性对照组相比，F9-2002 1.2 mg/kg 剂量能显著减少大鼠下腔静脉血栓湿重($P<0.05$)；利伐沙班 1.2 mg/kg 和剂量 F9-2002 2.4mg/kg 能极显著减少大鼠下腔静脉血栓湿重 ($P<0.001$, $P<0.001$)，但 F9-2002 0.6 mg/kg 和 F9-2002P 2.4mg/kg 剂量对大鼠下腔静脉血栓湿重无显著影响 ($P>0.05$, $P>0.05$)。结果见表 5。

表 5: F9-2002 对大鼠下腔静脉血栓模型的影响 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, $n=10$)

组别	剂量 (mg/kg)	血栓湿重 (mg)
阴性对照	0	21.47 $\pm$ 3.03
利伐沙班	1.2	1.56 $\pm$ 0.96***
	0.6	13.25 $\pm$ 3.11
F9-2002	1.2	12.51 $\pm$ 3.88*
	2.4	4.29 $\pm$ 1.81***

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 与阴性对照组相比较。利伐沙班为阳性对照。

4.3.2、大鼠下腔静脉血栓模型（盲法给药）

1. 模型的制备

SD 大鼠随机分组，各组大鼠术前 12h 禁食不禁水，各组大鼠按照分组及给药方案对应编码受试药物 0.3ml/100g 灌胃。给药 60min 后，10%水合氯醛腹腔注射麻醉。麻醉后常规备皮，消毒，铺巾，经大鼠腹部正中切口进腹，将小肠牵至视野左侧，充分暴露下腔静脉，打开后腹膜，在左肾静脉下方 2mm 处，结扎下腔静脉。静脉血流阻断，血栓形成。缝合腹壁，结扎 6h 后重新打开腹腔，在结扎线下方 2cm 处夹闭血管，剖开血管，取出血栓称湿重。

2. 实验数据：

血栓湿重（g）	L1（Y5）	L2（Y3）	L3（Y1）	L4（Y4）	L5（Y2）
1	0.0126	0.0173	0.0201	0.0149	0.0265
2	0.0087	0.0185	0.0156	0.0146	0.0184
3	0.0083	0.0185	0.0166	0.0147	0.0210
4	0.0104	0.0221	0.0197	0.0149	0.0186
5	0.0085	0.0164	0.0158	0.0117	0.0203
6	0.0096	0.0155	0.0142	0.0158	0.0341
7	0.0075	0.0173	0.0167	0.0129	0.0207
8	0.0071	0.0161	0.0174	0.0161	0.0191
9	0.0127	0.0216	0.0117	0.0127	0.0297
X	0.0095	0.0181	0.0164	0.0143	0.0232
S	0.0020	0.0023	0.0026	0.0015	0.0056

3. 试药编码：

试药名称	浓度	试药编码
溶媒	0mg/ml	Y2
F9-2002	0.167mg/ml	Y3
F9-2002	0.5mg/ml	Y5



F9-2002	1.5mg/ml	Y1
利伐沙班	0.5mg/ml	Y4

4. 实验结果:

试药名称	剂量	试药编码	血栓湿重 (mg)	血栓抑制率
溶媒	—	Y2	23.2±5.6	
	0.5mg/kg	Y3	18.1±2.3	22%
F9-2002	1.5mg/kg	Y5	9.5±2.0	59%
	4.5mg/kg	Y1	16.4±2.6	29.3%
利伐沙班	1.5mg/kg	Y4	14.3±1.5	38.4%

近期研究计划

- 1、 靶标凝血激酶的确定及排他性靶位研究
- 2、 初步药代动力学研究
- 3、 PK、处方筛选，原料、制剂质量研究及稳定性考察

远期研究计划

- 1、 主要药效学研究
- 2、 临床前药代动力学研究
- 3、 PK/PD 研究
- 4、 临床前安全性评价

参考文献

- [1] Parker D L, Jr., Walsh S, Li B, et al. Rapid development

of two factor IXa inhibitors from hit to lead [J]. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 2015, 25(11): 2321-5.

[2] Pollack C V, Jr., Reilly P A, Eikelboom J, et al. Idarucizumab for Dabigatran Reversal [J]. *The New England journal of medicine*, 2015, 373(6): 511-20.

[3] Mar F, Crowther M, Gold A, et al. 176 Andexanet Alfa: An Investigational Universal Antidote for Reversal of Anticoagulation of Factor Xa Inhibitors in Healthy Human Volunteers [J]. *Neurosurgery*, 2016, 63 Suppl 1(170).

[4] Lee Y K, Player M R. Developments in factor Xa inhibitors for the treatment of thromboembolic disorders [J]. *Medicinal research reviews*, 2011, 31(2): 202-83.

[5] Feuerstein G Z, Stern D. The coagulation factor lottery - Is 9 the winning number?: An essay on future oral anticoagulants [J]. *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies*, 2005, 2(3): 279-83.

[6] Howard E L, Becker K C, Rusconi C P, et al. Factor IXa inhibitors as novel anticoagulants [J]. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 2007, 27(4): 722-7.

[7] Zhang Ting C Y, Guo Liangqin, et al. Factor IXa inhibitors,



W02016094260A1 [P/OL]. 2016.