

# Combination of molecular modeling and docking simulation for rational design of novel isosteviol based FXa inhibitors

Nguyen Anh Vu, Nguyen Thi Hong Duc, Ly Cong Thanh\*  
Faculty of Basic Science, Hanoi University of Pharmacy,  
13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

\*Corresponding authors: Ly Cong Thanh, email: thanhhc@hup.edu.vn

## ABSTRACT

**Background:** Searching for new active compounds acting as Factor Xa inhibitors (FXaI) has become one of the main strategies for the pharmacotherapy of thromboembolic disorders. Isosteviol is a non-toxic hydrolysis product of naturally occurring stevioside and possesses a wide range of therapeutic properties, including anticoagulant activity.

**Aims:** The present paper describes in silico design of novel oxime ether isosteviol derivatives as well as molecular modeling approach based on structure-activity relationship analysis (QSAR) and docking simulation for searching novel isosteviol-based compounds as potential FXa inhibitors.

**Method:** Automated Network Search (ANS) algorithm was employed for constructing QSAR models to predict the FXa inhibitory activities. New compounds bearing isosteviol moieties were designed based on the structure-activity relationships obtained from QSAR models. Docking simulations using Autodock Vina program were applied for predicting the binding ability of the most active compounds towards FXa.

**Results:** A QSAR model with  $R^2$  training of 0.93, and  $R^2$  external validation of 0.84 was obtained based on a multilayer perceptron (MLP) 5-8-1 network and a database of 77 isosteviols. 16 new derivatives were designed, and their binding energies ranged between -6.9 to -9.1 kcal/mol. Among them, 5 isosteviols showed the highest activity against FXa.

**Conclusions:** Analysis showed that the most promising derivatives contain heterocyclic aromatic five-membered moieties with substituents containing chlorine or fluorine atoms. It is anticipated that the findings reported in present 27 work may provide useful information for designing effective FXa inhibitors as anticoagulant agents.

**Keywords:** Thrombosis, FXa inhibitor, molecular modeling, isosteviol-like FXa inhibitors, docking simulation, artificial neural networks.



# Kết hợp mô hình phân tử và protein docking trong thiết kế chất ức chế yếu tố đông máu hoạt hóa Xa mang khung isosteviol

Nguyễn Anh Vũ, Nguyễn Thị Hồng Đức, Lý Công Thành  
Khoa Khoa học cơ bản, Trường Đại học Dược Hà Nội  
\*Tác giả liên hệ: Lý Công Thành, e-mail: thanhlc@hup.edu.vn  
(Ngày gửi đăng 20/5/2023: - Ngày duyệt đăng: 15/6/2023)

## TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Thiết kế các hợp chất phân tử nhỏ có khả năng ức chế yếu tố đông máu hoạt hóa Xa (FXa) được xem là một trong những hướng đi chính nhằm tìm kiếm liệu pháp điều trị các rối loạn thuyên tắc huyết khối.

**Mục tiêu nghiên cứu:** Ứng dụng phương pháp silico trong thiết kế các dẫn xuất isosteviol mới hướng tác dụng ức chế FXa. Phương pháp: Mạng nơ ron nhân tạo được sử dụng để xây dựng các mô hình liên quan định lượng cấu trúc-hoạt tính sinh học (QSAR) nhằm dự đoán tác dụng ức chế FXa. Mô phỏng docking phân tử được áp dụng để dự đoán khả năng liên kết của các hợp chất đối với FXa.

**Kết quả nghiên cứu:** Mô hình QSAR áp dụng thuật toán mạng perceptron một lớp với cấu trúc 5-8-1 xây dựng trên 77 cấu trúc isosteviol cho hệ số xác định trên tập huấn luyện ( $R^2$ ) là 0,93 và trên tập đánh giá ngoài là 0,84. 16 dẫn chất mới của isosteviol được thiết kế có năng lượng liên kết với FXa dao động từ -9,1 tới -6,9 kcal/mol. Từ các chất mới thiết kế, 5 chất được xác định có hoạt tính mạnh nhất.

**Kết luận:** Các chất mới thiết kế thể hiện hoạt tính tốt, là cơ sở lý thuyết cho tối ưu hóa cấu trúc và phát triển thuốc chống đông máu mới hướng ức chế FXa.

*Từ khóa:* huyết khối, chất ức chế FXa, mô hình hóa phân tử, mô phỏng docking phân tử, mạng nơ ron nhân tạo.

## Đặt vấn đề

Yếu tố hoạt hóa Xa (FXa) đóng vai trò chính trong quá trình đông máu và là mục tiêu hấp dẫn để phát triển thuốc chống đông máu dùng đường uống. Vai trò của nó không chỉ giới hạn trong chuỗi phản ứng đông máu mà nó cũng tham gia nhiều con đường truyền tín hiệu nội bào thông qua kích hoạt các thụ thể

protease kết hợp với G-protein (PAR) cũng như gây ra các phản ứng viêm và xơ hóa [1]. Hiện nay, các chất ức chế FXa được xem là một trong những thuốc chống đông đường uống được áp dụng rộng rãi nhất để điều trị các rối loạn huyết khối tắc mạch [2]. Được công bố năm 2011, thuốc chống đông ức chế FXa là apixaban (Eliquis®) là một trong 10



thuốc bán chạy nhất trên thế giới năm 2021 [3]. Ngoài ra, các thuốc chống đông đường uống có cùng cơ chế là rivaroxaban, edoxaban và betrixaban ngày càng được sử dụng rộng rãi trong lâm sàng, thay thế cho thuốc kháng vitamin K trong điều trị thuyên tắc huyết khối tĩnh mạch và rung tâm nhĩ không do bệnh van tim [4].

Nghiên cứu phát triển thuốc chống đông đường uống hướng ức chế FXa đã thu hút được sự quan tâm lớn từ cộng đồng khoa học. Trong những năm gần đây, nhiều nỗ lực đã được thực hiện để tìm ra các chất ức chế FXa (FXaI) mới, mạnh và an toàn hơn. Nhóm các dẫn xuất isosteviol (ISV) đã được phát hiện có khả năng ức chế tốt FXa (Hình 1) [5]. Isosteviol là sản phẩm thủy phân axit của steviosid – một hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ cây cỏ ngọt. Không chỉ có hoạt tính tốt, ISV đã được chứng minh là có độc tính thấp và dược động học phù hợp để phát triển thuốc chống đông đường uống mới [2]. Chen và cộng sự năm 2019 đã ứng dụng phương pháp docking phân tử trong thiết kế và tổng hợp 18 ISV mới; một trong số chúng (hợp chất **6k**) có hệ số ức chế FXa lên tới 15nM và đặc điểm dược động học phù hợp để phát triển thành thuốc [6]. Shi và cộng sự áp dụng phản ứng Click trong tổng hợp 40 ISV mới và phát hiện một số dẫn xuất có hoạt tính trung bình đến mạnh, có tiềm năng để tiếp tục nghiên cứu [7]. Với sự phát triển của khoa học máy tính, nhiều phương pháp mới đã được phát triển, bao gồm mô hình hóa

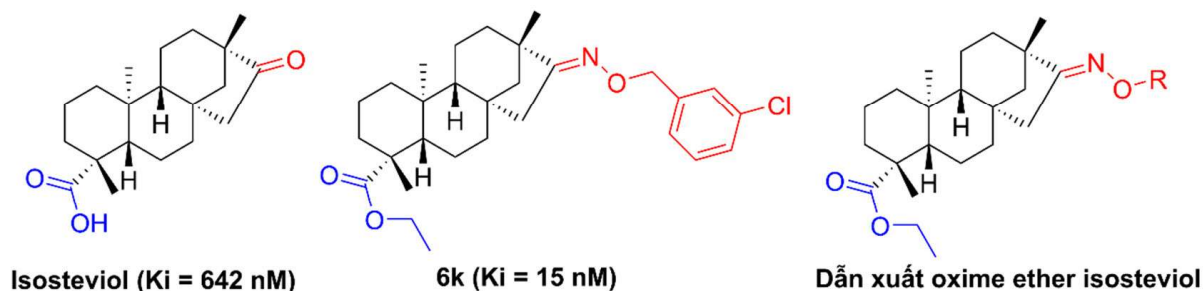
liên quan định lượng cấu trúc–hoạt tính sinh học (QSAR) và mô phỏng docking phân tử, đã được ứng dụng rộng rãi và hiệu quả trong nghiên cứu và thiết kế thuốc [8]. Cho tới nay, chỉ duy nhất một nghiên cứu ứng dụng mô hình QSAR được thực hiện nhằm thiết kế ISV hướng ức chế FXa [9], tuy nhiên có một số hạn chế liên quan đến số lượng giới hạn của dữ liệu (20 hợp chất) và độ chính xác không cao (hệ số xác định Q2 trên tập kiểm tra dao động từ 0,15 tới 0,79).

Từ các phân tích trên, phương pháp QSAR đã được ứng dụng trong nghiên cứu này nhằm thiết kế một số ISV mới với nhóm thế oxime ether (Hình 1). Mô phỏng docking phân tử sau đó được sử dụng nhằm dự đoán tương tác và năng lượng của các chất mới thiết kế khi gắn với thụ thể FXa.

#### Nguyên liệu, đối tượng và phương pháp nghiên cứu

##### Nguyên liệu và đối tượng nghiên cứu

Cấu trúc hóa học và hoạt tính của 77 ISV được thu thập từ các nghiên cứu đã được công bố [6, 7]. Công thức hóa học 3D được xây dựng bằng phần mềm Hyperchem 8.0 và tối ưu hóa năng lượng sử dụng mô hình Austin 1 (AM1), với gradient của RMS là 0,01 kcal/Åmol, 30000 vòng lặp. Phần mềm tính tham số phân tử: Dragon 5.0 (Talete, Milan, Ý) gồm 4885 tham số. Phần mềm xây dựng mô hình QSAR: Statistica 13.3; phần mềm mô phỏng docking phân tử: AutoDock Vina 1.0 và PyRx. Phần mềm phân tích tương tác: BIOVIA Discovery Studio 2021 Client.



Hình 1. Cấu trúc các dẫn xuất isosteviol, dẫn xuất **6k** [6] và khung chất mới thiết kế



**Phương pháp nghiên cứu**

**Xây dựng mô hình QSAR:** Phân tích hồi quy được thực hiện sử dụng mô hình mạng nơ ron nhân tạo (ANN) tích hợp trong Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, California, Hoa Kỳ). Cấu trúc mạng được thiết lập thông qua thuật toán tìm kiếm mạng tự động (ANS) cho phép chia tỷ lệ các biến đầu vào và biến mục tiêu, đồng thời cho tạo nhiều mạng khác nhau về chức năng kích hoạt hoặc độ phức tạp của mạng. Nghiên cứu này tập trung xây dựng mạng perceptron đa lớp (MLP) nhằm giảm thiểu bước tính và thiết lập số nút của lớp ẩn thông qua quy trình thử-lỗi. Các bước xây dựng mô hình như sau:

- Phân chia dữ liệu thành tập huấn luyện (65%), tập chuẩn hóa (20%) và tập đánh giá (15%). Tập đánh giá hoàn toàn tách khỏi quy trình xây dựng mô hình và dùng để kiểm chứng độ chính xác trong dự đoán hoạt tính của chất mới.

- Thiết lập thông số cho thuật toán học máy có giám sát MLP: số vòng lặp 1000, tốc độ học: 0,3 và moment: 0,2. Hàm kích hoạt: RDF.

- Các thông số đánh giá: sai số toàn phương trung bình (MSE), sai số tuyệt đối trung bình (MAE), hệ số tương quan (R2). Công thức tính MSE và MAE cụ thể như sau:

$$MSE = \frac{1}{n} \sum_i^n (y_i - x_i)^2 \tag{1}$$

$$MAE = \frac{\sum_{i=1}^n |y_i - x_i|}{n} \tag{2}$$

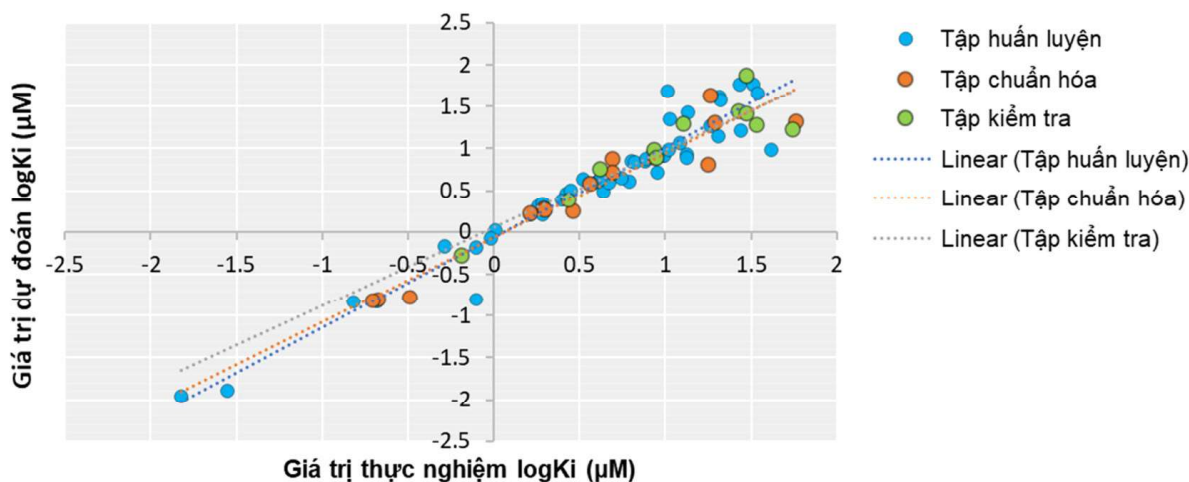
Trong đó  $n$  là kích thước tập huấn luyện,  $x_i$  là giá trị thực nghiệm và  $y_i$  là giá trị dự đoán.

**Mô phỏng docking phân tử:** Cấu trúc tinh thể tia X của yếu tố Xa được tải về từ Ngân hàng dữ liệu protein (PDB ID: 2P16) [10]. Quá trình chuẩn bị protein đích gồm: loại bỏ nước, tách cơ chất đồng tinh thể (edoxaban), thêm hydro phân cực, tối ưu hóa các axit amin His, Pro, Asn, Gln, Cys, phân bố điện tích Kollmann và Gasteiger. Kết quả thu được tệp pdbqt chứa cấu trúc đích phân tử sẵn sàng cho mô phỏng. Các hợp chất phân tử nhỏ được xây dựng cấu trúc 3D sử dụng phần mềm Hyperchem 8.0. Quy trình docking được đánh giá bằng cách dock lại Apixaban vào trung tâm hoạt động của Xa. Hộp grid được xác định với kích thước 25×25×25 lấy trung tâm tại tọa độ X = 9,54, Y = 43,27 và Z = 63,47.

**Kết quả nghiên cứu**

**Xây dựng mô hình QSAR**

Sau quá trình huấn luyện Mô hình mạng perceptron đa lớp (MLP) dự đoán hoạt tính ức chế Xa với các thông số và hiệu năng như sau (Hình 2):



Hình 2. Biểu đồ tương quan giá trị thực nghiệm và dự đoán của mô hình MLP 5-8-1



- Kiến trúc MLP 5-8-1 gồm: 5 nơ-ron đầu vào, 8 nơ-ron lớp ẩn và 1 nơ-ron đầu ra;
- Thuật toán huấn luyện mạng: BFGS 31 (Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno 31);
- Hàm kích hoạt lớp ẩn: logistic;
- Hàm kích hoạt đầu ra: hàm tiếp tuyến hyperbol tanh.

Kết quả huấn luyện và dự đoán của mô hình MLP thu được rất tốt, cụ thể: hệ số tương quan R<sup>2</sup> cho tập huấn luyện, tập chuẩn hóa và tập kiểm tra lần lượt là 0,931; 0,923 và 0,847. Sai số MSE và MAE trên tập kiểm tra thấp (0,181 và 0,022) cho thấy mô hình có độ chính xác cao trong dự đoán.

Kết quả chọn biến đầu vào cho mạng MLP 5-8-1 thu được 5 mô tả phân tử (MTPT) gồm 3 mô tả không gian 3D và 2 mô tả tô pô 2D. Danh sách và ý nghĩa các MTPT được liệt kê trong Bảng 1. Kết quả này cho thấy các mô tả không gian có ý nghĩa quan trọng trong dự đoán liên quan cấu trúc và tác dụng ức chế yếu tố Xa. Mạng MLP cho phép phân tích ảnh hưởng của mỗi MTPT đối với giá trị Ki, qua đó xác định đặc điểm cấu trúc có vai trò quan trọng trong tăng hay giảm hoạt tính ức chế FXa cũng như tác dụng chống đông của các hợp chất hóa học.

#### **Thiết kế dẫn xuất isosteviol (ISV) mới**

Dựa trên các MTPT có thể thấy kích thước,

độ phân cực và thế ion hóa có ảnh hưởng tới hoạt tính sinh học của các ISV. Chen và cộng sự nhận thấy 19-ethyl ester và 16-oxime là 2 nhóm thế quan trọng quyết định hoạt tính chống đông của ISV [6]. Gackowski cũng phát hiện các dẫn chất oxime ether của ISV có nhóm thế thiophen hoặc nhóm 3-methyloxetan cũng có hoạt tính ức chế Xa *in vitro* tốt [9]. Một số đặc điểm cấu trúc cũng được chứng minh có ảnh hưởng mạnh tới hoạt tính của isosteviol bao gồm dị vòng năm cạnh, số lượng nhóm thế halogen chứa Cl và F. Dựa trên các đặc điểm liên quan cấu trúc-tác dụng được đề cập đến ở trên, 16 dẫn xuất oxime ether isosteviol mới được thiết kế với các nhóm thế alicyclic bão hòa và không bão hòa hoặc các nhóm thế mang hệ dị vòng chứa S, O hoặc N (Bảng 2).

#### **Mô phỏng docking phân tử**

Mô phỏng docking phân tử giúp xác định cấu dạng tối ưu cũng như năng lượng liên kết của các ISV mới thiết kế khi tương tác với trung tâm hoạt động của FXa. Kết quả dự đoán năng lượng liên kết ΔG (kcal/mol) được liệt kê trong Bảng 2. Kết quả dock lại edoxaban cho độ chồng lấn cao (r.m.s.d ~ 1.12Å) và năng lượng liên kết ΔG = -9,4 kcal/mol. Tương tác quan trọng với Tyr99 (liên kết hydro Hbond và pi-stacking), Gln192,

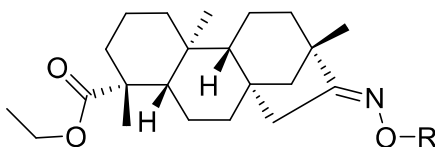
Bảng 1. Ý nghĩa và ảnh hưởng của các mô tả phân tử đối với hoạt tính ức chế FXa

STT	Tên mô tả phân tử	Định nghĩa	Nhóm MTPT	Độ nhạy	Xếp hạng quan trọng đối với Ki
1	<i>GATS8p</i>	Tỷ tương quan Geary (lag8) theo độ phân cực	Tỷ tương quan 2D	16,75	1
2	<i>HATS2i</i>	Tỷ tương quan theo trọng số đòn bẩy (lag2) / thế ion hóa	GETAWAY 3D	14,49	2
3	<i>R5e</i>	Tỷ tương quan R (lag5) theo độ âm điện Sanderson	GETAWAY 3D	13,33	3
4	<i>HATS2e</i>	Tỷ tương quan theo trọng số đòn bẩy (lag2) / độ âm điện Sanderson	GETAWAY 3D	8,86	4
5	<i>SpMAD_B(v)</i>	Độ lệch tuyệt đối trung bình phổ so với ma trận Burden có trọng số theo thể tích van der Waals	MTPT dựa trên ma trận 2D	8,69	5





Bảng 2. Các ISV mới thiết kế, hoạt tính dự đoán (Ki) bởi mô hình MLP 5-8-1 và năng lượng liên kết ( $\Delta G$ ) giữa chúng với FXa



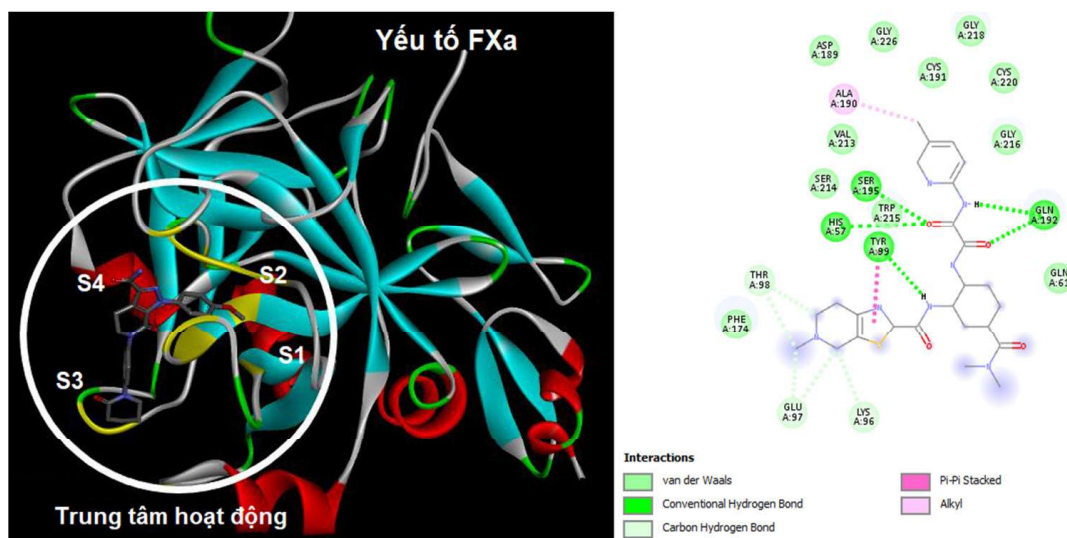
Hợp chất	R	Ki ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)	Hợp chất	R	Ki ( $\mu\text{M}$ )	$\Delta G$ (kcal/mol)
ISV01		1,112	-8,7	ISV09		0,356	-8,9
ISV02		0,645	-8,3	ISV10		0,354	-8,7
ISV03		9,282	-9,3	ISV11		0,487	-8,9
ISV04		0,544	-8,1	ISV12		0,573	-8,1
ISV05		0,372	-6,9	ISV13		0,493	-7,4
ISV06		0,749	-8,0	ISV14		0,650	-8,2
ISV07		0,306	-9,1	ISV15		0,936	-7,3
ISV08		0,442	-8,9	ISV16		0,947	-7,0

Ser195 và Trp215 (Hbond) đều được bảo toàn. Kết quả này cho thấy mô hình docking có khả năng dự đoán tốt tương quan cấu trúc-tác dụng của chất ức chế FXa (Hình 3).

Mô phỏng docking được ứng dụng để dự đoán tương tác của 16 ISV mới thiết kế với FXa. Dựa trên kết quả docking, 5 chất được đánh giá là có ái lực tốt nhất đồng thời có tương tác với các axit amin quan trọng tại

trung tâm hoạt động của FXa: ISV07–11. Các chất này có năng lượng tương tác dao động trong khoảng  $-9,1$  đến  $-8,7$  kcal/mol. Các tương tác chủ yếu như Hbond, stacking và halogen diễn ra chủ yếu giữa các nhóm thế tại khe S1 và S2 của trung tâm hoạt động (Hình 3) trong khi cấu trúc đa vòng của steviol tương tác mạnh với khe S4 của FXa [6].

Cụ thể, ISV07 được dự đoán có Ki = 0,306



Hình 3. Kết quả dock lại edoxaban vào trung tâm hoạt động của FXa

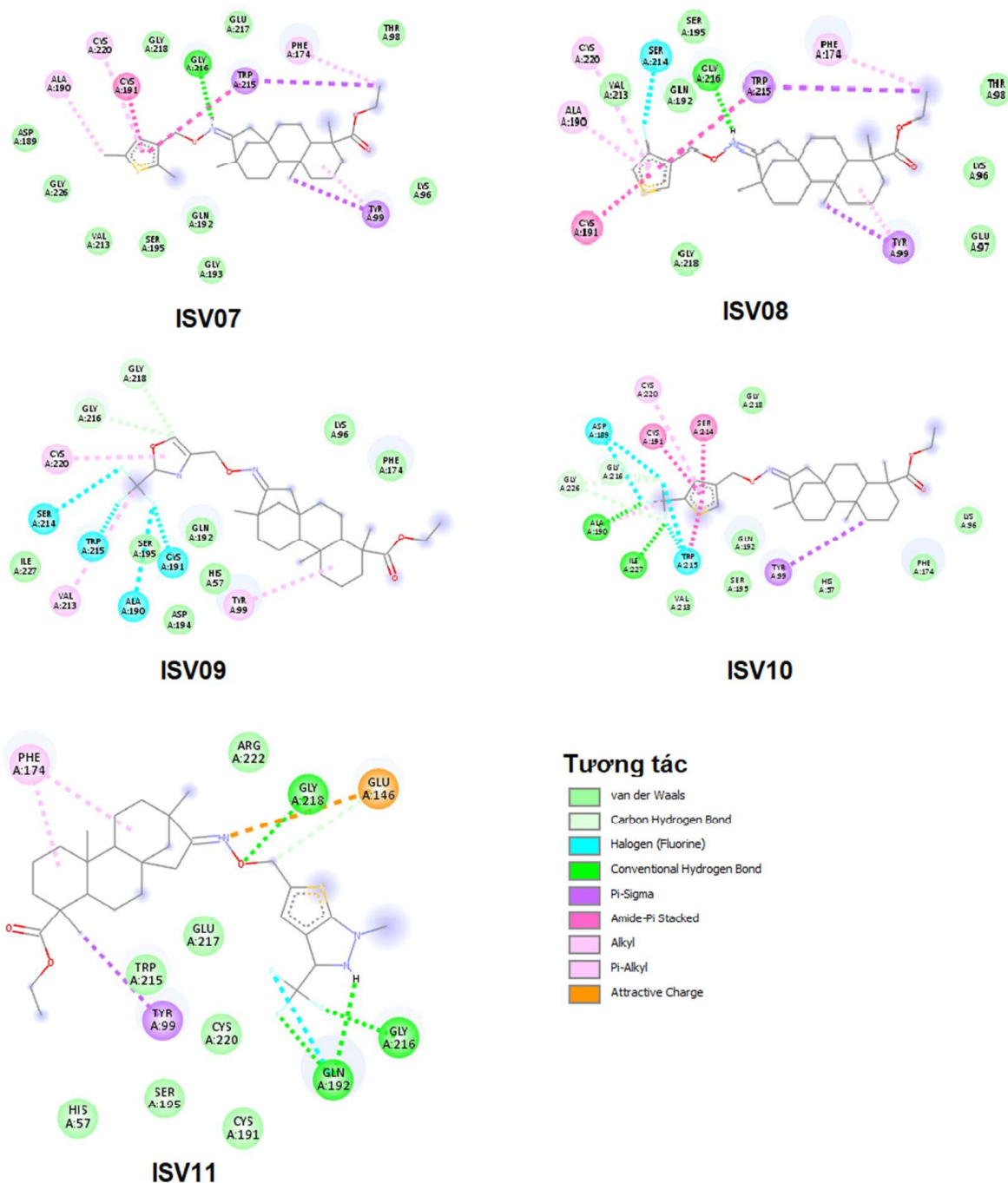
$\mu\text{M}$  và năng lượng tương tác  $-9,1$  kcal/mol. Chất này có tới 2 tương tác pi-sigma thông qua nhân pyrrol với Trp215 và nhóm alkyl của nhân polycyclic với Tyr99. Tương tác chủ yếu diễn ra tại khe S1 của FXa. Chất ISV08 lại có tương tác mạnh với Ser214, Ser195, Gln192 tại khe S2 thông qua liên kết Hbond và tương tác halogen. Chất ISV09 lại có khả năng tương tác với cả 2 khe S1 và S2 thông qua nhân isoxazole với Ser214, Trp215, Ala190 và Cys191. Chất ISV10 tương tự ISV09 với 4 tương tác halogen, 2 liên kết Hbond thông qua nhân pyrrol. Cuối cùng, chất ISV11 có nhóm thế khá cồng kềnh với 3 liên kết Hbond và nhiều tương tác kỵ nước với vùng S2. Đặc biệt, trong quá trình gắn kết, duy nhất ISV11 phát sinh liên kết tĩnh điện giữa nhóm amid với Glu146. Các tương tác nêu trên phù hợp với liên quan cấu trúc-tác dụng đã được mô tả trước đây và tương tự với các thuốc ức chế FXa đã được phát triển, như apixaban, edoxaban và rivaroxaban [1, 9].

### Bàn luận

Khung cấu trúc isosteviol đã được khai thác nhiều trong thiết kế và tổng hợp các chất có hoạt tính chống đông mạnh hướng ức chế FXa. Lần đầu tiên mạng nơ-ron nhân tạo đã được ứng dụng nhằm dự đoán giá trị của  $K_i$  cũng như phản ánh mối liên quan cấu trúc-

tác dụng của các chất ức chế FXa. Mô hình MLP 5-8-1 với 5 biến đầu vào là các mô tả phân tử thuộc nhóm 2D và 3D đã cho thấy độ ổn định cũng như khả năng dự đoán tốt với độ chính xác lớn hơn 0,8. Có thể thấy các yếu tố không gian cũng như các thông số liên quan đến khả năng phân cực, khả năng ion hóa và thể tích van der Waals cũng có ảnh hưởng lớn đến hoạt tính ức chế FXa của các chất (Bảng 1).

Trong khi mô hình QSAR giúp dự đoán chính xác giá trị  $K_i$  và phần nào phản ánh tương quan cấu trúc-tác dụng sinh học của các chất ức chế FXa, mô phỏng docking phân tử cho phép xác định chính xác cấu dạng cũng như mức độ tương tác của các chất với trung tâm hoạt động của đích FXa. Việc kết hợp mô hình QSAR và docking đã giúp phát huy tốt nhất thế mạnh của từng phương pháp, qua đó nâng cao độ chính xác của dự đoán. Nghiên cứu này thiết kế được 16 ISV mới với những nhóm thế đã được chứng minh tác dụng trên đích. Có một chú ý là một số chất cho kết quả dự đoán QSAR trái ngược với mô phỏng docking. Ví dụ chất ISV01 và ISV03, năng lượng tương tác với đích rất tốt, dao động trong khoảng  $-9,3$  và  $-8,7$  kcal/mol, không thấp hơn đáng kể so với chứng dương (edoxaban). Tuy nhiên mô hình QSAR dự đoán



Hình 4. Tương tác của các chất ISV07–11 với trung tâm hoạt động của FXa

hoạt tính của 2 chất này khá thấp so với các chất khác. Trong các chất mới thiết kế, 5 ISV mới được dự đoán tốt nhất bởi cả hai mô hình QSAR và docking. Các chất này có Ki dao động trong khoảng 0,31 đến 0,48  $\mu\text{M}$  đồng thời có mức năng lượng liên kết với FXa mạnh ( $\Delta G$  từ

–9,1 đến –8,7 kcal/mol). Các chất này là khởi đầu tốt để tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa cấu trúc nhằm tìm kiếm các ISV mới có hoạt tính tốt hơn, định hướng phát triển thành thuốc chống đông đường uống.





### Kết luận

Nghiên cứu này đã xây dựng được một mô hình QSAR ứng dụng mạng nơ-ron nhân tạo MLP 5-8-1 trên một cơ sở dữ liệu đồng nhất các chất mang khung isosteviol với độ chính xác cao ( $R^2 > 0,8$ ). Các đặc điểm cấu trúc ảnh hưởng lớn đến tác dụng sinh học của ISV đã được phân tích để từ đó nghiên cứu này đã thiết kế được 16 chất mới có hoạt tính sinh học tốt và có khả năng gắn kết với trung tâm hoạt động của Xa. Trong đó 5 chất có giá trị Ki tốt nhất đã được tiếp tục phân tích tương tác với yếu tố Xa. Các chất này có năng lượng

tương tác mạnh với đích và tuân theo quy luật liên quan cấu trúc-tác dụng tương tự các thuốc đang được lưu hành trên thị trường. Với việc kết hợp giữa các công cụ hóa tính toán như mô hình QSAR, mô phỏng docking, động lực học phân tử, phương pháp này có thể mở rộng trên các đối tượng khác nhằm đa dạng hóa khung thiết kế. Ngoài ra, các kết quả trong nghiên cứu này cũng có thể được ứng dụng để thiết kế, tối ưu hóa và tiến tới tổng hợp, đánh giá hoạt tính sinh học trên Xa trong tương lai.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ichikawa H, Shimada M, Narita M, Narita I, Kimura Y, Tanaka M, et al. Rivaroxaban, a Direct Factor Xa Inhibitor, Ameliorates Hypertensive Renal Damage Through Inhibition of the Inflammatory Response Mediated by Protease-Activated Receptor Pathway. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8(8):e012195.
2. Pinto DJP, Smallheer JM, Cheney DL, Knabb RM, Wexler RR. Factor Xa Inhibitors: Next-Generation Antithrombotic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;53(17):6243-6274.
3. Urquhart L. Top Companies and Drugs by Sales in 2021. *Nature Reviews Drug Discovery* 2022;21:251.
4. Kushnir M, Choi Y, Eisenberg R, Rao D, Tolu S, Gao J, et al. Efficacy and safety of direct oral factor Xa inhibitors compared with warfarin in patients with morbid obesity: a single-centre, retrospective analysis of chart data. *The Lancet Haematology*. 2019;6(7):e359-e365.
5. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2021;20(3):200-216.
6. Chen P, Zhang D, Li M, Wu Q, Lam YPY, Guo Y, et al. Discovery of novel, potent, isosteviol-based antithrombotic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;183:111722.
7. Shi Y, Pan B-W, Li W-C, Wang Q, Wu Q, Pan M, et al. Synthesis and biological evaluation of Isosteviol derivatives as FXa inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2020;30(2):126585.
8. Gregory S, Sandeepkumar K, Jens M, Edward W. Lowe, Jr. Computational Methods in Drug Discovery. *Pharmacological Reviews*. 2014;66(1):334.
9. Gackowski M, Szewczyk-Golec K, Mądra-Gackowska K, Pluskota R, Koba M. Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis of Isosteviol-Related Compounds as Activated Coagulation Factor X (FXa) Inhibitors. *Nutrients*. 2022; 14(17):3521.
10. Pinto DJP, Orwat MJ, Koch S, Rossi KA, Alexander RS, Smallwood A, et al. Discovery of 1-(4-Methoxyphenyl)-7-oxo-6-(4-(2-oxopiperidin-1-yl)phenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-c]pyridine-3-carboxamide (Apixaban, BMS-562247), a Highly Potent, Selective, Efficacious, and Orally Bioavailable Inhibitor of Blood Coagulation Factor Xa. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2007;50(22):5339-5356.