

新型受体相互作用蛋白1激酶抑制剂的动物药动学和药效学研究



周海蒙^{1,2}, 李斌², 王国政², 陈士柱², 赵新², 徐文娟¹, 董玲¹

1. 北京中医药大学生命科学院 (北京 102488)
2. 中国医药研究开发有限公司 (北京 102206)

【摘要】目的 对新型受体相互作用蛋白1 (RIP1) 激酶抑制剂的体内外生物活性及药动学进行初步研究, 为后续新药开发提供参考。**方法** 以 GSK2982772 为阳性参照, 通过 ADP-Glo 方法评估新型 RIP1 激酶抑制剂对重组人与鼠源 RIP1 激酶的抑制活性; 采用肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和凋亡抑制剂 (Q-VD-OPh) 建立细胞坏死模型, 评估 RIP1 激酶抑制剂对人组织淋巴瘤细胞 (U-937) 与小鼠成纤维细胞 (L-929) 坏死抑制水平; 考察 RIP1 激酶抑制剂经小鼠静脉及口服给药后的药动学; 小鼠静脉注射 mTNF- α 诱导全身性炎症反应综合征 (SIRS), 口服给予 RIP1 激酶抑制剂通过防止体温损失评估治疗炎症的效果。**结果** 新型 RIP1 激酶抑制剂 RIPK1-093、095、106 对重组人源 RIP1 激酶抑制活性 (4.55、7.38、10.93 nmol/L) 与阳性参照化合物 (18.93 nmol/L) 相当, 对重组鼠源 RIP1 激酶抑制活性 (5.70、8.44、70.58 nmol/L) 优于阳性参照化合物 (2 035.00 nmol/L); 对 U-937 细胞抑制坏死活性 (4.92、2.95、6.84 nmol/L) 与阳性参照化合物 (5.37 nmol/L) 相当, 对 L-929 细胞抑制坏死活性 (8.59、6.54、41.34 nmol/L) 优于阳性参照化合物 (489.40 nmol/L); 在小鼠药动学研究中, 具有低清除率 ($P < 0.05$), 且口服暴露量显著提高 ($P < 0.05$), 其中 RIPK1-106 口服暴露量提升约 4 倍; 在 SIRS 模型中, 口服治疗 10 mg/kg 剂量组显示, 6 h 时体温损失与阳性参照化合物相当, 24 h 显著抑制体温损失 ($P < 0.05$), 3 mg/kg 剂量组显示, 6 h 体温损失显著减小 ($P < 0.05$), 且 24 h 显著改善动物死亡率。**结论** 新型 RIP1 激酶抑制剂的体内外活性和药动学的特点, 可以作为治疗炎症性和自身免疫性疾病的新药进一步开发研究。

【关键词】 受体相互作用蛋白1 激酶抑制剂; 坏死; 药动学; 药理学

【中图分类号】 R969.1

【文献标识码】 A

Animal pharmacokinetics and pharmacodynamics of novel receptor-interacting protein kinase 1 inhibitors

ZHOU Haimeng^{1,2}, LI Bin², WANG Guozheng², CHEN Shizhu², ZHAO Xin², XU Wenjuan¹, DONG Ling¹

1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. The National Institute of Pharmaceutical R&D Co., Ltd, Beijing 102206, China

Corresponding author: DONG Ling, Email: dongling@bucm.edu.cn

【Abstract】Objective To conduct preliminary studies on the biological activity in vitro and in vivo and pharmacokinetics of novel receptor interacting protein 1 (RIP1) kinases inhibitors, and to provide a reference basis for the subsequent development of new drugs. **Methods** Using

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202406073

通信作者: 董玲, 博士, 研究员, 博士研究生导师, Email: dongling@bucm.edu.cn

GSK2982772 as a positive reference, inhibitory activity of novel RIP1 kinases inhibitors against recombinant human and murine RIP1 kinases was assessed by ADP-Glo methodology. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) and apoptosis inhibitor (quinoline-val-asp-difluorophenoxymethylketone, Q-VD-OPh) were used to establish a cell necrosis model to assess the level of inhibition of cell necrosis by RIP1 kinases inhibitor in human tissue lymphoma cells (U-937) and mouse fibroblasts (L-929). The pharmacokinetics of RIP1 kinases inhibitors after intravenous and oral administration to mice was examined. Intravenous injection of mTNF- α in mice induces systemic inflammatory response syndrome (SIRS), and oral administration of a RIP1 kinases inhibitor evaluates the potential for treating inflammation by preventing body temperature loss. **Results** The novel RIP1 kinases inhibitors RIPK1-093, 095, and 106 had comparable inhibitory activities against recombinant human-derived RIP1 kinases (4.55 nmol/L, 7.38 nmol/L, and 10.93 nmol/L) to the positive reference compound (18.93 nmol/L), and inhibitory activity against recombinant murine RIP1 kinases (5.70 nmol/L, 8.44 nmol/L, 70.58 nmol/L) was superior to the positive reference compound (2 035.00 nmol/L). Inhibition of necrotic activity against U-937 cells (4.92 nmol/L, 2.95 nmol/L, and 6.84 nmol/L) was comparable to that of the positive reference compound (5.37 nmol/L), and inhibition of necrosis activity on L-929 cells (8.59 nmol/L, 6.54 nmol/L, 41.34 nmol/L) was superior to the positive reference compound (489.40 nmol/L); in mouse pharmacokinetics, it had low clearance ($P < 0.05$) and significantly higher oral exposure ($P < 0.05$), noteworthy the oral exposure of RIPK1-106 was elevated about 4-fold. In the SIRS model, oral treatment of the 10 mg/kg dose group showed a comparable loss of body temperature as the positive reference compound at 6h and significantly reduced at 24h ($P < 0.05$), and the 3 mg/kg dose group showed a significant reduction in body temperature loss at 6h ($P < 0.05$) and a significant improvement of animal mortality at 24 h. **Conclusion** The in vitro and in vivo activity and pharmacokinetic profile of the novel RIP1 kinases inhibitors can be further developed and investigated as new drugs for the treatment of inflammatory and autoimmune diseases.

【Keywords】 RIP1 kinases inhibitors; Necrosis; Pharmacokinetics; Pharmacology

受体相互作用蛋白激酶 (receptor interacting protein kinases, RIPKs) 作为一种重要的上游激酶, 具有丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性, 已被证明可通过支架功能和激酶功能调节炎症反应^[1]。RIPKs 家族共有 7 个成员, 其中受体相互作用蛋白 (receptor interacting protein, RIP) 1 激酶处于先天免疫反应相关信号传导的关键节点。RIP1 激酶的泛素化和磷酸化调节决定了细胞的存活、凋亡和坏死, 因此, RIP1 激酶的失调将严重影响炎症性疾病的结局^[2]。RIP1 激酶通路上关键蛋白的突变可导致自发的、强烈的炎症表型。在小鼠上皮特异性死亡结构域蛋白 (fas-associating protein with a novel death domain, FADD) 敲除产生的自发皮肤炎症中, RIP1~RIP3 介导的角质形成细胞坏死发挥了关键的作用^[3]。SHARPIN 缺失的小鼠发生严重的皮肤和多器官炎症, RIPK1^{K45A} 可保护这种慢性增生性皮炎相关的病理损伤^[4]。最近研究表明, 上调的 RIP1 激酶活性可以通过直接调控程序性坏死、促炎细胞因子产生、炎性小体组装和某些形式的致病性细胞

凋亡来驱动炎症。RIP1 激酶已被证明是死亡受体肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1)、凋亡相关因子配体 (FasL) 和 TNF 相关凋亡诱导配体 (TNF related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 下游通路以及 Toll 样受体促炎途径的关键驱动因素^[5]。因此, 阻断这一途径有可能为多种炎症性疾病带来广泛的治疗益处。研究和开发高活性、高选择性以及安全性的 RIP1 激酶抑制剂对临床相关疾病治疗有着十分重要的意义。

RIP1 激酶作为调节炎症反应和细胞坏死的关键蛋白, 目前尚未有以其作为靶点的药物获批上市。葛兰素史克公司开发的 GSK2982772 是最早进入临床研究的小分子抑制剂, 目前处于 II 期临床研究阶段^[6]。Takeda 公司通过高通量筛选得到苗头化合物 10, 其与 GSK2982772 在 RIP1 口袋可很好的叠合 (图 1), 根据构效关系进一步优化得到候选化合物 22 (图 2)^[7], 包含 4-氧代-6,7-二氢-1H-咪唑并 [4,5-c] 吡啶部分作为母核结构。然而, GSK2982772 在人和啮齿类动物上

较大的活性种属差异限制了临床前有效的药效学和毒理学研究，化合物 22 有限的药动学性质也限制了其后续的开发。基于化合物 22 的共晶结构，其结合于非三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）口袋附近的别构位点，核心结构与 RIP1 激酶 Asp156 在 1 号位置的氮原子和 7 号位置的羰基之间形成了一个氢键网络，苄基与 ATP 结合位点后面的变构疏水深口袋结合（图 3）^[7]，发现 RIP1 激酶口袋仍有足够的结合空间，经过系列的筛选优化，研究得到活性和药动学性质较好的化合物系列新型 RIP1 激酶抑制剂（RIPK1）-093、095、106，并且与化合物 22 具有相似的结合模式（图 4）^[8]。本研究探讨了该化合物系列对 RIP1 激酶活性和细胞坏死的影响，同时分析了其在小鼠体内的药动学过程以及在全身性炎症反应疾病模型中的治疗效果，为后续 RIP1 激酶抑制剂的开发提供支持。

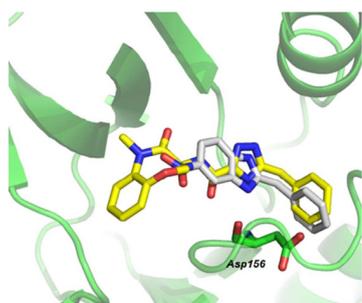


图1 化合物10（白色）与GSK2982772（黄色）的叠合结果^[7]

Figure 1. Stacking results of compound 10 (white) with GSK2982772 (yellow)^[7]

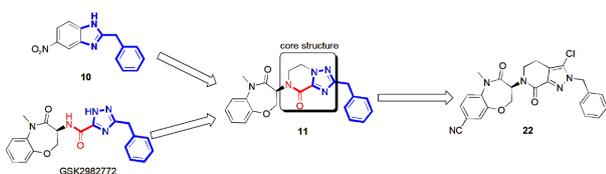


图2 Takeda化合物22设计优化过程

Figure 2. Design optimization process of Takeda compound 22

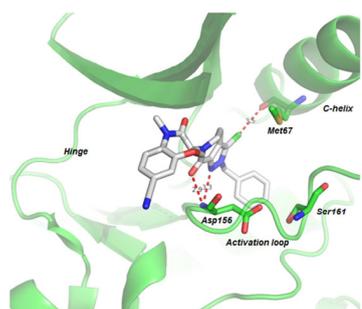


图3 化合物22的共晶结构^[7]

Figure 3. The co-crystal structure of compound 22^[7]

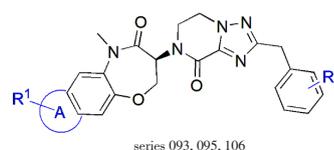


图4 新型RIP1激酶抑制剂设计思路^[8]

Figure 4. Design concept for novel RIP1 kinases inhibitors^[8]

1 材料与方法

1.1 主要仪器

2185A18022457 细胞计数仪 (Invitrogen 公司); Cytation 3 酶标仪 (Biotek 公司); TQ-S-Mirco 三重四极杆高效液相色谱仪 (美国沃特世公司); Sorvall ST16R 高速低温离心机 (Thermo Fisher 公司); AZ8856 高精度温度计 (台湾衡欣公司)。

1.2 主要药品与试剂

乙腈 (质谱级, Fisher 公司, 批号: 215625); 甲酸 (质谱级, Fisher 公司, 批号: 212271); 蒸馏水 (屈臣氏公司, 批号: 20211231); 二甲基亚砜 (色谱级, DMSO, Fisher 公司, 批号: 210435); Hepes (SignalChem 公司, 批号: H3375); BSA (SignalChem 公司, 批号: CR84-100); 氯化钠 (SignalChem 公司, 批号: 7647-100); 氯化镁 (SignalChem 公司, 批号: M1028-100 mL); CHAPS (SignalChem 公司, 批号: C3023); 二硫苏糖醇 (SignalChem 公司, 批号: 43816-50 mL); ADP-Glo™ 检测试剂盒 (Promega 公司, 批号: V9102); 人源 RIP1 重组蛋白 (SignalChem 公司, 批号: R07-11G); 鼠源 RIP1 重组蛋白 (SignalChem 公司, 批号: R07M-11G); mTNF- α (义翘神州生物, 批号: 50349-MNAE); hTNF- α (Gibco 公司, 批号: PHC3016); Q-VD-Oph (Merk 公司, 批号: 551476); OptiPlate-384F 板 (珀金埃尔默, 批号: 6007290); 胎牛血清 (Gibco 公司, 批号: 10099141); 384 孔板 (Corning 公司, 批号: 3570); CellTiter-Glo 试剂 (Promega 公司, 批号: G7572)。

RIPK1-093 (中国医药研究开发有限公司, 批号: 210400-065, 纯度 100.00%); RIPK1-095 (中国医药研究开发有限公司, 批号: 210461-023, 纯度 99.90%); RIPK1-106 (中国医药研究开发有限公司, 批号: 210465-034, 纯度 99.99%); GSK2982722 (MedChemExpress 公司, 批号: 113186, 纯度 98.98%)。

1.3 细胞与动物

U-937 细胞（南京科佰生物科技有限公司，货号：CBP60277）；L-929 细胞（南京科佰生物科技有限公司，货号：CBP60878）。

ICR 雄性小鼠和 C57BL/6J 雄性小鼠，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，生产许可证号：SCXK（京）2021-0006，使用许可证号：SYXK（京）2019-0051。本研究经中国医药研究开发中心有限公司实验动物伦理委员会批准（伦理审批号：211224-113、220323-028）。

1.4 方法

1.4.1 人源和鼠源 RIP1 激酶活性抑制实验

应用 ADP-Glo™ 激酶检测方法，通过定量激酶反应过程中产生的 ADP 的量来测定激酶活性，检测中产生的发光信号强度与激酶活性成正比^[9]。

将浓度均为 1 mmol/L 的新型 RIP1 激酶抑制剂溶液和化合物 GSK2982772 溶液（均溶于 DMSO）按 1:3 梯度稀释系列浓度于稀释板，共稀释 10 个梯度。从稀释板转移 10 nL 至 OptiPlate-384 F 实验板后，每孔加入 90 nL DMSO，各浓度平行两个复孔，阴性对照组和阳性对照组每孔加入 100 nL DMSO。将 0.794 μmol/L 的重组人源 RIP1 激酶蛋白 / 1.588 μmol/L 的重组鼠源 RIP1 激酶蛋白分别用反应缓冲溶液（含 50.00 mmol/L HEPES pH 7.5、0.02% CHAPS、50 mmol/L 氯化钠、30 mmol/L 氯化镁、1 mmol/L 二硫苏糖醇、0.05% BSA）稀释 19.85 倍 / 9.93 倍至 40 nmol/L，分别取 5 μL / 孔加入到实验板的化合物测试组及阳性对照组中，阴性对照组加入等体积的反应缓冲液。室温孵育 30 min，将 10 mmol/L ATP 用反应缓冲溶液稀释 100 倍至 100 μmol/L，取 5 μL / 孔加入到实验板中，25 °C 孵育 4 h；将实验板置于室温条件放置 5 min，加入 10 μL / 孔 ADP-Glo 试剂盒中的 Reagent，室温孵育 40 min；加入 20 μL / 孔 ADP-Glo 试剂盒的 Detection reagent，室温孵育 30 min，使用酶标仪读取发光值（L），并计算激酶活性抑制率 $[1 - (L_{\text{化合物孔}} - L_{\text{阴性对照孔}}) / (L_{\text{阳性对照孔}} - L_{\text{阴性对照孔}})] \times 100\%$ 。以激酶活性抑制率为纵坐标，化合物的浓度为横坐标，使用 Graphpad 8.0 拟合剂量-效应曲线，得到化合物的半抑制浓度（50% inhibiting concentration, IC₅₀）。

1.4.2 人组织细胞淋巴瘤细胞 U-937 和小鼠成纤维细胞 L-929 坏死抑制实验

RIP1 激酶抑制剂的效应通过体外细胞坏死抑制实验进行检测。将 U-937/L-929 细胞从液氮中取出复苏并培养于含有 10% 胎牛血清、100 μg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 1 640 培养基 / MEM 培养基中。检测时将细胞分别以 17 500 个 / 孔和 1 750 个 / 孔的密度接种于 384 孔板，体积为 35 μL / 孔。将 30 mmol/L 的新型 RIP1 激酶抑制剂溶液和 GSK2982772 溶液（溶于 DMSO）按 1:3 梯度系列稀释，共 9 个浓度，经培养基稀释 100 倍后，取 5 μL 加入到 384 孔板的细胞中。阳性对照孔加入 5 μL 浓度为 50 μmol/L 的 GSK2982772，阴性对照孔加入等体积的含有 0.1% DMSO 的培养基。将 Q-VD-OPh 溶液（溶于 DMSO）及 hTNF-α/mTNF-α 溶液（溶于无菌水）用培养基稀释后加入到 384 孔板的细胞中，反应终体系为 50 μL，Q-VD-OPh 终浓度为 25 μmol/L，hTNF-α/mTNF-α 终浓度为 100 ng/mL。将细胞培养板放置培养箱中，在 37 °C、5%CO₂ 下孵育 48 h。将细胞培养板取出，加入 30 μL CellTiter-Glo 试剂振荡混匀，室温孵育 10 min 后使用酶标仪读取发光值，并计算相对 L（ $L_{\text{化合物孔}} - L_{\text{阴性对照孔}}$ ）。以相对 L 为纵坐标，化合物的浓度为横坐标，使用 Graphpad 8.0 拟合剂量-效应曲线，得到化合物的 IC₅₀。

1.4.3 新型 RIP1 激酶抑制剂在全身炎症反应综合征模型中的药效实验

取 mTNF-α 溶解于无菌注射用水中配制成浓度为 0.2 μg/μL 的溶液，给予实验用雄性 6 周龄的 C57BL/6J 小鼠 54 只，每只静脉注射 0.1 mL，造全身炎症反应综合征模型，模型表现为体温降低^[10]。

本实验分为 6 组，包括阳性对照组（3 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量组）、实验组（3 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量组）、阴性对照组和造模组。给药方法：将不同剂量的实验品用含有 3% DMSO 和 20% 羟丙基-β-环糊精的溶媒溶解。阳性对照组：每剂量组 6 只，分别口服给予 3 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量的 GSK2982772。实验组：每剂量组 6 只，分别口服给予 3 mg/kg 和 10 mg/kg 剂量的新型 RIP1 激酶抑制剂（RIPK1-093、095、106）。阴性对照组：6 只小鼠口服给予溶媒 15 min 后静

脉注射 0.1 mL 无菌水。造模组：6 只小鼠口服给予溶媒。

给药 15 min 后，每只小鼠静脉注射 20 μg mTNF- α ^[11]，用电子温度计检测小鼠直肠位温度，连续监测注射小鼠重组 TNF- α 后 1、2、3、4、5、6、24 h 小鼠的体温值及死亡率。

1.4.4 小鼠药动学实验

雄性 6 周龄 ICR 小鼠静脉给予 1 mg/kg 新型 RIP1 激酶抑制剂，口服给予 2 mg/kg 新型 RIP1 激酶抑制剂。每个受试物 3 只静脉给药，3 只口服给药。静脉注射液与口服给药溶媒相同，为 3% DMSO 和 20% 羟丙基- β -环糊精溶液。

采用眼眦静脉丛采血，肝素钠抗凝，离心得血浆后冻存直至分析^[12]。精密量取血浆样品 10 μL ，向其中加入 100 μL 5 ng/mL 的盐酸维拉帕米乙腈溶液，涡旋剧烈震荡 5 min，用高速低温离心机以 2 112 $\times g$ 离心 10 min。取上清液 50 μL ，加入 100 μL 乙腈混匀，以 2 112 $\times g$ 离心 10 min，取上清液，置于进样盘中检测分析。

1.4.5 样品测试

色谱条件：色谱柱为 Waters BEH C₁₈ 柱（50 mm \times 2.1 mm，1.7 μm ）；流动相为 A（含 1 mol/L 乙酸铵和 0.1% 甲酸水溶液）-B（乙腈）；梯度洗脱（0~0.2 min，30% B；0.2~1.6 min，30%~98% B；1.6~2.4 min，98%~30% B）；流速为 0.4 mL/min；进样器温度：4 $^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件：电喷雾离子源；正离子模式；毛细管电压为 1 kV；脱溶剂气温度为 500 $^{\circ}\text{C}$ ；离子源温度为 150 $^{\circ}\text{C}$ ；锥孔气流量为 50 L/Hr；脱溶剂气流量为 1 000 L/Hr；多反应监测扫描方式；定量离子对分别为：RIPK1-093（ m/z 534.16 > 90.82）；RIPK1-095（ m/z 536.19 > 331.80）；

RIPK1-106（ m/z 554.19 > 349.75）；GSK2982772（ m/z 377.99 > 185.99）。

1.4.6 数据处理

用标准曲线对样品进行定量分析。用 Mas Studio 软件对血药浓度进行统计分析，得到药时曲线及主要药动学参数。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 20.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析和 LSD- t 检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新型RIP1激酶抑制剂对人源和鼠源激酶活性抑制的影响

使用人源和鼠源重组 RIP1 激酶，应用 ADP-Glo™ 激酶检测方法研究 RIPK1-093、095、106 对 RIP1 激酶催化活性的抑制作用。结果显示，RIPK1-093、095、106 抑制人源 RIP1 激酶活性 IC₅₀ 值分别为 4.55、7.38、10.93 nmol/L，与阳性药物 GSK2982772 抑制 RIP1 激酶的活性相当（18.93 nmol/L）。GSK2982772 对啮齿类动物的 RIP1 激酶表现出弱的抑制作用。其抑制 RIP1 激酶活性的 IC₅₀ 为 2 035.00 nmol/L，而新型 RIPK1-093、095、106 抑制鼠源 RIP1 激酶活性的 IC₅₀ 值分别为 5.70、8.44、70.58 nmol/L，对啮齿类动物的 RIP1 激酶也表现出显著的抑制（图 5）。

2.2 新型RIP1激酶抑制剂对TNF- α 介导的U-937和L-929细胞坏死抑制的影响

FasL、TNF- α 和 TRAIL 在半胱氨酸蛋白酶（cysteine aspartic acid specific protease, Caspase）

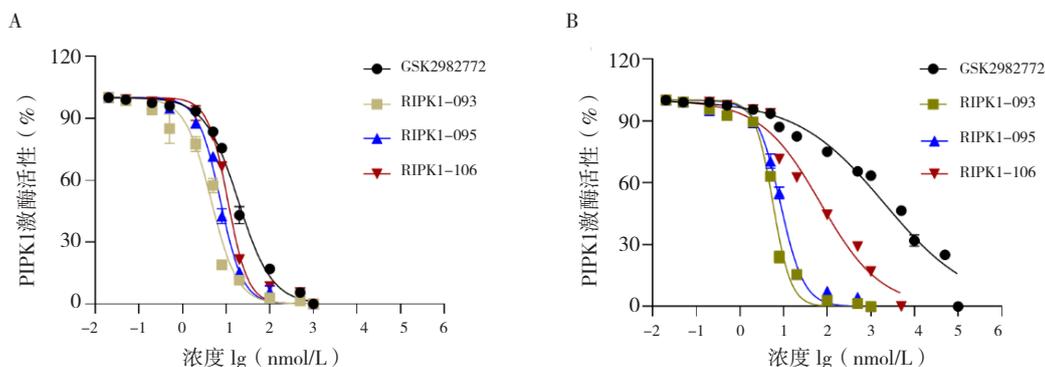


图5 RIPK1-093、095、106和GSK2982772对人（A）和小鼠（B）RIP1激酶活性抑制的影响

Figure 5. Inhibitory effect of RIPK1-093, 095, 106 and GSK2982772 on human (A) and mouse (B) RIP1 kinase activity

被抑制的情况下可诱导细胞坏死的发生^[13-14]。结果显示，RIPK1-093、095、106 的处理抑制了细胞死亡，U-937 细胞坏死抑制 IC₅₀ 分别为 4.92、2.95、6.84 nmol/L，与阳性药物 GSK2982772 有相当的活性（5.37 nmol/L）。在 L-929 细胞中，同其较低的 RIP1 激酶抑制活性一致，GSK2982772 抑制细胞坏死的活性仅为 489.40 nmol/L。而 RIPK1-093、095、106 的细胞坏死抑制 IC₅₀ 分别为 8.59、6.54、41.34 nmol/L，活性优于 GSK2982772（图 6）。

2.3 新型RIP1激酶抑制剂在全身炎症反应综合征中的治疗效果

阴性对照组小鼠体温恒定，维持在 37.01 °C 左右。模型组在静脉给予 TNF-α 后，6 h 小鼠体温下降至 27.30 °C，且 24 h 后 6 只动物全部休克

死亡。口服给予 10 mg/kg RIPK1-093、095、106 治疗，在 TNF-α 静脉注射 6 h 时 RIPK1-093、095、106 相比于模型组，分别使小鼠体温损失减少 52.12%、59.65%、64.17%，在保护小鼠体温损失方面与 GSK2982772 药效相似（体温损失减少 47.00%）。且在 24 h 时小鼠全部存活，体温分别为 35.37、35.77、35.67 °C，显著预防小鼠的体温下降，优于 GSK2982772（*P*<0.05）。给予 3 mg/kg 的 RIPK1-093、095、106 在 24 h 也均无小鼠死亡，在 TNF-α 静脉注射 6 h 时可使小鼠体温损失减少 37.37%、63.87%、56.34%，显著优于 GSK2982772（*P*<0.05）。24 h 时体温分别为 26.63、35.33、29.97 °C，而口服给予 GSK2982772 治疗的 6 只小鼠 24 h 后全部休克死亡（图 7）。

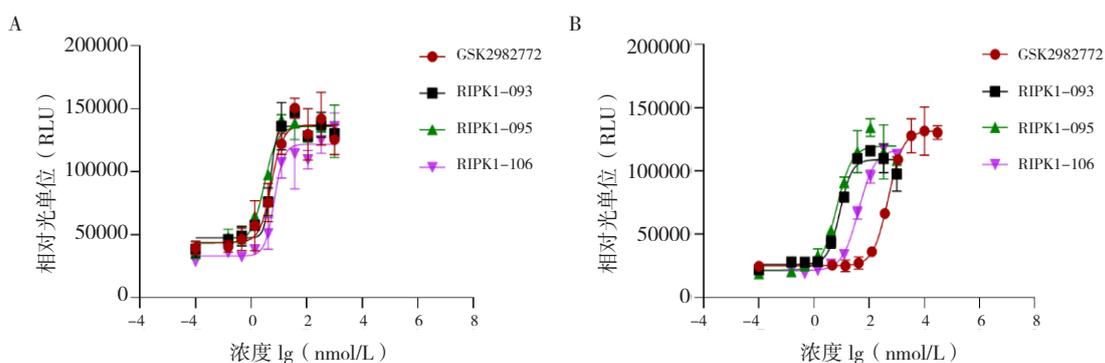


图6 RIP1激酶抑制剂对U-937细胞 (A) 和L-929细胞 (B) 的增殖抑制影响

Figure 6. Effects of RIP1 kinases inhibitors on proliferation inhibition of U-937 cells (A) and L-929 cells (B)

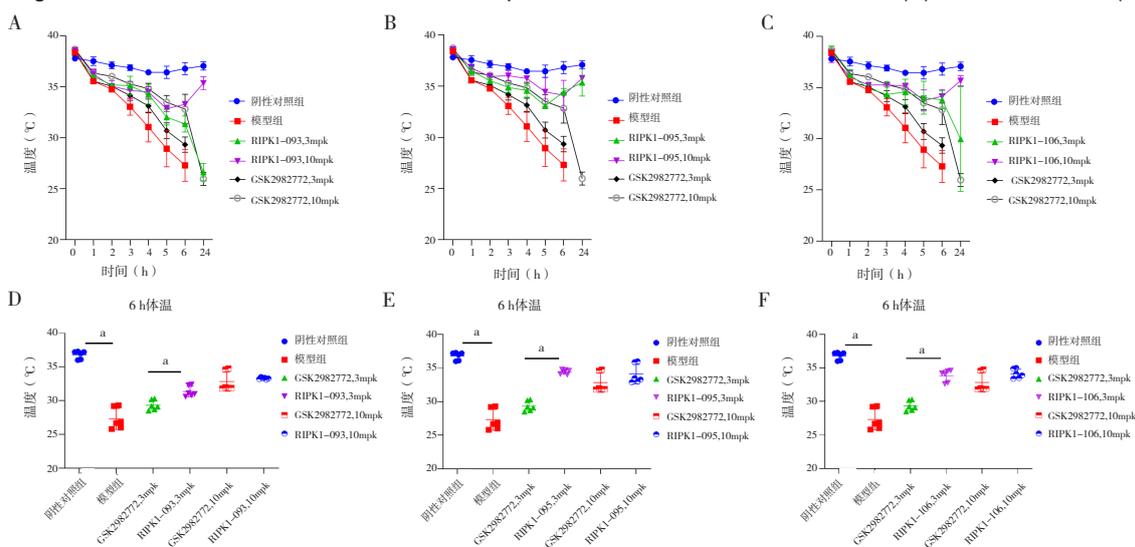


图7 RIPK1-093 (A、D)、RIPK1-095 (B、E)、RIPK1-106 (C、F) 在全身炎症反应综合征模型中的体温随时间变化曲线及显著性差异图 (n=6)

Figure 7. Curves of the temperature over time in the model of SIRS response by RIPK1-093 (A、D)、RIPK1-095 (B、E)、RIPK1-106 (C、F) and significant difference map (n=6)

注：**P*<0.0001。

2.4 新型RIP1激酶抑制剂的体内药动学分析

HPLC-MS/MS 分析方法验证结果显示, 小鼠血浆中的 RIPK1-093、095、106 在 5 ~5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好, r 大于 0.99, 定量下

限为 5 $\mu\text{g/L}$; 且该方法系统适用性、批内和批间准确度及精密度、特异性、残留各验证参数符合可接受标准, 可用于小鼠血浆中 RIPK1-093、095、106 的浓度测定^[15], 血药浓度-时间曲线具体见图 8。

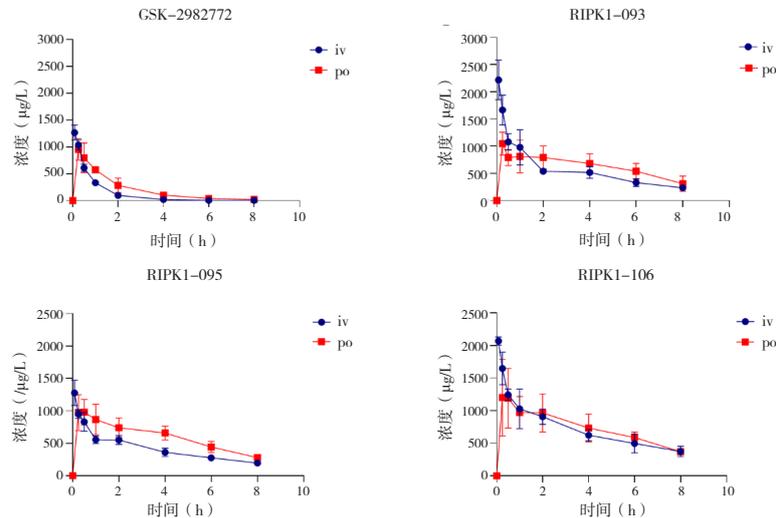


图8 静脉/口服给予剂量为1 mg/kg / 2 mg/kg的RIP1激酶抑制剂后ICR小鼠血浆药物浓度随时间变化曲线 ($n=3$)
Figure 8. Plasma drug concentration profiles over time in ICR mice after intravenous/oral administration of RIP1 kinases inhibitors at doses of 1 mg/kg / 2 mg/kg ($n=3$)

与 GSK298277 相比, 静脉给予 1 mg/kg RIPK1-093、095、106 在小鼠体内具有较低的清除率 ($P<0.05$), 可在体内进行稳定的代谢。口服给予 2 mg/kg RIPK1-093、095、106 在峰值浓

度和半衰期与阳性化合物 GSK2982772 持平, 口服暴露量显著提高 ($P<0.05$), 其中 RIPK1-106 的口服暴露量是 GSK2982772 的约 4 倍, 药动学参数见表 1 和表 2。

表1 ICR小鼠经静脉分别给药RIP1激酶抑制剂 (1 mg/kg) 后血浆中的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1. Pharmacokinetic parameters of RIP1 kinases inhibitor in plasma of ICR mice after intravenous administration at 1 mg/kg ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

参数	单位	GSK2982772	RIPK1-093	RIPK1-095	RIPK1-106
C_0	($\mu\text{g/L}$)	1 410.19 \pm 277.72	2 554.22 \pm 433.62 ^a	1 482.42 \pm 289.37	2 326.21 \pm 129.19 ^a
$AUC_{(0-t)}$	($\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$)	1 123.33 \pm 43.29	6 070.82 \pm 1 982.42 ^a	4 606.38 \pm 1 122.67 ^a	9 277.37 \pm 1 549.12 ^a
$AUC_{(0-\infty)}$	($\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$)	1 134.89 \pm 38.3	6 452.05 \pm 1 435.57 ^a	5 008.38 \pm 638.64 ^a	9 719.68 \pm 2 099.48 ^a
$T_{1/2}$	(h)	1.20 \pm 0.50	3.66 \pm 0.50 ^a	4.01 \pm 0.39 ^a	4.98 \pm 2.01 ^a
V_z	(L/kg)	1.54 \pm 0.70	0.86 \pm 0.27	1.16 \pm 0.14	0.72 \pm 0.14
CL	[L / (h \cdot kg)]	0.88 \pm 0.03	0.16 \pm 0.04 ^a	0.20 \pm 0.03 ^a	0.11 \pm 0.02 ^a

注: 与 GSK2982772 相比, ^a $P<0.05$; C_0 为 0 时血浆药物浓度; $AUC_{(0-t)}$ 为 0-t 时间内曲线下面积; $AUC_{(0-\infty)}$ 为 0-无穷大时间内曲线下面积; $T_{1/2}$ 为半衰期; V_z 为表观分布容积; CL 为清除率。

表2 ICR小鼠经口服分别给药RIP1激酶抑制剂 (2 mg/kg) 后血浆中的药动学参数 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2. Pharmacokinetic parameters of RIP1 kinases inhibitor in plasma of ICR mice after oral administration at 2 mg/kg ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

参数	单位	GSK2982772	RIPK1-093	RIPK1-095	RIPK1-106
$AUC_{(0-t)}$	($\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$)	1 879.18 \pm 372.57	6 052.29 \pm 2 271.01 ^a	6 477.42 \pm 1 729.63 ^a	8 976.03 \pm 1 236.18 ^a
$AUC_{(0-\infty)}$	($\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$)	1 912.39 \pm 397.78	7 055.67 \pm 2 556.37 ^a	6 904.04 \pm 1 083.19 ^a	9 023.66 \pm 1 218.11 ^a
$T_{1/2}$	(h)	3.02 \pm 3.19	2.99 \pm 0.86	3.08 \pm 0.29	3.10 \pm 0.31
T_{\max}	(h)	0.33 \pm 0.14	0.25 \pm 0.00	0.42 \pm 0.14	0.92 \pm 0.95
C_{\max}	($\mu\text{g/L}$)	1 034.40 \pm 115.22	1 049.00 \pm 209.67	1 017.77 \pm 249.11	1 354.17 \pm 563.80
V_z	(L/kg)	4.23 \pm 3.82	1.29 \pm 0.35	1.32 \pm 0.33	1.01 \pm 0.24
CL	[L / (h \cdot kg)]	1.08 \pm 0.25	0.32 \pm 0.14 ^a	0.29 \pm 0.05 ^a	0.22 \pm 0.03 ^a
F	(%)	83.64 \pm 16.58	49.85 \pm 18.70	70.31 \pm 18.77	48.38 \pm 6.66 ^a

注: 与 GSK2982772 相比, ^a $P<0.05$; T_{\max} 为达峰时间; C_{\max} 为药物的峰值浓度; F 为生物利用度。

3 讨论

RIP1 激酶已被证实一些炎症及自身免疫性疾病的发生发展中扮演重要角色。RIP1 激酶作为支架蛋白能够促进促分裂素原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 和核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 通路的激活, 并抑制细胞凋亡和坏死性凋亡, 同时其作为激酶又反常地诱导细胞凋亡和坏死发生^[1]。在关节炎、银屑病患者病理组织中观察到 RIP1 磷酸化的上调^[16-17]。RIP1 磷酸化介导 TNF- α 信号通路向凋亡和坏死转变, 抑制 RIP1 激酶活性可能为自身免疫性疾病和炎症性疾病带来获益。

在本研究中, 经过前期的筛选优化, 发现了活性和药动学性质较好的化合物系列 RIPK1-093、095、106。GSK2982772 对小鼠 RIP1 激酶的抑制活性弱于人源 108 倍, 与其临床前研究数据报道基本一致 (156 倍)^[14]。但 RIPK1-093、095、106 对人源和鼠源的 RIP1 激酶活性均具有较好的抑制作用, 并且在 RIP1 激酶驱动的细胞坏死模型中也进一步证实了这类新型抑制剂的效果。小鼠与人类的 RIP1 激酶存在 70% 的同源性, 小鼠 RIP1 激活环中的关键氨基酸的突变, 如 V159L、T164M、Q176L、S180D 和 S181G, 可以增强 RIP1 激酶抑制剂对啮齿类动物的抑制效力^[18]。本课题组开发的新型 RIP1 激酶抑制剂可能避开了与这些关键氨基酸位点的相互作用, 降低了种属差异。在使用啮齿类动物进行药效和安全性的研究中, 新型 RIP1 激酶抑制剂对啮齿类动物 RIP1 激酶的抑制效果显著提高了实验的可行性。

鉴于新型抑制剂优异的体外活性, 其在 TNF- α 诱导的急性致死性休克小鼠模型上进一步评估。RIP1 的激酶活性对 TNF- α 引发的坏死性凋亡至关重要^[19], 以 RIP1 介导的坏死性凋亡作为治疗 SIRS 的潜在靶标存在可能性。注射 TNF- α 导致全身性炎症反应, 表现为低血压、肝炎、体温过低和肠坏死, 已有研究证实这种急性致死性休克的保护作用具有 RIP1 激酶依赖性^[10]。RIPK1-093、095、106 在保护小鼠体温损失方面优于 GSK2982772, 特别是死亡率, GSK2982772 在 3 mg/kg 治疗剂量下, 24 h 小鼠全部死亡, 而新型抑制剂可使动物体温恢复至接近正常水平。

良好的体内药动学特征也是药物发挥药效的关键因素。在系统性炎症性疾病和自身免疫性疾病的治疗中, 血药浓度和全身血液系统的暴露量是药物发挥疗效的关键驱动因素。相同给药剂量条件下, RIPK1-093、095、106 的 AUC 显著提高, 观察到其与 GSK2982772 有相似的达峰浓度和半衰期, 新型 RIP1 激酶抑制剂 AUC 的提升可能来源于其在体内清除速率的减慢, 但生物利用度低于 GSK2982772, 在一定程度上反映出新型 RIP1 激酶抑制剂的吸收弱于 GSK2982772。在药动学测试方法方面, 为更完整的观测小鼠药时曲线, 采用连续微量采血。同时开发出微量生物样品分析方法, 每个样品前处理仅消耗 10 μ L, 在更完整药时曲线的观测方面起到积极作用。

目前, TNF- α 单抗已广泛应用于自身免疫性疾病的治疗^[20], RIP1 激酶作为 TNF- α 下游重要的调控因子, 抑制其激酶活性或许能够为这类患者带来临床获益。但值得注意的是, TNF- α 介导的 NF- κ B 激活不依赖于 RIP1 的激酶活性, 可能是 RIP1 激酶作为治疗靶标影响炎症性疾病和自身免疫性疾病治疗效果的另一个重要因素。

本研究基于结构进行药物设计, 并根据构效关系对分子进行一系列优化, 开发出一类高活性且在体内具有较好药动力学特征的新型 RIP1 激酶抑制剂。该类衍生物在体外具有较好的 RIP1 激酶抑制活性, 在 hTNF- α 诱导的 U-937 细胞坏死模型中, 抑制活性均小于 10 nmol/L, 且在动物体内有较高的暴露量和较长的半衰期, 展示出好的成药性。在 mTNF- α 诱导的 SIRS 模型中, 与 GSK2982772 相比, 具有更好的抑制全身性炎症反应的效果^[21]。该类化合物作为候选分子进行后续的临床开发, 有望为炎症性和自身免疫性疾病的治疗提供新策略。

参考文献

- 1 Shutinoski B, Alturki NA, Rijal D, et al. K45A mutation of RIPK1 results in poor necroptosis and cytokine signaling in macrophages, which impacts inflammatory responses in vivo[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(10): 1628-1637. DOI: 10.1038/cdd.2016.51.
- 2 Kondylis V, Kumari S, Vlantis K, et al. The interplay of IKK, NF- κ B and RIPK 1 signaling in the regulation of cell death, tissue homeostasis and inflammation[J]. Immunol Rev, 2017, 277(1): 113-127. DOI: 10.1111/immr.12550.
- 3 Xiaoru D, Xinxin L, Nian L, et al. Inhibition of keratinocyte

- necroptosis mediated by RIPK1/RIPK3/MLKL provides a protective effect against psoriatic inflammation[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2): 134. DOI: [10.1038/s41419-020-2328-0](https://doi.org/10.1038/s41419-020-2328-0).
- 4 Berger SB, Kasparcova V, Hoffman S, et al. Cutting edge: RIP1 kinase activity is dispensable for normal development but is a key regulator of inflammation in SHARPIN-deficient mice[J]. *J Immunol*, 2014, 192(12): 5476–5480. DOI: [10.4049/jimmunol.1400499](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400499).
- 5 Aveline F, Muhammad F, Claire P, et al. RIPK1 protects hepatocytes from death in Fas-induced hepatitis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1–4): 9205. DOI: [10.1038/s41598-017-09789-8](https://doi.org/10.1038/s41598-017-09789-8).
- 6 Chen L, Zhang X, Ou Y, et al. Advances in RIPK1 kinase inhibitors[J]. *Front Pharm*, 2022, 13: 976435. DOI: [10.3389/fphar.2022.976435](https://doi.org/10.3389/fphar.2022.976435).
- 7 Yoshikawa M, Saitoh M, Katoh T, et al. Discovery of 7-oxo-2,4,5,7-tetrahydro-6 H-pyrazolo[3,4- c]pyridine derivatives as potent, orally available, and brain-penetrating receptor interacting protein 1 (RIP1) kinase inhibitors: analysis of structure-kinetic relationships[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(6): 2384–2409. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.7b01647](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01647).
- 8 闫旭, 刘国标, 王国政, 等. 氮杂卓类稠环化合物及其医药用途: 中国专利, CN202280005442.8[P]. 2023-03-28.
- 9 Delehouz é C, Leverrier-PS, Le CF, et al. 6E11, a highly selective inhibitor of receptor-interacting protein kinase 1, protects cells against cold hypoxia-reoxygenation injury[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12931. DOI: [10.1038/s41598-017-12788-4](https://doi.org/10.1038/s41598-017-12788-4).
- 10 Harris PA, Bandyopadhyay D, Berger SB, et al. Discovery of small molecule RIP1 kinase inhibitors for the treatment of pathologies associated with necroptosis[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2013, 4(12): 1238–1243. DOI: [10.1021/ml400382p](https://doi.org/10.1021/ml400382p).
- 11 Kist M, Kőmüves LG, Goncharov T, et al. Impaired RIPK1 ubiquitination sensitizes mice to TNF toxicity and inflammatory cell death[J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(3): 985–1000. DOI: [10.1038/s41418-020-00629-3](https://doi.org/10.1038/s41418-020-00629-3).
- 12 段文丽, 丁星月, 贺雨欣, 等. 实验过程中 Balb/c 小鼠各种采血方法的比较和体会 [J]. *山西医药杂志*, 2023, 52(20): 1549–1551. [Duan WL, Ding XY, He YX, et al. Comparison and experience with various methods of blood collection in Balb/c mice during experiments[J]. *Shanxi Medical Journal*, 2023, 52(20): 1549–1551.] DOI: [10.3969/j.issn.0253-9926.2023.20.006](https://doi.org/10.3969/j.issn.0253-9926.2023.20.006).
- 13 ATran SEF, Holmstrom T H, Ahonen M, et al. MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors[J]. *J Bio Chem*, 2001, 276(19): 16484–16490. DOI: [10.1074/jbc.M010384200](https://doi.org/10.1074/jbc.M010384200).
- 14 Harris PA, Berger SB, Jeong JU, et al. Discovery of a first-in-class receptor interacting protein 1 (RIP1) kinase specific clinical candidate (GSK2982772) for the treatment of inflammatory diseases[J]. *Med Chem*, 2017, 60(4): 1247–1261. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.6b01751](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b01751).
- 15 陈亭如, 毛士龙. 体内药物分析技术在临床药学工作中的应用进展 [J]. *药学实践与服务*, 2024, 42(2): 60–65. [Chen TR, Mao SL. Application progress on in vivo drug analysis technique in clinical pharmacy[J]. *Journal of Pharmaceutical Practice and Service*, 2024, 42(2): 60–65.] DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202305039](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202305039).
- 16 Cheng J, Duan X, Fu X, et al. RIP1 perturbation induces chondrocyte necroptosis and promotes osteoarthritis pathogenesis via targeting BMP7[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 638382. DOI: [10.3389/fcell.2021.638382](https://doi.org/10.3389/fcell.2021.638382).
- 17 段晓茹. 抑制 RIPK1/RIPK3/MLKL 介导的程序性坏死在银屑病中的抗炎作用研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2020. DOI: [10.27157/d.cnki.ghzku.2020.001296](https://doi.org/10.27157/d.cnki.ghzku.2020.001296).
- 18 Harris PA, King BW, Bandyopadhyay D, et al. DNA-encoded library screening identifies benzo [b][1, 4] oxazepin-4-ones as highly potent and monoselective receptor interacting protein 1 kinase inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(5): 2163–2178. DOI: [10.1021/acs.jmedchem.5b01898](https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01898).
- 19 Polykratis A, Hermance N, Zelic M, et al. Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo[J]. *J Immunol*, 2014, 193(4): 1539–1543. DOI: [10.4049/jimmunol.1400590](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400590).
- 20 Danin JA, Hyeon L, Hye YS, et al. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2719. DOI: [10.3390/ijms22052719](https://doi.org/10.3390/ijms22052719).
- 21 Wang X, Chai Y, Guo Z, et al. A new perspective on the potential application of RIPK1 in the treatment of sepsis[J]. *Immunotherapy*, 2022, 15(1): 43–56. DOI: [10.2217/imt-2022-0219](https://doi.org/10.2217/imt-2022-0219).

收稿日期: 2024年06月14日 修回日期: 2024年08月25日
本文编辑: 李阳 钟巧妮