目录

[2.6.2 药理学总结 3](#_Toc188457682)

[2.6.2.1 概要 3](#_Toc188457683)

[2.6.2.2 主要药效学研究 4](#_Toc188457684)

[（1）DRUG001在酶学水平选择性抑制ENPP1的活性及选择性 4](#_Toc188457685)

[（2）DRUG001对内源高表达ENPP1细胞的酶活抑制研究 5](#_Toc188457686)

[（3）DRUG001在大鼠冠状动脉永久结扎诱发心肌梗死致心衰模型的体内药效试验 6](#_Toc188457687)

[（4）DRUG001在小鼠冠状动脉永久结扎诱发心肌梗死致心衰模型的体内药效试验 7](#_Toc188457688)

[（5）DRUG001在大、小鼠急性心肌梗死致心衰模型的PK/PD关系研究 8](#_Toc188457689)

[2.6.2.3 次要药效学研究 9](#_Toc188457690)

[（1）对44个靶点选择性作用的安全评估试验 9](#_Toc188457691)

[（2）对PDE家族21个相关靶点的活性评估试验 11](#_Toc188457692)

[（3）对Kinase激酶家族217个靶点的活性评估试验 12](#_Toc188457693)

[2.6.2.4 安全药理学研究 15](#_Toc188457694)

[（1）对心血管系统的影响 15](#_Toc188457695)

[（2）Beagle呼吸系统的评价 17](#_Toc188457696)

[（3）对中枢神经系统的影响 17](#_Toc188457697)

[2.6.2.5 药效学相互作用 18](#_Toc188457698)

[2.6.2.6 讨论和结论 18](#_Toc188457699)

[2.6.2.7 参考文献 19](#_Toc188457700)

表目录

表2- 1 DRUG001和实验体系阳参化合物对3种亚型ENPPs的酶活抑制IC50值 6

表2- 2 DRUG001对内源性高表达ENPP1细胞的酶活抑制IC50值 7

表2- 3 DRUG001对大鼠心肌梗死致心衰模型的影响 8

表2- 4 DRUG001对小鼠心肌梗死致心衰模型的影响 10

表2- 5 DRUG001在大鼠及小鼠急性心肌梗死致心衰模型药效的伴随PK-PD研究 12

表2- 6 DRUG001对23个GPCR、6个离子通道、3个神经递质转运体以及2个核受体靶点的影响 13

表2- 7 DRUG001对Eta受体的激动效应检测结果 15

表2- 8 DRUG001对Eta受体的拮抗效应检测结果 15

表2- 9 DRUG001对7个酶靶点抑制的检测结果 15

表2- 10 DRUG001对PDE家族217个靶点的IC50值 16

表2- 11 DRUG001对激酶家族217个靶点的抑制率 17

图目录

图 2- 1 ENPP活性及选择性的体外药效测试 7

图 2- 2大鼠急性心肌梗死致心衰模型药效测试 9

图 2- 3小鼠急性心肌梗死致心衰模型药效测试 11

图 2- 4 DRUG001在大小鼠心肌梗死致心衰模型血浆的PK-PD曲线 13

2.6.2 药理学总结

2.6.2.1 概要

DRUG001是选择性ENPP1抑制剂，主要药效学通过一系列的体内和体外试验，包括酶学活性、靶点选择性、细胞活性、大鼠及小鼠急性心肌梗死致心衰模型对DRUG001进行了评估。

体外酶学研究显示，DRUG001可以显著抑制ENPP1的活性（以ATP为底物时，IC50为3.65 nM；以TMP-pNP为底物时，IC50为0.18 nM），并且对ENPP2无明显抑制活性（IC50＞10 μM），对ENPP3的抑制活性比对ENPP1弱16倍（以TMP-pNP为底物时，IC50为2.89 nM）。DRUG001能够抑制内源性高表达ENPP1细胞的酶活， IC50为0.12 nM, 在最高浓度时（100 nM）的最大抑制率为98.09%。

在大鼠冠状动脉永久结扎诱发的心肌梗死（MI）致心衰模型的体内药效研究中，DRUG001每天灌胃给药一次，连续给药28天，无论是在早期心肌缺血损伤或后期心力衰竭过程均具有一定程度的改善作用，且呈现一定的剂量药效趋势。对于心功能指标的改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg组给药治疗的左心室射血分数第7天比模型对照组分别提高9%、13%和16%，第28天比模型对照组分别提高10%、16%和19%；对于心脏不良重构指标改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg和30 mg/kg组心肌纤维化程度比模型对照分别降低了21%、41%和53%，心体比均显著降低；对于心衰生化指标改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg和30 mg/kg组NT-proBNP水平均显著下调。

在小鼠冠状动脉永久结扎诱发的心肌梗死（MI）致心衰模型的体内药效研究中，DRUG001每天灌胃给药一次或两次，连续给药28天，无论是在早期心肌缺血损伤或后期心力衰竭过程均具有一定程度的改善作用，且呈现一定的剂量依赖性趋势。对于心功能指标的改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg, QD组和15 mg/kg，BID组给药治疗的左心室射血分数第7天比模型对照组分别提高16%、19%、31%和23%，第28天左心室射血分数比模型对照组分别提高11%、11%、18%和18%；对于心脏不良重构指标改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg, QD组和15 mg/kg，BID组的心肌纤维化程度及心体比剂量依赖性降低；对于心衰生化指标改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg, QD组和15 mg/kg，BID组的NT-proBNP水平比模型对照组显著性降低。

在大鼠、小鼠心肌梗死（MI）致心衰模型药效试验给药结束时进行的伴随PK-PD研究。结果显示，DRUG001灌胃给药后可以在体内较快的吸收。血浆的Tmax分别为2~4 h和0.5~2 h；且DRUG001在血浆暴露量随剂量增加而增加。PD指标方面，大鼠给药后，血浆中乳清酸水平在给药后4 h时即明显低于模型对照组（MI+Vehicle），降低程度具有一定的剂量相关性；小鼠给药后，血浆中乳清酸水平在给药后8 h时即明显低于模型对照组（MI+Vehicle），降低程度具有一定的剂量相关性。

次要药理学研究中，DRUG001对其他靶点的活性影响较小。考察DRUG001对同样含有PDE结构域家族的21个PDE靶点的试验中，DRUG001在终浓度为10 μM的条件下，对所有靶点没有抑制作用。对44 个靶点的safety panel试验中，DRUG001在终浓度为10 μM的条件下，对所有靶点没有结合、抑制或激动作用。对同样以ATP为底物的Kinase家族217个靶点的脱靶试验中，DRUG001在终浓度为1 μM的条件下，对所有靶点没有明显的抑制作用。

在安全药理研究中，DRUG001对Y57小鼠中枢神经系统及Beagle犬心血管系统和呼吸系统未产生影响；DRUG001对hERG电流抑制作用的IC50值大于150 μM，大于其对应游离Cmax的1563倍以上，提示引起QT延长的风险很低。以上结果表明DRUG001对三大核心系统产生影响的风险较低。

2.6.2.2 主要药效学研究

（1）DRUG001在酶学水平选择性抑制ENPP1的活性及选择性

为了验证DRUG001的ENPP1酶抑制活性，分别利用两种底物两种检测方法验证。首先以ATP为底物，AMP-Glo试剂盒检测AMP的生成，其次以TMP-pNP为底物，检测405nm吸收光产物的生成。两种方法分别测试DRUG001及实验体系的阳性对照化合物ENPP-1-IN-1在ENPP1上的抑制活性；以TMP-pNP为底物时，化合物DRUG001与ENPP-1-IN-1浓度分别从100 nM与1000 nM起始，分别进行4倍稀释和3倍稀释，10个浓度复孔测试。以ATP为底物时，化合物DRUG001与ENPP-1-IN-1浓度分别从300 nM与100000 nM起始，进行3倍稀释，10个浓度复孔测试。

进一步验证了DRUG001对ENPP1和同家族ENPP2及ENPP3抑制的选择性。对于ENPP2抑制活性，利用荧光方法测试DRUG001及实验体系阳性对照化合物HA130对酶活的抑制。对于ENPP3抑制活性，利用TMP-pNP为底物，检测405nm吸收光产物的生成，测试DRUG001及实验体系阳性对照化合物ENPP-1-IN-1对酶活的抑制。在ENPP2上，化合物DRUG001与HA130浓度从10000 nM起始，进行4倍稀释，10个浓度复孔测试。在ENPP3上以TMP-pNP为底物，化合物DRUG001与ENPP-1-IN-1浓度分别从10000 nM与100000 nM起始，分别进行4倍稀释和3倍稀释，10个浓度复孔测试。

试验结果显示，化合物DRUG001与ENPP-1-IN-1明显抑制ENPP1活性：以ATP为底物的IC50平均值分别为3.65 nM和1164.25 nM，以TMP-pNP为底物的IC50平均值分别为0.18 nM和5.32 nM。

在ENPP2上体系阳性化合物HA130的IC50平均值为59.33 nM，化合物DRUG001的IC50大于最高检测浓度（10 μM）。在ENPP3上以TMP-pNP为底物的IC50平均值分别为2.89 nM和859.70 nM。化合物DRUG001是一种有效的、选择性的ENPP1抑制剂，对ENPP2的选择性大于2741倍，对ENPP3的选择性是16倍。化合物对ENPP1/2/3抑制的IC50如表2-1和图2-1所示。（参见主要药效学资料4.2.1.1.1和4.2.1.1.2，试验编号BIO-SHYS-24-1-18 MAS(ATP)和BIO-SHYS-24-1-18 MSA(TMP-pNP)）

表2- 1 DRUG001和实验体系阳参化合物对3种亚型ENPPs的酶活抑制IC50值

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Enzyme | 底物 | IC50 (nM) | | | | | | 选择性 |
| DRUG001 | | ENPP-1-IN-1 | | HA130 | |
| 第一次/ 第二次 | 平均值 | 第一次/ 第二次 | 平均值 | 第一次/ 第二次 | 平均值 |
| ENPP1 | ATP | 5.03/2.266 | 3.65 | 1421/907.5 | 1164.25 | NA | NA | NA |
| TMP-pNP | 0.153/0.206 | 0.18 | 4.789/5.857 | 5.32 | NA | NA | NA |
| ENPP2 | LPC | >10000/>10000 | >10000 | NA | NA | 63.33/55.33 | 59.33 | ＞2741 |
| ENPP3 | TMP-pNP | 2.303/3.471 | 2.89 | 767.7/951.7 | 859.70 | NA | NA | 16 |

NA, 不适用

（2）DRUG001对内源高表达ENPP1细胞的酶活抑制研究

ENPP1蛋白主要以单次跨膜形式表达在膜上，内源全长蛋白的各种修饰可能与体外纯化的蛋白有区别，因此我们检测了DRUG001是否能抑制内源性高表达ENPP1蛋白的细胞的酶活性。利用体外培养的MDA-MB-231细胞，以TMP-pNP为底物，测试DRUG001在细胞水平的抑酶活性。

DRUG001或实验体系的阳性对照化合物ENPP-1-IN-1分别以100 nM和50000 nM为起始浓度并进行连续4倍梯度稀释，共10个浓度点孵育MDA-MB-231细胞株，细胞铺板过夜后，加入化合物、底物进行酶活反应1 h，进行产物检测。试验结果显示，DRUG001和ENPP-1-IN-1对MDA-MB-231的酶活有明显抑制作用，ENPP-1-IN-1抑制细胞酶活IC50平均值为39.61 nM, 证明检测体系有效，DRUG001抑制细胞酶活IC50平均值为0.12 nM。化合物对细胞酶活抑制详见表2-2和图2-1。（参见主要药效学资料4.2.1.1.2，试验编号BIO-SHYS-24-1-18 MSA(TMP-pNP)）

表2- 2 DRUG001对内源性高表达ENPP1细胞的酶活抑制IC50值

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 细胞株 | DRUG001 | | | | ENPP-1-IN-1 | | | |
| IC50 (nM) | | 最大抑制率，% | | IC50 (nM) | | 最大抑制率，% | |
| MDA-MB-231，底物TMP-pNP | 第一次/ 第二次 | 平均值 | 第一次/ 第二次 | 平均值 | 第一次/ 第二次 | 平均值 | 第一次/ 第二次 | 平均值 |
|
| 0.127/0.109 | 0.12 | 98.45/97.72 | 98.09 | 39.28/39.94 | 39.61 | 100.3/99.57 | 99.94 |

图 2- 1 ENPP活性及选择性的体外药效测试

A. 测定DRUG001与人类ENPP家族成员ENPP1/ENPP2/ENPP3的活性抑制,其中ENPP1和ENPP3的酶活测试底物为TMP-pNP。ENPP2的酶活测试底物为LPC；B. ENPP1以ATP为底物的活性测试, DRUG001以浓度依赖的方式抑制人ENPP1催化活性的效力曲线；C. DRUG001以浓度依赖的方式抑制内源高表达ENPP1细胞的酶活效力曲线, 酶活测试底物为TMP-pNP。

（3）DRUG001在大鼠冠状动脉永久结扎诱发心肌梗死致心衰模型的体内药效试验

利用SD雄性大鼠左前降支结扎诱导的心肌梗死（MI）致心衰体内药效模型，评价DRUG001及临床心衰标准治疗药物兼模型阳参化合物LCZ696（诺欣妥）的体内药效。灌胃给予左前降支结扎诱导的心肌梗死（MI）大鼠DRUG001， 0、3、10及30 mg/kg，以及阳性对照组LCZ696，68 mg/kg，每天1次，连续给药28天；另设假手术组（Sham），灌胃给予空白溶媒，每天1次，连续给药28天。

试验结果显示，化合物DRUG001（3 mg/kg）、DRUG001（10 mg/kg）和DRUG001（30 mg/kg）三种剂量对左前降支结扎诱导大鼠心肌梗死致心衰模型，无论是在早期心肌缺血损伤或后期心力衰竭过程均具有一定程度的改善作用且呈现一定的剂量药效趋势；临床心衰标准治疗药物兼模型阳参化合物LCZ696（诺欣妥）给药组也有显著的改善心功能及不良重构作用。对于心功能指标的改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg组和LCZ696 的68 mg/kg组给药治疗的左心室射血分数第7天比模型对照组分别提高9%、13%、16%和13%，第28天比模型对照组分别提高10%、16%、19%和11%；对于心脏不良重构指标改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg组和LCZ696组心肌纤维化程度比模型对照分别降低了21%、41%、53%和34%，心体比均显著降低；对于心衰生化指标改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg组和LCZ696 的68 mg/kg组NT-proBNP水平均显著下调。（参见主要药效学资料4.2.1.1.3，试验编号YIS-OCT-PH-20240618-01）

表2- 3 DRUG001对大鼠心肌梗死致心衰模型的影响

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量 (mg/kg) | D7左室射血 分数（%） | D28左室射血 分数（%） | 心肌纤维化 (%) | 心体比 | NT-proBNP  （pg/mL） |
| Sham +Vehicle | 0 | 84.5±3.9####\*\*\*\* | 84.8±4.6####\*\*\*\* | 4.6±1.0####\*\*\*\* | 0.27±0.0###\*\* | 874.9±226.9 #\*\* |
| MI+Vehicle | 0 | 45.9±7.1 | 42.3±8.1 | 18.2±4.9 | 0.31±0.02 | 1156.5±211 |
| MI+LCZ696 PO, QD | 68 | 59.2±8.8##\*\* | 53.4±7.4##\* | 12.0±4.2##\* | 0.27±0.02##\*\*\* | 752.7±159.9 ###\*\*\*\* |
| MI+DRUG001 PO, QD | 3 | 54.7±12.0 | 52.6±10.4#\* | 14.4±6.2 | 0.28±0.02#\* | 916.5±191.2#\* |
| 10 | 59.0±10.1##\*\* | 57.8±9.6##\*\*\* | 10.8±4.5##\*\* | 0.29±0.01# | 872.7±106.3##\*\* |
| 30 | 62.1±8.9###\*\*\* | 61.5±10.7###\*\*\*\* | 8.5±4.3###\*\*\*\* | 0.28±0.02##\*\* | 946.9±173 # |

数据以平均数±标准差（Mean ± SD）表示， N=10，（\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 vs. G2 MI+Vehicle, One-way ANOVA and Dunnett’s test。#P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001, #### P<0.0001 vs. G2 MI+Vehicle, T-test.）。

图 2- 2大鼠急性心肌梗死致心衰模型药效测试

A. 心超测试第7天的左心室射血分数LVEF (%)； B.心超测试第28天的左心室射血分数LVEF (%)；C. Masson染色测试的心肌纤维化程度, 为MI模型给药4周后测量的纤维化面积占左心室面积。D. 血清NT-proBNP水平，MI模型给药4周后采集血清测量。E. 心脏重量与体重比值，心脏重量HW，体重BW；其中，Sham组为假手术组。MI组为冠状动脉永久结扎模型组。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. G2 MI+Vehicle, One-way ANOVA and Dunnett’s test; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs. G2 MI+Vehicle, T-test.。数据以平均数±标准差（Mean ± SD）表示， N=10。

（4）DRUG001在小鼠冠状动脉永久结扎诱发心肌梗死致心衰模型的体内药效试验

利用Y57雄性小鼠左前降支结扎诱导的心肌梗死（MI）致心衰体内药效模型，评价DRUG001的体内药效。灌胃给予左前降支结扎诱导的心肌梗死（MI）小鼠DRUG001，剂量分别为 0、3、10、30 mg/kg (QD)、15 mg/kg（BID），连续给药28天。另设假手术组（Sham），灌胃给予空白溶媒，每天一次，连续给药28天。

试验结果显示，DRUG001无论是在早期心肌缺血损伤或后期心力衰竭过程均具有一定程度的改善作用，且呈现一定的剂量依赖性趋势。对于心功能指标的改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg, QD组和15 mg/kg，BID组给药治疗的左心室射血分数第7天比模型对照组分别提高16%、19%、31%和23%，第28天左心室射血分数比模型对照组分别提高11%、11%、18%和18%；对于心脏不良重构指标改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg, QD组和15 mg/kg，BID组的心肌纤维化程度及心体比剂量依赖性降低；对于心衰生化指标改善方面，DRUG001的3 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg, QD组和15 mg/kg，BID组的NT-proBNP水平比模型对照显著性降低。（参见主要药效学资料4.2.1.1.4，试验编号YIS-OCT-PH-20230921-01）

表2- 4 DRUG001对小鼠心肌梗死致心衰模型的影响

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组别 | 剂量 (mg/kg) | 频次 | D7左室射血 分数（%） | D28左室射血分数（%） | 心肌纤维化 (%) | 心体比 | NT-proBNP （pg/mL） |
| Sham+ Vehicle | 0 | QD | 80.7±8.2####\*\*\*\* | 77.4±4.4####\*\*\*\* | 3.2±0.7####\*\*\*\* | 0.40±0.04###\*\*\* | 390.7±112.8##\*\*\* |
| MI+ Vehicle | 0 | QD | 20.2±7.5 | 21.3±5.5 | 47.5±12.0 | 0.52±0.06 | 875.0±323.5 |
| MI+ DRUG001 | 3 | QD | 36.1±12.7## | 32.7±17.1 | 41.3±5.9 | 0.51±0.06 | 506.9±154.9 #\*\* |
| 10 | QD | 38.7±12.3##\* | 33.0±12.5# | 38.2±11.0 | 0.49±0.03 | 505.1±221.4#\*\* |
| 30 | QD | 51.1±16.7###\*\*\* | 38.9±16.3# | 29.3±15.1#\* | 0.45±0.02##\* | 447.4±154.5##\*\*\* |
| 15 | BID | 43.2±15.7##\*\* | 39.7±16.6#\* | 31.6±16.9#\* | 0.47±0.06 | 402.3±120.1##\*\*\* |

数据以平均数±标准差（Mean ± SD）表示，Sham组: N=6, MI组: N=8，（\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001, \*\*\*\*P<0.0001 vs. G2 MI+Vehicle, One-way ANOVA and Dunnett’s test。#P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001, #### P<0.0001 vs. G2 MI+Vehicle, T-test.）。

图 2- 3小鼠急性心肌梗死致心衰模型药效测试

A. 心超测试第7天的左心室射血分数LVEF (%)。 B.心超测试第28天的左心室射血分数LVEF (%)。C. Masson染色测试的心肌纤维化程度, 为MI模型给药4周后测量的纤维化面积占左心室面积。D. 血清NT-proBNP水平，MI模型给药4周后采集血清测量。E. 心脏重量与体重比值，心脏重量HW，体重BW; 其中，Sham组为假手术组。MI组为冠状动脉永久结扎模型组。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. G2 MI+Vehicle, One-way ANOVA and Dunnett’s test; #P<0.05, ##P<0.01, ###P<0.001 vs. G2 MI+Vehicle, T-test.。数据以平均数±标准差（Mean ± SD）表示，Sham组: N=6, MI组: N=8.

（5）DRUG001在大、小鼠急性心肌梗死致心衰模型的PK/PD关系研究

当大、小鼠左前降支结扎诱导的心肌梗死（MI）致心衰体内药效试验（主要药效学资料4.2.1.1.3与4.2.1.1.4，试验编号YIS-OCT-PH-20240618-01与YIS-OCT-PH-20230921-01）结束时，于末次给药后不同时间点，采集各组大小鼠的血浆组织样品，检测各样品中DRUG001含量，以及嘧啶合成通路中乳清酸水平。以此考察DRUG001连续给药药效后伴随的PK-PD关系，研究血浆中的药物暴露量与乳清酸水平随时间及给药剂量的变化。

试验结果显示，DRUG001以剂量3、10、30 mg/kg （QD）（大鼠）和3、10、30 mg/kg（QD）、15mg/kg（BID）（小鼠）给药后在体内较快的吸收，血浆的Tmax分别在2~4h和0.5~2 h。暴露量随剂量增加而依次增加。大鼠MI模型中，血浆中Cmax分别为62.1、265和456 ng/mL，AUC0-last分别为681、1529和2146 h·ng/mL；给药组乳清酸水平在给药后4 h时明显低于模型对照组（MI+Vehicle），相较于MI+Vehicle组82.7 ng/mL，给药组血浆乳清酸水平降低程度具有一定的剂量相关性，3/10/30 mg/kg分别为53.3、48.2和48.7 ng/mL。小鼠MI模型中，血浆中Cmax分别为1347、3277、8790和5617 ng/mL，AUC0-last分别为9573、17184、40229 和35102 h·ng/mL；给药组乳清酸水平在给药后8 h时即明显低Vehicle组。相较于MI+Vehicle组89.9 ng/mL，给药组血浆乳清酸水平降低程度具有一定的剂量相关性，3/10/30 mg/kg（QD）和15 mg/kg (BID)分别为96.2、57.8、47.6和43.2 ng/mL。乳清酸水平在各剂量组的变化与PK数据基本一致，说明给药组大、小鼠随着体内DRUG001暴露量的增加，血浆中乳清酸水平降低程度增加，显示DRUG001在体内发挥靶点相关通路的作用。（参见主要药效学资料4.2.1.1.5、4.2.1.1.6、4.2.1.1.7、4.2.1.1.8，试验编号RPT-PL24-0307-A-14 (PK)、PH-DMPK-SHYS-24-003(PD)、RPT-PL23-0589-E-16 (PK)、PH-DMPK-SHYS-24-001(PD)）

表2- 5 DRUG001在大鼠及小鼠急性心肌梗死致心衰模型药效的伴随PK-PD研究

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Parameter |  | | Group | | | | | | |
| Rat MI Model | | | |  | Mouse MI Model | | | |
| 3 mg/kg QD | 10 mg/kg QD | | 30 mg/kg QD |  | 3 mg/kg QD | 10 mg/kg QD | 30 mg/kg QD | 15 mg/kg BID |
| Plasma Cmax (ng/mL) | 62.1 | 265 | | 456 |  | 1347 | 3277 | 8790 | 5617 |
| Plasma AUC0-last (h·ng/mL) | 681 | 1529 | | 2146 |  | 9573 | 17184 | 40229 | 35102 |
| LVEF (%), Day 7 | 54.7 | 59.0 | | 62.1 |  | 36.1 | 38.7 | 51.1 | 43.2 |
| LVEF (%), Day 28 | 52.6 | 57.8 | | 61.5 |  | 32.7 | 33.0 | 38.9 | 39.7 |
| Orotic Acid (ng/mL) | 53.3 | 48.2\* | | 48.7\* |  | 96.2 | 57.8\*\*\* | 47.6\*\*\* | 43.2\*\*\* |

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 vs. MI Vehicle, T-test.

A B

图 2- 4 DRUG001在大小鼠心肌梗死致心衰模型血浆的PK-PD曲线

A．大鼠急性心肌梗死致心衰模型；B.小鼠急性心肌梗死致心衰模型。左侧纵坐标为反映心脏功能的左室射血分数LVEF（%），右侧纵坐标为PD指标的乳清酸水平，以柱形图表述血浆DRUG001的暴露量。DRUG001分别在大鼠MI模型以3、10及30 mg/kg（QD）和在小鼠MI模型以3、10、30 mg/kg（QD）及15 mg/kg（BID）剂量给药后，大小鼠血浆中的暴露量剂量依赖性的增加；血浆中乳清酸水平剂量依赖性的降低。

2.6.2.3 次要药效学研究

（1）对44个靶点选择性作用的安全评估试验

为了全面评估DRUG001的体外药理学安全性，根据四大国际知名药企（葛兰素史克，辉瑞，诺华以及阿斯利康）推荐应用于早期体外安全性评价的靶标，选取的44个靶标，检测DRUG001的脱靶作用。包括24个GPCR靶标，3个神经递质转运体，2个核受体，7个酶以及8个离子通道靶点。分别利用放射性同位素配体结合实验检测DRUG001对23个GPCR、8个离子通道、3个神经递质转运体以及2个核受体靶点的影响；利用钙流检测实验检测DRUG001对Eta靶点的影响；利用体外生化平台检测DRUG001对7个酶靶点的影响。试验结果显示，DRUG001在终浓度为10 μM的条件下（仅对Eta激动作用的测试浓度为12 μM）时，对44个靶点均没有明显的结合或抑制作用（抑制率＜50%）或激动作用（激动率＜50%）。化合物对44个靶点的活性结果如表2-6，表2-7，表2-8，表2-9所示。（参见次要药效学资料4.2.1.2.1，试验编号SHYSYY-20230829）

表2- 6 DRUG001对23个GPCR、6个离子通道、3个神经递质转运体以及2个核受体靶点的影响

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Target | DRUG001 | | Reference | | | |
| Dose (nM) | Ave\_% Inh | Reference name | Max dose (nM) | %Inh @Max dose | IC50 (nM) |
| Alpha2A | 10000 | -11.26 | Yohimbine | 1000 | 100.24 | 2.657 |
| NET | 10000 | -2.35 | Protriptyline | 1000 | 100.05 | 13.59 |
| V1A | 10000 | 8.17 | [d(CH2)51, Tyr(Me)2]-AVP | 100 | 95.06 | 1.117 |
| CCKa | 10000 | 3.30 | CCK-8s | 100 | 99.94 | 0.3910 |
| NMDA (MK-801) | 10000 | -1.44 | MK-801 | 1000 | 111.83 | 11.95 |
| Cav1.2 (Dihydropyridine Site) | 10000 | -0.03 | Nitrendipine | 100 | 105.44 | 0.9515 |
| 5-HT2B | 10000 | -20.93 | (±) DOI | 10000 | 101.00 | 38.36 |
| 5-HTT | 10000 | -5.22 | Imipramine | 1000 | 100.48 | 1.634 |
| DAT | 10000 | 36.45 | BTCP | 1000 | 103.83 | 7.004 |
| hERG | 10000 | -7.73 | Dofetilide | 1000 | 98.83 | 2.350 |
| 5-HT2A | 10000 | -8.73 | Ketanserin | 100 | 99.91 | 1.430 |
| H1 | 10000 | -8.76 | Pyrilamine | 1000 | 100.44 | 2.717 |
| M1 | 10000 | 15.35 | Pirenzepine | 1000 | 98.33 | 28.22 |
| M2 | 10000 | -9.67 | Methoctramine | 1000 | 108.70 | 4.063 |
| M3 | 10000 | -11.17 | 4-DAMP | 250 | 98.97 | 0.9687 |
| AR | 10000 | 2.64 | Progesterone | 1000 | 100.49 | 9.947 |
| GR | 10000 | 12.27 | Dexamethasone | 100 | 101.54 | 1.582 |
| ADORA2A | 10000 | -4.10 | CGS 15943 | 1000 | 94.52 | 2.323 |
| Alpha1A | 10000 | 0.86 | WB 4101 | 100 | 106.02 | 1.447 |
| GABAA (α1β3γ2) | 10000 | -0.13 | Flumazenil | 1000 | 100.08 | 2.768 |
| D1 | 10000 | 3.89 | SCH 23390 | 100 | 101.55 | 0.6861 |
| D2L | 10000 | 2.37 | 7-OH-DPAT | 1000 | 100.67 | 4.163 |
| op-delta | 10000 | 4.00 | Naltrindole | 100 | 104.13 | 0.2454 |
| op-kappa | 10000 | -13.37 | U-50488 | 1000 | 100.34 | 9.325 |
| op-mu | 10000 | 4.48 | DAMGO | 100 | 101.41 | 0.2981 |
| 5-HT3 | 10000 | -11.26 | MDL 72222 | 10000 | 103.62 | 10.12 |
| 5-HT1B | 10000 | -2.35 | Serotonin | 10000 | 100.42 | 53.21 |
| H2 | 10000 | 8.17 | Cimetidine | 50000 | 101.21 | 305.6 |
| Beta1 | 10000 | 3.30 | Atenolol | 10000 | 100.33 | 799.0 |
| Beta2 | 10000 | -1.44 | ICI 118551 | 1000 | 99.81 | 2.268 |
| nAChR-Alpha7 | 10000 | -0.03 | MLA | 1000 | 103.07 | 8.216 |
| 5-HT1A | 10000 | -20.93 | 8-OH-DPAT | 100 | 104.52 | 0.1670 |
| CB1 | 10000 | -5.22 | CP 55940 | 500 | 98.13 | 0.5327 |
| CB2 | 10000 | 36.45 | WIN 55212-2 | 500 | 98.90 | 1.065 |
| Na+ | 10000 | -7.73 | Tetrodotoxin | 1000 | 99.88 | 11.02 |
| Kv | 10000 | -8.73 | Charybdotoxin | 1000 | 97.43 | 23.59 |

表2- 7 DRUG001对Eta受体的激动效应检测结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Agonist-Target | DRUG001 | Reference | | | |
| Act%@12 μM | Reference ID | Max dose (nM) | Act% @Max dose | EC50 (nM) |
| Eta | -0.14 | Endothelin 1 | 300 | 100.04 | 1.113 |

表2- 8 DRUG001对Eta受体的拮抗效应检测结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Antagonist-Target | DRUG001 | Reference | | | |
| Inh% @10 μM | Reference ID | Max dose (nM) | Inh% @Max dose | IC50 (nM) |
| Eta | -16.17 | BQ-123 | 75 | 100.84 | 2.323 |

表2- 9 DRUG001对7个酶靶点抑制的检测结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Target | DRUG001 | | Reference | | | |
| Dose (nM) | Ave\_% Inh | Reference name | Max dose (nM) | %Inh @Max dose | IC50 (nM) |
| ACHE | 10000 | 9.51 | Neostigmine bromide | 50000 | 100.13 | 82.33 |
| COX1 | 10000 | 7.22 | Diclofenac | 5000 | 94.12 | 65.06 |
| COX2 | 10000 | 2.02 | NS-398 | 150000 | 96.60 | 1141 |
| LCK | 10000 | -1.45 | Stausporine | 500 | 97.36 | 2.529 |
| MAO-A | 10000 | -5.32 | Clorgyline | 500 | 99.37 | 1.253 |
| PDE3A | 10000 | 10.85 | Trequinsin | 20 | 101.35 | 0.1191 |
| PDE4D2 | 10000 | 2.94 | Roflumilast | 20 | 94.21 | 0.1997 |

（2）对PDE家族21个相关靶点的活性评估试验

为了进一步评估DRUG001对其他含有PDE结构域的PDE家族成员的抑制活性，在体外检测了DRUG001对21个靶点（PDE1A、PDE1B、PDE1C、PDE2A1、PDE3A、PDE3B、PDE4A1、PDE4B1、PDE4B2、PDE4C1、PDE4D2、PDE4D3、PDE5A1、PDE6C、PDE7A1、PDE7B、PDE8A1、PDE9A2、PDE10A1、PDE10A2和PDE11A4）的抑制活性。分别利用FP方法，化合物DRUG001浓度从10 μM起始，进行3倍稀释10个浓度复孔测试检测其IC50。结果显示，化合物DRUG001在靶点PDE1A、PDE1B、PDE1C、PDE2A1、PDE3A、PDE3B、PDE4A1、PDE4B1、PDE4B2、PDE4C1、PDE4D2、PDE4D3、PDE5A1、PDE6C、PDE7A1、PDE7B、PDE8A1、PDE9A2、PDE10A1、PDE10A2和PDE11A4上的IC50均大于10000 nM，在10 μM时对上述靶点均无显著抑制。化合物对21个PDE家族靶点的抑制结果如表2-10所示。（参见次要药效学资料4.2.1.2.2，试验编号YSCA-2024020401）

表2- 10 DRUG001对PDE家族217个靶点的IC50值

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Assay name | Compounds ID | | IC50(nM) | Comments | |
| PDE1A | Bay 60-7550 | | 280.3 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE1B | Bay 60-7550 | | 329.9 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE1C | Bay 60-7550 | | 46.45 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE2A1 | Bay 60-7550 | | 0.7409 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE3A | Cilostamide | | 85.07 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE3B | Cilostamide | | 127.3 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE4A1 | Roflumilast | | 1.424 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE4B1 | Roflumilast | | 3.604 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE4B2 | Roflumilast | | 0.5872 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE4C1 | Roflumilast | | 11.64 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE4D2 | ML-030 | | 1.525 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE4D3 | ML-030 | | 8.027 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE5A1 | Sildenafil citrate | | 19.83 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE6C | Sildenafil citrate | | 31.8 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE7A1 | BRL-50481 | | 2303 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE7B | Dipyridmole | | 44733 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE8A1 | Dipyridmole | | 14906 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE9A2 | BAY-73-6691 | | 247.9 | Reference | |
| DRUG001 | | >10000 |  | |
| PDE10A1 | TP-10 | 9.335 | | | Reference |
| DRUG001 | >10000 | | |  |
| PDE10A2 | TP-10 | 5.781 | | | Reference |
| DRUG001 | >10000 | | |  |
| PDE11A4 | Dipyridmole | 3429 | | | Reference |
| DRUG001 | >10000 | | |  |

（3）对Kinase激酶家族217个靶点的活性评估试验

为了进一步评估DRUG001对以ATP为底物的激酶家族的抑制活性，在体外检测了DRUG001对217个激酶靶点的抑制活性。利用HTRF或ADP-GLO方法检测DRUG001对激酶的活性抑制。试验结果显示，化合物DRUG001在在1 μM 的检测浓度下，化合物DRUG001 对217 个靶点组成的激酶谱抑制活性测试中，对217 个靶点均无明显的抑制效果，抑制率均小于50%，没有表现出抑制效果。化合物对217个激酶靶点的抑制结果如表2-11所示。（参见次要药效学资料4.2.1.2.3，试验编号YSCA-2024020101）

表2- 11 DRUG001对激酶家族217个靶点的抑制率

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Kinase | DRUG001 | Kinase | DRUG001 |
| (Ave\_%inhibition@1 μM) | (Ave\_%inhibition@1 μM) |
| DCAMKL1 | 30.39 | YES | 3.45 |
| AurC | 28.55 | KIT | 3.35 |
| Erk7 | 27.81 | CK2α2/β | 3.31 |
| ALK | 23.14 | KHS1 | 2.96 |
| BLK | 20.62 | SIK | 2.9 |
| AMPKα2/β1/γ1 | 17.49 | CDK4/CycD1 | 2.87 |
| CaMK1α | 17.34 | ABL1 | 2.78 |
| CDK2/CycE1 | 17.13 | AKT1 | 2.66 |
| TAOK2 | 16.86 | ACK | 2.65 |
| MARK3 | 16.7 | GSK3α | 2.55 |
| ABL2 | 16.35 | MAPKAPK5 | 2.38 |
| ZAP70 | 16.29 | CLK3 | 2.24 |
| p38β | 15.54 | Nuak2 | 1.96 |
| EPHA4 | 15.07 | TEC | 1.92 |
| TXK | 14.34 | TRKB | 1.89 |
| CK1γ2 | 13.7 | RSK2 | 1.76 |
| CaMK2α | 13.54 | IGF1R | 1.41 |
| JNK1 | 13.43 | p38γ | 1.34 |
| CK1α | 13.23 | BTK | 1.3 |
| EGFR | 12.92 | CHK2 | 1.16 |
| TTK | 12.8 | BRK | 1.1 |
| TNIK | 12.45 | BRAF | 1.02 |
| EPHA5 | 12.25 | LYNa | 1 |
| HIPK3 | 11.8 | AMPKα1/β1/γ1 | 1 |
| DYRK3 | 11.78 | P38α | 0.97 |
| BRSK2 | 11.47 | MAPKAPK2 | 0.91 |
| DCAMKL2 | 11.46 | MLK3 | 0.9 |
| MAP2K1 | 11.27 | DYRK1B | 0.61 |
| PIM1 | 11.24 | FRK | 0.55 |
| NEK9 | 10.97 | NuaK1 | 0.39 |
| LOK | 10.92 | SRC | 0.27 |
| ULK3 | 10.84 | IRAK4 | 0.19 |
| NEK1 | 10.46 | PKCα | 0.17 |
| TAOK1 | 10.42 | EPHA2 | -0.08 |
| PIM2 | 10.37 | HER4 | -0.42 |
| PAK3 | 10.3 | MST1 | -0.46 |
| RON | 10.15 | CK1γ3 | -0.56 |
| CSK | 10.14 | DDR1 | -0.77 |
| BMX | 9.82 | ROS | -0.78 |
| CDK3/CycE1 | 9.5 | HCK | -0.94 |
| ROCK2 | 9.44 | MINK | -1.23 |
| CRAF | 9.22 | SRM | -1.27 |
| AurB | 9.21 | Erk5 | -1.43 |
| MARK2 | 9.21 | MRCKβ | -1.57 |
| SYK | 9.11 | MAP3K3 | -1.71 |
| CK1δ | 9 | GLK | -1.73 |
| PYK2 | 8.65 | FGFR2 | -1.73 |
| MET | 8.63 | PLK1 | -2.32 |
| AKT2 | 8.63 | MAP3K19 | -2.6 |
| ALK4 | 8.62 | MST3 | -2.62 |
| MARK4 | 8.62 | EPHB2 | -2.64 |
| FLT1 | 8.56 | DDR2 | -2.65 |
| TAOK3 | 8.38 | IRAK1 | -2.68 |
| RSK4 | 8.36 | PIM3 | -2.77 |
| ULK2 | 8.04 | CDK16/CycY | -2.95 |
| FER | 8.01 | EPHA1 | -2.95 |
| NIM1K | 7.89 | PAK5 | -2.96 |
| SLK | 7.62 | PKD2 | -3.16 |
| OSR1 | 7.47 | EPHA3 | -3.37 |
| CSF1R | 7.41 | HIPK2 | -3.57 |
| CK1ε | 7.39 | LCK | -3.68 |
| JAK1 | 7.32 | HGK | -3.76 |
| INSR | 7.29 | MST2 | -3.79 |
| FLT3 | 7.12 | TIE2 | -3.84 |
| MSK1 | 6.79 | TRKA | -4.03 |
| PAK2 | 6.78 | JAK3 | -4.07 |
| EPHB1 | 6.63 | JNK3 | -4.19 |
| CDK1/CycA2 | 6.6 | PAK4 | -4.35 |
| FGFR4 | 6.54 | IRR | -4.58 |
| CLK4 | 6.14 | PKD1 | -4.59 |
| RET | 6.14 | FGFR1 | -5.51 |
| FYN [isoform a] | 6.03 | TSSK1 | -5.73 |
| ITK | 6.01 | QIK | -5.88 |
| MAP3K2 | 5.91 | p38δ | -5.94 |
| CHK1 | 5.84 | HIPK4 | -6.07 |
| MER | 5.81 | MRCKα | -6.16 |
| CDK13/CycK | 5.73 | ErK1 | -6.5 |
| TYK2 | 5.68 | EPHB3 | -6.79 |
| CK2α1/β | 5.58 | EPHA8 | -7.19 |
| NEK2 | 5.55 | p70S6K | -7.57 |
| CDK9/CycT1 | 5.54 | FAK | -7.68 |
| HIPK1 | 5.53 | PAK1 | -7.69 |
| MLK1 | 5.32 | CK1γ1 | -7.75 |
| AXL | 5.23 | MAP4K2 | -7.97 |
| CDK18/CycY | 5.14 | FES | -7.98 |
| BRSK1 | 5.14 | TGFβR2 | -8.18 |
| AKT3 | 5.1 | PKD3 | -8.41 |
| JAK2 | 5.09 | ROCK1 | -8.48 |
| PKACα | 5.08 | PLK3 | -8.54 |
| KDR | 5.02 | JNK2 | -8.62 |
| CDK7/CCNH/MNAT1 | 4.94 | DYRK4 | -9.44 |
| HPK1 | 4.89 | DYRK2 | -10.19 |
| SGK | 4.74 | SGK2 | -10.94 |
| GSK3β | 4.66 | TGFβR1 | -10.94 |
| YSK1 | 4.52 | PDGFRα | -11.69 |
| ZAK | 4.43 | RSK3 | -11.85 |
| TYRO3 | 4.38 | SGK3 | -11.88 |
| AurA | 4.27 | FLT4 | -12.34 |
| CLK1 | 4.15 | MARK1 | -13.08 |
| TBK1 | 4.1 | EPHA7 | -13.12 |
| DAPK1 | 4.06 | PKCβ1 | -13.54 |
| PKR | 4.02 | HER2 | -13.88 |
| CDK5/p35NCK | 3.86 | PDGFRβ | -14.5 |
| PLK4 | 3.85 | FGR | -16.07 |
| TRKC | 3.84 | MUSK | -18.13 |
| RSK1 | 3.81 | FGFR3 | -18.66 |
| CDK12/CycK | 3.7 | EPHA6 | -19.73 |
| DYRK1A | 3.67 | EPHB4 | -22.72 |
| CDK6/CycD1 | 3.5 |  |  |

2.6.2.4 安全药理学研究

（1）对心血管系统的影响

1）体外hERG钾离子通道效应

本试验设阴性对照组、阳性对照组、DRUG001低、次低、中、次高、高剂量组。在本试验体系下，阴性对照组、阳性对照组分别给予0.1% DMSO细胞外液、1 µM的特非那定（Terfenadine）工作液，DRUG001各组分别给予含DRUG001浓度为3、10、30、100、150 µM的工作液。阴性对照组和DRUG001各组选用5个符合数据质量标准的HEK293细胞，每个待测细胞按从低浓度到高浓度的顺序依次加入阴性对照、DRUG001低、次低、中、次高、高剂量，加药体积为40 µL/次，加药2次，药物作用时间设为180 s。另选用3个符合数据质量标准的HEK293细胞进行阳性对照品的检测。根据方案要求，采用全细胞膜片钳记录各组细胞hERG钾电流，检测DRUG001各组对hERG钾电流的抑制作用。

阴性对照组0.1% DMSO细胞外液对hERG钾电流无明显抑制（平均抑制率为-1.98±0.96%），阳性对照组1 µM特非那定（Terfenadine）对hERG钾电流的平均抑制率为76.65±6.19%，证明本次试验体系稳定可靠，测试结果准确。DRUG001对hERG钾电流的抑制率范围为9.05%~19.90%，计算其IC50大于>150 µM。

与小鼠药效试验有效剂量3 mg/kg对应的Cmax均值1347 ng/mL（3 μM）相比，DRUG001对hERG电流的IC50大于其对应游离Cmax的1563倍以上（小鼠血浆蛋白结合率为96.8%，Cmax游离=0.096 μM），该安全窗提示引起QT延长的风险很低。

（参见安全药理学资料4.2.1.3.1，试验编号T2401355）

2）Beagle心血管系统评价

本试验设溶媒对照组、DRUG001低、中、高剂量组（给药剂量分别为0、20、50、100 mg/kg），将8只Beagle犬（雌、雄各半）采用4×8改良拉丁方设计分批次给药，每个给药阶段各组均以5 mL/kg体积经口灌胃给予溶媒对照品和或相应浓度的DRUG001，每阶段每组各2只动物，雌、雄各半。洗脱7天后进行下一阶段给药。试验期间，每天观察各组动物的一般状态；每批次给药前进行体重测定；并于每次给药前、给药后约1 h、2 h、4 h、8 h、24 h、144 h，各测定1次心电图（II导联）、血压指标。观察DRUG001对Beagle犬心血管及呼吸系统指标，包括心率、RR间期、PR间期、QRS间期、QT间期、校正QT间期（QTcF = QT/RR1/3）、收缩压、舒张压、平均动脉压的影响，每个时间点数据进行统计分析，并进行安全药理学分析。

试验期间各检测点，DRUG001各组动物心电图指标，如心率、RR间期、PR间期、QRS间期、QT间期、校正QT间期；血压方面指标，如收缩压、舒张压、平均动脉压等均未见与受试物相关的明显异常改变。

因此，在本试验条件下，Beagle犬单次经口灌胃给予20、50、100 mg/kg剂量的DRUG001，未见明显对心血管系统的不良影响。

（参见安全药理学资料4.2.1.3.2，试验编号T2401353）

（2）Beagle呼吸系统的评价

本试验设溶媒对照组、DRUG001低、中、高剂量组（给药剂量分别为0、20、50、100 mg/kg），将8只Beagle犬（雌、雄各半）采用4×8改良拉丁方设计分批次给药，每个给药阶段各组均以5 mL/kg体积经口灌胃给予溶媒对照品和或相应浓度的DRUG001，每阶段每组各2只动物，雌、雄各半。洗脱7天后进行下一阶段给药。试验期间，每天观察各组动物的一般状态；每批次给药前进行体重测定；并于每次给药前、给药后约1 h、2 h、4 h、8 h、24 h、144 h，各测定1次呼吸指标。观察DRUG001对Beagle犬呼吸系统指标，包括呼吸频率、潮气量、每分钟通气量等的影响，每个时间点数据进行统计分析，并进行安全药理学分析。

试验期间各检测点，DRUG001各组动物呼吸方面指标，如呼吸频率、潮气量、每分钟通气量等均未见与受试物相关的明显异常改变。

因此，在本试验条件下，Beagle犬单次经口灌胃给予20、50、100 mg/kg剂量的DRUG001，未见明显对呼吸系统的不良影响。

（参见安全药理学资料4.2.1.3.2，试验编号T2401353）

（3）对中枢神经系统的影响

本试验将40只Y57小鼠按体重随机分为溶媒对照组、DRUG001低、中、高剂量组（给药剂量分别为0、20、60、120 mg/kg），共4组，每组10只小鼠，雌雄各半。各组均按10 mL/kg体积经口单次灌胃分别给予溶媒对照品和相应浓度的DRUG001和溶媒对照品。

试验期间，每天观察各组动物的一般状况；给药前进行体重测定；给药前及给药后约0.5 h、2 h、8 h、24 h、72 h采用神经功能组合试验（Functional Observational Battery，FOB）观察受试物对小鼠中枢神经系统功能的影响，包括：动物运动功能、行为改变、感觉/运动反射和体温等；并于给药前及给药后约0.5 h、24 h、72 h（每时间点FOB检测后），采用十鼠通用自发活动视频分析系统观察药物对动物自发活动的影响，同时记录动物自发活动情况，采集活动包括总路程（mm）、平均速度（mm/s）、活动次数、活动时间（s）、休息时间（s）、总时间（s）。

试验期间各检测时间点，DRUG001各试验组小鼠行为方面指标、神经方面指标、自主体征指标、体温及自发活动指标均未见受试物相关的明显异常改变。

因此，在本试验条件下，Y57小鼠单次经口灌胃给予20、60、120 mg/kg剂量的DRUG001，未见对中枢神经系统的明显不良影响。

（参见安全药理学资料4.2.1.3.3，试验编号T2401352）

综上所述，在安全药理研究中，DRUG001对Y57小鼠中枢神经系统及Beagle犬心血管和呼吸系统未产生影响，在体外hERG电流抑制作用的IC50/Cmax游离大于1563倍以上，表明DRUG001对三大核心系统潜在影响的风险较低。

2.6.2.5 药效学相互作用

暂未开展相关研究。

2.6.2.6 讨论和结论

ENPP1在心脏损伤后修复中发挥重要作用。一方面，通过靶向ENPP1/AMP途径来挽救嘧啶生物合成，诱导心脏的全器官代谢和转录重编程，从而增强心肌细胞呼吸，减少梗死心脏的细胞死亡和纤维化，增强心脏损伤后的修复和梗死后的心脏功能[1][2]。另一方面，通过靶向ENPP1-PPi-Pi轴，减少异位心脏钙化并保护损伤后的心脏功能[3]。靶向ENPP1的治疗方法，针对细胞串扰的设计方式，使心脏中的多种细胞类型受益[2]，包括心肌细胞、形成血管的内皮细胞和成纤维细胞，可以在发生心梗后关键的最初几天进行自我修复，较于目前侧重于预防进一步损伤但不积极促进愈合的疗法，这是靶向ENPP1治疗的优势，也使其可能成为第一种直接增强心脏病发作后心脏组织修复的方法，因此ENPP1抑制剂在急性心梗及心梗后心衰领域临床治疗意义重大。

体外活性显示DRUG001较高的酶抑制活性：DRUG001为选择性ENPP1抑制剂，DRUG001可以显著抑制ENPP1的活性（以ATP为底物时，IC50为3.65 nM；以TMP-pNP为底物时，IC50为0.18 nM），并且对ENPP2无明显抑制活性（IC50＞10 μM），对ENPP3的 IC50为2.89 nM（以TMP-pNP为底物），相对于ENPP1的选择性为16倍。

在细胞水平，DRUG001能够抑制内源性高表达ENPP1细胞的酶活， IC50为0.12 nM, 在最高浓度时（100 nM）的最大抑制率平均为98.09%。

DRUG001对大鼠及小鼠冠状动脉永久结扎诱发的急性心梗（MI）致心衰模型作用：DRUG001无论是在早期心肌缺血损伤或后期心力衰竭过程均具有一定程度的改善作用，可以剂量依赖的改善心脏功能，提高左心室射血分数、短轴缩短率；改善心脏不良重构，降低心肌纤维化、降低心脏肥大；改善心衰相关生化指标，降低NT-proBNP水平；且在大鼠、小鼠MI模型，DRUG001的起效剂量最低为3 mg/kg。尤其的，DRUG001的高剂量组对于心脏功能的改善显示出比心衰标准治疗的药物LCZ696（诺欣妥）效果更优趋势。

DRUG001体外的靶标选择性较优：在PDE家族21个靶点作用的结果显示， DRUG001对21个靶点无明显抑制。在44个safety panel靶点作用的结果显示，DRUG001对44个靶点无明显结合、抑制或激动。在217个激酶靶点作用的结果显示，DRUG001对217个靶点无明显抑制。预计发生靶点以外临床不良反应事件的风险较小。

DRUG001对心血管系统、呼吸系统和中枢神经系统的风险较低：安全药理学试验中，DRUG001对动物的中枢神经系统、呼吸系统和心血管系统均无药物相关影响。

总之，DRUG001是一个高选择性的ENPP1抑制剂，同时也是ENPP1靶点在急性心梗后心衰适应症领域的全新机制First in class小分子抑制剂。安全药理学研究表明，DRUG001不会对患者心血管系统、呼吸系统和中枢神经系统产生不良影响。药理实验表明DRUG001对大鼠、小鼠冠状动脉永久结扎诱发的心肌梗死致心衰模型有提高心脏功能的作用，并能进一步减缓心衰的恶化。证实了DRUG001用于治疗急性心肌梗死后心衰的药理活性，并为可能扩展用于其他心肌缺血引发的心脏疾病的治疗以及与其他治疗心梗心衰药物联合给药提供了依据。

2.6.2.7 参考文献

[1] Li S, Yokota T, Wang P, Ten Hoeve J, Ma F, Le TM, Abt ER, Zhou Y, Wu R, Nanthavongdouangsy M, Rodriguez A, Wang Y, Lin YJ, Muranaka H, Sharpley M, Braddock DT, MacRae VE, Banerjee U, Chiou PY, Seldin M, Huang D, Teitell M, Gertsman I, Jung M, Bensinger SJ, Damoiseaux R, Faull K, Pellegrini M, Lusis AJ, Graeber TG, Radu CG, Deb A. Cardiomyocytes disrupt pyrimidine biosynthesis in nonmyocytes to regulate heart repair. J Clin Invest. 2022 Jan 18;132(2):e149711. doi: 10.1172/JCI149711. PMID: 34813507; PMCID: PMC8759793.

[2] Li S, Tao B, Wan J, Montecino-Rodriguez E, Wang P, Ma F, Sun B, Gu Y, Ramadoss S, Su L, Sun Q, Hoeve JT, Stiles L, Collins J, van Dam RM, Tamboline M, Taschereau R, Shirihai O, Kitchen DB, Pellegrini M, Graeber T, Dorshkind K, Xu S, Deb A. A humanized monoclonal antibody targeting an ectonucleotidase rescues cardiac metabolism and heart function after myocardial infarction. Cell Rep Med. 2024 Oct 17:101795. doi: 10.1016/j.xcrm.2024.101795. Epub ahead of print. PMID: 39454569.

[3] Pillai ICL, Li S, Romay M, Lam L, Lu Y, Huang J, Dillard N, Zemanova M, Rubbi L, Wang Y, Lee J, Xia M, Liang O, Xie YH, Pellegrini M, Lusis AJ, Deb A. Cardiac Fibroblasts Adopt Osteogenic Fates and Can Be Targeted to Attenuate Pathological Heart Calcification. Cell Stem Cell. 2017 Feb 2;20(2):218-232.e5. doi: 10.1016/j.stem.2016.10.005. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27867037; PMCID: PMC5291784.