

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5964952号
(P5964952)

(45) 発行日 平成28年8月3日(2016.8.3)

(24) 登録日 平成28年7月8日(2016.7.8)

(51) Int.Cl.	F I
A 6 1 K 31/4196 (2006.01)	A 6 1 K 31/4196
A 6 1 K 31/549 (2006.01)	A 6 1 K 31/549
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06
A 6 1 K 31/4035 (2006.01)	A 6 1 K 31/4035
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519

請求項の数 9 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-512951 (P2014-512951)
(86) (22) 出願日	平成24年5月22日(2012.5.22)
(65) 公表番号	特表2014-515376 (P2014-515376A)
(43) 公表日	平成26年6月30日(2014.6.30)
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/039011
(87) 国際公開番号	W02012/162323
(87) 国際公開日	平成24年11月29日(2012.11.29)
審査請求日	平成26年4月4日(2014.4.4)
(31) 優先権主張番号	61/489,597
(32) 優先日	平成23年5月24日(2011.5.24)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	510146366 アルデア バイオサイエンス インク . アメリカ合衆国 92121 カリフォル ニア州 サンディエゴ タウン・センター ・ドライブ 9390
(74) 代理人	100082072 弁理士 清原 義博
(72) 発明者	マイナー, ジェフリー アメリカ合衆国 92122 カリフォル ニア州 サンディエゴ ポーリング・アベ ニュー 4572

審査官 上條 のぶよ

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高血圧症と高尿酸血症

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

併用チアジド系利尿薬を受け取る患者の痛風を処置するための製剤の製造における、アロプリノールと組み合わせた化合物の使用であって、

化合物は lesinurad である、ことを特徴とする使用。

【請求項2】

lesinurad の投与量は 200 mg である、ことを特徴とする請求項1に記載の使用。

【請求項3】

lesinurad の投与量は 400 mg である、ことを特徴とする請求項1に記載の使用。

10

【請求項4】

チアジド処置を受ける患者の高尿酸血症または痛風の発生率または可能性を減少させる、あるいは、高尿酸血症または痛風を覆すための製剤の製造における、アロプリノールと組み合わせた化合物の使用であって、

化合物は 2 - (5 - プロモ - 4 - (4 - シクロプロピルナフタレン - 1 - イル) - 4 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾル - 3 - イルチオ) 酢酸又はその薬学的に許容可能な塩である、ことを特徴とする使用。

【請求項5】

チアジドによる処置は、ヒドロクロロチアジド、ベンズチアジド、ベンゾチアジジン

20

、ヒドロフルメチアジド、クロロチアジド、メチクロチアジド、ポリチアジド、クロルサリドン、メトラゾン、インダパミド、キネサゾン又はトリクロルメチアジドによる処置である、ことを特徴とする請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

ヒドロクロロチアジドを受け取る患者において高尿酸血症または痛風を減少させる、または、覆すための製剤の製造における、アロプリノールと組み合わせた化合物の使用であって、

化合物が、2 - (5 - ブロモ - 4 - (4 - シクロプロピルナフタレン - 1 - イル) - 4 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾル - 3 - イルチオ) 酢酸又はその薬学的に許容可能な塩である、ことを特徴とする使用。

10

【請求項 7】

高血圧症に苦しむ患者の血清尿酸値を下げるための製剤の製造における、アロプリノールと組み合わせた化合物の使用であって、

患者はチアジド系利尿薬を受け取り、

チアジド系利尿薬の投与は血清尿酸値の上昇をもたらし、及び

化合物は 2 - (5 - ブロモ - 4 - (4 - シクロプロピルナフタレン - 1 - イル) - 4 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾル - 3 - イルチオ) 酢酸又はその薬学的に許容可能な塩であることを特徴とする使用。

【請求項 8】

(i) チアジド系利尿薬、

(i i) 2 - (5 - ブロモ - 4 - (4 - シクロプロピルナフタレン - 1 - イル) - 4 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾル - 3 - イルチオ) 酢酸、または、その薬学的に許容可能な塩、

(i i i) アロプリノール、及び

(i v) 薬学的に許容可能な賦形剤または担体、を含む組成物。

20

【請求項 9】

(i) ヒドロクロロチアジド、

(i i) 2 - (5 - ブロモ - 4 - (4 - シクロプロピルナフタレン - 1 - イル) - 4 H - 1 , 2 , 4 - トリアゾル - 3 - イルチオ) 酢酸、または、その薬学的に許容可能な塩、

(i i i) アロプリノール、及び

(i v) 薬学的に許容可能な賦形剤または担体、を含む組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

< 相互参照 >

本出願は、2011年5月24日に出版された米国仮特許出願第61/489,597号の利益を主張するものであり、該出願は引用によって本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

高血圧症は、血清尿酸値を上昇させることもあるチアジド系利尿薬などの抗高血圧症薬で治療される。

40

【発明の概要】

【0003】

本明細書のある実施形態では、必要としている被験体で高血圧症を処置するための方法が提供され(例えば、前記処置は、血清尿酸値の増加をもたらさず、血清尿酸値の異常な上昇をもたらさず、高尿酸血症をもたらさず、6mg/dL以上の血清尿酸値をもたらさず、あるいは、被験体の痛風の進行を生じさせない)、前記方法は、

a. チアジド系利尿薬、および、

b. 有機的なアニオン輸送体4(OAT4)阻害剤

を被験体に投与する工程を含む。

【0004】

50

実施形態によっては、チアジド系利尿薬は、ヒドロクロロチアジド、ベンドロフルメサイアザイド、ベンゾチアアジアジン、ヒドロフルメチアジド、クロロチアジド (chlorothiazide)、メチクロチアジド、ポリチアジド、クオルサリドン、メトラゾン、インダパミド、ブメタニド、エタクリン酸、フロセミド、または、トルセミドから選ばれる。

【0005】

特定の具体的な実施形態において、OAT4阻害剤は、2-(5-プロモ-4-(4-シクロプロピルナフタレン-1-イル)-4H-1,2,4-トリアゾル-3-イルチオ)酢酸、または、その薬学的に許容可能な塩である。

【0006】

幾つかの実施形態では、さらに本明細書に記載の任意の方法は、被験体にURAT1阻害剤を投与する工程を含む。特定の実施形態では、OAT4阻害剤およびURAT1阻害剤は同じ薬物である。

【0007】

本明細書の実施形態によっては、必要としている被験体の高血圧症を処置するための方法が提供され、処置は、血清尿酸値の上昇をもたらさず、

- a. ヒドロクロロチアジド、
 - b. 2-(5-プロモ-4-(4-シクロプロピルナフタレン-1-イル)-4H-1,2,4-トリアゾル-3-イルチオ)酢酸、または、その薬学的に許容可能な塩
- を被験体に投与する工程を含む。

【0008】

本明細書の実施形態によっては、高血圧症に苦しむ被験体において、血清尿酸を減らし、痛風を処置し、または、血清尿酸の上昇または痛風の発生率を減少させる方法が提供され、該方法は、本明細書に記載のOAT4阻害剤などの、OAT4阻害剤の投与を含む。具体的な実施形態では、血清尿酸の上昇または痛風は、チアジド利尿薬の投与によって誘発される。特定の実施形態では、2-(5-プロモ-4-(4-シクロプロピルナフタレン-1-イル)-4H-1,2,4-トリアゾル-3-イルチオ)酢酸、その薬学的に許容可能な塩、または、そのアナログを、被験体に投与することによって、被験体のOAT4媒介性の疾患を処置する方法が本明細書で提供される。具体的な実施形態では、OAT4媒介性の疾患は、OAT4を媒介とした高尿酸血症、あるいは、OAT4媒介性の痛風である。

【0009】

幾つかの実施形態では、患者にOAT4阻害剤を投与する工程を含む、チアジド処置を受ける患者の高尿酸血症または痛風の発生率、可能性を減少させる、あるいは、高尿酸血症または痛風の診断を覆す方法が本明細書では提供される。

【0010】

特定の実施形態では、被験体に有効な量のOAT-4阻害剤を投与する工程を含む、高血圧症に苦しむ患者の血清尿酸値を下げる方法が本明細書で提供され、患者はチアジド系利尿薬を受け取り、(OAT-4阻害剤の投与がないときは)、チアジド系利尿薬の投与は血清尿酸値の上昇をもたらす。

【0011】

実施形態によっては、

- a. チアジド系利尿薬、
- b. OAT-4阻害剤、および、
- c. 薬学的に許容可能な賦形剤または担体

を含む医薬組成物が本明細書で提供される。

【0012】

具体的な実施形態において、

- a. ヒドロクロロチアジド；
- b. 2-(5-プロモ-4-(4-シクロプロピルナフタレン-1-イル)-4H-1,

10

20

30

40

50

2, 4 - トリアゾル - 3 - イルチオ) 酢酸、または、その薬学的に許容可能な塩、および、
 c . 薬学的に許容可能な賦形剤または担体、
 を含む医薬組成物が本明細書で提供される。

【0013】

<参照による組み込み>

本明細書で言及されるすべての公開公報および特許出願は、それぞれの個々の公開公報または特許出願が引用によって明確かつ別々に組み込まれるように意図されたかのような同程度まで、引用によって本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

10

【0014】

本発明の新規な特徴は、とりわけ添付の特許請求の範囲で説明される。本発明の特徴および利点のより良い理解は、本発明の原理が用いられる例証的な実施形態を説明する以下の詳細な説明と、以下の添付図面とを引用することによって得られるであろう。

【0015】

【図1】ヒドロクロロチアジド (HCTZ) によって誘発される高尿酸血症の2つの機構の図による記載を表す: a) 直接 - OAT4 による尿酸の取り込みの直接的なHCTZ改善、および、b) 間接 - HCTZはOAT4刺激タンパク質 (NHE3) を増強する。

【図2】(a) OAT4を欠く対照プラスミド (pCMV) または(b) OAT4のいずれかで一時的にトランスフェクトさせたHEK293T細胞において、50 μM Lesinurad (黒) またはビヒクル (明るい灰色) でインキュベートした6 - カルボキシフルオセイン (CF) 基質のOAT4輸送活性を表す。

20

【図3】CF (EC₅₀ ~ 900 μM) のOAT4の競合的な基質として機能する尿酸塩を例証している様々な量 (0, 0.5, 1, 2 nM) の尿酸を含む6 - カルボキシフルオセイン (CF) 基質でインキュベートした、OAT4を欠く対照プラスミド (pCMV、黒)、または、OAT4で一時的にトランスフェクトしたHEK293T細胞 (灰色) を表す。

【図4】多様な量のLesinurad () およびベンズプロマロン () の存在下でのOAT4尿酸塩輸送体の量 (cpm) を表す。LesinuradのOAT4 IC₅₀ = 5 μM; および、ベンズプロマロン = 10 μM。

30

【図5】様々な濃度でLesinuradによる、URAT1および/またはOAT4を発現する293T細胞中のUA輸送のパーセント阻害を表しており、Lesinuradが同様の効能で、URAT1およびOAT4を阻害していることを示している。

【図6】1 mMのヒドロクロロチアジド (HCTZ) がある状態 (実線) とない状態 (破線) で、および、様々なLesinurad濃度下での、OAT4を安定的に発現する293T細胞中の3H - エストロン硫酸塩 (ES) 輸送体のパーセントを表しており、HCTZがOAT4輸送体活性のLesinuradを媒介とする阻害に対して効果がないことを示している。

【図7】OAT4を発現するHEK293細胞中で、ビヒクル、Lesinurad、オキシプリノール、または、アロプリノールの存在下 (100 μM - 5分間のインキュベーション) で、(a) 6 - カルボキシフルオセイン (CF - 5 μM) および(b) ¹⁴C尿酸 (UA - 100 μM) 基質のOAT4輸送活性を表わし、オキシプリノールとアロプリノールがOAT4を阻害しないことを示している。

40

【図8】様々な濃度のLesinurad (25, 50, 100 μM - 外部; 22, 44, 444 μM - 内部) とビヒクルを注入した、OAT4を発現する卵母細胞中での3Hエストロン硫酸塩 (ES) の取り込みパーセントを表しており、Lesinuradが主として細胞外 (尖端) の側からOAT4を阻害することを示している。

【図9】Lesinurad (50 nL) を注入して、30分間インキュベートした後の、OAT4を発現する卵母細胞の内部と外部における¹⁴Cで標識化したLesinurad (シンチレーション計数によって測定された) の量を表わしており、Lesinur

50

a dが実験のあいだ、注入された卵母細胞内部で維持することを示している。

【図10A】臨床的な第2相試験設計の概略を表す。

【図10B】利尿薬を摂取する群（黒色）と利尿薬を摂取しない群（明るい灰色）とに分類した、6mg/dL未満の血清尿酸（sUA）値を持った患者の割合を表しており、利尿薬を受け取る患者がLesinuradによく応答したことを示している。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明の特定の実施形態が本明細書中で示され記載されているが、このような実施形態はほんの一例として提供されていることが当業者には明らかであろう。多くの変更、変化および置換が、本発明から逸脱することなく、当業者に思い当たるであろう。本明細書に記載される実施形態に対する様々な代替物が、状況によっては本発明を実行するために用いられてもよいことが理解されよう。以下の請求項は本発明の範囲を定義するものであり、この請求項とその均等物の範囲内の方法および構造体がそれによって包含されるものであるということが意図されている。

【0017】

本明細書で使用される段落の表題は、組織化を目的としたものに過ぎず、記載された主題を制限するとして解釈されるものではない。特許、特許出願、記事、書籍、説明書、および、論文を含む、出願で引用されるすべての文献または文献の一部は、限定されることなく、任意の目的のためにそのまま引用されることで、これによって明確に組み込まれる。

【0018】

（利尿薬と高尿酸血症）

高血圧症は痛風患者でよく見られ、1950年代から血清尿酸値を上昇させるものとして知られるようになったチアジド系利尿薬などの抗高血圧症薬でしばしば治療される（Healey et al., NEJM, 1959, 261, 1358）。例えば、1つの研究は、一日当たり25mg以上の投与量のチアジド系利尿薬の使用が、抗痛風治療を始めるリスクの著しい増加に関係していることを明らかにした（Gurwitz et al., J Clin. Epidemiol. 1997, 50(8), 953）。

【0019】

一方で、尿酸を低下させる治療法は、利尿薬を同時に摂取する患者ではあまり効率的には作用しないと一般に考えられている（Reyes, Cardiovasc. Drugs Ther., 2003, 17(5-6), 397）。この効果は、2つの異なる機構：OAT4による尿酸取り込みのチアジド増強によって直接、（Hagos et al., J. Am. Soc. Nephrol., 2007, 18, 430）、あるいは、OAT4 刺激タンパク質のチアジド増強を介して間接（ナトリウム/水素交換体3；NHE3）（Nijenhuis et al., J. Clin. Invest. 2005, 115, 1651）によるOAT4の活性化によって増強された尿酸再吸収で媒介されるものと考えられている（図1を参照）。

【0020】

URAT1に加えて、有機的なアニオン輸送体4（OAT4）は、尿酸排出の重要な制御因子と考えられている。有機的なアニオン輸送体4（OAT4）は尿酸輸送体であり、チアジド系利尿薬などの抗高血圧症薬の腎分泌にも関与している。幾つかの例では、OAT4は、尿酸に対してこれらの薬物を交換し、それによって、高尿酸血症効果をもたらす尿酸の再吸収を強化する。OAT4はいくつかの利尿薬に関連した高尿酸血症の原因かもしれないと推測されてきた。

【0021】

幾つかの例においては、利尿薬の使用は、痛風のリスクの増大と、血清尿酸値の上昇につながっている（Arch. Intern. Med. 2005; 165: 742-8）。確かに、すべてのループ利尿薬、または、多くのチアジドタイプの利尿薬は、

10

20

30

40

50

チエニル酸（尿酸排泄性で、血清尿酸を減少させる）を例外として、血清尿酸を上げる。その機構は各薬物分類ごとにおそらく異なるが、ナトリウムチャネル遮断薬（アミロライドとトリアムテレンなど）とアルドステロン受容体遮断薬（スピロノラクトンとエプレレノンなど）も血清尿酸値を上げる。尿酸の分画排出は、利尿薬で処理された被験体では減少する（*J. Am. Soc. Nephrol.* 18:3101, 2007）。幾つかの例においては、これらの観察を説明する機構は、利尿薬の潜在的な体積効果、近位尿細管（NPT）での尿酸分泌物輸送体の阻害、および、OAT4（SLC22A11）とURAT1の直接的または間接的な活性化を含んでいる（*Reyes, Cardiovascular Drugs and Serum Uric Acid, Cardiovascular Drugs and Therapy* 17:397, 2004.）

10

【0022】

幾つかの例においては、利尿薬は、尿酸の再吸収を促進するOAT4によって尿へ分泌される、対イオン基質として機能する。例えば、ヒドロクロロチアジド（*J. Am. Soc. Nephrol.* a18:430, 2007）と、トラセミド（*J. Am. Soc. Nephrol.* 18:3101, 2007）は、OAT4の尿酸輸送活性を増加させる。

【0023】

遺伝学的証拠が、痛風、高尿酸血症、および、OAT4利尿薬によって誘発された高尿酸血症におけるOAT4とURAT1の役割を支持し、それによると、2つの関連研究がOAT4の独立した関連性を示しており（*Circ. Cardiovasc. Genet.* 2010; 3; 523-530 and *Kolz et al, 2009. Vol 5:6*）、別の研究が、利尿薬によって誘発された高尿酸血症とのOAT4の関連を示している（*McAdams 発現ACR関節炎&リウマチ (McAdams presentation ACR Arthritis & Rheumatism, Volume 63, November 2011 Abstract Supplement)*）。

20

【0024】

幾つかの例においては、流体の体積の変化は、ナトリウム輸送体の遮断による利尿薬の優性効果であり、および、尿酸吸収は近位尿細管によるNaCl吸収に類似する。鉄尿酸値と血清尿酸値は、体積状態とよく相関する。高尿酸血症は、重要な役割を果たす体積状態と一致して、利尿薬で処置した患者に食塩負荷することによって抑制される（塩類が不足した患者の高尿酸血症で、一日当たり~20mequ/の塩分制限を課した高血圧性患者と、一日当たり250mequの塩負荷を課した高血圧性患者の間でSUAの2mg/dlの減少）。幾つかの例では、利尿薬は尿酸の分画排泄の減少を引き起こし、sUAに対する体積効果はURAT1とOAT4の活性化につながる近位尿細管細胞中のナトリウムと陽子バランスの変化が原因である可能性がある（*Am. J. Physiol.* 1996 Nov; 271(5 Pt 2):F1093-9, *Nijenhuis et al, J. Clin. Invest.* 115:1651, 2005; *J. Am. Soc. Nephrol.* 18:3101-3109, 2007）。

30

40

【0025】

ある研究（*Arthritis & Rheumatism, Volume 63, Pt (November 2011) Abstract Supplement, Abstracts of the Am Coll of Rheumatology/Assoc of Rheumatology Health Professionals Annual Scientific Meeting*）は、尿酸の遺伝子と利尿薬の相互作用（urate gene-by-diuretic interaction）を示唆し、尿酸代謝に影響を及ぼす遺伝形質の重要な相互作用を描写し、かつ高血圧の被験体においては利尿薬使用で対処する、高い血清尿酸レベルに関してより

50

高い遺伝的危険度スコアを有する被験体の間にのみ、高血圧の被験体での利尿薬使用に関する痛風の増加が観察されると結論付けた。

【0026】

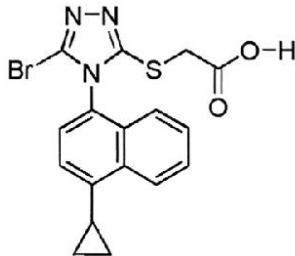
<Lesinurad>

Lesinuradは、2-(5-ブromo-4-(4-シクロプロピルナフタレン-1-イル))-4H-1,2,4-トリアゾル-3-イルチオ)酢酸の属名であり、その化学構造は以下のものである。

【0027】

【0028】

【化1】



10

【0029】

幾つかの例では、用語Lesinuradは、Lesinuradのナトリウム塩、すなわち、ナトリウム2-(5-ブromo-4-(4-シクロプロピルナフタレン-1-イル))-4H-1,2,4-トリアゾル-3-イルチオ)アセテートも含む。

20

【0030】

Lesinuradは、痛風の処置の臨床的な発達において尿酸を低下させる療法である。幾つかの例では、Lesinuradは、URAT1輸送体を阻害することにより腎臓近位尿細管内の尿酸(UA)の再吸収を遮断する。

【0031】

<チアジド/チアジド系利尿薬>

チアジドまたはチアジド系利尿薬は、高血圧症(高血圧)及び浮腫(心臓、肝臓、又は腎臓の疾患によって引き起こされたものなど)を処置するために使用され、高血圧による死亡、脳卒中、心臓発作および心不全のリスクを減らす。チアジドは、米国で推奨される第1選択処置として、また欧州で推奨される処置として、最も一般的に使用される利尿薬である。チアジドは、チアジド感受性Na⁺-Cl⁻共輸送体を遮断することによって、腎臓内の遠位尿細管からのナトリウムと塩素のイオンの再吸収を阻害することで働き、ナトリウム分泌の増加およびそれによる水分排泄の増加(すなわち排尿の増加)につながる。幾つかの例において、身体中の水の量を減少させることは、結果としてより低い血液量をもたらす、それにより心拍出量を減少させ、動脈圧の低下につながる。

30

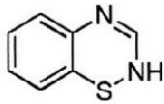
【0032】

用語「チアジド」は、「チアジド受容体」に作用する薬物を指し、またチアジド同様に作用するがベンゾチアジアジン分子構造を含有しない「チアジド様利尿薬」を含む。「チアジド様利尿薬」の例は、限定されないが、ベンドロフルメチアジド、ベンズチアジド、クロロチアジド、ヒドロクロロチアジド、ヒドロフルメチアジド、インダパミド、メチクロロチアジド、ポリチアジド、キネサゾン、トリクロルメチアジド、クロルタリドン及びメトラゾンを含む。

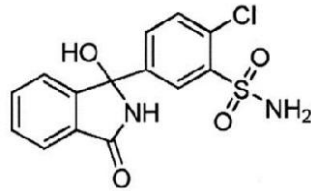
40

【0033】

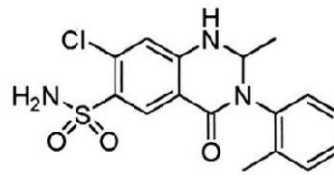
【化2】



ベンゾチアジジン



クロルタリドン



メトラゾン

【0034】

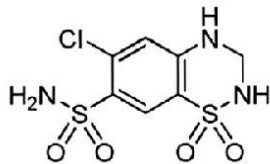
10

<ヒドロクロロチアジド>

ヒドロクロロチアジド、6-クロロ-1,1-ジオキソ-3,4-ジヒドロ-2H-1,2,4-ベンゾチアジジン-7-スルホンアミド(HCTZ、HCT又はH Z T)は、しばしば高血圧症とうっ血性心不全の処置のために処方される。

【0035】

【化3】



20

【0036】

ヒドロクロロチアジドは、ナトリウム再吸収を減少させるために腎臓に作用し、水を保持する腎臓の能力を阻害し、それにより血液量を減少させ、心臓へ戻る血液を減らすことが一般に理解されている。ヒドロクロロチアジドは、 $\text{Na}^+ / \text{Cl}^-$ 共同輸送体上の塩素部位を競い、それによりナトリウム輸送を弱める。ある研究は、ヒドロクロロチアジドの使用は、OAT4 媒介性の尿酸吸収の2.6倍の増加をもたらすことを観察した。

【0037】

<有機陰イオン輸送体-4(OAT4)>

ヒト有機陰イオン輸送体4(hOAT4)は腎臓で発現され、いくつかの例では、550のアミノ酸残基タンパク質をコード化する。幾つかの例では、hOAT4は、多くの薬物および薬物動態と同様、内因性物質の腎臓の分泌および再吸収に関わる。一般に、OAT4は近位尿細管管腔の側面膜に存在し得、エストロン硫酸(esteron硫酸(ES))、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)硫酸、およびオクラトキシニンA、パラアミノ馬尿酸(aminohippurate)(PAH)などの有機陰イオンの輸送を媒介する。

30

【0038】

ベンズプロマロンおよび6-ヒドロキシベンズプロマロン(hydroxybenz bromarone)は、OAT4の阻害剤である(それにより尿酸分泌を促進させる)。ベンズプロマロンは、 $5.4 \mu\text{mol/L}$ のIC50の ^3H エストロン硫酸のOAT4吸収を阻害し、6-ヒドロキシベンズプロマロンは、 $3.2 \mu\text{mol/L}$ のIC50の ^3H エストロン硫酸のOAT4吸収を阻害する。

40

【0039】

<実施例>

以下に提供される実施例および調製は、本発明の化合物およびそのような化合物を調製する方法をさらに示し例証する。本発明の範囲が、以下の実施例および調製の範囲によっていかなる方法においても限定されないことを理解されたい。

【0040】

尿酸輸送体OAT4は、培養細胞と卵母細胞で安定して発現された。

【0041】

50

培養細胞に関して、安定して輸送体を発現するHEK293細胞は、高い輸送体活性による、輸送体、抗生物質選択、及びクローンのクローン選択を保有するDNAコンストラクトの導入を通じて生成された。あるいは、輸送体を一時的に発現する細胞は、HEK293T細胞のリバーストランスフェクションによって生成された。トランスフェクタントは、ポリ-L-リジンコートマルチウェルプレート上へと高密度で蒔かれ、1乃至2日後にアッセイされた。結果は、安定かつ一過性の発現細胞のものと類似していた。

【0042】

卵母細胞はOAT4発現用のcRNAを注入され、3乃至4日後にアッセイされた。

【0043】

活性アッセイは、125mMのグルコン酸ナトリウム、4.8mMのグルコン酸カリウム、1.2mMの第一リン酸ナトリウム、1.2mMの硫酸マグネシウム、1.3mMのグルコン酸カルシウム、5.6mMのグルコース、及び25mMのHEPES pH7.1を含有するアッセイバッファーにおいて、輸送体基質で細胞をインキュベートすることによって実行され、被験薬は、示された時間の間、基質の追加前に細胞へ加えられた。使用された基質は、5 μ Mの6-カルボキシフルオレスセイン(CF)、50nMの3Hエストロン硫酸(ES)、及び100 μ Mの14C尿酸(UA)であった。トランスフェクトされた細胞に関して、基質は2分間インキュベートされ、次に、吸入により取り除かれ、および125mMのグルコン酸ナトリウム及び25mMのHEPES pH7.1を含有する洗浄バッファー内で3度洗浄された。次に、細胞は、CF輸送に関する蛍光測定及びESとUAに関する液体シンチレーション計数の前に、1Mの水酸化ナトリウム内で溶解された。卵母細胞アッセイは、被験薬が注入されたこと以外は同様に行われ、次に、輸送は30分(ES)又は60分(UA)後に測定された。これらのアッセイの結果は、以下に記載されるような図に要約される。

【0044】

図1はヒドロクロロチアジド(HCTZ)によって誘発される高尿酸血症の2つの機構の図を表す；-OAT4による尿酸の取り込みの直接的なHCTZ改善、及びb)間接-HCTZはOAT4刺激タンパク質(NHE3)を増強する。

【0045】

図2は、(a)OAT4を欠く対照プラスミド(pCMV)または(b)OAT4のいずれかで一時的にトランスフェクトさせたHEK293T細胞において、50 μ M Lesinurad(黒)またはビヒクル(明るい灰色)でインキュベートした6-カルボキシフルオセイン(CF)基質のOAT4輸送活性を表す。

【0046】

図3は、CF(EC₅₀~900 μ M)のOAT4の競合的な基質として機能する尿酸塩を例証している様々な量(0、0.5、1、2nM)の冷尿酸を含む6-カルボキシフルオセイン(CF)基質でインキュベートした、OAT4を欠く対照プラスミド(pCMV、黒)、または、OAT4で一時的にトランスフェクトしたHEK293T細胞(灰色)を表す。

【0047】

図4は、多様な量のLesinurad()およびベンズプロマロン()の存在下でのOAT4尿酸塩輸送体の量(cpm)を表す。LesinuradのOAT4 IC₅₀=5 μ M； および、ベンズプロマロン=10 μ M。

【0048】

図5は、様々な濃度でLesinuradによって、URAT1および/またはOAT4を発現する293T細胞中のUA輸送のパーセント阻害を表しており、Lesinuradが同様の効能で、URAT1およびOAT4を阻害していることを示している。

【0049】

図6は、1mMのヒドロクロロチアジド(HCTZ)がある状態(実線)とない状態(破線)で、および、様々なLesinurad濃度下での、OAT4を安定的に発現する293T細胞中の³H-エストロン硫酸塩(ES)輸送体のパーセントを表しており、H

10

20

30

40

50

CTZがOAT4輸送体活性のLesinuradを媒介とする阻害に対して効果がないことを示している。

【0050】

図7は、OAT4を発現するHEK293細胞中で、ビヒクル、Lesinurad、オキシブリノール、または、アロプリノールの存在下(100 μ M - 5分間のインキュベーション)で、(a)6-カルボキシフルオセイン(CF - 5 μ M)および(b)14C尿酸(UA - 100 μ M)基質のOAT4輸送活性を表わし、オキシブリノールとアロプリノールがOAT4を阻害しないことを示している。

【0051】

図8は、様々な濃度のLesinurad(25、50、100 μ M - 外部; 22、44、444 μ M - 内部)とビヒクルを注入した、OAT4を発現する卵母細胞中での³Hエストロン硫酸塩(ES)の取り込みパーセントを表しており、Lesinuradが主として細胞外(尖端)の側からOAT4を阻害することを示している。

10

【0052】

図9は、Lesinurad(50nL)を注入して、30分間インキュベートした後の、OAT4を発現する卵母細胞の内部と外部における¹⁴Cで標識化したLesinurad(シンチレーション計数によって測定された)の量を表わしており、Lesinuradが実験のあいだ、注入された卵母細胞内部で維持することを示している。

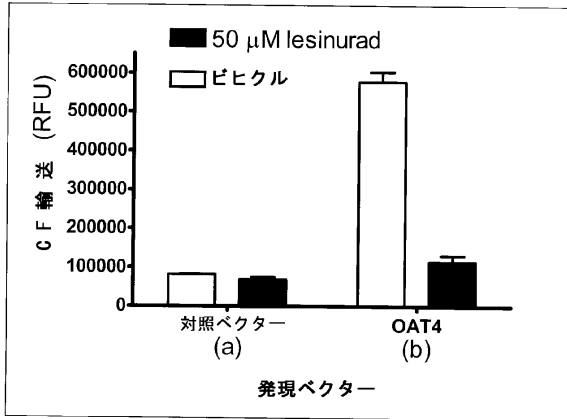
【0053】

図10Aは、臨床的な第2相試験設計の概略を表す。試験は、少なくとも6週間、安定量のアロプリノールを受けている間に、血清尿酸(sUA)を有するアロプリノール>6mg/dLに十分に反応していなかった208人の痛風患者における、4週、二重盲検、プラセボ-対照臨床試験であった。Lesinuradの3つの用量のうちの1つ又は一致するプラセボは、患者アロプリノールレジメンに加えられた。試験の主要エンドポイントは、4週目のsUAの平均減少であり、重要な副次エンドポイントは4週目にsUA<6.0mg/dLの患者の割合であった。この試験における少数の患者は、処置期間中にチアジド利尿薬を受け、彼らの反応率は併用チアジド利尿薬を受けていなかった患者と比較され、その結果は図10Bに示されている。この図は、6mg/dL以下の血清尿酸(sUA)を有する患者の割合を表わしており、様々な用量のLesinuradについて、利尿薬を摂取する群(黒色)と利尿薬を摂取しない群(明るい灰色)とに分類されており、利尿薬を受ける患者がLesinuradによく反応したことを示している。

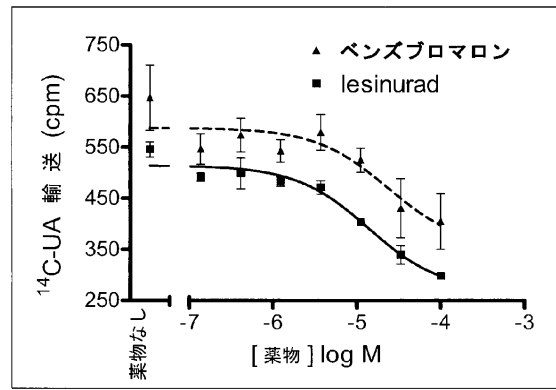
20

30

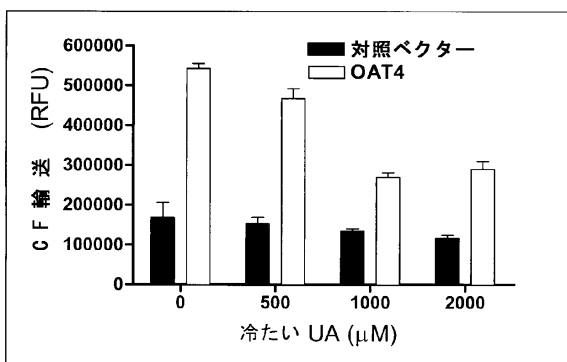
【図2】



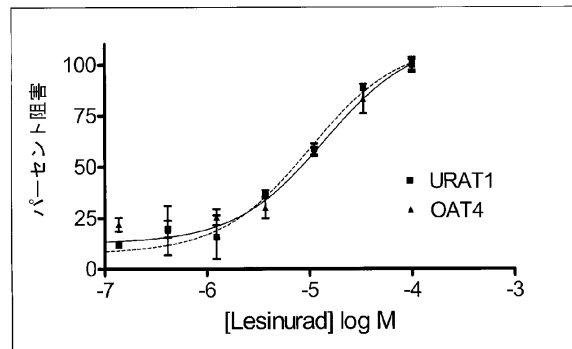
【図4】



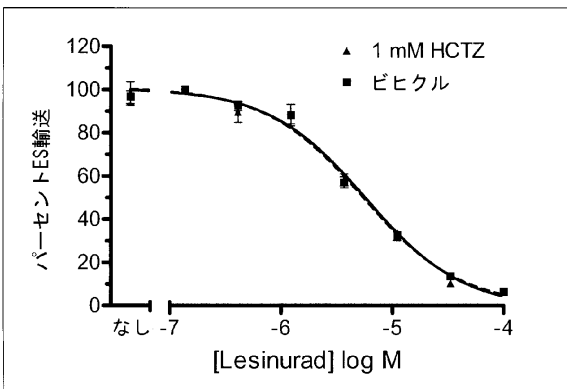
【図3】



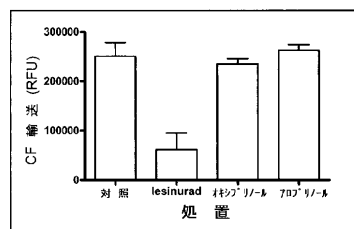
【図5】



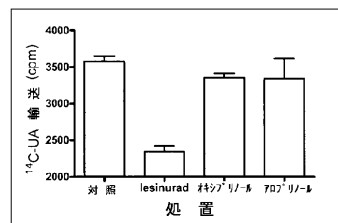
【図6】



【図7】

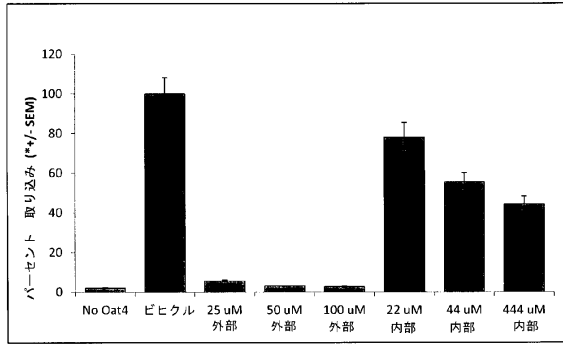


(a)

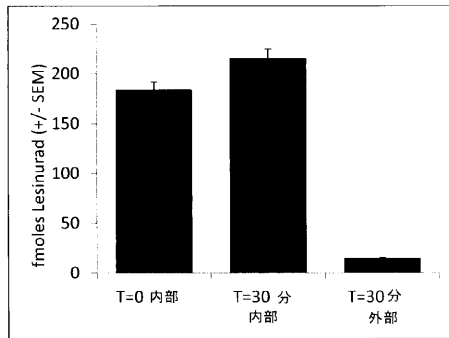


(b)

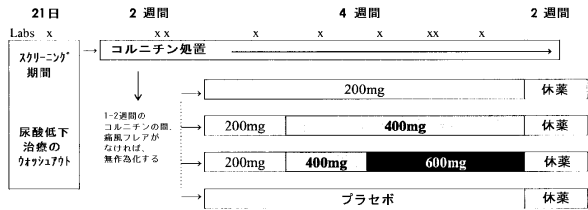
【図 8】



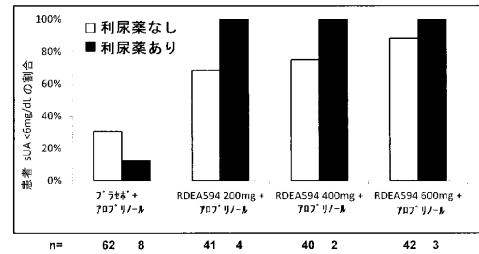
【図 9】



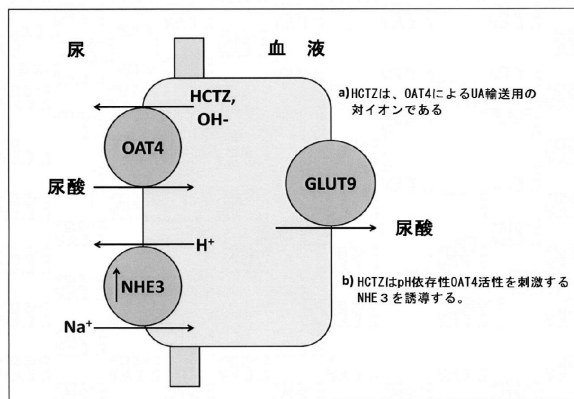
【図 10 A】



【図 10 B】



【図 1】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/404 (2006.01)	A 6 1 K	31/404
A 6 1 K	31/196 (2006.01)	A 6 1 K	31/196
A 6 1 K	31/192 (2006.01)	A 6 1 K	31/192
A 6 1 K	31/4409 (2006.01)	A 6 1 K	31/4409
A 6 1 K	31/635 (2006.01)	A 6 1 K	31/635
A 6 1 P	19/06 (2006.01)	A 6 1 P	19/06
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 2 1
A 6 1 P	7/10 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1
		A 6 1 P	7/10

- (56) 参考文献 国際公開第 2 0 1 0 / 0 2 8 1 9 0 (W O , A 1)
 国際公開第 2 0 0 9 / 0 7 0 7 4 0 (W O , A 1)
 Arthritis and Rheumatism , 2 0 0 9 年 , Vol.60, Suppl.10 , p.1102
 Arthritis and Rheumatism , 2 0 0 9 年 , Vol.60, Suppl.10 , p.1105
 血圧 , 2 0 0 7 年 , Vol.14, No.6 , p.628-630
 月刊薬事 , 1 9 9 8 年 , Vol.40, No.4 , p.833-838
 Ardea Biosciences Reports Positive Results for RDEA594, its Lead Product Candidate for Gout, in Combination with Allopurinol or Febuxostat , Press release of Ardea Biosciences , 2 0 0 9 年 1 月 7 日 , U R L , <http://www.prnewswire.com/news-releases/ardea-biosciences-reports-positive-results-for-rdea594-its-lead-product-candidate-for-gout-in-combination-with-allopurinol-or-febuxostat-80895837.html>

(58) 調査した分野 (Int.Cl. , DB 名)

A 6 1 K 3 1 / 0 0 - 3 3 / 4 4
 A 6 1 K 4 5 / 0 0 - 0 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)