(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103702986 A
(43)申请公布日 2014.04.02

(21)申请号 201280036513.7
(22)申请日 2012.05.22
(30)优先权数据
61/489,597 2011.05.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.01.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/039011 2012.05.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/162323 EN 2012.11.29
(71)申请人 阿迪亚生命科学公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 杰弗里·迈纳
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 高瑜 郑霞
(51)Int.Cl.
C07D 285/24(2006.01)
C07D 249/12(2006.01)
A01N 37/44(2006.01)

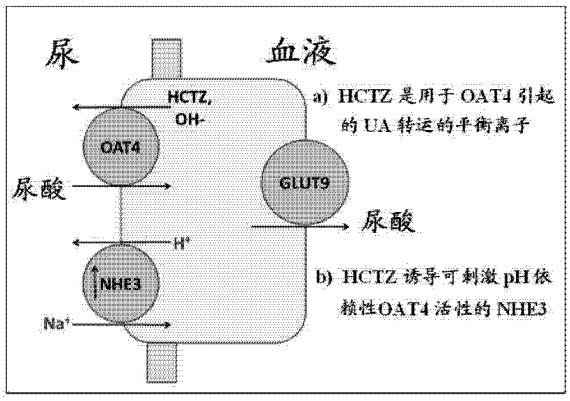
权利要求书2页 说明书7页 附图9页

(54)发明名称

高血压和高尿酸血症

(57)摘要

本发明涉及用于在有需要的受试者中治疗高血压的方法(例如,其中所述治疗不会导致所述受试者中血清尿酸水平增加,不会导致血清尿酸水平异常升高,不会导致高尿酸血症,不会导致高于6mg/dL的血清尿酸水平,并且不会导致发展成痛风),所述方法包括对受试者施用:a.噻嗪类利尿剂;和b.有机阴离子转运体4(OAT4)抑制剂和高尿酸血症。所述噻嗪类利尿剂选自氢氯噻嗪、苄氟噻嗪、苯并噻二嗪、氢氟噻嗪、氯噻嗪、甲氯噻嗪、泊利噻嗪、氯噻酮、美托拉宗、吲达帕胺、布美他尼、依他尼酸、呋塞米或托塞米。所述OAT4抑制剂是2-(5-溴-4-(4-环丙基萘-1-基)-4H-1,2,4-三唑-3-基硫代)乙酸或其药学上可接受的盐。



CN 103702986 A

1. 一种用于在有需要的受试者中治疗高血压的方法，其中所述治疗不会导致血清尿酸水平增加，该方法包括对该受试者施用：

(i) 噻嗪类利尿剂；和

(ii)OAT4 抑制剂。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述 OAT4 抑制剂是 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述噻嗪类利尿剂选自氢氯噻嗪、苄氟噻嗪、苯并噻二嗪、氢氟噻嗪、氯噻嗪、甲氯噻嗪、泊利噻嗪、氯噻酮、美托拉宗、吲达帕胺、布美他尼、依他尼酸、呋塞米或托塞米。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其进一步包括施用 URAT1 抑制剂。

5. 如权利要求 4 所述的方法，其中所述 OAT4 抑制剂和所述 URAT1 抑制剂是相同的药物。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中所述药物是 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐。

7. 一种用于在有需要的受试者中治疗高血压的方法，其中所述治疗不会导致血清尿酸水平增加，该方法包括对该受试者施用：

(i) 氢氯噻嗪；和

(ii)2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐。

8. 一种用于在接受噻嗪类治疗的患者中降低高尿酸血症或痛风的发病率或可能性或者逆转其诊断的方法，其包括对该患者施用 OAT4 抑制剂。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其中所述 OAT4 抑制剂是 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐。

10. 如权利要求 8 所述的方法，其中所述噻嗪类治疗是用氢氯噻嗪、苄氟噻嗪、苯并噻二嗪、氢氟噻嗪、氯噻嗪、甲氯噻嗪、泊利噻嗪、氯噻酮、美托拉宗、吲达帕胺、布美他尼、依他尼酸、呋塞米或托塞米进行的治疗。

11. 一种用于在接受氢氯噻嗪的患者中减轻高尿酸血症或痛风或者逆转其诊断的方法，其包括施用 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐。

12. 一种用于在患有高血压的患者中降低血清尿酸水平的方法，其包括对受试者施用有效量的 OAT-4 抑制剂，

其中所述患者正在接受噻嗪类利尿剂，并且

其中该噻嗪类利尿剂的施用导致血清尿酸水平升高。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其中所述 OAT4 抑制剂是 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐。

14. 一种组合物，其包含：

(i) 噻嗪类利尿剂；

(ii)OAT-4 抑制剂；和

(iii) 药学上可接受的赋形剂或载体。

15. 一种组合物，其包含：

(i) 氢氯噻嗪；

(ii)2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐；和

(iii) 药学上可接受的赋形剂或载体。

高血压和高尿酸血症

交叉引用

[0001] 本申请要求享有 2011 年 5 月 24 日提交的美国临时申请 No.61/489,597 的权益，该申请通过引用并入本文。

背景技术

[0002] 高血压用抗高血压剂例如噻嗪类 (thiazide) 利尿剂进行治疗，这会使血清尿酸水平升高。

发明内容

[0003] 在本文的某些实施方案中提供了一种用于在有需要的受试者中治疗高血压的方法 (例如，其中所述治疗不会导致血清尿酸水平增加，不会导致血清尿酸水平异常升高，不会导致高尿酸血症，不会导致高于 6mg/dL 的血清尿酸水平，也不会导致在受试者中发展成痛风)，所述方法包括对受试者施用 ：

a. 噻嗪类利尿剂 ；和

b. 有机阴离子转运体 4(OAT4) 抑制剂。

[0004] 在一些实施方案中，噻嗪类利尿剂选自氢氯噻嗪 (hydrochlorothiazide)、苄氟噻嗪 (bendroflumethiazide)、苯并噻二嗪 (benzothiadiazine)、氢氟噻嗪 (hydroflumethiazide)、氯噻嗪 (chlorothiazide)、甲氯噻嗪 (methyclothiazide)、泊利噻嗪 (polythiazide)、氯噻酮 (chlorthalidone)、美托拉宗 (metolazone)、吲达帕胺 (indapamide)、布美他尼 (bumetanide)、依他尼酸 (ethacrynic acid)、呋塞米 (furosemide) 或托塞米 (torsemide)。

[0005] 在某些实施方案中，OAT4 抑制剂是 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐。

[0006] 在一些实施方案中，本文所述的任何方法进一步包括对受试者施用 URAT1 抑制剂。在特定的实施方案中，OAT4 抑制剂和 URAT1 抑制剂是相同的药物。

[0007] 在本文的一些实施方案中提供了一种用于在有需要的受试者中治疗高血压的方法，其中所述治疗不会导致血清尿酸水平增加，该方法包括对受试者施用 ：

a. 氢氯噻嗪 ；和

b. 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸或其药学上可接受的盐。

[0008] 在本文的一些实施方案中提供了一种在患有高血压的受试者中降低血清尿酸、治疗痛风或降低血清尿酸升高或痛风的发病率的方法，该方法包括施用 OAT4 抑制剂，例如本文所述的 OAT4 抑制剂。在特定的实施方案中，血清尿酸的升高或痛风是由噻嗪类药物的施用而诱导的。在某些实施方案中，本文提供了一种通过对受试者施用 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸、其药学上可接受的盐或其类似物从而治疗受试者中 OAT4 介导的病症的方法。在特定的实施方案中，OAT4 介导的病症是 OAT4 介导

的高尿酸血症或 OAT4 介导的痛风。

[0009] 在一些实施方案中，本文提供了一种在接受噻嗪类治疗的患者中降低高尿酸血症或痛风的发病率或可能性或者逆转其诊断的方法，其包括对患者施用 OAT4 抑制剂。

[0010] 在某些实施方案中，本文提供了一种在患有高血压的患者中降低血清尿酸水平的方法，其包括对受试者施用有效量的 OAT-4 抑制剂，其中该患者正在接受噻嗪类利尿剂，并且其中（在不施用 OAT-4 抑制剂的情况下）噻嗪类利尿剂的施用导致血清尿酸水平升高。

[0011] 在一些实施方案中，本文提供了一种组合物，其包含：

a. 噻嗪类利尿剂；

b. OAT-4 抑制剂；和

c. 药学上可接受的赋形剂或载体。

[0012] 在特定的实施方案中，本文提供了一种组合物，其包含：

a. 氢氯噻嗪；

b. 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代）乙酸或其药学上可接受的盐；和

c. 药学上可接受的赋形剂或载体。

援引并入

[0013] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请均通过引用并入本文，其程度犹如特别地且单独地指出每个单独的出版物或专利申请通过引用而并入。

附图说明

[0014] 本发明的新特征在随附的权利要求中具体阐述。通过参考以下对在其中利用到本发明原理的说明性实施方案加以阐述的详细描述和附图，将会获得对本发明的特征和优点的更好的理解，在附图中：

[0015] 图 1 表示氢氯噻嗪 (HCTZ) 诱导的高尿酸血症的两种机制的图示；a) 直接的—HCTZ 对 OAT4 引起的尿酸摄取的增强；和 b) 间接的—HCTZ 增强 OAT4 刺激性蛋白质 (NHE3)。

[0016] 图 2 表示在用 (a) 缺少 OAT4 的对照质粒 (pCMV) 或 (b)OAT4 瞬时转染的 HEK293T 细胞中与 50μM Lesinurad（黑色）或赋形剂 (vehicle)（浅灰色）孵育的 6- 羧基荧光素 (CF) 底物的 OAT4 转运活性。

[0017] 图 3 表示与 6- 羧基荧光素 (CF) 底物和不同量 (0、0.5、1、2nM) 的冷尿酸孵育的、用 OAT4（灰色）或缺少 OAT4 的对照质粒 (pCMV，黑色）瞬时转染的 HEK293T 细胞，其表明尿酸盐充当 CF 的针对 OAT4 的竞争性底物 (EC50 ～ 900μM)。

[0018] 图 4 表示在不同量的 Lesinurad（■）和苯溴马隆 (benzbromarone)（▲）的存在下 OAT4 尿酸盐转运的量 (cpm)。Lesinurad 的 OAT4IC_{50}=5μM；而苯溴马隆 =10μM。

[0019] 图 5 表示不同浓度的 Lesinurad 在表达 URAT1 和 / 或 OAT4 的 293T 细胞中对 UA 转运的抑制百分比，其表明 Lesinurad 以类似的效力抑制 URAT1 和 OAT4。

[0020] 图 6 表示在 1mM 氢氯噻嗪 (HCTZ) 的存在（——）或不存在 (----) 下以及不同浓度的 Lesinurad 下，稳定表达 OAT4 的 293T 细胞中的 ^{3}H- 硫酸雌酮 (ES) 转运百分比，其表明 HCTZ 对 Lesinurad 介导的对 OAT4 转运体活性的抑制没有影响。

[0021] 图 7 表示在表达 OAT4 的 HEK293 细胞中，在赋形剂、Lesinurad、奥昔嘌醇

(oxypurinol)或别嘌呤醇(allopurinol)(100μM- 孵育5min)的存在下,(a)6-羧基荧光素(CF-5μM)和(b)^{14}C-尿酸(UA-100μM)底物的OAT4转运活性,其表明奥昔嘌醇和别嘌呤醇不会抑制OAT4转运活性。

[0022] 图8表示在注射了多种不同浓度的Lesinurad(25、50、100μM- 外部;22、44、444μM- 内部)或赋形剂的表达OAT4的卵母细胞中^{3}H-硫酸雌酮(ES)的摄取百分比,其表明Lesinurad主要从胞外(顶)侧抑制OAT4。

[0023] 图9表示注射了Lesinurad(50nL)并孵育30分钟后,表达OAT4的卵母细胞内部和外部^{14}C标记的Lesinurad的量(通过闪烁计数测得),其表明Lesinurad在实验期间保留于经注射的卵母细胞内部。

[0024] 图10A表示2期临床研究设计的示意图。

[0025] 图10B表示血清尿酸(sUA)水平低于6mg/dL的患者的比例,这些患者针对Lesinurad的多种不同剂量被分为接受利尿剂的患者(黑色)和未接受利尿剂的患者(浅灰色),并且表明接受利尿剂的患者对Lesinurad应答良好。

具体实施方式

[0026] 虽然本文已经显示并描述了本发明的某些实施方案,但对于本领域技术人员来说显而易见的是,这些实施方案仅以示例的方式提供。在不偏离本发明的情况下,本领域技术人员将会想到众多更改、改变和替换。应当理解,在一些情况下,在实践本发明的过程中可采用本文所述的实施方案的各种替代方案。以下权利要求旨在限定本发明的范围,从而涵盖这些权利要求的范围内的方法和结构及其等效方案。

[0027] 本文中使用的章节标题仅出于编排目的,不能将其视为限制所描述的主题。本申请中引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册和论文,特此出于任何目的明确地通过引用而整体并入。

利尿剂和高尿酸血症

[0028] 高血压在痛风患者中普遍存在,他们常常用抗高血压药例如从二十世纪五十年代起即已知可升高血清尿酸水平的噻嗪类利尿剂进行治疗(Healey等人,NEJM,1959,261,1358)。例如,一项研究表明,以25mg/天或更高的剂量使用噻嗪类利尿剂与显著增加的开始抗痛风治疗的风险相关(Gurwitz等人,J Clin. Epidemiol.1997,50(8),953)。

[0029] 同时,一般认为降低尿酸盐的治疗在同时接受利尿剂的患者中有效性较低(Reyes,Cardiovasc.Drugs Ther.,2003,17(5-6),397)。该作用被认为是由通过两种不同机制激活OAT4(参见图1)而引起的增强的尿酸重吸收而介导的;这两种机制是:噻嗪类增强OAT4引起的尿酸摄取的直接机制(Hagos等人,J.Am.Soc.Nephrol.,2007,18,430);或通过噻嗪类增强OAT4刺激性蛋白质(钠/氢交换体3;NHE3)的间接机制(Nijenhuis等人,J.Clin.Invest.2005,115,1651)。

[0030] 除了URAT1之外,有机阴离子转运体4(OAT4)也被认为是一种重要的尿酸盐排泄调节物。有机阴离子转运体4(OAT4)是一种尿酸盐转运体,其还参与抗高血压药物例如噻嗪类利尿剂的肾脏分泌。在一些情况下,OAT4使这些药物与尿酸盐发生交换,从而增强尿酸的重吸收,导致其高尿酸血效应。已经假定OAT4可能是导致与一些利尿剂相关的高尿酸

血症的原因。

[0031] 在一些情况下，利尿剂的使用与痛风风险增加和血清尿酸水平升高相关 (Arch. Intern. Med. 2005;165:742 - 8)。实际上，除了替尼酸（它是促尿酸药，并且降低血清尿酸盐），所有髓袢利尿剂和很多噻嗪型利尿剂都使血清尿酸盐升高。钠通道阻滞剂（例如阿米洛利 (amiloride) 和氨苯蝶啶 (triamterene)）和醛固酮受体阻断剂（例如螺内酯 (spironolactone) 和依普利酮 (eplerenone)）也使血清尿酸盐水平升高，尽管每种药物类别的机制可能不同。在用利尿剂治疗的受试者中，尿酸盐的分级排泄 (fractional excretion) 降低 (J. Am. Soc. Nephrol. 18:3101, 2007)。在一些情况下，可以解释这些现象的机制包括利尿剂的可能存在的体积效应、近端小管 (NPT) 中对尿酸盐分泌转运体的抑制以及 OAT4(SLC22A11) 和 URAT1 的直接或间接激活 (Reyes, Cardiovascular Drugs and Serum Uric Acid, Cardiovascular Drugs and Therapy17:397, 2004)。

[0032] 在一些情况下，利尿剂作为平衡离子底物发挥功能，由 OAT4 分泌到尿液中，这促进了尿酸的重吸收。例如，氢氯噻嗪 (J. Am. Soc. Nephrol. 18:430, 2007) 和托拉塞米 (torasemide) (J. Am. Soc. Nephrol. 18:3101, 2007) 使 OAT4 尿酸转运活性增加。

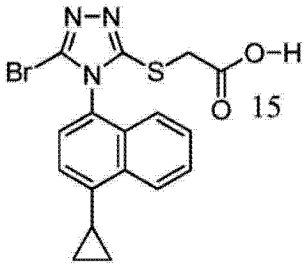
[0033] 遗传证据支持 OAT4 和 URAT1 在痛风、高尿酸血症和 OAT4 利尿剂诱导的高尿酸血症中的作用，其中两项关联研究显示了不依赖于 OAT4 的关联 (Circ. Cardiovasc. Genet. 2010;3;523-530 和 Kolz 等人，2009. Vol5:6)，而另一项研究表明 OAT4 与利尿剂诱导的高尿酸血症相关 (McAdams presentation ACR Arthritis&Rheumatism, 第 63 卷，2011 年 11 月文摘增刊）。

[0034] 在一些情况下，流体体积改变是利尿剂通过对钠转运体的阻断产生的主要作用，并且尿酸盐的吸收与近端小管的 NaCl 吸收并行。尿酸铁和血清尿酸水平与体积状态很好地相关。通过对经利尿剂治疗的患者加载 (loading) 盐可以消除高尿酸血症，这与发挥重要作用的体积状态一致（在盐限制量～ 20mequ/ 天与盐加载量为 250mEqu/ 天的高血压患者之间，SUA 降低 2mg/dl，而在盐剥夺 (salt-deprived) 的患者中存在高尿酸血症）。在一些情况下，利尿剂导致尿酸盐的分级排泄减少，其中对 sUA 的体积效应可能是由于近端小管细胞中钠与质子平衡的改变，这导致 URAT1 和 OAT4 的激活 (Am. J. Physiol. 1996Nov;271(5Pt2):F1093-9, Nijenhuis 等 人，J. Clin. Invest. 115:1651, 2005; J. Am. Soc. Nephrol. 18:3101 - 3109, 2007)。

[0035] 一项研究 (Arthritis&Rheumatism, 第 63 卷，2011 年 11 月文摘增刊，Abstracts of the Am Coll of Rheumatology/Assoc of Rheumatology Health Professionals Annual Scientific Meeting) 得出以下结论：仅在具有血清尿酸盐水平升高的较高遗传风险评分的那些受试者中观察到与高血压受试者中利尿剂的使用相关的痛风风险增加，这提示了尿酸盐基因与利尿剂之间的相互作用 (urate gene-by-diuretic interaction)，阐述了影响尿酸盐代谢和处理的遗传性状与高血压受试者中利尿剂使用的重要相互作用。

Lesinurad

[0036] Lesinurad 是 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1, 2, 4- 三唑 -3- 基硫代）乙酸的通用名，其化学结构为：



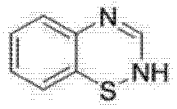
[0037] 在一些情况下，术语 Lesinurad 还包括 Lesinurad 的钠盐，即 2-(5- 溴 -4-(4- 环丙基萘 -1- 基)-4H-1,2,4- 三唑 -3- 基硫代) 乙酸钠。

[0038] Lesinurad 在治疗痛风的临床研发中是一种使尿酸盐降低的治疗。在一些情况下，Lesinurad 通过抑制 URAT1 转运体而阻断肾脏近端小管内尿酸盐 (UA) 的重吸收。

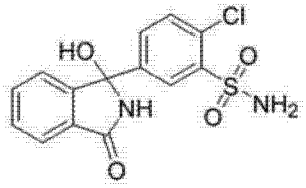
噻嗪类 / 噻嗪类利尿剂

[0039] 噻嗪类或噻嗪类利尿剂用于治疗高血压症 (高血压) 和水肿 (例如由心脏、肝脏或肾脏疾病所导致的)，降低因高血压引起的死亡、中风、心脏病发作和心力衰竭的风险。噻嗪类作为美国推荐的一线 (first-line) 治疗和欧洲推荐的治疗，是最常用的利尿剂。噻嗪类通常被理解为通过阻断噻嗪类敏感的 Na^+-Cl^- 协同转运体 (symporter) 从而抑制肾脏中钠和氯离子从远曲小管的重吸收而工作，这导致钠排泄增加并且因此导致水排泄增加，即排尿增加。在一些情况下，减少体内水量可导致较低的血液体积，从而降低心输出量，并最终导致动脉压下降。

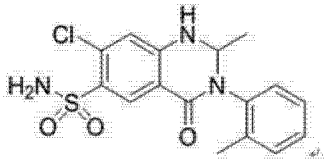
[0040] 术语“噻嗪类”是指作用于“噻嗪类受体”的药物，并且包括与噻嗪类作用类似但是不含苯并噻二嗪分子结构的“噻嗪类样利尿剂”。“噻嗪类样利尿剂”的示例包括但不限于苄氟噻嗪、苄噻嗪 (benzthiazide)、氯噻嗪、氢氯噻嗪、氢氟噻嗪、吲达帕胺、甲氯噻嗪、泊利噻嗪、喹乙宗 (quinethazone)、三氯噻嗪 (trichlormethiazide)、氯噻酮 (chlortalidone) 和美托拉宗。



苯并噻二嗪



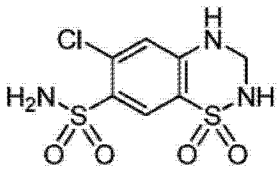
氯噻酮



美托拉宗

氢氯噻嗪

[0041] 氢氯噻嗪，6- 氯 -1,1- 二氧代 -3,4- 二氢 -2H-1,2,4- 苯并噻二嗪 -7- 磺酰胺 (HCTZ、HCT 或 HZT)，常常被开在处方中用于治疗高血压和充血性心力衰竭。



[0042] 氢氯噻嗪通常被理解为作用于肾脏，以降低钠的重吸收并且抑制肾脏留存水的能力，从而降低血液体积，减少回流至心脏的血液回流并且因此降低心输出量。氢氯噻嗪竞争 Na^+/Cl^- 协同转运体上的氯位点，从而损害钠的转运。一项研究发现，使用氢氯噻嗪导致

OAT4 介导的尿酸摄取增加 2.6 倍。

有机阴离子转运体 -4(OAT4)

[0043] 人有机阴离子转运体 4(hOAT4) 在肾脏中表达，并且在一些情况下，编码 550 个氨基酸残基的蛋白质。在一些情况下，hOAT4 参与内源性物质以及许多药物和生物异源物质 (xenobiotics) 的肾脏分泌和重吸收。通常，OAT4 可以存在于近端肾小管的腔侧膜处，并且介导有机阴离子例如硫酸雌酮 (ES)、硫酸脱氢表雄酮 (DHEA) 和赭曲霉素 A、ρ - 氨基马尿酸盐 (PAH) 的转运。

[0044] 苯溴马隆和 6- 羟基苯溴马隆是 OAT4 的抑制剂（它们由此促进尿酸的排泄）。苯溴马隆以 5.4 μ mol/L 的 IC50 抑制 ^{3}H- 硫酸雌酮的 OAT4 摄取，而 6- 羟基苯溴马隆以 3.2 μ mol/L 的 IC50 抑制 ^{3}H- 硫酸雌酮的 OAT4 摄取。

实施例

[0045] 下面提供的实施例和制品进一步阐述和例示了本发明的化合物和制备此类化合物的方法。应当理解，以下实施例和制品的范围不以任何方式限制本发明的范围。

[0046] 尿酸盐转运体 OAT4 在培养的细胞和卵母细胞中稳定表达。

[0047] 对于培养的细胞，稳定表达转运体的 HEK293 细胞是通过用携带转运体的 DNA 构建体转染、抗生素选择和克隆选择具有高转运体活性的克隆而产生的。另外，瞬时表达转运体的细胞是通过 HEK293T 细胞的反向转染而产生的。将转染子以高密度平板接种于以多聚 L- 赖氨酸涂布的多孔板上，并于 1-2 天后进行测定。稳定和瞬时表达的细胞的结果是类似的。

[0048] 向卵母细胞注射 cRNA 以供 OAT4 表达，并于 3-4 天后进行测定。

[0049] 通过使细胞与转运体底物在含有 125mM 葡萄糖酸钠、4.8mM 葡萄糖酸钾、1.2mM 磷酸二氢钠、1.2mM 硫酸镁、1.3mM 葡萄糖酸钙、5.6mM 葡萄糖和 25mM HEPES pH7.1 的测定缓冲液中孵育来进行活性测定。在加入底物之前，将测试药物加入细胞中保持指定的时间。所使用的底物是 5 μ M6- 羧基荧光素 (CF)、50nM ^{3}H- 硫酸雌酮 (ES) 和 100 μ M ^{14}C- 尿酸 (UA)。对于已转染的细胞，将底物孵育 2 分钟，接着通过抽吸将其去除，并在含有 125mM 葡萄糖酸钠和 25mM HEPESpH7.1 的洗涤缓冲液中洗涤细胞 3 次。然后在 CF 转运的荧光测定以及 ES 和 UA 的液体闪烁计数之前，在 1M 氢氧化钠中使细胞裂解。

类似地进行卵母细胞测定，不同之处为注射测试药物，然后在 30 分钟 (ES) 或 60 分钟 (UA) 后对转运进行测定。这些测定的结果总结于以下所列的附图中。

[0050] 图 1 表示氢氯噻嗪 (HCTZ) 诱导的高尿酸血症的两种机制的图示；a) 直接的—HCTZ 对 OAT4 引起的尿酸摄取的增强；和 b) 间接的—HCTZ 增强 OAT4 刺激性蛋白质 (NHE3)。

[0051] 图 2 表示在用 (a) 缺少 OAT4 的对照质粒 (pCMV) 或 (b)OAT4 瞬时转染的 HEK293T 细胞中与 50 μ M Lesinurad（黑色）或赋形剂（浅灰色）孵育的 6- 羧基荧光素 (CF) 底物的 OAT4 转运活性。

[0052] 图 3 表示与 6- 羧基荧光素 (CF) 底物和不同量 (0、0.5、1、2nM) 的冷尿酸孵育的、用 OAT4（灰色）或缺少 OAT4 的对照质粒 (pCMV，黑色）瞬时转染的 HEK293T 细胞，其表明尿酸盐充当 CF 的针对 OAT4 的竞争性底物 (EC_{50} ～ 900 μ M)。

[0053] 图 4 表示在不同量的 Lesinurad（■）和苯溴马隆（▲）的存在下 OAT4 尿酸盐转运的量 (cpm)。Lesinurad 的 OAT4IC_{50}=5 μ M；而苯溴马隆 =10 μ M。

[0054] 图 5 表示不同浓度的 Lesinurad 在表达 URAT1 和 / 或 OAT4 的 293T 细胞中对 UA 转运的抑制百分比，其表明 Lesinurad 以类似的效力抑制 URAT1 和 OAT4。

[0055] 图 6 表示在 1mM 氢氯噻嗪 (HCTZ) 的存在（——）或不存在 (----) 下以及不同浓度的 Lesinurad 下，稳定表达 OAT4 的 293T 细胞中的 3H- 硫酸雌酮 (ES) 转运百分比，其表明 HCTZ 对 Lesinurad 介导的对 OAT4 转运体活性的抑制没有影响。

[0056] 图 7 表示在表达 OAT4 的 HEK293 细胞中，在赋形剂、Lesinurad、奥昔嘌醇或别嘌呤醇 (100μM- 孵育 5min) 的存在下，(a)6- 羧基荧光素 (CF-5μM) 和 (b)^{14}C- 尿酸 (UA-100μM) 底物的 OAT4 转运活性，其表明奥昔嘌醇和别嘌呤醇不会抑制 OAT4 转运活性。

[0057] 图 8 表示在注射了多种不同浓度的 Lesinurad(25、50、100μM- 外部；22、44、444μM- 内部）或赋形剂的表达 OAT4 的卵母细胞中 ^{3}H- 硫酸雌酮 (ES) 的摄取百分比，其表明 Lesinurad 主要从胞外（顶）侧抑制 OAT4。

[0058] 图 9 表示注射了 Lesinurad(50nL) 并孵育 30 分钟后，表达 OAT4 的卵母细胞内部和外部 ^{14}C 标记的 Lesinurad 的量（通过闪烁计数测得），其表明 Lesinurad 在实验期间保留于经注射的卵母细胞内部。

[0059] 图 10A 表示 2 期临床研究设计的示意图。该研究是在 208 例痛风患者中进行的为期 4 周、双盲、以安慰剂为对照的临床试验，所述患者尽管接受稳定剂量的别嘌呤醇至少 6 周，但是对别嘌呤醇应答不足，血清尿酸盐 (sUA) ≥ 6mg/dL。将 Lesinurad 或匹配安慰剂的 3 种剂量之一加入到患者的别嘌呤醇方案中。该研究的主要终点是第 4 周时 sUA 的平均降低，关键的次要终点是第 4 周时 sUA<6.0mg/dL 的受试者的比例。在该试验中，少数患者在治疗期间接受噻嗪类利尿剂；将其应答率与未同时接受噻嗪类利尿剂的那些患者进行比较，其结果示于图 10B 中。该图表示血清尿酸 (sUA) 水平低于 6mg/dL 的患者的比例，这些患者针对 Lesinurad 的多种不同剂量被分为接受利尿剂的患者（黑色）和未接受利尿剂的患者（浅灰色），其表明接受利尿剂的患者对 Lesinurad 应答良好。

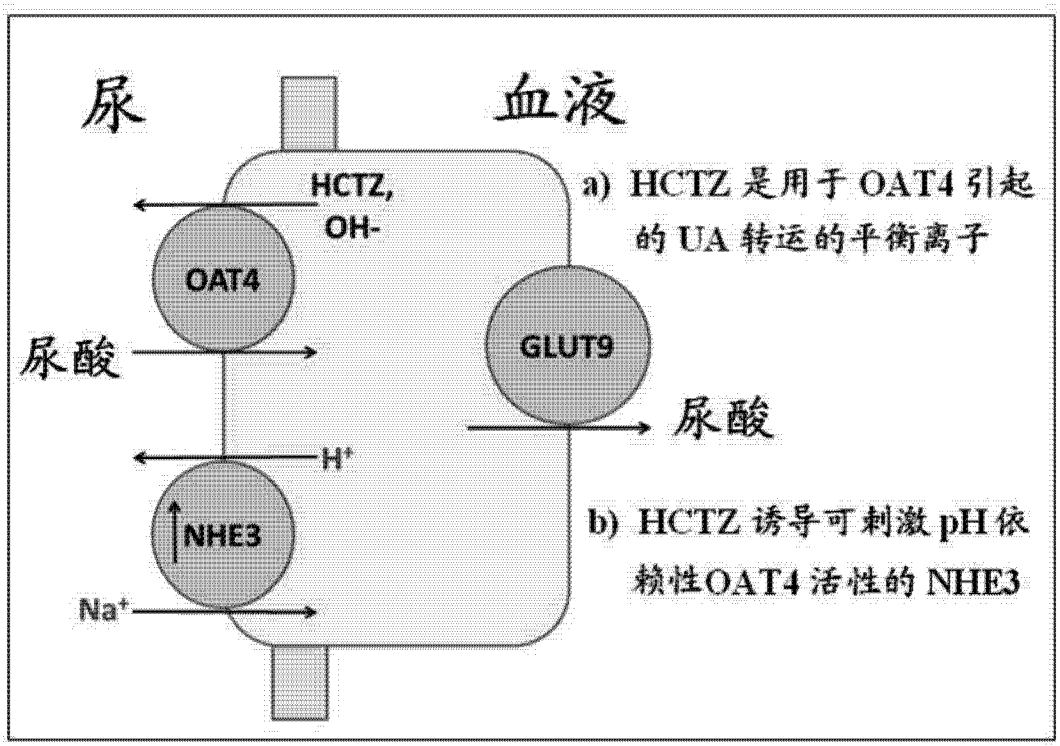

尿
血液
HCTZ,
OH-
OAT4
尿酸
GLUT9
尿酸
H+
NHE3
Na+
a) HCTZ 是用于 OAT4 引起的 UA 转运的平衡离子
b) HCTZ 诱导可刺激 pH 依赖性OAT4 活性的 NHE3

图 1

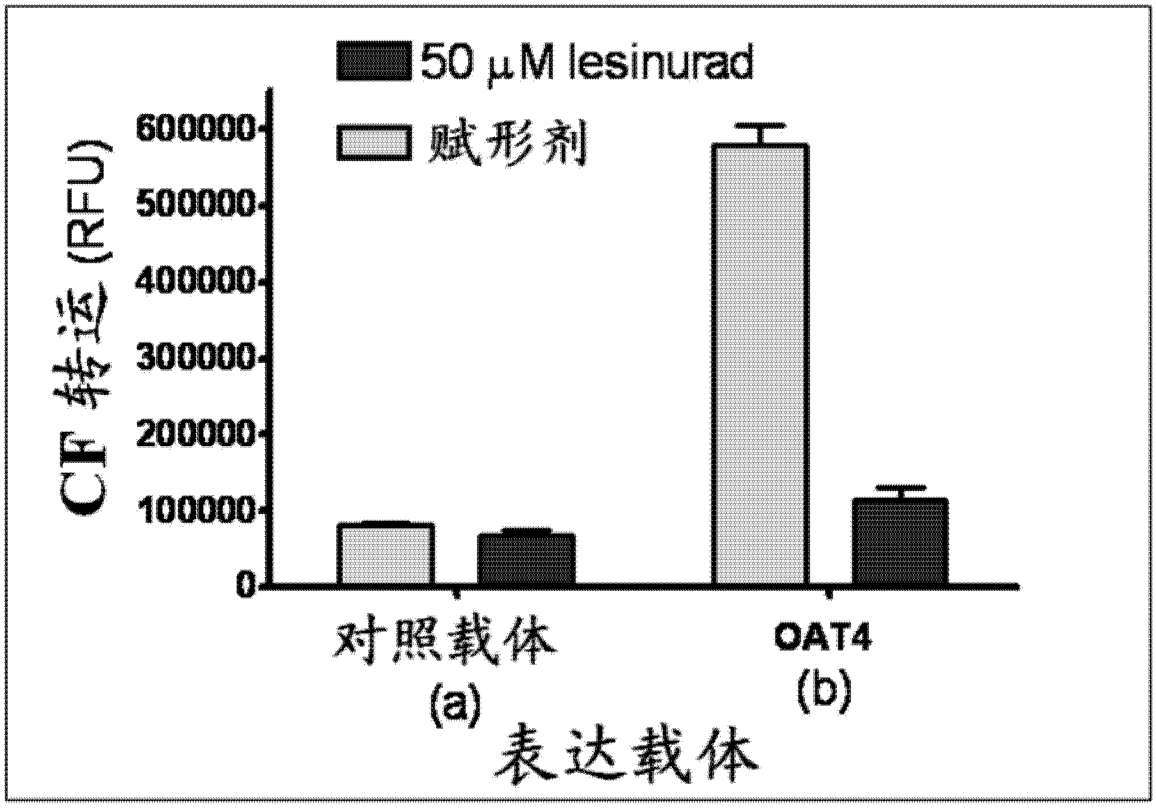

50 μM lesinurad
赋形剂
CF 转运 (RFU)
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
对照载体
OAT4
(a)
(b)
表达载体

图 2

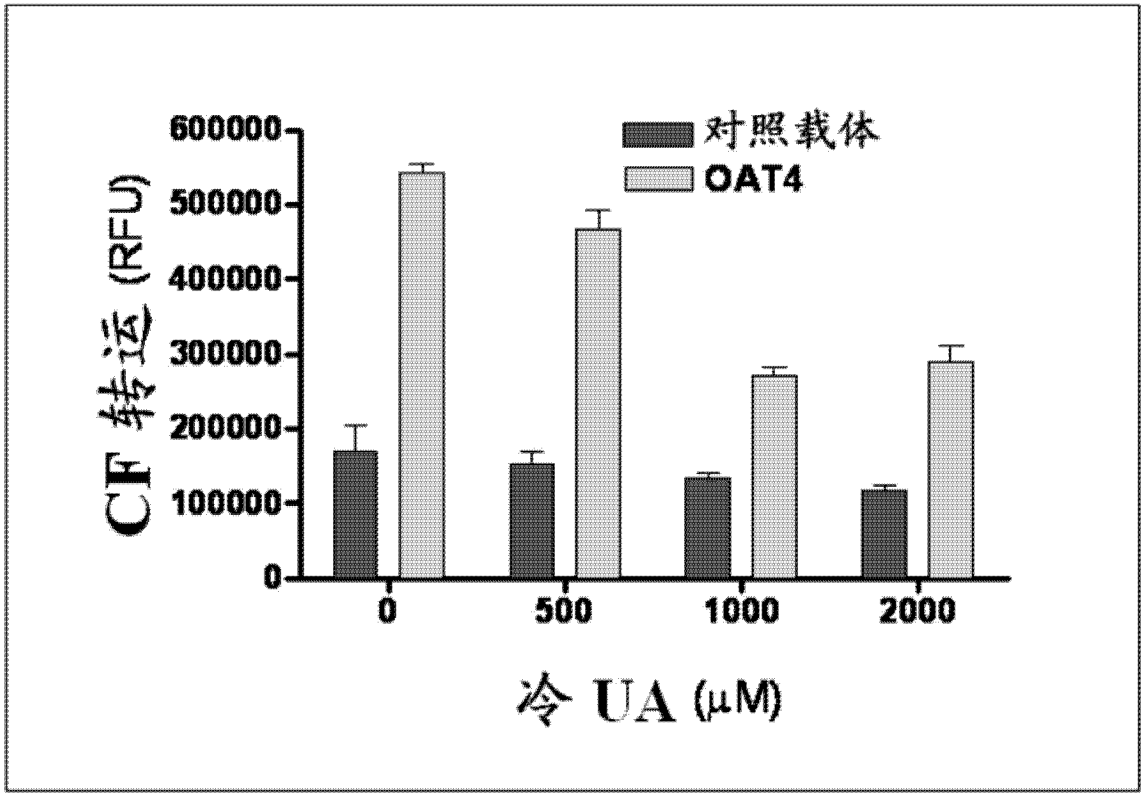

600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
CF 转运 (RFU)
对照载体
OAT4
0
500
1000
2000
冷 UA (μM)

图 3

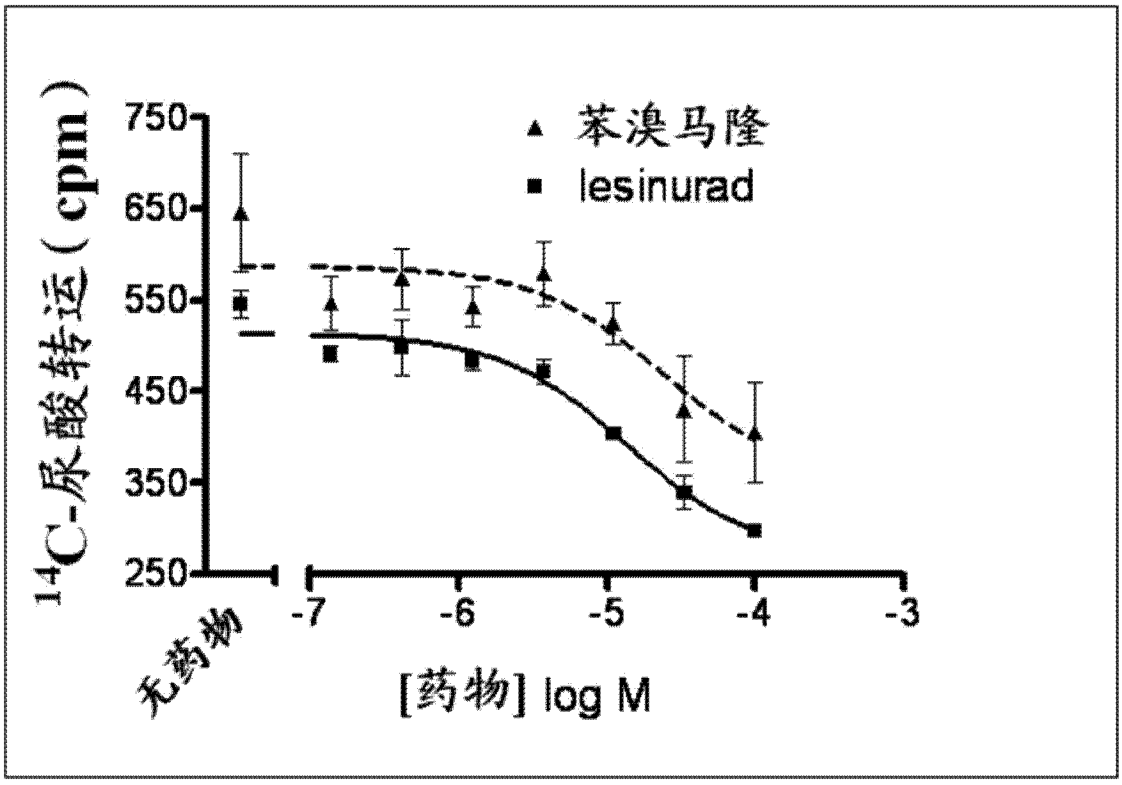

苯溴马隆
lesinurad
750
650
550
450
350
250
^{14}C-尿酸转运(cpm)
无药物
-7
-6
-5
-4
-3
[药物] log M

图 4

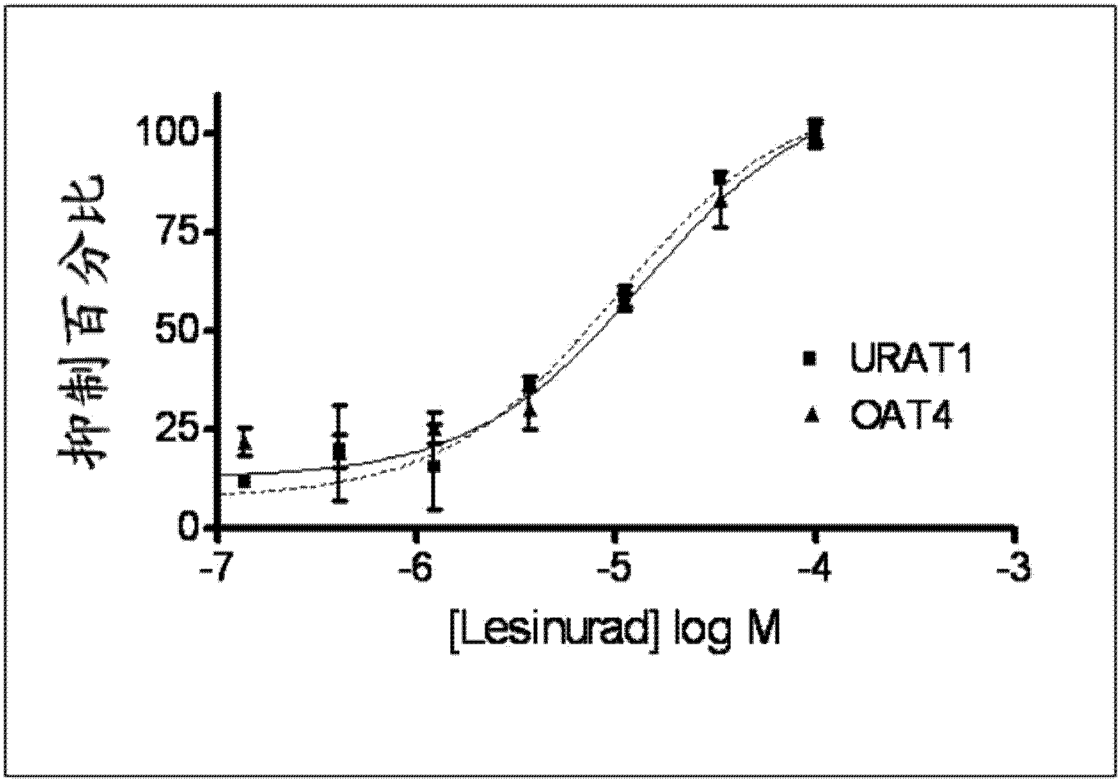


图 5

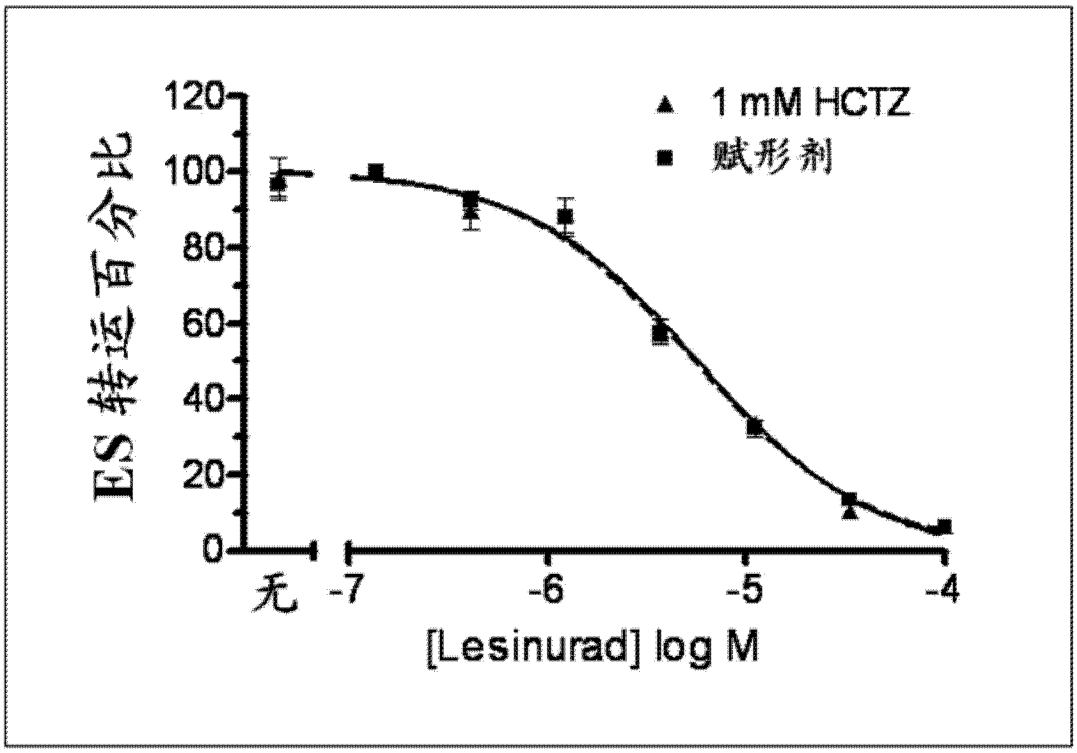
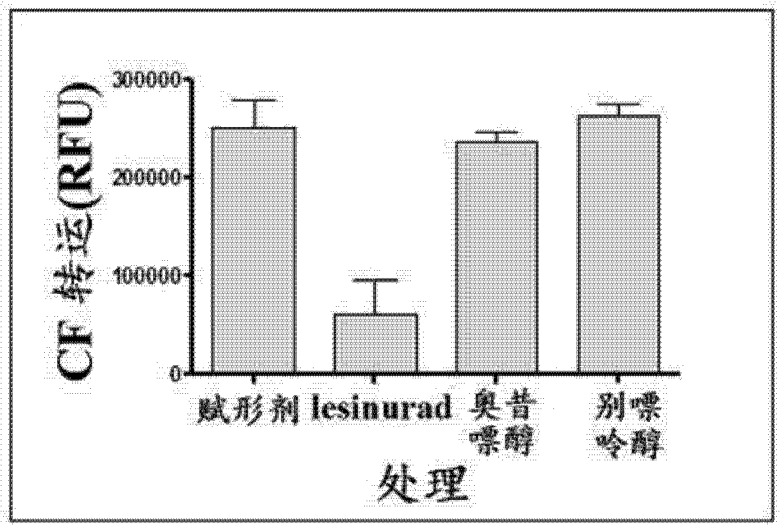

120
100
80
60
40
20
0
ES 转运百分比
1 mM HCTZ
赋形剂
无
-7
-6
-5
-4
[Lesinurad] log M

图 6


CF 转运(RFU)
300000
200000
100000
0
赋形剂
lesinurad
奥昔嘌醇
别嘌呤醇
处理

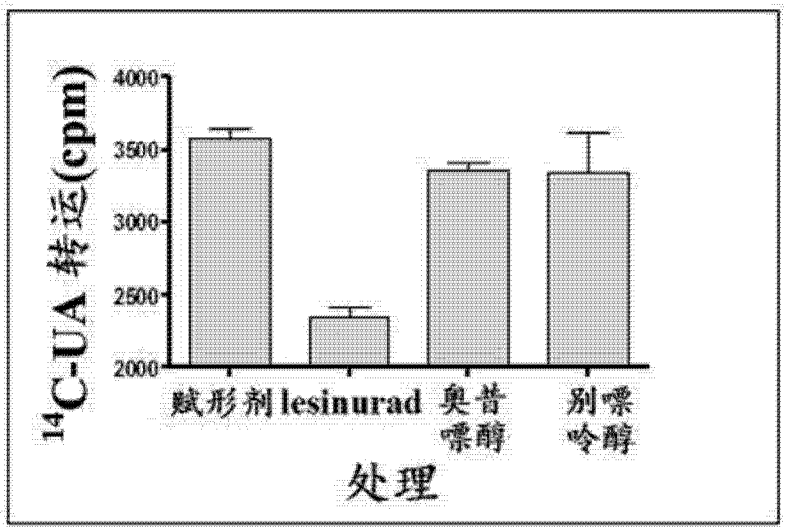

14C-UA 转运(cpm)
4000
3500
3000
2500
2000
赋形剂
lesinurad
奥昔嘌醇
别嘌呤醇
处理

图 7

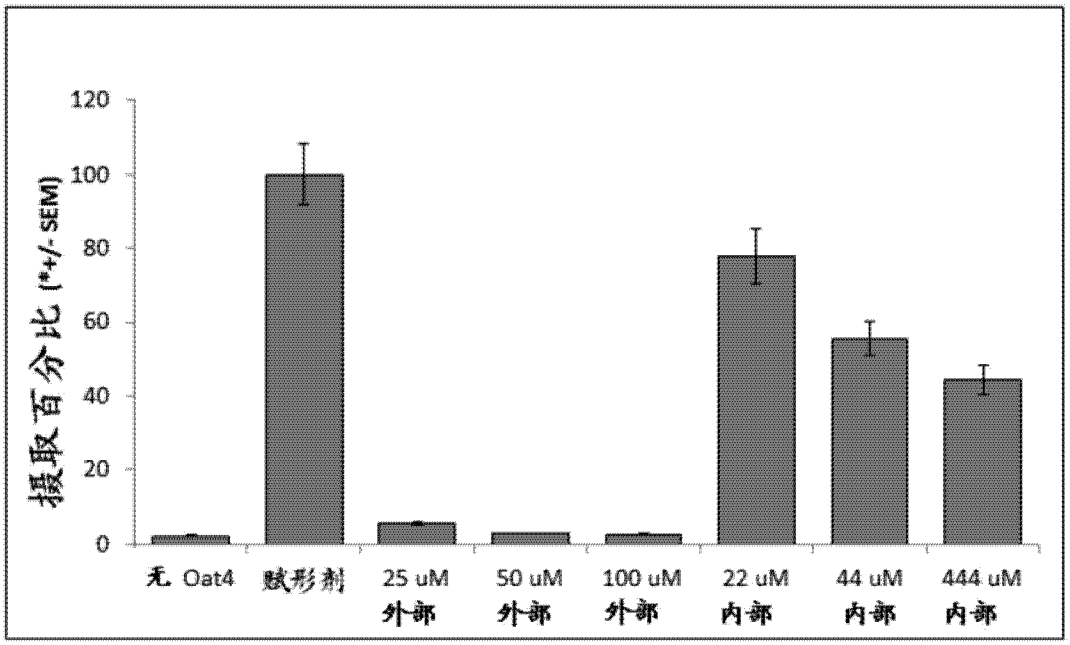

摄取百分比 (*+/- SEM)
120
100
80
60
40
20
0
无 Oat4
赋形剂
25 uM 外部
50 uM 外部
100 uM 外部
22 uM 内部
44 uM 内部
444 uM 内部

图 8

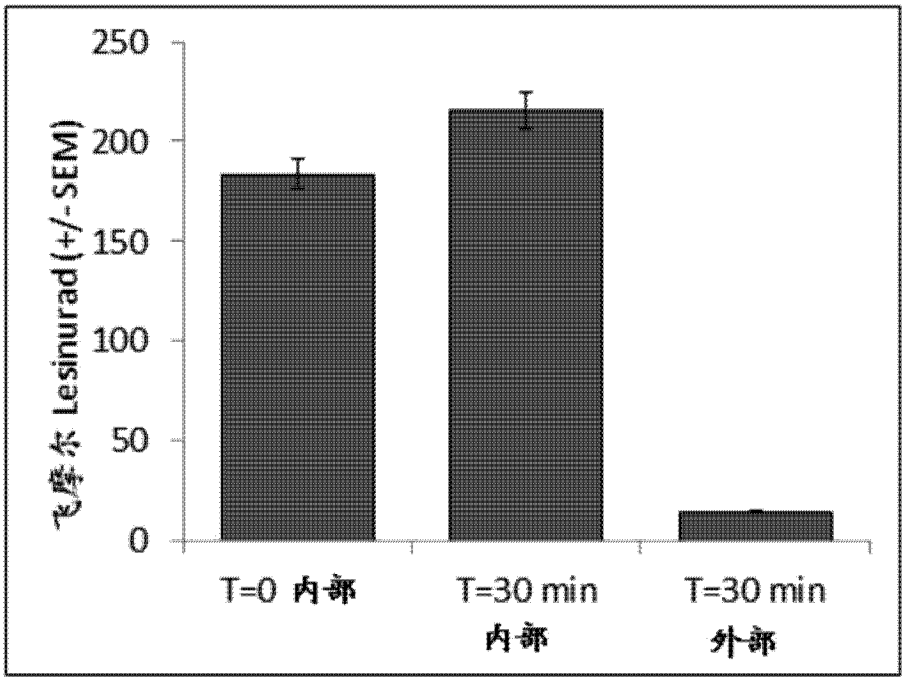

飞摩尔 Lesinurad (+/- SEM)
250
200
150
100
50
0
T=0 内部
T=30 min 内部
T=30 min 外部

图 9

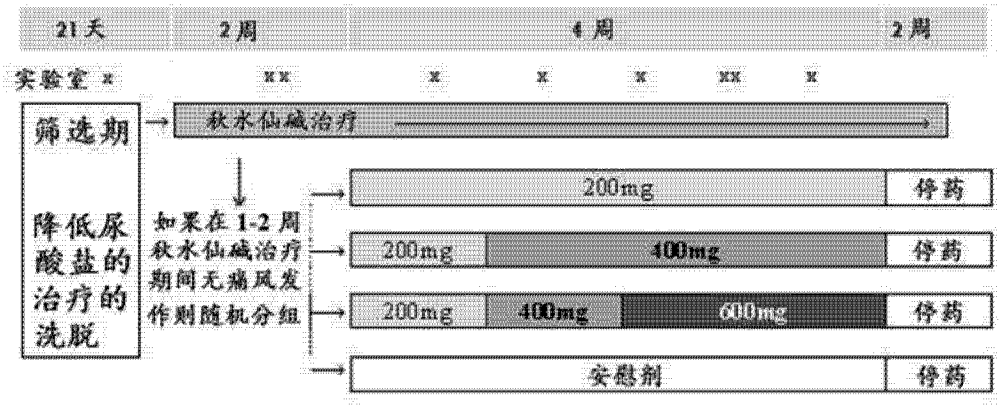

21天
2周
4周
2周
实验室 x
xx
x
x
x
xx
x
筛选期
秋水仙碱治疗
降低尿酸盐的治疗的洗脱
如果在1-2周秋水仙碱治疗期间无痛风发作则随机分组
200mg
停药
200mg
400mg
停药
200mg
400mg
600mg
停药
安慰剂
停药

图 10A

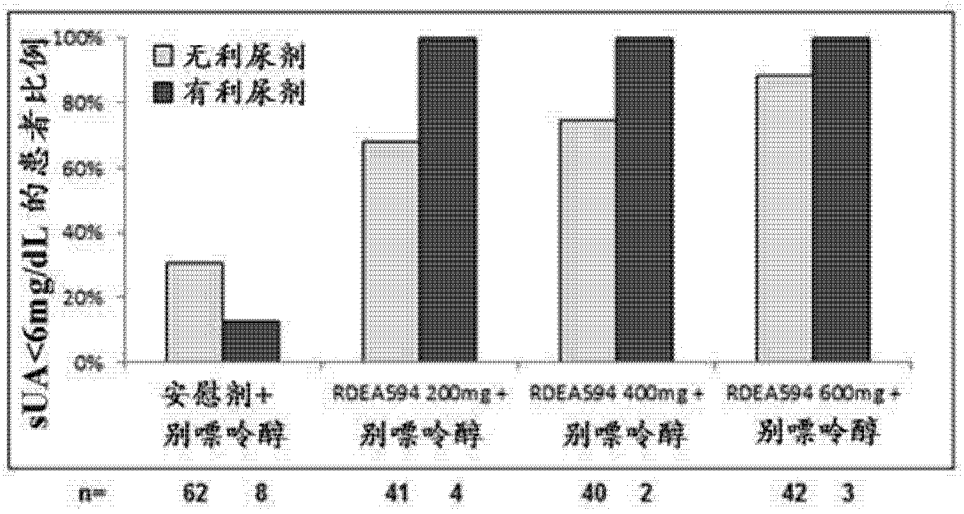

sUA<6mg/dL 的患者比例
100%
80%
60%
40%
20%
0%
无利尿剂
有利尿剂
安慰剂+
别嘌呤醇
RDEA594 200mg+
别嘌呤醇
RDEA594 400mg+
别嘌呤醇
RDEA594 600mg+
别嘌呤醇
n=
62 8
41 4
40 2
42 3

图 10B