·重大新药创制专项巡礼·

化合物 CC18013 抗高尿酸血症作用的实验研究

李雪晨[1],姜　楠[1],杨亚军[2],闫祯昕[1],张　露[2],陈冬婷[1],田金英[1],肖志艳[2],叶　菲[1]
(中国医学科学院北京协和医学院药物研究所 1 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室,
2 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室,北京 100050)

[摘要] **目的**:研究化合物 CC18013 对抗高尿酸血症的药效,评价其早期安全性,并对其与黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XOD)活性抑制相关的机制进行探索。**方法**:分别构建急性与慢性高尿酸血症小鼠模型,以非布索坦为阳性对照药,检测不同剂量 CC18013 对模型动物血尿酸水平的影响。体外酶学方法检测 CC18013 抑制 XOD 活性的能力;并观察其对高尿酸血症小鼠血清和组织 XOD 活性的影响;分子对接分析其与 XOD 的相互作用。CC18013 单次灌胃(*ig*)给药,观察其对正常 ICR 小鼠体重增长等一般状态的影响。**结果**:化合物 CC18013 在体内剂量依赖地发挥降尿酸作用,最低有效剂量为 0.5 mg·kg^{-1}。其体外抑制 XOD 活性的半抑制浓度(IC_{50})为 4.6 nmol·L^{-1},体内明显降低肝脏与小肠 XOD 活性。分子对接显示其与 XOD 存在较强的相互作用。在单次口服(*po*) 500 mg·kg^{-1}剂量下,化合物 CC18013 对正常 ICR 小鼠未见明显不良反应。**结论**:化合物 CC18013 是抗高尿酸血症药效较强且安全性较好的 XOD 抑制剂。

[关键词] 高尿酸血症;尿酸;黄嘌呤氧化酶
[中图分类号] R965　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003－3734(2021)16－1460－06

Experimental study of the anti-hyperuricemic effect of compound CC18013

LI Xue-chen[1], JIANG Nan[1], YANG Ya-jun[2], YAN Zhen-xin[1], ZHANG Lu[2], CHEN Dong-ting[1], TIAN Jin-ying[1], XIAO Zhi-yan[2], YE Fei[1]
(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College*, 1 *Beijing Key Laboratory of New Drug Mechanisms and Pharmacological Evaluation Study*, 2 *Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation*, *Beijing* 100050, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To study the anti-hyperuricemic efficacy, assess the safety of compound CC18013, and explore its possible mechanism related to xanthine oxidase (XOD) inhibition. **Methods**: By establishing the acute and chronic hyperuricemic mice models and use of febuxostat as the positive control drug, the effect of CC18013 on serum uric acid levels was detected; the XOD inhibiting ability of CC18013 was determined using *in vitro* XOD model. The effect of CC18013 on serum and tissue XOD activity in hyperuricemic mice was measured. The interaction between CC18013 and XOD was analyzed by molecular-docking. The body weight change and general state of the mice were observe after a single dose treatment of CC18013. **Results**: CC18013 dose-dependently reduced serum uric acid levels *in vivo*, with the lowest effective dose of 0.5 mg·kg^{-1}. Its IC_{50} value of XOD inhibition *in vitro* was 4.6 nmol·L^{-1}. Moreover, it significantly inhibited XOD activity in liver and small intestine. Molecular-docking result indicated that it had a strong interaction with XOD. It showed no evident toxicity under the single dose of 500 mg·kg^{-1}. **Conclusion**: CC18013 is an XOD inhibitor with strong anti-hyperuricemic effect and high safety.

[**Key words**] hyperuricemia; uric acid; xanthine oxidase

[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09711001-003-005);国家自然科学基金资助项目(81600546,82000820);中国医学科学院医学与健康科技创新工程团队资助项目(CIFMS-2016-I2M-3-012)

[作者简介] 李雪晨,女,助理研究员,主要从事抗高尿酸血症与肾病药理研究。E-mail:xli@imm.ac.cn。共同第一作者:姜楠,女,硕士,主要从事高尿酸血症药理研究。E-mail:jiangnan@imm.ac.cn。

[通讯作者] 叶菲,女,研究员,主要从事代谢综合征药理研究。联系电话:(010)83150495,E-mail:yefei@imm.ac.cn。

作为嘌呤代谢的终产物,尿酸在体内生成过多或排泄减少,均可导致高尿酸血症。临床经验认为在正常嘌呤饮食状态下,当男性血尿酸水平高于 7 mg·dL^{-1}、女性血尿酸水平高于 6 mg·dL^{-1}时,可诊断为高尿酸血症[1]。近年来,随着人们生活水平的日益提高,高尿酸血症发病率逐渐升高,在国内已达到约 13.3%[2],且正在向年轻化趋势发展[3-4]。高尿酸血症易引起尿酸结晶析出,在关节腔中沉积,造成痛风。除此以外,虽然高尿酸血症可无具体临床症状表现,但多项流行病学研究表明,高尿酸血症与包括心血管疾病、肾脏疾病、糖脂代谢紊乱等内在疾病的发生和发展密切相关[5-7]。研究表明,高尿酸可引起氧化应激、炎症等反应,对组织、血管等产生损害[8]。所以,有效控制高尿酸血症具有重要临床意义。

目前,临床抗高尿酸血症药物主要通过减少尿酸合成或促进尿酸排泄发挥降尿酸作用。其中,减少尿酸合成的药物主要以黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)为靶点。XOD 是黄嘌呤(xanthine, XA)氧化生成次黄嘌呤(hypoxanthine, HXA)并最终生成尿酸过程中的关键催化酶,抑制 XOD 可显著降低血尿酸水平,是临床一线用药的重要靶点之一。临床使用的 XOD 抑制剂主要有别嘌呤醇、非布索坦与托匹司他。其中,别嘌呤醇的药效低于非布索坦与托匹司他。非布索坦药效虽然显著,但临床试验发现其有增加心源性死亡的风险[9],美国 FDA 已发布相关安全性警告。托匹司他效果良好,具有长效降尿酸效果[10],但目前还未在日本以外的国家上市。因此,研发新型高效的 XOD 抑制剂作为抗高尿酸血症的一线治疗药物十分必要。

本研究通过前期大量筛选,获得对 XOD 活性有显著抑制作用,并在体内具有良好降尿酸效果及安全性的化合物 CC18013,为进一步将其研发成为抗高尿酸血症临床药物提供了实验基础。

材料与方法

1 药物与试剂

化合物 CC18013 由中国医学科学院药物研究所肖志艳研究员课题组合成,分子结构见图 1。

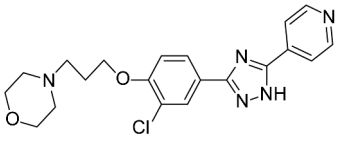


图 1 化合物 CC18013 的化学结构

非布索坦(日本 TCI 公司,纯度 >97%);XOD 来源于牛奶;黄嘌呤、次黄嘌呤均购自德国默克 Sigma-Aldrich 公司;氧嗪酸钾(oteracil potassium, OP,大连美仑生物技术有限公司,批号:D0901A);尿酸测定试剂盒(北京中生北控生物技术有限公司);XOD 活性检测试剂盒(南京建成生物科技有限公司);Thermo Pierce 二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 仪器

U-Quant 酶标仪(美国 Bio Tek 公司)。

3 实验动物

雄性 ICR 小鼠,体重(20 ± 2) g,北京维通利华生物科技股份有限公司。动物合格证号:SCXK(京)2016-0006。小鼠饲养于中国医学科学院药物研究所实验动物管理中心,温度(22 ℃ ~25 ℃)、湿度(40% ~60%)、光照/黑暗时间 12 h 交替,5 只小鼠同笼饲养,自由进食和饮水。所有动物实验均按标准操作,经中国医学科学院药物研究所实验动物管理与动物福利委员会审核并批准。

4 高尿酸血症小鼠模型

健康雄性 ICR 小鼠随机分为对照-1 组、模型-1 组、CC18013 低-1、中-1、高-1 组(给药剂量 0.1,0.5 和 1 mg·kg^{-1}),非布索坦-1 组(给药剂量 1 mg·kg^{-1}),每组 8 只。对照-1 组单次灌胃(*ig*)纯水、皮下注射(*sc*)溶剂 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液;其余各组动物均单次 *ig* 给予 HXA 500 mg·kg^{-1}、*sc* 给予 OP 300 mg·kg^{-1}造成急性高尿酸血症。各给药组单次 *ig* 给予相应治疗药物,对照-1 组和模型-1 组给予等量纯水。分别于给药 0,1,2 和 4 h 时尾尖取血,测定小鼠血尿酸水平并计算血尿酸-时间曲线下面积(AUC)。于给药 4 h 后处死小鼠,取全血后以 3 500 r·min^{-1}离心 4 min,取上层血清,保存于 -80 ℃冰箱。同时,迅速将小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏和小肠取出,于液氮中速冻,随后转至 -80 ℃冰箱保存。

健康雄性 ICR 小鼠随机分为对照-2 组与造模组,造模组 *sc* 给予 OP 300 mg·kg^{-1},*qd*,对照-2 组 *sc* 给予 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液,*qd*,连续诱导 2 周,造成慢性高尿酸血症。将血尿酸稳定升高的小鼠按血尿酸水平随机分为模型-2 组、CC18013 低剂量-2 组(0.1 mg·kg^{-1})与高剂量-2 组(0.5 mg·kg^{-1}),每组 8 只,并单次 *ig* 给予相应剂量 CC18013,对照-2 组和模型-2 组给予等量纯水。于给药 4 h 时尾尖取血,

检测小鼠的血尿酸水平。

5　血尿酸水平测定

根据试剂盒说明书方法检测血尿酸水平。

6　急性毒性实验

健康 ICR 小鼠，每组 10 只，雌雄数量各半。动物适应性饲养 1 d，称体重记为 d 0 体重，单次 *ig* 给予 500 mg·kg^{-1} CC18013。观察动物的一般状态。每天记录体重，连续观察 7 d，实验终点时脱臼处死动物，并进行大体解剖。

7　血清与组织 XOD 活性测定

将冻存于 −80 ℃冰箱的血清、各组织置于冰水中复融。将组织用预冷的生理盐水按一定比例的重量(g)∶体积(mL)制成匀浆，分别按试剂盒说明书测定血清和各组织 XOD 活性。按 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定各组织匀浆液的蛋白质含量，用以修正其 XOD 活性。

8　体外 XOD 活性抑制实验

在磷酸钠缓冲体系(pH 7.4)中，加入 3 U·L^{-1} 的 XOD、50 μmol·L^{-1} 底物 XA、不同浓度的化合物 CC18013，37 ℃恒温条件下反应 20 min，酶标仪读取 293 nm 波长处光密度值(OD 值)，最后通过 Graphpad Prism 8 软件 Sigmoidal dose-response (variable slope)拟合曲线，并计算半抑制浓度(IC_{50})。

9　分子对接分析

利用 MOE 2018.01 软件包生成 XOD 分子结构，并进行分子模拟，对接图使用 DS 2016 生成。以托匹司他为共配晶体，选取 PDB 结构 1V97 作为对接受体。采用 Site Finder 程序定义活性位点，托匹司他的复位对接均方根偏差(RMSD)值为 1.56 Å。并使用打分函数 London DG 和 GBVI/WSA DG 优选对接构象。

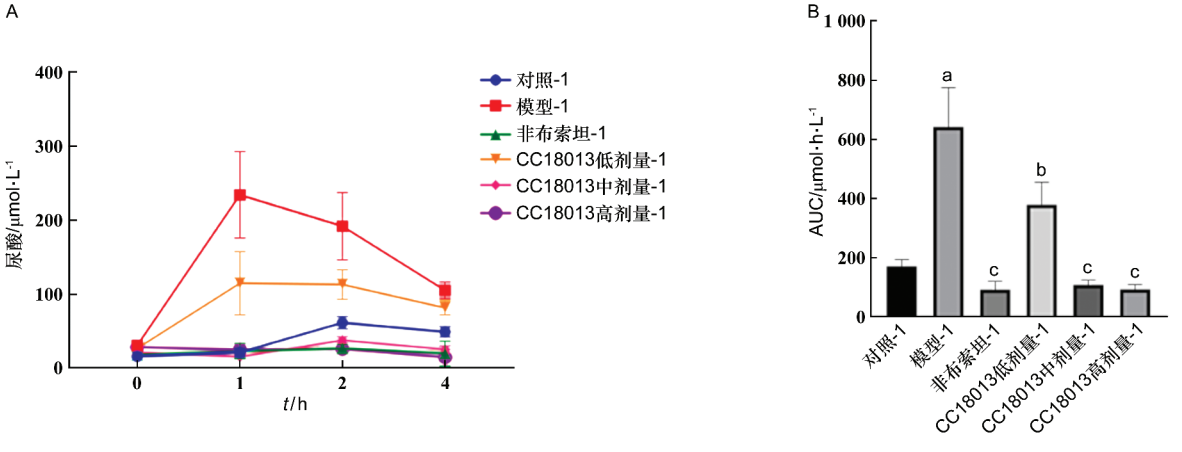
10　数据处理

应用 GraphPad Prism 8 统计软件进行统计分析，实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行多组间数据比较，$P < 0.05$ 表明具有统计学差异。

结　果

1　CC18013 在高尿酸血症小鼠模型中的降血尿酸作用

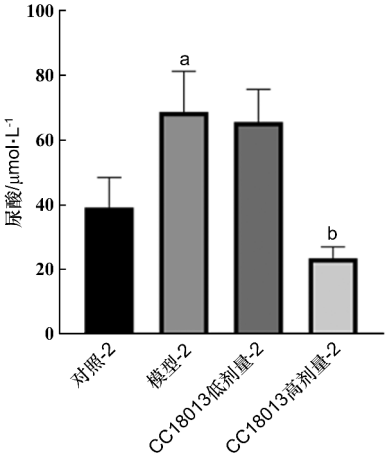
1.1　CC18013 对急性高尿酸血症小鼠的降尿酸作用　为评估 CC18013 的抗高尿酸血症效果，利用 HXA 与 OP 合并单次诱导造成小鼠急性高尿酸血症。如图 2 所示，与对照-1 组比较，模型-1 组小鼠血尿酸水平呈现一过性升高，在 4 h 后逐渐回落至较低水平。CC18013 低、中、高剂量-1 组的血尿酸-时间曲线整体低于模型-1 组，并呈一定的剂量相关性。其中，阳性对照药非布索坦与中、高剂量 CC18013 处理的小鼠的血尿酸-时间曲线趋于对照-1 组。通过计算 AUC 值发现模型-1 组比对照-1 组升高约 273.7%；非布索坦-1 组较模型-1 组降低约 85.4%；CC18013 低、中、高剂量-1 组较模型-1 组分别降低了约 40.8%，83% 和 85.2%。其中，CC18013 中、高剂量-1 组降血尿酸水平与非布索坦-1 组基本一致。



A：急性高尿酸血症小鼠模型时间-血尿酸曲线；B：急性高尿酸血症小鼠模型时间-血尿酸曲线下面积；与对照-1 组相比，a：$P < 0.001$；与模型-1 组相比，b：$P < 0.05$，c：$P < 0.001$

图 2　CC18013 在急性高尿酸血症小鼠模型中降尿酸效果($n = 8$)

1.2　CC18013 对慢性高尿酸血症小鼠的降尿酸作用　为进一步验证 CC18013 在慢性高尿酸血症中的降尿酸效果，通过连续 14 d，*sc* 给予 OP，挑选血尿酸稳定升高的慢性高尿酸血症小鼠模型，*po* 给药后检测小鼠血尿酸水平，以评估 0.1 与 0.5 mg·kg^{-1} CC18013 的降尿酸效果。如图 3 所示，模型-2 组小鼠血尿酸水平较对照-2 组升高约 99.2%，与模型-2 组相比，CC18013 低剂量-2 组降低约 0.4%，CC18013 高剂量-2 组则显著降低约 70.9%。



与对照-2 组相比，a：$P<0.05$；与模型-2 组相比，b：$P<0.01$

图 3　CC18013 在慢性高尿酸血症小鼠模型中发挥降尿酸效果（$n=8$）

2　CC18013 的急性毒性评估

为了评价 CC18013 的早期安全性，我们对 CC18013 进行了急性毒性实验。选取 500 mg·kg^{-1} 剂量，大于 0.5 mg·kg^{-1} 最低有效剂量 1 000 倍，对正常 ICR 小鼠单次 *ig* 给药。与同批雄性对照组及雌性对照组比较，给药后雌性、雄性小鼠出现不同程度的精神萎糜状态，体重增长出现不同程度的降低，分别于给药 2～3 d 后逐渐恢复正常，见图 4。

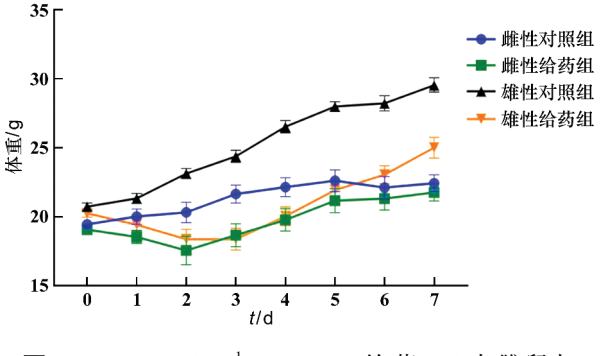


图 4　500 mg·kg^{-1} CC18013 给药 7 d 内雌鼠与雄鼠的体重变化

给药 7 d 后处死小鼠进行大体解剖，与同批对照组小鼠比较，各给药组动物的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、消化道和生殖系统等组织均未见明显异常。

3　CC18013 对 XOD 的作用

3.1　CC18013 在体外酶学模型中对 XOD 的抑制作用　利用体外酶学模型探究化合物 CC18013 对 XOD 的抑制作用。以 XA 为底物，加入 XOD 在体外催化生成尿酸，并加入不同浓度化合物 CC18013，观察其对尿酸生成的影响，绘制出尿酸 CC18013 浓度曲线，见图 5。结果表明，CC18013 具有良好的 XOD 抑制作用，IC_{50} 达到 4.6 nmol·L^{-1}。

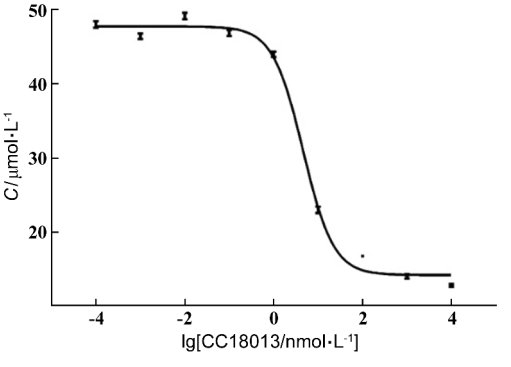
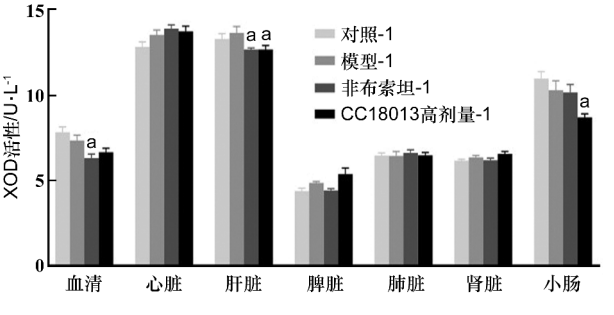


图 5　CC18013 对体外 XOD 催化 XA 生成尿酸的影响

3.2　CC18013 对急性高尿酸血症小鼠各组织及血清的 XOD 活性影响　应用急性高尿酸血症模型小鼠，检测 4 h 后 1 mg·kg^{-1} CC18013 对模型小鼠血清及心脏、肝脏、肺脏、脾脏、肾脏、小肠组织 XOD 活性的影响，结果见图 6。模型-1 组在血清及各组织中的 XOD 活性较对照-1 组均无显著差异；CC18013 与同剂量非布索坦均可有效降低肝脏 XOD 活性，相比模型组的下降程度均为 7.1%。

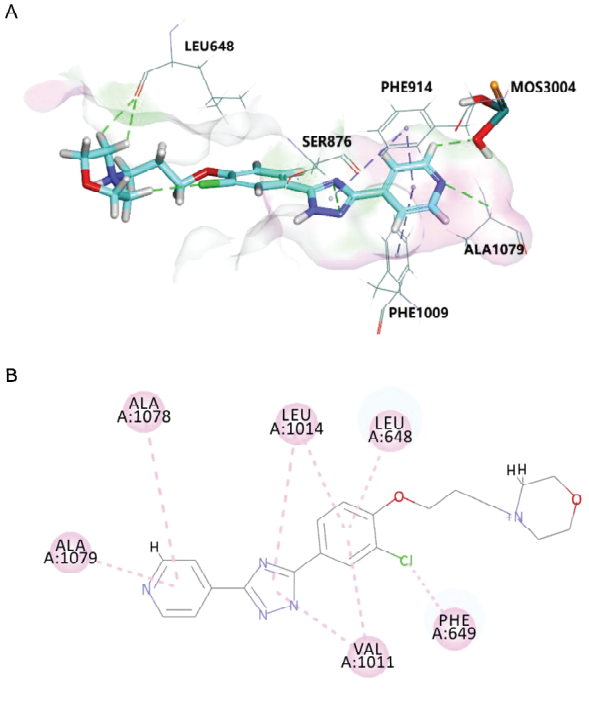


与相应组织模型组相比，a：$P<0.05$

图 6　化合物 CC18013 对急性高尿酸血症小鼠血清及各组织 XOD 活性的影响（$n=8$）

此外,CC18013 高剂量-1 组的血清和小肠 XOD 活性分别较模型-1 组下降了 9.2% 和 15.3%;而非布索坦-1 组血清和小肠 XOD 活性则分别较模型-1 组下降了 13.8% 和 1.2%。化合物 CC18013 和非布索坦对模型小鼠的心脏、脾脏、肺脏、肾脏等组织的 XOD 活性未见明显影响。

3.3 CC18013 与 XOD 的分子对接分析 为进一步探索 CC18013 与 XOD 可能的相互作用,对 CC18013 与 XOD 进行分子对接分析。结果将 CC18013 的氢键及 π-π 相互作用分别以绿色和紫色虚线表示,见图 7A,发现化合物 CC18013 的吡啶环可深入 XOD 疏水通道内部,并与钼喋呤区域结合,其吡啶环上的氮和邻位氢可分别与钼喋呤的羟基及 ALA1079 间产生氢键;其三氮唑上的氮与 SER876 同样存在氢键相互作用;其吗啉环延伸至疏水通道外部,可与 LEU648 发生氢键相互作用。另外,将 CC18013 与 XOD 的疏水相互作用以粉色虚线表示,见图 7B,可发现 CC18013 的吡啶环、三氮唑和苯环占据 XOD 的疏水空腔,并与 PHE914,ALA1079,ALA1078,PHE1009,LEU1014,VAL1011 和 LEU648 形成了广泛疏水作用。



绿色虚线:CC18013 的氢键;紫色虚线:π-π 相互作用;
粉色虚线:CC18013 的疏水相互作用

图 7 CC18013 与 XOD 的作用模式

讨 论

急性高尿酸血症小鼠模型的构建利用 HXA 增加尿酸生成的底物,OP 抑制尿酸酶活性,从而减少尿酸被分解,二者合并使用,单次诱导,可使小鼠的血尿酸水平呈“一过性”升高特点,且升高程度较高。慢性高尿酸血症小鼠模型的构建则在正常嘌呤饮食条件下,只单独使用 OP 诱导,经连续多次诱导后,小鼠血尿酸水平缓慢稳定升高,升高程度低于急性高尿酸血症小鼠。本研究利用急性与慢性高尿酸血症小鼠模型,发现化合物 CC18013 具有较强的降低血尿酸效果。在急性高尿酸血症模型小鼠中,0.1,0.5 和 1 $mg\cdot kg^{-1}$剂量 CC18013 均可降低血尿酸水平,并具有剂量依赖性。其中,0.5 与 1 $mg\cdot kg^{-1}$剂量的 CC18013 与 1 $mg\cdot kg^{-1}$阳性药非布索坦的药效相当。因此,在慢性高尿酸血症模型中,挑选 0.1 和 0.5 $mg\cdot kg^{-1}$ 2 个剂量 CC18013 进行药效分析,给药 4 h 后 0.1 $mg\cdot kg^{-1}$低剂量 CC18013 无明显降低血尿酸的效果,而 0.5 $mg\cdot kg^{-1}$ CC18013 仍可显著降低血尿酸水平。低剂量 CC18013 在 2 个模型中的药效差异可能与模型的原理不同相关,慢性高尿酸血症模型中小鼠给予正常嘌呤饮食,反应底物有限,体内 XOD 过剩,可能需较大程度抑制 XOD 活性而达到真正减少尿酸生成、降低血尿酸水平的效果。以上结果也与 CC18013 作用于 XOD 的机制一致。

XOD 体外酶学模型的结果发现 CC18013 对 XOD 活性有效抑制的 IC_{50}可达到 4.6 $nmol\cdot L^{-1}$,而利用相同体系检测得到的非布索坦抑制 XOD 活性的 IC_{50}值为 2.9 $nmol\cdot L^{-1}$[11]。CC18013 与强效 XOD 抑制剂的 XOD 抑制力在同一量级,具有一定的开发前景。进一步分析 CC18013 对体内 XOD 活性的抑制作用,在尿酸生成的主要组织肝脏中,相同剂量阳性药非布索坦与 CC18013 均可显著降低 XOD 活性,降低程度基本一致,验证了 CC18013 在体内的强 XOD 抑制性。另外,CC18013 还对小肠 XOD 活性有显著的抑制作用。小肠是除心脏、肝脏外,XOD 活性最高的组织,可能与其为嘌呤吸收的主要场所相关[12]。抑制小肠 XOD 活性是否对血尿酸水平的降低有影响,值得进一步研究。

综上所述,化合物 CC18013 具有强效且剂量依赖性良好的抗高尿酸血症的作用,与非布索坦效果基本相当[13-15]。除具有很好的安全性,其在体内、

体外均表现出较强的 XOD 活性抑制力,具有开发为新型 XOD 抑制剂的良好前景。

[参 考 文 献]

[1] UNDERWOOD M. Diagnosis and management of gout[J]. *BMJ*, 2006, 332(7553):1315 – 1319.

[2] LIU R, HAN C, WU D, *et al*. Prevalence of hyperuricemia and gout in mainland China from 2000 to 2014: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015(11): 762820.

[3] DEHLIN M, JACOBSSON L, RODDY E. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2020, 16(7):380 – 390.

[4] 林淑芃.《中国高尿酸血症与痛风诊疗指南(2019)》解读[J]. 临床内科杂志, 2020, 37(6): 460 – 462.

[5] RICHETTE P, BARDIN T. Gout[J]. *Lancet*, 2010, 375(9711): 318 – 328.

[6] JALAL DI, CHONCHOL M, CHEN W, *et al*. Uric acid as a target of therapy in CKD[J]. *Am J Kidney Dis*, 2013, 61(1): 134 – 146.

[7] CIARLA S, STRUGLIA M, GIORGINI P, *et al*. Serum uric acid levels and metabolic syndrome[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2014, 120(3):119 – 122.

[8] LI XC, YAN ZX, CARLSTRÖM M, *et al*. Mangiferin ameliorates hyperuricemic nephropathy which is associated with down-regulation of AQP2 and increased urinary uric acid excretion[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11(2):49.

[9] WHITE WB, SAAG KG, BECKER MA, *et al*. Cardiovascular safety of febuxostat or allopurinol in patients with gout[J]. *N Engl J Med*, 2018, 378(13):1200 – 1210.

[10] MATSUMOTO K, OKAMOTO K, ASHIZAWA N, *et al*. FYX-051: a novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 336(1):95 – 103.

[11] 闫祯昕, 尹非, 李雪晨, 等. 黄嘌呤氧化酶抑制剂筛选体系的建立[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1471 – 1477.

[12] ANSARI A, ASLAM Z, DE SICA A, *et al*. Influence of xanthine oxidase on thiopurine metabolism in Crohn's disease[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2008, 28(6):749 – 757.

[13] 周启蒙,赵晓悦,梁宇,等. 治疗高尿酸血症相关药物研究新进展[J]. 中国新药杂志,2021,30(10):929 – 936.

[14] 赵啸,陈绍华,唐红. 高尿酸血症的中西医治疗研究进展[J]. 世界临床药物,2020,41(7):502 – 508.

[15] 李红星,张信岳,武柠子,等. 代谢组学技术在痛风类疾病研究中的应用进展[J]. 中国现代应用药学,2021,38(1):122 – 128.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 – 06 – 11