



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111247149 B

(45) 授权公告日 2024. 12. 03

(21) 申请号 201880068624.3

(22) 申请日 2018.09.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111247149 A

(43) 申请公布日 2020.06.05

(30) 优先权数据
62/559,355 2017.09.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.21

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/051132 2018.09.14

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/055814 EN 2019.03.21

(73) 专利权人 威斯康星州医药大学股份有限公司
地址 美国威斯康星州
专利权人 德克萨斯州大学系统董事会

(72) 发明人 J·D·伊米格 J·R·弗拉克
A·H·可汗 A·阿得贝辛

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100
专利代理师 张静 陈扬扬

(51) Int.Cl.
C07D 475/04 (2006.01)
A61K 31/17 (2006.01)
C07C 233/49 (2006.01)
C07C 237/22 (2006.01)

(56) 对比文件
John D Imig 等. Abstract 111: A Kidney Targeted Epoxyeicosatrienoic Acid Analog, EET-F01, Reduces Cisplatin-induced Nephrotoxicity.《Hypertension》.2017,第70卷(第A111期),第1-5页.

审查员 贾丹

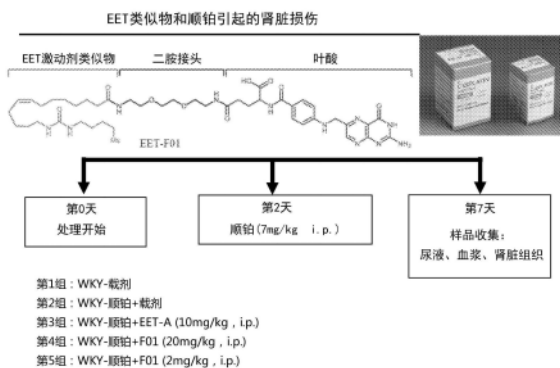
权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

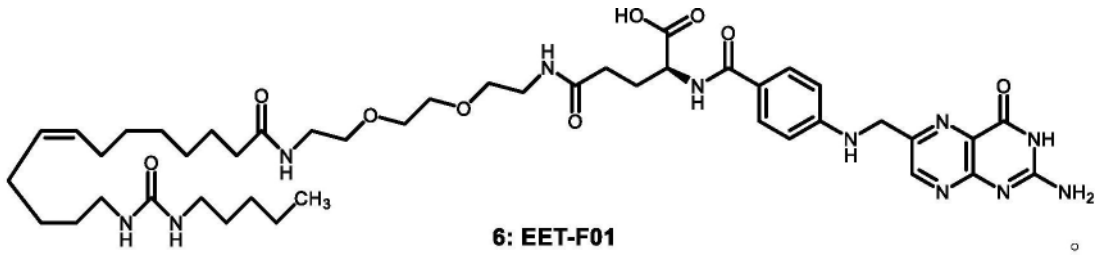
肾脏靶向的环氧二十碳三烯酸 (EET) 类似物

(57) 摘要

本文描述了与叶酸受体配体偶联的EET类似物以及此类偶联的EET类似物将治疗剂靶向递送至具有叶酸受体的细胞群的用途,其中,所述叶酸受体配体包括例如由叶酸受体及其他叶酸结合蛋白识别并选择性结合的叶酸或叶酸类似物。更具体地,本文提供偶联至叶酸受体配体的EET类似物,以及此类偶联的EET类似物作为肾靶向治疗剂的用途。



1. 一种化合物,其具有式:



2. 一种药物组合物,其包含如权利要求1所述的化合物和选自药学上可接受的运载体、赋形剂或稀释剂的至少一种组分。

3. 如权利要求1所述的化合物在制备用于治疗肾病的药物中的用途。

4. 如权利要求1所述的化合物在制备用于降低肾毒性的药物中的用途。

5. 如权利要求4所述的用途,其中,所述肾毒性是药物引起的。

6. 如权利要求4所述的用途,其中,所述肾毒性是顺铂引起的。

7. 如权利要求1所述的化合物在制备用于将治疗剂递送至包含叶酸受体的靶细胞群的药物中的用途。

肾脏靶向的环氧二十碳三烯酸(EET)类似物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年9月15日提交的美国临时申请第62/559,355号的优先权,其全部内容通过引用纳入本文。

[0003] 关于联邦资助研究的声明

[0004] 无

背景技术

[0005] 根据美国国家肾脏基金会的数据,全世界10%的人口受到慢性肾脏病(CKD)的影响,每年有数百万人因无法获得负担得起的或有效的治疗而死亡。随着CKD的患病率和终末期肾脏疾病(ESRD)的增加,CKD的经济负担越来越受到患者、其照护者和付款人的关注。管理CKD和ESRD患者的临床复杂性需要花费大量医疗费用,包括与CKD的检测和管理、ESRD治疗以及同时管理共存病症(如糖尿病、高血压和充血性心力衰竭)相关的费用。与肾脏和心血管疾病相关的进行性器官损害是发病率和死亡率的主要原因。高血压和糖尿病是导致ESRD升高和透析患者人数增加的两种主要疾病。尽管人们对慢性肾脏病(CKD)已成为世界范围内的重大医学问题的认识有所提高,但几乎没有可用于预防或延缓CKD演变为终末期肾脏疾病(ESRD)的药理学疗法,更不用说可以治愈的疗法了。

[0006] 对于接受铂基化学疗法治疗各种恶性肿瘤的患者来说,药物引起的肾毒性也是一个问题。例如,顺铂是有效的化学治疗剂,但是存在临床实践中与顺铂的使用相关联的一些不良副作用。对于接受顺铂治疗的患者,最常见的不良反应是严重的肾毒性,发生在25-40%的接受顺铂治疗的患者中。众所周知,需要开发一种在临床使用期间可保护肾脏免受顺铂不利影响的药物。

附图说明

[0007] 图1是慢性研究方案的示意图。

[0008] 图2显示叶酸偶联形式的EET类似物靶向肾脏。

[0009] 图3表明使用叶酸偶联形式的EET类似物降低了顺铂引起的肾损伤。

[0010] 图4显示了叶酸偶联的EET类似物的实施方案。

具体实施方式

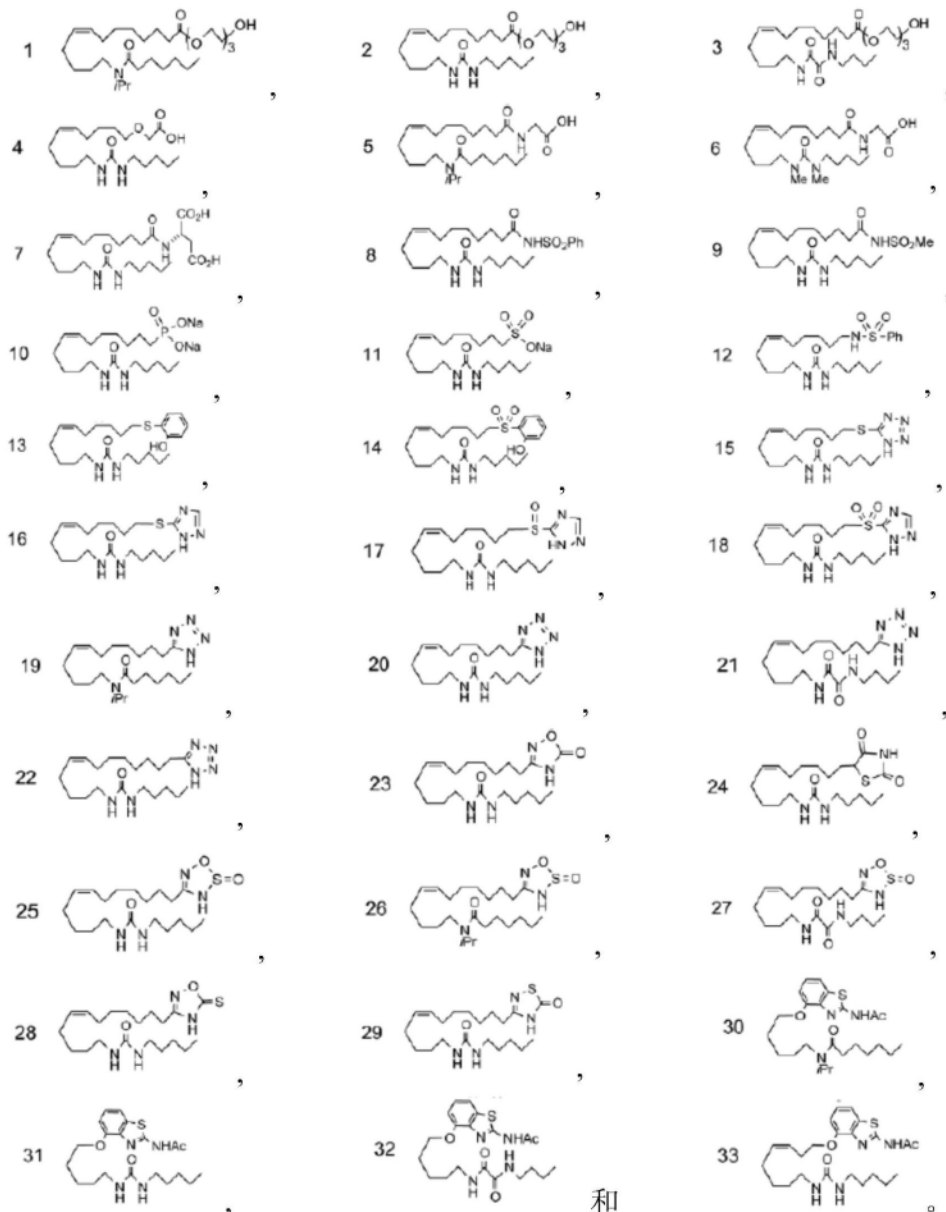
[0011] 说明书中所引用的所有出版物,包括但不限于专利和专利申请通过引用纳入本文,如同它们完全示于本申请中那样。

[0012] 此处和随后的页面描述的是肾脏靶向的环氧二十碳三烯酸(EET)类似物,以及使用此类EET类似物治疗肾脏和心血管疾病的方法。更具体地,本文提供了与叶酸受体配体偶联的EET类似物以及此类偶联的EET类似物作为肾脏靶向治疗剂的用途,其中所述叶酸受体配体例如是由叶酸受体和其他叶酸结合蛋白识别并选择性结合的叶酸或叶酸类似物。通常,这些化合物和方法至少部分基于发明人对心血管和肾脏疾病具有有望治疗潜力的EET

激动剂和类似物的开发。发明人先前合成了一系列的14,15-EET的类似物,定义了基本药效基团并使其稳定以防止代谢失活。这些类似物的一个子集,称为EET-A,EET-B和EET-C22,具有良好的药代动力学特性,具有口服活性。参见,例如PCT/US2012/032090以及美国专利号9,422,318和9,127,027,它们各自通过引用全文纳入本文。

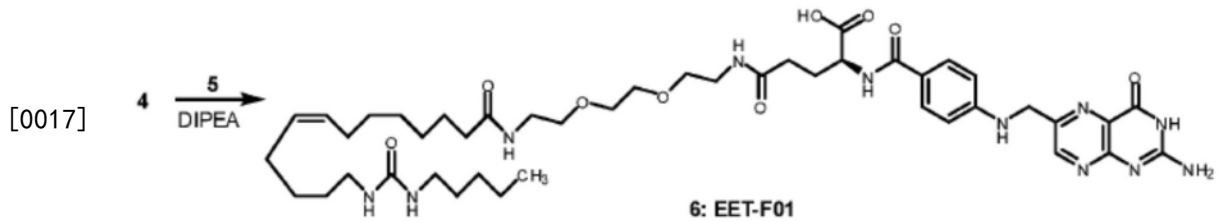
[0013] 在第一方面,本文提供了一种肾脏靶向的环氧二十碳三烯酸(EET)类似物,其包含与叶酸(folic acid)(也称为叶酸(folate))受体配体(例如,叶酸、甲氨蝶呤或与叶酸受体结合的叶酸类似物)偶联的EET类似物。不受任何特定理论或作用机理的束缚,据信叶酸受体配体与EET类似物的连接将叶酸连接的化合物靶向表达高水平叶酸受体(FR)的细胞,例如肾脏的近端肾小管细胞。合适的叶酸受体配体包括叶酸、甲氨蝶呤以及与叶酸受体结合的叶酸类似物。叶酸受体配体可以与EET类似物直接偶联,或者,叶酸受体配体可以通过接头与EET类似物间接偶联。

[0014] 在某些情况下,用于形成偶联化合物的EET类似物选自下组:



[0016] 在某些实施方案中,具有下式的本发明化合物还显示出对叶酸受体的结合亲和

力:



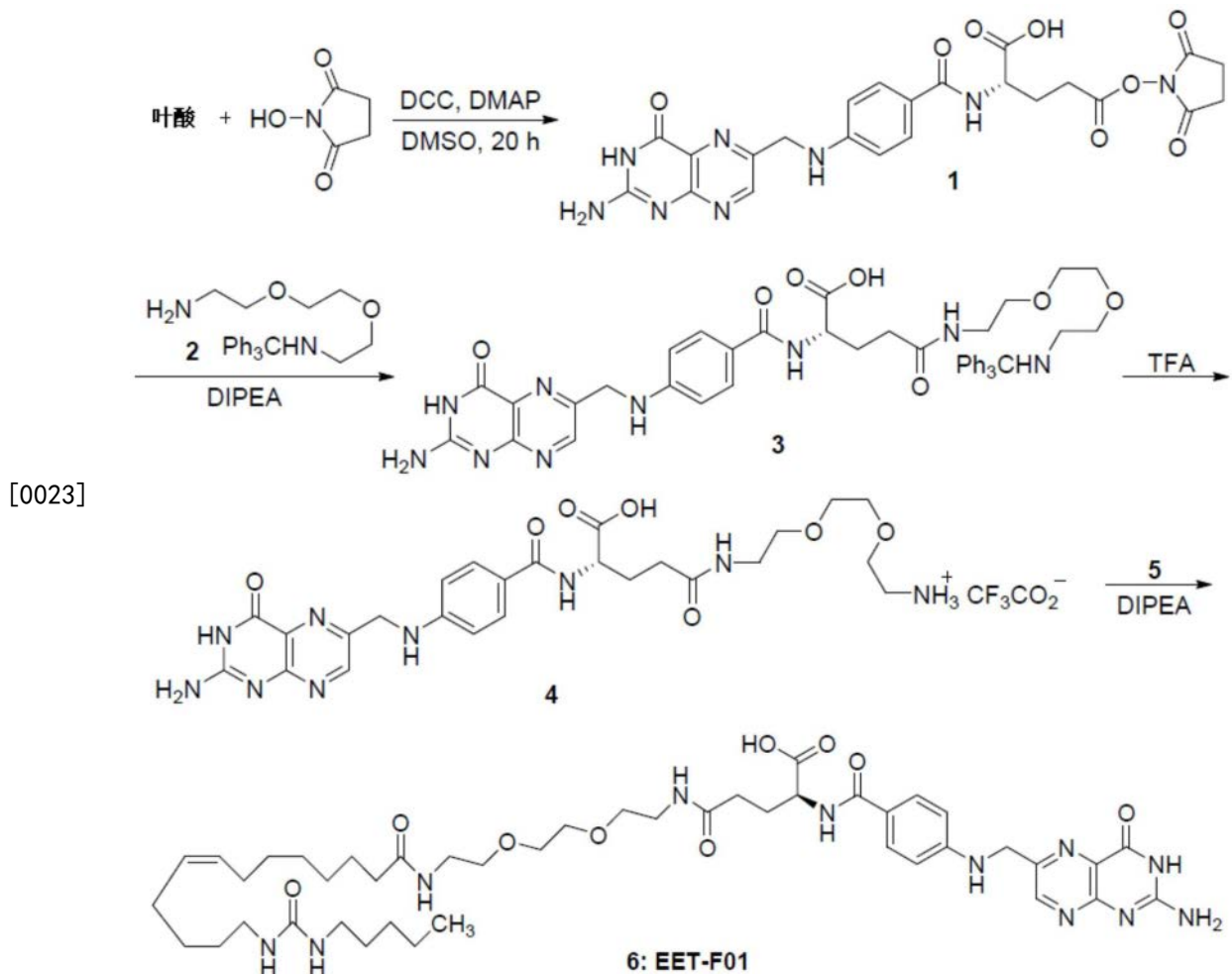
[0018] 适用于EET类似物的叶酸偶联以合成肾脏靶向的EET类似物的接头和连接化学物质包括但不限于:聚乙二醇 (PEG) 接头、PEG-二胺接头。例如,在某些实施方案中,EET类似物通过PEG二胺接头与叶酸受体配体偶联。在其他情况下,接头包括乙二胺 (参见例如图4),二异氰酸酯,二异硫氰酸酯,碳二亚胺,双(羟基琥珀酰亚胺)酯,马来酰亚胺-羟基琥珀酰亚胺酯,戊二醛或其组合。

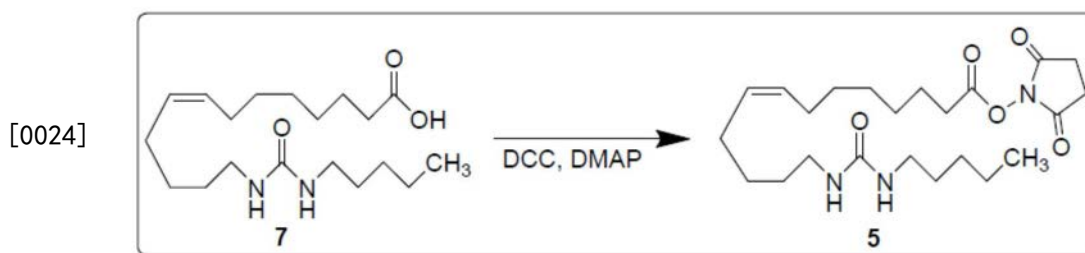
[0019] 接头可以产生永久或半永久(即不稳定)的连接键。包含半永久连接键对于需要细胞摄取药物的应用特别有利。

[0020] 肾脏靶向的EET类似物的合成可以根据以下示例性合成方案完成。其他叶酸类似物的合成可以通过技术人员已知的方法来完成。另外,还可以通过本领域技术人员已知的方法来实现接头的任选掺入。

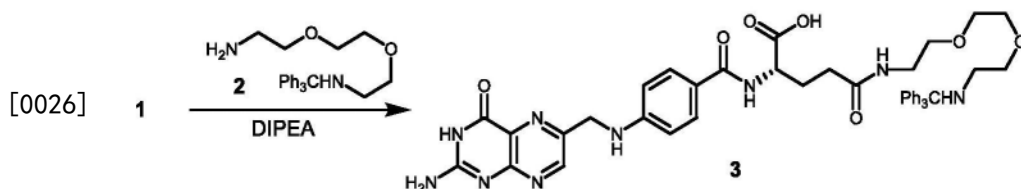
[0021] 叶酸-偶联物的合成

[0022] EET-F01的合成:

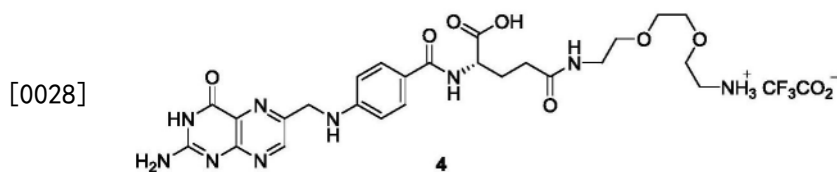




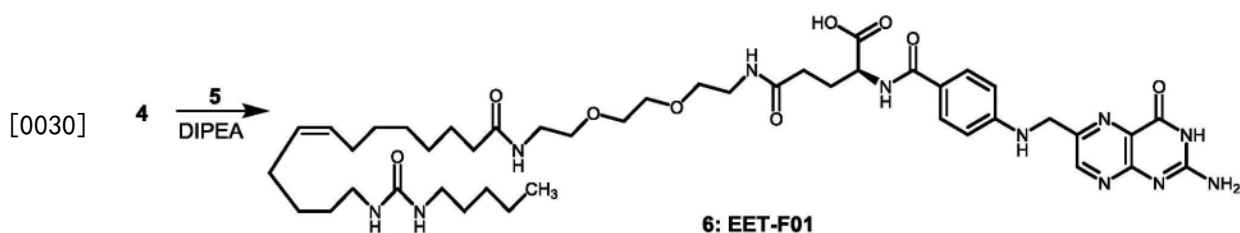
[0025] 实验过程:



[0027] 将二异丙基胺 (DIPEA, 1.18mL, 6.78mmol, 3.00当量) 添加到N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 叶酸酯¹ (1) (11.44g, 2.26mmol) 和2-[2-(2-氨基乙氧基)乙氧基]-N-三苯甲基乙烷-1-胺² (2) (1.06g, 2.71mmol, 1.20当量) 在无水DMSO (20mL) 中的混合物中。18小时后, 将DMSO蒸发 (50°C, 0.1托), 并将残余物先后用丙酮/乙醚 (20/70, 2×50mL) 和丙酮 (2×50mL) 研磨。将残余物在高真空下干燥过夜, 得到橙色固体 (橙色固体, 2.00g), 其无需进一步纯化即可用于下一步。



[0029] 将三氟乙酸 (TFA, 5.36mL) 逐滴添加至粗品3 (1.09g, 1.34mmol) 在CH₂Cl₂/H₂O (5/1, 6mL) 中的悬浮液中。轻轻摇动2小时后, 将混合物真空浓缩, 并将残余物与无水甲苯 (10mL) 共沸干燥。将残留物用CH₂Cl₂ (5×5mL) 研磨; 每次用移液管除去带黄色的CH₂Cl₂上清液, 每次洗涤使得黄色逐渐变浅, 直至几乎无色。粗品4 (稠厚的红色油) 无需进一步纯化即可用于下一步。



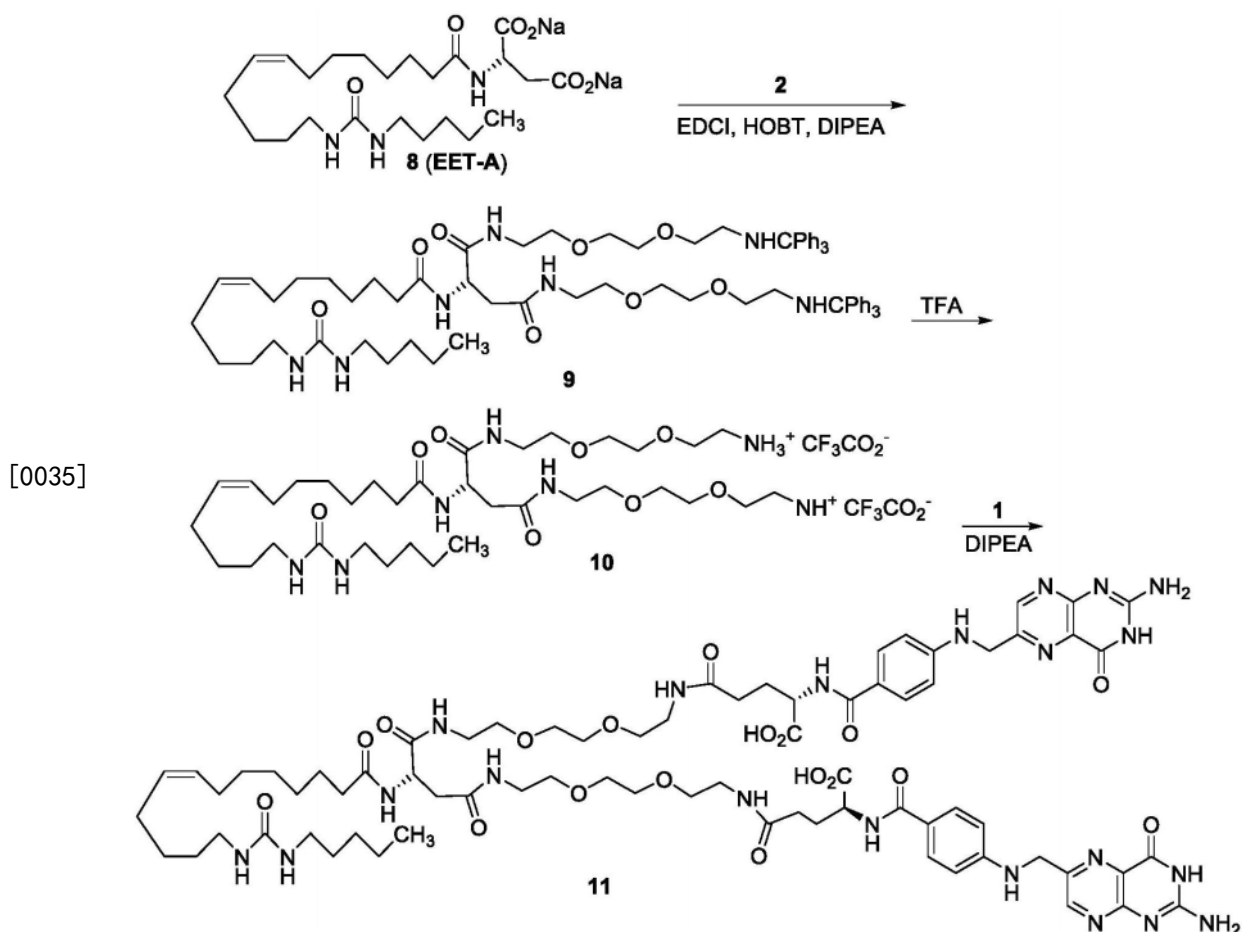
[0031] 将DIPEA (1.13mL, 6.50mmol, 5.00当量) 滴加到粗品4 (0.891g, 1.30mmol) 在无水DMSO (6mL) 中的悬浮液中。15分钟后, 加入NHS EET类似物酯5 (0.569g, 1.30mmol) 在无水CH₂Cl₂ (6mL) 中的溶液。24小时后, 将反应混合物用冰冷的20%丙酮/Et₂O (50mL) 稀释。倾析出上清液, 从所得沉淀物中分离出残余物, 然后依次用另外的20%丙酮/Et₂O (50mL)、50%丙酮/Et₂O (100mL)、0.1N HCl (20mL) 和丙酮 (2×50mL) 研磨。将残余物在高真空下干燥过夜, 得到为橙色固体的EET-F01 (6) (0.690g, 59%)。

[0032] ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ8.65 (s, 1H), 7.93-7.80 (m, 1H), 7.73-7.58 (m, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.64 (dd, J=8.7, 2.3Hz, 2H), 5.79-5.69 (m, 2H), 5.38-5.28 (m, 2H), 4.49 (d, J=

6.1Hz, 2H), 3.52-3.45 (m, 4H), 3.22-3.13 (m, 4H), 3.01-2.87 (m, 4H), 2.10-2.09 (m, 2H), 2.05 (t, J=7.5Hz, 2H), 2.01-1.93 (m, 4H), 1.51-1.40 (m, 2H), 1.40-1.14 (m, 18H), 0.86 (t, J=7.0Hz, 3H). LCMS (ES-APCI⁺) [C₄₄H₆₇N₁₁O₉]⁺ 计算值894.1, 实测值894.4。

[0033] 合成NHS EET类似物酯5。将N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 0.165g, 1.43mmol, 1.10当量) 和二环己基碳二亚胺 (DCC, 0.322g, 1.56mmol, 1.20当量) 添加到搅拌中的0℃ EET类似物³7 (0.443g, 1.30mmol) 的无水EtOAc (26mL) 溶液中。5分钟后, 加入N,N-二甲基吡啶 (DMAP, 15.9mg, 0.13mmol, 0.100当量), 并将悬浮液温热至室温。24小时后, 将反应液通过Celite™垫过滤, 并将Celite™床用EtOAc洗涤。滤液用饱和NaHCO₃水溶液 (10mL) 和盐水 (10mL) 洗涤。有机层经Na₂SO₄干燥, 过滤, 并真空浓缩, 得到粗品5, 其无需进一步纯化即可用于下一步。

[0034] 合成EET-A叶酸偶联物:



[0036] 合成9。将EEE-A二钠盐³ (100mg, 0.20mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI·HCl, 88mg, 0.460mmol, 2.3当量) 和羟基苯并三唑 (HOBT, 6.10mg, 0.04mmol, 0.2当量) 在无水DMF (1mL) 中的混合物在室温下搅拌。2小时后, 依次加入在无水CH₂Cl₂ (1mL) 中的2 (188mg, 0.481mmol, 2.40当量) 和DIPEA (79μL, 0.440mmol, 2.20当量)。再过40小时后, 将混合物用MeOH (10mL) 稀释并真空浓缩。使用Teledyne Isco Combiflash® R_f 色谱系统 (4g SiO₂柱) 纯化粗产物, 用0-100% EtOAc/己烷梯度洗脱, 持续25分钟; 100% EtOAc, 持续15分钟; 以及10% MeOH/CH₂Cl₂ 持续7分钟, 得到9 (169mg, 70%)。

[0037] ¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ7.51-7.44 (m, 14H), 7.33-7.25 (m, 14H), 7.24-7.17 (m, 6H), 5.87 (s, 1H), 5.40-5.33 (m, 2H), 4.69 (dd, J=7.5, 5.9Hz, 1H), 3.71-3.49 (m, 18H),

3.17-3.07 (m, 4H), 2.62 (dd, J=15.0, 6.0Hz, 1H), 2.53 (dd, J=15.0, 7.7Hz, 1H), 2.35 (t, J=5.5Hz, 4H), 2.21 (t, J=7.6Hz, 3H), 2.13-1.99 (m, 4H), 1.66-1.54 (m, 2H), 1.53-1.45 (m, 4H), 1.43-1.26 (m, 14H), 0.93 (t, J=6.9Hz, 3H)。

[0038] 合成10。将三氟乙酸 (TFA, 0.40mL) 滴加到三苯甲基保护的胺9 (130mg, 0.108mmol) 在H₂O (0.50mL) 和CHCl₃ (1.5mL) 中的混合物中。45分钟后, 将反应物用MeOH (3mL) 稀释并真空浓缩。与甲苯 (3×5mL) 共蒸发, 得到10, 为白色固体, 其无需进一步纯化即可用于下一步。

[0039] 合成11。将DIPEA (77μL, 0.432mmol, 4当量) 加入到粗品1 (116mg, 0.216mmol, 2当量) 和10 (77mg, 0.108mmol) 在无水的DMSO (1.50mL) 中的混合物中。40小时后, 将混合物在搅拌下倒入0℃的Et₂O (25mL) 中。从所得沉淀物中小心倒出上清液, 并将沉淀物用丙酮/Et₂O (30/70, 30mL) 和丙酮/CH₂Cl₂ (30/70, 30mL) 研磨。将残余物在高真空下干燥, 得到11 (57mg), 为橙色固体。

[0040] ¹H NMR (500MHz, DMSO-d₆) δ 8.73-8.61 (m, 2H), 8.12-7.83 (m, 4H), 7.76-7.55 (m, 3H), 7.03-6.88 (m, 2H), 6.64 (dd, J=7.8, 4.5Hz, 4H), 5.76 (br s, 2H), 5.40-5.20 (m, 2H), 4.57-4.42 (m, 5H), 3.68-3.44 (m, 14H), 3.22-3.08 (m, 6H), 3.06-2.88 (m, 6H), 2.02-1.84 (m, 7H), 1.53-1.14 (m, 18H), 0.92-0.78 (m, 3H)。

[0041] 本文所述的肾脏靶向的EET类似物可以与药学上可接受的运载体或赋形剂一起配制以形成主要治疗剂。“药学上可接受的运载体”是可以用于给予治疗剂或预防剂 (例如, 肾脏靶向的EET类似物) 的载剂的物质, 因为该物质是惰性的或医学上可接受的, 并且与前述治疗剂或预防剂相容。

[0042] 还公开了包含偶联物和/或复合物以及药学上可接受的赋形剂以形成治疗剂的试剂盒。试剂盒可包括用于给予治疗剂的实现工具。另外, 试剂盒可包括一种或多种补充治疗剂和/或诊断剂。

[0043] 如本文所述的肾脏靶向的EET类似物的有益性质还包括: 将EET类似物靶向递送至肾脏, 因此以靶向方式利用EET的有用的生物学性质 (例如, 血管舒张, 抗炎, 抗凋亡和抗纤维化); 用作预防或限制肾毒性的预防药以及介入疗法; 比未靶向的EET同类药物低十倍的剂量是有效的; 和更少的全身副作用。

[0044] 在另一方面, 本文提供了用本文所述的化合物治疗需要的对象的肾脏疾病的方法。本文还提供了用于将治疗剂递送至包含叶酸受体的靶细胞群的方法, 该方法包括提供权利要求1所述的化合物, 并使靶细胞群与有效量的化合物接触以允许该化合物与叶酸受体的结合。

[0045] 本文所述的肾脏靶向的EET类似物的治疗和预防应用包括但不限于: 开始于近端小管的肾脏疾病, 急性肾小管坏死 (ATN) 和旁路或移植手术后的缺血性肾损伤的治疗; 治疗或预防药物引起的肾毒性, 包括顺铂引起的肾毒性; 用作保存要移植的肾脏的防腐剂; 治疗糖尿病性肾病, 局灶性节段性肾小球硬化 (FSGS) 和慢性肾脏病 (CKD)。本文提供的肾脏靶向的EET类似物的其他治疗和预防应用包括: 治疗和/或预防药物-和放射-诱导的肾脏损害, 高血压和心肾综合征肾脏损害, 以及代谢综合征和糖尿病肾病。

[0046] 除非另有限定, 在此使用的所有技术和科学术语均与本发明所属领域技术人员的通常理解一致。虽然可采用与本文所述类似或等同的任何方法和材料实施或测试本发明, 但本文描述优选的方法和材料。

[0047] 以下实施例说明了本发明的某些实施方案。其中提出的实施例、方法和条件不应解释为限制本发明的范围或精神。

[0048] 实施例

[0049] 实施例1-肾脏靶向的EET类似物的递送

[0050] 环氧二十碳三烯酸 (EET) 类似物具有对抗心血管和肾脏疾病的卓越治疗潜力。EET 类似物可对抗急性和慢性肾脏疾病模型中的损害。归因于EET类似物的生物学作用,例如血管舒张、抗炎、抗凋亡和抗纤维化,其非常适合治疗肾脏疾病。尽管EET类似物在几种体内模型中表现良好,但可以合理预期EET类似物向肾脏的靶向递送可降低在肾脏中达到治疗效果所需的药物水平并消除可能的副作用。

[0051] 对于EET类似物的肾脏靶向递送,我们将EET类似物与叶酸偶联,因为肾脏组织中叶酸受体的浓度很高。EET类似物通过PEG-二胺接头与叶酸偶联。接下来,我们将肾脏靶向的EET类似物EET-F01与经过充分研究的EET类似物EET-A进行了比较。通过大鼠颈静脉将EET-A或EET-F01静脉输注(10mg/kg/hr)持续6小时。收集血浆和肾脏组织,并通过LC-MS-MS测量EET-A或EET-F01。EET-A血浆水平为1.6ng/mL,但在肾脏中未检测到EET-A。另一方面,EET-F01在血浆中为6.5ng/mL,并且在肾脏组织中为26.7ng/mL。这些数据表明EET-F01靶向肾脏。进行了实验以比较EET-F01和EET-A在减少顺铂诱导的肾毒性方面的作用。对用载体,EET-A(10mg/kg ip)或EET-F01(20mg/kg或2mg/kg ip)处理持续5天的WKY大鼠单次注射顺铂(7mg/kg ip)。与对照相比(36 ± 9 mg/dL和 4 ± 1 IU/L),顺铂增加了BUN(125 ± 11 mg/dL)和NAG(12 ± 4 IU/L)。在给予顺铂后五天,EET-F01与EET-A在降低BUN、NAG和肾脏组织学损伤方面一样有效。尽管EET-F01的分子量是EET-A的近两倍,但在20mg/kg/d以及低10倍的剂量2mg/kg/d时EET-F01可有效降低BUN和NAG。这些数据清楚地表明EET-F01靶向肾脏并允许较低的有效剂量。总之,我们已经开发了肾脏靶向EET类似物EET-F01,它具有治疗肾脏疾病的巨大潜力。

[0052] 实施例2-使用肾脏靶向的EET类似物预防顺铂诱导的肾毒性

[0053] 顺铂是一种基于铂的无机化学治疗剂,可用于治疗多种恶性肿瘤(1-3)。但是,在临床实践中使用顺铂会产生一些不良副作用。在这些不良反应中,最常见的不良反应是在25-40%的顺铂治疗患者中发生的严重的肾毒性,这影响了这种化学治疗剂的有效使用(4-7)。众所周知,需要开发一种在临床使用期间可保护肾脏免受顺铂不利影响的药物。可以用来开发针对顺铂肾毒性的肾脏保护剂的一种方法是靶向CYP环氧合酶途径,该途径由花生四烯酸产生环氧二十碳三烯酸(EET)。

[0054] 多项研究表明,EET显示出多种多样的生物学作用,可用于保护器官,包括肾脏(8,9)。在这些研究中,我们证明了合成的EET模拟物可以在多种病理状况(例如高血压,顺铂肾毒性和放射性肾病)中对肾脏起到保护作用(10-14)。这些研究清楚地表明了基于EET的方法在不同病因的病理情况下保护肾脏的潜力,并且我们已经开发了几种具有EET模拟特性的合成EET类似物。

[0055] 近来,已尝试开发具有EET模拟活性以及靶向肾脏的独特性质的EET类似物。我们已经通过将EET药效团与叶酸偶联来开发一种新形式的肾脏靶向EET类似物。在初步研究中,我们研究了其与没有叶酸偶联的EET类似物相比的靶向肾脏的能力。我们还比较了叶酸偶联的EET类似物与不含任何叶酸部分的原始EET类似物在保护肾脏免受顺铂肾毒性方面

的能力。

[0056] 材料和方法

[0057] 除非另有说明,否则所有化学药品和测定试剂盒均购自西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)(美国密苏里州圣路易斯)。EET类似物是在德克萨斯州达拉斯的德克萨斯大学西南医学中心生物化学系John R.Falck的实验室中设计和合成的。

[0058] 动物研究:所有动物研究均根据威斯康星州医学院的机构动物护理和使用委员会的指导原则批准和实施。将动物饲养在温度控制的环境中,光照/黑暗周期为12小时,并允许他们自由获取食物和水。实验前,大鼠的适应期为6天。

[0059] 急性研究:将隔夜禁食(12-14小时)的雄性SD大鼠(10周龄)用戊巴比妥钠(60mg/kg, i.p.)麻醉。气管切开术后,将左颈静脉插管,以6ml/kg/hr的速度连续注入载剂或EET-A或叶酸偶联的EET类似物持续6小时。在方案结束时收集血浆和肾脏样品,在液氮中速冻,并保存在-80℃直至进行LC-MS分析。在盐水中的0.1%DMSO和1%PEG-400中制备EET-A和叶酸偶联的EET类似物溶液。

[0060] 慢性研究:在慢性研究中,使用体重180-200g(美国马萨诸塞州的查尔斯河(Charles River))的雄性Wistar-Kyoto(WKY)大鼠。将大鼠分为四组(每组n=4)。第1组的大鼠随意喝水,并在第7天给予DMSO(300-500 μ l, i.p.),用于制备顺铂的溶液。同时,在渗透微型泵(2ML, Alzet, Cupertino, CA)中,第2、3、4、5组的大鼠分别用载剂(PEG-400v/v中的20%DMSO),EET类似物(在双蒸水中的EET类似物)或新型叶酸偶联的EET类似物F01以剂量20mg/kg和2mg/kg(20%DMSO在PEG400中的混合物制备)进行预处理持续7天。在第7天,给这些大鼠单剂量的顺铂(7mg/kg i.p.),然后是五天的载剂、EET-A和F01处理。安乐死前一天,在24小时内收集每只大鼠的尿液。顺铂或载剂给予后五天,麻醉大鼠以收集血样,然后实施安乐死。该方案的示意图如图1所示。

[0061] 生化分析:血尿素氮(BUN)的水平(博世生物技术公司(BioAssay Systems),美国加利福尼亚州海沃德)以及尿液中尿N-乙酰基- β -(D)-氨基葡萄糖苷酶(NAG)的活性通过Diazyme的试剂盒(Diazyme实验室,美国加利福尼亚州波威市)进行检测。

[0062] 质谱分析:通过LC-ESI-MS方法测量血浆和肾脏中EET-A和叶酸偶联的EET-A的水平。使用Varian BondElut® C18色谱柱(安捷伦科技公司,美国加利福尼亚州圣塔克拉拉(Santa Clara)),通过固相萃取,从200 μ l血浆或肾脏匀浆中制备样品,血浆或肾脏匀浆来自EET-A或叶酸偶联的EET-A处理的大鼠。在分析之前,将萃取的样品储存在-80℃。将样品加热至室温,在氮气流中干燥,残留物在20 μ L乙腈中重建,进样量为12 μ L。将各组分在250mm x 2.0mm Kromasil C18色谱柱上解析,该色谱柱装有5 μ m直径的具有100Å孔的颗粒。使用从80%A到10%A的梯度洗脱液,洗脱液流速为0.2mL/分钟。溶剂A是具有0.01%甲酸的水,溶剂B是具有0.01%甲酸的乙腈,采用以下过程:10分钟内20%B至30%B,17分钟内30%B至60%B,28分钟内60%B至90%B,100%保持7分钟,然后重新平衡7分钟。MS/MS分析是在配备有Jet Stream™接口的Agilent 6460三重四极杆质谱仪上进行的。针对每种化合物的负极性,优化了前体离子,产物离子,碰撞能量和碎裂电压。其他参数如下:干燥气体流量=在325℃下10L/分钟,雾化器=20psi,鞘气流量=325℃下11L/分钟,毛细管=3.5kV,喷嘴=1.0kV。以单位质量分辨率获得的结果。

[0063] 结果

[0064] 急性静脉内给予后,F01的血浆和肾脏含量高于EET-A。

[0065] 在急性动物研究中,静脉注射等剂量的EET-A和F01持续6小时,然后收集血浆和肾脏组织。在连续给予F01和EET-A 6小时后,我们证明F01的血浆水平比EET-A高5倍(图2)。有趣的是,我们还证明了连续给予6小时后,与肾脏中的F01含量相比,EET-A的肾脏含量几乎无法检测到(图2)。

[0066] F01的慢性治疗显示出比EET-A更好的肾脏保护作用,以对抗顺铂肾毒性。

[0067] 在另一组实验组中,在诱导顺铂肾病之前用F01和EET-A预处理大鼠,然后再用测试化合物(F01和EET-A)再治疗5天。F01和EET-A对肾脏的保护作用取决于血尿素氮(BUN)的水平和尿中NAG的含量。我们证明,与EET类似物的非叶酸形式EET-A相比,F01具有更好的肾脏保护作用(图3)。

[0068] 结论

[0069] EET类似物的叶酸偶联形式F01比非叶酸偶联形式具有更快的到达血浆和肾脏的能力。并且,F01化合物在抵抗顺铂肾毒性方面显示出比EET-A更好的肾脏保护作用。

[0070] 参考文献

[0071] Bongers M.L., Coupé V.M., Jansma E.P., Smit E.F., Uyl-de Groot C.A. (2012) 在晚期非小细胞肺癌中用新药治疗的成本效益:系统性评价 (Cost effectiveness of treatment with new agents in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review). *Pharmacoeconomics* 30, 17-34.

[0072] Levy A.R., Johnston K.M., Sambrook J., Donato B., Penrod J.R., Corral M., Chasen M. (2011) 间接比较西妥昔单抗和顺铂在头颈部鳞状细胞癌中的疗效 (Indirect comparison of the efficacy of cetuximab and cisplatin in squamous cell carcinoma of the head and neck). *Curr. Med. Res. Opin.* 27, 2253-2259.

[0073] Wang D., Lippard S.J. (2005) 铂抗癌药的细胞加工 (Cellular processing of platinum anticancer drugs). *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 307-320.

[0074] Kintzel P.E. (2001) 抗癌药诱导的肾脏疾病 (Anticancer drug-induced kidney disorders). *Drug Saf.* 24, 19-38.

[0075] Miller R.P., Tadagavadi R.K., Ramesh G., Reeves W.B. (2010) 顺铂肾毒性的机制 (Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity). *Toxins* 2, 2490-2518.

[0076] Sánchez-González P.D., López-Hernández F.J., López-Novoa J.M., Morales A.I. (2011) 导致顺铂肾毒性的病理生理事件的综合观点 (An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity). *Crit. Rev. Toxicol.* 41, 803-821.

[0077] Perazella M.A., Moeckel G.W. (2010) 来自化学治疗剂的肾毒性:临床表现,病理生物学和预防/治疗 (Nephrotoxicity from chemotherapeutic agents: clinical manifestations, pathobiology, and prevention/therapy). *Semin. Nephrol.* 30, 570-581.

[0078] Imig J.D. (2012) 心血管生理学中的环氧化物和可溶性环氧化物水解酶 (Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology). *Physiol. Rev.* 92, 101-130.

[0079] Imig J.D., Hammock B.D. (2009) 可溶性环氧化物水解酶作为心血管疾病的治疗

靶标(Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases).*Nat.Rev.Drug Discov.*8,794-805.

[0080] Khan A.H.,Falck J.R.,Manthati V.L.,Campbell W.B.,Imig J.D. (2014) 环氧二十碳三烯酸类似物可减轻血管紧张素II高血压和肾脏损伤(Epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates angiotensin II hypertension and kidney injury).*Front Pharmacol.*5,216.

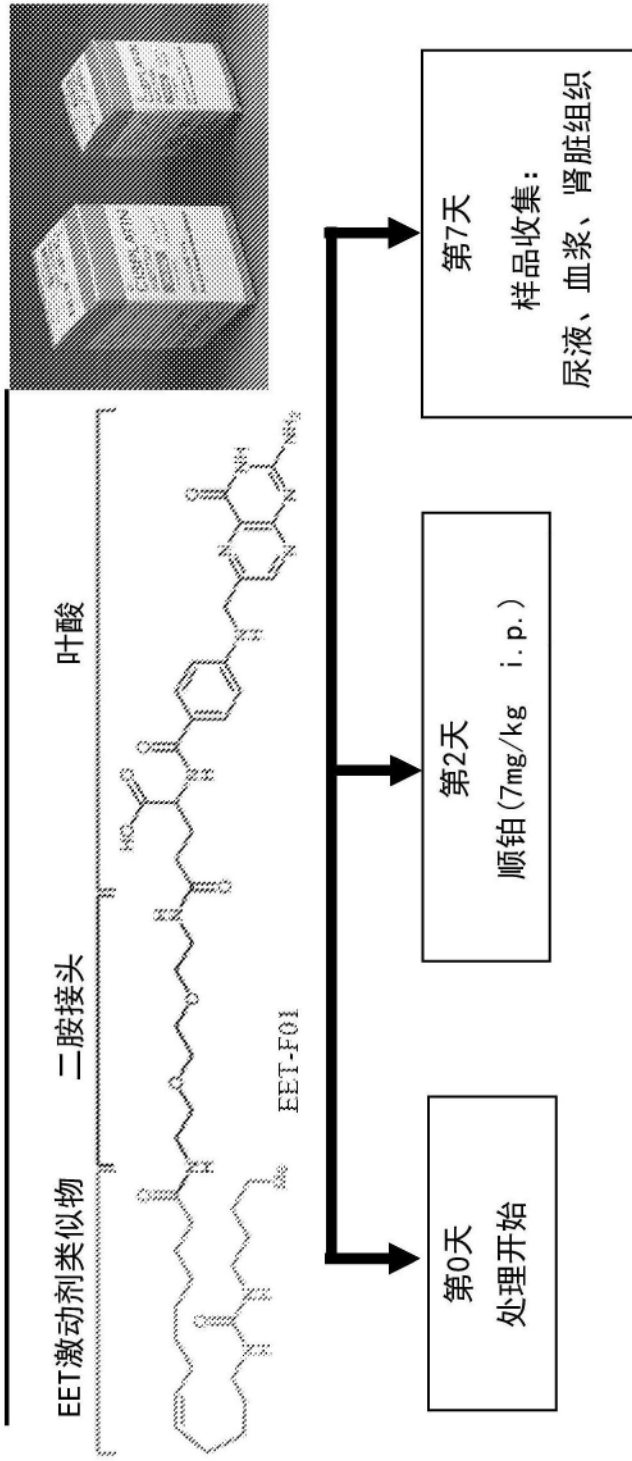
[0081] Khan M.A.,Liu J.,Kumar G.,Skapek S.X.,Falck J.R.,Imig J.D. (2013) 新型口服活性环氧二十碳三烯酸(EET)类似物可减轻顺铂肾毒性(Novel orally active epoxyeicosatrienoic acid(EET)analogs attenuate cisplatin nephrotoxicity).*FASEB J.*7(8),2946-56.

[0082] Hye Khan M.A.,Fish B.,Wahl G.,Sharma A.,Falck J.R.,Paudyal M.P.,Moulder J.E.,Imig J.D.,Cohen E.P. (2016) 环氧二十碳三烯酸类似物减轻了放射性肾病大鼠模型的肾脏损伤(Epoxyeicosatrienoic acid analogue mitigates kidney injury in a rat model of radiation nephropathy).*Clin Sci(Lond)*.30(8),587-99.

[0083] Hye Khan M.A.,Neckár J.,Manthati V.,Errabelli R.,Pavlov T.S.,Staruschenko A.,Falck J.R.,Imig J.D. (2013) 口服活性环氧二十碳三烯酸类似物可减轻高血压Dahl盐敏感性大鼠的肾脏损伤(Orally active epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates kidney injury in hypertensive Dahl salt-sensitive rat).*Hypertension.*62(5),905-13.

[0084] 已通过一个或多个优选的实施方式描述了本发明,但应理解,除了明确描述的那些方案之外,许多等同方案、替代方案、变化方案和修改方案是可能实现的并在本发明范围内。

EET类似物和顺铂引起的肾脏损伤



- 第1组: WKY-载剂
- 第2组: WKY-顺铂 + 载剂
- 第3组: WKY-顺铂 + EET-A (10mg/kg, i.p.)
- 第4组: WKY-顺铂 + F01 (20mg/kg, i.p.)
- 第5组: WKY-顺铂 + F01 (2mg/kg, i.p.)

图1

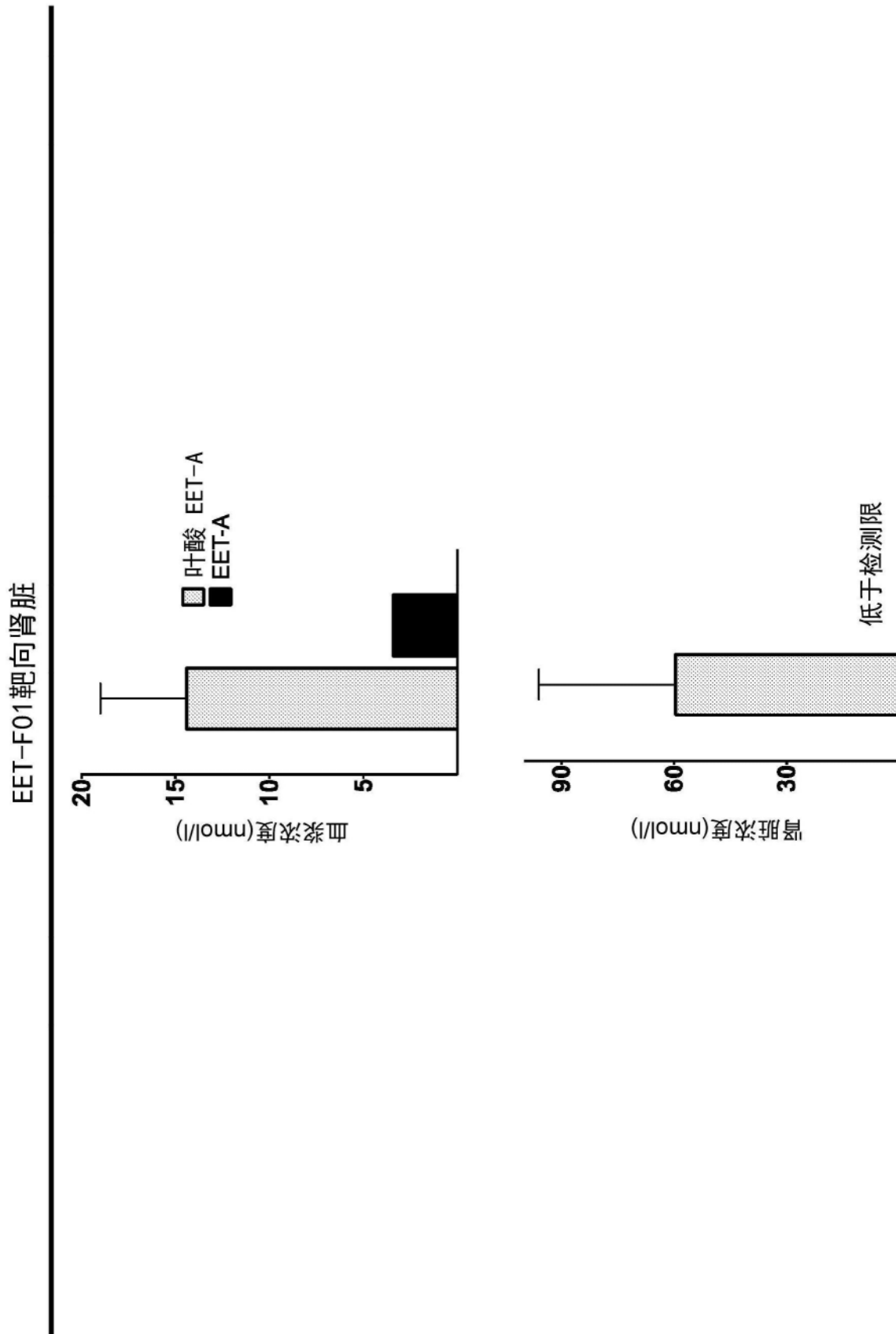


图2

EET-F01降低顺铂引起的肾脏损伤

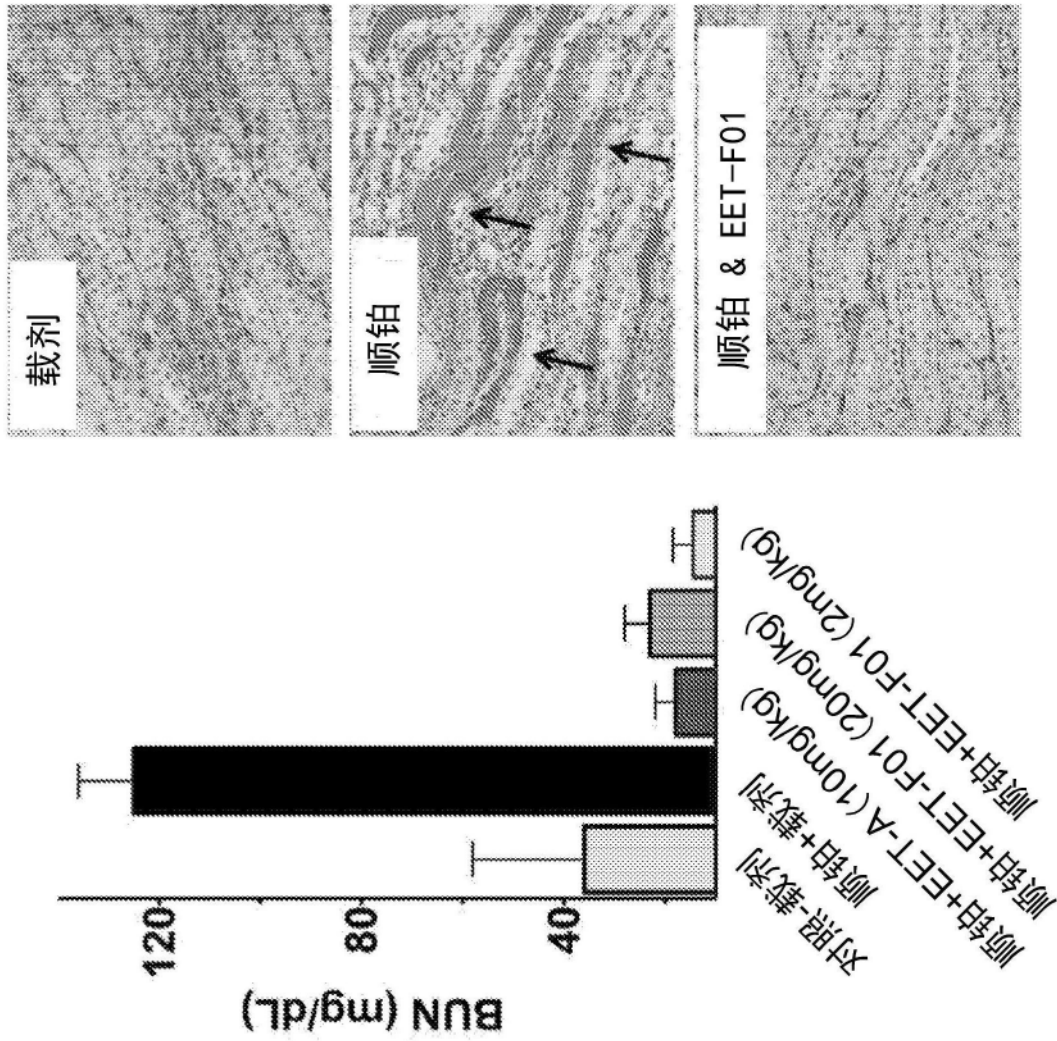


图3

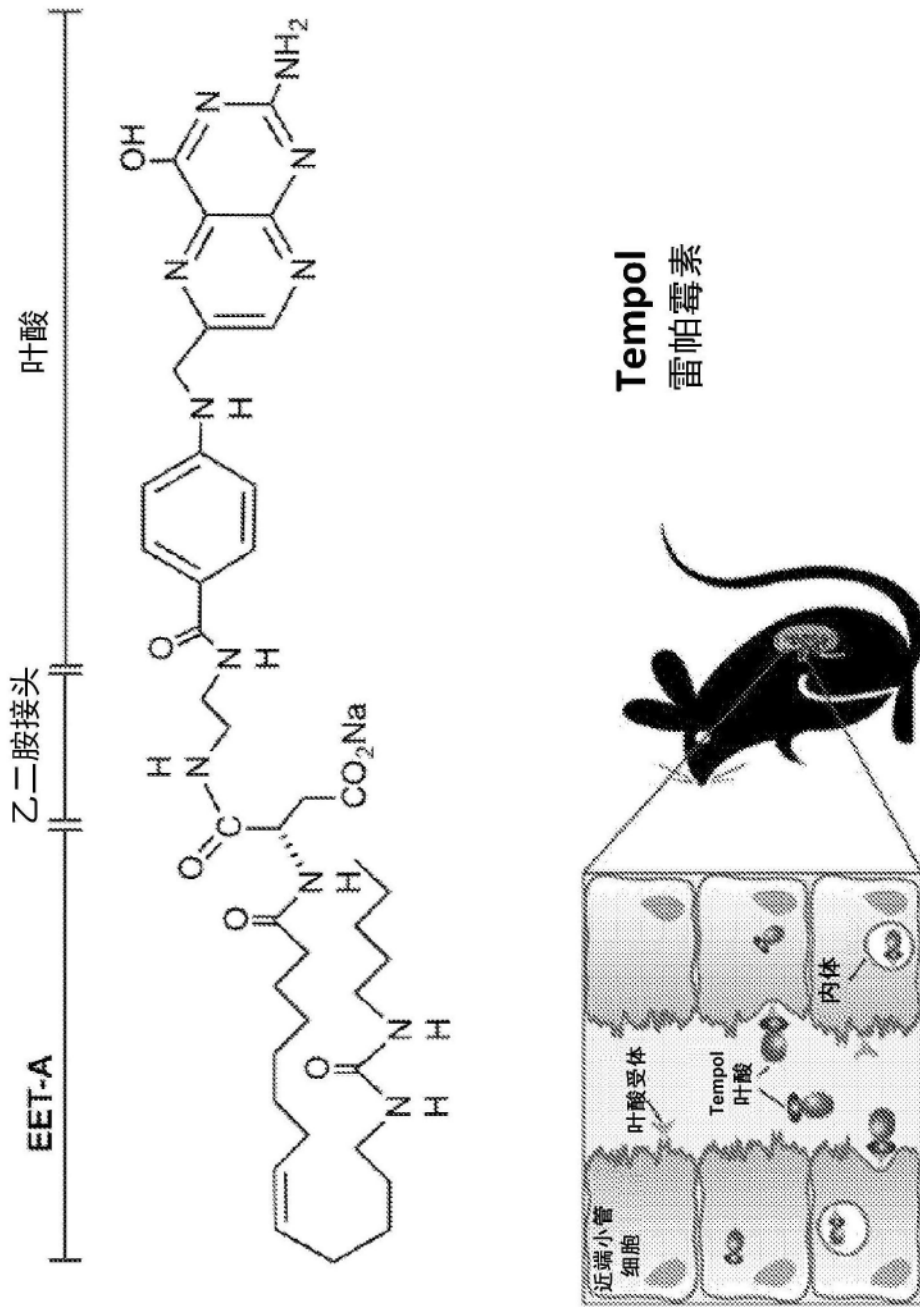


图4