(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116568296 A
(43)申请公布日 2023.08.08

(21)申请号 202180074898.5
(22)申请日 2021.11.12
(30)优先权数据
20207534.7 2020.11.13 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.05.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/081482 2021.11.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/101389 EN 2022.05.19
(71)申请人 赛罗多斯公司
地址 挪威奥斯陆
(72)发明人 E·斯坦尼斯
T·F·斯卡斯菲尔特
(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
专利代理师 李栋修 张培源
(51)Int.Cl.
A61K 31/357(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)

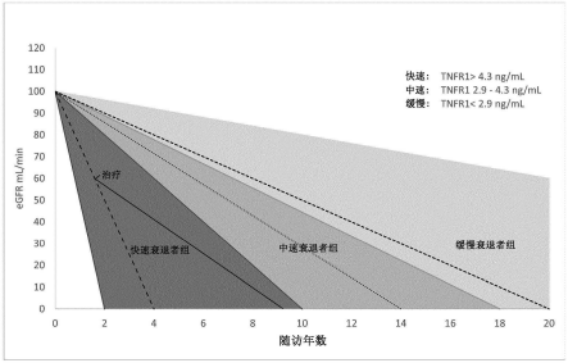
权利要求书1页 说明书14页 附图3页

(54)发明名称

用于肾脏疾病的双重TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂

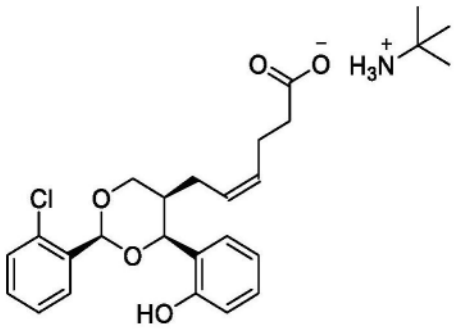
(57)摘要

本发明涉及某些能够减少肿瘤坏死因子受体1(sTNFR1)并且能够增加肿瘤坏死因子受体2(sTNFR2)的2,4-二苯基1,3-二氧杂环己烷,以及它们在治疗患有肾脏疾病如糖尿病性肾病的特定亚组中的应用。



CN 116568296 A

1.式(I)的化合物，



式(I)

其应用于治疗患有肾脏疾病的患者群体，其中要治疗的所述群体的特征在于TNFR1的血清水平>2.9ng/ml和/或ACR>300mg/g。

2.根据权利要求1所述应用的化合物，其中，所述肾脏疾病是糖尿病性肾病。

3.根据前述权利要求中任一项所述应用的化合物，其中，升高的sTNFR1>4.3ng/mL。

4.根据前述权利要求中任一项所述应用的化合物，其中，所述化合物以0.16mg/kg至1.6mg/kg的每日剂量施用，优选每日0.3mg/kg或0.625mg/kg。

5.根据前述权利要求中任一项所述应用的化合物，其用于降低受试者血清或尿液中的sTNF1R和/或ACR。

6.根据前述权利要求中任一项所述应用的化合物，其中，血清或尿液中的sTNFR1值降低至＜4.3ng/mL，优选＜2.9ng/mL。

用于肾脏疾病的双重TNFR1拮抗剂和TNFR2激动剂

技术领域

[0001] 本发明涉及以下的发现:某些2,4-二苯基-1,3-二氧杂环己烷能够减少肿瘤坏死因子受体1(sTNFR1),并能够增加肿瘤坏死因子受体2(sTNFR2)。因此,减少sTNFR1和增加sTNFR2的混合情况使这类化合物成为用于治疗肾脏疾病,特别是治疗某些患有其中TNFR1的促炎症途径高度升高的肾脏疾病的患者亚组的有希望的候选药物。因此,本发明涉及某些2,4-二苯基-1,3-二氧杂环己烷,其用于治疗患者亚组中的肾脏疾病,特别是糖尿病性肾病,所述患者亚组的特征在于sTNF1R血清水平>2.9ng/mL和/或ACR>300mg/g的亚组患者。

背景技术

[0002] 糖尿病性肾病是用于表示糖尿病患者的肾脏疾病或损害的医学术语,其最终导致慢性肾脏疾病(CKD)。它是一种渐进性疾病,在长期,如10-20年或更长时间患有1型或2型糖尿病的人中更为常见。糖尿病性肾病是比较常见的,据估计,约有40%的1型或2型糖尿病患者会发展到CKD的某个阶段。此外,截至2019年,国际糖尿病联合会估计,全球有4.63亿人患有糖尿病。CKD可分为五个阶段,其中第5阶段(肾衰退或终末期肾病(ESRD))是最后一个阶段,这时患者将需要定期透析或肾脏移植。这些阶段是由肾脏损伤的程度和肾小球滤过率(GFR)决定的。肾脏损害的迹象可以从血液、尿液、肾脏活检或影像学研究中看到,包括白蛋白/肌酐比率(ACR)的测量。第1阶段:存在肾脏损害,但肾功能正常或相对较高,GFR在90以上,第2阶段:存在肾脏损害,肾功能有些丧失;GFR在60至89之间,第3阶段:肾功能轻度至严重丧失;GFR在30至59之间,第4阶段:肾功能严重丧失;GFR在15至29之间,第5阶段:肾脏衰退;GFR小于15。

[0003] 根据美国最近的一份报告(美国肾脏数据系统2019年年度数据报告,Centers for Medicare&Medicaid Services),2017年有124,500个ESRD新病例登记,超过746,557名美国人正在接受ESRD治疗,其中约39%的病例由糖尿病性肾病引起。治疗的费用是惊人的:2017年,美国每位患者的血液透析治疗费用平均为91795美元,这相当于美国每年的血液透析总费用约为280亿美元;2017年,医疗保险在CKD和ESRD患者身上的总支出超过了1200亿美元。除了给社会带来巨大的经济成本外,受CKD或ESRD影响的患者个人在日常生活中也受到严重阻碍,往往很难维持普通工作,因为他们的疾病需要严重的饮食限制,最后还需要非常频繁的透析。通常情况下,每次透析治疗持续约四个小时,每周进行三次。

[0004] CKD可能由不同的肾脏疾病引起,如糖尿病性肾病、肾小球肾炎、肾小球硬化症或高血压肾硬化症,尽管这些肾脏疾病背后的病因和病理有所不同。肾小球肾炎指的是肾小球(肾脏中被鲍曼氏囊包围的小毛细血管)的炎症,可能由自身免疫反应或感染引起,通常会导致肾病和/或肾炎综合征。肾小球硬化症是指肾小球的瘢痕化或硬化,可能由不同的病因引起,如病态肥胖、HIV感染、出生缺陷、药物滥用或遗传原因。高血压肾硬化症是指由于慢性高血压引起的高滤过导致肾脏组织(包括肾小球、肾小管和间质组织)的硬化和增厚的损害。糖尿病性肾病指的是糖尿病患者的肾脏受损。糖尿病性肾病的病理生理学被认为涉及血液动力学和代谢因素之间的相互作用。血液动力学因素包括全身和肾小球内压的增

加,以及肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的过度激活。由于血糖控制不佳的糖尿病患者过滤葡萄糖的负荷较高,近端肾小管中的钠-葡萄糖共转运体2(SGLT2)出现了上调,该共转运体将钠和葡萄糖带回循环。这导致氯化钠向远端肾小管中的致密斑区的输送减少。致密斑区细胞感觉到氯化钠水平的变化,并通过释放肾素和过度激活RAAS而触发自动调节反应,从而增加血压。此外,代谢因素包括由于血糖控制不佳的糖尿病患者血糖浓度较高而形成的高级糖化终产物(AGEs)。形成的AGE产物激活了RAGE受体,这是一种信号转导受体,发现于多种细胞类型,包括巨噬细胞、内皮细胞、肾系膜细胞和肾小球中的足细胞。RAGE受体的激活增强了细胞质活性氧物质(ROS)的产生,并刺激了细胞内分子,如核因子kappa B(NF-kB)。这些因子导致足细胞损伤、氧化应激、炎症和纤维化,进而导致肾脏功能下降。糖尿病性肾病通常伴随着白蛋白尿,早期有肾小球高滤过和肾脏肥大,随后尿液中白蛋白含量增加,GFR逐渐下降,往往呈现将导致ESRD的恶化的过程。目前糖尿病性肾病的治疗方法包括降低血压的血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂,严格控制血糖的降糖药,以及包括运动和健康饮食的生活方式。最近,恩格列净(empagliflozin)(一种钠依赖性葡萄糖转运体2抑制剂)的治疗也显示稳定肾功能。

[0005] 目前,两种测试用来诊断CKD:基于肌酐的eGFR(估计的GFR)和ACR(白蛋白与肌酐的比率)。肾小球滤过率(GFR)描述了单位时间内肾脏中从肾小球毛细血管进入鲍曼囊的过滤液体体积。肌酐清除率是指单位时间内肌酐得到清除的血浆体积,是近似于GFR的有用的测量方法,因为肌酐是通过肾小球自由过滤的,而不是从肾小管重吸收的。ACR是对尿液中白蛋白与肌酐比率的测量。白蛋白是在肾脏受损患者的尿液中最先检测到的蛋白质之一,也是排泄的蛋白质中比例最大的。白蛋白是在血液中以高浓度存在的血浆蛋白,而当肾脏功能正常时,尿液中几乎没有白蛋白存在。然而,如果一个人的肾脏受损或患病,他们往往可能失去保存白蛋白和其他蛋白质的能力。

[0006] 被诊断为糖尿病性肾病的患者有进行性肾脏衰退。它以几乎稳定的线性速度发展,直到达到ESRD,尽管个体之间的速度有很大差异。目前采用的上述诊断方法,即ACR和基于肌酐的eGFR,不能可靠地区分哪些衰退是"非常快"、"快速"、"中速"或"缓慢"。因此,尿白蛋白排泄量的增加是糖尿病性肾病疾病进展的一个重要决定因素,但它并不能完全解释为什么有些患者群体与其他患者群体相比肾脏的进行性衰退更快,尽管最初具有相似的ACR和/或eGFR值。

[0007] 肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)是细胞因子受体的蛋白质超家族,其特征在于能够通过细胞外富含半胱氨酸的结构域结合肿瘤坏死因子(TNFs)。该家族包括肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)和肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)以及其他受体。TNFR1和TNFR2既作为膜结合受体(mTNFR1和mTNFR2)又作为可溶性形式(sTNFR1和sTNFR2)存在,并通过与参与系统性炎症的促炎细胞因子TNF-α结合而被激活。因此,在血清或尿液中测量的TNFR1/2的水平是可溶性形式(sTNFR1和sTNFR2)。TNF-α也以可溶形式(sTNF-α)和膜结合形式(mTNF-α)存在。有证据表明,mTNFR1在几乎所有的细胞上都普遍表达,而mTNFR2显示更有限的表达,主要是在调节性T细胞(Tregs)上。TNFRs对可溶性TNF-α(sTNF-α)和膜结合TNF-α(mTNF-α)有不同的亲和力。TNFR1对两种形式都结合很好,而TNFR2对膜结合形式有更高的亲和力。

[0008] 近年来,A.Krolewski及其同事提出了1型和2型糖尿病的糖尿病性肾病的新模型(Diabetes Care 2015;38:954-962和Kidney Int.2017June;91(6):1300-1311),据此,糖

尿病性肾病早期和晚期的主要临床特征是进行性肾脏衰退的速度(eGFR斜率,以mL/min/1.73m^2/年计测量)。Krolewski等人发现,虽然个体的肾脏衰退速度是恒定的,但eGFR斜率在个体之间有很大的差异,从-72到-3.0mL/分钟/1.73m^2/年,取决于sTNFR1的血清水平,即使这些个体最初有类似的ACR和/或GFR值。Krolewski等人将患者分为"非常快速"、"快速"、"中速"和"缓慢"的衰退者,并证明"快速"和"非常快速"的衰退者在2-10年内从正常eGFR衰退到ESRD(见图1)。研究发现,无论ACR和GFR等其他标志物的值如何,基线血清sTNFR1>4.3ng/ml的患者在3年随访期内发生ESRD的累积风险最高。结果总结在图1中。因此,糖尿病性肾病患者的高危组("快速"肾衰退者组)与其他糖尿病性肾病患者组(如"中速"或"缓慢"肾衰退者组)是有区别的,后者的肾衰退进展较慢。这些患者群体--快速和中速衰退者--因此构成了以血清中sTNF1R值增加的特定生理和/或病理状态为特征的独立的患者群体。血清sTNFR1的升高决定了进行性肾衰退的速度,这一发现表明TNF1R的促炎症途径起着关键作用,新的治疗方法至少应以拮抗/减少TNFR1为目标,以减缓疾病的进展。

[0009] 最近的研究结果指出,sTNFR1和sTNFR2的可溶性循环水平,而不是通过膜结合受体mTNFR1和mTNFR2的细胞信号转导的重要性。然而,sTNFR的调节机制还没有被完全理解。一些研究认为TNF-α是主要的调节剂,因为这种细胞因子会诱导TNFRs从膜上脱落。同样在尿液中,sTNFRs排泄的增加反映了TNFRs从细胞膜上脱落的增加,这可以解释为TNF-α在活化的肾脏细胞中表达增加的标志。已经进一步证明,血清中的sTNFRs和尿液中的sTNFRs之间有很强的相关性。因此,血清中高水平的sTNFRs对应于尿液中高水平的sTNFRs,反之亦然。尽管sTNFRs的确切生理作用仍然未知,但最近有人提出TNFR介导的途径而不是一般的炎症具体参与了I型和II型糖尿病早期和晚期肾功能丧失的发展。

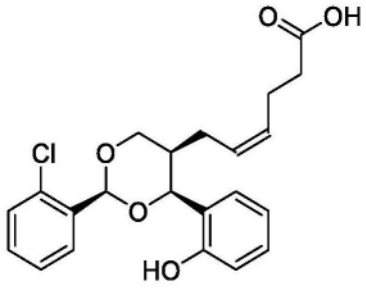
[0010] 已知sTNF-α通过TNFR1的结合主要触发促炎途径,而mTNF-α通过TNFR2的结合则触发免疫调节和组织再生。因此,治疗炎症性疾病的有希望的治疗策略是,通过施用sTNF-α抑制剂/清除剂、TNFR1拮抗剂或通过降低sTNFR1的血清水平,选择性地阻断sTNF-α/TNFR1途径而保持TNFR2信号传导途径的完整。另一个有希望的策略是依靠TNFR2激动剂或通过增加sTNFR2的血清水平,这可以驱动调节性T细胞的扩增并促进组织再生。因此,未来对肾脏疾病,如糖尿病性肾病的治疗应旨在确定能够通过减少或拮抗TNFR1和增加或激动TNFR2来调控TNFRs的分子。目前,据申请人所知,还没有通过减少或拮抗TNFR1并同时通过增加或激动TNFR2来发挥作用的已知分子。因此,在寻找能够减少或拮抗TNFR1和增加或激动TNF2R,从而减少sTNF1R途径和增加sTNFR2途径的新疗法方面,存在着未满足的需求。特别是,这种化合物对治疗某些亚组受试者很有价值,这些受试者的特征在于TNFR1高度升高并患有肾脏疾病,特别是糖尿病性肾病,然后在几年内他们的肾病不可逆地发展成ESRD。

发明内容

[0011] 本发明人发现,(Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-氯苯基)-4-(2-羟基苯基)-1,3-二氧杂己环-顺-5-基)己-4-烯酸或其药学上可接受的盐通过减少或拮抗肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)和通过增加或激动肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)而发挥作用。因此,发明人已经证明,与安慰剂处理的大鼠相比,本发明的化合物能够在糖尿病性肾病的动物模型中减少sTNFR1,同时增加sTNFR2,从而减少TNFR1的促炎途径,增加TNFR2的组织再生介导的途径。因此,根据本发明的化合物在治疗肾脏疾病,特别是糖尿病性肾病方面,在以具有sTNFR1水

平升高为特征的患者亚组中比在TNFR1途径较不明显的其他患者亚组中更有用。此外，令人惊讶的是，在ACR>300mg/kg的患者中观察到了更好的治疗效果。

[0012] 因此，在第一方面，本发明因此涉及式(I)的化合物或其药学上可接受的盐：

[0013] 

式(I)

[0014] 其应用于治疗以血清sTNFR1值>2.9ng/ml和/或ACR>300mg/g为特征的患者群体的肾脏疾病。

附图说明

[0015] 图1显示了未经治疗的快速衰退者组(TNFR1>4.3ng/mL)的eGFR轨迹、中速衰退者组(TNFR1 2.9-4.3ng/mL)的eGFR轨迹和缓慢衰退者组(TNFR1<2.9ng/mL)的eGFR轨迹的示意图(虚线)。当通过治疗降低TNFR1值时(黑色实线)，eGFR斜率会发生改变，从而推迟ESRD(图改编自A.Krolewski等，Kidney Int.2017June;91(6):1300-1311)。

[0016] 图2显示了接受安慰剂或化合物1治疗的假手术大鼠和Px-UNx手术大鼠在4和7周后相对于基线值的尿液TNFR1:肌酐的变化(pg/mg)的测量，以及4和7周后的变化。收集剂量1、3和10mg/kg，口服(p.o.)的数据。值代表平均值±SEM。图中显示，在研究的7周内，假手术大鼠的TNFR1水平略有下降，而接受安慰剂(载剂)的Px-UNx手术大鼠的TNFR1水平在同一时期迅速上升。经化合物1处理的Px-UNx手术大鼠在7周内也显示出TNFR1水平的增加，但明显低于安慰剂对照组。

[0017] 图3显示了接受安慰剂或用化合物1(3mg/kg，p.o)治疗的假手术大鼠和Px-UNx手术大鼠在4和7周后相对于基线值的尿液TNFR2:肌酐的变化(pg/mg)的测量。值代表平均值±SEM。图中显示，在研究的7周内，假手术大鼠的TNFR2水平略有下降，而接受安慰剂(载剂)的Px-UNx手术大鼠的TNFR2水平在同一时期迅速下降。经化合物1处理的Px-UNx手术大鼠显示出TNFR2水平的下降，但与安慰剂对照组相比要少得多。

[0018] 图4显示了胰腺的解剖图。90％胰腺切除术后的残余部分(残余胰腺)被定义为图4中的白色区域。

[0019] 定义

[0020] 在本文中，术语"治疗"应在最广泛的意义上理解为预防、改善或治疗。因此，治疗也旨在包括预防性治疗。因此，肾脏疾病的治疗可以指预防或延缓肾脏功能的丧失，或部分逆转由ACR和/或eGFR估计的肾脏功能的丧失。

[0021] 在本上下文中，术语"药学上可接受的盐"是指所有类型的盐，这些盐在药物中用于将酸转化为盐。该盐可通过向式(I)化合物添加碱而形成。典型的实例可以在"Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,Selection,and Use,2nd Revised Edition

P.Heinrich Stahl(Editor),Camille G.Wermuth(Editor)ISBN:978-3-906-39051-2 2011年4月,388页”中找到。

[0022] 在本文中,"sTNFR1"是指可溶性TNF受体1型。sTNFR1可以根据本文描述的程序在血清或尿液中进行测量。

[0023] 在本文中,"sTNFR2是指可溶性TNF受体2型。sTNFR2可以根据本文描述的程序在血清或尿液中进行测量。

[0024] 根据本发明,根据Krolewski A.S.Diabetes Care 2015;38:954-962and Krolewski A.S.et al.Kidney Int.2017June;91(6):1300-1311中描述的程序,在血清或尿液中测量sTNFR1和sTNFR2。简而言之,所有的标记物都是通过免疫测定进行的。将样品解冻,涡旋,离心,并在上清液中进行测量。sTNFR1和sTNFR2根据制造商的方案通过ELISA(分别为DRT100、DRT200和高敏免疫测定HS600B;R&D,Minneapolis,Minnesota)进行测量。

[0025] 本文中使用的其他定义如下:

[0026] ACR:白蛋白与肌酐比率

[0027] eGFR:估计的GFR

[0028] ESRD:末期肾脏疾病

[0029] GFR:肾小球滤过率

[0030] NA:正常白蛋白尿

[0031] MA:微量白蛋白尿

[0032] T1DM或T1D:1型糖尿病(mellitus)。

[0033] T2DM或T2D:2型糖尿病(mellitus)。

具体实施方式

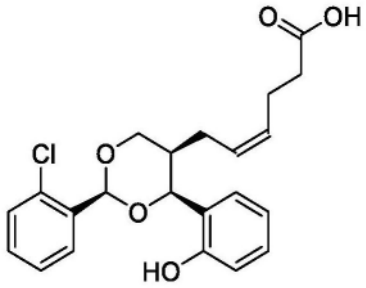
[0034] 本发明涉及(Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-氯苯基)-4-(2-羟基苯基)-1,3-二氧杂己环-顺-5-基)己-4-烯酸或其药学上可接受的盐,其应用于治疗肾脏疾病,特别是糖尿病性肾病。该化合物属于2,4-二苯基-1,3-二氧杂环己烷类,以前曾被证明是血栓素受体拮抗剂、血栓素合成酶抑制剂和/或PPAR激动剂。因此,这类化合物以前已被证明对葡萄糖摄取有影响(例如参见WO 2007/138485中的实施例28),能拮抗血栓素受体(例如参见WO 2007/138485中的实施例29)并抑制细胞增殖(例如参见WO 2007/138485中的实施例30)。因此,以前发表的数据支持这类化合物可能具有作为抗高血糖剂、抗癌剂和/或抗凝血剂的潜力。

[0035] 本发明人现在惊奇地发现,(Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-氯苯基)-4-(2-羟基苯基)-1,3-二氧杂己环-顺-5-基)己-4-烯酸或其药学上可接受的盐也降低肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)的血清或尿液水平/作为拮抗剂起作用,并增加肿瘤坏死因子受体2(TNFR2)的血清和尿液水平/作为激动剂起作用。这一发现使得本发明的化合物可用于治疗肾脏疾病,特别是糖尿病性肾病,更特别是治疗以血清或尿液中sTNFR1水平升高为特征的肾脏疾病患者亚组中的肾脏疾病。

[0036] 本发明人惊奇地发现,与接受安慰剂的Px-UNx手术大鼠相比,化合物1能够降低Px-UNx手术大鼠中的sTNFR1水平(见图2)。此外,发明人惊讶地发现,与接受安慰剂的Px-UNx手术大鼠相比,化合物1能够提高Px-UNx手术大鼠的sTNFR2水平(见图3)。这一发现是令人惊讶的,因为化合物1作为血栓素受体拮抗剂、血栓素合成酶抑制剂和PPAR激动剂,预计

不会调节TNFR1的水平，因为这些受体和TNFR1之间不存在生物学联系。因此，这些新发现导致了新的临床应用，即用于治疗某些患有肾脏疾病并且特征在于具有升高的sTNFR1和/或降低的sTNFR2，从而使肾功能衰退最快的亚组。

[0037] 因此，在第一方面，本发明涉及一种式(I)化合物或其药学上可接受的盐，

[0038] 

式(I)

[0039] 其应用于治疗以sTNFR1的血清水平>2.9ng/mL和/或ACR>300mg/g为特征的患者的肾脏疾病。

[0040] 肾脏疾病

[0041] 在本发明的一个实施方式中，肾脏疾病选自糖尿病性肾病、肾小球肾炎、肾小球硬化症或高血压肾硬化症组成的组。在最优选的实施方式中，该肾脏疾病是糖尿病性肾病。

[0042] 患者群体

[0043] 如上所述，患有特定肾脏疾病的患者不能被视为单一的统一群体，而是可以根据例如sTNFR1的水平进一步划分为亚组。如图1所示，根据肾功能衰退的速度(eGFR的斜率)，患有糖尿病性肾病的患者可以进一步被分为"快速衰退者"、"中速衰退者"或"缓慢衰退者"。因此，最初由于相似的ACR和GFR值而被归类为糖尿病性肾病同一阶段(1-5)的受试者，由于其肾功能衰退的速度高度不同，可具有完全不同的疾病的进展。肾功能衰退的速度由血清或尿液的sTNFR1水平决定，强调sTNFR1及其促炎症信号传导途径在疾病进展速度中的作用。根据Krolewski等的研究，"快速衰退者"大约在2-10年内达到ERSD，并且其特征是TNFR1的血清>4.3ng/mL。"中速衰退者"在大约10-18年内达到ERSD，其特征是TNFR1为2.9-4.3ng/mL。最后，缓慢衰退者在20-45年内达到ERSD，其特征是血清中的TNFR1水平<2.9ng/mL(参见图4)。因此，根据本发明的化合物或其药学上可接受的盐在治疗以具有血清sTNFR1水平>2.9ng/mL，如sTNFR1值在2.9-4.3ng/mL之间，最优选血清水平sTNFR1>4.3ng/mL为特征的亚组中特别有用。因此，根据本发明的化合物对于减缓那些具有发展ESRD的高风险或在几年内失去≥40％的基线eGFR的组的糖尿病性肾病的进展特别有用，因为高水平的sTNFR1导致疾病的快速进展。因此，在优选的实施方式中，该治疗用于患有肾脏疾病并且特征在于血清sTNFR1水平>2.9ng/mL的患者亚组(即"中速衰退者"或"快速衰退者")。在优选的实施方式中，该治疗方法用于患有肾脏疾病并且特征在于血清sTNFR1水平值在2.9-4.3ng/mL之间的患者亚组(即"中速衰退者")。在更优选的实施方式中，该治疗用于患有肾脏疾病并且特征在于血清sTNFR1水平>4.3ng/mL的人类受试者亚组(即"快速衰退者")。特别是，本发明对于治疗糖尿病性肾病是有用的。因此，在更优选的实施方式中，该治疗用于患有糖尿病性肾病且特征在于血清sTNFR1水平在2.9-4.3ng/mL之间的患者亚组(即"中速衰退者")。在最优选的实施方式中，该治疗方法用于患有糖尿病性肾病且特征在于sTNFR1

的血清水平>4.3ng/mL的患者亚组(即"快速衰退者")。如上所述,糖尿病性肾病可作为1型糖尿病和2型糖尿病的长期并发症发生。因此,在特定的实施方式中,临床状况是作为1型糖尿病的长期并发症的糖尿病性肾病。在另一个特定的实施方式中,临床状况是作为2型糖尿病的长期并发症的糖尿病性肾病。

[0044] 当降低TNFR1值时,eGFR的斜率降低,从而推迟ESRD的发病。图1显示了"快速衰退者亚组"患者的eGFR斜率(虚线),该斜率被转变为对应于"中速衰退者亚组"的eGFR斜率(实线),从而将ESRD的发病时间推迟了约5年。由此可见,肾脏疾病的治疗最好尽早开始,以获得最佳的临床效果。因此,在本发明的实施方式中,该治疗用于患有肾脏疾病并有肾衰退(5期,GFR小于15)和血清sTNFR1水平>2.9ng/mL,最优选>4.3ng/mL的患者亚组。在优选的实施方式中,该治疗用于患有肾脏疾病并具有严重的肾功能丧失(GFR小于15至29的第4阶段)和血清sTNFR1水平>2.9ng/mL,最优选>4.3ng/mL的人类受试者亚组中。在更优选的实施方式中,该治疗用于患有肾脏疾病并有中度至重度肾功能丧失(GFR低于30至59之间的第3阶段)且血清sTNFR1水平>2.9ng/ml,最优选>4.3ng/ml的患者亚组。在更优选的实施方式中,该治疗用于患有肾脏疾病和有肾脏损害并有一些肾脏功能丧失(GFR小于60至89之间的第2阶段)且血清sTNFR1水平>2.9ng/ml,最优选>4.3ng/ml的患者亚组。在最优选的实施方式中,该治疗用于患有肾脏疾病并有肾脏损害存在但肾功能正常(GFR高于90的第1阶段)且血清sTNFR1水平>2.9ng/ml,最优选>4.3ng/ml的患者亚组。在上述任一实施方式中,肾脏疾病优选为糖尿病性肾病。

[0045] 在另一个高度优选的实施方式中,式(I)化合物用于治疗以下亚组患者的糖尿病性肾病,该亚组患者特征在于具有超过90mL/分钟的正常的肾小球滤过率(GFR),ACR>1.9g白蛋白/g尿肌酐,且血清sTNFR1的水平>2.9ng/mL,最优选>4.3ng/mL。

[0046] 在另一个高度优选的实施方式中,式(I)化合物用于治疗以下亚组患者的糖尿病性肾病,该亚组患者特征在于具有超过90mL/分钟的正常的肾小球滤过率(GFR),ACR>300mg白蛋白/g尿肌酐,且血清sTNFR1水平>2.9ng/mL,最优选>4.3ng/mL。

[0047] 剂量

[0048] 发明人最初在手术引发的糖尿病性肾病动物(大鼠)模型中测试了化合物1(Secher T等人,Diabetes 2018Jul;67(Supplement 1))。在该模型中,在"快速衰退者"的尿液中可以观察到循环TNFR1水平的升高,这与Krolewski等人的发现类似。在大鼠研究中,发明人令人惊讶地发现,在7周的整个治疗期内,与安慰剂治疗相比,化合物1降低了TNFR1的水平(见图2)。

[0049] 在49天内,对90%的胰腺切除和单侧肾切除的大鼠每天口服施用一次1mg/kg、3mg/kg和10mg/kg三个有效剂量的化合物1。一个对照组接受安慰剂,另一个对照组接受了模仿90%胰腺切除术(Px)和单肾切除术(UNx)的手术,但不影响肾脏或胰腺的功能(假手术模型)。假手术组也接受安慰剂。大鼠研究的结论是,化合物1在整个治疗期间降低了尿液中的sTNFR1的水平(见图2)。从图2可以看出,在7周的研究中,假手术大鼠经历了sTNFR1水平略有下降,而接受安慰剂(载剂)的Px-UNx手术大鼠显示出同一时期迅速上升的sTNFR1水平。化合物1治疗和Px-UNx手术的大鼠在7周内也显示TNFR1水平的增加,但明显低于安慰剂对照组。大鼠模型中的每日剂量可转换为人类的等效剂量(Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for

Therapeutics in Adult Healthy Volunteers,2005)。因此,1mg/kg的日剂量相当于人类日剂量为0.16mg/kg,或70kg患者的11.2mg。同样,3mg/kg的日剂量相当于人类日剂量为0.48mg/kg,或70kg的患者的33.6mg。最后,10mg/kg的日剂量相当于人类日剂量为1.6mg/kg,或70kg的患者的112.7mg。正如在实施例1中所看到的,无法观察到剂量水平(1、3或10mg)之间的统计学上的显著差异。这表明在最低的剂量下已经获得了充分的疗效,因此在动物模型中,甚至比1mg/kg更低的日剂量也足以降低尿液中的sTNFR1。

[0050] 因此,根据动物研究,并将上述剂量换算为人体剂量,显示同等治疗效果的日剂量位于0.16mg/kg至1.6mg/kg之间。然而,由于发现所有的剂量都同样有效,来自动物模型的数据表明甚至比0.16mg/kg更低的化合物1的日剂量也能有效降低sTNFR1。这实际上意味着,在需要较高剂量的情况下,可以在患者中减少sTNFR1,以使对凝血系统的影响(通过拮抗血栓素受体或血栓素合成酶)最小化。

[0051] 因此,在优选的实施方式中,将式(I)化合物或其药学上可接受的盐以相当于每日剂量<1.6mg/kg,优选小于0.48mg/kg,甚至更优选小于0.16mg/kg的治疗有效剂量施用于患者,例如每日剂量在0.01-1.6mg/kg,更优选0.05-0.48mg/kg,更优选0.1-0.16mg/kg。在本发明的另一个实施方式中,将式(I)化合物或其药学上可接受的盐以在0.16mg/kg至1.6mg/kg的每日剂量施用于患者。在本发明的另一个优选实施方式中,将式(I)的化合物或其药学上可接受的盐以0.3mg/kg至0.625mg/kg的每日剂量施用于患者。在本发明的另一个实施方式中,式(I)化合物或其药学上可接受的盐以每天0.3mg/kg或0.625mg/kg的剂量施用于患者。

[0052] 给药方案

[0053] 给药方案可包括本文所述的单一日剂量或分为多个较小的日剂量,以便达到药物的有效治疗血浆浓度。多个小剂量的好处是血浆药物浓度的波动小,这对于具有狭窄治疗窗口或短半衰期的药物来说是必要的。更复杂的给药方案的缺点可能是患者的依从性不佳。在一个实施方式中,给药方案包括本文所述的单日剂量。在另一个实施方式中,给药方案包括两个每日剂量,其中每个剂量是单一每日剂量的一半。优选的是,由于患者的依从性原因,单一每日剂量是优选的。

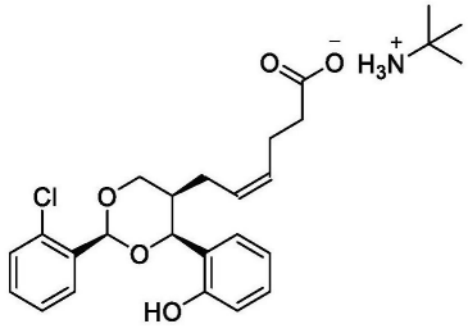
[0054] 因此,在本发明的实施方式中,提供了式(I)化合物或其药学上可接受的盐,其用于治疗特征在于具有sTNFR1的血清水平>2.9ng/mL,最优选>4.3ng/mL的糖尿病性肾病患者群体,其中所述患者在需要治疗的时间内(即只要尿液或血清中存在升高的sTNFR1水平)接受上述"剂量"部分所述的每日剂量。由于上述肾功能丧失的进行性质,治疗期在某些实施方式中可持续数周、数月或数年,最优选的是该治疗是慢性治疗。

[0055] 式(I)化合物或其药学上可接受的盐可与一种或多种用于治疗糖尿病性肾病的额外药物,如血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂或降血糖药一起施用。

[0056] 药学上可接受的盐

[0057] 式(I)化合物可作为游离羧酸或其药学上可接受的碱加成盐使用。盐的形成是众所周知的改善酸性和碱性药物的溶解性和溶出率的有效方法。因此,在一个优选的实施方式中,式(I)的化合物是盐。合适的盐包括但不限于包含碱金属或碱土金属的盐,如式(I)化合物的钠盐、钾盐或钙盐。其他盐类可包括合适的铵盐,其通过使式(I)的酸与适当的胺反应形成。适当的盐的实例可以在"Handbook of Pharmaceutical Salts:Properties,

Selection,and Use,2nd Revised Edition P.Heinrich Stahl(Editor),Camille G.Wermuth(Editor)ISBN:978-3-906-39051-2 2011年4月,388页”找到。在本发明最优选的实施方式中,该盐是如下所示的叔丁基铵盐(化合物1)。

[0058] 

[0059] 降低TNFR1

[0060] 发明人发现,通过施用上述有效的治疗剂量,式(I)化合物或其药学上可接受的盐能够降低糖尿病性肾病动物模型血清或尿液中的sTNF1R。血清或尿液sTNFR1水平的任何下降都将减缓疾病的发展并改善肾功能。sTNFR1的下降量取决于治疗受试者的初始sTNFR1水平、有效治疗剂量和治疗持续时间。因此,在本发明的实施方式中,血清中的sTNFR1值下降到<4.3ng/mL,优选地,血清中的sTNFR1值下降到<2.9ng/mL,更优选地,血清中的sTNFR1值下降<1.0ng/mL。

[0061] 在本发明的第二个方面,提供了一种治疗被诊断患有肾脏疾病,优选糖尿病性肾病的人类受试者的方法,该受试者发展慢性肾脏疾病(CKD)或终末期肾脏疾病(ESRD)或两者的风险增加,该方法包括:

[0062] 1.从具有正常白蛋白尿(NA)、微量白蛋白尿(MA)、大量白蛋白尿或蛋白尿(PT)的人受试者获取血清或尿液样本,

[0063] 2.测量受试者样品中sTNFR1的水平(例如使用TNFR1抗体),

[0064] 3.将受试者样品的sTNFR1水平与参考样品的sTNFR1水平进行比较,

[0065] 4.根据受试者样品水平与参考水平的比较,确定受试者是否有增加的患CKD或ESRD或两者的风险,其中受试者血清样品中sTNFR1的水平至少为2.9ng/mL的存在表明受试者患CKD、ESRD或两者的风险增加,

[0066] 5.对在第4点中被确认为患CKD、ESRD或两者风险增加的任何受试者施用治疗有效剂量的式I化合物;以及

[0067] 6.可选地继续监测所述确定的受试者的TNFR1的水平的减少。

[0068] 实施例

[0069] 检测生物标志物的方法

[0070] 在下面的实施例中,根据制造商的方案,使用来自R&D Systems公司的商业ELISA试剂盒小鼠/大鼠TNFRI/TNFRII Quantikine ELISA试剂盒测量sTNFR1和sTNFR2。然而,为了根据本发明测量人类的sTNFR1和sTNFR2以确定相关人群,应使用Krolewski A.S.Diabetes Care 2015;38:954-962和Krolewski A.S.et al.Kidney Int.2017June;91(6):1300-1311中描述的方法。

[0071] 实施例1--糖尿病性肾病大鼠模型

[0072] 外科手术

[0073] 在一次手术过程中进行胰腺切除术和单肾切除术(见下文)(Secher T等,Diabetes2018Jul;67(Supplement 1))。在几个连续的手术日中,以随机的方式对动物进行手术。在笼子里安装了格子的一夜充分禁食后,在异氟烷麻醉下对大鼠进行了胰腺切除和单肾切除。进行术前镇痛、抗生素和液体补充。从手术前一天到手术后一天不给大鼠提供任何食物,从手术后第二天开始,大鼠可以自由进食。

[0074] 胰腺切除术(PX)

[0075] 简而言之,90%的胰腺切除术是通过用牙科涂抹器轻柔地磨去胰腺尾部、体部的完整部分和部分胰头。通往胃、脾和肠道的主要血管保持完好,因此没有其他器官受到影响。根据图4所示的解剖图,残余物(残留的胰腺)被定义为白色区域。

[0076] 单肾切除术(UNx)

[0077] 简而言之,找到右肾,确定右输尿管、肾动脉和肾静脉,并用缝线结扎。此后,右肾被切除。

[0078] 假手术

[0079] 进行假手术以尽可能地模拟Px-UNx的手术过程。简而言之,麻醉和镇痛以及打开和关闭腹腔都如上所述进行。腹腔打开后,胰腺和右肾将被暴露出来,但不被触及,保持完整。

[0080] 尿液采样

[0081] 大鼠被单独放置在代谢笼中,从下午到第二天早上16小时。研究组的随机子集被放置在笼子里数天(因为笼子比大鼠少)。给大鼠提供饲料和水,自由采用。如果可能的话,包括笼子的丰富性(冰屋、可坐的塑料棒)。记录总尿量,并将尿液储存在-80℃。在冷冻之前,将大量的尿液等分在几个0.5mL的Eppendorph管中。

[0082] 尿液检测

[0083] 将尿液样品储存在-80℃直到分析。根据制造商的说明,使用商业ELISA试剂盒(R&D Systems小鼠/大鼠TNFRI/TNFRII Quantikine ELISA试剂盒)测量大鼠尿液中的sTNFR1。根据制造商的说明,在CobasTM C-501自动分析仪上使用CREP2试剂盒(Roche Diagnostics,德国)测量尿肌酐。根据制造商的说明,使用Bethyl Laboratories大鼠白蛋白ELISA测定尿白蛋白。计算尿白蛋白与肌酐的比率(UACR)。

[0084] 测试计划

[0085] 研究中包括五组雄性Sprague-Dawley大鼠:三组接受化合物1的手术治疗组,一组接受安慰剂(载剂),和一组也接受安慰剂的假手术组。各组汇总于以下表1。

[0086]

组别	名称	剂量(mg/kg)	模型	大鼠数量
1	假手术载剂	-	假手术	12
2	Px-Unx载剂	-	Px-Unx	11
3	Px-Unx低	1	Px-Unx	12
4	Px-UNx中	3	Px-Unx	9
5	Px-UNx高	10	Px-Unx	12

[0087] 表1.Sprague-Dawley大鼠每天口服给药一次。

[0088] 结果

[0089] 在基线和4、7周时,第1-5各组的对于尿液肌酐浓度校正的尿液sTNFR1浓度(pg/

mg)如表2所示：

[0090]

时间	第1组 (假手术)	第2组 (安慰剂)	第3组 (1 mg/kg)	第4组 (3 mg(kg)	第5组 (10 mg/kg)
0周	35,98	259,50	243,38	236,29	220,27
4周	23,57	426,64	373,28	313,80	348,50
7周	21,31	446,88	345,46	369,65	375,03

[0091] 表2

[0092] 表2显示了第1-5组在第0、4和7周的sTNFR1值，单位为pg/mg肌酐。

[0093] 从表2可以看出，3个治疗组的校正sTNFR1值在4周和7周时都持续低于安慰剂组的值，表明化合物1的治疗效果。然而，此时无法观察到剂量水平(1、3或10mg)之间的统计学显著差异。这表明，在最低剂量时已经获得了充分的疗效，因此，即使是比1mg/kg更低的剂量也足以降低尿液中的sTNFR1。因此，决定将这些剂量数据集中起来，得出如表3所示的以下数据集：

[0094]

时间	假手术 (n = 12)	载剂 (n = 11)	治疗 (n=33)
0周	35,98	259,5	233,3
4周	23,57	426,64	345,2
7周	21,31	446,88	363,4

[0095] 表3:表2的数据集合

[0096] 表3中的数据被绘制成相对于基线值的sTNFR1浓度的变化(参见图2)。从图2可以看出，在7周的研究中，假手术大鼠经历了TNFR1水平略有下降，而接受安慰剂(载剂)的Px-UNx手术大鼠展示sTNFR1水平在同一时期迅速上升。化合物1治疗和Px-UNx手术的大鼠在7周内也显示出sTNFR1水平的增加，但显著低于安慰剂对照组。该数据表明了化合物1在降低sTNFR1方面的作用。

[0097] 同样，在基线处和4周和7周后，第3组测量了经尿液肌酐浓度校正的尿液sTNFR2浓度(pg/mg)：

[0098]

时间	第1组 (假手术)	第2组 (安慰剂)	第3组 (1 mg/kg)
0周	2521	5212	4561
4周	1460	3473	3302
7周	1348	2743	3264

[0099] 表4

[0100] 表4显示了第3组在第0、4和7周的TNFR1值，单位为pg/mg肌酐。表4中的数据被绘制成TNFR2浓度相对于基线值的变化(见图3)。从图3可以看出，与第2组(安慰剂)相比，第3组(治疗组)的TNFR2值的变化不太明显。这表明，与安慰剂组相比，sTNFR2途径保持不变，导致组织再生增加的有利效果。

[0101] 实施例2

[0102] 在糖尿病性肾病患者中进行了利用化合物1的临床2a期研究。患者被分为两个不同的亚组，有大量白蛋白尿(ACR>300mg/g)或微量白蛋白尿(ACR30-300 mg/g)，每个亚组每天用0.3mg的化合物1/kg或每天0.625mg的化合物1/kg治疗4周。在每个亚组中，两个剂量之间没有观察到统计学上的显著差异，数据被汇集起来。这表明，在最低剂量下已经获得了充分的疗效，因此，甚至比每天0.3mg/kg更低的剂量也足以改善ACR。与基线相比，在两个亚组中都观察到ACR的统计学上显著的降低。数据汇总在下面的表5中：

[0103]

患者	微量白蛋白尿(n＝38)	大量白蛋白尿(n＝11)
平均基线ACR	91.8mg/g	691mg/g
平均ACR(4周)	72.6mg/g	510mg/g
ACR减少(%)	20.9%	26.2%

[0104] 表5

[0105] 表5，化合物1对改善两组患者的ACR是有效的。然而，与微量白蛋白尿(ACR 30-300mg/g)亚组(ACR降低率为(20.9%))相比，大量白蛋白尿(ACR>300mg/g)亚组显示了统计学上显著更高的ACR降低(26.2%)。这一观察结果与化合物1能够降低或拮抗TNFR1的发现十分吻合，因为TNFR1的升高先前已被证明与ACR的升高相关联。因此，总之，化合物1在有大量白蛋白尿(ACR>300mg/g)的亚组中表现最好。

[0106] 实施例3-合成(Z)-6-(-2-(2-氯苯基)-4-(2-羟基苯基)-1,3-二氧杂己环-5-基)己-4-烯酸

[0107] 第1步：合成外消旋的2-甲氧基-仲康酸的顺式/反式混合物：

[0108] 在20L的双套玻璃反应器中装入260g邻甲氧基苯甲醛、286g琥珀酸酐、572g无水氯化锌和2600mL无水二氯甲烷(DCM)。搅拌混合物并冷却至2℃。在30分钟内加入533mL三乙胺。然后让该混合物在环境温度下搅拌24小时。加入1690mL量的2M HCl，然后加入2600mL乙酸乙酯。该混合物剧烈搅拌5分钟。水相用2000mL乙酸乙酯萃取。合并的有机萃取物用650mL的饱和盐水洗涤，然后用3x 2600mL的饱和碳酸氢钠洗涤。然后合并的水萃取物用乙酸乙酯洗涤。用浓盐酸将水萃取物酸化至pH 2。分离出黄色油。混合物用2000mL乙酸乙酯萃取两次。有机相用1000mL盐水洗涤四次，并在Buchi R220旋转蒸发器上物蒸发，采用的热浴温度为45℃。向剩下的残留物中加入4000mL甲苯。将混合物加热至110℃。蒸馏出1L甲苯。剩余的部分被冷却到室温，并放置48小时，在此期间，纯的2-甲氧基仲康酸结晶。收集结晶物质，过滤并在真空炉中于45℃真空干燥至恒重。

[0109] 产量：220g(49%)。顺式/反式比：46/54。

[0110] 第2步：顺式和反式外消旋甲氧基仲康酸转换为全反式-2-甲氧基仲康酸：

[0111] 向1729mL浓硫酸和2570mL水的混合物加入1020g甲氧基仲康酸。使该混合物在室温下搅拌18小时。得到33:64的顺式/反式比例。然后将该混合物加热到60℃，持续2.5小时。得到顺式/反式比例为11:89(通过HPLC分析)。然后让该混合物冷却到室温，随后进行过滤。

将固体物质重新溶解在乙酸乙酯中，用水和盐水清洗。有机层在$MgSO_4$上干燥并蒸发。观察到顺式/反式比率为6:94。从热甲苯中重结晶固体物质。得到的结晶物质在真空中于40℃下干燥48小时。产量：855g(84％)。顺式/反式比：8/92。熔点：132-133℃。H-NMR(CDCl3，300MHz)：2.9(2H,d)，3.4(1H,m)，3.83(3H,s)，5.85(1H,d)，6.8-7.4(4H,m)

[0112] 第3步：外消旋甲氧基仲康酸的酯化：

[0113] 将193g甲氧基仲康酸溶解在600mL四氢呋喃中。向该混合物中加入145gCDI(899mmol，1.1当量)，并将该混合物搅拌10分钟。加入量为65mL的无水乙醇(或甲醇以制成甲酯)，并将混合物搅拌至完全溶解(～120分钟)。用乙酸乙酯和饱和碳酸氢钠萃取粗反应混合物。有机相用0.5N HCl和盐水洗涤。蒸发后，得到了量为188g所需的乙酯。

[0114] 第4步：外消旋的甲氧基仲康酸，乙酯的还原：

[0115] 外消旋乳醇的制备：在5℃下，向700mL甲苯中的105g乙酯(397mmol)中加入3当量的DIBAL-H(1.19mol，1.19L 1M溶液)。混合物在室温下搅拌60分钟，用甲醇淬灭。加入乙酸乙酯(2.5L)和水(700mL)。相分离后，水相再次用EtOAc萃取。然后用盐水洗涤有机层，过滤并蒸发。油状残留物从氯仿/己烷中重结晶。将固体过滤并真空干燥。产量：53g(237mmol，59％)。

[0116] 第5步：采用外消旋乳醇的Wittig反应-合成外消旋二醇：

[0117] 将191g羧丙基三苯基溴化鏻、1000mL无水甲苯和100g丁醇钾在80℃下混合30分钟。混合物冷却到室温。慢慢加入预先溶解在180mL无水THF中的25g纯外消旋乳醇(114.5mmol)。继续反应60分钟。将粗反应混合物倒入1500mL冰水中，加入300mL乙酸乙酯。水相用300mL乙酸乙酯重新萃取。然后用2N HCl酸化水相，用300mL乙酸乙酯萃取3次。过滤掉已形成的固体。蒸发掉有机相。向蒸发后的残余物中加入500mL二乙醚。搅拌烧瓶10分钟，并过滤掉固体。滤液用饱和碳酸氢钠溶液萃取3次。然后用2M HCl将水相酸化至pH4。然后用200mL乙酸乙酯萃取水相3次。合并有机相，在$MgSO_4$上干燥并蒸发，得到45g的材料。

[0118] 柱色谱法：

[0119] 外消旋二醇在硅胶(柱长35cm，直径4cm)上纯化。将外消旋二醇溶解在最低限度的乙酸乙酯中，并应用于该柱。将1L乙酸乙酯(60％)/己烷(40％)加入容量瓶中。从瓶中取出300mL的EtOAc/己烷并加入到柱中。用乙酸乙酯将瓶中剩余的700mLEtOAc/己烷稀释至1升。然后将300mL新的EtOAc/己烷溶液加入到柱中，使其通过柱。再次用乙酸乙酯将瓶中剩余的700mLEtOAc/己烷稀释至1L。然后将300mL新的EtOAc/己烷溶液加入到柱中，使其通过柱。再一次用乙酸乙酯将瓶中剩余的700L tOAc/己烷稀释至1L。然后将300mL新的EtOAc/己烷溶液加入到柱中，使其通过柱。收集外消旋二醇的纯馏分并蒸发，得到26g纯外消旋二醇。产量：26g(88.3mmol，79％)。

[0120] 第6步：将外消旋二醇转化为外消旋丙酮化物：

[0121] 将26g(88mmol)纯化的二醇与260mL二甲氧基丙烷和26mg p-TsOH混合。使该混合物在环境温度下搅拌过夜。加入三滴三乙胺，并将混合物蒸发。向剩余的残余物加入150mL己烷，并将混合物搅拌过夜。过滤掉固体并干燥，得到25g(75mmol)的外消旋丙酮化物。产量：85％。

[0122] 第7步：外消旋丙酮化物的去甲基化：

[0123] 通过将16.7g乙硫醇加入21.5gNaH在375mL DMPU中的混合物，而制备氢化钠和乙

硫醇的悬浮液。将该悬浮液加热至80℃，并使其冷却至环境温度。将15g外消旋丙酮化物溶解在75mL DMPU中，并加入到EtSH/NaH的悬浮液中。该混合物在130℃下加热2小时。然后将反应混合物倒入冰水中，用DCM萃取。水层用2N盐酸酸化，用乙酸乙酯萃取。有机层用盐水洗涤并蒸发至干。产量:16.5g(粗品)。

[0124] 第8步:外消旋的最终化合物的制备:

[0125] 将28mmol去甲基化的消旋丙酮化物与15mL 2-氯苯甲醛、0.5g p-TSOH和60mL甲苯混合。混合物搅拌24小时并蒸发。采用Biotage Horizon®色谱仪，使用硅胶色谱法对粗反应混合物进行纯化。混合物用DCM(19)/甲醇(1)纯化，蒸发后得到6.5g固体。产量:6.5g(16.7mmol,59%)

[0126] 手性色谱法

[0127] 步骤8的产品的每个对映体，即化合物(Z)-6-((2S,4S,5R)-2-(2-氯苯基)-4-(2-羟基苯基)-1,3-二氧杂己环-5-基)己-4-烯酸(对映体1)和(Z)-6-((2R,4R,5S)-2-(2-氯苯基)-4-(2-羟基苯基)-1,3-二氧杂己环-5-基)己-4-烯酸(对映体2，根据以下手性柱的洗脱)，在以下条件下通过手性色谱法分离:

[0128] 柱:250x4.6 mm Chiralpak AD-H 5mm

[0129] 流动相:80/20/0.1正庚烷/乙醇/三氟乙酸

[0130] 流速:1mL/分钟

[0131] 检测:在230nm的紫外光

[0132] 温度:25℃

[0133] 将样品溶解在80/20正庚烷/乙醇中。对映体1在手性柱上首先洗脱，对映体2在手性柱上第二洗脱。

[0134] 转换为盐

[0135] 在室温下，将上述获得的对映体纯(对映体1)酸(452.23mg,1.12mmol)溶于IPA(2mL)。将溶液加热到50℃并加入叔丁胺。1小时后沉淀出结晶物质。将IPA的体积增加到23mL，通过加热使所述物质重新溶解，并在48小时内冷却到室温。得到了白色的结晶物质，产率为34%。对这种物质的表征确定其是IPA溶剂化物，化学纯度为95.4%。衍射仪显示该化合物的叔丁基铵盐作为IPA溶剂化物形成。

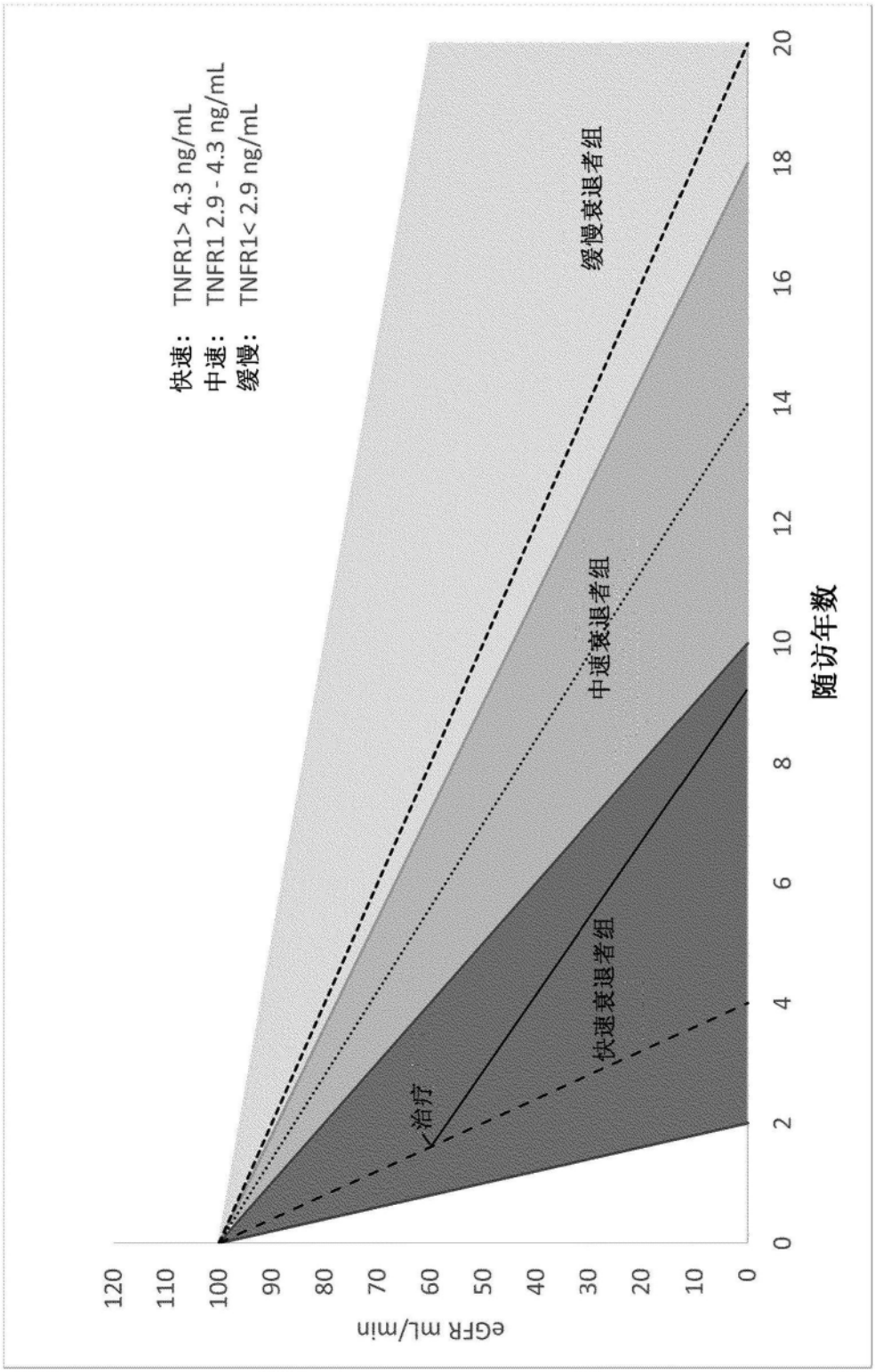

快速： TNFR1> 4.3 ng/mL
中速： TNFR1 2.9 - 4.3 ng/mL
缓慢： TNFR1< 2.9 ng/mL
缓慢衰退者组
中速衰退者组
快速衰退者组
治疗
eGFR mL/min
随访年数
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20

图1

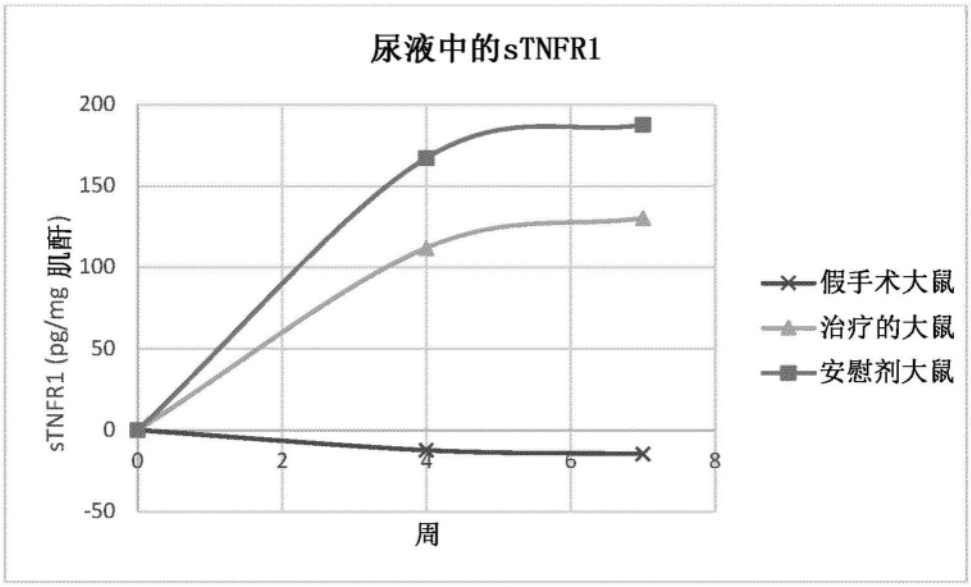

尿液中的sTNFR1
200
150
100
50
0
-50
sTNFR1 (pg/mg 肌酐)
0
2
4
6
8
周
假手术大鼠
治疗的大鼠
安慰剂大鼠

图2

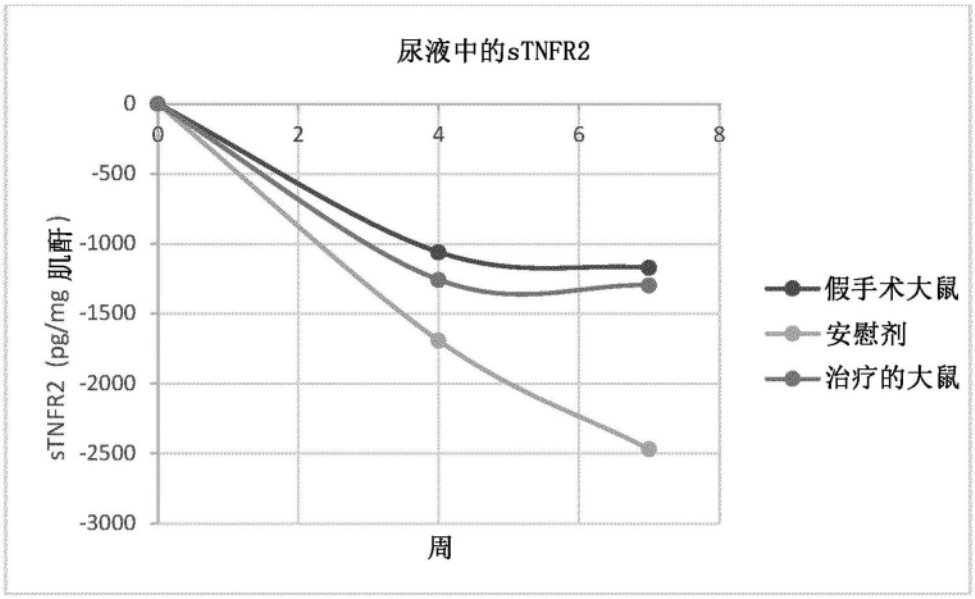

尿液中的sTNFR2
0
-500
-1000
-1500
-2000
-2500
-3000
sTNFR2 (pg/mg 肌酐)
0
2
4
6
8
周
假手术大鼠
安慰剂
治疗的大鼠

图3

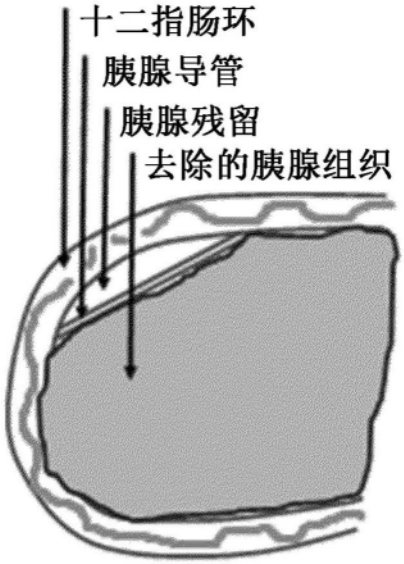


图4