

심혈관계 질환 치료제 후보물질 발굴을 위한 Soluble Epoxide Hydrolase 억제평가 방법 개발

이관호 · 김봉희 · 김상겸[#]

충남대학교 약학대학

(Received December 16, 2011; Revised December 20, 2011; Accepted December 21, 2011)

Development of Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor Screening Methods for Discovery of Drug Candidate in Cardiovascular Diseases

Gwan Ho Lee, Bong Hee Kim and Sang Kyum Kim[#]

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract — Soluble epoxide hydrolase (sEH) is a metabolic regulator of epoxyeicosatrienoic acids (EETs). EETs have many beneficial effects, vasodilation, anti-diabetes, anti-inflammation, cardiovascular protection, renal protection. Therefore, selective sEH inhibitors have a potential for treating these diseases. In the present study, screening methods for sEH inhibitors using PHOME ((3-phenyl-oxiranyl)-acetic acid cyano-(6-methoxynaphthalen-2-yl)-methyl ester) and 14,15-EET as substrates were established. To determine selectivity, microsomal epoxide hydrolase (mEH) inhibition assay was also developed using styrene oxide as a substrate of microsomal epoxide hydrolase. Our results obtained from 12-[[tricyclo[3.3.1.1.3,7]dec-1-ylamino]carbonyl]amino]-dodecanoic acid (AUDA) used as a positive sEH inhibitor and valpromide used as a positive mEH inhibitor showed that these methods are useful for discovery of drug candidates.

Keywords □ soluble epoxide hydrolase, 14,15-epoxyeicosatrienoic acid, cardiovascular disease, soluble epoxide hydrolase inhibitor, microsomal epoxide hydrolase

심혈관계 질환은 심장질환과 뇌혈관을 포함한 기타 혈관질환을 모두 일컫는 매우 광범한 질환이다. 심장질환의 종류에는 동맥경화 진행에 의한 허혈성 심장질환(심근경색, 협심증 등)을 대표로 하여 고혈압, 심부전, 부정맥, 심근증, 심내막염 등이 있으며 혈관질환에는 뇌졸중(중풍)과 말초혈관질환 등이 있다. 2007년 세계보건기구(WHO)의 통계에 따르면 전 세계적으로 매년 심혈관계질환으로 1,700만명 이상이 사망하고 있으며 이는 30%의 사망률로 나타나 세계 1위의 사망요인을 차지하고 있다. 우리나라의 경우 지난 30년 간 심혈관계질환의 발병률 및 유병률이 매우 가파른 상승곡선을 그리는 것으로 조사되었다. 식생활의 서구화, 운동 부족 및 인구의 고령화 등의 문제를 고려 할 때 심혈관질환은 계속 증가할 것으로 예상되고 있다.^{1,2)}

따라서 부작용 없는 또는 적은 심혈관계 질환에 대한 새로운 치료제 개발이 요구되고 있는 실정이다. Eicosatrienoic acids

(EETs)는 arachidonic acid가 cytochrome P450 경로의 epoxygenase에 의해 생성되는 정보전달 물질로써, 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET, 14,15-EET의 4가지 구조 이성질체가 존재하며, 이들 EETs는 혈관확장(vasodilation), 항염증(anti-inflammation), 혈소판 응집억제(anti-platelet aggregation)의 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.³⁾ 인체내에는 11,12-EET와 14,15-EET가 가장 높은 농도로 존재하며, 특히 14,15-EET는 혈관확장과 심근보호와 연관이 있다고 알려져 있다. 지난 10년간 EET의 구조와 구조 이성질체의 작용에 대해 규명하기 위해 EET 유사체와 길항제(antagonist)가 합성되었고, 연구결과 EET는 혈관확장, 항고혈압, 항염증 효과가 있음이 증명되었다.^{4,5)}

인간의 내피세포에서는 cytochrome P450 2C8, 2C9, 2J2, 3A와 2B1 모두 EETs를 생산하고, 생산된 EETs는 인간의 관상동맥을 확장시키는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ Arachidonic acid가 EET로 대사되는 과정에 가장 크게 작용하는 효소는 CYP 2C8과 2J2이며, 이들 효소는 인간의 여러 조직에 분포하고 있다. CYP2C8은 간의 hepatocyte에 가장 많이 존재하고, CYP2J2는 심장, 신장과 위장에 존재하며 EET 생산에 관여한다.⁷⁾

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-821-5930 (팩스) 042-823-6566
(E-mail) sangkim@cnu.ac.kr

Soluble epoxide hydrolase(sEH)는 EET를 대사하는 효소로서 EET는 sEH에 의해 빠르게 dihydroxyeicosatrienoic acids (DHETs)로 대사되어 불활성화 된다. 최근 10년간의 수많은 연구들을 통해 EET와 sEH 효소의 생물학적 효과는 심혈관계 질환에 대한 치료 목표가 되어왔다. 많은 동물실험을 통해 sEH 억제제의 심혈관계 질환 및 염증에 효과가 있음이 보고되었고 그 가능성이 입증되었다. 설치류를 이용한 실험을 통해 sEH 억제제는 항염증, 항고혈압 효과와 더불어 뇌혈관을 보호하고 신장의 손상을 방지함을 밝혀졌다. 비록 많은 연구가 진행되고 있으나 최근까지의 억제제로 개발된 물질들은 약동학적으로 좋은 속성을 보여주지 못하고 있다. 그 예로 12-[[tricyclo[3.3.1.1.3,7]dec-1-ylamino]carbonyl]amino]-dodecanoic acid (AUDA)는 최적으로 제조되었다고 가정할 때 경구 투여시 단지 30%의 흡수율을 보였으며 이로 인해 경구투여시 더 흡수율이 높고 더 안정한 sEH 억제제의 개발이 요구되고 있다.⁸⁾ 심혈관계 질환에 있어 앞으로의 sEH 억제제 연구는 긍정적으로 평가되고 있다.^{9,10)}

sEH 억제효과를 평가하는 빠른 선별방법을 구축하여 대량의 물질들을 검사하는 방법이 요구된다. 2006년 sEH의 인위적으로 만든 형광기질을 이용하여 sEH 억제효과를 평가하는 분석방법이 구축되었다.⁸⁾ 이 방법은 인위적으로 만든 형광기질을 이용하여 한번에 대량의 시료를 평가할 수 있다는 장점이 있으나 실질적인 기질인 EET에 비해 생리적인 상관성이 낮다는 단점이 있어 보완이 필요하다. 또한 sEH 억제제가 약물로 개발되기 위해서는 외인성물질을 대사하는 microsomal epoxide hydrolase (mEH)를 저해하는지를 평가하는 방법의 구축이 필요하다. mEH를 저해는 폐기종, 유산, 여러 종류의 암의 유발과 연관 가능성이 있다는 연구결과가 있기 때문이다.¹¹⁾ 그러므로 선별된 sEH 억제제로 물질이 mEH를 저해하지 않아야 한다. 본 연구의 목적은 sEH 억제효과를 평가하기 위하여 형광인 PHOME 외에 EET를 이용한 방법을 구축하고 sEH에 대한 선택성을 확인하기 위해 mEH에 대한 억제효과와 평가방법을 확립하는 것이다.

실험방법

시약 및 기기

PHOME(3-phenyl-cyano(6-methoxy-2-naphthalenyl)methyl ester-2-oxiraneacetic acid), AUDA(12-[[tricyclo[3.3.1.1.3,7]dec-1-ylamino]carbonyl]amino]-dodecanoic acid), soluble epoxide hydrolase은 caymanchem에서 구입하였다. 6-methoxy-2-naphthaldehyde은 santacruz biotechnology에서 구입하였다. Bis-Tris는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. greiner 96well black plate는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 14,15-EET(14,15-epoxyeicosatrienoic acid), 14,15-DHET(14,15-dihydroxyeicosatrienoic acid), 9,10-DiHOME(Leukotoxin

diol(+/-)9(10)-dihydroxy-octadec-12-enoic Acid), soluble epoxide hydrolase는 caymanchem(Ann arbor, Michigan)에서 구입하였다. prodigy 5μ column(150×2 mm 5 micron)은 phenomenex (Torrance, California)에서 구입하였다. Human microsomes (150 pooled)은 BD gentest에서 구입하였다. styrene oxide, styrene glycol, felbamate, valpromide는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. Luna 5μ C18 column(150×4.60 mm 5 μm)은 phenomenex(Torrance, California)에서 구입하였다.

형광기질을 이용한 sEH 억제효과 평가는 tecan genios 96 plate reader(Männedorf, Switzerland)를 사용하였다. 실제기질을 이용한 sEH 억제효과 평가를 위해 triple quadrupole mass spectrometer가 장착된 AB sciex API3200(Foster, California) LC-MS/MS를 사용하였다. mEH 저해평가는 UV detector가 장착된 HPLC를 사용하였다.

형광기질을 이용한 sEH 억제효과 평가

sEH 억제평가를 위해 형광강도측정기를 이용하여 형광기질 (PHOME)의 형광강도를 측정하였다. 반응용액 총 부피가 200 μl 가 되도록 하여 Blank, 100% 활성군, 억제군 3군으로 실험하였다. 실험의 양성대조군은 AUDA를 사용하였고 용매로는 DMSO를 사용하였다. 음성대조군에는 buffer 190 μl, DMSO 5 μl, 기질 5 μl 순으로 넣었다. 100% 활성군은 buffer 185 μl, DMSO 5 μl, 효소 5 μl, 기질 5 μl 순으로 넣었다. 억제군은 buffer 185 μl, 억제물질 5 μl, 효소 5 μl, 기질 5 μl 순으로 넣었다. 반응온도는 30°C로 하고 3분 간격으로 1시간 동안 측정하였다. 형광과장은 excitation wavelength 320 nm, emission wavelength 465 nm로 하였다. 형광 gain값은 73, intergration time 20 μs, Number of flashes 3으로 설정하였다.

LC-MS/MS를 이용한 sEH 억제효과 평가

반응용액의 부피는 50 μl가 되도록 하고, sEH 효소의 농도는 0.1 μg/ml, 14,15-EET의 농도는 10 μM, 내부표준은 9,10-DiHOME을 사용하였다. 반응시간은 20분으로 하고 methanol 200 μl로 반응종결하였다.

LC(liquid chromatography)는 pump, autosampler, oven, degasser가 장착된 Shimadzu UFLC-XR(Kyoto, Japan)을 사용하였다. Column은 phenomenex prodigy C18(150×2 mm 5 micron)을 사용하였고, 이동상의 유속은 0.4 ml/min을 사용하였다. 컬럼 온도는 40°C로 일정하게 유지시켰다. 이동상 용매로 Acetonitrile과 3차 증류수를 사용하였고, 14,15-DHET의 분리를 위해 gradient 용매 조성으로 분리하였다. 시료는 각각 10 μl씩 주입하여 분석하였다.

분석을 위해 triple quadrupole mass spectrometer가 장착된 AB sciex API3200(Foster, California) LC-MS/MS(liquid

chromatography mass spectrometry)를 사용하였다. 이온화 장치로는 ESI(electrospray ionization)장치를 사용했으며, MS parameter들을 최적화 한 후 MRM(multiple reaction monitoring)으로 분석하였다. 자료분석을 위해 ABSciex사의 Analyst 1.5.1을 사용하였다.

UV-HPLC를 이용한 mEH 저해효과 평가

반응용액은 부피는 50 μ l가 되도록 하고, microsomes은 0.2 mg/ml, styrene oxide 농도는 25 μ M, 내부표준 felbamate는 210 μ M, valpromide는 20 μ M을 사용하였다. 10분 반응 후 methanol 200 μ l로 반응중결하였다. 실험군은 음성대조군, 100% 활성군, 억제군으로 나누어 실험하였다. 이동상 조성은 methanol : H₂O=40% : 60%로 하였고, 유속은 1.5 ml/min, column 온도는 30°C로 하였다. UV 흡광은 208 nm로 하였다.

결과 및 고찰

형광기질을 이용한 실험에서의 sEH 효소의 시간/농도의존성 sEH 효소의 억제효과를 평가하기 위해서 먼저 실험의 조건을

설정하기 위한 선행실험을 수행해야했다. 먼저 sEH 효소의 시간과 농도의존성을 알아보는 실험을 수행하였다. 시간의존성을 알아보는 실험은 15, 30, 45와 60분을 설정하여 실험을 수행하였고, sEH의 농도는 3 nM을 사용하였으며 PHOME의 농도는 25 μ M을 사용하였다. 농도의존성을 평가하는 실험은 0, 0.5, 1, 3, 6과 9 nM로 실험을 수행하였고, 시간은 60분으로 하였다. 실험결과 설정한 농도와 시간에서 직선성을 나타내었다(Fig. 1A, B). 억제효과를 평가하는 실험조건을 sEH 효소 3 nM, 시간은 15분에서 60분 사이로 설정하였다.

형광기질 PHOME의 Km값

인공적으로 만들어진 형광기질(PHOME)에 대한 sEH 효소의 기질친화도를 알아보는 실험을 수행하였다. PHOME의 농도는 0.1875, 0.375, 0.75, 1.5, 3, 6과 12 μ M으로 하여 실험을 수행하였다. sEH 효소의 농도는 3 nM로 하였다.

실험결과 PHOME의 Km값은 1.508 μ M(95% 신뢰구간 : 1.253-1.762)의 결과를 산출하였다(Fig. 1C). 기준에 발표된 PHOME의 Km값은 272 μ M로 많은 차이를 보였다.⁸⁾ 그러나 PHOME을 독점 판매하는 caymanchem(Ann arbor, Michigan)의

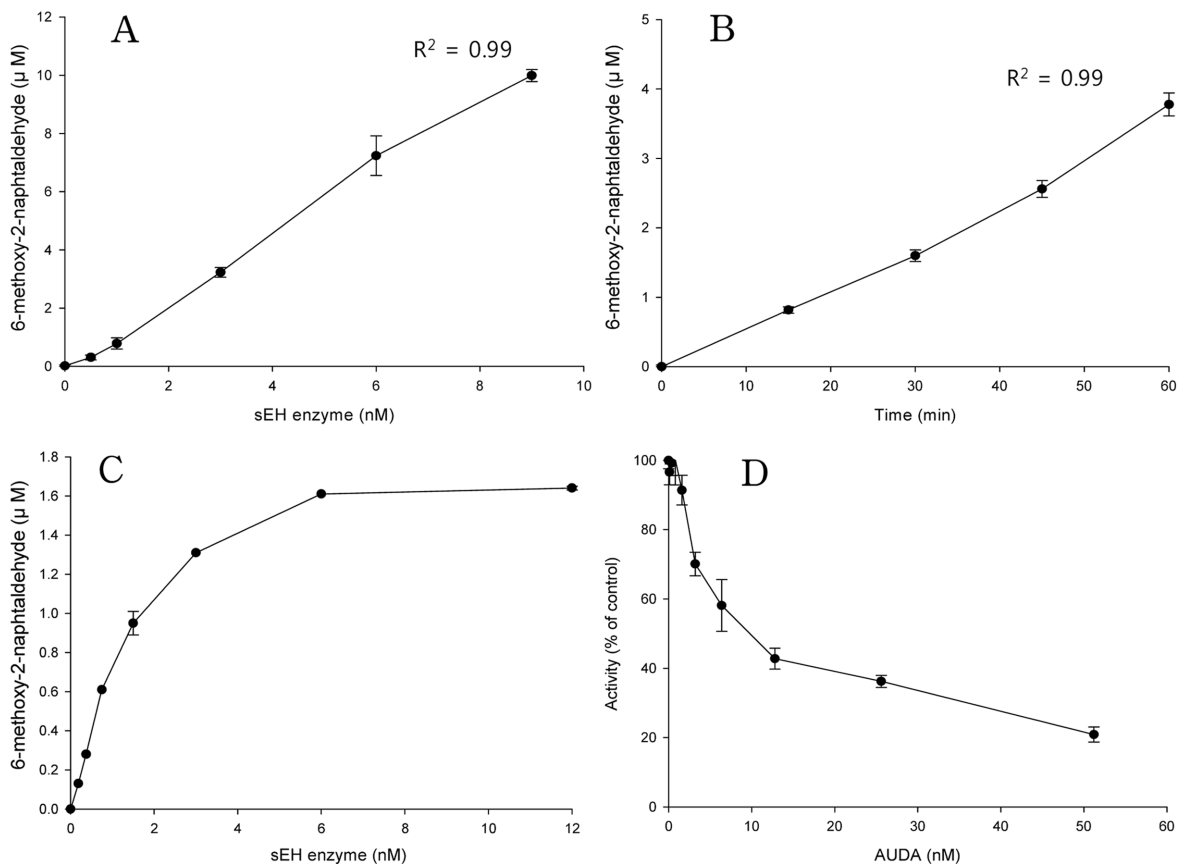


Fig. 1 – sEH inhibition assay using PHOME, an artificial fluorescent substrate. (A) sEH concentration dependency, (B) Incubation time dependency, (C) Km value of PHOME and (D) IC₅₀ of AUDA. The values represent the mean \pm SD for triplicate experiments.

soluble epoxide hydrolase inhibitor screening assay kit의 kit booklet에 언급된 PHOME의 Km값은 1.5 μM로 실험결과와 유사한 값을 보였다.¹²⁾

형광기질을 이용한 실험에서의 AUDA의 IC₅₀값

선행실험에서 획득한 조건으로 억제효과를 평가하는 실험을 수행하였다. sEH 억제제로 잘 알려진 양성대조군 AUDA를 이용하여 IC₅₀값을 구하는 실험을 하였다. PHOME의 농도는 PHOME의 Km값 부근인 1 μM, sEH의 농도는 3 nM로 실험을 수행하였다. AUDA의 농도는 0.0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8, 25.6, 51.2 nM로 실험을 수행하였다. 실험결과 AUDA의 IC₅₀값은 10.48 nM(95% 신뢰구간: 8.186-13.41)의 결과를 산출하였다(Fig. 1D). 위 결과는 기존의 sEH 효소농도를 1 nM로 했을 때의 AUDA IC₅₀값인 3 nM의 결과와 비교적 일치되는 결과였다.¹³⁾ 위의 방법으로 형광기질을 이용하여 sEH 효소의 억제효과를 빠르고 대량으로 평가하는 방법을 구축하였다. 그러나 형광기질을 이용한 sEH효소 억제효과 평가방법은 형광이 높거나 형광소광(fluorescence quenching) 효과가 있는 시료에 대해서는 억제효과를 정확하게 평가할 수 없다는 단점도 도출되었다.

형광이 높거나 형광소광이 있는 물질에 대해서는 결과에 오류가 발생할 수 있으며 정확하고 정교한 방법은 아닐 수도 있다고 판단된다.

실제기질을 이용한 실험에서의 sEH 효소의 시간/농도의존성

실제기질에서 sEH 효소의 억제효과를 평가하기 위해 sEH 효소의 시간과 농도의존성 실험을 수행하였다. 시간의존성을 알아보는 실험은 0, 10, 20, 30분으로 실험을 수행하였고, sEH의 농도는 0.1 μg/ml을 사용하였다. 농도의존성을 평가하는 실험은 0, 0.05, 0.1, 0.2 μg/ml로 실험을 수행하였고, 시간은 20분으로 하였다. 실험결과 설정한 농도와 시간에서 직선성을 나타내었고, 20분의 시간과 0.1 μg/ml의 효소농도 조건에서 실험계를 설정하였다(Fig. 2A, B).

실제기질 14,15-EET의 Km값

실제기질인 14,15-EET의 기질친화도를 구하는 실험을 수행하였다. 14,15-EET의 농도는 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 150 μM로 실험을 수행하였다. 반응시간은 20분, sEH의 농도는 0.1 μg/ml로 실험을 수행하였다. 실험결과 14,15-EET의 Km값은

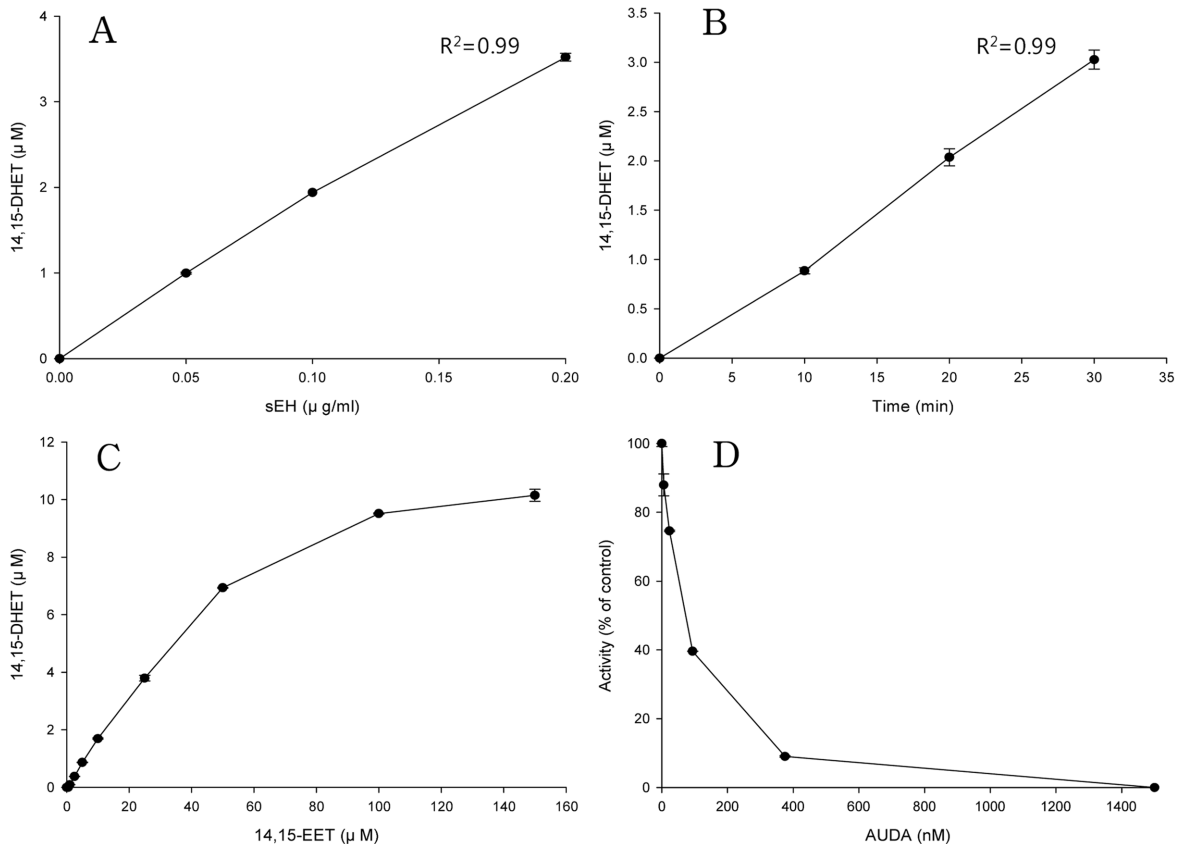


Fig. 2 – sEH inhibition assay using 14,15-EET. (A) sEH concentration dependency, (B) Incubation time dependency, (C) Km value of 14,15-EET and (D) IC₅₀ of AUDA. The values represent the mean ± SD for triplicate experiments.

67.87 μM (95% 신뢰구간: 46.44-89.29)의 결과를 얻었다(Fig. 2C). Human sEH 효소로 14,15-EET의 기질 친화도를 알아보는 실험은 처음 수행한 실험으로 기존의 결과와 비교할 수 없었다.

실제기질을 이용한 실험에서의 AUDA의 IC_{50} 값

선행실험에서 획득한 조건으로 억제효과를 평가하는 실험을 수행하였다. sEH의 억제제로 알려진 AUDA의 IC_{50} 값을 구하는 실험을 수행하였다. AUDA의 농도는 0, 5.8, 23.4, 93.7, 375 nM로 실험을 수행하였다. 반응시간은 20분, sEH의 농도는 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 실험을 수행하였다. 실험결과 AUDA의 IC_{50} 값은 59.27 nM (95% 신뢰구간: 42.14-83.36)의 결과를 얻었다(Fig. 2D). Human sEH 효소를 이용하여 IC_{50} 값을 구한 실험은 처음 수행한 실험으로 기존의 실험결과와 비교할 수 없었다. 형광기질을 이용한 빠르고 대량의 sEH 억제제 발굴방법에 대한 정확한 정보를 제공할 수 있는 sEH 억제제 평가방법을 구축하였다. 실제기질인 14,15-EET의 대사체인 14,15-DHET는 형광이나 흡광을 나타내지 않아 LC-MS/MS를 이용한 평가방법이 이상적이다. 실제기질을 이용하여 구축된 방법은 sEH 억제효과에 대한 정확한 정보를 제공하는 방법으로 판단된다.

mEH 효소의 시간/농도의존성

mEH를 저해하는지를 평가하기 위한 실험을 하기위한 조건을 설정하기 위해 mEH 효소의 시간과 농도의존성 실험을 수행하였다. 시간의존성을 알아보는 실험은 5, 10, 15분으로 실험을 수행하였고, microsomes의 농도는 0.2 mg/mL을 사용하였다. 농도의존성을 평가하는 실험은 0.1, 0.2, 0.4 mg/mL로 실험을 수행하였고, 시간은 10분으로 하였다.

실험결과 설정값에서 시간과 농도 모두 직선성을 나타내었고, 10분의 시간과 0.2 mg/mL의 효소농도조건에서 실험계를 설정하였다(Fig. 3A, B).

Styrene oxide의 K_m 값

mEH의 잘 알려진 기질인 styrene oxide에 대한 mEH 효소의 기질친화도를 알아보는 실험을 수행하였다. Styrene oxide의 농도는 4.11, 12.34, 37.04, 111.11, 333.33, 1000 μM 로 실험을 수행하였다. 반응시간은 10분, microsome의 농도는 0.2 mg/mL로 실험을 수행하였다. 실험결과 styrene oxide의 K_m 값은 50.53 μM (95% confidence interval: 13.04-88.02)의 결과를 얻었다(Fig. 3C). Styrene oxide의 K_m 값은 기존의 결과(K_m 값: 40~140 μM)

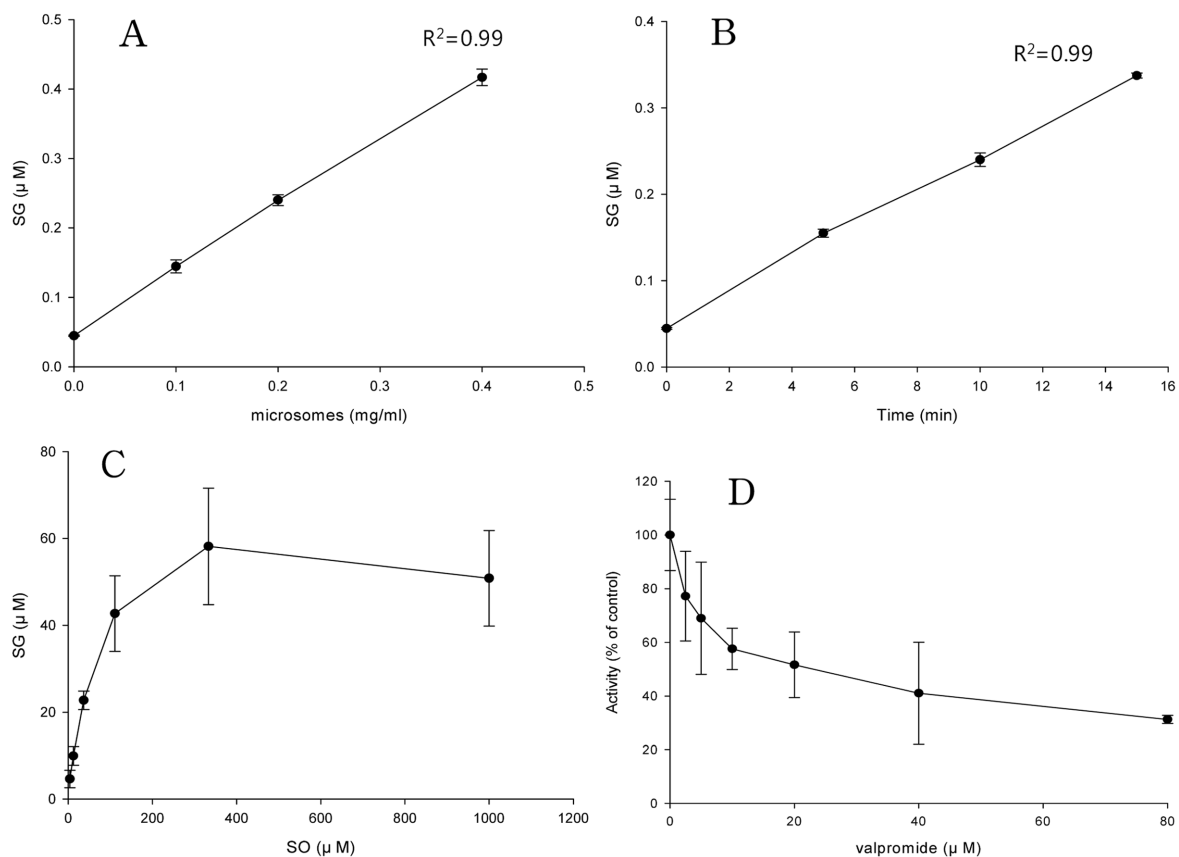


Fig. 3 – mEH inhibition assay using styrene glycol. (A) mEH concentration dependency, (B) Incubation time dependency, (C) K_m value of styrene glycol and (D) IC_{50} of valpromide. The values represent the mean \pm SD for triplicate experiments.

와 유사한 값이었다.¹⁴⁾

Valpromide의 IC₅₀값

선행실험에서 획득한 조건으로 mEH 효소의 억제효과를 평가하는 실험을 수행하였다. mEH 효소의 억제제로 알려진 valpromide로 mEH 효소의 IC₅₀값을 구하는 실험을 수행하였다. Valpromide의 농도는 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 μM로 실험을 수행하였다. 반응시간은 10분, microsome의 농도는 0.2 mg/ml로 실험을 수행하였다. 실험결과 valpromide의 IC₅₀값은 18.91 μM (95% 신뢰구간: 13.70-26.08)의 결과를 얻었다(Fig. 3D). Valpromide의 IC₅₀값은 기존의 valpromide의 IC₅₀값인 15.3 μM과 유사한 값이었다.¹⁵⁾ sEH 억제제는 외인성물질을 대사하는 mEH를 저해해서는 안된다. 본 실험으로 sEH 억제제가 mEH를 억제하는지에 대해 평가할 수 있는 방법을 구축하였다.

결 론

심혈관질환의 약물개발의 목표가 될 수 있는 sEH효소의 억제효과를 평가하는 방법을 구축하였다. 인위적으로 만든 sEH 효소의 형광기질인 PHOME을 이용해서 sEH의 억제효과를 평가하는 방법을 구축하였고, sEH 효소의 실제기질인 14,15-EET를 이용하여 LC-MS/MS로 평가하는 방법을 구축하였다. 형광기질을 이용하여 평가하는 방법은 빠르고 대량의 시료를 평가할 수 있다는 장점이 있으나 형광이 있거나 형광소광현상을 나타내는 시료에 대해서는 평가가 어려울 수 있다는 단점도 도출되었다. 반면 기존의 sEH 효소 억제방법인 형광기질을 이용한 평가방법이 아닌 처음으로 구축된 실제기질을 이용한 sEH 효소의 억제효과 평가방법은 정확하고 정교한 결과를 도출할 수 있었다. 마지막으로 sEH 억제제가 외인성물질을 대사하는 mEH를 저해하는지에 대해 평가하는 구축함으로써 심혈관계 질환 치료제의 후보물질인 sEH 억제제를 평가하고 독성을 평가하는 방법을 구축하였다. sEH 효소의 억제효과 평가방법을 구축함으로써, 천연물과 합성물에 대한 sEH 효소의 억제효과가 있는 물질을 발굴하고 *in vivo* 실험 등을 거쳐 약효를 평가하는 실험이 가능하게 되었다.

감사의 말

이 연구는 2010년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었습니다.

참고문헌

1) 생명공학정책연구센터 : 주요 질환별 기술개발 동향, 기술동향 2009-5 (2009).

- 2) Astrazeneca global : Astrazeneca Annual Report and Form 20-F Information 2006, 16 (2006).
- 3) Spiecker, M. and Liao, J. : Cytochrome P450 epoxygenase CYP2J2 and the risk of coronary artery disease. *Trends. Cardiovasc. Med.* **16**, 204 (2006).
- 4) Imig, J. D., Carpenter, M. A. and Shaw, S. : The soluble epoxide hydrolase inhibitor AR9281 decreases blood pressure, ameliorates renal injury and improves vascular function in hypertension. *Pharmaceuticals* **2**, 217 (2009).
- 5) Mustafa, S., Sharma, V. and McNeill, J. H. : Insulin resistance and endothelial dysfunction: Are epoxyeicosatrienoic acids the link? *Exp. Clin. Cardiol.* **14**, 41 (2009).
- 6) Roman, R. J. : P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.* **82**, 131 (2001).
- 7) Enayetallah, A. E., French, R. A. and Grant, D. F. : Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms. *J. Mol. Histol.* **37**, 133 (2006).
- 8) Wolf, N. M., Morisseau, C., Jones, P. D., Hock, B. and Hammock, B. D. : Development of a high-throughput screen for soluble epoxide hydrolase inhibition. *Anal. Biochem.* **355**, 71 (2006).
- 9) Parrish, A. R., Chen, G., Burghardt, R. C., Watanabe, T., Morisseau, C. and Hammock, B. D. : Attenuation of cisplatin nephrotoxicity by inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Cell. Biol. Toxicol.* **25**, 217 (2009).
- 10) Xu, D., Li, N., He, Y., Timofeyev, V., Lu, L., Tsai, H. J., Kim, I. H., Tuteja, D., Mateo, R. K., Singapur, A., Davis, B. B., Low, R., Hammock, B. D. and Chiamvimonvat, N. : Prevention and reversal of cardiac hypertrophy by soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18733 (2006).
- 11) Morisseau, C., Newman, J. W., Dowdy, D. L., Goodrow, M. H. and Hammock, B. D. : Inhibition of Microsomal Epoxide Hydrolases by Ureas, Amides, and Amines. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 409 (2000).
- 12) Caymanchem (Ann arbor, Michigan) : Soluble epoxide hydrolase inhibitor screening assay kit booklet. <http://www.caymanchem.com/pdfs/10011671.pdf>.
- 13) Huang, S. X., Li, H. Y., Liu, J. Y., Morisseau, C., Hammock, B. D. and Long, Y. Q. : Incorporation of piperazino functionality into 1,3-disubstituted urea as the tertiary pharmacophore affording potent inhibitors of soluble epoxide hydrolase with improved pharmacokinetic properties. *J. Med. Chem.* **53**, 8376 (2010).
- 14) Pacifici, G. M., Franchi, M., Bencini, C. and Rane, A. : Valpromide inhibits human epoxide hydrolase. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **22**, 269 (1986)
- 15) Pisani, F., Haj-Yehia, A., Fazio, A., Artesi, C., Oteri, G., Perucca, E., Kroetz, D. L., Levy, R. H. and Bialer, M. : Carbamazepine-valnoctamide interaction in epileptic patients: *in vitro/in vivo* correlation. *Epilepsia.* **34**, 954 (1993).