



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108785677 A

(43)申请公布日 2018. 11. 13

(21)申请号 201810751621.1

A61P 37/02(2006.01)

(22)申请日 2018.07.10

A61P 5/14(2006.01)

(71)申请人 仙鹤生物科技(杭州)有限公司

A61P 1/16(2006.01)

地址 310000 浙江省杭州市滨江区滨安路
1180号1幢2号楼2层2001-2028室-382
(自主申报)

A61P 13/12(2006.01)

A23L 33/00(2016.01)

(72)发明人 汤慧芳

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 李进

(51)Int.Cl.

A61K 45/00(2006.01)

A61P 1/00(2006.01)

A61P 29/00(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制品、
防治炎性肠病的药物及保健品中的应用

(57)摘要

本发明涉及PDE9A抑制剂在制备提升Treg含
量的制品、防治炎性肠病的药物及保健品中的应
用,涉及医药领域。PDE9A抑制剂能改善炎性肠病
肠道的粘膜粘液分泌,降低TNF- α 、IL-6、IL-17
和IL-12/IL-23促炎因子分泌,抑制DC细胞分化
和迁移,提升Foxp3+Treg细胞比例,并促进CD4+
CD25+Treg细胞由脾脏和肠系膜淋巴结向结肠中
移动,从而抑制肠道炎症反应,控制疾病的发生
发展。PDE9A抑制剂应用于防治炎性肠病的药物
时,可以有效预防、缓解以及治疗炎性肠病,同时
包含其作为活性成分的保健品可以调理炎性肠
病的患者的肠道,控制炎性肠病的发生以及发
展。



1. PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制品中的应用,其特征在于,所述制品为药物、试剂或保健品。

2. PDE9A抑制剂在制备防治炎性肠病的药物中的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述PDE9A抑制剂选自PDE9A抑制剂BAY 73-6691、PDE9A抑制剂PF-04447943、PDE9A抑制剂PF-04449613及PDE9A抑制剂PF-418366中的至少一种。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述PDE9A抑制剂为PDE9A抑制剂PF-04447943。

5. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述炎性肠病包括溃疡性结肠炎和/或克罗恩病。

6. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述防治炎性肠病的药物的剂型包括注射液剂、口服液剂、灌肠液剂、胶囊剂、片剂、肠溶剂、粉剂或粒剂。

7. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述防治炎性肠病药物还包括药学领域常规的辅料,所述辅料包括吸收促进剂、表面活性剂、润滑剂、稳定剂、稀释剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸附载体、赋形剂、色素、甜味剂和香味剂中的至少一种。

8. PDE9A抑制剂在制备调理炎性肠病的保健品中的应用。

9. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述PDE9A抑制剂选自PDE9A抑制剂BAY 73-6691、PDE9A抑制剂PF-04447943、PDE9A抑制剂PF-04449613及PDE9A抑制剂PF-418366中的至少一种;

优选地,所述PDE9A抑制剂为PDE9A抑制剂PF-04447943。

10. 根据权利要求8所述的应用,其特征在于,所述炎性肠病包括溃疡性结肠炎和/或克罗恩病。

PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制品、防治炎性肠病的药物及保健品中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体而言,涉及PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制品、防治炎性肠病的药物及保健品中的应用。

背景技术

[0002] 调节性T细胞(Regulatory cell,简称Treg)是一类控制体内自身免疫反应性的T细胞亚群。

[0003] 炎性肠病(inflammatory bowel disease,IBD)主要包括溃疡性结肠炎和克罗恩病(Crohn's disease,CD),是一种可影响肠道所有部位的慢性特发性肠道炎性疾病。该病主要临床特征包括腹痛,腹泻,体重减轻,和直肠出血等,有些患者还可出现不同程度的全身症状。IBD的病因和发病机制尚未完全明确,目前普遍认为由多种因素导致的,包括遗传因素、免疫因素、感染因素等。现今的治疗IBD的药物主要有5-氨基水杨酸、肾上腺皮质激素、免疫抑制剂和生物制剂等。这些药物为许多患者提供治疗,但仍有超过35%患者无法用现有的药物进行治疗。目前应用最多的生物制剂是TNF- α 单抗制剂,包括英夫利昔单抗、阿达木单抗、赛妥珠单抗等,但有一部分患者对这些生物制剂表现为不敏感。其他的生物制剂包括整合素抗体等,其中 α 4 β 7整合素抗体维多珠单抗于2014年被FDA批准用于治疗中重度UC和CD,通过维多珠单抗的治疗患者出现明显的临床改善,但仍有29%的UC患者和37%的CD患者出现了不良反应。

[0004] 磷酸二酯酶(phosphodiesterase,PDEs)是降解细胞内环核苷酸的酶,比如环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP)等第二信使,PDE通过水解切割3'-磷酸酯键灭活环核苷酸,形成相应的无活性的单磷酸酯产物。磷酸二酯酶抑制剂(PDEI)选择性抑制PDEs使细胞内cAMP和以GMP水平升高导致蛋白激酶A/G(PKA/PKG)活化加强和蛋白磷酸化,从而抑制细胞内炎症反应。PDE超家族包含11个基因家族(PDE1至PDE11),其中每个家族包含1至4个不同的基因。在哺乳动物细胞中有超过20个基因,其编码出50多种蛋白,但各个家族在不同组织和细胞中占有比例不同。

[0005] PDE9AcDNA是于1998年发现并命名PDE家族的第九个成员。PDE9是cGMP特异性,并且与其他PDE不同,它不包含在N端区域中已知功能的蛋白质结构域;PDE域位于C端的蛋白质。PDE9由单个基因编码,定位于人染色体21q22.3,并分裂成延伸超过122kb的25个外显子。目前已经鉴定了28种剪接变体,最长的转录变体1(PDE9A1)翻译成蛋白质含有593个氨基酸。PDE9表达在物种间保守,并且PDE9同源物已经在灵长类动物,啮齿动物,鱼类中发现。例如,脊椎动物中的同源性很高,人PDE9A2与相应的小鼠同源,在氨基酸和核苷酸水平上分别为93%和83%。所有器官或多或少检测到PDE9mRNA;然而,PDE9A在造血细胞,脑,前列腺,结肠,小肠,脾,肾和胸腺中的信号最高。

[0006] 2003年,辉瑞公司(Pfizer)通过对小鼠进行基因敲除研究证实了PDE9A抑制剂可以起到治疗糖尿病的作用,并报到了第1个PDE9A抑制剂的先导化合物。但是这些化合物的

选择性较差。随后,2005年拜耳公司(Bayer)报道了第1个PDE9A选择性抑制剂BAY73-6691,对PDE9A的IC₅₀为0.088mM,对PDE1C和PDE11A的IC₅₀分别为1.4mM和2.6mM,对其他PDE的IC₅₀均大于4.0mM。迄今为止,有近20个研究PDE9A抑制剂用于治疗糖尿病、阿尔茨海默氏病、Huntington病等疾病潜在用途的报道,而且PDE9A也被认为是心衰的标志物,提示PDE9A的抑制剂有可能应用于心衰治疗。但到目前为止,国内外对于PDE9A在肠道的研究较少。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供PDE9A抑制剂在制备提升Treg(即调节性T细胞,Regulatory cell)含量的制剂中的应用,可应用于对自身免疫疾病的治疗,以及用于科研。

[0008] 本发明的目的在于提供PDE9A抑制剂在制备防治炎性肠病的药物中的应用,其可以有效预防、缓解以及治疗炎性肠病。

[0009] 本发明的另一目的在于提供PDE9A抑制剂在制备调理炎性肠病的保健品中的应用,以调理炎性肠病的患者的肠道,控制炎性肠病的发生以及发展。

[0010] 本发明解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。

[0011] 本发明提出一种PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制剂中的应用,制品为药物、试剂或保健品。

[0012] 本发明提出一种PDE9A抑制剂在制备防治炎性肠病的药物中的应用。

[0013] 本发明提出一种PDE9A抑制剂在制备调理炎性肠病的保健品中的应用。

[0014] 本发明实施例的有益效果是:

[0015] PDE9A抑制剂能改善炎性肠病肠道的粘膜粘液分泌,降低TNF- α 、IL-6、IL-17和IL-12/IL-23促炎因子分泌,增加SOD活性,降低MDA含量,降低DC细胞分化,提升Foxp3+Treg细胞比例,提升Foxp3+Treg细胞分化,并促进CD4+CD25+Treg细胞由脾脏和肠系膜淋巴结向结肠中移动,从而抑制免疫反应,控制疾病的发生发展。PDE9A抑制剂应用于防治炎性肠病的药物时,可以有效预防、缓解以及治疗炎性肠病,同时包含其作为活性成分的保健品可以调理炎性肠病的患者的肠道,控制炎性肠病的发生以及发展。

[0016] 同时,由于Treg与类风湿性关节炎、自身免疫性甲状腺炎,自身免疫性肝病、多种肾脏疾病等很多自身免疫性疾病的发病相关,因此,PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制品中的应用,对于其进行深入研究将有助于了解自身免疫性疾病的发病机制,对疾病预后判断、进一步的治疗有着深远的意义。

附图说明

[0017] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0018] 图1为各PDE9A抑制剂的具体结构、效价和选择性的示意图;

[0019] 图2为本发明实施例提供的DSS造模小鼠体重及结肠长度的对照图;

[0020] 图3为本发明实施例提供的DSS造模小鼠的结肠粘蛋白分泌的对照图;

[0021] 图4为本发明实施例提供的DSS造模小鼠的肠粘膜分泌的炎症因子的对照图;

[0022] 图5为本发明实施例提供的DSS造模小鼠结肠、肠系膜淋巴洁中DC总量及成熟DC的对照图；

[0023] 图6为本发明实施例提供的DSS造模小鼠肠系膜淋巴洁、脾脏及结肠中Treg数量的对照图。

[0024] 图7为本发明实施例提供的DSS造模小鼠结肠组织匀浆中SOD活性和MDA含量的对照图。

具体实施方式

[0025] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0026] 下面对本发明实施例的PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制品、防治炎性肠病的药物及保健品中的应用进行具体说明。

[0027] 本发明的目的在于提供PDE9A抑制剂在制备提升Treg (调节性T细胞, Regulatory cell) 含量的制剂的应用, 其中, 制品为药物、试剂或保健品, 药品以及保健品用于进行疾病, 例如炎性肠病的治疗及调理, 以及试剂用于科研。同时, Treg与类风湿性关节炎、自身免疫性甲状腺炎, 自身免疫性肝病、多种肾脏疾病等很多自身免疫性疾病的发病相关, 因此, PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制剂中的应用, 对于其进行深入研究将有助于了解自身免疫性疾病的发病机制, 对疾病预后判断、进一步的治疗有着深远的意义。同时PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制品中的应用, 可以在未来进一步的研究, 用于治疗与其相关的自身免疫性疾病。

[0028] PDE9抑制剂有多种, 可以直接购买, 也可以自行设计。其中, 较佳地, PDE9A (phosphodiesterase 9A) 抑制剂选自PDE9A抑制剂BAY 73-6691、PDE9A抑制剂PF-04447943、PDE9A抑制剂PF-04449613及PDE9A抑制剂PF-418366中的至少一种。例如PDE9A抑制剂为PDE9A抑制剂BAY 73-6691和PDE9A抑制剂PF-04447943的混合物、PDE9A抑制剂PF-04447943、PDE9A抑制剂PF-04449613及PDE9A抑制剂PF-418366的混合物、PDE9A抑制剂PF-04447943或PDE9A抑制剂PF-418366等, 其中, 各PDE9A抑制剂的具体结构、效价和选择性如图1所示。

[0029] 本发明提供PDE9A抑制剂在制备防治炎性肠病的药物中的应用, 此处的防治包括预防炎性肠病的发生、治疗炎性肠病以及减轻炎性肠病的症状 (即缓解症状), 也即是通过PDE9A抑制剂, 可有效预防、缓解以及治疗炎性肠病。

[0030] PDE9抑制剂有多种, 可以直接购买, 也可以自行设计。其中, 较佳地, PDE9A (phosphodiesterase 9A) 抑制剂选自PDE9A抑制剂BAY 73-6691、PDE9A抑制剂PF-04447943、PDE9A抑制剂PF-04449613及PDE9A抑制剂PF-418366中的至少一种。例如PDE9A抑制剂为PDE9A抑制剂BAY 73-6691和PDE9A抑制剂PF-04447943的混合物、PDE9A抑制剂PF-04447943、PDE9A抑制剂PF-04449613及PDE9A抑制剂PF-418366的混合物、PDE9A抑制剂PF-04447943或PDE9A抑制剂PF-418366等, 其中, 各PDE9A抑制剂的具体结构、效价和选择性如图1所示。

[0031] 本发明较佳的实施例中,PDE9抑制剂PF-04447943已经进入了临床研究,因此PDE9A抑制剂优选为PDE9A抑制剂PF-04447943。

[0032] 炎性肠病包括溃疡性结肠炎和/或克罗恩病,同时可以推导出,其还可以缓解其他的,例如溃疡性结肠炎和/或克罗恩病的并发症等。

[0033] 本发明较佳的实施例中,防治炎性肠病的药物的剂型包括注射液剂、口服液剂、灌肠液剂、胶囊剂、片剂、肠溶剂、粉剂或粒剂。优选为口服液剂、胶囊剂、片剂、肠溶剂、粉剂或粒剂,直接口服,服用方便。

[0034] 本发明较佳的实施例中,防治炎性肠病药物还包括药学领域常规的辅料,辅料包括吸收促进剂、表面活性剂、润滑剂、稳定剂、稀释剂、粘合剂、湿润剂、崩解剂、吸附载体、赋形剂、色素、甜味剂和香味剂中的至少一种,可采用现有的工艺以及设备制作不同的剂型。

[0035] 此外,本发明还提供PDE9A抑制剂在制备调理炎性肠病的保健品中的应用。

[0036] 其中,PDE9A (phosphodiesterase 9A) 抑制剂选自PDE9A抑制剂BAY 73-6691、PDE9A抑制剂PF-04447943、PDE9A抑制剂PF-04449613及PDE9A抑制剂PF-418366中的至少一种。例如PDE9A抑制剂为PDE9A抑制剂BAY 73-6691和PDE9A抑制剂PF-04447943的混合物、PDE9A抑制剂PF-04447943、PDE9A抑制剂PF-04449613及PDE9A抑制剂PF-418366的混合物、PDE9A抑制剂PF-04447943或PDE9A抑制剂PF-418366等,其中,各PDE9A抑制剂的具体结构、效价和选择性如图1所示。

[0037] 本发明较佳的实施例中,PDE9抑制剂PF-04447943已经进入了临床研究,因此PDE9A抑制剂优选为PDE9A抑制剂PF-04447943。

[0038] 承上述,需要说明的是,本发明所指的炎性肠病包括溃疡性结肠炎和/或克罗恩病。同时可以推导出,其还可以缓解其他的,例如溃疡性结肠炎和/或克罗恩病的并发症等。

[0039] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0040] 实施例1

[0041] 实验选择C57雌性小鼠,体重20g左右,用随机法将所有小鼠分成对照组(control组)、模型组(DSS组)、柳氮磺吡啶组(AS组)、低剂量组(PF3组)、中剂量组(PF10组)、高剂量组(PF30组),共6组,每组5只。

[0042] 对照组用去离子水,其余5组用3%DSS溶液喂养。

[0043] 期间,柳氮磺吡啶组每天灌胃,剂量是0.5g/kg,PF-04447943低剂量组、中剂量组、高剂量每天灌胃,剂量分别是3mg/kg、10mg/kg、30mg/kg,每天称取小鼠体质量、水瓶重量并做记录。第8天深度麻醉处死小鼠,留取小鼠结肠、肠系膜淋巴结、脾、肛门,量取结肠长度后将结肠平均分成三段。肛门部分标本放入福尔马林固定,其余标本放入-80℃冰冻保存。分离结肠、肠系膜淋巴结、脾的单个核细胞分别进行染色,流式细胞术测定DC细胞和Treg细胞在结肠、肠系膜淋巴结和脾脏的分布,ELISA测定这些组织里IL-6、IL-12、TNF- α 、IL-17等的含量,测定结肠组织中SOD活性和MDA含量,分析PDE9A抑制剂PF-04447943对小鼠模型的影响。

[0044] ①DSS诱导模型的体重及结肠长度试验

[0045] 图2为DSS造模小鼠体重及结肠长度的对照图,其中,图2(C)中* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs DSS model group。

[0046] 请参阅图2(A),可以看出,对照组小鼠的体重均在初始体重上下浮动,而其他5组

小鼠在经过7天分别使用DSS, AS 0.5g/kg, PF-04447943 3mg/kg、PF-04447943 10mg/kg及PF-04447943 30mg/kg后, 体重在第5天开始有显著的下降。在第7天处死前体重结果显示, PF-04447943 30mg/kg组的小鼠体重与模型组比较存在显著性差异, 具有一定改善作用。

[0047] 请参阅图2 (B以及C), 通过分析小鼠结肠长度, DSS造模型后, 小鼠结肠明显缩短, 与正常组比较有显著性差异, 同时DSS组和PF30组的结肠长度有显著性差异, 这说明PF-04447943对DSS模型小鼠结肠可能具有保护作用。

[0048] 综上, PDE9A抑制剂PF-04447943能抑制DSS诱导模型的体重下降及结肠缩短现象。

[0049] ②DSS诱导模型的肠粘膜粘蛋白分泌试验

[0050] 图3为DSS造模小鼠的结肠粘蛋白分泌的对照图, 由图3可得, DSS组相比于对照组上皮完整性丧失, 隐窝结构丧失, 杯状细胞的缺失, 免疫细胞浸润, 平滑肌细胞肥大和分泌性糖蛋白减少。而低剂量组、中剂量组和高剂量组的上皮完整性和隐窝结构的丧失, 杯状细胞的缺失, 免疫细胞浸润和平滑肌细胞肥大和分泌性糖蛋白减少的情况均逐渐被逆转, 而且随着PF-04447943的剂量升高对结肠上皮细胞的保护效果逐渐更好。同时, 柳氮磺吡啶组对结肠上皮的保护程度与PF-04447943中剂量组相似, 但不及PF-04447943高剂量组。

[0051] 承上, PF-04447943能显著抑制DSS诱导的肠粘膜粘蛋白分泌的破坏。

[0052] ③DSS诱导模型的肠粘膜分泌的炎症因子的试验

[0053] 图4为DSS造模小鼠的肠粘膜分泌的炎症因子的对照图, 其中, 图4 (A至D) 中, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs DSS model group。

[0054] 肠组织匀浆后, 采用ELISA试剂盒测定结肠组织中TNF- α 、IL-17、IL-6、IL-12/IL-23。

[0055] 请一并参阅图4 (A至D), 可得, DSS组中的TNF- α 、IL-17、IL-6、IL-12/IL-23均显著高于对照组, 用药组的TNF- α 、IL-17、IL-6、IL-12/IL-23含量相对于DSS组均有所降低, 而且高剂量组与DSS组相比均有统计学意义。PF-04447943对IL-6的抑制作用明显, 中剂量组和高剂量组的IL-6水平均显著低于DSS组。提示在DSS模型中, PF-04447943通过抑制促炎细胞因子, 抑制炎症的发生。同时由于这些细胞因子分别来源于TH1, TH2及TH17, 因此, 此结果也提示PF-04447943对TH1, TH2及TH17均有一定抑制作用。

[0056] 承上, 本实验说明PF-04447943能显著抑制DSS诱导的肠粘膜分泌的炎症因子。

[0057] ④DSS诱导模型的肠粘膜DC的活化试验

[0058] 将结肠用胶原酶消化, 肠系膜淋巴结采用研磨, 100目过筛, 分别制备成单细胞悬液, 调细胞密度为 $10^5/100\mu l$, 每个样品测定DC细胞含量。

[0059] 图5为DSS造模小鼠结肠、肠系膜淋巴结中DC总量及成熟DC的对照图。其中, 图5中, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs DSS model group。

[0060] 由图5 (A和C) 可得, 结肠 (colon) 中, 对照组总DC细胞多于DSS组, 但活化的DC (mDC) 细胞显著性低于DSS组, 同时低、中、高剂量组活化的DC细胞也显著性低于DSS组, 且随着剂量升高活化的DC细胞升高, 柳氮磺吡啶组活化的DC细胞高于中剂量组却低于高剂量组。

[0061] 根据图5 (B和D) 可得, 在肠系膜淋巴结 (MLN) 中, 总DC细胞DSS组显著高于对照组, 而低、中、高组均显著低于DSS组。提示药物处理能抑制DC的迁移。活化的DC细胞对照组显著低于DSS组, 且高、中、低剂量组均显著性低于DSS组。无论在结肠还是在肠系膜淋巴结中, 活化的DC细胞在低、中、高剂量组中均较DSS低且具有统计学意义, 柳氮磺吡啶组的实验结果

与低、中、高组相似。PF-04447943可以抑制DC细胞从结肠迁移到肠系膜淋巴结,及在结肠和肠系膜淋巴结的成熟。

[0062] ⑤DSS诱导模型的Treg的活化试验

[0063] 将结肠用胶原酶消化,肠系膜淋巴结、脾组织采用研磨,100目过筛,分别制备成单细胞悬液,调细胞密度为 $10^5/100\mu\text{l}$,每个样品测定Treg含量。

[0064] 相关的研究表明T细胞特别是Treg细胞对DSS炎性肠病模型的保护中发挥一定的作用,为了研究Treg在DSS结肠炎模型的作用,基于试验④分别评估了肠系膜淋巴结、脾脏和结肠中三个部位中Treg细胞亚型的分布,结果如图6所示。图6为DSS造模小鼠肠系膜淋巴结、脾脏及结肠中Treg数量的对照图,注:* $P<0.05$;** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs DSS model group。

[0065] 如图6(A、B以及C)所示,DSS组和对照组的CD4+Foxp3+的Treg细胞没有显著性差异,CD4+FOXP3+的Treg细胞在肠系膜淋巴结、脾脏和结肠中PF-04447943高剂量组显著高于DSS组和对照组。

[0066] 如图6(D、E以及F)所示,CD4+CD25+的Treg细胞在肠系膜淋巴结和脾脏中高中低剂量组显著低于对照组和DSS组,而结肠中却显著高于对照组的DSS组。而PF-04447943显著性诱导了CD4+Foxp3+的Treg细胞分化增加。CD4+CD25+Treg细胞主要是抑制免疫作用,通过口服PF-04447943使更多的CD4+CD25+Treg细胞由脾脏和肠系膜淋巴结向结肠中移动,发挥其免疫抑制作用。也即是,试验⑤表明PF-04447943能显著增强DSS抑制的Treg的活化,从而对DSS炎性肠病模型进行保护。

[0067] ⑦DSS诱导模型结肠组织的SOD活性和MDA含量试验

[0068] 图7为DSS造模小鼠的肠粘膜SOD活性和MDA含量的对照图,其中,图7(A至B)中,* $P<0.05$;** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs DSS modelgroup。

[0069] 肠组织匀浆后,采用SOD和MDA测定试剂盒测定结肠组织中SOD活性和MDA含量。

[0070] 参阅图7(A),可得,DSS组中的SOD活性显著下降,高剂量组的SOD活性相对于DSS组有所提升,与DSS组相比有统计学意义。PF-04447943增加结肠组织SOD活性作用明显。参阅图7(B),可得,DSS组中的MDA含量均显著高于对照组,用药组的MDA含量相对于DSS组均有所降低,而且高剂量组与DSS组相比均有统计学意义。PF-04447943对MDA的抑制作用明显,MDA含量均显著低于DSS组。提示在DSS模型中,PF-04447943具有较强的抗氧化功能,通过增强SOD活性,抑制MDA含量,抑制炎症的发生。因此,此结果也提示PF-04447943具有较强的抗氧化功能。

[0071] 承上,本实验说明PF-04447943能显著抑制DSS诱导的肠粘膜氧化应激损伤。

[0072] 综上所述,通过口服PF-04447943能改善DSS模型小鼠肠粘膜粘液分泌,降低TNF- α 、IL-6、IL-17和IL-12/IL-23促炎因子分泌,提高SOD活性,降低MDA含量,降低DC细胞分化,提升Foxp3+Treg细胞比例,并促进CD4+CD25+Treg细胞由脾脏和肠系膜淋巴结向结肠中移动,从而抑制免疫反应,控制疾病的发生发展。由上述结果可推断,PDE9A抑制剂能改善炎性肠病(IBD)的症状,可用于IBD的治疗,同时高剂量组的疗效与柳氮磺吡啶常规剂量组,在IL-6的分泌、SOD活性和MDA含量及DC的活化和Treg的调节方面优于常规药物柳氮磺吡啶。

[0073] 基于动物试验的结果可知,PDE9A抑制剂具有很好的防治炎性肠病的活性。因此,推断PDE9A抑制剂作为活性成分在防治炎性肠病的药物中时,该药物可以预防、缓解以及治

疗炎性肠病。

[0074] 由上述内容可以推断,PDE9A抑制剂势必可以应用于制备调理炎性肠病的保健品中,以调理炎性肠病的患者的肠道,控制炎性肠病的发生以及发展。

[0075] 综上所述,本发明实施例提供PDE9A抑制剂在制备防治炎性肠病的药物及调理炎性肠病的保健品中的应用,该药物可以有效预防、缓解以及治疗炎性肠病,同时该保健品可以调理炎性肠病的患者的肠道,控制炎性肠病的发生以及发展。同时,PDE9A抑制剂在制备提升Treg含量的制剂中的应用,可应用于对自身免疫疾病的治疗,以及用于科研。

[0076] 以上所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。本发明的实施例的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围,而是仅仅表示本发明的选定实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。


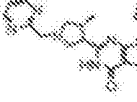


PDE9 inhibitor	Structure	PDE9 IC ₅₀ (K.)	Minimum selectivity factor	Reference
BAY 73-6691		55 nM	25-fold against PDE1C	Wunder et al. (2005)
PF-04447943		12 nM (2.8 nM)	78-fold against PDE1C (>1000-fold against PDE6)	Kleiman et al. (2012), Hutson et al. (2011)
PF-04449613		24 nM	33-fold against PDE1C	Kleiman et al. (2012)
PF-4181366		1.8 nM	30-fold against PDE1C	Verhoest et al. (2009)

图1

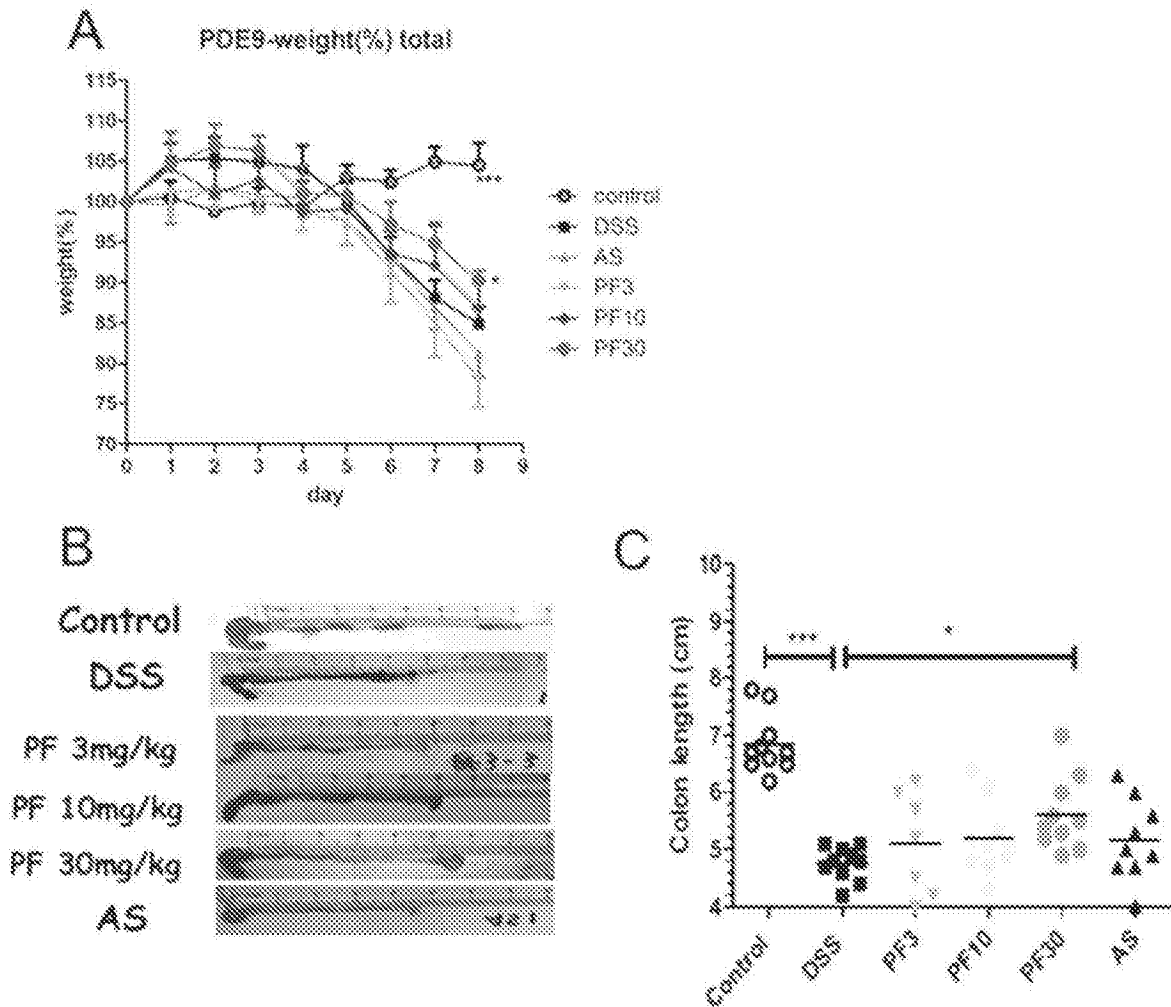


图2

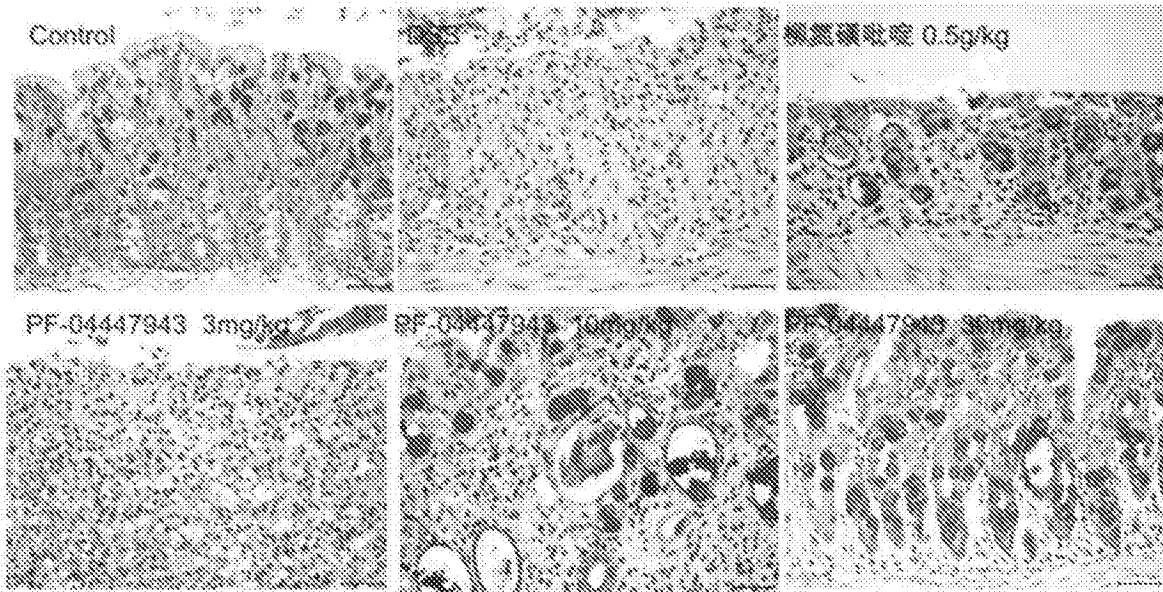


图3

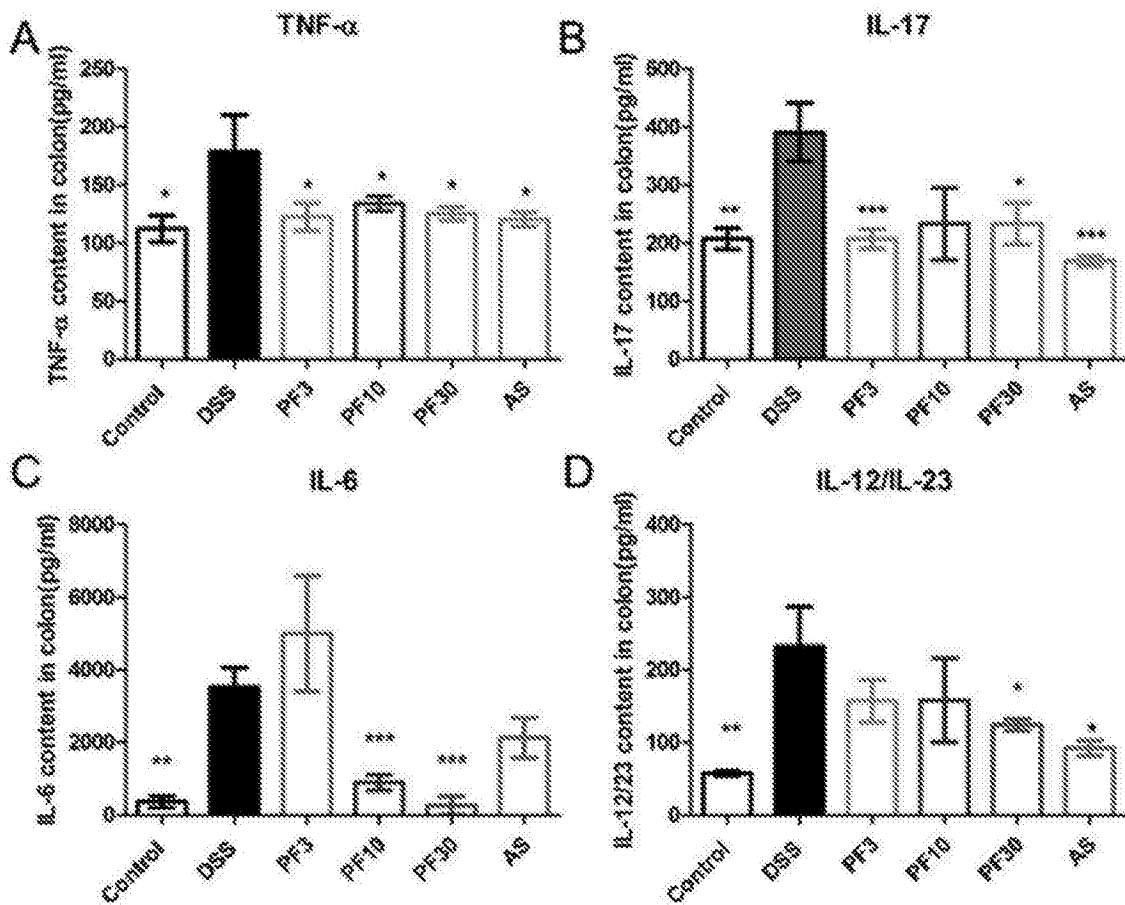


图4

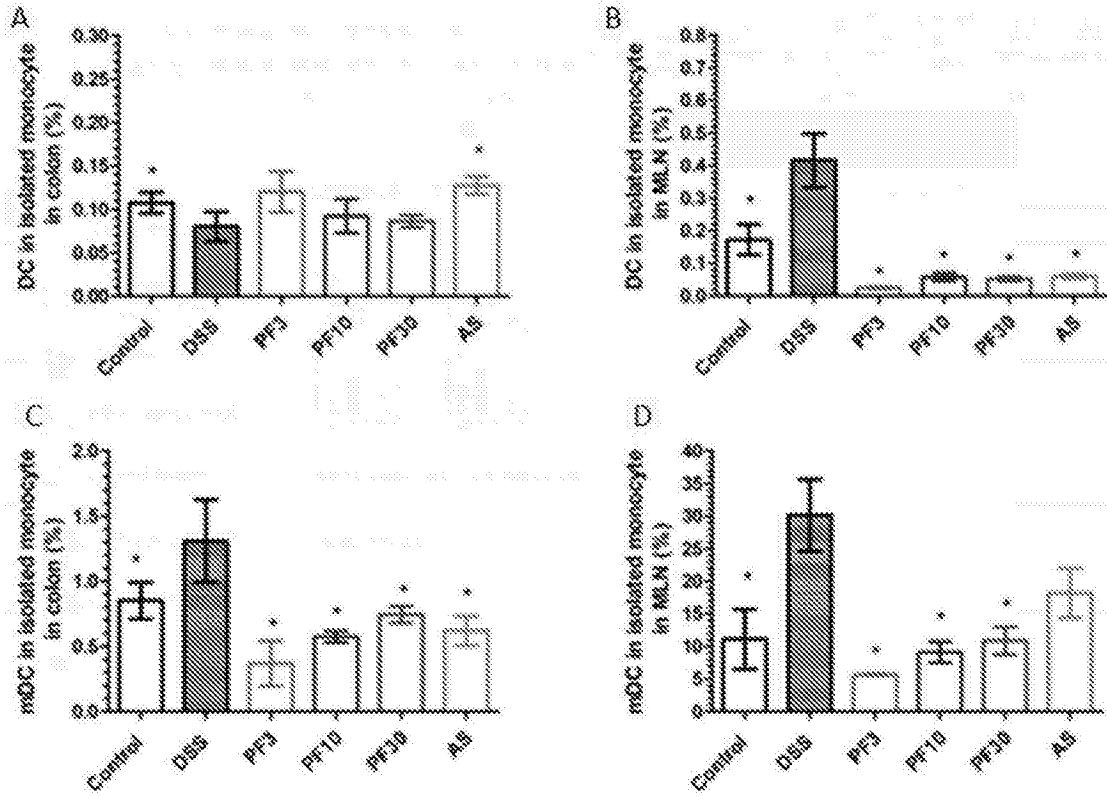


图5

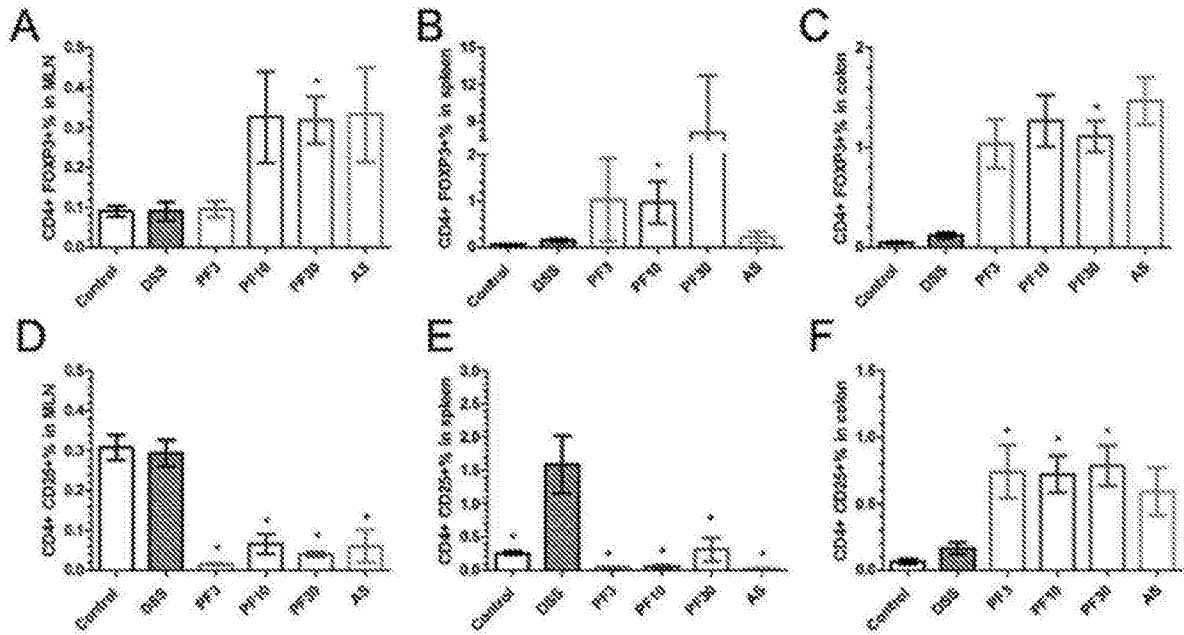


图6

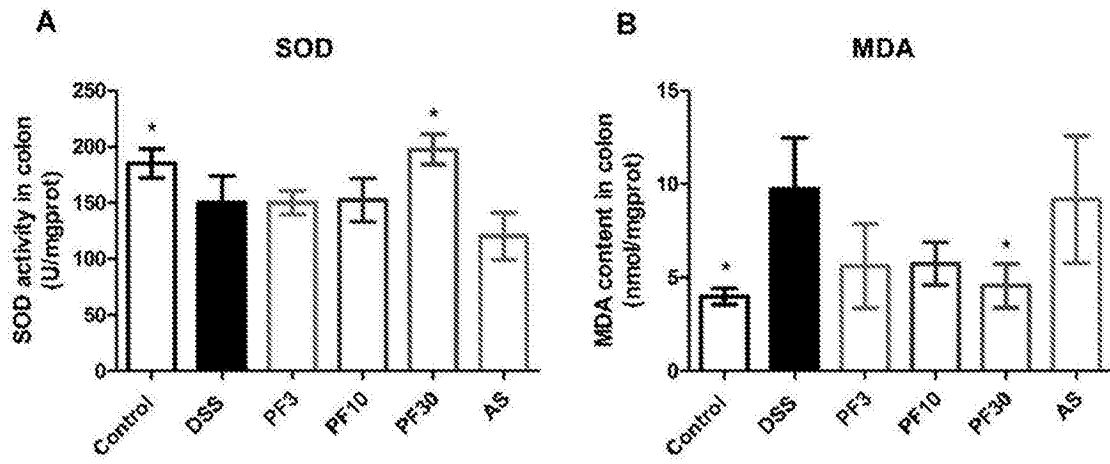


图7