

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580035426.X

[51] Int. Cl.

A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

[43] 公开日 2008年1月16日

[11] 公开号 CN 101106997A

[22] 申请日 2005.8.17

[21] 申请号 200580035426.X

[30] 优先权

[32] 2004.8.17 [33] US [31] 60/602,134

[86] 国际申请 PCT/US2005/029327 2005.8.17

[87] 国际公布 WO2006/023603 英 2006.3.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.4.17

[71] 申请人 约翰·霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

[72] 发明人 D·卡斯 泷本英树 H·钱皮恩

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 程伟

权利要求书9页 说明书99页 附图25页

[54] 发明名称

PDE5 抑制剂组合物及治疗心脏病征候的方法

[57] 摘要

本发明方法及组合物的特征为，一种用于治疗或预防患者心脏病征候的 PDE5 抑制剂。

1.强化心脏病症患者心脏功能的方法，而该心脏病症选自由下列所构成的群组：心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、适应不良肥大症、收缩功能保留的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭，该方法包括对该患者投予有效量的 PDE5 抑制剂，其中，该抑制剂的投予增强了心脏功能。

2.如权利要求 1 的方法，其中，该方法降低或逆转心脏腔室重塑。

3.如权利要求 2 的方法，其中，该方法降低或逆转心脏扩张。

4.如权利要求 1 的方法，其中，该方法降低或逆转心肌细胞重塑。

5.如权利要求 4 的方法，其中，该方法降低肌肉细胞肥大。

6.如权利要求 1 的方法，其中，该方法降低或逆转分子重塑。

7.如权利要求 6 的方法，其中，该 PDE5 抑制剂降低试剂的表达，而该试剂选自由下列所构成的群组：金属蛋白酶、钙调神经磷酸酶、有丝分裂原活化激酶、Akt 激酶、活化 T 细胞的核因子、RhoA 及 Rho 激酶、PI3 激酶、gp130/Stat-3 途径成分、硝基酪氨酸、氧化氮合成酶、和氧化氮合成酶未偶合相关的试剂以及和氧化压力相关的试剂。

8.如权利要求 6 的方法，其中，该 PDE5 抑制剂降低试剂的生物活性，而该试剂选自由下列所构成的群组：金属蛋白酶、钙调神经磷酸酶、有丝分裂原活化激酶、Akt 激酶、NFAT、RhoA 及 Rho 激酶、PI3 激酶、gp130/Stat-3

途径成分、硝基酪氨酸、氧化氮合成酶、和氧化氮合成酶未偶合相关的试剂以及和氧化压力相关的试剂。

9.如权利要求 1 的方法，其中，该 PDE5 抑制剂通过蛋白激酶 G 来增强依赖于 cGMP 的信号。

10.如权利要求 1 的方法，其中，该心脏腔室、细胞或分子重塑系由刺激所诱发。

11.如权利要求 10 的方法，其中，该刺激是压力超载。

12.如权利要求 10 的方法，其中，该刺激是神经激素压力。

13.如权利要求 10 的方法，其中，该刺激是心肌梗塞。

14.如权利要求 10 的方法，其中，该刺激是容量超载。

15.如权利要求 1 的方法，其中，该心脏功能是由测量与负载无关的松弛速率来评估的。

16.如权利要求 1 的方法，其中，该心脏功能是由测量与负载无关的心脏收缩性来评估的。

17.如权利要求 1 的方法，其中，该心脏功能是由测量与负载无关的心脏射出容积来评估的。

18.如权利要求 1 的方法，其中，该心脏功能是由测量与负载无关的收缩末期容积来评估的。

19.如权利要求 1 至 18 中任一项的方法，其中，心脏功能的测定方法选自由下列所构成的群组：多普勒超音波心动图、二维回音多普勒、脉冲波多普勒、连续波多普勒、示波臂套 (oscillometric arm cuff)、心导管插入术、核磁共振图像、正子放射型电脑断层扫描、胸部 X 光、射出分率测定、心电图、核子扫描、侵袭性心脏压力以及非侵袭性和非侵袭性地测量心脏压力-容积回圈 (电导心导管)。

20.预防具有心脏肥大发展倾向的患者心脏肥大的方法，该方法包括对该患者投予有效量的 PDE5 抑制剂，其中，该抑制剂的投予预防了心脏肥大。

21.使具有心脏肥大的患者降低心脏肥大的方法，该方法包括对该患者投予有效量的 PDE5 抑制剂，其中，该抑制剂的投予降低了心脏肥大。

22.如权利要求 21 的方法，其中，该方法逆转心脏肥大。

23.预防具有心脏扩张发展倾向的患者心脏扩张的方法，该方法包括对该患投予有效量的 PDE5 抑制剂，其中，该抑制剂的投予预防了心脏扩张。

24.使诊断出有心脏扩张的患者降低心脏扩张的方法，该方法包括对该患者投予有效量的 PDE5 抑制剂，其中，该抑制剂的投予降低了心脏扩张。

25.如权利要求 24 的方法，其中，该方法逆转心脏扩张。

26.如权利要求 20 至 25 中任一项的方法，其中，该方法降低心脏腔室重塑。

27.如权利要求 20 至 25 中任一项的方法，其中，该 PDE5 抑制剂降低细胞重塑。

28.如权利要求 27 的方法，其中，该 PDE5 抑制剂降低肌肉细胞大小。

29.如权利要求 20 至 28 中任一项的方法，其中，该 PDE5 抑制剂降低分子重塑。

30.如权利要求 29 的方法，其中，该 PDE5 抑制剂调控试剂的表达，而该试剂选自由下列所构成的群组：金属蛋白酶、钙调神经磷酸酶、有丝分裂原活化激酶、Akt 激酶、活化 T 细胞的核因子、RhoA 及 Rho 激酶、PI3 激酶、gp130/Stat-3 途径成分、硝基酪氨酸、氧化氮合成酶、和氧化氮合成酶未偶合相关的试剂以及和氧化压力相关的试剂。

31.如权利要求 29 的方法，其中该 PDE5 抑制剂调控试剂的生物活性，而该试剂选自由下列所构成的群组：

金属蛋白酶、钙调神经磷酸酶、有丝分裂原活化激酶、Akt 激酶、NFAT、RhoA 及 Rho 激酶、PI3 激酶、gpl30/Stat-3 途径成分、硝基酪氨酸、氧化氮合成酶、和氧化氮合成酶未偶合相关的试剂以及和氧化压力相关的试剂。

32.如权利要求 31 的方法，其中，该 PDE5 抑制剂改变该试剂的活化作用。

33.如权利要求 20 至 32 中任一项的方法，其中，该 PDE5 抑制剂通过蛋白激酶 G 增强了依赖于 cGMP 的信号。

34.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，使用该 PDE5 抑制剂处理心脏状况不需要调控纤维化过程。

35.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，使用该 PDE5 抑制剂处理心脏状况不需要调控压力负载。

36.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，该 PDE5 抑制剂增强与动脉血压效果无关的心脏功能。

37.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，该 PDE5 抑制剂增强与肺血压效果无关的心脏功能。

38.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，该 PDE5 抑制剂增强与血管舒张效果无关的心脏功能。

39.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的浓度达到该 PDE5 抑制剂的 $0.25 \times IC_{50}$ 。

40.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的浓度达到该 PDE5 抑制剂的 $0.5 \times IC_{50}$ 。

41.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的浓度等于该 PDE5 抑制剂的 IC_{50} 。

42.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的浓度达到该 PDE5 抑制剂的

5X IC₅₀。

43.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的浓度达到该 PDE5 抑制剂的 10X IC₅₀。

44.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的浓度达到该 PDE5 抑制剂的 50X IC₅₀。

45.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，该 PDE5 抑制剂选择性地抑制 PDE5。

46.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的浓度达到 IC₅₀ 为 10nM。

47.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的浓度达到峰值浓度为 50nM。

48.如权利要求 1 至 33 中任一项的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的有效浓度达到 0.1 至 100 nM。

49.如权利要求 48 的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的有效浓度达到 0.1 至 75.0nM。

50.如权利要求 49 的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的有效浓度达到 0.5 至 50.0nM。

51.如权利要求 50 的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆的有效浓度达到 5 至 10nM。

52.如权利要求 51 的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的有效浓度达到 10 至 20nM。

53.如权利要求 50 的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的有效浓度达到 20 至 30nM。

54.如权利要求 50 的方法，其中，投予该 PDE5 抑制剂使在血浆中的有效浓度达到 30 至 40nM。

55.如权利要求 48 至 54 中任一项的方法，其中，该

有效浓度维持超过至少 4 至 8 个小时。

56.如权利要求 55 的方法，其中，该有效浓度维持超过至少 8 至 12 个小时。

57.如权利要求 56 的方法，其中，该有效浓度维持超过至少 12 至 24 个小时。

58.预防患者适应不良心脏改变的方法，该方法包括对该患者投予有效量的 PDE5 抑制剂，其中，该抑制剂防止该适应不良心脏改变。

59.使有需要的患者降低适应不良心脏改变的方法，该方法包括对该患者投予有效量的 PDE5 抑制剂，其中，该抑制剂降低该适应不良心脏改变。

60.如权利要求 59 的方法，其中该方法逆转该改变。

61.如权利要求 58 或 59 的方法，其中，该改变与高血压有关。

62.如权利要求 58 或 59 的方法，其中，该改变与病症有关，而该病症选自由下列所构成的群组：心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、适应不良肥大症、收缩功能保留的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭。

63.对有需要的患者增强心肌活力的方法，该方法包括对该患者投予有效量的 PDE5 抑制剂，其中，该抑制剂的投予增强了心肌能量。

64.如权利要求 63 的方法，其中，心肌能量的分析通过下列评估来进行：相对于高能磷酸盐的运用(腺核苷三磷酸)的高能磷酸盐的储存(磷酸基肌酸)的评估；相对于 ADP 的 ATP 的通量的评估；ADP 和无机磷酸盐水平的评估；与总心脏工作量有关的心脏对氧气的消耗量的评估；以及与总肌肉工作量有关的分离心肌对氧气的消耗量的评估。

65.治疗病症的组合物，而该病症选自由下列所构成的群组：心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、适应不良肥大症、收缩功能保留的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭，该组合物包含在医药上可接受的赋形剂中的至少 0.1 至 200 毫克的 PDE5 抑制剂，其中，将该组合物投予患者，在血浆中产生的有效浓度至少为 0.1 至 100 nM。

66.治疗心脏肥大的组合物，该组合物包含在医药上可接受的赋形剂中的至少 0.1 至 200 毫克的 PDE5 抑制剂，其中，将该组合物投予患者，在血浆中产生的有效浓度至少为 0.1 至 100 nM。

67.如权利要求 65 或 66 的组合物，其中，将该组合物投予患者，产生的有效浓度为 0.1 至 75nM。

68.如权利要求 67 的组合物，其中，将该组合物投予患者，产生的有效浓度为 0.5 至 50nM。

69.如权利要求 68 的组合物，其中，将该组合物投予患者，在血浆中产生的有效浓度为 1 至 25nM。

70.如权利要求 69 的组合物，其中，将该组合物投予患者，在血浆中产生的有效浓度为 5 至 10nM。

71.如权利要求 69 的组合物，其中，将该组合物投予患者，在血浆中产生的有效浓度为 10 至 20nM。

72.如权利要求 68 的组合物，其中，将该组合物投予患者，在血浆中产生的有效浓度为 20 至 30nM。

73.如权利要求 68 的组合物，其中，将该组合物投予患者，在血浆中产生的有效浓度为 30 至 40nM。

74.如权利要求 65 或 66 的组合物，其中，该组合物包含至少 10 毫克的 PDE5 抑制剂。

75.如权利要求 65 或 66 的组合物，其中，该组合物包含至少 20 毫克的 PDE5 抑制剂。

76.如权利要求 65 或 66 的组合物，其中，该组合物包含至少 100 毫克的 PDE5 抑制剂。

77.如权利要求 63 或 64 的组合物，其中，该组合物包含至少 150 毫克的 PDE5 抑制剂。

78.如权利要求 65 或 66 的组合物，其中，该组合物提供持续释放该 PDE5 抑制剂。

79.如权利要求 78 的组合物，其中，该组合物提供释放该 PDE5 抑制剂超过至少 4 至 8 个小时。

80.如权利要求 79 的组合物，其中，该组合物提供释放该 PDE5 抑制剂超过至少 8 至 12 个小时。

81.如权利要求 80 的组合物，其中，该组合物提供释放该 PDE5 抑制剂超过至少 12 至 24 个小时。

82.如权利要求 65 或 66 的组合物，其中，该组合物实质上由 PDE5 抑制剂所构成。

83.一种药物包装，其包含组合物，该组合物包含在医药上可接受的赋形剂中的至少 5 毫克的 PDE5 抑制剂，其中，该药物包装用于治疗或预防病症，而该病症选自下列所构成的群组：心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、适应不良肥大症、收缩功能保留的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭。

84.一种药物包装，其包含组合物，该组合物包含在医药上可接受的赋形剂中的至少 5 毫克的 PDE5 抑制剂，其中，该药物包装用于治疗或预防心脏肥大。

85.如权利要求 83 或 84 的药物包装，其中，该药物包装包含至少 10 毫克的 PDE5 抑制剂。

86.如权利要求 83 或 84 的药物包装，其中，该药物包装包含至少 20 毫克的 PDE5 抑制剂。

87.如权利要求 83 或 84 的药物包装，其中，该药物包装包含至少 100 毫克的 PDE5 抑制剂。

88.如权利要求 83 或 84 的药物包装，其中，该 PDE5 抑制剂在持续释放的配方中被提供。

89.如权利要求 83 或 84 的药物包装，其中，该组合物实质上由 PDE5 抑制剂所构成。

90.如权利要求 83 至 89 中任一项的药物包装，又包含对患者投予该组合物以治疗或预防心脏肥大的文字说明书。

PDE5 抑制剂组合物及治疗心脏病征候的方法

技术领域

本发明是关于一种治疗和预防心脏病症的方法及组合物。

背景技术

心脏持续的处于血液动力学超负荷状态时，造成分子、细胞、肌肉以及腔室形态上的改变，是典型的心脏适应不良，将导致进一步心脏功能障碍，最后引发心脏衰竭。触发此等反应的病理生理刺激，包括高血压、心脏瓣膜疾病、神经激素压力及与帮浦功能衰退有关的腔室过度充装。这些触发多重细胞信号和转录途径的改变，将引发肌肉细胞生长、心肌功能恶化、肥大重塑和心脏扩张。现有的疗法无法充分地防止这些病理变化。心脏扩大是慢性且持续恶化的病症，最后导致心脏衰竭。超过 5 百万个美国人受心脏衰竭所影响，单在美国每年就有超过 500,000 个新病例，是死亡的主因。这些患者近半有高血压和明显心脏收缩减小的心脏肥大症，此症状目前没有特别经测试和认可的治疗方法。因此，对用于治疗心脏病症譬如心脏肥大的改良组合物和方法，实有迫切的需求。

发明内容

本发明为治疗和预防心脏病症的方法和组合物。是以发现 PDE5A 在心脏遭受慢性压力，譬如持续的压力负载、儿茶酚胺刺激和其它型式的血液动力学负载，扮演着重要角色；以及在这背景下，抑制 PDE5A 而预防并逆

转了形态、细胞和分子的心脏重塑，作为本发明的依据。

在一态样中，本发明大抵是强化患者(例如，人类病患)心脏功能的方法，这些有心脏病症的患者选自由下列所构成的群组：心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、适应不良肥大症、收缩功能持平的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭。方法包含对患者投予有效的 PDE5 抑制剂量，由投予抑制剂来增强心脏功能。在一具体实例中，该方法降低或逆转了心脏腔室重塑、心脏扩张、心肌细胞重塑(例如，降低肌肉细胞肥大)或分子的重塑。在另一具体实例中，PDE5 抑制剂降低了选自由下列所构成群组的试剂的表达或生物活性：金属蛋白酶、钙调神经酶(calcineurin)、有丝分裂原活化激酶(mitogen activated kinase)、Akt 激酶、活化 T 细胞的核因子(NFAT)，RhoA 及 Rho 激酶、PI3 激酶、gp130/Stat-3 途径成分、硝基酪氨酸、氧化氮合成酶、和氧化氮合成酶未偶合有关联的试剂以及和氧化压力相关的试剂。在另一具体实例中，PDE5 抑制剂通过蛋白激酶 G 来增强依赖于 cGMP 的信号。又在另一具体实例中，心脏腔室、细胞或分子的重塑是由刺激所引发(例如，压力超载、神经激素压力、心肌梗塞或容量超载)。又在另一具体实例中，通过测量与负载无关的松弛速率；测量与负载无关的心脏收缩性；测量与负载无关的心脏射出容积；或量测与负载无关的收缩末期容积，来评估心脏功能。使用选自由下列所构成群组的分析方法来测量心脏的功能：多普勒超音波心动图、二维回音多普勒、脉冲波多普勒、连续波多普勒、示波臂套(oscillometric arm cuff)、心导管插入术、核磁共振图像、正子放射型电脑断层扫描、胸部 X 光、射出分率测定(ejection fraction test)、心动图、核子扫描、侵袭性心脏压力、侵袭性和

非侵袭性地测量心脏压力-容积循环(电导心导管)。

在另一态样中,本发明提供给有心脏肥大倾向的患者(例如,人类病患)一种预防、降低或逆转心脏肥大的方法,该方法包含对患者投予有效剂量的 PDE5 抑制剂,由投予该抑制剂来预防心脏肥大。

在另一态样中,本发明提供给有心脏扩张倾向的患者(例如,人类病患)一种预防、降低或逆转心脏扩张的方法,该方法包含对患者投予有效剂量的 PDE5 抑制剂,由投予抑制剂来预防心脏扩大。

以上任何态样的各种具体实例中, PDE5 抑制剂降低心脏腔室的重塑;降低细胞的重塑(例如,通过降低肌肉细胞大小);或降低分子的重塑(例如,通过调节选自由下列所构成群组的试剂的表达或生物活性:金属蛋白酶、钙调神经酶、有丝分裂原活化激酶、Akt 激酶、活化 T 细胞的核因子、RhoA 及 Rho 激酶、PI3 激酶、gp130/Stat-3 途径成分、硝基酪氨酸、氧化氮合成酶、和氧化氮合成酶未偶合有关联的试剂以及和氧化压力相关的试剂。在一具体实例中, PDE5 抑制剂改变试剂的活化作用。在另一具体实例中, PDE5 抑制剂通过蛋白激酶 G 来增强依赖于 cGMP 的信号。

在以上任何态样的各种具体实例中,用 PDE5 抑制剂来治疗心脏病症,不需要调控纤维化过程或调控压力负载。在以上任何态样的其它具体实例中, PDE5 抑制剂增强了与动脉血压效果无关、与肺脏血压效果无关、或与血管扩张效果无关的心脏功能。在以上任何态样的各种具体实例中,所投予 PDE5 抑制剂的浓度,达到血浆中有 0.25 倍半抑制浓度 $0.25 \times IC_{50}$ 、 $0.5 \times IC_{50}$ 、相当于 IC_{50} 、 $5 \times IC_{50}$ 、 $10 \times IC_{50}$ 或 $50 \times IC_{50}$ 的 PDE5 抑制剂。在以上任何态样的其它具体实例中, PDE5 抑制剂选择性地抑制 PDE5。在以上任何态样的又其它具体实例中,所

投予PDE5抑制剂在血浆中达到 IC_{50} 为10nM。在以上任何态样的其它具体实例中，所投予PDE5抑制剂在血浆中达到50 nM的峰值浓度。在以上任何态样的又其它具体实例中，所投予PDE5抑制剂在血浆中达到0.1至100、0.1至75.0、0.5至50.0、5至10、10至20、20至30或30至40 nM的有效浓度。在以上任何态样的又其它具体实例中，有效浓度维持至少4至8、8至12或12至24个小时。

在其它态样中，本发明提供给有变化倾向的患者一种预防、降低或逆转适应不良心脏改变的方法，该方法包含对患者投予有效量的PDE5抑制剂，其中该抑制剂防止心脏适应不良改变(例如，与高血压或选自由下列所构成群组的病症有关的改变：心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、心脏适应不良肥大症、收缩功能持平的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭)。

在另一态样中，本发明提供给有需求的患者一种增强心肌能量的方法，该方法包含对患者投予有效量的PDE5抑制剂，其中投予该抑制剂增强了心肌能量。在其它具体实例中，心肌能量的分析通过下列评估来进行：相对于高能磷酸盐的运用(腺核苷三磷酸，ATP)的高能磷酸盐的储存(磷酸基肌酸)的评估；相对于腺核苷二磷酸(ADP)的ATP的通量的评估；ADP和无机磷酸盐水平的评估；与总心脏工作量有关的对氧气的消耗量的评估；以及与总肌肉工作量有关的分离心肌对氧气的消耗量的评估。

在另一态样中，本发明提供组合物以用来治疗选自由下列所构成群组的病症：心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、适应不良肥大症、收缩功能持

平的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭，该组合物包含在医药上可接受的赋形剂中的至少 0.1 至 200 毫克的 PDE5 抑制剂，其中对患者投予该组合物使该组合物在血浆中的有效浓度至少达 0.1 至 100 nM(例如,0.1 至 75nM)。

在另一态样中，本发明提供用来治疗心脏肥大的组合物，该组合物包含在医药上可接受的赋形剂中的至少 0.1 至 200 毫克的 PDE5 抑制剂。

在以上态样的各种具体实例中，对患者投予该组合物，使该组合物在血浆中的有效浓度至少达 0.1 至 100nM(例如，0.1 至 75、0.5 至 50、1 至 25、5 至 10、10 至 20、20 至 30 或 30 至 40nM)。在其它具体实例中，该组合物包括至少 10、20、100 或 150 毫克的 PDE5 抑制剂。在以上态样的其它具体实例中，该组合物提供持续释放 PDE5 抑制剂。在其它具体实例中，该组合物提供持续释放 PDE5 抑制剂至少超过 4 至 8、8 至 12 或 12 至 24 个小时。在以上态样的其它具体实例中，该组合物实质上由 PDE5 抑制剂所构成。

在另一态样中，本发明提供包括组合物的药物包装，而该组合物包含在医药上可接受的赋形剂中的至少 5 毫克的 PDE5 抑制剂，其中该药物包装是用于治疗或预防选自下列所构成群组的病症：心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、适应不良肥大症、收缩功能持平的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭。

在相关的态样中，本发明提供包括组合物的药物包装，该组合物包含在医药上可接受的赋形剂中的至少 5 毫克的 PDE5 抑制剂，其中该药物包装是用于治疗或预防心脏肥大。

在以上态样的各种具体实例中，该药物包装包含至少 10、20 或 100 毫克的 PDE5 抑制剂。在其它具体实例中，提供 PDE5 抑制剂持续释放的配方。在其它具体实例中，该组合物实质上由 PDE5 抑制剂所构成。在其它具体实例中，又包括对患者授予该组合物以治疗或预防心脏肥大的文字说明书。

附图说明

第 1A、1B 和 1C 图显示用昔多芬(sildenafil)抑制 PDE5A 来预防压力负载所引发的的心脏肥大。第 1A 图显示心脏截面(上部)和 M 型心动图(下部)，尺标为一毫米。简称和其所示的表意义如下：Con:进行假(sham)手术的老鼠-手术后 3 星期，TAC:横向大动脉结扎术(transverse aortic constriction, 该处置诱发压力超载)，+/-Sil:有或没有昔多芬治疗。未使用昔多芬治疗的动物，在持续的压力负载下产生了明显的心脏肥大和扩张。到了 9 星期，心脏明显地重塑并呈现显著的心脏功能降低。注意，心动图显示出扩张和脏壁短缩的减少。使用昔多芬治疗的动物，其心脏肥大和腔室扩张的发展，显示出有明显的降低，且心脏功能保留。第 1B 图提供三张关于控制组、TAC 手术后三个星期和九个星期的老鼠的下列总结图：心脏重量对胫骨长度的比率、心肌短缩分率的百分比(percent fractional shortening 从超音波心动图中获得)及左心室收缩终期内径(心脏扩张/重塑和收缩功能的测定)。第 1B 图中的缩写及意义如下：HW/TL 为心脏重量/胫骨长度，FS 为心肌短缩分率以及 LV-ESD 为左心室收缩终期内径，是由心动图得知(平均值±平均值标准差；样本数 $n \geq 6$ ；*表对载剂达 $p < 0.001$ 。在未非使用昔多芬治疗的动物，其心脏肥大的情形明显增加，而使用昔多芬治疗的，则心脏肥大的情形减少超过 50%。心脏经

治疗后，其功能亦改善。第 1C 图为六张显微镜图和一张总结图。显微镜图显示经过碘酸希夫氏-六亚甲四胺染色 (PAS-methenamine-stained) 的来自经载剂以及经昔多芬治疗的动物的心肌层。深蓝色反映间质纤维化 (interstitial fibrosis)。尺标为 100 微米。下部的柱状图显示肌细胞横截面直径 (CSD) 的总结数据；*表对载剂治疗达 $p < 0.01$ 。在持续压力超载期间，用昔多芬治疗阻止了心肌细胞肥大的恶化，并且亦抑制间质纤维化的发展。

第 2 图是剂量对应曲线，显示每日口服剂量改变时，在老鼠体内所达到的血浆游离昔多芬浓度。当剂量为 100 毫克/公斤/日 (此为第 1 图及本申请案整体所述研究的使用剂量)，血浆中游离昔多芬的浓度为 $10.4 \pm 5.7 \text{ nM}$ ，非常接近该化合物的半抑制浓度 (IC_{50})。

第 3A 至 3C 图显示用昔多芬抑制 PDE5A 逆转了已发生的心脏肥大。第 3 A 图包括三张图，此三张图显示出一个星期的 TAC 诱发心脏肥大而无腔室扩张。图中的缩写与第 1 图相同。脏壁厚度及左心室舒张终期容积 (LV-EDD) 由超音波心动图判定。第 3B 图 (左边) 为二张显微镜图，显示出经 PAS-六亚甲四胺染色的心肌层，在 1 星期 TAC (治疗前) 时，呈现肌肉细胞肥大和间质纤维化。后续用昔多芬治疗 2 星期 (TAC-3 星期，2 星期昔多芬) 降低了该肥大和间质纤维化。尺标为 100 微米。第 3B 图 (右边) 为数据总结图；*表对 Con 达 $p < 0.05$ ；†表对 TAC 1 星期达 $p < 0.05$ 。第 3C 图显示用昔多芬逆转心脏肥大的图形。数据开始于 TAC 1 星期之后 (两组在此时具有相同的肥大初始状态)。接着将动物随机化以接受安慰剂或昔多芬治疗。用昔多芬治疗的那一组在接下来的 2 个星期期间显示出心脏肥大的降低和心脏功能 (心肌缩短分率，fractional shortening) 的维持。相反地，经安慰剂治疗者，心脏肥大和心脏功能障碍都更为恶化 (undergo

progressive)。P值用于治疗效果的共变数分析。

第 4A 及 4B 图显示相较于控制组,经昔多芬治疗的的心脏重塑较少,且收缩和舒张功能改善。第 4A 图显示藉由压力-容积关系全面性第评估活体内的的心脏功能,使用包括假手术控制组老鼠(Con)、以昔多芬治疗 3 星期的控制组老鼠(3 星期 Si1)、有以昔多芬治疗或没有以昔多芬治疗的 3 星期的 TAC 老鼠,以及先以 TAC 引发老鼠心脏肥大 1 星期,之后再加入昔多芬治疗二星期(3 星期 TAC + 延迟的 Si12 星期)。在所有有 TAC 处置的例子中,收缩压的增加是相似的,并且未因为昔多芬的治疗而改变。因而,所有先前所显示在心脏形态学上以及心脏功能上存在的变化都与压力负载本身的任何变化无关。未经治疗的的心脏也显示了回圈向右偏移,以及收缩终期压力-容积的关系(连接左上角的线)与肥大重塑一致。以昔多芬治疗的假手术控制组心脏(即没有 TAC 诱发的压力超载),没有改变心脏功能。只有当心脏处于压力增加时,在本文的例子中前述心脏所处的压力是由 TAC 压力负载所造成的,才有观察到昔多芬的作用。在这种情况下,压力-容积回圈偏移至较小的容积,而收缩终期压力-容量的关系依然维持在它的正常位置。这反映了重塑的预防和整体心脏功能的改善。第 4B 图是一系列的六张图,呈现出关于老鼠心脏功能参数的总结数据。左上图显示动脉弹性量-后负载(afterload)的量测(Ea)。在所有使用 TAC 的模式中,由 TAC 所造成的动脉弹性量的增加都是相似的,且不因昔多芬的治疗而减少。右上图所显示的射出分率(EF)是净心脏收缩功能的量测。慢性 TAC 造成 EF 减少,而在以昔多芬合并(concomitant)治疗的动物,其 EF 恢复至正常水平,且在昔多芬治疗延迟 1 星期的动物,其 EF 亦恢复至正常水平(亦即,逆转实验, reversal experiment)。重要的是,EF 回复的发生并没有改变用昔多芬治疗的那些动物的压力

负载。中间二个图显示与心脏负载无关的收缩性量测:最大力量指数 (PMXI) 和前负载再充盈搏功 (preload recruitable stroke work, Msw)。与未经治疗的TAC相较,心脏经昔多芬治疗时,这二个测量值都大大地获得改善。下方的图呈现舒张功能的测量: Tau (等体积松弛时间常数); dP/dt_{mn} -压力下降的峰率。TAC导致心脏松弛作用的延长且反映在二个参数上,并且以昔多芬治疗的动物亦恢复至正常程度。*表对Con和3星期Sil达 $p<0.001$; †表对所有其它组达 $p<0.05$; ‡表对Con、3星期Sil及3星期TAC达 $p<0.01$ 。

第5A至5D图显示另一种专一性PDE5a抑制剂(EMD360527)预防经TAC(3星期)所诱发的心脏肥大发展且同时改善心脏功能的能力。第5A图是一系列以福尔马林固定的心脏截面图(左区块),且二张图显示出在有以EMD360527治疗或没有以EMD360527治疗,在假手术控制组老鼠和TAC术后3星期老鼠的心脏重量/胫骨长度(HW/TL)比率(中间区块)与心肌细胞横截面直径(CSD,右区块)。第5A图中的简称如下:Con:3星期载剂治疗的假手术老鼠、EMD:3星期EMD360527治疗的假手术老鼠、TAC:3星期载剂治疗的TAC老鼠, TAC+EMD:3星期EMD360527治疗的TAC老鼠。*表对Con达 $p<0.05$; †表对以载剂治疗的TAC达 $p<0.05$ 。如以昔多芬治疗者,EMD360527治疗防止了心脏肥大和所伴随的腔室扩张和重塑的发展。第5B图呈现代表性的M型超音波心动图(左区块),以及显示基于侵入式压力-容积插管(invasive pressure-volume)的心脏机转的三张总结图。第5B图所用简称如前所述或如下: Ea代表的是由TAC所造成的心室后负载的增加在有使用EMD360527和没有使用EMD360527的情况都是一样的。与TAC组相较,EMD-TAC组中的最大心脏力量指数(PMXI)上升,且等体积舒张时

间(Tau)显著缩短。这些数据与那些使用昔多芬(即,第4图)所测得的结果几乎相同。*表对Con和EMD达 $p<0.05$; †表对所有其它组达 $p<0.05$ 。第5C图显示墨点图(dot blot)以及分析心脏胎儿基因(cardiac fetal gene)表达的总结图。第5C图用到的简称如下: ANP:A型钠利尿肽(natriuretic peptide)、BNP:B型钠利尿肽、 β MHC: β 肌凝蛋白重链、 α SkA: α 骨骼肌动蛋白、钙处理蛋白(calcium handling protein, PLB):受磷蛋白(phospholamban)、SERCA:肌浆网钙ATP酶(sarcoplasmic reticular calcium ATPase)(上区块)。总结数据以GAPDH常态化(normalized)表示(下区块)。TAC导致胎儿基因重演(recapitulation)-钠利尿肽、 β MHC和 α SkA的表达增加,而PLB和SERCA减少。PDE5A抑制作用逆转了胎儿基因重演,并且增进了经TAC所改变的 Ca^{2+} 处理蛋白的表达。*表对Con达 $p<0.05$, †表对TAC达 $p<0.05$ 。第5D图显示总心肌cGMP水平(whole myocardial cGMP level)在仅有TAC处置的情况下增加,但在以EMD360527治疗的TAC则有轻微的减少。如下张图所呈现,此反应与使用昔多芬者所观察到的结果相似,且与钠利尿肽表达的显著下降相符,尽管PDE5受抑制。*表对Con和EMD达 $p<0.05$, †表对TAC达 $p<0.05$ 。

第6A至6D图显示,在使用压力超载来刺激以造成心脏肥大和重塑的心脏,其中的PDE5a活性增加。在这情况中,昔多芬抑制了PDE5a对蛋白激酶G-1(PKG-1)的刺激。第6A图是显示整个心脏的PKG-1活性的图。图中,*表对Con达 $p<0.05$, †表对以载剂治疗的TAC组达 $p<0.05$ 。PKG-1由cGMP活化,如果昔多芬抑制PDE5,则PKG-1活性将依次提高。在休息的情况下,抑制PDE5对PKG-1活化的净效能微小。相反地,昔多芬显著地增加肥大/重塑的心脏的PKG-1活性,上述之心脏是由3星期的TAC所造成的。第6B图是显示在假手术控制组心脏(Con)和3

星期 TAC 心脏 (TAC) 中的总 cGMP 酯酶活性。基线处的总活性百分比约为 30%，而该活性是透过与专一性的 PDE5 A 抑制剂 (昔多芬或他达拉非 (tadalafil)) 共培养而阻断。使用 IBMX 的广效 PDE 抑制 (broad PDE inhibition) 作用当作控制组而显示。随着压力超载持续 (TAC)，总 cGMP 酯酶的活性提高 (* 表 $p < 0.005$)。由 PDE5 所贡献的活性占比 (proportion) 亦提高到将近全部 (酵素活性的 100% 增加) 的 60% (利用二因子变异数分析, 2-way ANOVA, $p < 0.001$)。第 6C 图是显示整个心脏的 cGMP 水平的图，图中 * 表对 Con 达 $p < 0.05$ 。第 6D 图 (上区块) 呈现钙依赖钙调神经磷酸酶 (calcium-dependent phosphatase calcineurin, Cn) 和有丝分裂原活化激酶 (mitogen activated kinase)-细胞外信号调节激酶 (ERK1/2) 的二个西方墨点法。第 6D 图 (下区块) 提供总结西方墨点法结果的二张图 (每张图的样本数 $n = 4$ 至 5)。ERK1/2 的总结结果以磷 (p) 对总 (t) 蛋白质的比率表示，图中，* 表对 Con 达 $p < 0.05$; † 表对以载剂治疗的 TAC 组 (TAC) 达 $p < 0.05$ 。一星期 TAC 增加上述两种酵素的表达和活性。昔多芬使该效能减弱。在晚期的 TAC 时间点 (later TAC time point, 9 星期)，只有钙调神经酶依旧有显著地增加。在以昔多芬共同治疗的肝脏中，钙调神经酶仍然减少。

第 7A 至 7D 图显示使用昔多芬抑制 PDE5A，通过钙调神经酶/NFAT 依赖的途径来预防新生老鼠的心肌细胞肥大。第 7A 图 (左区块) 是一系列的三张显微镜图。这些显微镜图显示了脱羟肾上腺素 (phenylephrine, PE) 对肌细胞肥大的作用，如肌小节组织增加 (sarcomere organization increased) 所显示 (第 7A 图 α -肌动蛋白染色 (x 1000))。第 7B 图 (右区块) 是以具组织化肌节 (with organized sarcomeres) 的肌肉细胞中， ^3H -白氨酸混入的百分比来定量蛋白质 (* 表对 Con 达 $p < 0.05$, † 表对 PE 达 $p < 0.05$)。使用

昔多芬治疗，减少了PE所刺激的肌肉细胞中的肌节组织和蛋白质合成。第7C图是一系列十张的显微镜图，显示以偶合至 β -半乳糖苷酶的NFAT促进剂转染后的肌细胞(x200)。染成蓝色者表示NFAT活化作用。第7C图中的简称如下：PE - 脱羟肾上腺素，BK - BayK 8644，AdCn - 腺病毒过度表达钙调神经酶(calcineurin overexpression by adenovirus)。区块(1、3、5)是利用相差过滤器处理(phase contrast filter, +fil)，其它则没有(-fil)。第7D图是一系列的三张图，显示NFAT(亦即， β -半乳糖苷酶)的定量分析活性(* 表对Con达 $p < 0.05$ ；† 表对肥大刺激(PE、BK或AdCn)的 $p < 0.05$)。用昔多芬治疗，抑制了由PE和由BayK 8644引起的NFAT活化作用。然而，昔多芬不能阻断以本质上有活性的钙调神经酶来活化细胞中NFAT。此提供了药品效能更接近的标的。

第8A至8F图为显示腺病毒转染效率的显微镜图。第8A和8C图呈现用表达细胞核标靶的 β -半乳糖苷酶的腺病毒进行转染，以及用X-gal染色的各别盘中新生老鼠(neonatal)肌肉细胞显微镜图。对应的盘第8B和8D图是同样的细胞在没有相差的情况下所观察。第8E和8F图显示一盘细胞的较低倍率(第8E图有相差，第8F图没有相差)，用来显示转染的均一性。转染效率是一致的(consistent)且接近95%。

第9A至9C图是显示在以写入NFAT促进剂与萤光素酶偶合密码的腺病毒转染的新生老鼠肌细胞中，NFAT促进剂活化作用的评估。细胞接着暴露至脱羟肾上腺素(PE)、钙增强(calcium enhancement)(BK)或写入活性钙调神经酶(AdCn)密码的腺病毒中，然后与载剂或昔多芬共培养。培养四十八小时以后，细胞是藉由光度计(luminometer)来评估萤光素酶的活性。数据是以常态化至控制组水平的变化百分比显示。昔多芬(Sil)抑制PE，

而BK诱导NFAT促进剂活性，但非由AdCn所诱导的活性。这些结果与使用NFAT促进剂偶合至 β 半乳糖苷酶的病毒的发现类似。图中，*表对Con达 $p < 0.05$ ，†表对心脏肥大刺激(hypertrophy stimulation, PE、BK或AdCn)达 $p < 0.05$ 。

第10A至10E图显示通过抑制PDE5A使Akt途径失活。第10A图为在1和9星期的TAC时，磷(p)Akt和总(t)Akt的西方墨点法及总结数据。第10B图显示Akt活性分析试验的结果。第10C图显示PI3K活性分析试验的结果(3星期TAC时的数据，S:只用昔多芬治疗)。PI3K活性和Akt活性在1和9星期TAC时，皆显著地增加，且使用昔多芬治疗抑制达控制组水平。第10D图为显示GSK3 β 表达和活化作用的西方墨点法和数据总结图。GSK3 β 是调控心脏肥大的下游激酶，受Akt和其它激酶活化。在TAC9星期时，昔多芬降低了由TAC诱导的GSK3 β 活性，但在TAC1星期时则否。第10E图显示昔多芬慢性作用对在心脏中过度表达构成式激活的(constitutive active)Akt的转基因老鼠的效能。上方为死后的心脏，下方为根据超音波心动图和死后分析的总结数据。尺标标记是1mm。从系列超音波心电图和死后研究所得的左心室质量显示于下方，所有比较中，以AktTG的情况其左心室质量较大($p < 0.05$)。Akt过度表达本身导致较严重的心室肥大，而昔多芬并未使重量的增加改变。这表示，昔多芬对Akt信号(亦即，第A至C图)的作用是在Akt本身上游。图中，*表对控制组达 $p < 0.05$ ；†表对TAC达 $p < 0.05$ ；C表控制组；T表TAC；T+S表TAC + 昔多芬，而以上简称适用于第10A至10E所有图。

第11A至11F图显示PDE5A抑制剂的抗肾上腺素对单离成体老鼠肌细胞的作用，所述的单离成体老鼠肌细胞是暴露至异丙肾上腺素(ISO)，接着暴露至ISO与昔多芬组合(ISO+SIL)。第11A图显示在暴露至ISO组中肌小

节的缩短量增加，但合并暴露至 PDE5 抑制剂(昔多芬)，该作用显著地减弱。第 11B 图显示由荧光染料 Indo-2AM 所测量的钙瞬变(calcium transient)。染料信号是以二种放射波长的比率表现。第 11C 和 11D 图是定量由第 11A 和 11B 图所显示结果的图表。第 11E 图包括未受损伤的老鼠心脏结果的两个压力容积循环。ISO 造成压力容积循环变宽且使上角点(心脏收缩终期)向左偏移。这反映出收缩力的增加。使用 SIL 治疗组，ISO 反应减弱，且收缩力的增加是可忽略的。第 11F 图是总结基于压力上升的最大速率(dP/dt_{max})数据的柱状图。投予 ISO 组有 dP/dt_{max} 的上升，在重新建立基线之后，仅单独投予昔多芬。这对处在休息状态的的心脏并没有作用。当添加 ISO，并没有观察到在 dP/dt_{max} 所预期的收缩性的增加。

第 12A 和 12B 图包括三张图(图 12A)以及一张柱状图(图 12B)。第 12A 图显示在未受损伤的心脏 PDE5A 对 ISO 所诱导的慢性心脏肥大的作用。第 12B 图显示 PDE5A 抑制作用对心脏重量/胫骨长度比率的效能。ISO 藉由渗透式帮浦输注至老鼠达 2 周，导致在左心室近 50%的肥大(心脏质量/胫骨长度)。与 PDE5a 抑制剂共同治疗能后预防此反应。

第 13A 和第 13B 图是显示心房钠利尿肽并不如 PDE5A 抑制作用般压制与 β -肾上腺素有关的心脏变化。当 ANP 以静脉内输注，会造成心肌 cGMP 显著增加(右区块)。这没有抑制经异丙基肾上腺素刺激的收缩(左区呈现血压上升的最大速率；基线、投予 ISO、重新建立后的基线、仅使用 ANP，及 ANP+ISO)。这与如前文所示投予 PDE5a 抑制剂所观察到的情况非常不同。而投予 PDE5a 抑制剂所量得的 cGMP 显示有较少的不同。不希望被任何特定理论局限，这些结果可能意味，高度分区化的信号是造成 PDE5a 的心肌作用的原因。

第 14A 和 14B 图是显示 PDE5a 抑制剂(昔多芬; SIL)对经异丙基肾上腺素(ISO)刺激的单离成体心脏肌肉细胞的收缩和钙瞬变的直接作用, 该收缩和钙瞬变是处在经 ODQ 所造成的鸟苷酸(guanylate cyclase, sGC)抑制作用的状态或并非处在该抑制状态。sGC 产生接下来会被 PDE5a 所代谢掉的 cGMP。藉由 sGC(ODQ)阻断 cGMP 的合成来避免 PDE5a 抑制剂减弱 ISO 反应。这支持了 cGMP 调节机制对 PDE5a 抑制作用的重要性。

第 15A、15B, 和 15C 图是显示 PDE5a 抑制剂在单离的成体心脏肌肉细胞中增加 cGMP 的图表。第 15A 图显示蛋白激酶 G-1(PKG-1)在肌细胞的活性。单独使用昔多芬(SIL)治疗或单独使用他达拉非(tadalafil, TAD)治疗仅些微地提升 PKG-1 的活性($p < 0.05$), 但上述合并 ISO 使用会增加 PKG-1 的活性达 70%($p < 0.001$), 较单独使用 ISO 增加达 30%($p < 0.001$)。第 15B 图显示 cGMP 的产生, 该图是以 cGMP 敏感的萤光共振能量转移(FRET)在控制组老鼠新生鼠的肌细胞中量测的。SIL(500nM)和 ISO(100nM)使细胞 cGMP($p < 0.01$)上升, 且在两者合并使用时有更大的改变。NO 供体 DEA/NO(5 μ M)的添加使 cGMP 上升的更多。第 12C 图是显示 FRET 相对变化的数据总结(*表对于未经治疗的细胞达 $p < 0.05$)。

第 16A 至 16E 图显示 PDE5A 蛋白质在单离的成体肌细胞或在整个心脏肌肉层中的表达和活性。第 16A 图显示 PDE5A 蛋白质在单离的成体肌细胞表达(所加载的蛋白质如所显示)的西方点墨(上区块)以及呈现的 4 至 6 个分离的点(在每一群中含 $n \geq 6$ 个心脏)。观察到双条带的形式(double banding pattern; a, b)。肌细胞所用的加载量是 100 μ g, 然而肺脏的量是 1 μ g。第 6B 图是显示 PDE5a 基因在肺脏、单离的心脏肌肉细胞(MYO), 以及整个心肌层(HRT)表达的相对水平。相较于在肺脏, PDE5a 在心

脏中表达的水平非常低，且在单离的肌细胞中比在整个心脏中还要低 10 倍。第 16C 是显示在整个尸体心脏 (murine heart) 中的 PDE5A 蛋白质表达，且肺脏和心脏都使用 $20\ \mu\text{g}$ 的加载量确认了在蛋白质水平表达的差异。第 16D 和 16E 图显示 cGMP 酯酶活性分析试验在整个心脏以及单离的成体心脏肌肉细胞中的结果的图表。总活性大幅的被广效 PDE 抑制剂 IBMX ($50\ \mu\text{M}$) 所减弱，而昔多芬 (SIL, 100nM) 将该活性减弱达约 30% ($p < 0.001$)。这显示在正常心脏肌肉和肌肉细胞总 cGMP 酯酶活性有约 30% 是由 PDE5a 所造成。

第 17A 至 17F 图显示心肌细胞 PDE5A 分布的共轭焦荧光染色。第 17A 图显示在肌细胞中 PDE5A 荧光染色是出现在细胞质且更明显的是在 z 带 (z-band, 左区块)。对应的染色是为 z 带蛋白质 α -肌动蛋白 (α -actinin) (右区块)。第 17B 图显示 PDE5A 染色是藉由与阻断性肽 (blocking peptide, 细胞信号公司 (cell signaling), 5: 1 BP/Ab (左区块); 右区块: α -肌动蛋白)。第 17C 图显示 PDE1C 染色不受该阻断性肽所影响 (PDE1C: 左; 右区块: α -肌动蛋白)。第 17D 图显示在另一个心脏肌细胞中的 PDE5A 染色。第 17E 图显示同样的细胞针对一氧化氮合成酶 3 (NOS3, 或 eNOS) 来染色，而第 17F 图显示在 z 带处该染色与 PDE5a 一起存在。

第 18A 和 18B 图显示得自健康人类实验体的数据，该数据是在以 β -肾上腺素促效剂-多巴酚丁胺刺激之前和之后所得，且每个这样的试验都是在服用昔多芬单次口服剂量之前和之后进行 (100mg , 口服)。第 18A 图是一系列四个区块显示例示的多普勒血流及血压。第 18B 图是显示最大 LV 心室力量指数的图表，该心室力量指数是用来评估心脏收缩力的。对初始试验多巴酚丁胺增加该等参数达将近 200% (1); 在使用昔多芬之后 (虚线; 2),

该刺激作用显著的减少了。

第 19 图是一系列六张图，显示在实验流程的每个时期的峰值力量指数(峰值LV力量除以舒张终期)、射出分数、搏出容积、心脏收缩血压以及总外围血管阻力。这些图提供了在健康人类自愿者的安慰剂控制组、双盲、昔多芬随机选取测试结果的总结图。在每个实验体，先进行多巴酚丁胺刺激挑战试验(dobutamine stimulation challenge test)然后接着口服本研究的药物(安慰剂或昔多芬)。B1 及 B2 指的是最初和第二次(即在研究药物以后)的基线，而 D1 和 D2 分别指的是在多巴酚丁胺输注期间在口服本研究药物之前和之后所量测的结果。得自组内 RMANOVA 测试的 P 值是代表在接受本发明药物之前对于接受药物之后，经多巴酚丁胺刺激的反应的变化。D1 对于 B1 和 D2 对于 B2(*表 $p < 0.001$ ，†表 $p < 0.005$)的组内对照亦显示其配对的 t-试验。相较于安慰剂，昔多芬显著地降低经多巴酚丁胺增强的收缩力。然而，对总外围血管阻力没有显著的作用。

第 20 图是一系列的十二张图，显示在接受本研究药物-昔多芬或安慰剂之前(B, ●)和之后(A, ○)，由多巴酚丁胺所造成血液动力功能的变化。每个患者的组内配对是由线所连接的数据点所确认。平均值是在每个数据组的左边或右边的方块所显示。每个个别图表上方的 p 值是表示在每个组群中第一和第二多巴酚丁胺反应(对于基线的变化)的比较。在每一组配对的图形上方黑体字的 p 值是代表基于多巴酚丁胺试验(在研究药物投予前或投予后)、多巴酚丁胺(有存在或没有)以及研究药物(昔多芬对于安慰剂)的 3 向互动(3-way interaction)的 RMANOVA。图 21A 至 21F 显示 PdE5A 抑制性质在 NOS3 结合和金属结合蛋白酶(metalloproteinase)作用。图 21 A 显示肥大的变化在 TAC 心脏上与仿真老鼠的正常心脏比

较。图 21B 是西方点墨法操作在一个非变性的胶体，显示在 3 个星期术后处理，在 TAC 心脏，当 NOS3 单体的 (NOS3-m) 浓度增加时，NOS3 二聚体 (NOS3-d) 降低了。这是表示 NOS 解联，NOS3 从醇素转换，而其醇素主要是合成一氧化氮进而产生过氧化物。图 21 C (更低区) 是一对显微镜图显示超氧化物阴离子荧光探针 (dihydroethidium) (DHE) - 一种氧化应力敏感染料 - 在仿真和 TAC 的老鼠心肌层染色。图 21 C (上区) 是一对图表表示，在手术以后，在 TAC 老鼠三个星期，钙相关 NOS 活性引起一氧化氮的降低。图 21D 是由 NOS3 增加造成过氧化物形成的图表。图 21E 西方点墨法显示，NOS3 二聚体 (280 kD) 在 TAC 老鼠三个星期在压力超载以后，量降低了，且昔多芬 (sildenafil) 的处理防止了二聚体 (280 kD 带) 的流失。图 21F 是明胶酶酶 (gelatinase zymogen) 谱显示昔多芬 (sildenafil) 抑制明胶酶 (gelatinase) 活性 (金属结合蛋白酶 (metalloproteinase) MMP-2 和 MMP-9，都为明胶酶 (gelatinases))。

图 22A, 22B 和 22C 是西部点墨法 (图 22A) 和二张图表 (图 22B 和 C) 显示 TAC 和 TAC+昔多芬 (sildenafil) 处理的小 GTP 结合蛋白质 Rho A 的表现和活化效用相当于它的下游激酶与 ρ 激酶 (Rho kinase) (ROCK1 和 ROCK2)。图 22A 表示，RhoA 及 ROCK2 在老鼠曝露 3 星期 TAC，蛋白质表现量增加。二者皆因由昔多芬 (sildenafil) 处理造成 PDE5A 抑制性质钝化。图 22B 和 22C 表示，RhoA 和整体 ROCK 在老鼠曝露于 TAC 三个星期活性增加。活性的增加受到昔多芬 (sildenafil) 的抑制。

图 23 A 和 23B 是六张磷酸化点墨显示 STAT3 磷酸化。图 23A 表示，STAT3 (信号转换器和转录活化剂 3) 磷酸化 (即；活化作用) 在 TAC 条件下一个星期，三个星期，及九个星期后，量都有增加。以昔多芬 (sildenafil)

处理预防了这活化作用。图 23B 实验是说明出生鼠肌肉细胞的实验结果，介白素 6 (IL-6)活化 STAT3 而不是 STAT1。以昔多芬(sildenafil)处理可防止 STAT 的活化。p-STAT3 和 t-STAT3 是被磷酸化且在各条件下都有表现，并且大致相似 STAT1 线。昔多芬(sildenafil)于 STAT3 转录方面没有作用是因为 t-STAT3 是未改变的。更近一步的比较证实 STAT3 的活性是受到沉默 RNA(SiRNA)的压抑。将 STAT3 量降低，反而增加 STAT1 表现和活性。这是以昔多芬(sildenafil)处理时尚未观察到的。

图 24 A 和 24B 表示，昔多芬(sildenafil)处理能增强心肌能学。图 24A (左区)是在手术之后三星期 TAC 心脏的一个核磁共振光谱图像。心脏被显示在横切面。图 24A (上区)是核磁共振光谱显示在心脏高能磷酸盐的新陈代谢。图 24B 是图表，在三个星期手术以后，磷酸肌酸(phosphocreatine)(PCr)之于整体 ATP 的值在 TAC 心脏组织较低。这个效用会因昔多芬(sildenafil)处理而钝化。

发明说明

定义

"心脏肥大"意谓任一非预期的心肌细胞生长；相对于身体尺寸增加了心脏腔室重量；或增加正常体积或已变大腔室体积时的心脏腔室壁厚度。

"心脏病症"意谓任一心脏疾病或失调。

"心脏腔室重塑"意谓心脏组织非预期的形态改变以反应病理生理学的刺激(例如，高血压、心肌梗塞、神经激素压力、容量超载)。

"细胞重塑"意谓心脏细胞非预期的改变以反应病理生理学刺激。细胞重塑的改变包括，但不受限于，下列任一或多个的变化：肌肉细胞肥大、钙处理(例如，肌肉细胞刺激造成细胞内的钙循环性改变；从细胞内部储存

处譬如肌浆网，吸取和释放钙；钙与收缩蛋白质或调节蛋白质的交互作用)、活化电流(例如，钠)和再极化电位流(例如，钾)。

"分子重塑"意谓心脏组织中基因转录或表现的改变或是蛋白质生物活性的改变，以反应病理生理的刺激。

"增强心脏功能"意谓使心脏的帮浦作用和容积产生有利的改变。

"适应不良心脏改变"意谓心脏或心脏细胞非预期的变化，以反应病理生理的刺激。

"PDE5 抑制剂"意谓抑制磷酸二酯酶-5 水解 cGMP 的化合物。PDE5 抑制剂较佳为降低 PDE5 酵素活性至少 5% (例如，10%、15%、20%、30%、50%、60%、75%、85%、90%或 95%)。应用习知技术分析 PDE5 抑制剂活性，本文中有描述(例如，实施例 4)。

"治疗"意谓降低、抑制、减弱、减低、停止或稳定疾病的发展或进程。

"疾病"意谓损伤或干扰细胞、组织或器官正常功能的任何病症或失调。

"调控"意谓生物功能或活性的任何改变(例如，增加或降低)。

"降低"或"增加"分别意谓至少 5%程度的负向或正向改变。改变程度可为 5%、10%、25%、30%、50%、75%或甚至 100%。

"降低心脏肥大"意谓在形态、细胞或分子重塑产生至少 5%的降低。

"逆转心脏肥大"意谓在形态、细胞或分子心脏表现型上产生预期的改变，其中该经改变的表现型实质上系使正常心脏组织特征化者。

"患者"意谓哺乳动物譬如人类病患，或动物(例如：啮齿类动物、牛、马、猪、羊、犬、猫或其它家里饲养

的哺乳动物)。

"有效量"是指足够产生有利或预期临床结果的量。

在本揭示中，"包含(comprises)"、"包含(comprising)"、"含有(containing)"及"具有(having)"等，能具有在美国专利法中所认为的意义，能意谓"包括(includes)"、"包括(including)"等；"实质上由...构成(consisting essentially of)"或"实质上由...构成(consists essentially)"同样具有在美国专利法中所认为的意义，系开放性的用语，允许出现多于所列举者，只要所列举者的基本或新颖特征不受该多于所列举者所改变，但排除先前技术的具体实例。

发明方法

这种发明包含 PDE5 抑制剂，对于预防或治疗心脏病情况是有用的。发明的构成和方法是在形态上，细胞上，或分子再成型描绘心脏病情况的治疗或预防是有用的。典型地，这样的再成型发生以反应血液动力学的应力譬如高血压，瓣膜方面疾病，神经激素应力，心脏病梗塞，或容量超载。这个发明根据某一部分发现，功能强大的 PDE5 被表现于心脏组织；这些标定物于心脏的再成型和功能都是有效的调节者；并且特殊环状鸟粪嘌呤 3',5'单磷酸二酯酶(PDE5)处理或防止心脏肥大和其它心脏病情况。

此文中方法包括投以对实验体(包括实验体辨识和需要如何的治疗)及在此文中描述有效数量的化合物，或本文描述的化合物在心脏组织产生有利的效用。辨认一个实验体需要如何的治疗是在实验体或医疗保健专家的评断，可能是主观(即；观点)或客观(即可由测试或诊断方法测量)。

依照此文中被使用，术语"处理(treat)"，"处理

(treating)", "处理(treatment)"等等, 提到降低或改良不稳定及/或症状随即结合。大家的评鉴是, 虽不妨碍, 但处理一个病状或症状并不需要不符合程序的疗程, 症状或征兆随即马上被排除。

依照此文提及, 术语"预防(prevent)", "预防(preventing)", "预防(prevention)", "预防疾病的治疗(prophylactic treatment)"等等提到在实验体降低病状发展或病况的可能性, 但是病状或是病况的发展是危险且易受影响的。

本文提及发明中的治疗方法(包括预防疾病的治疗)一般包括构成有助于治疗上地效益, 譬如 PDE5 抑制剂(即; 伐地那非(vardenafil), 他达拉非(tadalafil), 或昔多芬(sildenafil))对实验体(即; 动物, 人)亦需要如此, 包括哺乳动物, 特别是人。这样的治疗对实验体, 特别是人, 遭受从(from), 具有(having), 易受影响(susceptible), 或在危险中成为一种心脏病疾病, 病状, 或其症状。判断那些实验体"在危险中"可能藉由实验体的一个诊断测试或观点或医疗保健提供者(即; 基因测试, 酵素或蛋白质标记, 标记(依照此中被定义), 家族史, 等等)。本文中化合物也许亦可使用于肥大, 包括形态, 细胞的, 或分子再成型所有其它病状的治疗。

心血管的功能

心脏病症和适应不良心脏变化(maladaptive cardiac alternation)、心室、细胞的、和分子重塑有关, 该等心脏病诸如心脏肥大、心脏收缩功能降低、心脏舒张功能降低、适应不良肥大症、仍保有心脏收缩功能的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉和僧帽瓣疾病、肺动脉瓣疾病、肥大性心肌病变(例如, 源于基因或由次发性原因的肥大性心肌病变)、缺血后和梗塞后心脏重塑和心脏衰竭。本发明的组成物可以用来在心脏功

能减低的实验体增强心脏功能。所想要的是，心脏功能增加 5%、10%或至少 20%，或甚至增加了 25%，50%或 75%这么多。最有利地，心脏功能被增强或损伤被逆转，因此功能是实质上正常的(例如，健康控制组实验体心脏作用的 85%、90%、95%或 100%)。或者，该等分析试验在以 PDE5A 抑制剂治疗之前、期间或之后用于监控实验体的情况。增加心脏功能的治疗在发明的方法中是有用的。

任意数量的标准方法对检验心血管功能是可用的。较佳地，心血管功能在实验体(例如，人类)是使用非侵入性的方法评估，诸如藉由影像方法测量净心脏射出(net cardiac ejection)(射出分率(ejection fraction)、缩短分数(fractional shorting)和心室收缩末期容量(ventricular end-systolic volume))，该等成像方法诸如超音波心动图、核子或放射对比性造影心室造影术或核磁共振成像，且心脏收缩的组织速率如藉由组织多普勒成像方法量测。心脏收缩的收缩力亦可使用血压量测结合对心脏流出量的评估或结合对容量(评估肌肉硬化的峰值(peak muscle stiffening))的评估而非侵入性地量测。心血管舒张功能的量测包括心室顺应性，该性质典型由同时量测压力和容量而量测，左心室早期舒张的充血率和松弛率(可由音波多普勒量测而评估)。其它心脏功能的测量包括心肌收缩力(myocardial contractility)、休息时的每搏输出量(resting stroke volume)、休息时的心率、休息时的心脏指数(cardiac index，每单位时间的心脏输出量[L/minute]，坐着测量并除以身体表面积[m²])、总有氧容量、运动时的心血管效能(cardiovascular performance)、峰值运动能力(peak exercise capacity)、峰值氧气(O₂)消耗，或藉由在此技术领域中所广知的或在本文中描述的任何其它方法。血管功能的量测包括总心室后负荷

(ventricular afterload)的判断，心室后负荷取决于数种因素，包括周边血管阻力、大动脉阻抗(aortic impedance)、动脉顺应性、波反射，和大动脉脉搏波速(aortic pulse wave velocity)。

评估心血管功能的方法包括以下一者或多者：多谱勒超音波心动图、二维回音多谱勒成像、脉冲波多谱勒、连续波多谱勒、示波臂套(oscillometric arm cuff)、组织多谱勒成像、心脏导管、核磁共振成像、正子放射断层摄影术、胸部X光、X-射线对比心室造影术、核子成像心室造影术、计算机断层造影术成像、快速螺旋计算机断层造影术成像(rapid spiral computerized tomographic imaging)、三维超音波心动图、侵入性心脏压力(invasive cardiac pressures)、侵入性心脏血流(invasive cardiac flows)、侵入性心脏压力容量循环(invasive cardiac pressure-volume loops)(电导导管)、非侵入性心脏压力容量循环。

疾病预防和治疗的应用

心脏病是每年造成超过二百四十万的美国人死亡的典型慢性和进行性疾病。每年约有五十万的心脏衰竭新病例，单单是在美国就有估计五百万名的患者有这种疾病。早期预防对保留心脏功能可能是最有效的。本发明的方法是想要用来预防以及逆转和心脏疾病有关的形态学的、细胞的，和分子的重塑。在一个具体实例中，是藉由对有发展成心脏病症风险的实验体投以有效量的PDE5抑制剂，来预防心脏疾病。为了判断实验体发展成心脏病况的倾向，该实验体的心脏病风险是使用在此技术领域任何已知的标准方法评估。心脏病风险最重要的指针是年龄、遗传性因素、体重、抽烟、血压、运动史，和糖尿病。心脏病风险其它的指针包括实验体的脂

肪概况 (lipid profile), 该概况典型地是使用血液试验评估, 或其它与心脏病或高血压相关的生物标记。评估心脏病风险的其它方法包括, 但不限于, EKG 压力测试、铊压力测试、EKG、CT 扫描、超音波心动图、核磁共振成像研究、非侵入性和侵入性动脉搏图 (arteriogram), 和心脏导管术。

PDE5 抑制性质亦有用于处理涉及心室、细胞的, 以及分子重塑的适应不良心脏变化, 该等变化会导致心脏功能障碍、肥大、扩张和其它的心脏病指针。有益地, 本发明的方法对在心脏组织内形态学、细胞和分子重塑的降低是有用的, 上述的心脏组织是处在和压力超载、神经内分泌压力、心肌梗塞、或容量超载有关的压力之下。因此, 本发明的方法在具有不受控制的高血压或具有对心脏造成压力的任何其它慢性病症的病人是特别有用的。

PDE5 抑制剂

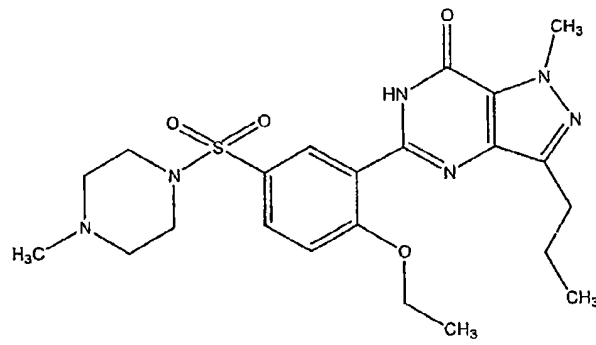
PDE5 是在全身以及肺动脉和静脉平滑肌 (venous smooth muscle) 细胞表达 - 尤其是在海绵体 (corpus cavernosum)。根据这个立场表示, PDE5 抑制剂最初有兴趣的是在于使血管舒张 (vasodilatory) 的效能。例如昔多芬 (sildenafil), 起初是基于预期它对扩张冠状动脉的能力, 而当作抗心绞痛的药物来研究。昔多芬的早期临床研究是作为心绞痛的治疗, 然而, 结果是令人失望的, 因为它对动脉扩张的效果非常轻微。这些临床研究发现勃起功能的增进是投予昔多芬的常见副作用。昔多芬会增进勃起, 这是由于昔多芬藉由减少 cGMP 的分解而因此在阴茎的血液循环中延长由于对性刺激的反应而由一氧化氮所导致的血管扩张效能。同样的环核苷酸信号途径调节了对正常勃起作用所必需的一氧化氮的平滑肌放

松效能。这条途径的下调是许多种形式的勃起功能障碍的病理生理的问题核心。

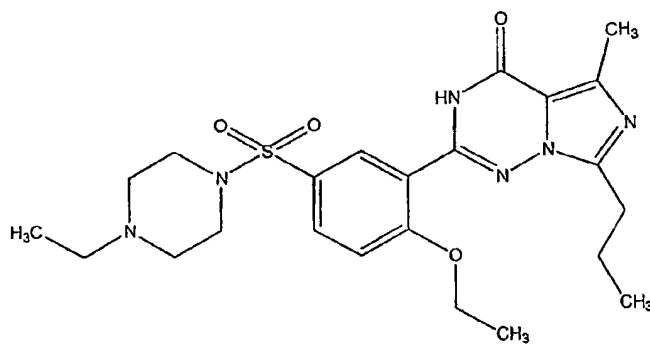
昔多芬对 PDE5 是有选择性的。在本发现于本文报导之前，PDE5 在心肌里的水平(level)被认为在功能上无意义的(functional insignificant)。确实，即使到了 2003 年这么近期，在医药界此类的主要回顾中所提及，并不知道 PDE5 对心肌有直接影响，且对动脉血压有微小效用。这告诉我们，PDE5 抑制剂不会降低在左心的负载到足以造成心脏功能或型态(亦即，肥大)的改变，亦不改造(modify)分子和细胞的重塑。事实上，PDE5 在休息情况下(under rest condition)在心脏的调节仅扮演次要的角色-就像是汽车的制动器在空转的汽车上仅有很少的效能。

让人惊讶的是，本文所报导的结果指出，PDE5A 在心脏遭受压力时扮演重要的角色，并且 PDE5A 抑制作用预防和逆转了在遭受压力的心脏的形态学、细胞，和分子的重塑，上述的压力是与压力超载、神经内分泌压力、心肌梗塞，或容量超载有关。令人惊讶的是，在加诸于心脏的负载完全没有任何改变的情况下，PDE5 抑制剂在心脏功能、左心脏功能、心脏肥大及分子与细胞的重塑达到其治疗效能。

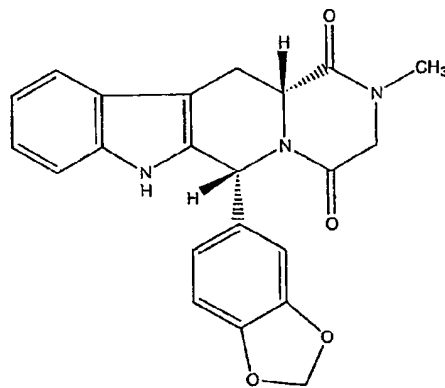
PDE5 抑制剂在此技术领域已充分了解，包括，但不限于，昔多芬(化合物 1)、伐地那非(vardenafil)(化合物 2)、他达拉非(tadalafil) (化合物 3)、EMD 360527、DA 8159 等，或由磷酸二酯酶-5phosphodiesterase-5 (PDE5)抑制 cGMP 水解的其它化合物。



化合物 1

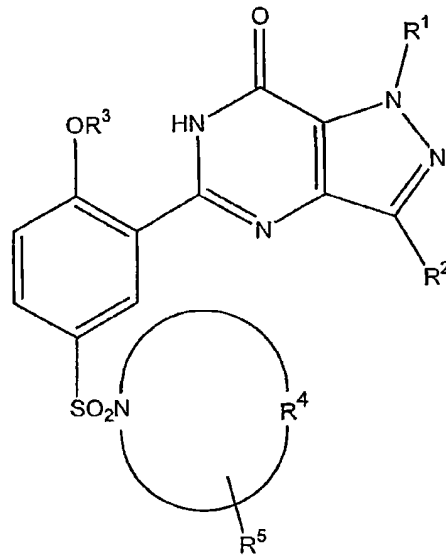


化合物 2



化合物 3

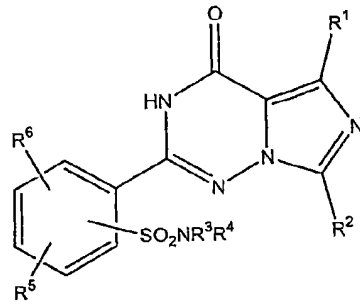
某些适用于本发明的化合物及其医药上可接受的盐能以下式结构(式 I)来表示:



式 I

，式中， R^1 是 H、 C_1-C_3 烷基、 C_3-C_5 环烷基或 C_1-C_3 全氟烷基； R^2 是 H、视需要经 OH 取代的 C_1-C_6 烷基、 C_1-C_3 烷氧基、 C_3-C_6 环烷基或 C_1-C_3 全氟烷基； R^3 是 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_6 烯基、 C_3-C_6 炔基、 C_3-C_6 环烷基、 C_1-C_6 全氟烷基或 (C_3-C_6 环烷基) C_1-C_6 烷基； R^4 与所附接的氮原子一起形成 4-N-(R^6) 六氢吡嗪基； R^5 是 H、 C_1-C_4 烷基、 C_1-C_3 烷氧基、 NR^7R^8 或 $CONR^7R^8$ ； R^6 是 H、 C_1-C_6 烷基、(C_1-C_3 烷氧基) C_2-C_6 烷基羟基 C_2-C_6 烷基、(R^7R^8N) C_2-C_6 烷基、(R^7R^8NCO) C_1-C_6 烷基、 $CONR^7R^8$ 、 $CSNR^7R^8$ 或 $C(NH)NR^7R^8$ ； R^7 和 R^8 各自独立的为 H、 C_1-C_4 烷基、(C_1-C_3 烷氧基) C_2-C_4 烷基或羟基 C_2-C_4 烷基。

其它用于本发明的较佳化合物及其盐、水合物、氮的氧化物和结构异构物，揭示在美国专利第 6,362,178 号中，能以下式结构(式 II)来表示：



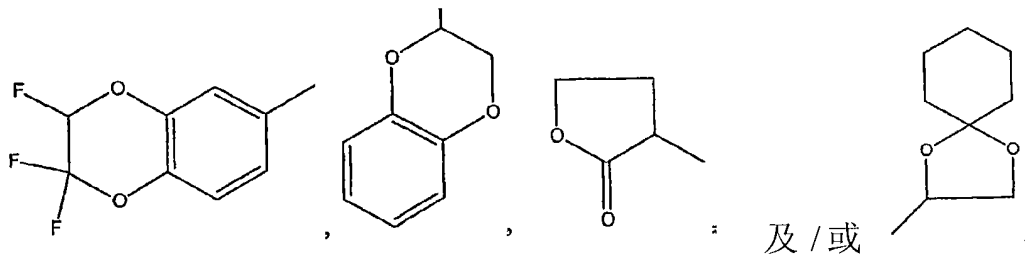
式 II

，式中，

R^1 代表氢或具有达 4 个碳原子的直链或支链烷基；

R^2 代表具有达 4 个碳原子的直链烷基；

R^3 和 R^4 相同或不同，各代表氢或具有达 8 个碳原子的直链或支链烯基或烷氧基，或代表具有达 10 个碳原子的直链或支链烷基链，该烷基链视需要有氧原子插入，并且视需要经选自由下列所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代：三氟甲基、三氟甲氧基、羟基、卤素、羧基、苯甲氧羰基、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧羰基及/或由下式基团进行取代： $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{A})_a-\text{NR}^7\text{R}^8$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NR}^{7'}\text{R}^{8'}$ 、 $-\text{S}(\text{O})_b-\text{R}^9$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{10})(\text{OR}^{11})$ 、



式中，

a 和 b 相同或不同，各代表数 0 或 1；

A 代表 CO 或 SO_2 基；

R^7 、 R^7' 、 R^8 和 R^8' 相同或不同，各代表氢或代表具有 3 至 8 个碳原子的环烷基、具有 6 至 10 个碳原子的芳基、5 至 6 环员的不饱和、部份不饱和或饱和并视需要与苯基并合的杂环，而该杂环具有达 3 个选自由 S 、 N 和 O 所构

成群组的杂原子，上述环系统视需要经选自下列所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代：羟基、硝基、三氟甲基、三氟甲氧基、羧基、卤素、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基或烷氧羰基，或由式 $-(\text{SO}_2)_c-\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$ 基团进行取代，式中，

c 代表数 0 或 1；

R^{12} 和 R^{13} 相同或不同，各代表氢或具有达 5 个碳原子的直链或支链烷基；或

R^7 、 $\text{R}^{7'}$ 、 R^8 和 $\text{R}^{8'}$ 各代表具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基，或代表具有达 8 个碳原子的直链或支链烷基，该烷基视需要经选自下列所构成群组的相同或不同取代基进行取代：羟基、卤素、具有 6 至 10 个碳原子的芳基、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基或烷氧羰基，或由式 $-(\text{CO})_d-\text{NR}^{14}\text{R}^{15}$ 基团进行取代，式中，

R^{14} 和 R^{15} 相同或不同，各代表氢或具有达 4 个碳原子的直链或支链烷基；

d 代表数 0 或 1；或

R^7 和 R^8 及/或 $\text{R}^{7'}$ 和 $\text{R}^{8'}$ 与附接的氮原子一起形成 5 至 7 环员饱和杂环，该杂环视需要可再含有选自 S 和 O 所构成群组的杂原子，或含有式 $-\text{NR}^{16}$ 基团，式中，

R^{16} 代表氢、具有 6 至 10 个碳原子的芳基、苯甲基、5 至 7 环员芳香族或饱和杂环，该杂环具有达 3 个选自 S、N 和 O 所构成群组的杂原子，该杂环视需要经甲基取代，或代表具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基，该烷基视需要经羟基取代；

R^9 代表具有达 6 至 10 个碳原子的芳基，或代表具有达 4 个碳原子的直链或支链烷基；

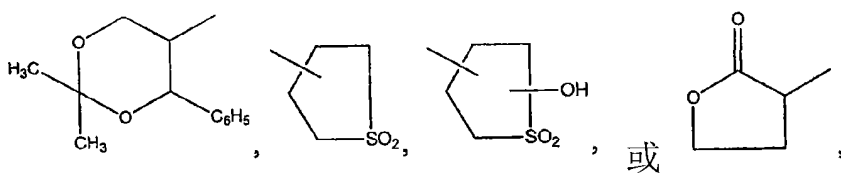
R^{10} 和 R^{11} 相同或不同，各代表氢或具有达 4 个碳原子的直链或支链烷基，及/或在 R^3/R^4 下该以上所列的烷基链视需要经具有 3 至 8 个碳原子的环烷基、具有 6 个到 10

个碳原子的芳基取代，或经 5 至 7 环员部份不饱和、饱和或不饱和并视需要与苯基并合的杂环取代，该杂环可含有达 4 个选自由 S、N 和 O 所构成群组的杂原子，或含有式 -NR¹⁷ 基团，式中，

R¹⁷ 代表氢、羟基、甲酰基、三氟甲基、具有达 4 个碳原子的直链或支链酰基或烷氧基，或代表具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基，该烷基视需要经选自由羟基和具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代，其中芳基和杂环视需要经选自由下列所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代：硝基、卤素、-SO₃H、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基或烷氧基、羟基、三氟甲基、三氟甲氧基，及/或经式 -SO₂-NR¹⁸R¹⁹ 基团进行取代，式中，

R¹⁸ 和 R¹⁹ 相同或不同，各代表氢或具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基；及/或

R³ 或 R⁴ 代表式 -NR²⁰R²¹ 基团，其中 R²⁰ 与 R²¹ 具有如上述 R¹⁸ 与 R¹⁹ 的界定，且与 R¹⁸、R¹⁹ 相同或不同；及/或 R³ 或 R⁴ 代表金刚基 (adamantyl)，或代表下式基团：



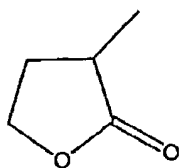
或代表环烷基具有 3 至 8 个碳原子、芳基具有 6 至 10 个碳原子，或代表 5 至 7 环员部份不饱和、饱和或不饱和并视需要与苯基并合的杂环，该杂环可含有达 4 个选自由 S、N 和 O 所构成群组的杂原子，或含有式 -NR²² 基团，其中，

R²² 具有如上述 R¹⁶ 的界定，且与 R¹⁶ 相同或不同，或代表羧基、甲酰基或具有达 5 个碳原子的直链或支链酰基，其中环烷基、芳基及/或杂环视需要经选自由下列所构成

群组的相同或不同取代基进行单或多取代：卤素、三唑基 (triazoly1)、三氟甲基、三氟甲氧基、羧基、具有达 6 个碳原子的直链或支链酯基或烷氧羰基、硝基，及/或经下式基团进行取代： $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{OR}^{23}$ 、 $-(\text{SO}_2)_e\text{NR}^{24}\text{R}^{25}$ 、 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{26})(\text{OR}^{27})$ ，其中，

e 代表数 0 或 1；

R^{23} 代表下式基团：



，或代表环烷基具有 3 至 7 个碳原子，或代表氢或具有达 4 个碳原子的直链或支链烷基，该烷基视情况经具有 3 至 7 个碳原子的环烷基、苯甲氧基、四羟吡喃基、四羟呋喃基、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基或烷氧羰基、羧基、苯甲氧羰基或苯基取代，该苯基可经选自由下列所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代：具有达 4 个碳原子的直链或支链烷氧基、羟基和卤素，及/或烷基视情况经式 $-\text{CO}-\text{NR}^{28}\text{R}^{29}$ 或 $-\text{CO}-\text{R}^{30}$ 基团进行取代，其中，

R^{28} 和 R^{29} 相同或不同，各代表氢或具有达 8 个碳原子的直链或支链烷基；或

R^{28} 和 R^{29} 与附接的氮原子一起形成 5 至 7 环员饱和杂环，该杂环视情况可再含有选自由 S 和 O 所构成群组的杂原子；

R^{30} 代表苯基或金刚基；

R^{24} 与 R^{25} 具有如上述 R^{18} 与 R^{19} 的界定，且与 R^{18} 、 R^{19} 相同或不同；

R^{26} 与 R^{27} 具有如上述 R^{10} 和 R^{11} 的界定，且与 R^{10} 、 R^{11} 相同或不同，及/或为环烷基、芳基，及/或该杂环视情况经具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基取代而该烷基视

情况经羟基、羧基取代，经 5 至 7 环员杂环取代而该杂环具有达 3 个选自由 S、N 和 O 所构成群组的杂原子，或经式 $-\text{SO}_2-\text{R}^{31}$ 、 $\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{32})(\text{OR}^{33})$ 或 $-\text{NR}^{34}\text{R}^{35}$ 基团取代，其中，

R^{31} 代表氢或具有如上述 R^9 的界定，且与 R^9 相同或不同； R^{32} 与 R^{33} 具有如上述 R^{10} 与 R^{11} 的界定，且与 R^{10} 、 R^{11} 相同或不同；

R^{34} 和 R^{35} 相同或不同，各代表氢或具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基，而该烷基视情况经羟基或具有达 4 个碳原子的直链或支链烷基取代；或

R^{34} 和 R^{35} 与所附接的氮原子一起形成 5 至 6 环员饱和杂环，该杂环可再含有选自由 S 和 O 所构成群组的杂原子，含有式 $-\text{NR}^{36}$ 基团，其中，

R^{36} 代表氢、羟基、具有达 7 个碳原子的直链或支链烷氧羰基，或具有达 5 个碳原子的直链或支链烷基，该烷基视情况经羟基取代；或

R^3 和 R^4 与所附接的氮原子一起形成 5 至 7 环员不饱和或饱和或部分不饱和且视需要与苯基并合的杂环，该杂环可视需要含有达 3 个选自由 S、N 和 O 所构成群组的杂原子，或含有式 $-\text{NR}^{37}$ 基团，其中，

R^{37} 代表氢、羟基、甲酰基、三氟甲基、直链或支链酰基、具有达 4 个碳原子的烷氧基或烷氧羰基，或代表具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基，而该烷基视情况经选自由下列所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代：羟基、三氟甲基、羧基、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基或烷氧羰基，或经式 $-(\text{D})_f-\text{NR}^{38}\text{R}^{39}$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_g-\text{O}-\text{CO}-\text{R}^{40}$ 、 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_h-\text{OR}^{41}$ 或 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{42})(\text{OR}^{43})$ 基团取代，其中，

g 和 h 相同或不同，各代表数 1、2、3 或 4；

f 代表数 0 或 1；

D代表式 $-\text{CO}$ 或 $-\text{SO}_2$ 基团；

R^{38} 和 R^{39} 相同或不同，各具有如上述 R^7 和 R^8 的界定；

R^{40} 代表具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基；

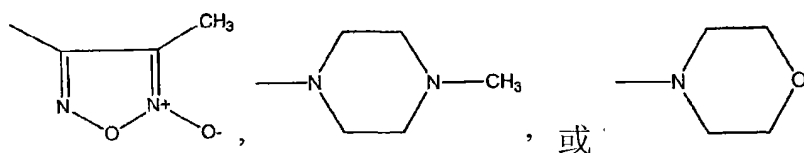
R^{41} 代表具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基；

R^{42} 和 R^{43} 相同或不同，各代表氢或具有达 4 个碳原子的直链或支链烷基；或

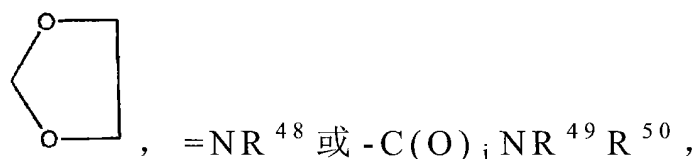
R^{37} 代表式 $-(\text{CO})_i-\text{E}$ 基团，其中， i 代表数 0 或 1；

E 代表具有 3 至 7 个碳原子的环烷基或苯甲基，代表具有 6 至 10 个碳原子的芳基或 5 至 6 环员芳香族杂环，而该杂环具有达 4 个选自由 S、N 和 O 所构成群组的杂原子，其中，该上述环系统视需要经选自由下列所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代：硝基、卤素、 $-\text{SO}_3\text{H}$ ，具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基、羟基、三氟甲基、三氟甲氧基，或经式 $-\text{SO}_2-\text{NR}^{44}\text{R}^{45}$ 基团取代，其中， R^{44} 和 R^{45} 具有如上述 R^{18} 和 R^{19} 的界定，并且与 R^{18} 、 R^{19} 相同或不同；或

E 代表下式基团：



列在 R^3 和 R^4 下，与附接的氮原子一起形成的杂环，视需要经选自由下列所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代，如果适合亦能重复：羟基、甲酰基、羧基、具有达 6 个碳原子的直链或支链酰基或烷氧羰基、硝基，和式 $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{46})(\text{OR}^{47})$ 、



其中，

R^{46} 和 R^{47} 具有如上述 R^{10} 和 R^{11} 的界定，且与 R^{10} 、 R^{11}

相同或不同；

R^{48} 代表羟基或具有达 4 个碳原子的直链或支链烷氧基；
 j 代表数 0 或 1；以及

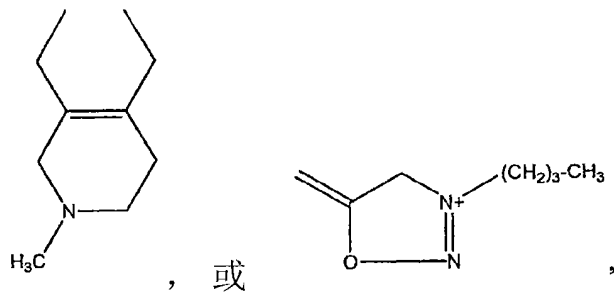
R^{49} 和 R^{50} 相同或不同，且具有如上述 R^{14} 和 R^{15} 的界定，及/或列在 R^3 和 R^4 下，与附接的氮原子一起形成的杂环，视需要经具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基取代，该烷基视需要经选自由下列所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代：羟基、卤素、羧基、环烷基或环烷氧基各具有 3 至 8 个碳原子、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基或烷氧羰基，或经式 $-SO_3H$ 、 $-NR^{51}R^{52}$ 或 $P(O)OR^{53}OR^{54}$ ，基团取代，其中，

R^{51} 和 R^{52} 相同或不同，各代表氢、苯基、羧基、苯甲基或具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基或烷氧基；

R^{53} 和 R^{54} 相同或不同且具有如上述 R^{10} 和 R^{11} 的界定，及/或该烷基视需要经具有 6 至 10 个碳原子的芳基取代，而该芳基可经选自由卤素、羟基、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基所构成群组的相同或不同取代基进行单或多取代，或经式 $-NR^{51'}R^{52'}$ 基团取代，其中，

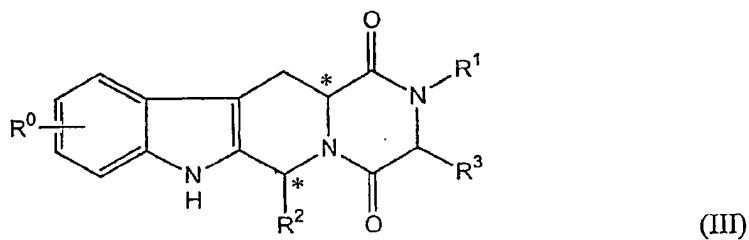
$R^{51'}$ 和 $R^{52'}$ 具有如上述 R^{51} 和 R^{52} 的界定，且与 R^{51} 、 R^{52} 相同或不同，及/或列在 R^3 和 R^4 下与附接的氮原子一起形成的杂环，视需要经具有 6 至 10 个碳原子的芳基取代，或经 5 至 7 环员饱和、部分不饱和或不饱和杂环取代，而该杂环具有达 3 个选自由 S、N 和 O 所构成群组的杂原子，视需要亦通过氮原子的功能进行键结，其中该环系统可经羟基或经具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基或烷氧基取代；或

R^3 和 R^4 一起与氮原子形成下式基团：



R^5 和 R^6 相同或不同，各代表氢、具有达 6 个碳原子的直链或支链烷基、羟基或代表具有达 6 个碳原子的直链或支链烷氧基。

其它适合的化合物包括该些具下式 III 的化合物及其医药上可接受的盐和溶剂合物(例如,水合物):

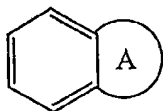


(III)

式中， R^0 代表氢、卤素或 C_{1-6} 烷基；

R^1 代表氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、卤素 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-3} 烷基、芳基 C_{1-3} 烷基或杂芳基 C_{1-3} 烷基；

R^2 代表视需要经取代的单环芳香族环，而该芳香族环是选自苯、噻吩、呋喃和吡啶，或视需要经取代的双环：

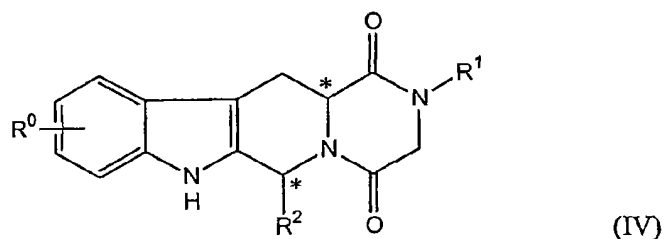


R^2 通过苯环的一个碳原子与该化合物分子的其它部分键结，其中，并合的 A 环是 5 至 6 环员的环，该环可为饱和或部分不饱和或完全不饱和，且该 A 环包含碳原子和视需要有一或二个选自氧、硫和氮的杂原子；以及

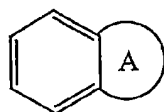
R^3 代表 C_{1-3} 烷基的氢，或 R^1 和 R^3 一起代表 3 或 4 员的烷

基或烯基链；

某些较佳的化合物亦包含该些具下式 IV 的化合物，及其医药上可接受的盐和溶剂合物(例如水合物)：

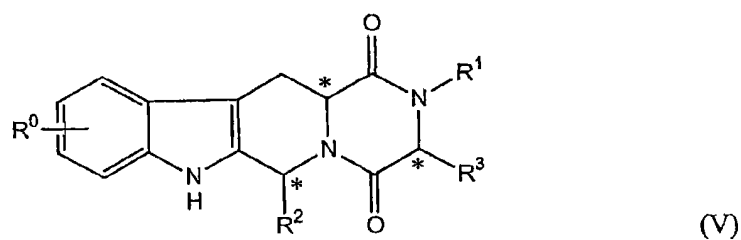


于式 IV 中， R^0 代表氢、卤素或 C_{1-6} 烷基； R^1 代表氢、 C_{1-6} 烷基、卤素 C_{1-6} 烷基、 C_{3-8} 环烷基 C_{1-3} 烷基、芳基 C_{1-3} 烷基或杂芳基 C_{1-3} 烷基；以及 R^2 代表视需要经取代的单环芳香环，而该芳香环是选自苯、噻吩、呋喃和吡啶，或 R^2 代表视需要经取代的双环：



R^2 通过苯环的一个碳原子与该化合物分子的其它部分键结，其中，并合的 A 环是 5 至 6 环员的环，该环能为饱和或部分不饱和或完全不饱和，且该 A 环包含碳原子和视需要有一或二个选自氧、硫和氮的杂原子。

用在本发明中的其它较佳化合物群为具下式 V 的化合物，及其医药上可接受的盐和溶剂合物(例如，水合物)：

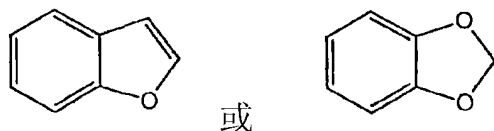


，式 V 中：

R^0 代表氢、卤素或 C_{1-6} 烷基；

R^1 代表氢或 C_{1-6} 烷基；

R^2 代表双环：

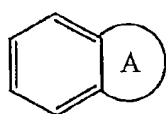


，该双环视需要能经一或多个选自卤素和 C_{1-3} 烷基的基团取代；以及

R^3 代表代表氢或 C_{1-3} 烷基。

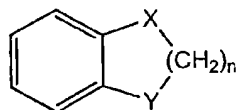
关于上述式 IV 中 R^1 ，作为芳基 C_{1-3} 烷基基团中一部份的“芳基”术语，意指苯基或经选自卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和亚甲二氧基 (methylenedioxy) 的一或多个 (例如，1、2 或 3) 取代基所取代。作为杂芳基 C_{1-3} 烷基基团中一部份的“杂芳基”术语，意指噻吩基、呋喃基或吡啶基，并视需要经选自卤素、 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 烷氧基的一或多个 (例如，1、2 或 3) 取代基所取代。作为 C_{3-8} 环烷基 C_{1-3} 烷基基团中一部份的“ C_{3-8} 环烷基”术语，意指单环结构包含 3 至 8 个碳原子。适合的环烷基环实例包括 C_{3-6} 环烷基环：环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

关于上述式 IV 中 R^2 ，可供选择的苯环取代物为选自包含卤素、羟基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、 CO_2R^b 、卤素 C_{1-6} 烷基、卤素 C_{1-6} 烷氧基、氰基、硝基和 NR^aR^b 的一或多个 (例如，1、2 或 3) 原子或基团，其中 R^a 和 R^b 各为氢或 C_{1-6} 烷基，或 R^a 亦能代表 C_{2-7} 烷醯基或 C_{1-6} 烷磺醯基。用在该环系统其余部份的可供选择的取代基，是选自包含卤素、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和如上所定义芳基 C_{1-3} 烷基的一或多个 (例如，1、2 或 3) 原子或基团。双环：



，例如，能代表萘、杂环例如苯并恶唑 (benzoxazole)、

苯并噻唑、苯并异恶唑、苯并咪唑、喹啉(quinoline)、吲哚、苯并噻吩、苯并呋喃，或



，其中，n为整数 1 或 2，X和Y各能代表CH₂、O、S或NH。

参见美国专利：第 6,916,927、6,911,542、6,903,099、6,878,711、6,872,721、6,858,620、6,825,197、6,774,128、6,723,719、6,699,870、6,670,366、5,859,006 和 5,250,534 号。其它适用在本发明方法的 PDE5 抑制剂在 WO 03/063875、WO 03/1012761、WO 2004/037183 和 WO 98/38168 中有描述。所有这些专利和专利申请书整个并于本说明书中作为参考文献。

商业上可购得的昔多芬有 25、50 或 100 毫克三种剂量，具有大约 10nM的 IC₅₀。血浆中有效浓度是在 1nM至 250nM间，该范围底限是任一在 1nM至 249nM间的整数；该范围上限是任一在 2nM至 250nM间的整数。较佳地，血浆中有效浓度是在 5nM至 100nM间，而更佳地，是在 10nM至 50nM间(例如，15nM、20 nM、25 nM、30 nM、40 nM或 45 nM)。

商业可购得的他达拉非有 5、10 或 20 毫克三种剂量，具有大约 1nM 的 IC₅₀。对健康受试者给予 20 毫克的他达拉非口服剂量后，他达拉非迅速地被吸收，且在投药二小时后有 378 奈克/毫升的最高血浆中浓度。血浆中有效浓度较佳是在 5nM 至 100nM 间，更佳是在 10nM 至 50nM 间(例如，15nM、20nM、25nM、30nM、40nM 或 45nM)。他达拉非有相当大而明显的体积分布(Vd/F) 62.6 升，和明显低的口服清除率(CL/F) 2.48 升/小时。结果，他达拉非的平均排除半衰期是大约 17.5 小时，实

质上比昔多芬或伐地那非的平均排除半衰期长。

商业上可购得的伐地那非有 5 毫克、10 毫克和 20 毫克三种剂量，具有大约 0.7nM 的 IC₅₀。伐地那非的血浆中有效浓度是在 0.1nM 至 5.0nM 间。

熟于本领域技艺者将明了，降低 PDE5 活性的任何化合物是适用在本发明方法中。其它适用在本发明方法中的化合物实例包括 UK-343,664 (Walker 等人, *Xenobiotica*, 31: 651-664)、UK-427,387、UK-357903 [1-乙基-4-{3-[3-乙基-6,7-二氢-7-侧氧基-2-(2-吡啶甲基)-2H-吡啶[4,3-d]嘧啶-5-基]-2-(2-甲氧乙氧基)-5-吡啶磺酰基}六氢吡嗪] (Gardiner 等人, *J. Pharmacol Exp Ther.* 2005, 312: 265-271)、UK-371800 (Pfizer)、UK-313794 (Pfizer) 和 UK-343664 (Abel 等人, *Xenobiotica*. 2001 31:665-76); TA-1790 from Tanabe Seiyaku; CP-248、CP-461 和磺酸舒林酸 (exisulind) (Deguchi 等人, *Molecular Cancer Therapeutics* 803-809, 2002), 该些可从 OSI Pharmaceuticals 公司购得; 吡啶啉酮 (pyrazolinone); EMD82639 (4-(4-[2-乙基苯胺]亚甲基)-3-甲基-5-侧氧基-4,5-二氢吡啶-1-基)苯甲酸 (Senzaki 等人, *FASEB Journal*. 2001, 15:1718-1726); [7-(3-氯-4-甲氧基苯甲胺基)-1-甲基-3-丙基-1-氢-吡啶[4,3-d]嘧啶-5-基甲氧基]乙酸 (EMD360527)、4-[4-(3-氯-4-甲氧基苯甲胺基)苯[4,5]噻吩[2,3-d]嘧啶-2-基]环己基甲酸、乙醇胺盐 (EMD221829) 和 5-[4-(3-氯-4-甲氧基苯甲胺基)-5,6,7,8-四氢苯[4,5]噻吩[2,3-d]嘧啶-2-基]戊酸 (EMD171827), 该些可从 Merck KgaA (Darmstadt, 德国) 购得, 且在例如 Scutt 等人中有说明 (*BMC Pharmacol*. 2004, 4: 10); 3-(1-甲基-7-侧氧基-3-丙基-6,7-二氢-1H-吡啶[4,3-d]嘧啶-5-基)-N-[2-(1-甲基吡咯啶-2-基)乙基]-4-丙氧基苯磺酰胺 (DA-8259); E-4021 (Dukarm 等人, *Am. J. Respir. Crit.*

Care Med.,1999,160:858-865); 己酮可可碱(pentoxifylline)及 FR22934 (Fujisawa)。

医药上的组合物

本发明特征为医药上制剂，包含 PDE5 A 抑制剂(例如，昔多芬、伐地那非、他达拉非或其类似物)与医药上可接受的载体，其中该化合物用于治疗实质上任何的心脏征候，该征候特征为心脏组织的肥大形态、细胞或分子的重塑。本发明的医药制剂具有治疗和预防疾病上的应用。在一具体实例中，医药组合物包括有效量的 PDE5 抑制剂。该组合应无菌且含有治疗上适合投予患者(例如，人类病患)的 PDE5 抑制剂有效重量或体积。发明的组合物和组合能是医药包的一部分，其中 PDE5 抑制剂以个别的剂量型式呈现。

用在预防或治疗投药的本发明医药组合物应无菌。利用通过无菌滤膜(例如，0.2 微米的膜)的过滤法；伽玛照射或任何其它习知的适当方法，能很快地达到无菌状态。治疗用的组合物一般置入至具有无菌存取口的容器中，例如，静脉溶液袋或药水瓶，而该药水瓶有瓶塞可遭皮下射入针所刺穿。当作为水溶液或复水用的冻干配方使用时，这些组合物通常以单位或多重剂量容器(例如，经密封的安瓿瓶或药瓶)的方式存放。

PDE5 抑制剂视需要可与医药上可接受的赋形剂相组合。本文中所用的术语"医药上可接受的赋形剂"指的是一或多种可兼容的固体或液体填充剂、稀释剂或使胶囊化的物质，适合用在投入人体。术语"载体"表示有机或无机成份，为天然或合成的，与活性成分相结合以促进投药。医药组合物的成分亦能与本发明的 PDE5 抑制剂共同混合，且以无实质上削弱所欲医药功效的交互作用的方式，彼此相混合。

本发明的化合物能含有医药上可接受的赋形剂。赋形剂较佳为含有微量的添加剂，譬如增强等渗压性和化学稳定性的物质。这样材料在使用的剂量和浓度上对使用者而言是无毒的，该材料包括缓冲剂譬如磷酸盐、柠檬酸盐、丁二酸盐、醋酸盐、乳酸盐、酒石酸和其它有机酸或其盐；参-羟甲基氨基甲烷(TRIS)、碳酸氢盐、碳酸盐和其它有机碱及其盐；抗氧化剂譬如抗坏血酸；低分子量(例如，约小于十个残基)多肽例如聚精氨酸、聚赖氨酸、聚谷氨酸和聚天门冬氨酸；蛋白质譬如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水聚合物譬如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚丙二醇(PPGs)和聚乙二醇(PEGs)；胺基酸譬如甘氨酸、谷氨酸、天门冬氨酸、组氨酸、赖氨酸或精氨酸；单糖、双糖和其它碳水化合物包括纤维素或其衍生物、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、糊精或硫酸化碳水化合物的衍生物譬如肝素(heparin)、硫酸软骨素(chondroitin)或硫酸葡聚糖(dextran sulfate)；多价金属离子譬如二价金属离子包括钙离子、镁离子和锰离子；螯合剂譬如伸乙二胺四醋酸(EDTA)；糖醇譬如甘露糖醇或山梨糖醇；平衡离子譬如钠或氨；及/或非离子型表面活性剂譬如聚山梨酯或泊洛沙姆(poloxamer)。可包括使用其它添加剂譬如安定剂、抗菌剂、惰性气体、流体和营养素补充剂(即，林格氏(Ringer's)葡萄糖)、电解质补充剂等，以上该些添加剂能以惯用的量来使用。

如上所述的组合物能以有效量来投予。有效量将取决于投药方式、所治疗的特殊病症和预期的结果。它亦可能取决于病症的阶段、患者的年龄和身体情况、同步治疗的性质，以及若有的话，像为执业医生所习知的因素。为了用在治疗，需有足够的剂量来达到在医疗上期望的结果。

对于患有心脏疾病或与形态肥大、细胞或分子重塑

有关的病症的患者而言，有效量是足够用来预防、降低、稳定或逆转与心脏病肥大有关的改变。对于患有心脏疾病或病症的患者而言，有效量是充分稳定、减慢或降低与心脏病症有关的剂量。通常，本发明化合物的剂量大约从每天 0.01 毫克/公斤至大约每天 1000 毫克/公斤。在一具体实例中，对患者投予 25、50、75、100、125、150 或 200 毫克的 PDE5 抑制剂譬如昔多芬。较佳地，投予 100 毫克的 PDE5 抑制剂。期望的是，所投予 PDE5 抑制剂的量足够在血浆中达到 10、25、50、75 或 100nM 的峰值浓度。较佳地，峰值浓度为 50nM。有效剂量范围从 0.1nM 至 200nM，该范围底限是任一在 1 至 199 间的整数，而该范围上限是任一在 2 至 200 间的整数。期望的是，有效剂量产生的血浆中游离 PDE5 抑制剂浓度范围为 10 至 50nM，但能高达 200 nM 或低至 1 至 2nM。浓度实例包括 0.1、1、5、10、20、25、30、40 或 50 nM。据估计，剂量范围从大约 5 至大约 2000 毫克/公斤将是适当的，视所使用的特定 PDE5a 抑制剂而定。更低的剂量将用在某些投药方式，譬如静脉投药和配药。在患者对最初使用剂量的反应不充分时，可使用较高的剂量(或以不同、较局部的传递途径提高有效剂量)，而该剂量在病人可耐受的范围。亦可考量每天多重剂量使本发明组合物达到适当的全身浓度。

可使用各种的投药途径。本发明的方法，一般而言，可应用任何医疗上可接受的投药方式，意谓任何产生活性化合物有效浓度而没有导致临床不可接受不利影响的方式。在一较佳具体实例中，本发明的组成物是口服投药。其它投药的方式包括直肠、局部、眼内、口腔、阴道、脑池、脑室、气管、鼻、透过皮肤、在插入管内/上或非经肠的投药途径。术语"非经肠"包括皮下、气管、静脉、肌肉、腹膜或注入。静脉或肌肉途径对于长期疗

法和预防并不是特别适当，然而，在紧急情况时，该途径也许较佳。包含本发明组合物的组合物能添加至生理流体譬如血液。口服给药对预防性的治疗较佳，因为便于患者使用以及投药剂量安排。

本发明的医药组合物能包含一或多种 pH 缓冲化合物，以使配方的 pH 值维持在反映生理 pH 值的给定范围内，譬如大约 5.0 至大约 8.0 的范围。使用于水溶液配方的 pH 缓冲化合物能是氨基酸或氨基酸混合物，譬如组氨酸或氨基酸譬如组氨酸和甘氨酸的混合物。可选择地，pH 缓冲化合物较佳是维持配方的 pH 值在给定范围内，譬如维持在大约 5.0 至大约 8.0 的范围，该缓冲化合物不螯合钙离子。此 pH 缓冲化合物的实例包括，但不限制于，咪唑和醋酸根离子。pH 缓冲化合物可以任何适合维持配方的 pH 值在给定范围内的量存在。

本发明的医药组合物亦能含有一或多种渗透调控剂，即调控配方渗透性质(例如，渗透性、渗透莫耳浓度及/或渗透压)至对使用者个体的血液和血细胞是可接受的程度。渗透调控剂能为不螯合钙离子的试剂。渗透调控剂能为任何熟于本领域技艺者所习知或可得到的用来调控配方渗透性质的化合物。熟于本技艺者可依经验来确定所给予的渗透调控剂用在本发明配方的适合性。适当渗透调控剂类型的实例包括，但不限制为，盐类譬如氯化钠和醋酸钠；糖譬如蔗糖、葡萄糖和甘露糖醇；氨基酸譬如甘氨酸；及一或多种这些试剂的混合物及/或试剂类型。渗透调控剂可以任何足够来调控配方渗透性质的浓度存在。

包含本发明化合物的组合物能含有多价金属离子譬如钙离子、镁离子及/或锰离子。任何有助于稳定该组合物且对使用者无不利影响的多价金属离子可予以使用。熟于本领域技艺者，根据这二个准则，能凭经验确定适

当的金属离子，此金属离子的适当来源已习知，其来源包括无机和有机盐。

本发明的医药组合物亦能为非水溶液液体配方。可使用任何适当的非水溶液液体，只要该液体对含在其中的活性试剂赋予稳定性。较佳地，非水溶液液体是亲水性液体。适当非水溶液液体的例子包括：甘油；二甲亚砜(DMSO)；聚二甲基硅氧烷(PMS)；乙二醇譬如乙二醇、二乙二醇、三乙二醇、聚乙二醇("PEG") 200、PEG 300和PEG 400；及丙二醇譬如二丙二醇、三丙二醇、聚丙二醇("PPG") 425、PPG 725、PPG 1000、PPG 2000、PPG 3000和PPG 4000。

本发明的医药组合物亦能为混合的水溶液/非水溶液液体配方。任何适当的非水液体配方譬如以上所述者，能与任何水溶液液体配方一起使用譬如以上所述者，只要该混合的水溶液/非水溶液液体配方对包含在其中的化合物赋予稳定性。较佳地，在此配方中的非水溶液液体是亲水性液体。适当非水溶液液体的例子包括：甘油；DMSO；PMS；乙二醇譬如PEG200、PEG300和PEG400；及丙二醇譬如PPG 425、PPG 725、PPG 1000、PPG 2000、PPG 3000和PPG 4000。

适当的稳定配方能允许活性试剂以冷冻或未冷冻的液体状态储存。稳定的液体配方能存放在至少-70℃的温度，亦能存放在至少0℃的较高温度，或存放在大约0.1℃至大约42℃间，根据组合物的性质而定。熟于技艺者都知道，蛋白质和多肽对pH、温度和其它因子多样性的改变是相当敏感的，而这些可能会影响治疗的效力。

其它传递系统能包括缓慢释放、延迟释放或持续释放的传递系统。这样的系统能避免本发明组合物的重复投予，因而增加对患者和医师的便利性。有许多类型的释放传递系统可利用，对该些具本领域通常技艺者而言

是习知的。他们包括聚合物基本系统譬如聚乳酸 (polylactides)(美国专利第 3,773,919 号、欧洲专利第 58,481 号)、聚乳酸甘醇酸 (poly(lactide-glycolide))、共聚草酸酯 (copolyoxalates)、聚己内酯、聚酯醯胺、聚原酸酯 (polyorthoesters)、聚羟丁酸譬如聚 -D-(-)-3-羟丁酸 (欧洲专利第 133, 988 号)、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸盐共聚合物 (Sidman, K.R. 等人, Biopolymers 22: 547-556)、聚 2-羟乙基异丁烯酸或乙酸伸乙基乙烯酯 (ethylene vinyl acetate)(Langer, R. 等人, J. Biomed. Mater. Res. 15:267-277 ; Langer, R. Chem.Tech. 12:98-105), 和聚酸酐。

持续性释放组合物的其它例子包括有具体化形状的半通透性聚合物基质, 例如薄膜或微胶囊。传递系统亦包括非聚合物系统, 他们是: 油脂包括甾醇譬如胆固醇、胆固醇酯类和脂肪酸, 或中性油脂譬如单、双和三甘油酯; 水凝胶释放系统譬如生物衍生出的生物再吸收水凝胶 (即, 几丁质水凝胶或几丁聚糖水凝胶); 硅橡胶 (sylastic) 系统; 胜肽系统; 蜡涂层; 使用习知结合剂和赋形剂的压缩药片; 部份融合的插入管等。具体例子包括, 但不限制为: (a) 浸蚀系统, 其中该试剂以在基质内的形式包含在该系统中, 而基质例如为该些美国专利第 4,452,775、4,667,014、4,748,034 和 5,239,660 所揭示者; 及 (b) 扩散系统, 其中活性成分以受控制的速率通透过聚合物, 而该聚合物例如为美国专利第 3,832,253 和 3,854,480 所揭示者。

传递系统的其它类型能使用于发明方法和组合物的是胶体分散系统。胶体分散系统包括油脂系的系统, 包括水包油乳化液、微胶粒、混合的微胶粒和微脂体。微脂体是人造膜水泡, 作为在活体内或在活体外的传递载体。单层大水泡 (LUV) 的尺寸范围为 0.2 至 4.0 微米, 能

将巨大的分子封入至水溶液内部，然后以具生物活性的型式载送至细胞中 (Fraley, R., 和 Papahadjopoulos, D., Trends Biochem. Sci. 6: 77-80)。

微脂体能通过与其特定配位子譬如单株抗体、糖、醣脂质或蛋白质的偶合而瞄准至特定的组织。微脂体可从 Gibco BRL 公司购得，例如 LIPOFECTINTM 和 LIPOFECTACETM，是由阳离子脂质譬如氯化 N-[1-(2,3-二油基氧基)-丙基]-N,N,N-三甲铵 (DOTMA) 及溴化二甲基二(十八基)铵 (DDAB)。制造微脂体的方法为本领域所习知，在许多出版物里已有叙述，例如德国专利 DE 3,218,121; Epstein 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (美国) 82:3688-3692 (1985); Hwang 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (美国) 77:4030-4034 (1980); 欧洲专利 EP 52,322; EP 36,676; EP 88, 046; EP 143,949; EP 142,641; 日本专利申请案 83-118008; 美国专利 4,485,045 及 4,544,545; 以及 EP 102,324。微脂体亦已由 Gregoriadis, G. 于 Trends Biotechnol., 3: 235-241 作回顾。

其它类型的载具是生物兼容性的微粒子或适于植入哺乳动物使用者的植入管。依据本发明方法，适用的生物浸蚀植入管揭示在 PCT 国际申请案 PCT/US/03307 (公开号 WO 95/24929, 标题为"聚合物基因传递系统")。PCT/US/03307 描述了在适当启动子的控制下，用于含外生基因的生物兼容、较佳为生物可分解的聚合物基质。能使用聚合物基质来达到患者体内外生基因或基因产品的持续释放。

聚合物基质较佳为微粒子的形式，譬如微球体(试剂分散在整个固体聚合物基质中)或微胶囊(试剂存放在聚合物壳的核心中)。前述聚合物的微胶囊含有药物，已揭示在例如美国专利 5,075,109 中。其它用于含试剂的聚合物基质形式包括薄膜、涂层、胶体、植入管和支架。选

择聚合物基质装置的尺寸和组合物，以在导入基质的组织中产生有利的释放动力学。又根据将使用的传递方法，选择聚合物基质的尺寸。较佳地，当使用气胶路径时，聚合物基质和组合物是包含在表面活性剂载具内。能选择聚合物基质组合物，使二者都具有令人满意的降解速率，并亦可由生物黏着剂材料所形成，以进一步增加转移的效率。亦能选择非降解而是通过扩散方式在一段时间内进行释放的基质组合物。传递系统亦能为具生物兼容性的微球体，适合用于局部、特定位置的传递。这样的微球体揭露在 Chickering, D.E., 等人, *Biotechnol. Bioeng.*, 52: 96-101; Mathiowitz, E., 等人, *Nature* 386: 410-414。

能应用非生物可分解和生物可分解的聚合物基质来将本发明的组合物传递至患者。这样的聚合物可为天然或合成的聚合物。选择聚合物的根据是所期望的释放时间期，通常为数小时至一年或更长。典型地，释放期间从数小时至 3 至 12 个月是最适合的。聚合物视需为水凝胶的型式，其在水中能吸收的量大约高达其重量的 90%，并且视需要进一步与多价离子或其它聚合物交联。

能用来形成生物可分解的传递系统的合成聚合物实例包括：聚醯胺、聚碳酸酯、聚烯(polyalkylenes)、聚乙二醇、聚烯氧化物(polyalkylene oxides)、聚烯对苯二甲酸酯 (polyalkylene terephthalates)、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯卤化物(poly-vinyl halides)、聚乙烯吡咯烷酮、聚羟乙酸(polyglycolides)、聚硅氧烷、聚氨基甲酸酯(polyurethanes)和其共聚物、烷基纤维素、羟烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸酯和异丁烯酯的聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、纤维素乙酸酯、纤维素丙酸酯、纤维素乙酸丁酸酯、纤维素乙

酸邻苯二甲酸酯、羧乙基纤维素、纤维素三乙酸酯、纤维素硫酸钠盐、聚异丁烯酸甲酯、聚异丁烯酸乙酯、聚异丁烯酸丁酯、聚异丁烯酸异丁酯、聚异丁烯酸己酯、聚异丁烯酸异癸酯、聚异丁烯酸月桂酯、聚异丁烯酸苯酯、聚丙烯酸甲酯、聚丙烯酸异丙酯、聚丙烯酸异丁酯、聚丙烯酸十八酯、聚乙烯、聚丙烯、聚乙二醇、聚乙烯氧化物、聚乙烯对苯二甲酸酯、聚乙烯醇、聚乙烯乙酸酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙烯吡咯烷酮、和乳酸及羟乙酸的聚合物、聚酸酐、聚(原)酸酯、聚丁酸、聚戊酸、乳酸-己内酯共聚合物，和天然聚合物譬如藻酸盐和其它多醣体包括葡聚糖和纤维素、胶原蛋白、其化学衍生物(代替物，加入化学基团例如烷基、烯基、羟化、氧化和其它该些熟于本技艺者常用的修饰)、白蛋白和其它亲水性蛋白质、玉米蛋白和其它醇溶性蛋白和疏水性蛋白、其共聚物和混合物。通常，这些材料的降解不是通过酵素水解就是暴露于体内水中，利用表面或整体的侵蚀。

治疗方法

在一具体实例中，本发明提供抑制患者心脏中 PDE5 的方法，包含对患者授予 PDE5 抑制剂有效量的步骤，较佳地，额外包含医药上可接受的载体作为组合物的一部分。较佳地，这个方法是应用在治疗患有心脏病症或对心脏病症敏感的患者，而该心脏病症选自由心脏肥大、收缩功能降低、舒张功能降低、适应不良肥大症、收缩功能持平的心脏衰竭、舒张性心脏衰竭、高血压心脏病、大动脉狭窄、肥大性心肌病、缺血后心脏重塑和心脏衰竭。其它具体实例包括本说明书中的任何方法，其中该患者经确认须要做该征候的治疗。

本发明的另一态样，是在制造用来增强患者心脏功能或降低患者心脏形态上、细胞或分子的重塑的药剂时，

使用 PDE5 抑制剂。较佳地，该药剂是用来治疗或预防患者前述所提的疾病、病症或症候。

套组

本发明提供套组用来治疗或预防与心脏肥大 包括形态上、细胞或分子重塑有关的心脏病症。在一具体实例中，该套组包括药物包装，而该药物包装包含有效量的 PDE5 抑制剂(例如，PDE5a 抑制剂譬如昔多芬)。较佳地，该组合物是以单位剂量型式呈现。在一些具体实例中，该套组包含无菌容器，而该容器含有治疗或预防用的组合物；这样的容器能是盒、安瓿瓶、瓶子、小瓶子、管、包、袋、泡壳包装、或其它习知的容器。这样的容器能由塑料、玻璃、积层纸、金属箔或其它适合承载药剂的材料所制成。

如果所要的本发明组合物或其组合，与用来指示将它们投予有与心脏肥大相关的病症演变或存在演变风险的患者的说明书一起提供，则该说明书一般包括关于使用该化合物来治疗或预防与心脏肥大相关的信息。在另一具体实例中，该说明书包括至少下列一项：化合物或化合物组合的叙述；治疗心脏病症或其征候的剂量安排和投药方式；预防方法；警告；征候；反向症候；过量用药信息；有害反应；动物药理；临床研究；及/或参考文献。用药说明书可直接印在容器上(当有时)，或作为卷标贴到容器，或作为分开的纸片、小册子、卡片 或折页而放置在容器中内或与容器一起提供。

以下实施例用来阐述本发明，但并不用来限制本发明。该些熟于本技艺者将了解，在符合以上所述的发明下，以下所提供的特殊结构可用许多方式来进行改变，而仍保留该化合物或其组合的关键特性。

具体实施方式

实施例

实施例 1：抑制 PDE5A 使心脏肥大、重塑和纤维化钝化

成熟 C57BL6 老鼠进行 1 至 3 星期由横向主动脉收缩 (TAC) 所引发的慢性压力超载收缩，或进行假手术，然后同时用混合在固体食物中的 PDE5A 抑制剂-昔多芬 (100 毫克/公斤/日) 或赋形药治疗。TAC 引发显著的心脏腔室和细胞的肥大 (3 星期 +100%)，9 星期后演变成腔室扩张，其心肌缩短分率减小。TAC 的动物 (见第 1A 和 1B 图)，其肥大和腔室重塑皆受到 PDE5A 抑制剂-昔多芬的抑制，但是昔多芬对假手术控制组没有影响。游离血浆中昔多芬浓度平均约为 10nM (见第 2 图)，恰巧落在适于 PDE5A 的特定范围内，与使用标准临床剂量所达到的浓度相似。TAC 引发与时间有关的心肌纤维化及肌肉细胞肥大的加速，该二者皆受到 PDE5A 的抑制 (见第 1C 图，例如，9 星期后心肌纤维化减少 67%， $p < 0.0001$)。此效应是以药理学上的适当剂量来达成 (见第 2 图)。使用 100 毫克/公斤/日的口服剂量，得到游离血浆中昔多芬浓度为 10nM。以可任择使用的高选择性 PDE5A 抑制剂 (EMD 360527) 进行各别研究，得到支持药物级作用的相同结果 (见第 5A 图)。

实施例 2：抑制 PDE5A 逆转了已形成的肥大

对于抑制 PDE5A 是否能逆转已存在的肥大的更多临床上应用问题进行测试。老鼠处于 TAC 状态 7 至 10 天，此使心脏重量增加 63% ($p < 0.005$) 而腔室未扩张 (见第 3A 图)。将实验动物分成二组，一组以昔多芬再治疗 2 星期，而另一组 (控制组) 只使用赋形药。观察 1 星期 TAC 的肌肉细胞肥大和间质纤维化，以昔多芬治疗后该二症状皆向基线逆转 (见第 3B 图)。以昔多芬治疗的动物，其一连串超音波心动图显示，左心室重量和壁厚度逐渐减少，而收缩射出持平 (见第 3C 图)。

实施例 3：尽管持续后负荷，心脏功能仍增强

以侵袭性压力-容积(PV)分析进行详细的心脏功能检查。第 4A 图显示，在腔室前负荷瞬间减少前与瞬间减少期间测定 PV 循环，以产生特定的收缩和舒张功能指数。如实施例所示，TAC(3 星期)的 PV 循环和对应的收缩与舒张界限关系向右移动-此与腔室重塑相符合。以昔多芬共同治疗，结果使心脏容积持平和使收缩功能提高(例如，收缩末期压力和容积间关系的斜率，图中实线)。同样治疗 3 星期的假手术控制组显示没有变化。在肥大形成后投予昔多芬时，心脏功能亦获得改善。由此可见，使用 PDE5 抑制剂治疗，预防或逆转了与心脏肥大相关的心脏功能改变。

此分析的总结结果显示在第 4B 图。无视于治疗方式，TAC 相等地提高心室后负荷(标示为 E_a)，只有以赋形药治疗的 TAC 动物显示出射出分率(EF)减小。昔多芬恢复或改善了与负载无关的参数(最大力量指数(PMXI)和前负荷再充盈博功(M_{sw}))所评估的控制组和只经 TAC 的心脏收缩功能，而舒张功能(τ 及压力下降的峰速率 - $dP/dt_{\text{最小}}$)也有类似的结果。其它的功能和超音波心动图数据显示在表 1 和表 2。

表 1: 昔多芬治疗对在有意识的老鼠的左心室结构和功能的连续超音波心动图测量测值的作用。

		控制组	TAC-3 周	TAC-6 周	TAC-9 周
以载剂治疗		n = 7	n = 12	n = 7	n = 8
脏壁厚度	mm	0.69±0.05	1.24±0.03†	0.90±0.03††	0.90±0.05††
LV Dim (dia)	mm	2.85±0.05	3.40±0.14	4.94±0.23 ††	5.16±0.36 ††
LV Dim (sys)	mm	0.92±0.01	2.18±0.21†	3.98±0.36 ††	4.31±0.49 ††
LV Mass	mg	55.4±1.5	175.7±13.5 †	195.3±9.3 †	208.3±14.1 †
EF	%	96.6±0.2	70.9±4.7 †	45.3±7.3 ††	41.3±8.0 ††
HR	min ⁻¹	631±21	631±15	610±23	531±33†
以昔多芬治疗		n = 9	n = 18	n = 7	n = 7
脏壁厚度	mm	0.71±0.02	0.82±0.02*†	0.86±0.03†	0.86±0.03†
LV Dim (dia)	mm	2.87±0.09	3.09±0.06*	3.67±0.24*†	4.14±0.36*††
LV Dim (sys)	mm	0.89±0.05	1.17±0.08*	2.24±0.37*††	2.54±0.57*††
LV Mass	mg	59.1±5.6	82.2±5.0*	115.6±14.2*†	142.5±21.5*††
EF	%	96.5±0.2	93.4±1.1*	74.9±7.1 *††	71.7±9.9 *††
HR	min ⁻¹	634±9	595±7	617±18	608±25

资料为平均值±标准差，LV Dim(LV短轴尺寸，short axis dimension)，dia-舒张；sys-收缩。LV Mass-根据椭圆模式(truncated ellipsoid model)所估计的LV质量；EF-射出比率；HR-心跳速率。*表对于载剂治疗达p < 0.05；†表对于控制组达p < 0.05；‡表对于TAC3周达p < 0.05。

表 2: 普多芬治疗在有或没有TAC的情况下, 对由血压-容积分析所获得的
心脏血液动力学的作用

	控制组 n=5	普多芬3周 n=5	3周TAC n=6	3周TAC + 普多芬 n=5	3星期TAC+延迟2星期后 加入普多芬 n=4	ANOVA
HR	522.6±13.7	558.5±22.9	520.0±12.9 (a)	598.8±23.8	574.6±21.7	0.032
ESP	102.0±2.0	101.5±2.6	159.6±4.6 (b)	163.6±5.6 (b)	184.0±9.1 (b)	<0.0001
EDP	5.4±1.0	6.5±1.0	7.1±1.4	7.6±1.4	7.5±0.6	NS
Ea	5.5±0.4	5.3±0.5	10.4±0.5 (b)	10.5±0.8 (b)	9.9±0.6 (b)	<0.0001
EDV	29.0±2.0	32.8±2.3	38.8±3.4 (c)	22.2±1.5	29.4±2.0	<0.001
ESV	10.2±1.0	13.0±2.7	23.3±3.3 (d)	6.4±1.7	10.9±2.1	<0.0005
EF	65.1±2.1	61.4±6.1	41.3±3.5 (d)	72.6±5.7	64.0±4.7	0.001
CO	9.9±0.7	11.1±1.1	8.0±0.3 (e)	9.4±0.5	10.7±0.5	0.026
dP/dt _{max}	13368±370	11843±681	12602±620	18638±1379 (f)	14879±898	<0.001
dP/dt _{max} /IP	205.1±6.6	183.7±6.9	192.2±6.9	256.5±8.4 (g)	209.4±11.1	<0.001
PMXI	31.6±0.9	32.7±3.5	41.5±1.9	63.0±6.7 (h)	58.6±7.1 (i)	<0.0005
Msw	79.4±4.1	84.0±5.7	120.8±12.6	162.5±10.5 (i)	171.3±27.6 (i)	<0.0001
Ees _n	37.9±5.8	47.6±5.8	70.2±13.4	133.0±25.1 (i)	111.0±31.4	<0.005
Tau	7.8±0.3	7.6±0.4	9.7±0.5 (d)	6.3±0.4	7.5±0.3	<0.0001
dP/dt _{min}	-10728±236	-10689±399	-10508±500	-16758±917 (f)	-14325±445 (j)	<0.001
PFR/EDV	37.1±5.6	34.1±1.9	24.4±1.4	43.1±4.9 (k)	30.6±3.6	0.014

表 2 说明：数据为平均值±标准差。HR-心跳速率；ESP-LV收缩末期血压；EDP-LV舒张末期血压；Ea-有效动脉弹性量-整体心室后负荷指数；EDV-LV舒张末期体积；ESV-LV收缩末期体积；EF-射出比率；CO-心脏输出。收缩舒张指数是： dP/dt_{max} -血压上升的最快速率； $dP/dt_{mx}/IP-dP/dt_{max}$ 常态化至瞬时发展 (instantaneous developed) 的血压；PXMI-力量指数；最大心室力量除以 EDV^2 ； M_{sw} -前负载再充盈搏功³； E_{esn} - 收缩末期弹性量常态化至测量的心脏质量。后四个指数是LV收缩功能的与负载无关 (load-independent) 的测量。舒张指数是： Tau -压力松弛时间常数所衍生的函数，是使用代入一级指数并入非零压力渐近线⁴； dP/dt_{min} - LV压力下峰率； PFR/EDV - 峰值心室舒张充血率对EDV常态化。后者反映早期舒张性质，即在早期充血期间松弛和被动僵化 (passive stiffness)。较高的值反映心脏舒张功能的增进。所显示的p值是代表变异的单方向分析。Tukey事后因果 (post-hoc) 多重比较测试是用来鉴定组群间的特定差异 (specific difference)：a) 对于3周TAC+Sil达 $p=0.042$ ；b) 对于Con和昔多芬3周达 $p<0.001$ ；c) 对于Con达 $p<0.05$ ，对于3星期 TAC+Sil达 $p<0.001$ ；d) 对于所有其它小组达 $p<0.05$ ；e) 对于昔多芬3星期达 $p=0.02$ ；f) 对于Con、昔多芬3周及3周TAC达 $p<0.005$ ；g) 对于所有其它小组达 $p<0.01$ ；h) 对于Con、昔多芬3周及3周TAC达 $p<0.05$ ；i) 对于Con和昔多芬达 $p<0.05$ ；j) 对于Con、昔多芬3星期和3星期TAC达 $p<0.01$ ；k) 对于3星期TAC达 $p<0.01$ 。

以 EMD 360527 抑制 PDE5A 产生几近相同的生理结果(见第 5B 图)。这些研究进一步显示,抑制 PDE5A 逆转了由 TAC 所引发的胎儿基因表达(例如,钠尿胜肽、 α -骨骼肌动蛋白)提高,并且降低受磷蛋白和肌浆网 Ca^{2+} 腺苷三磷酸酶表达(见第 5C 和 5D 图)。

实施例 4: TAC 的心脏有较高 PDE5A 活性和由昔多芬所诱导的 PKG-1 活性

心肌中 cGMP 的主要下游作用激酶被认为是 PKG-1, 且 PKG-1 的增加是直接(基因活化作用)或是通过钠尿胜肽信号来阻止肥大反应。前提是测试慢性昔多芬增加 PKG-1 活性(见第 6A 图)。在假手术控制组中,昔多芬对活性没有作用-与它对静止时的心脏功能可忽略的作用相符合。在 TAC 的心脏中,抑制 PDE5A 多于使 PKG-1 活性加倍。此结果说明 PDE5A 活性是选择性地增加心肌层肥大。所以测定归因于 PDE5A 的 cGMP 酯酶活性及活性成分(见第 6B 图)。在假手术控制组中, PDE5A 贡献总活性的 35 至 45%,与由狗¹所获得的数据相似。在 TAC 的心脏中,总 cGMP 酯酶活性增加 20% 超过控制组 ($p < 0.005$),而归因于 PDE5A 的成分占该总活性 60% (对控制组的 $p < 0.001$)。因此, TAC 提高 PDE5A 活性,该现象恰巧解释昔多芬对 PKG-1 活化作用的抑制性提高。

然而总心肌 cGMP 的浓度并没有反映抑制 PDE5A 对依赖于 cGMP 的信号的冲击(见第 6C 图)。假手术控制组的 cGMP 基线并没有随着以昔多芬治疗而改变。在 TAC 的心脏中 cGMP 增加,但是当这些心脏以昔多芬共同治疗时, cGMP 减少。在使用可任择使用的 PDE5A 抑制剂各别研究中,证实了相同的结果(见第 5D 图)。如钠尿胜肽表达减少所说明的,这恰好反映伴随的 cGMP 合成变化(即,与肥大和壁伸张相关的预防)(见第 5C 图)。抑制 PDE5A 没有改变基本或 TAC 情况的心肌 cAMP 浓度。

实施例 5：抑制 PDE5A 抑制了钙调神经酶/NFAT 及 ERK1/2 的活化作用

钙调神经磷酸酶的活化作用与 NFAT (活化 T 细胞的核因子) 转录因子的核迁移偶合, 因而造成心脏肥大和腔室重塑^{2,3}。这条途径能用 PKG-1 加以抑制, 因为新生肌肉细胞中已活化 PKG-1 的过度表达, 抑制了钙调神经酶/NFAT 活化作用和细胞肥大⁴。因此, 在 TAC 的心脏中, 以有或没有使用昔多芬治疗来检查钙调神经酶表达。TAC 1 和 9 星期后, 钙调神经酶蛋白质表达提高超过 2 倍, 而且在这二个时间点, 钙调神经酶蛋白质表现因使用昔多芬而显著降低(见第 6D 图)。

有丝分裂原活化激酶 ERK1/2 是由伸张及 $G_{\alpha q}$ 受体偶合的信号^{5,6}, 以及钙调神经酶活化作用⁷ 所诱导, 本身就是肥大的贡献者⁸。TAC 1 星期后, ERK1/2 受到活化(磷酸化/总 ERK1/2 增加), 而此亦因使用昔多芬治疗而受到抑制。然而, 9 星期后, ERK1/2 活化作用回到基线值(尽管钙调神经酶的量持续上升), 昔多芬并没有可显示的效果(第 6D 图)。

为了阐明抑制 PDE5 A 如何影响与钙调神经酶/NFAT 有关的肥大, 因而对新生老鼠肌肉细胞中的此信号进行评估。当利用肌节组织(α 辅肌动蛋白, 见第 7A 图)及重新蛋白质合成(混入 [³H]-白氨酸, 见第 7B 图)进行评估时, 与脱羟肾上腺素 (PE) 一起培养引发细胞肥大。通过伴随的昔多芬治疗此肥大受到抑制。为了测试昔多芬是否抑制 NFAT 活化作用, 以表达 NFAT 促进剂(与 β -半乳糖苷酶偶合)的腺病毒转染肌肉细胞。转染效率一致地 > 95% (见第 8A 至 8F 图)。肌肉细胞然后与 PE、钙活化剂 BayK8644 (BK) 或本质上表达活化的鼠科动物钙调神经酶 A (AdCn) 的腺病毒一起培养。三种触发剂皆增强 NFAT 促进剂活性。昔多芬抑制了由 PE 或 BK 所刺激的活化作

用, 但不抑制由 AdCn 所刺激的(见第 7C图)。基于 β -半乳糖苷酶活性分析的总结结果显示在第 7D图。使用可任择使用的腺病毒(具有与萤光素酶偶合的 NFAT 促进剂)进行研究, 产生相同的结果(见第 9A至 9C图)。这些结果与先前用本质上活化的 PKG-1⁴ 转染新生肌肉细胞的数据一致, 并且支持钙调神经酶本身的靶上游。

实施例 6: PDE5A 抑制作用藉由上游抑制作用使 Akt 去活化

受压力超载刺激且其过活化是与心脏肥大和重塑有关的另一个主要信号梯瀑是 Akt/PI3K 途径。有生理压力时, Akt 活化作用是以中等水平发生, 但在以更高水平, 会触发病理性的重塑和心脏衰竭^{9,10,11}。经 TAC 增进的 Akt 活性同时由磷酸化/总 Akt 蛋白质表现的比率(图 10A) 及活性分析试验(图 10B)显示。在压力负载后阶段(9 星期), 此情况特别显著。在二时间点, 昔多芬皆抑制此反应至接近基线值(见第 10A 和 10B 图)。Akt 由磷肌醇甘油酯-3-激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)^{11,12} 所活化。特别是, 高活性 PI3K α 与肌肉细胞肥大¹³ 有关, 但是由于 cAMP 的抑制^{13,14}, γ 异型和收缩功能障碍有关。假设 TAC 3 星期时收缩功能持平(见第 3 图)且 cAMP 未改变, 然后评估 PKB α 活性。TAC 增加 PKB α 活性。此增加受到以昔多芬共同治疗的抑制(见第 10C 图)。

为了测试抑制 PDE5 是否干扰下游 Akt 信号, 我们检验肝糖合成激酶 3 β (GSK3 β)¹⁵, 该激酶是以 Akt 和其它激酶予以磷酸化(例如, PKA¹⁷ 和 PKC¹⁸), 此导致它原有的抗肥大活性无法受抑制¹⁹。1 星期时, TAC 使磷酸化/总 GSK3 β 的表达增加二倍, 尽管 Akt 活性因以昔多芬治疗而降低, GSK3 β 活化作用依旧未改变(见第 10D 图)。然而, TAC 9 星期后, Akt 和 GSK3 β 的活化作用受到更多的刺激, 而此时 PDE5A 的抑制使 Akt 和 GSK3 β 二者活性皆降低。这

些数据支持与Akt无关的GSK3 β 活化作用，特别是在早期(非扩张)TAC未受cGMP/PKG-1/PDE5A影响的阶段，而与Akt有关的GSK3 β 活化作用则受昔多芬影响而减小。

为了进一步测试是否昔多芬对Akt活化作用的抑制是通过下游信号途径来进行，具有本质上已活化Akt(AktTG)的心脏靶过度表达的转基因老鼠，用赋形药或昔多芬予以长期治疗。以赋形药治疗的动物(年龄4至5个月)，AktTG心脏较大且心脏功能降低(见第10E图和表3)。

表 3: 无基因转殖的控制组(NTG)与心脏标定Akt过度表现(AktTG)形转殖作用的血液动力学分析;
此资料为侵入性压力-容量分析。

	NTG		AktTG		p ¹	NTG		AktTG		p ²	p ³
	NTG	Vehicle	AktTG	Vehicle		NTG	Sildenafil	AktTG	Sildenafil		
HR	538.7±9.7		515.3±24.6		NS	511.6±31.4		569.5±47.4		NS	NS
ESP	96.1±2.1		93.4±4.6		NS	96.7±4.7		90.1±0.9		NS	NS
EDP	7.5±0.7	8.1±1.6	NS		4.9±1.2	8.9±1.1		NS		NS	NS
ESV	17.6±1.9		36.4±6.1		<0.05	19.4±3.0		39.6±4.5		<0.01	NS
EDV	45.9±5.8		55.0±6.3		0.33	44.5±4.9		57.6±5.4		0.05	NS
EF	61.4±0.9		34.7±5.5		<0.005	56.7±3.5		31.8±2.1		<0.001	NS
dP/dt _{max}	9447±556		7188±354		<0.02	10133±791		6993±156		<0.005	NS
dP/dt _{min}	-9051±573		-6248±349		<0.006	-9267±417		-6241±289		<0.001	NS
PMXI	27.1±1.8		18.2±2.7		<0.05	25.9±2.2		17.8±1.9		<0.05	NS
Tau	6.8±0.2		10.5±1.4		<0.05	7.4±0.6		10.0±0.6		<0.02	NS
dP/dt _{max} /TP	173.1±6.6		144.5±9.2		<0.05	176.4±14.8		128.5±2.9		<0.02	NS
Ees ₀	46.7±5.5		22.7±4.1		<0.02	39.9±1.5		21.5±2.9		<0.001	NS

资料为平均值±标准差。承上所述，p¹-NTG及AktTG经载体剂处理而非经配对t测试的P值；p²-NTG及AktTG经昔多芬(sildenafil)100mg/kg/day处理而非经配对t测试的P值；p³-AktTG及昔多芬(sildenafil)经载体剂处理而非经配对t测试的P值。

在 6 星期的期间，由一连串超音波心动图和心脏重量/胫骨长度比率显示，昔多芬并没有减弱心脏肥大的演变(见第 10E 图)。即使有使用昔多芬治疗，AktTG 动物的心脏收缩和舒张功能依然降低(见表 3)。这些结果说明昔多芬作用在 Akt 活化作用的上游，和 PI3K 酶活性结果一致。

这些结果显示，当增强处于持续压力超载的心脏功能时，抑制 PDE5A 所呈现的新奇和潜在功效抑制了心室、细胞和分子重塑。当改善功能后，即使再持续增加负载，PDE5A 的抑制亦逆转了已存在的肥大。以小分子方法抑制(或逆转)肥大至本研究所观察到的程度是不寻常的，此说明与 PDE5A/cGMP/PKG-1 调控相关的基本机制是有效力的，且可能会干扰几条途径。假设疗法简单、有广泛的临床经验和 PDE5A 抑制剂的安全纪录，则适合用在实质上任何有形态上、细胞或分子肥大重塑特征的心脏病症的治疗。

按照先前已认定抑制 PDE5A 对心脏只有微小影响的想法^{19,20}，这些发现特别有趣。早期的研究几乎完全集中在对处于休息状态的正常心脏的急性效应及/或反应。心脏的 PDE5A 表达浓度低^{1,21}，抑制 PDE5A 对基本功能产生的急性效应相当小^{1,19,21}。最近对二个不同的种类进行研究，发现 PDE5A 能有效地调节 β -肾上腺素(beta-adrenergic)心脏和心肌细胞刺激，而此效应与其在 z 带结构的战略位置相结合^{1,21}。当前的研究显示，即使长期的 PDE5A 抑制对正常心脏有可忽视的效应，但这情况在心脏处于长期负载压力下时，产生剧烈改变。此情形一部分是因压力负载的心脏比控制组有较高的与 PDE5A 有关的 cGMP 酯酶活性，而造成在抑制 PDE5A 后 PKG-1 活化作用有更大的改变。当合成 cGMP 受到刺激时，cGMP 代谢酶的反向调节类似物在血管系统(PDE1A 随慢性硝

酸盐注入而增加，作为硝酸盐不耐性的机制²²)及肾脏(PDE5A随慢性容量负载而增加，作为肾脏对钠尿胜肽去敏化的机制²³)已有报告。当前的结果是第一个显示出在心脏中这样的调节作用。

不希望由局限于任意特定理论，PDE5A的经增强的活化作用和PDE5A在cGMP平衡稳定性(homeostasis)的角色可由数种机制解释。PDE5A活性是藉由cGMP所增强—藉由直接结合至GAF区域²⁴，以及藉由PKG-1的活化两者，上述PKG-1在调节区域(regulatory domain)将PDE5A磷酸化以增强催化活性²⁵。上述两事件都增强了酯酶活性—作为反向回馈循环(negative feedback loop)以调控cGMP浓度。此外，在心脏于压力之下，cGMP依赖的信号一般会变得较有效力—就像汽车的制动器。例如，受cGMP合成刺激的一氧化氮在基础收缩(basal contractility)上的效能微小，但在肾上腺素(adrenergic)的或其它压力^{26,27}之下是较有效力的。急性的PDE5A抑制作用对基础功能(basal function)的效能也是微小的，但在意识清楚的狗，能够抑制受 β -肾上腺素(β -adrenergic)刺激的心脏收缩¹。

先前关于心脏肥大的cGMP/PKG-1抑制的研究主要瞄准于钠利尿肽(natriuretic peptide)依赖的合成。心脏的ANP接受器缺失^{28,29,30,40,41}恶化负载所引致的心脏肥大，然而轻微的腔室肥大可藉由经构成地活化的(constitutively activated)ANP受体鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase)区域³¹的肌细胞标的(myocyte-targeted)的过度表达来预防。这些改变伴随心肌的cGMP的减少或增加。然而，不同于ANP偶联的信号(ANP-coupled signaling)，PDE5A的抑制产生有效力的抗肥厚效能(anti-hypertrophic)，而总心肌cGMP没有明显的增加—即使大量的增加PKG-1的活性。这表示，总心肌的

水平 (total myocardial level) 不必然反射 cGMP-信号。cGMP 信号的改变存在于细胞内的局部次区域 (localized sub-domain) 内是有高度可能的。其它实验室最近研究支持上述论点，尤其是特定的 PDEs 标的 cGMP 的降解此概念，上述 cGMP 的降解是取决于负责它的合成的酵素。cGMP 结合至 PKG-1 变构位置 (allosteric site) 被认为是 cGMP 从细胞质隔离的重要机制以及保护它免于受 PDE5A 水解³² 的手段。

这能造成 PKG-1 活化作用的增强，但不使 cGMP 等量的增加。信号的分区化 (compartmentalized signaling) 进一步由以下事实所支持：靠近心肌细胞中的 z 带结构的 PDE5A 的表达会增强，且当此定位 (localization) 改变时会失去生理活性。因为受钠利尿肽引致的高水平，总 cGMP 可能特别反射出所牵涉的合成途径。经昔多芬治疗的 心脏，脏壁压力和 ANP/BNP 的表达减少；因此，可预期 cGMP 有一些的下降。

持续的压力负载活化了多种激酶和磷酸酶，且藉由基因工程选择性地标的许多此类蛋白质，显示此类蛋白质有力地参与心脏的肥厚反应。PDE5A 抑制作用看来好象反转 (counter) 几条途径，且所观察到的改变总是可能次发于迄今仍未确认出来的初级效应体 (primary effector)，但由于以下原因，这似乎是不太可能的。首先，如同 PKA 依赖的信号，一般了解 cGMP/PKG-1 的信号可影响多种酵素梯瀑 (multiple enzyme cascade)^{4,33,34}，包括钙调神经酶 (calcineurin)。其次，在对持续的压力负载有反应的 ERK1/2, Akt, PI3K γ , 和钙调神经酶所观察到的变化是各自分别在仿真心肌肥大和/或在各种基因模式中重塑的范围中显示，由单一原因所造成是较不可能的。再者第三，根据基因工程模式的结果，所观察到的变化的幅度 (amplitude) 和时程与单一效应体是不兼容的。例如，

虽然 ERK 1/2 的活化作用增加了老鼠的钙调神经酶^{35,36}的过度表达,在 9 星期的 TAC 之后,尽管钙调神经酶持续刺激, ERK1/2 磷酸化作用仍是微不足道的。在 TAC 小鼠的钙调神经酶的基因抑制作用并不逆转 ERK1/2 活化作用³⁵,但是投予昔多芬者观察到两者皆下降。钙调神经酶的过度表达亦触发 Akt 的活化作用³⁶,但是比有 TAC 者所观察到的水平来的低许多。这不能解释 Akt 和钙调神经酶改变的暂时性差异。缺乏 PI3K 抑制剂 PTEN 的小鼠发展出肌细胞肥大和心脏收缩性功能障碍,以及 Akt 和 GSK3 β 活化作用,但并未显示 ERK1/2 活化作用¹³。此外,基因增强 Akt 或 PBK 的活性达近于在本研究中由 TAC 所达到的水平,会导致心脏收缩性功能障碍¹³和心室扩张^{10,37},但并不会与钙调神经酶共同刺激(co-stimulation)有关。整体而言,上述的矛盾处表示 PDE5A 抑制作用标的多于一个途径。

在 1 星期 TAC 后由昔多芬在 Akt 和 GSK3 β 之间造成的明显矛盾是值得讨论的。GSK3 β 是由 TAC 活化,且本身与心脏肥大¹⁹以及心脏功能障碍³⁹有关。然而,GSK3 β 亦可能由 PKA 磷酸化(通透锚激酶 AKAP220¹⁷)、由 PKC γ ¹⁸ 磷酸化以及由其它激酶¹⁶来磷酸化。假定 Akt 的活化作用下降,即使 GSK3 β 磷酸化持续,似乎一个或更多 Akt 不依赖(Akt-independent)途径牵涉其中-但不受 PDE5A 抑制作用所调节。心脏肥大晚期的特征是持续性的重塑和更大的 Akt 和 GSK3 β 活化。在心脏肥大晚期昔多芬对两者的抑制作用可产生持续的益处。

虽然心脏肥大性传统上被视为能适应负载压力的适应反应,证据显示它可能不是必需的代偿作用³⁷。当昔多芬没有完全地逆转或阻止在 TAC 后数星期至数月上述为特征的心脏肥大、腔室和分子重塑,尽管负载依然持续,但心脏的功能改善了。本研究结果是临床兴趣的,

这样的临床兴趣是由于本发明对肥厚性心脏疾病和心脏肥大的高度预防效果，而肥厚性心脏疾病和心脏肥大在许多形式的的心脏衰竭中扮演显著的角色。以口服PDE5A抑制剂的延伸使用(*expanding use*)来治疗疾病(诸如肺动脉高血压)，不只勃起功能障碍，是当作长期治疗来支持其使用。

实施例 7: PDE5a 抑制剂使心肌细胞对异丙基肾上腺素(isoproterenol)的反应钝化

异丙基肾上腺素，是刺激心肌细胞收缩的 β -肾上腺素受体促效剂(β -adrenergic receptor agonist)。PDE5a抑制剂(昔多芬，100nM)藉由响应肾上腺素促效剂-异丙基肾上腺素的刺激来将初代单离(primary isolated)的心脏肌肉细胞的增强的收缩作用钝化。(图 11A-11D)。如果可溶解性的鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase)被ODQ抑制，ODQ是一种可溶解性的鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)抑制剂，上述的钝化作用将不会发生(图 14A和 14B)。这表示，PDE5a抑制剂藉由调控cGMP来改造心脏功能，该cGMP是由sGC产生。因此，PDE5a抑制剂的作用机制可能是与ATP敏感的钾信道的活化作用机制是不同，该钾信道可能改造后缺血功能(post-ischemic)。这些资料最终显示，PDE5抑制剂的效应并非取决于动脉血管扩张或实际上根本并非取决于任何的动脉变化。

实施例 8: PDE5A 抑制作用刺激 PKG-1 和 Cgmp

为了直接判定在成体肌肉细胞(adult myocyte)PDE5A抑制作用是否刺激了PKG-1(图 15A)，PDE5A抑制性质在蛋白激酶G1(PKG-1)的效能单独以昔多芬、单独以异丙基肾上腺素、二者联合、单独以他达拉非，以及他达拉非与异丙基肾上腺素联合测试。PDE5A抑制作用在基础情况下(约10%， $p < 0.05$)仅轻微地增强了PKG-1

活性。当异丙基肾上腺素与任一 PDE5a 抑制剂联合，在 PKG 活性有 50% 的显著增加。这与 PDE5a 抑制的预期效能是一致的，PDE5a 抑制是预期会增加 cGMP 水平，而 cGMP 水平接着会活化 PKG。为了直接监测细胞内 cGMP 的产生，对 cGMP 水平敏感的荧光共振能量转移探针被用在新生老鼠的肌细胞(图 15B 和 15C)。异丙基肾上腺素、昔多芬和一氧化氮供体(NO donor)(DEA/NO)全都增强了 FRET 信号，提供了在肌肉细胞 PDE5 A 抑制作用增强 cGMP 的直接验证 (图 15 A-15C)。

实施例 9：PDE5A 抑制作用阻断经 β -肾上腺素(β -adrenergic)刺激的收缩，且慢性地预防受肾上腺素刺激的肥大

心脏腔室收缩力的急骤增加是藉由异丙基肾上腺素输液引入至控制组 C57b16 小鼠。在心脏收缩功能的增加是藉由活体内压力-容量关系(pressure-volume relation)评估(图 11E)，且该心脏收缩功能的增加是以图中循环的增宽和左上角向左偏移而反射出压力容量关系的变化。昔多芬以产生 30nM 的自由血浆浓度(free plasma concentration)的剂量经静脉传输，导致此肾上腺素刺激的反应有显著的抑制。这支持心肌的效能使其维持在未受损伤的心脏的水平(intact heart level)。此外，如果用植入式渗透微型泵浦(implanted osmotic mini-pump)慢慢地输注异丙基肾上腺素，心脏是以心脏质量的增加(心脏肥大)及一些扩张做为响应。上述现象是以一组控制组 C57b16 小鼠对照显示(图 12A 和 12B)。与 PDE5a 抑制剂(EMD 360527)共同治疗显著地抑制了心脏肥大的发展。

重要的是，PDE5a 抑制作用对 β -肾上腺素刺激的阻断效能对上述干扰是专一性的，且使心肌 cGMP 的增加是不能由其它方法所复制。图 13 A 显示由心房的钠利尿胜肽(atrial natriuretic peptide)(ANP)输注在心肌

(myocardium)刺激 cGMP 对异丙基肾上腺素心脏反应 (isoproterenol cardiac response)的效能。不同于在图 11F 所提供的使用 PDE5a 抑制剂的资料, ANP 在未受损伤的心脏对 ISO 反应并没有效能。图 13B 显示在控制组条件下所量测到的 cGMP 水平, 以及暴露至静脉内 PDE5a 抑制作用 (EM 360527)或 ANP 的 cGMP 水平。后者导致心肌 cGMP 显著地上升-但在交感神经刺激反应 (sympathetic stimulatory response)则没有效能。另一方面, PDE5a 抑制剂在所量测到的总心肌 cGMP 效能几乎可以忽略, 但作为 β -肾上腺素刺激的负向调节剂 (negative regulator)这是非常有效力的。在心脏所测得的 cGMP 没有上升先前已用来支持在心脏中缺乏显著的生理角色此一理论。然而, 这些资料显示, 该信号是高度分区化的, 且精确地正确的区域由 PDE5a 抑制作用所调控以对心脏收缩力产生冲击, 且这不是简单的借着由合成的手段 (synthetic mean)来增加 cGMP 所仿真的。

实施例 10: PDE5A 的表达和在试管内 (*in vitro*)的活性

在单离肌肉细胞中 PDE5A mRNA 的表达比在肺脏中较低超过一百倍 (图 16B)。在单离的成体心肌细胞中观察到有蛋白质的表达, 但蛋白质水平同样远低于在肺脏中 (图 16A)。SDS-PAGE 凝胶显示在肺脏加载的量 (load) 有 $1\mu\text{g}$, 相较而言, 心脏的量是 100 倍以配合 (match) 在肺脏的密度水平。先前的报告显示, PDE5A 在肌细胞中是以低水平表达, 且这样的表达的低水平推导出 PDE5A 在心肌细胞并非扮演功能显著角色的假定。相较于肺脏, 蛋白质和基因整个心脏的表达亦发现是减少的 (图 16C)。在肺脏, 它主要存在于血管平滑肌细胞。在此, SDS-PAGE 凝胶加载 $20\mu\text{g}$ 心肌衍生的蛋白质或肺衍生出的蛋白质, 其相对表达差异 (relative expression differences) 是非常明显的。上述现象由在这些组织之间 mRNA 表达的差异所

支持(图 16A)。在心脏整体,在单离的肌细胞中观察到在约 95Kda处有主要的条带,此条带和在肺脏所观察到的条带几乎是同样大小。在心脏如预期地观察到第二条在约 70kDa的条带,这反应了剪接片段(splice variant)或蛋白质水解片段。使用不同的抗体仍观察到相似地发现^{41,42}。

成体单离肌细胞和未受损伤的心脏心肌(intact heart myocardium)的总cGMP以及PDE5a依赖的cGMP酯酶活性被判定出来(图 16D和 16E)。上述组织任一者与IBMX(是一种广谱PDE抑制剂, a broad spectrum PDE inhibitor)共培养,会将cGMP酯酶的活性降低大约 90%。上述组织萃取之任一者与昔多芬(是选择性的PDE5a抑制剂)共培养,揭示仅cGMP的成分是由PDE5A正常代谢。在单离的肌细胞和在心脏两者都是将近 30%。藉由放射性酵素分析试验(radio-enzyme assay)获得PDE5A依赖的cGMP酯酶有相似的结果⁴¹ ($32 \pm 7.3\%$ - NTG (n=9))。

之前的研究报告在心肌层PDE5A的表达是低水平的^{43,44},且在休息时的心脏功能PDE5A的抑制功能是微小的^{41,45,46,47},上述的研究推导出PDE5A在心脏扮演微小角色的错误结论。与先前的报告相反,本研究显示,上述的低水平表达并不意味PDE5A缺乏生理功能。相反的,本研究的结果指出,PDE5A在 β -肾上腺素的刺激作用,以及在心脏重塑、肥大,和对慢性压力的功能障碍扮演重要角色。藉由抑制PDE5a来防止cGMP代谢的效能似乎实质上大于较藉由钠利尿肽偶联的合成(natriuretic peptide-coupled synthesis)增加cGMP的合成^{48,49}或经肾上腺素刺激的收缩力改变。这支持了先前从未被认同或辨识的一个非常新的机转,此机转是说标的的cGMP的操弄(targeted cGMP manipulation)可直接影响心脏肌肉细胞以及心脏本身。

实施例 11: PDE5 在肌细胞的位置(Myocyte localization of PDE5A)

在整个(throughout)心肌细胞都有 PDE5A 出现(第 17A 至 17F 图),且亦出现在 z 带条纹(z-band striation)(第 17A 图(左区), (右区)- α -肌动蛋白(actinin))。PDE5A 免疫染色被特定阻断肽所抑制(第 17B 图, 左), 然而同样的肽并未阻断 PDE1C 染色(第 17C 图, 左), 支持了分析试验的专一性。PDE5A 出现在 z 带条纹(图 17D 和 17F), 且与一氧化氮合成酵素 NOS3 的位置是一样的(colocalize)。

实施例 12: 基线分析和昔多芬效能

PDE5A 在心肌是以低水平表达⁵¹⁻⁵³, 且因为昔多芬或其它药剂仅轻微地降低动脉压力且对在休息状态下^{54,55}的或运动期间^{56,57}心脏的射出分率或输出量并没有明显的影响, 由这些药物所造成的抑制作用并未被认为是直接影响心脏功能。如前文所报导, 尽管表达水平低, PDE5A 可展现对肾上腺素刺激强力的局部性调节作用(localized regulation)^{58,59}, 且其慢性抑制作用显著地限制和逆转受到压力超载而刺激的心脏肥大和重塑。这些结果支持了 PDE5A 抑制剂在治疗或预防心脏肥大和重素的治疗用途。

为了判定在健康人类受试体, 昔多芬预处理(pretreatment)是否抑制经 β -肾上腺素刺激的的心脏收缩, 利用巴酚丁胺(dobutamine)压力测试在口服投予昔多芬或安慰剂之前与之后执行随机化的、双盲、安慰剂控制组、非侵入性的血液动力学研究。

多巴酚丁胺是具有正向影响肌肉收缩效能(positive inotropic effect)且临床上用来作为对心脏组织药物刺激及施压(pharmacologically stimulate (and stress))且增加心脏磊血功能的肾上腺素 β -1 促效剂。昔多芬藉由抑制

磷酸二酯酶-5 (phosphodiesterase-5, PDE5A)来提高细胞内的环形 GMP 的量并导致血管扩张。如本文所报导, 昔多芬亦有力地影响了经 β -肾上腺素受器促效剂或压力超载所刺激心脏。为了判定昔多芬在人类是否使经多巴酚丁胺刺激的的心脏功能钝化, 三十五个健康志愿者接受随机化的、双盲、安慰剂控制组研究, 在此研究中心脏功能是以在口服昔多芬(100mg, n=19)或安慰剂(n=16)之前或之后对多巴酚丁胺的反应而评估。超音波多谱勒和非侵入性的血压资料产生了与负载无关的收缩指数(load-independent contractility index)(最大力量指数和心脏收缩终期弹性量, maximal power index and end-systolic elastance)、射出分率, 及扩张功能的测量值。在活化治疗组(active treatment group), 血浆自由昔多芬浓度是 $44 \pm 29 \text{ nM}$, 而昔多芬的代谢物-去甲基昔多芬(desmethyl-sildenafil, 预期占母药水平的 50%)的浓度是 $22 \pm 18 \text{ nM}^{21}$ 。在接受昔多芬的四个实验体中, 在此研究之时血浆浓度非常低(亦即, 全都 $< 6 \text{ nM}$, 中值 3.6 nM , 在组平均的 10 倍以下)。此外, 这些实验体中每一者亦都具有低的代谢水平, 与用来解释次治疗(subtherapeutic)浓度的快速代谢作用不符。既然测试我们的假说需要建立治疗性的昔多芬水平, 这些实验体从分析中排除。另外一个被排除的实验体是因为他的血液样本遗失了。在此研究中并无有害的事件。

在安慰剂组和昔多芬治疗组在关于年龄(安慰剂组和昔多芬治疗组分别是 30 ± 6 岁与 30 ± 8 岁, $p=0.95$)、性别(50%女性与 79%女性; $p=0.1$)、身体重量指数(23.9 ± 3.5 与 $22.9 \pm 2.5 \text{ kg/m}^2$; $p=0.45$), 或心脏功能指数(表 4)并没有没有基线差异。

表 4: 第一次对第二次多巴酚丁胺研究的收缩和舒张数据的分析

收缩变量	Placebo (n=16)		Sildenafil (n=19)		P value	
	B ₁	Δ(B ₂ -B ₁)	B ₁	Δ(B ₂ -B ₁)	a	b
	(mmHg)	106 ± 13	-3 ± 9	107 ± 12	-6 ± 3 *	0.79
(mmHg)	59 ± 7	-2 ± 6	62 ± 6	-6 ± 5 *	0.18	0.05
(min ⁻¹)	61 ± 9	-2 ± 4	66 ± 12	+0 ± 3	0.24	0.44
(mL)	77 ± 17	+3 ± 7	72 ± 16	+5 ± 6 *	0.34	0.44
全身外周血管阻力 (dyne*s/cm ⁵)	1310 ± 280	-55 ± 130	1370 ± 310	-170 ± 60 *	0.57	0.03
峰值力量指数 (mmHg/sec)	297 ± 42	+6 ± 31	312 ± 61	+21 ± 13 *	0.42	0.26
收缩终期弹性量 (mmHg/mL)	2.3 ± 0.8	+0.2 ± 0.6	2.6 ± 0.9	+0.4 ± 0.2 *	0.40	0.25
射出分率	61 ± 5	+3 ± 4	61 ± 6	+6 ± 2 *	0.99	0.05
舒张变量						
E 速率 (cm/sec)	87 ± 12	+0 ± 12	92 ± 19	-4 ± 12	0.32	0.24
A 速率 (cm/sec)	59 ± 8	+5 ± 8	57 ± 17	-3 ± 8	0.59	0.63
E/A比率	1.5 ± 0.2	+0.1 ± 0.2	1.7 ± 0.4	-0.1 ± 0.4	0.06	0.18
E' 速率 (cm/sec)	19 ± 6	-1 ± 3	18 ± 5	+0 ± 3	0.68	0.66
E/E' 速率	4.8 ± 1.4	+0.2 ± 0.8	5.2 ± 1.4	-0.3 ± 0.8	0.45	0.13
IVRT (msec)	84 ± 22	-2 ± 13	71 ± 13	+8 ± 12	0.06	0.05

表4说明: 最初的基线及利用第一条基线及第二条基线区别二组不同的病患。B₁: 最初的基线; B₂: 在最初的多巴酚丁胺测试之后重新校正基线; Δ(B₂-B₁)-区别第一条基线与第二条基线的不同。P值: a)在最初基线(B₁)于二研究小组之间的非配对t测试; b)二种方式方差分析(RMANOVA), 基线级数相互作用及研究药物(昔多芬(sildenafil)对于安慰剂)。*p<0.005(于小组中, 经配对t测试于第一和第二基线之间) E-早期的舒张装填波; A-心房装填波; E'-早期装填期间二尖瓣的环形组织速度; IVRT-等容弛驰时间。

安慰剂组和昔多芬治疗组的第一基线和第二基线之间的变化亦在表 4 中提供。在给昔多芬组的实验体伴随着射出分率一前一后(tandem)的增加, 动脉压和全身血管阻力有轻微的降低。在昔多芬组收缩力也轻微的上升了, 在该组可能反射出对血管扩张、直接效能(direct effect)或轻微的残余多巴酚丁胺效能的反射反应。重要的是, 组间(inter-group)分析发现药物治疗对基线收缩力或扩

张功能改变没有显著影响(B_2-B_1 , 重复测量的方差分析(RMANOVA)), 只对动脉阻力有影响, 而对扩张动脉压及EF有不明显的(borderline)影响。

实施例 13: 昔多芬(sildenafil)钝化经多巴酚丁胺刺激的收缩力

图 18A 展示在接受作为本研究药物的昔多芬的实验体在多巴酚丁胺刺激之前和之后, 例示的多谱勒大动脉血流资料及其对应的血压及计算出的峰值力量指数。大动脉血流和收缩压随着第一次多巴酚丁胺测试而上升, 力量指数增加将近 200%, 然而上述反应在同一个患者在接受口服昔多芬之后实质地钝化了(第 18B 图)。分组资料显示在第 19 图和第 20 图。两组(昔多芬组对安慰剂组)对第一次多巴酚丁胺的收缩反应都是一样的, 且特征是收缩力增强以及血压连同外围血管阻力的下降。在第二基线的收缩力变化被大幅的逆转了。在接受研究药物之后, 在第二次多巴酚丁胺测试有显著的差异, 且接受昔多芬的实验体展现出收缩反应的下降(第 20 图)。该等改变并非简单地由在昔多芬治疗组稍微较高的基线所造成(亦即, 降低净改变), 峰值反应(第二次测试对第一次测试)本身是显著的被昔多芬所抑制而安慰剂并无(力量指数为 $p<0.015$; 射出分率为 $p<0.01$, 及心脏收缩终期弹性量为 $p<0.002$)。

第 20 图展示在投予该研究药物之前(第一次试验)和之后(第二次试验)由多巴酚丁胺所造成的功能的绝对变化。每个实验体的资料是经过配对的。峰值力量指数在昔多芬治疗之前上升了 $+254\pm 82$ mmHg/s(从约为 300 mmHg/s 的基线), 但在治疗之后上升了仅 164 ± 80 mmHg/s($p=0.001$), 而在安慰剂投予之前和之后该指数改变是相似的(236 ± 89 对 215 ± 83 mmHg/s, $p=0.31$; 群组间比较是 $p=0.04$)。中值力量指数($p=0.04$)和心室收缩终

期弹性量也观察到相似地发现 (2.52 ± 1.5 对 0.84 ± 0.9 mmHg/ml, 昔多芬组是 $p < 0.001$; 1.8 ± 1.1 对 1.4 ± 1.1 mmHg/ml, $p = 0.25$; 安慰剂组; 组间是 $p = 0.008$)。多巴酚丁胺在昔多芬投予之前增加射出分率达 $15 \pm 3\%$ (绝对变化), 但在昔多芬投予之后仅增加 $4 \pm 5\%$ ($p < 0.001$), 而在安慰剂组, EF 在两次试验中的上升是相似的 ($p = 0.12$; 组间是 $p = 0.001$)。在经多巴酚丁胺所诱导的搏出量 (stroke volume) 改变亦可观察到相似的差异。

重要的是, 在心脏收缩反应的改变并非由血管负载的改变所造成。在外围血管中由多巴酚丁胺所调节的阻力下降并非由昔多芬所改变 (modify) ($p = 0.66$, 第 3 图), 在本研究的各期在心脏的预负载 (preload, 舒张终期容积 (end-diastolic volume)) 两组之间并没有差异。舒张终期的容积随着多巴酚丁胺的投予而减少, 但相较于安慰剂组, 在昔多芬组的反应也是被钝化了。在第一次多巴酚丁胺试验中, 在两组中心律平均值仅轻微地上升 (在安慰剂组和昔多芬组分别是 3.5 ± 7.7 bpm 和 6.7 ± 2.2 bpm, 第 20 图), 而在一些实验体甚至还下降了。后者似乎和所用的低剂量有关, 这样的低剂量产生收缩效能而非变时 (chronotropic) 效能, 但对血压和血流的上升引发反射反应。在昔多芬投予之后, 随着多巴酚丁胺 ($+14.5 \pm 4.7$, $p < 0.01$) 的投予, 心律增加的更多, 但以 RMANOVA 与安慰剂组比较, 并未达统计显著的程度。

实施例 14: 收缩功能的效应

表 5 提供在投以研究性药物的前和后, 藉由多巴酚丁胺 (dobutamine) 得知在舒张功能上绝对的变化。

表 5: 于舒张的功能上探讨由多巴酚丁胺(dobutamine)诱导昔多芬(sildenafil)的影响

变量	Placebo		Sildenafil		p value- RMANOVA
	D ₁ -B ₁	D ₂ -B ₂	D ₁ -B ₁	D ₂ -B ₂	
E 速率 (cm/sec)	25 ± 10	21 ± 16	20 ± 18	12 ± 11†	0.19
A 速率 (cm/s)	5 ± 8	7 ± 11	5 ± 9	11 ± 7†	0.33
E/A比率	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.3	0.3 ± 0.3	-0.1 ± 0.3*	0.14
E' 速率 (cm/s)	3.9 ± 2.3	2.9 ± 3.1	4.1 ± 3.4	1.5 ± 2.4*	0.19
E/E' 速率	-0.2 ± 0.9	-0.3 ± 1.0	+0.1 ± 0.8	-0.2 ± 0.7	0.21
IVRT	-28 ± 14	-24 ± 15	-17 ± 11	-20 ± 13	0.30

表5: 资料是最初(D1- B1) 及第二次(D2- B2)多巴酚丁胺 (dobutamine)测试结果, 各个参数比较多巴酚丁胺 (dobutamine) 刺激高于基线值的变化。*p < 0.01, †p < 0.05, ‡p < 0.06。P值是三种方式方差分析 (RMANOVA), 测试对于三种方式相互作用于多巴酚丁胺(dobutamine) 测试次序之间(在接受研究药物前与后), 呈现或缺乏多巴酚丁胺 (dobutamine), 及处理剂(昔多芬(sildenafil) 对于安慰剂)。简称是依照 表1定义。

于第一次测试,早期的(E)和晚期的(A)舒张充填率在二个群组上升幅度相似,并且 E/A 比率轻微地上升了。昔多芬(Sildenafil)导致在 E 速度($p=0.06$)的边线下降, A 速度($p=0.03$)轻微地上升,和 E/A 比率的下降($p=0.007$)。多巴酚丁胺(Dobutamine)刺激造成了在组织多谱勒仪的上升。E '速度由昔多芬(sildenafil)钝化($p=0.002$)。多巴酚丁胺(dobutamine)的效应在 E/E 比率, LV 结束心脏舒张压力, 及等容松弛时间, 由研究药物或在其它群组来看是未改变的。重要的是, 在群组之间分析显示于舒张作用的任何参数(p 值被显示为 3 种方式重复测量的方差分析(RMANOVA)使用在心脏收缩的分析), 研究药物在多巴酚丁胺(dobutamine)变化并没有重大交互作用。

在最初的多巴酚丁胺(dobutamin)测试, 心脏收缩和舒张功能相似地改善了二个治疗小组(即; 峰值强度指数上升了 $80\pm 28\%$ -安慰剂, $82\pm 31\%$ -昔多芬(sildenafil)小组, $p=NS$)。在实验体接受昔多芬(sildenafil)的处理, 他们的第二个多巴酚丁胺(dobutamin)反应发生显著的钝化, 以峰值强度, 射出分数, 及结束心脏收缩弹性量改变, 全部各自降低 $32\pm 34\%$, $66\pm 64\%$, 和 $56\pm 63\%$ 。(各 $p<0.001$ 对于最初的反应)。这相对于安慰剂群组, 其展示了相似的功能反应的二个多巴酚丁胺(dobutamine)测试。当昔多芬(Sildenafil)与安慰剂处理结果比较, 昔多芬(Sildenafil)处理经由多巴酚丁胺(dobutamine)诱导并没有显著地改变舒张变化。因而, PDE5A 抑制性质藉由昔多芬(sildenafil)使 β -肾上腺素(beta-adrenergic)对于心脏收缩的反应钝化。这支持 PDE5A 在人的心脏的活性和它在调控刺激心脏功能的角色。

这项研究报导第一直接证据, 昔多芬(sildenafil)影响健康人类的的心脏功能, 当静止状态下具有最小的效应时, 抑制 β -肾上腺素(beta-adrenergic)刺激心脏收缩的功能。

重要的是，这个抑制效应没有取决于后负荷或心脏预压变化。这表示，PDE5A抑制性质可调控人体心脏的应力反应。

PDE5A抑制剂在血管床和组织^{61,62}具有有潜力的效应。此外，昔多芬(Sildenafil)降低肺动脉阻抗，也许在治疗肺高血压^{63,64}是有效的。它亦改善内皮细胞的功能，一氧化氮生物兼容性标志和整体血管健康，尤其是瘾君子⁶⁵和心脏衰竭的病人⁶⁶。动物研究表明，昔多芬(sildenafil)令人印象深刻的是藉由预先处理局部缺血效应降低梗塞尺寸^{67,68}。

一个早期报导告诉我们，PDE5A抑制剂也许可增加心脏发病⁶⁹的风险，几项研究试图定义心脏功能的药物。在14人的研究中以冠状动脉疾病，Herrmann等人，报导100mg口头昔多芬(sildenafil)轻微地降低静止系统和肺压力，但在心跳速率并没有效应，左心室充填压力或心脏输出⁵⁴。在一项随后研究中，人已知或疑似罹患冠状疾病接受了仰自行车运动测试，且昔多芬(sildenafil)再次轻微地降低了血压，但没有改变基线或受运动而被刺激的心跳速率，血压，运动期间，或功能性保存⁵⁶。其它调查发现了只有在运动的表现时适度的改善⁵⁷或延长达到局部缺血的ST段衰退⁷⁰。

对心脏效应的直接分析在试管实验被获得，但这些结果依然有限和互相冲突。PDE5A基因表现是存在于人体心脏^{52,59}，虽然蛋白质表现和酵素活性是已被解答的^{51,53,71}。最近证据发现当基因和蛋白质表现量低迷时，PDE5A在肌肉细胞之内部被分区，并且它的抑制功能是能改变心脏和肌肉细胞功能。这在静止情况下无法被观测，但只有当心脏被刺激，例如藉由 β -肾上腺素(beta-adrenergic)促效剂^{58,59}或压力超载⁶⁰。 β -刺激共同活化腺苷酸活化酶(adenylate cyclase)增加循环3'5'-腺苷

(adenosine) 单磷酸盐 (cAMP) 以及鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase) 产生 cGMP⁷²。之前活化蛋白激酶 A, 该酵素由标靶钙处理和肌丝相互作用增强收缩性, 但后者作用是为 "制动器" 来反抗这个作用。这达到一部分由活化双重受体 PDEs 来分解 cAMP⁷³, 和蛋白激酶 G, 其酵素在心脏细胞内抵制多种 cAMP/蛋白激酶 A (protein kinase A) 效应^{72,74,75}。

结果报告在此文中提供第一叙述于 PDE5a 抑制性质在人体抗肾上腺素 (anti-adrenergic) 的效益。心脏功能被研究在静止期间和在肾上腺素的刺激期间, 使用各种参数专一性对心脏和与心脏负载较不相关的变化^{76,77}。虽然重新校正基线收缩性轻微地 (但极大) 高于在群组接受昔多芬 (sildenafil) 的处理, 这并不表示研究结果因为峰值反应本身显着下降了。不刻意局限任一种特殊理论, 这些结果无法排除藉由 (sildenafil) 可能像接受器的角色降低敏感度, 虽然预先的证据支持细胞内 cGMP/PKG 信号⁵⁹ 的主要角色支持一个远程的机制。多巴酚丁胺 (dobutamine) 应力测试而不是运动作为这被使用了由昔多芬 (sildenafil) 提供对肾上腺素的调节作为一个更加专一性的评估。的确, 甚至健康的实验体没有投以阻断剂 (beta blocker) 显示在整体运动压力测试表现或最大的心脏输出量上并没有改变 - 尽管对肾上腺素刺激的收缩性有清楚的作用。心脏浓度指数提供一个敏感负载无关的收缩性^{51-64,72,74,76,77,79-84} 指数, 系由动脉或静脉舒张⁷⁶ 的影响程度低。

不同于心脏收缩的改变, 多巴酚丁胺 (dobutamine) 刺激的舒张功能, 经各群组之间的比较, 由昔多芬 (sildenafil) 处理并未显着钝化。在群组分析表示, 接受昔多芬 (sildenafil) 的实验体在早期的心室充填和松弛有微小的上升 (E 和 E' 的速度) 且在心房充填更多量的增加 (A

速度)。当在舒张作用能反射轻微的降低时，它与降低的收缩度和增加以多巴酚丁胺(dobutamine)注入以昔多芬(sildenafil)处理后的结束心脏收缩容量是一致的。于净心室排斥的下降能限制早期舒张反冲作用，其归因于对心脏早期的迅速充填。这反之导致增加充填在静脉收缩期间，特别因为结束心脏舒张容量在两个小组是相似的。E/E'速度比率显示与左心室舒张压³⁹有好的关联性。在基线或与多巴酚丁胺(dobutamine)，E/E'比率在两个小组是相似，并且重要的是没有证据显示左心室舒张压是随昔多芬(sildenafil)增加而增加，即使使心脏收缩的增强钝化。样本尺寸也许归因于舒张效应的缺乏，因为扩张非侵入性的测量可能会有更加巨大的变化。

昔多芬(Sildenafil)被报导在增加交感神经活性于没有改变心跳速率或血压的情况⁸⁵，并且这可能扮演了一个在基础收缩性轻微上升的角色在第二条基线在实验体接受昔多芬(sildenafil)处理。这样的活性也许被期望由下游调节肾上腺素的刺激，因此使多巴酚丁胺(dobutamine)反应钝化。这变化是微小的，但与在血浆儿茶酚胺里随着以昔多芬⁸⁶ (sildenafil)(约 70 pg/mL)的轻微增加是一致的，和大约 3 至 4 个级数的强度更低于当初预期多巴酚丁胺(dobutamine)的处理。此外，在群组之间的分析上并没有统计学上的不同。昔多芬(Sildenafil)亦被报导降低迷走神经在心跳速率⁸⁷的抑制性质和单一剂量⁸⁸研究增加的心跳速率几乎 10%。这也许可解释本研究中在昔多芬(sildenafil)处理之后，对多巴酚丁胺(dobutamine)增进心跳速率的反应。更高的心跳速率就其本身而言是期望增加收缩性，由力量频率关系，但是在对昔多芬(sildenafil)群组的分析中，反作用是真实的。

昔多芬(Sildenafil)在未受损伤的人类心脏可能有效地抑制由肾上腺素刺激的收缩性。早先研究表示，昔

多芬 (sildenafil) 和其它 PDE5 A 抑制剂在健康个体勃起功能障碍的治疗是安全和有效的⁸⁰，冠状动脉疾病患者^{54,56}，和心脏衰竭的病人⁵⁷。相对于早先报导，PDE5A 抑制剂在人的心脏没有作用，结果在此文中报导表明，PDE5A 抑制剂在儿茶酚胺刺激下是心脏功能的重要调节者。肾上腺素的刺激钝化将可能证明增强神经激素刺激等病状是有利的，譬如高血压，左心室肥大，及心脏衰竭。

实施例 15：PDE5A 抑制心脏分子再成型

当心脏上形态的改变是剧烈的变化与心脏再成型有关，这些形态上的变化增强早期基因转录和蛋白质活性改变的反应(图 21 A-F)。PDE5 A 抑制处理可预防 eNOS (NOS3)解除和限制金属结合蛋白酶(metalloproteinases)的活化作用。慢性大动脉带(TAC)导致 NOS3 内正常二聚体(更高 mw 形式)的损失(图 21 B)。这导致反应的氧气种类的活化作用在上图 21C。这个图显示正向染色由超氧化物阴离子荧光探针(dihydroethidium)侦测。这根据由对钙相关 NOS3 活性的降低(图 21C)，和由 NOS3 使增加相当数量的超氧化物形成(图 21D)。

此外，PDE5 A 抑制性质预防 NOS 二聚体形成损失-支持一个重要新颖的机制，藉由该机制的 PDE5a 抑制性质限制在肥大性的和心脏衰竭的氧化剂应力(图 21E)。图 21F 表示，昔多芬(sildenafil)抑制明胶酶(gelatinases)中金属结合蛋白酶(metalloproteinase)的活性。标记的胶体溶解与慢性 TAC 一起被观测于图 21E (3W TAC)。这活性藉由和昔多芬(sildenafil)共同处理而大大的被抑制。因为明胶酶(gelatinases)的活化作用结合于心室再成型和扩张，这表明，PDE5a 抑制性质可抑制金属结合蛋白酶(metalloproteinase)在分子再成型的角色，而分子再成型与心脏衰竭和肥大性有关连。

RhoA 的增加和 Rho 激酶的表现和活性被观测在慢性大动脉带(TAC) (图 21A-21C)。昔多芬(sildenafil)抑制 RhoA, Rho 激酶 1 (ROCK1)及 Rho 激酶 2 蛋白质表现和活性(ROCK2) (图 22A-22C)。在 rhoA 和 rho 激酶的增加与分子再成型以及心脏肥大和扩张有关连。由这些分子里抑制性质改变,昔多芬(sildenafil)于分子再成型的治疗是有用的。

STAT3 磷酸化的增加,其活化 STAT3,与 TAC (图 23 A 和 B)有关连。昔多芬(sildenafil)抑制 STAT3 的活化作用(图 23A)。因此,昔多芬(sildenafil)抑制分子再成型与改变在 STAT3 活性相关。

实施例 16: 昔多芬(sildenafil)改善心肌能学

昔多芬(sildenafil)的治疗改善心肌能学。老鼠暴露于 TAC 三个星期。心脏于活体内利用核磁共振光谱仪(NMR spectroscopy)估算高能磷酸盐的代谢。一个标准图像和光谱被显示在图 24A 和 24B。磷酸肌酸(PCr)与总 ATP 的比率被使用作为测量能量储备和平衡。当以昔多芬(sildenafil)保存正常能量平衡治疗,TAC 大大地降低这个比率。这表明,PDE5 A 抑制性质改善心肌能学和增强在应力之下心脏能量的储备。

结论报导此文中利用以下材料和方法。

动物模型

使用雄性 C57BL/6 老鼠(8 -11 个星期, Jackson 实验室)。压力超载由横向大动脉收缩导致。条带步骤的急性和慢性死亡率 < 5%。仿真控制老鼠进行了同样操作,但没有大动脉收缩。以 PDE5 抑制剂口头治疗是由混合药物注入半软的啮齿目动物(Bioserv; 4-6 g/day),并且充分提供的每日必须营养。控制组是以载剂和食物混合喂食。雄性基因转殖老鼠与持续性地反应 Akt 的心脏过度表现

(16-20周)⁸⁹，对照组(liter mate controls)用一样的方法以载剂或PDE5抑制剂处理。

PDE5A 抑制剂

昔多芬(sildenafil)柠檬酸盐(Viagra[®], Pfizer), EMD 360527(MERCK KgA)及他达拉非(tadalafil)(Cialis[®], Eli Lilly)被使用于研究。活体内慢性研究,昔多芬(sildenafil) 100 mg/kg/day被用来产生平均自由血浆浓度 10.4 ± 2.3 nM (IC_{50} 5-10 nM)。这与浓度上是可比较的,观察在人体内 1 mg/kg/day, 和反射昔多芬(sildenafil)将近一百倍在老鼠的高代谢。1.5 g/kg/day EMD 360527用来产生 EMD 360527 血浆浓度 4μ M (IC_{50} 1μ M 在体外血管圆环里)。100 nM或 1μ M 的昔多芬(sildenafil)被使用在 cGMP-PDE活动分析和出生鼠心肌细胞研究。50 nM他达拉非(tadalafil)被使用在 cGMP-PDE活动分析。

生理研究

经胸二维导向M型超音波心电图(Transthoracic two-dimensional guided M-mode echocardiography)在非被麻醉的老鼠实验。测量完成后使用超音波心电图(echocardiography)系统, SEQUOI C256 (Siemens, Munich, DE)与 15 MHz 线性排列变换器。无损伤的心脏血液动力学的分析执行由前所述⁹⁰。这些研究使用了四个电极压力容量导管(model SPR-839, Millar Instruments)放置经由左心室尖端在开放胸口的麻醉动物和由阻抗安置于沿纵轴记录心室容量及由微量测压法(micromanometry)测压力。

RNA 点墨分析

RNA样品是根据制造商的实验方法从急速冷冻心脏

使用立即可用的试剂作为分离总RNA TRIZOL试剂(Life Technology, Gaithersburg, MD)而制备。RNA点墨分析以一套寡核苷酸探针使用已公开实验方法而进行⁵⁹。资料显示经过对各别样品所测得的GAPDH标准化。

西方点墨法

蛋白质是从急速冷冻心脏组织使用如前所述的萃取缓冲液而制备⁹⁰。抗体包括钙调神经磷酸酶(calcineurin)(1:2000稀释, BD转导实验室(San Diego, CA), GSK3 β , Ser9-phospho-GSK3 β , Akt, Ser473-phospho-Akt, ERK, Thr202/Thr204-phospho-ERK (1:1000稀释, Cell Signaling Technology, Beverly, MA)。初级抗体的结合藉由经山葵过氧化酶共轭的二级抗体和增强化学发光来显现(Pierce, Rockford, IL)。

环状核苷酸分析

心脏以冰冷的PBS洗涤,在6%三氯乙酸中均质化,以水-饱和乙醚离心和萃取。移出水层,真空脱水,并将颗粒状物重新悬浮在醋酸钠缓冲液,用于cAMP和cGMP酵素免疫分析(Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)。

PDE5A、PI3K α 、Akt和PKG-1活性

低 K_m cGMP磷酸二酯酶总活性是在1 μ M/L受质于线性条件下以有和没有PDE5A抑制剂(昔多芬(sildenafil) 0.1至1 μ M,或他达拉非(tadalafil) 50nM)或IBMX (50 μ M)使用萤光极化分析(Molecular Devices)来予以分析。PDE分析在1 μ M cGMP侦测到数个高亲合力cGMP-PDE(PDE5A、PDE9A)及双重专一性PDE(例如, PDE1C、PDE3A、PDE10A和PDE11A)。PI3K α 活性是由Elisa分析

随后接着PI3K免疫沉淀(Seize X IP Kit, Pierce)利用p85 α 单株抗体(Cell Signaling),以萤光极化(Molecular Device, Perkin-Elmer Victor 3 plate reader)测得的活性来进行评估。Akt活性(以s473-pAkt抗体, GSK-3 融合蛋白受质免疫沉淀)使用商业上的套组(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)来进行。PKG-1活性是从整体心脏溶解产物由比色分析, CycLex (Clinisciences, Montrouge, FR)来进行分析。

组织学

心脏以10%甲醛固定隔夜,然后埋置在石蜡里,切成5 μ m厚度并以PAS-六亚甲四胺(PAS-methenamine)染色。心肌细胞直径和间质胶原比率是在观测者不清楚组织来源的情况下使用计算机辅助的图像分析测得(Adobe Photoshop 5.0, NIH Image J)。对至少4至5个不同心脏,以五个不同领域的细胞(共计50至70个细胞于各个心脏)进行定量以供细胞分析。

新生大鼠心肌细胞的研究

如上述将大鼠新生心肌细胞从1至2天大的史-道二氏(Sprague-Dawley)大鼠分离出来⁵⁰。在有或没有以100nM或1 μ M昔多芬(sildenafil)共同培养之下,细胞培养物藉由以脱羟肾上腺素(phenylephrine)(PE; 1 μ M; Sigma Chemical (St. Louis, Missouri)或BayK8644 (1 μ M; Sigma)培养四十八小时来加以刺激。为了估计NFAT活化作用,使用先前叙述的方法将细胞以表现三个连接 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)的NFAT结合位置(p3xNFAT-GL)的腺病毒转染⁷²。另外的研究是利用另一种编码萤光素酶(luciferase)的报导腺病毒(reporter adenovirus)来进行,该报导腺病毒是由NFAT激活子所驱动。此步骤在PE、

BayK8644 或活化的钙调神经磷酸酶的刺激之前二十四个小时进行。后者藉由共同转染编码 Ca^{2+} 非依赖型且持续活化的截短型老鼠钙调神经磷酸酶 A (calcineurin A) (AdCnA⁷²) 的复制缺陷型腺病毒而达成。转染是以 100 PFU 的 MOI 于 2 mL (6 cm 培养皿) DMEM 在 37°C 潮湿且含 5% 二氧化碳的培养器中进行二个小时, 在此之后, 将培养液用包含 1 μ M 的昔多芬或是载剂的培养液替换。在另外的 48 小时后, NFAT 活化作用藉由 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 组织学/活性或萤光素酶活性来估计。将肌肉细胞固定于 2% 聚甲醛和 0.2% 戊二醛在 PBS 10 分钟, 于 24°C 培养在 X-gal 染剂 (在 PBS, 20 mmol/L $\text{K}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 20 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}[\text{CN}]_6$, 2 mmol/L 氯化镁和 1 mg/mL X-gal [Promega] 在 DMSO) 二个小时, 以 PBS 润洗, 并利用 7% 甲醛缓冲液后固定六个小时。 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 活性利用商业测试套组 (Galacto-Light Plus, Applied Biosystems) 由微盘式冷光仪 (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA) 所测得的发光现象来分析。萤光素酶活性由商业套组 (Stratagene, La Jolla, California) 分析并以盘式冷光仪读取。

[³H]-白胺酸的并入

在血清饥饿 (serum starvation) 起始后 24 小时, 在昔多芬 (100 nM 或 1 μ M) 存在或不存在下, 将新生心肌细胞培养在一式三份的含有 1 μ M PE 的 12 孔培养盘里二十四个小时, 然后在含有 1.0 μ Ci/ml [³H]白胺酸的相同培养液中培养另外的十二个小时。吸出培养液, 并且将细胞利用冰冷的 PBS 洗涤和利用冷的 10% 三氯乙酸 (TCA) 固定在冰上 30 分钟。以 5% 的 TCA 洗涤两次并以水洗涤一次之后, 并入 TCA 可沉淀材料的放射线是在溶于 0.25 M 氢氧化钠之后藉由液体闪烁计数法测得。

统计学分析

资料是以平均值 \pm 测量标准误差表示。多个群组之间的差异由变异数分析(ANOVA)并接着由 Tukey 的多重比较测试来进行比较。二群组分析由 t 测试执行(适当地使用配对或非配对测试)。一系列的研究由重复测量变异数分析(repeated measures ANOVA)来检测。

专一性的血液动力学指数法：

所有血液动力学资料皆使用习知发展的软件记录，数字化信号在 2KHz。舒张末期容积和收缩末期容积分别是在等容收缩和松弛期间测量的平均容积。ESP是在最大心室弹性的压力(压力/容积比(P/V ratio))¹。EDP是在压力-容积循环的较低右手角落的舒张压。心输出量是从放置在胸部主动脉附近的血管外围血流探针(Transonics, Ithica, NY)测得。Ea等于收缩末期压力除以心搏排血量的比。将容积导管信号对增益(gain)和偏移(offset)进行校准。增益是藉由设定导管导出的心输出量(等于压力-容积循环宽度乘以心跳速率)至彼等由经校准的血流探针值所得的心输出量。偏移是运用高张盐水的方法测得⁸⁰。心室强度等于压力乘以血流的瞬间乘积，且峰值强度除以EDV获得强度指数PMXI⁷⁹。由一组在暂时性下腔静脉阻塞期间所测量的收缩末期压力-容积点(最大P/[V-V₀])获得Ees_n。此相关性Ees的斜率由心脏重量标准化且表示为每gm心脏重量。Msw是由心搏做功及EDV(其来自用于导出Ees_n的同一组交变载荷心脏循环)之间的线性关系导出，且该Msw是另一种非负载依赖型的心脏收缩功能的评估⁴。Tau由下列模型获得： $P = P_0 + ae^{-t/\tau}$ ，代入在等容松弛期间的资料。dP/dt是从数字过滤器(5个点算出的斜率)而导出。PFR/EDV是从早期舒张期间的容积信号中最大的第一衍生物除以EDV而导出。

动物研究为例子 7-11

雄性野生型及 NOS3^{-/-} 老鼠 (C57BL6, Jackson Labs, 6 至 8 星期) 的研究。PDE5A 在活体内以昔多芬 (sildenafil) 处理被抑制了 (100 μg/kg/min; 37±5.2 nM 自由血浆浓度); 或 EMD-360527/5 (MERCK KgA, Germany, 160-300 μg/kg/min)。两种化合物有 IC₅₀ 大约 10 nM 纯化的 PDE5A (PDE1 或 PDE3 对于 1-20 μM)。体外研究使用了 0.1 至 1 μM 昔多芬 (sildenafil) (SIL), 0.05 μM 他达拉非 (tadalafil) (于 IX PBS 制备), 或 0.1 μM EMD-360527/5 于 1% 丙二醇缓冲液中。单独以载体于实验体内及实验体外已被证明是毫无效应。

活体研究

异丙肾上腺素 (Isoproterenol) (ISO: 20 ng/kg/minutes i.v. x 5 分钟) 有或没有 PDE5A 抑制剂给予未受损伤的老鼠麻醉, 和活体内心脏功能由压力容积相关评估²³, 以固定的心房搏动速率约 600 至 650 min⁻¹。资料在基线测量, 与 ISO, 重新良测基线, PDE5A 抑制性质, 及 PDE5A 抑制性质+ISO。ISO 只反应于高度可再生的。

隔绝肌肉细胞研究

被切除的心脏是由缓冲布满包含 BDM (1 mg/ml) 及牛磺酸 (taurine) (0.628 mg/ml) 3 分钟, 0.9 mg/ml 胶原酶 (Worthington Biochemical Co., Lakewood, NJ, type 2; 299 U/mg) 和 0.05 mg/ml 蛋白酶 (Sigma Chemical, St Louis, Missouri) 6 至 7 分钟。心室轻轻地削剪了, 过滤 (滤网 150 μ), 分离 (1 分钟 500 转), 随着钙的增加以泰洛氏溶液 (Tyrode's solution) 清洗 (Ca²⁺ 最终浓度为 1.8 mM)。细胞与 5 μM Indo-1 AM (Molecular Probes) 由领域刺激在一个被倒置的荧光显微镜 (Diaphot 200; Nikon, Inc) 培养,

清洗，和在 27°C 研究，。肌小节长度 (IonOptix, MA) 并且整体细胞钙瞬间被测量了。随着基线，细胞暴露于 10nM 的 ISO，然后 ISO+SIL，或 ISO+EMD- 360527/5 在 pH7.45。SIL 在 0.1% DMSO 和 EMD 在 0.001% 丙二醇里被稀释了；控制溶液包含了相似的载剂浓度。

基因和蛋白质表现

PDE5A 基因表现由定量实时 PCR 量测。残余的染色体组 DNA 藉由 DNase I 的处理从 mRNA 移除，及 cDNA 的合成随着 SuperScript First-Strand Synthesis System 为 RT-PCR (Invitrogen)。相对的量由 SYBR Green I 分析 (QuantiTect SYBR Green PCR, Qiagen) 测得了 PDE5A mRNA，利用以下激活子：PDE5A (GenBank: NM_153422.1) 上部激活子 1493 5'-TGAGCAGTTCCTGGAAGCCT-S'，低激活子 1596 5'-ATGTCACCATCTGCTTGGCC-3'，产物 104 bp；GAPDH (NM_008084.1) 上部激活子 263 5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAGAC-S'，低激活子 363 5'-GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3'，产物 101 bp；以 GeneAmp 5700 序列检测系统 (Applied Biosystems)。PCR 样品跑了一式三份，并且 GAPDH 被使用于正规化不同的样品 PDE5 A 内容。反应 (20 μ l) 执行了与 300 nM 专一性的激活子对为 40 个循环的放大作用 (变性作用在 95°C、15 s，黏合于 60°C、30 s，及扩张在 72°C、30 s)。PCR 产物放大作用专一性由熔化的曲线分析证实了²⁴。在最后的 PCR 周期后，反应热变性超过 35°C，温度梯度从 60 至 95°C 以 0.03°C/s 加热。

蛋白质溶解产物从整体心肌层和被隔绝的心肌细胞于透析缓冲液 (# 9803, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) 中与小型蛋白酶抑制剂 (# 1-836-153, Roche,

IN)以及 5%氟核(Triton)萃取。以下 12,000 g 离心法三十分钟, 蛋白质定量(# 23235, Pierce, Rockford, IL), NUPage LDS 样品缓冲添加(# 161-0737, Biorad, Hercules, CA), 并且溶解产物电泳在 NuPAGE 4 至 12% Bis-Tris 聚丙烯酰胺(polyacrylamide)胶体(Invitrogen, San Diego, CA)。膜与兔子聚株抗体培养量的上升受到纯化的牛肺 PDE5 A 的压制(Cell Signaling, MA) [1:5,000], 氨基终端 PDE5A 区域(从 Mauro Giorgi 赠送而来)[1:5,000], 或重组 PDE5A [1:10,000]。

荧光共振能量转移(FRET)影像

心室肌肉细胞从 1 至 2 天的史一道二氏(Sprague dawley)大鼠(CharlesRiver Lab, MA)制备及与载体携带 cGMP 传感器 cygnet- 2.1 做转染⁷⁷, 在该传感器 EYFP 以较少 pH 敏感变异黄石英替换⁸⁹, 及成像的十八至二十四小时在转染之后叙述⁹⁰。图像(50-80ms 曝光)在每 10 秒使用订制软件和由 Imagej (NIH, MD)处理取得。FRET 是变化在 480nm/545nm 辐射强度(ΔR) 在 430nm 上激发⁹¹表示在基础强度在 (R_0) 百分比的改变。细胞浸泡了在 HEPES 缓冲的林格氏(Ringer's)调控盐(1mmol/L 氯化钙), 在室温(20-22°C)。

PDE5A 及 PKG-1 活性分析

低 K_m , cGMP 磷酸二酯酶活性了在 1 μ Mol/L 受质被检验, 藉由荧光极化(Molecular Device, CA)在线性情况下, 或 2 阶段放射性标志测定法¹⁸, 有或没有添加的昔多芬(sildenafil)(0.1-1 μ M), 他达拉非(tadalafil)(50nM), 或 IBMX (50 μ M)。PDE 分析在 1 μ M cGMP 侦测出数个高亲合性的 GMP-PDEs (PDE5A, PDE9A) 及双重专一性 PDEs (即; PDE1C, PDE3A, PDE10A 和 PDE11A)。

PKG-1 活性由比色分析(CycLex, Nagno, Japan)检验了执行在整体肌肉细胞与有或没有添加 ISO (10nM)做培养, SIL (1 μ M), 他达拉非(tadalafil)(50nM), 或 sGC 抑制剂 ODQ (3 μ M, Sigma)。在 10 分钟以后, 细胞被溶解了且 PKG-1 活性测得了。

免疫荧光组织学

野生型心肌细胞被固定在 50%甲醇/50%丙酮里, 和整页与序列专一性的 PDE5A 抗体(从 K. Omori 赠送而来)培养, 在 1:5,000 稀释和不是老鼠单株 α -actinin (1:500 稀释; Chemicon Intern.CA), 或 NOS3 (1:3000; 转导实验室, KY)。第二次培养使用了反兔子 Alexa 488 和反老鼠 Alexa 546 (Molecular Probes, OR) (1 小时, 27 $^{\circ}$ C)。细胞是在一个 Zeiss 倒置的表面荧光显微镜(epifluorescence microscope)以氩氮雷射共焦扫描系统(UltraVIEW, PerkinElmer Life Science, MA)成像。

人体研究

四十个健康志愿者从一般人口中以被张贴在周围的社区所响应广告的人来补充。由病史, 体格检查, 和经胸超音波心电图(transthoracic echocardiogram)筛选实验体。个体以心脏病, 动脉粥样硬化, 高血压, 糖尿病性酮尿, 肺高血压, 肾脏或肝疾病, 抽烟, 怀孕, 或在硝酸盐治疗之下, 肾上腺素阻隔药物, 或医学上已知干涉昔多芬(sildenafil)的药物动力学被排除了。研究设计如以下一个随机化的, 双盲, 安慰剂控制流程, 使用倾向昔多芬(sildenafil)的 3:2 分配比率。所有实验体均指示在研究之前禁食大于 6 小时。一根静脉内导管安置在前臂, 并且 15 至 20 分钟之后, 血压, 心电图的最初的基线(B1)测量, 并且对评估心脏作用的超音波多谱勒仪在仰卧位

置获得。静脉内投以多巴酚丁胺(dobutamine)(5 μ g/kg/min) 5分钟达到一个稳定的反应,及重复测量(D1)。多巴酚丁胺(dobutamine)被中断了,并且假使15分钟回归到基线状态。实验体然后接受了不是100mg口头昔多芬(sildenafil)就是安慰剂。在75分钟之后(平均时间峰值浓度)⁸²,血样被获得证实昔多芬(sildenafil)浓度。资料再次记录了第二条基线(B2),和在第二多巴酚丁胺(dobutamine)注入(D2)期间使用和第一次测试相同的流程。

心脏功能分析

心脏收缩功能由心脏专一性指数确定了压力,次元,和流程的联合测量。动脉压力由一个腕式及臂式的示波器(oscillometric arm cuff)(Dinemap, Critikon, Tampa, FL)测得,及2维超音波多谱勒仪由Agilent Sonos 5500(Philips, 荷兰)使用一根3兆赫探针测得。所有超音波多谱勒仪测量是数字化地需要光盘和由一位蒙蔽的调查员离线分析。各次测量反射了平均至少3不同跳动。大动脉流程与速度对时间的积分结果是相等的,此积分从脉冲波多谱勒仪在左心室流出径乘以横截面直径。行程排量,峰值,和平均流程从这信号波形测得。心脏输出量是心跳速率和行程排量的产物。系统血管阻抗是平均动脉压力($1/3$ 脉压+ 舒张压)与心脏输出量的比率。

心脏收缩性由几个与装载无关的指数评估。主要结果是峰值强度指数(最大的强度由结束心脏舒张容量划分的)的变量,其指数反射心脏可收缩的状态与后负荷和预压无关,如同早先被证明的^{76,77,84}。最大强度与峰值大动脉流程和收缩压产物近似,其强度强烈地与压力和流程最大的瞬间压力和流程产物($y=1.08x + 0.002$, $r^2 = 0.97$, $p < 0.0001$; 根据对报导侵略性资料从有心脏情况范围较大病人的分析)有关联。与负载无关的第二次结果收

缩性参数是平均心室强度指数和结束心脏收缩的压力/容量比率，略计为心室结束心脏收缩的弹性量。

其它第二次结果变量包括心脏收缩和舒张功能定期测量。射出分数从结束心脏舒张和心脏收缩的容量藉由Simpson's方法利用顶端4和2心室观点测得。结束舒张容量与行程排量是相等的(从多谱勒仪)由射出分数划分，以收缩末期容量的相等区别前者 and 后者。脉冲波转二尖瓣流入(transmitral flow)多谱勒仪光谱及横向二尖瓣环状组织多谱勒仪成像速度已作为早先习惯使用估计舒张的功能⁸⁹。E/E'比率被确定了作为左心室充填压力的一个代理标志如同之前确认的⁹⁰。等容松弛时间由连续波多谱勒仪测量，此时间为在大动脉流程停止和二尖瓣流入起始之间。

血浆昔多芬(sildenafil)浓度

血浆昔多芬(sildenafil)及它的代谢产物：去甲基化昔多芬(desmethylsildenafil)在各个实验体由液相层析仪和质谱仪(SFBC Analytical Labs, North Wales, PA)测得。

统计学的分析

样本大小估计设定侦测出 $a > 20\%$ 在左心室以响应多巴酚丁胺(dobutamine)造成峰值强度指数下降，与 $\alpha=0.05$ 和80%强度。在预先的动物研究中，随着PDE5A抑制性质由多巴酚丁胺(dobutamine)刺激的强度降低约50%，人体实验中，从大约300 mmHg/sec基线来看⁷⁶，多巴酚丁胺(dobutamine)强度增加大于100%。侦测出在这个反应(60 mmHg/sec)与50 mmHg/sec的标准偏差(从预先的资料)降低20%，以15个安慰剂控制的样本尺寸和23个昔多芬(sildenafil)处理的实验体估算。

所有统计分析执行使用Systat^(R)软件。结果被表达作

为平均值 \pm 标准偏差。血液动力学的资料被分析于使用重复三种方法测量变异数分析，用三个群组的因素是：1) 呈现或缺乏多巴酚丁胺(dobutamine)；2) 安慰剂对于昔多芬(sildenafil)；并且 3) 第一次对于第二次多巴酚丁胺(dobutamine)挑战研究。主要测试是测试在小组分析之间，是否昔多芬(sildenafil)(对于安慰剂)改变了在第一个和第二个多巴酚丁胺(dobutamine)反应之间的差距，并且由一个三种方法交互作用的项目测得，包括各个群组因素。这个模型亦包括一个项目测试对于昔多芬(sildenafil)的一个整体作用(对于安慰剂)，该测试与相对多巴酚丁胺(dobutamine)反应完全没有关系。在群组分析亦执行使用 2 尾型 Student 的配对 t 测试估计个体的多巴酚丁胺(dobutamine)反应(即；D1-B1, D2-B2)，和双向变异数分析测试是否研究药物改变了在各个小组的这个反应。某范畴的变量可使用卡方试验比较。

本发明的实际应用，除非另外说明，分子生物学传统技术(包括重组技术)，微生物学，细胞生物学，生化和免疫学，这些都已经是在熟练的大师视界之内。这样技术充分地解释在文学，譬如："Molecular Clonig: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait 1984); "Animal Cell Culture" (Freshney 1987); "Methods in Enzymology" "Handbook of Experimental" (Weir, 1996); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (Miller and Calos, 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel, 1987); "PCR: The Polymerase Train Reaction", (Mullis, 1994); "Current Protcols in Immunology" (Coligan, 1991)。这些技术可适用于对聚核苷酸的生产 and 多胜肽的发明，以及也许考虑制作和实践发明。特殊具体化的有用技术将被谈论在以下的部分。

DHE 染色方法

新鲜冰冻的LV心肌层(8 μm 切片)与超氧化物阴离子荧光探针(dihydroethidium)(DHE; Molecular Probes, Eugene, Ore; 2 μM)被培养在1小时37 $^{\circ}\text{C}$, 该探针可评估 O_2 的形成(典型地核子局部化)。图像执行了在Zeiss倒置的表面荧光显微镜(epifluorescence microscope)接触氩氦雷射共焦扫描系统(UltraVIEW, Perkin Elmer Life Science, Inc)。DHE的激发/辐射光谱各别是488和610nm, 以585 nm侦测。

心脏明胶酶(gelatinase)分析

MMP-2 和 MMP-9 分解体外明胶由酶谱分析(zymography)评估。简要地, 修饰过的Laemmli缓冲液没有巯乙醇(mercaptoethanol), 此缓冲液被添加于分解的组织样品且装在10%明胶(Invitrogen Corp., San Diego, CA)中。在电泳之后, 胶体以复性(renaturing)的缓冲液在室温清洗二次接着形成缓冲液(Invitrogen Corp., San Diego, CA), 然后以一个商业上可利用的考马斯(Coomassie)染色显现细胞溶解的带(SMPLYBLUe, Invitrogen Corp., San Diego, CA)。

RhoA 活性分析

RhoA 活性分析由免疫沉淀(immunoprecipitation)使用商业上可利用的被固定的抗体(SEIZE X IP, Pierce Biotechnology, IL)。抗体的使用是兔子聚株抗体培养的上升受到RhoA的压制(Upstate, NY [1:2500])并且随后商业上的活性分析是根据制造商的规格(Upstate Biotechnology, NY)

西方分析

蛋白质分解从整体心肌层及隔绝的心肌细胞使用溶解的缓冲液(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)与微型蛋白酶抑制剂(Roche,IN)及 5% 氘核(Triton)(Sigma Chemical St. Louis, Missouri)获得。随后以 12,000 g 离心法 30 分钟, 蛋白质定量(Pierce Rockford, IL), 添加 NUPage LDS 样品缓冲液(Biorad,Hercules, California), 且分解电泳在 NuPAGE 4 至 12% 的 Bis-Tris-聚丙烯酰胺(polyacrylamide)胶体(Invitrogen, San Diego, CA)。膜与兔子聚株抗体培养的上升受到 ROCK1 或 ROCK2 压制(Cell Signaling, Beverly, MA) [1:3,000]。

STAT3 活化研究

心肌组织萃取物是在 SDS 新胶体中电泳, 和探测酪氨酸磷酸化(Tyr705)及整体 Stat3。在另外的研究中, 鼠出生肌肉细胞被培养了, 然后暴露在介白素-6 (IL-6, Cell Signaling, 100 ng/ml)一个小时。在一些研究中, 细胞在 IL-6 之前以昔多芬(sildenafil)预处理(1 μ M) 30 分钟, 和然后再以 IL-6 同样步骤。在其它研究中, 细胞与混杂的多糖体沉默 RNAs 预转染(LipofectamineTM, Invitrogen)为 STAT3 (siRNA, SmarTTPool Stat3)。蛋白质萃取物从肌肉细胞萃取物在 1 个小时潜伏期之后获得, 和探测 Stat1 (Tyr701)及 Stat3 (Tyr705)(Cell Signaling Inc.)的磷酸化和总蛋白质浓度。siRNA 转染入初生的肌肉细胞。

其它

由前面的叙述, 它将是明显的, 变异和修饰也许对此文中发明的描述采取它对各式各样的用法和情况。这样具体的做法亦是在以下要求的范围之内。所有的专利和出版物在这个规格由参考文献被提及并入此文中在同

样程度上，就好象各独立专利和出版物具体地和各自地表明由参考文献合并。

参考文献

1. Senazaki, et al., (2001) *FASEB J.* 15:1718-1726
2. Molkentin, et al., (1998) *Cell* 93:215-228
3. Semeniuk, et al., (2003) *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 284:H425-H430
4. Fiedler, et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:11363-11368
5. Bueno, et al., (2002) *Circ. Res.* 91:776-781
6. Minamino, et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:3866-3871
7. Zou, et al., (2001) *Circulation* 104: 102- 108
8. Bueno, et al., (2000) *EMBO J* 19:6341-6350
9. Condorelli, et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:12333-12338
10. Matsui, et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277:22896-22901
11. Matsui, et al., (2003) *Cell Cycle* 2:220-223
12. Oudit, et al., (2004) *J. Mol. Cell Cardiol* 37:449-471
13. Crackower, et al., (2002) *Cell* 110:737-749
14. Patrucco, et al., (2004) *Cell* 118:375-387
15. Hardt, et al., (2002) *Circ. Res* 90:1055-1063
16. Juhaszova, et al., (2004) *J. Clin. Invest* 113:1535-1549
17. Tanji, et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277:36955-36961
18. Shin, et al., (2002) *Exp. Mol. Med.* 34:444-450
19. Antos, et al., (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:907-912

20. Corbin, et al., (2003) *Curr. Med. Res. Opin.* 19:747-752
21. Takimoto, et al., (2004) *Circ Res.* In Press
22. Kim, et al., (2001) *Circulation* 104:2338-2343
23. Ni, et al., (2004) *J. Am. Soc. Nephrol.* 15:1254-1260
24. Rybalkin, et al., (2003) *EMBO J.* 22:469-478
25. Francis, et al., (2002) *J. Biol. Chem.* 277:47581-47587
26. Massion, et al., (2003) *Circ. Res.* 93:388-398
27. Champion, et al. (2004) *Circ. Res.* 94:657-668
28. Knowles, et al. (2001) *J. Clin. Invest* 107:975-984
29. Holtwick, et al., (2003) *J. Clin. Invest* 111:1399-1407
30. Oliver, et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:
31. Zahabi, et al., (2003) *J. Biol. Chem.* 278:47694-47699
32. Kotera, et al., (2003) *Biochem J.* 372:419-426
33. Wollert, et al., (2002) *Hypertension* 39:87-92
34. Pilz, et al., (2003) *Circ. Res.* 93:1034-1046
35. De Windt, et al., (2000) *J. Biol. Chem.* 275:13571-13579
36. De Windt, et al., (2000) *Circ. Res.* 86:255-263
37. Esposito, et al., (2002) *Circulation* 105:85-92
38. Wilkins, et al., (2004) *Circ. Res.* 94:110-118
39. Michael, et al., (2004) *J. Biol. Chem.* 279-21383-21393
40. Sastry, et al., (2004) *J. Am. Coll. Cardiol.* 43:1149-1153
41. Senzaki, et al., (2001) *FASEB J.* 15:1718-1726

42. Giordano, et al., (2001) *Biochem Biophys Acta*. 1539: 16-27
43. Kotera, et al., (2000) *J Histochem Cytochem*. 48: 685-693
44. Loughney, et al. (1998) *Gene*. 216:139-147
45. Corbin, et al., (2003) *Curr. Med. Res. Opin.* 19: 747-752
46. Cremers, et al., (2003) *J. Cardiovasc Pharmacol*. 41: 734-743
47. Herrmann, et al., (2000) *N Engl J Med*. 342: 1622-1626
48. Kishimoto, et al., (2001) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98:2703-2706
49. Holtwick, et al., (2003) *J Clin Invest*. 111:1399-1407
50. Wollert, et al., (2002) *Hypertension* 39:87-92
51. Corbin, et al., (2003) *Curr Med Res Opin*. 19: 747-752
52. Loughney, et al., (1998) *Gene*. 216:139-147
53. Wallis, et al., (1999) *Am J. Cardiol*. 83:3C-12C
54. Herrmann, et al., (2000) *N Engl J Med*. 342:1622-1626
55. Jackson, et al., (1999) *Am J Cardiol*. 83:13C-20C
56. Arruda Olson, et al., (2002) *JAMA* 287:719-725
57. Bocchi, et al., (2002) *Circulation* 106:1097-1103
58. Senzaki, et al., (2002) *FASEB J* 15:1718-1726
59. Takimoto, et al., (2005) *Circ Res*. 96:100-109
60. Takimoto, et al., (2005) *Nat Med*. 11:214-222
61. Raja, et al., (2004) *Ann Thora Surg*. 78:1496-1506
62. Reffelmann, et al., (2003) *Circulation* 108:239-244
63. Humbert, et al., (2004) *N Engl J. Med*. 351:1425-1436

64. Michelakis, et al., (2003) *Circulation* 108:2006-2069
65. Kimura, et al., (2003) *Hypertension* 41 :1106-1110
66. Katz, et al., (2000) *J Am Coll Cardiol* 36:845-851
67. Salloum, et al. (2003) *Circ. Res.* 92:595-597
68. Kukreja, et al., (2003) *Cardiovasc Res.* 60:700-701
69. Feenstra, et al., (1998) *Lancet* 352:957-958
70. Thadani, et al., (2002) *J Am Coll Cardiol.* 40:2006-2012
71. Cremers, et al., (2003) *J Cardiovasc Pharmacol.*41:734-743
72. Massion, et al., (2003) *Circ Res.* 93:388-398
73. Rivet-Bastide, et al., (1997) *J Clin Invest.* 99:2710-2718
74. Hare, et al., (1995) *Circulation.* 92:2198-2203
75. Massion, et al., (2003) *J Physiol* 546:63-75
76. Sharir, et al., (1994) *Circulation* 89:2045-2053
77. Nakayama, et al., (1998) *Am Heart J.* 136:281-288
78. Fleg, et al., (1994) *Circulation* 90:2333-2341
79. Feil, et al., (2003) *Circ Res.* 93:907-916
80. Goldstein, et al., (1998) *N Engl. J. Med.* 338:1397-1404
81. Pilz, et al., (2003) *Circ. Res.* 93:1034-1046
82. Pfizer Labs, Product Information: Viagra(R), Sildenafil Citrate (2002)
83. Lewis, et al., (1984) *Circulation* 70:425-431
84. Marmor, et al., (1997) *J Am Coll Cardiol.* 29:422-428
85. Phillips, et al., (2000) *Circulation.* 102:3068-3073
86. Daly, et al., (1997) *Am J. Cardiol.* 79:1381-1386
87. Piccirillo, et al. (2002) *Am Heart J.* 143:703-710
88. Schalcher, et al. (2002) *Hypertension* 40:763-767

89. Sohn, et al., (1997) J Am Coll Cardiol. 30:474-480
90. Ommen, et al., (2000) Circulation. 102:1788-1794
91. Traverse, et al., (2000) Circulation 102:2997-3002

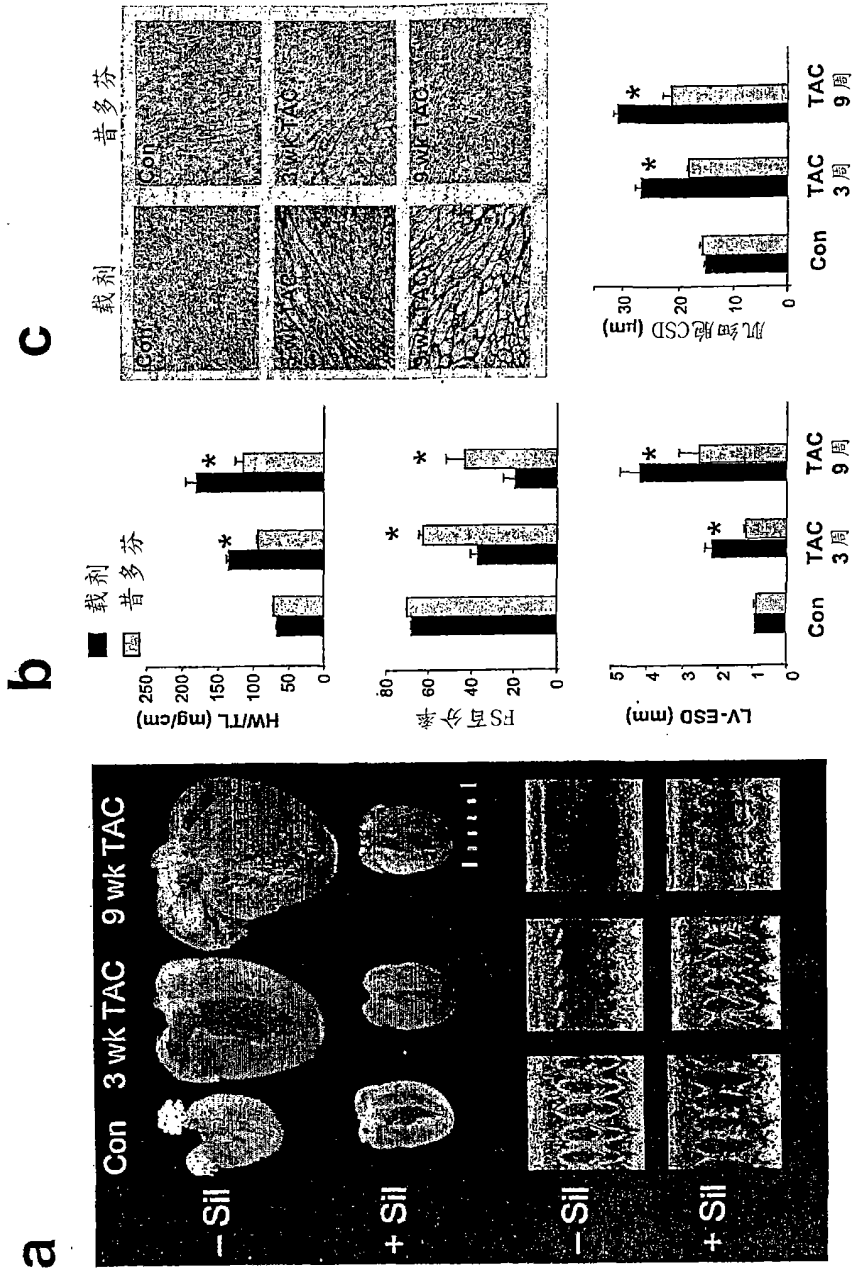


图1

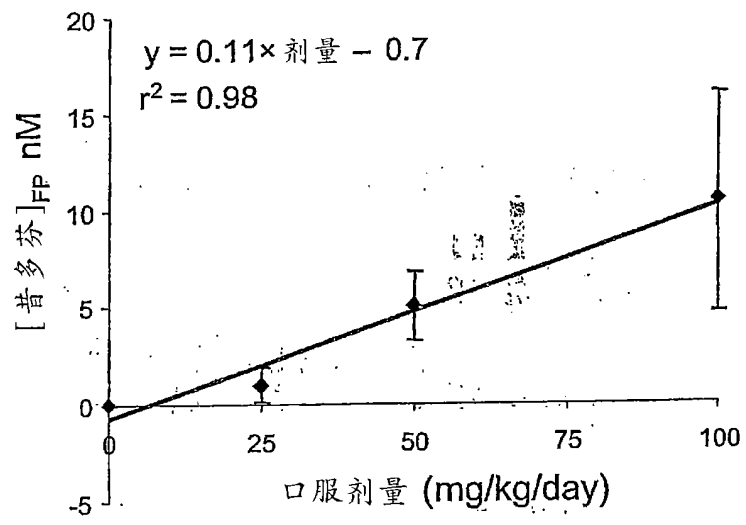


图2

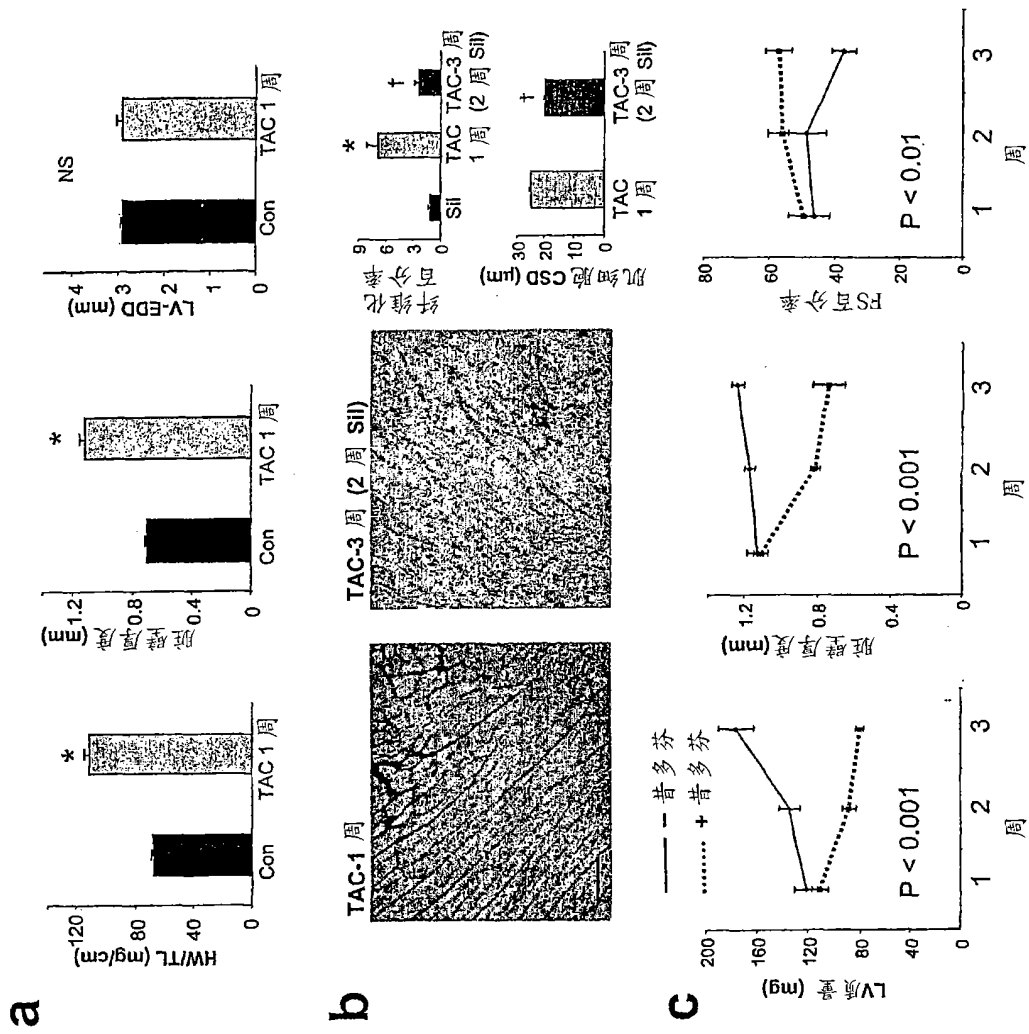


图3

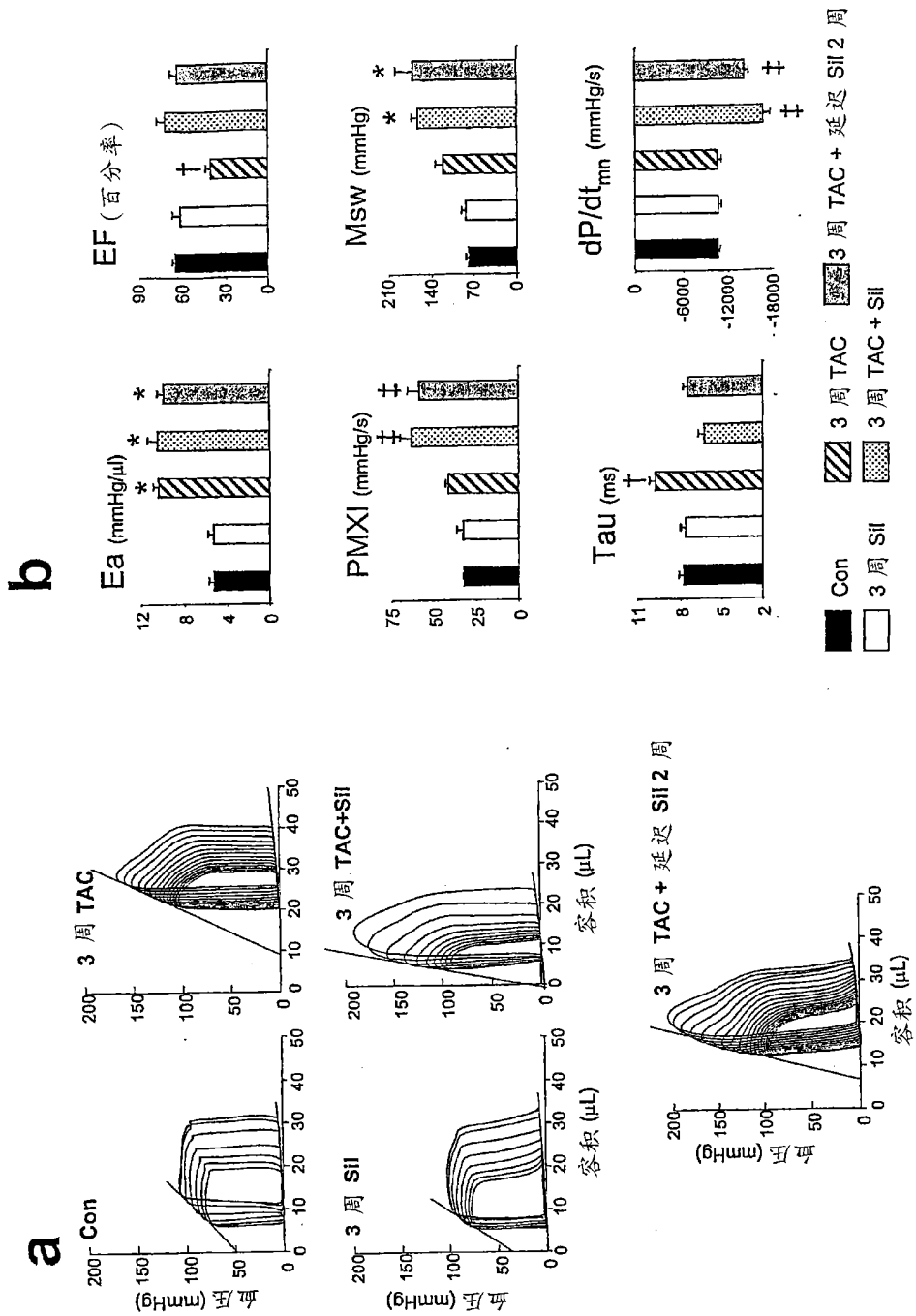


图4

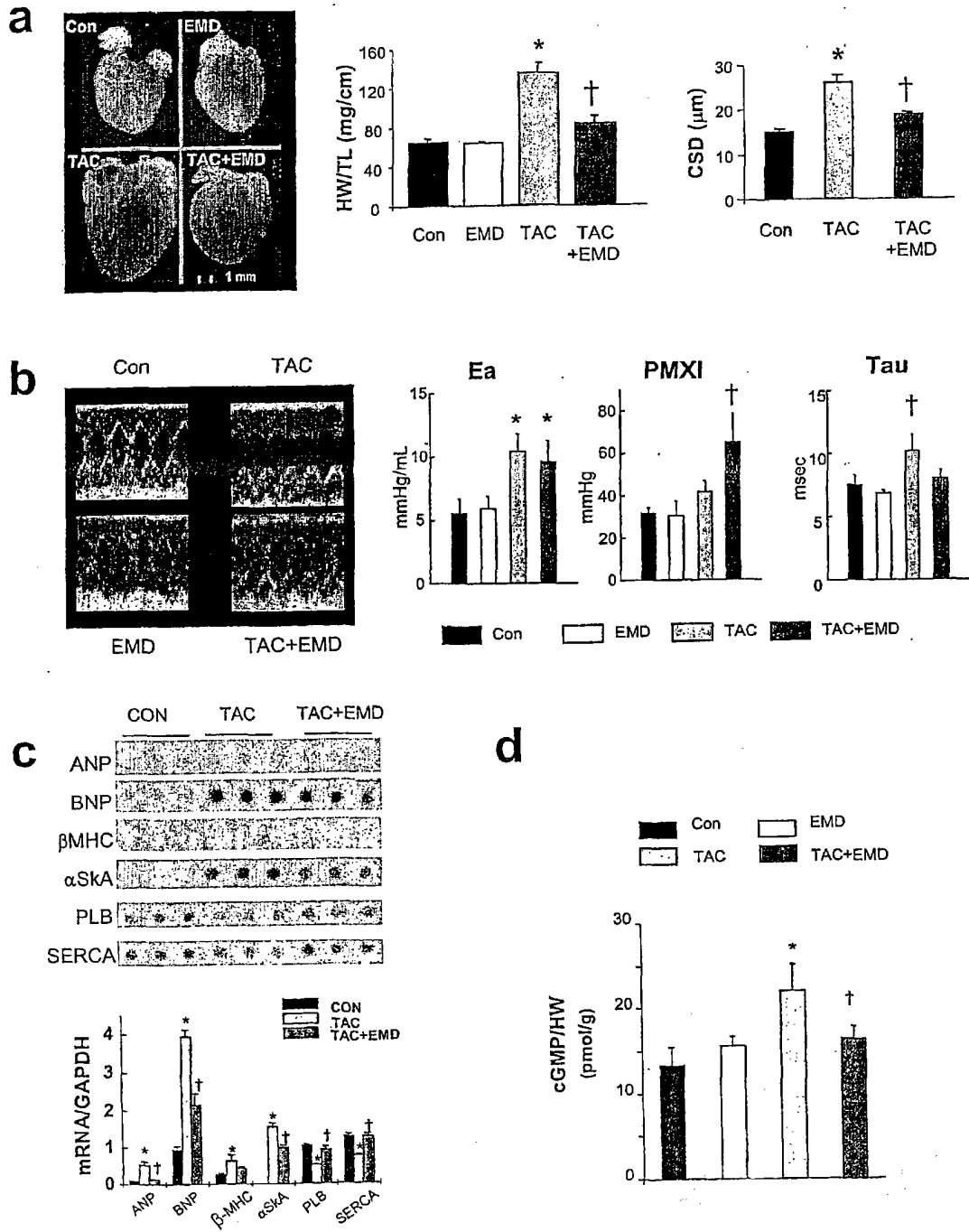


图5

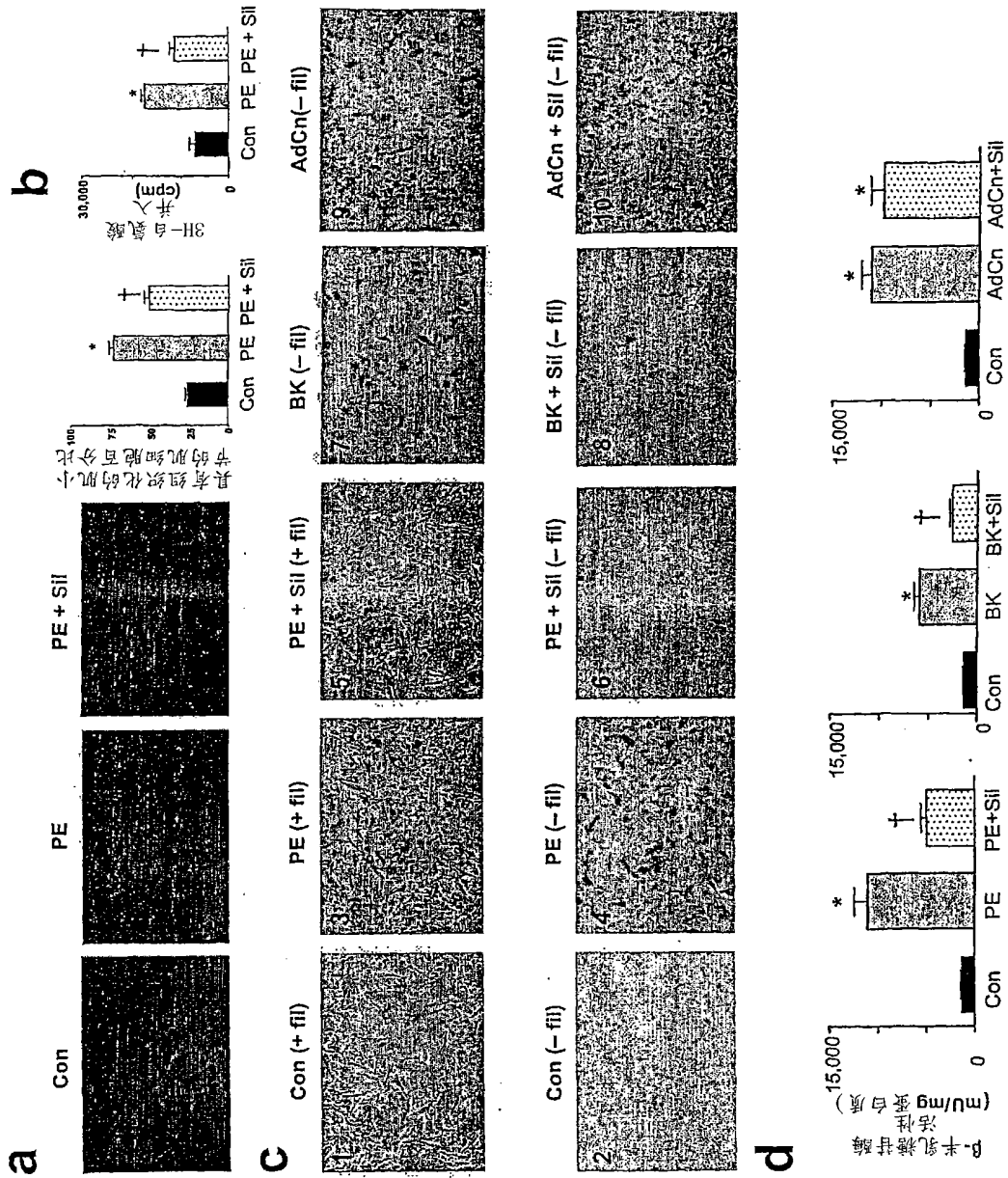


图7

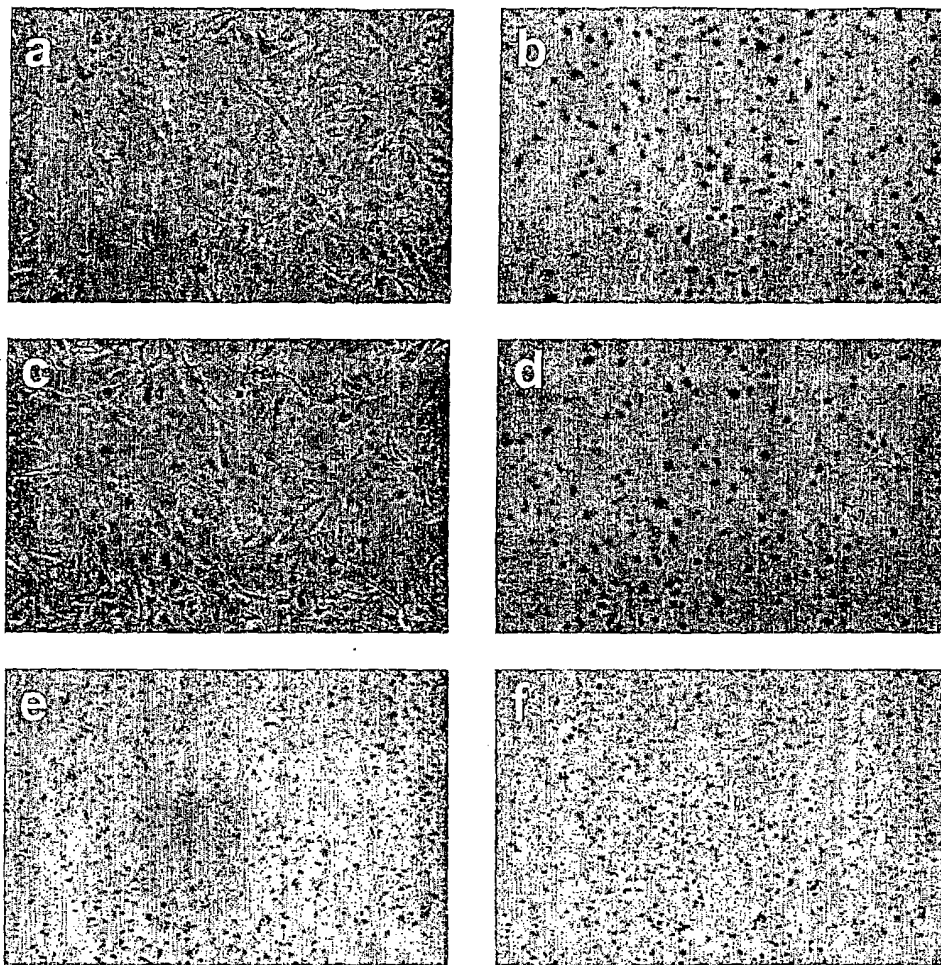


图8

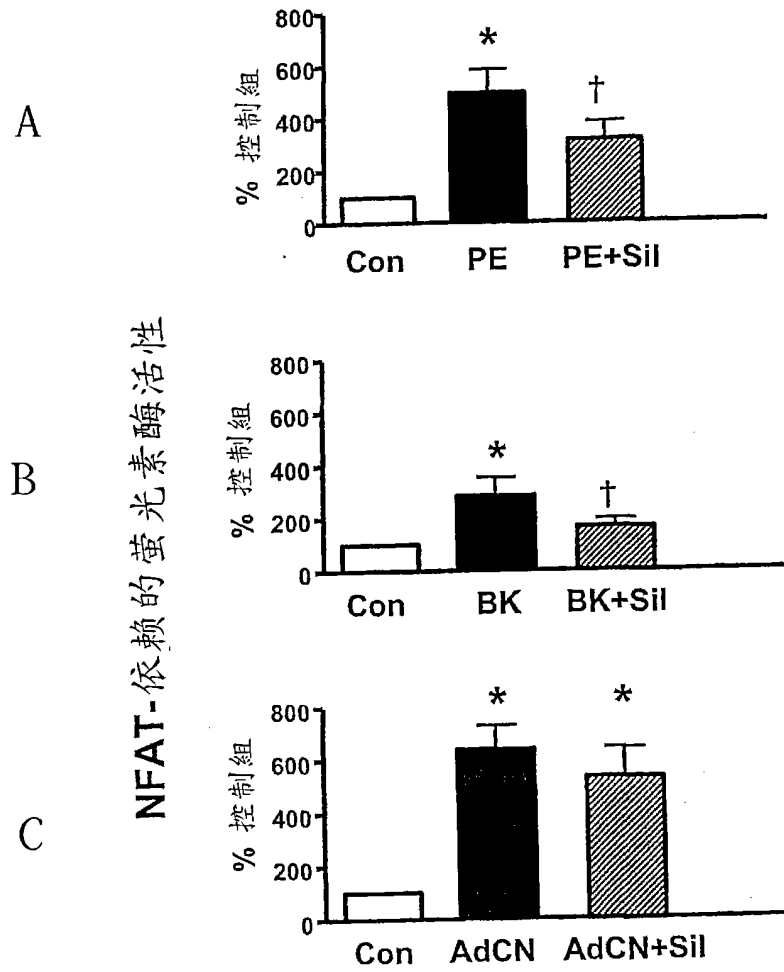


图9

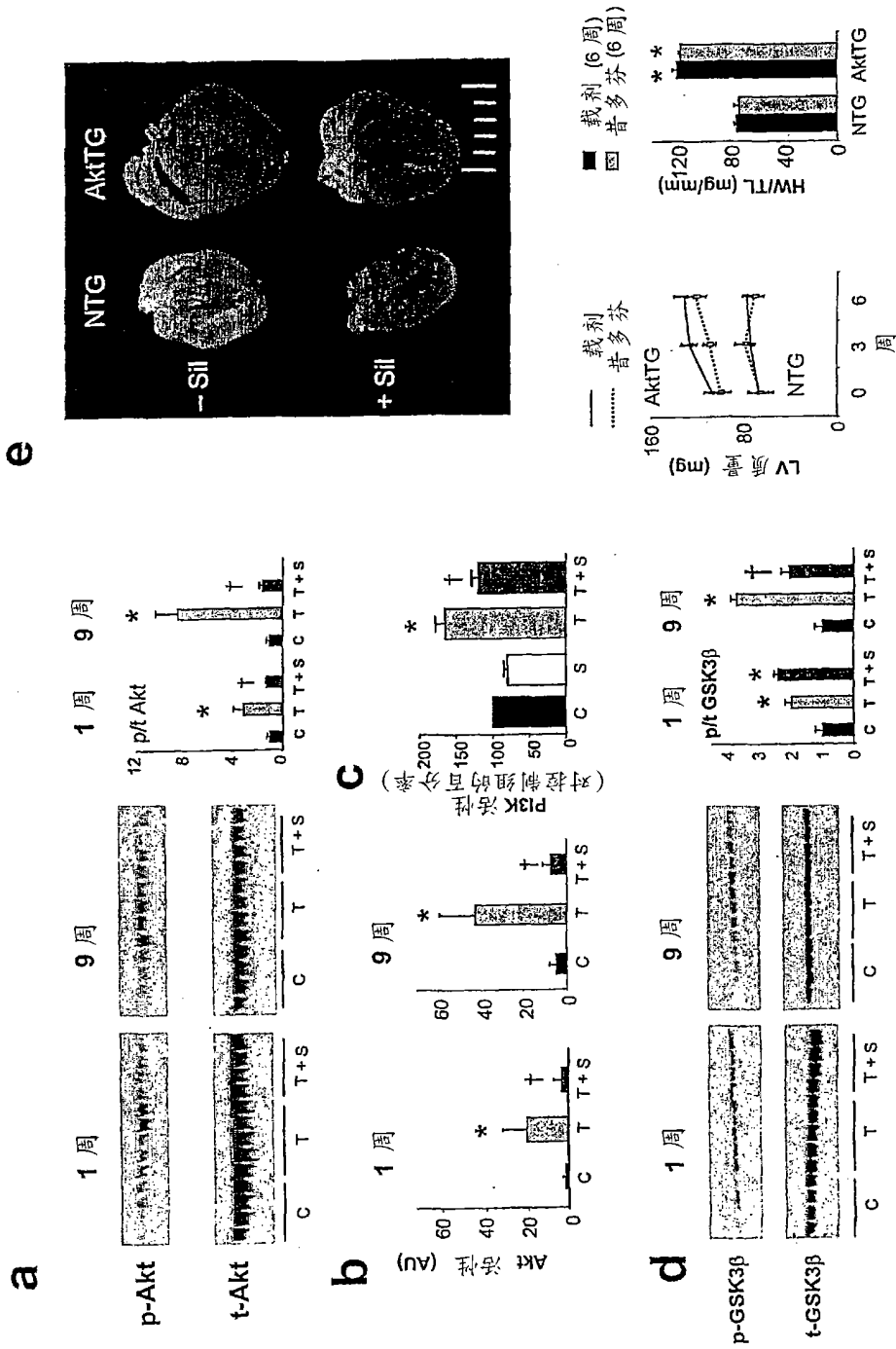
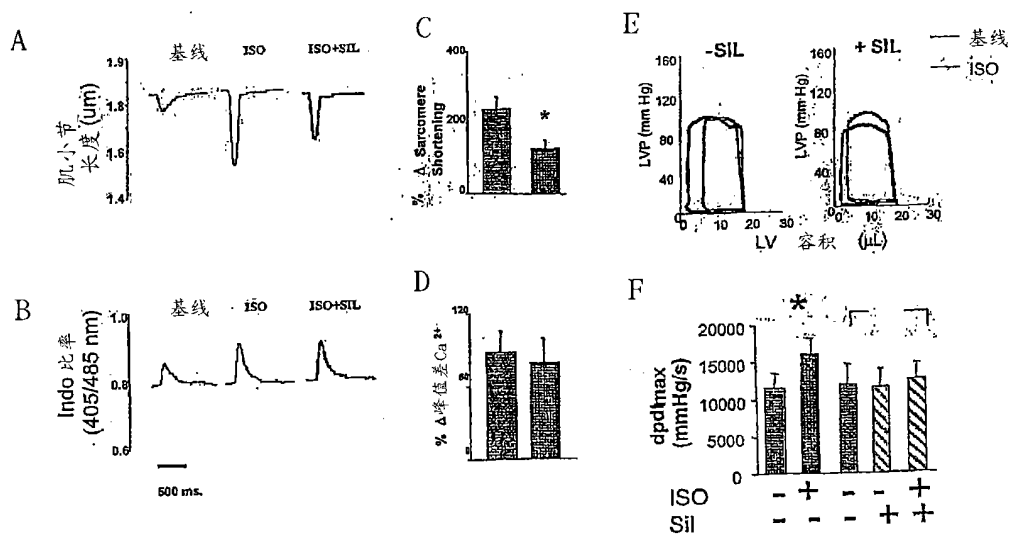


图10

PDE5A-I在单离的成体老鼠肌细胞的抗肾上腺素作用



Takimoto et al. Circ Res 2005;96:100-109

图11

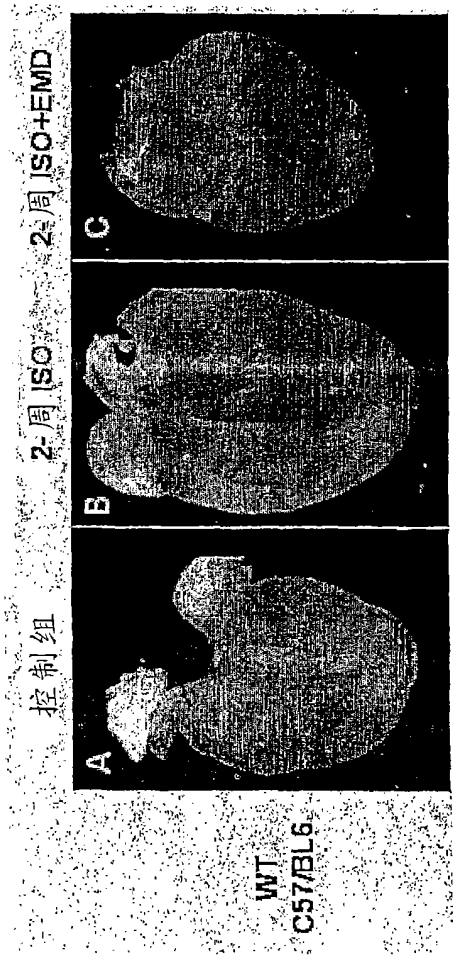


图12A

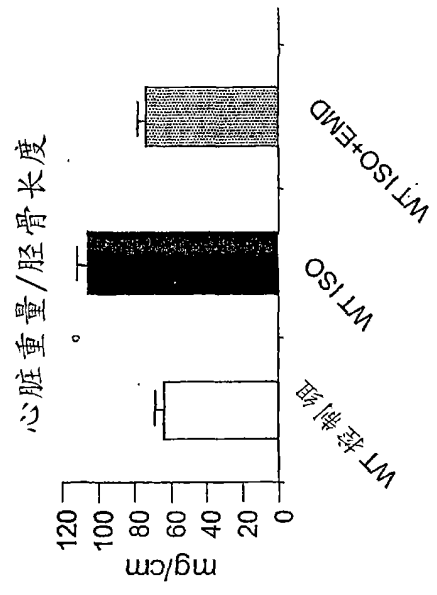


图12B

β -肾上腺素刺激作用的抑制
并未发生在ANP刺激作用中

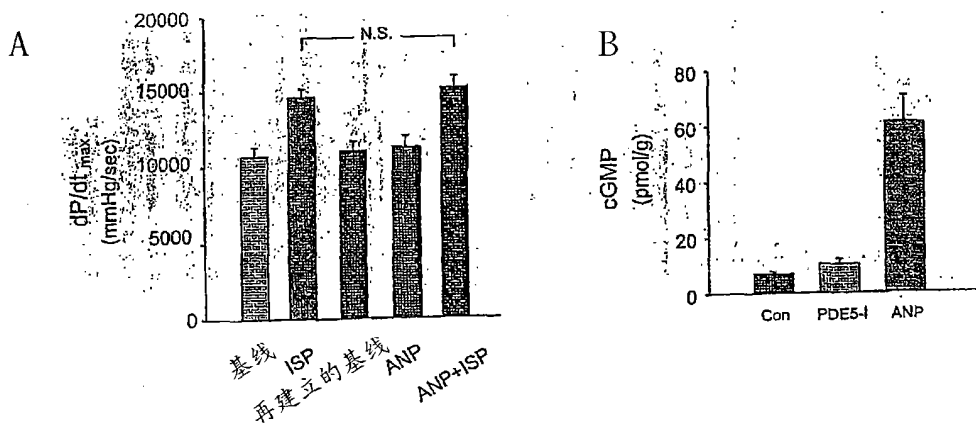


图13

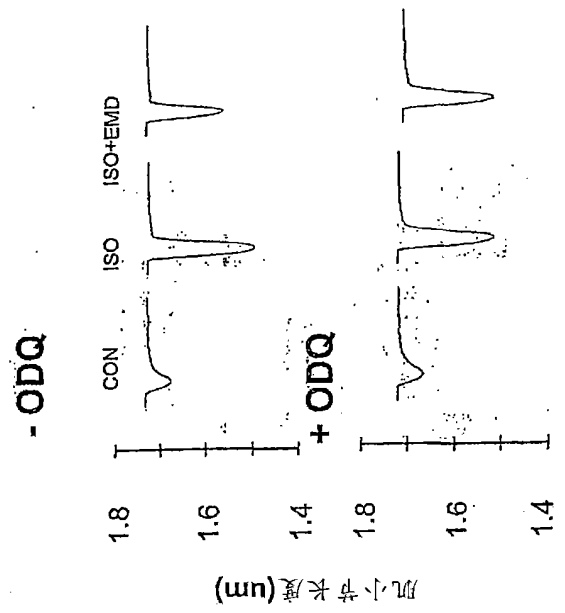


图14A

图14B

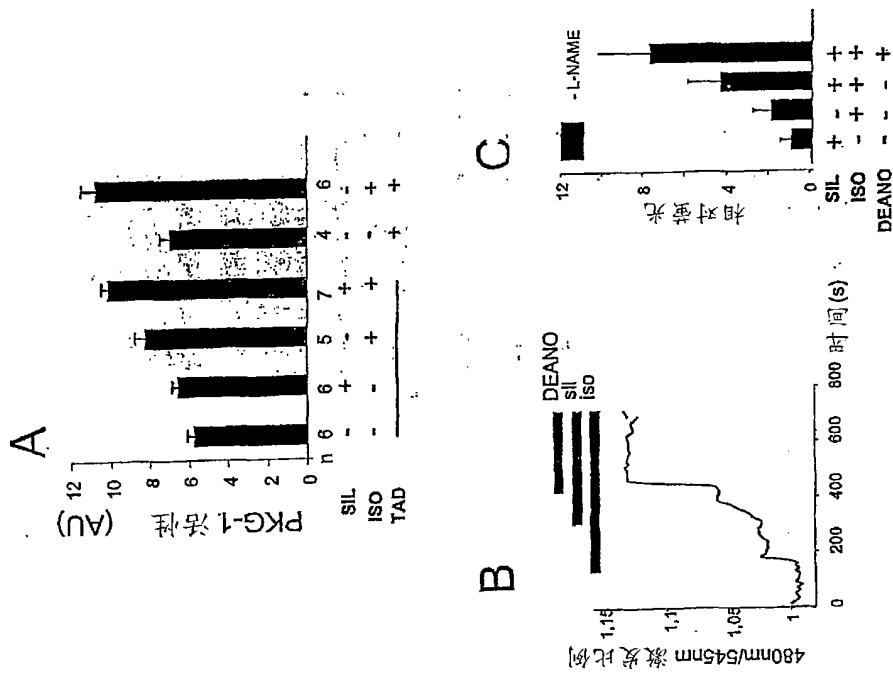


图15

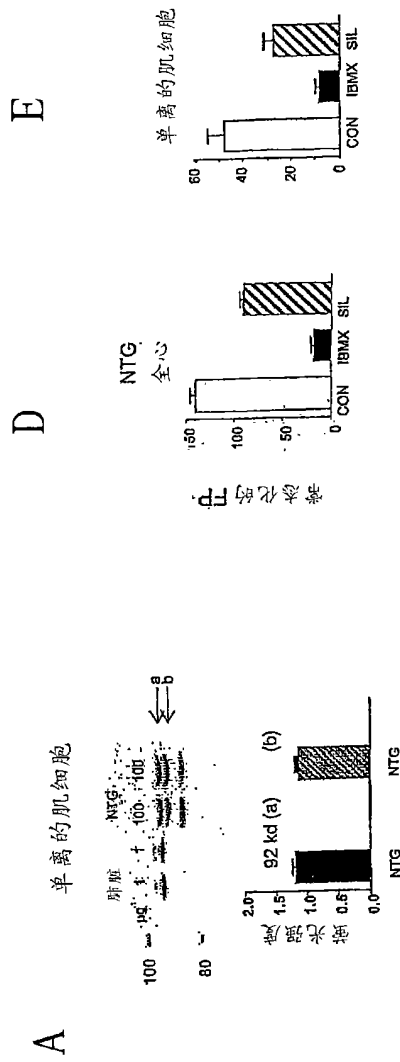


图 16

PDE5a 在老鼠心脏:低表达

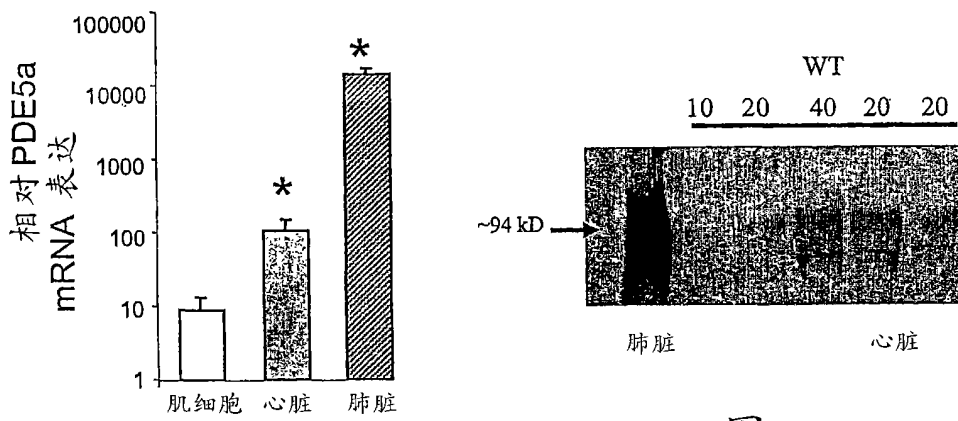


图16B

图16C

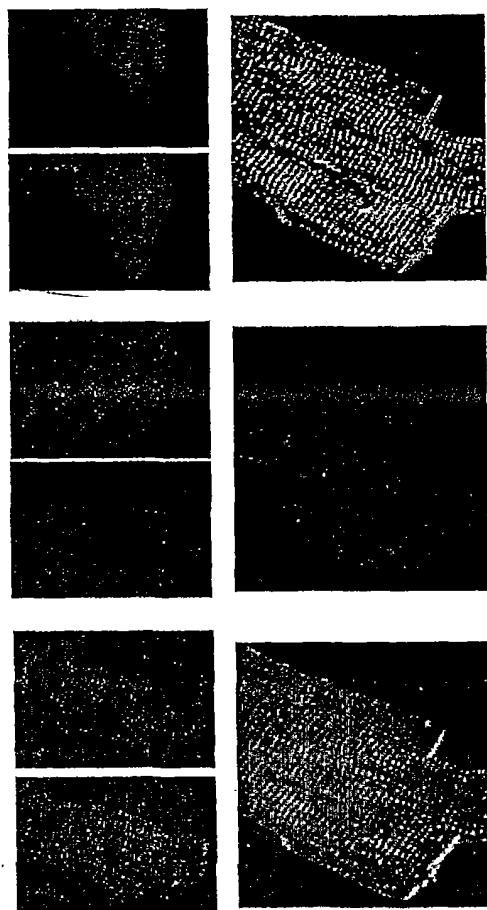


图17

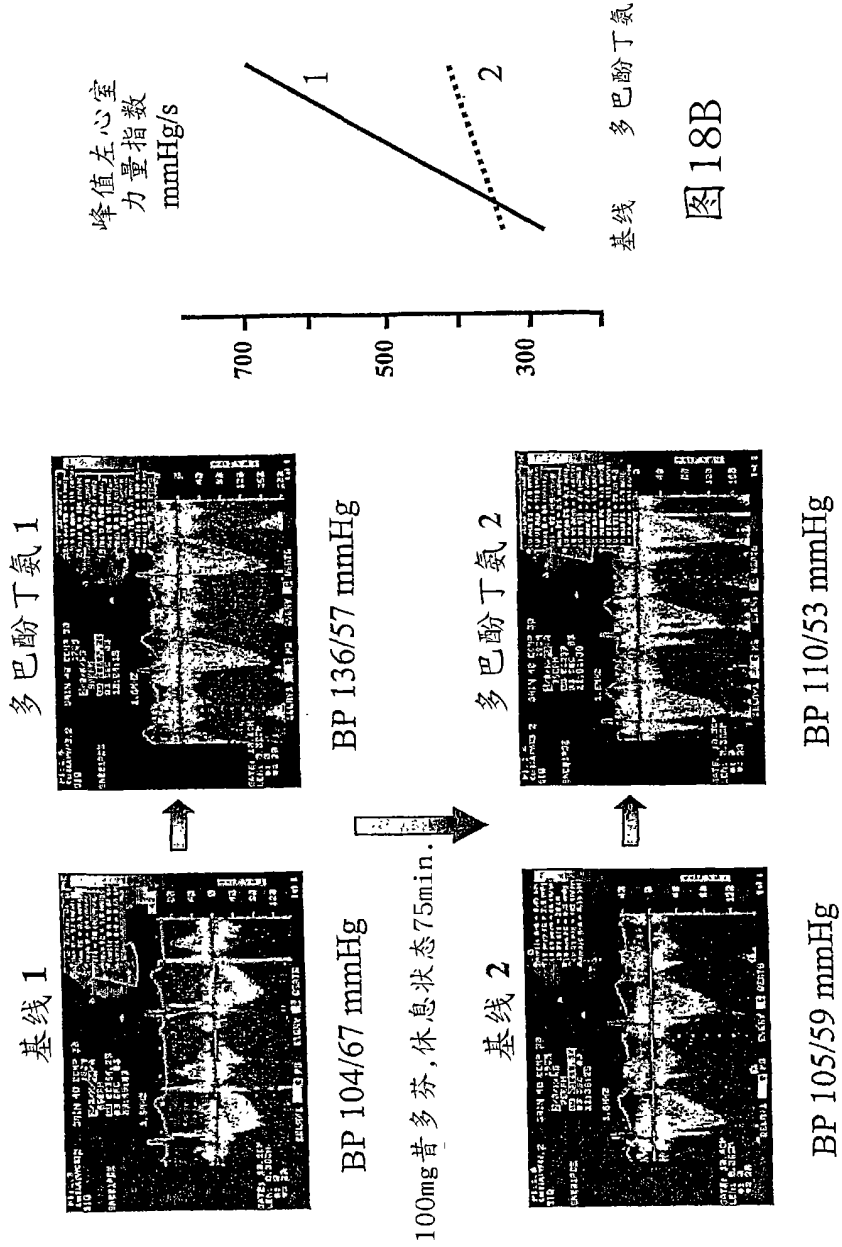
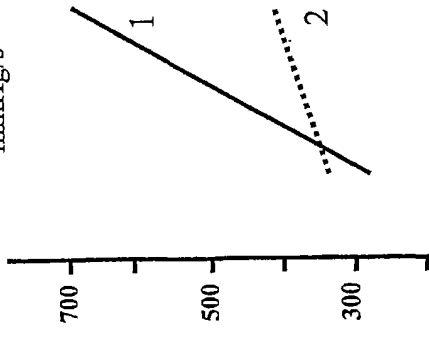


图 18A

峰值左心室
力量指数
mmHg/s



基线 多巴酚丁胺

图 18B

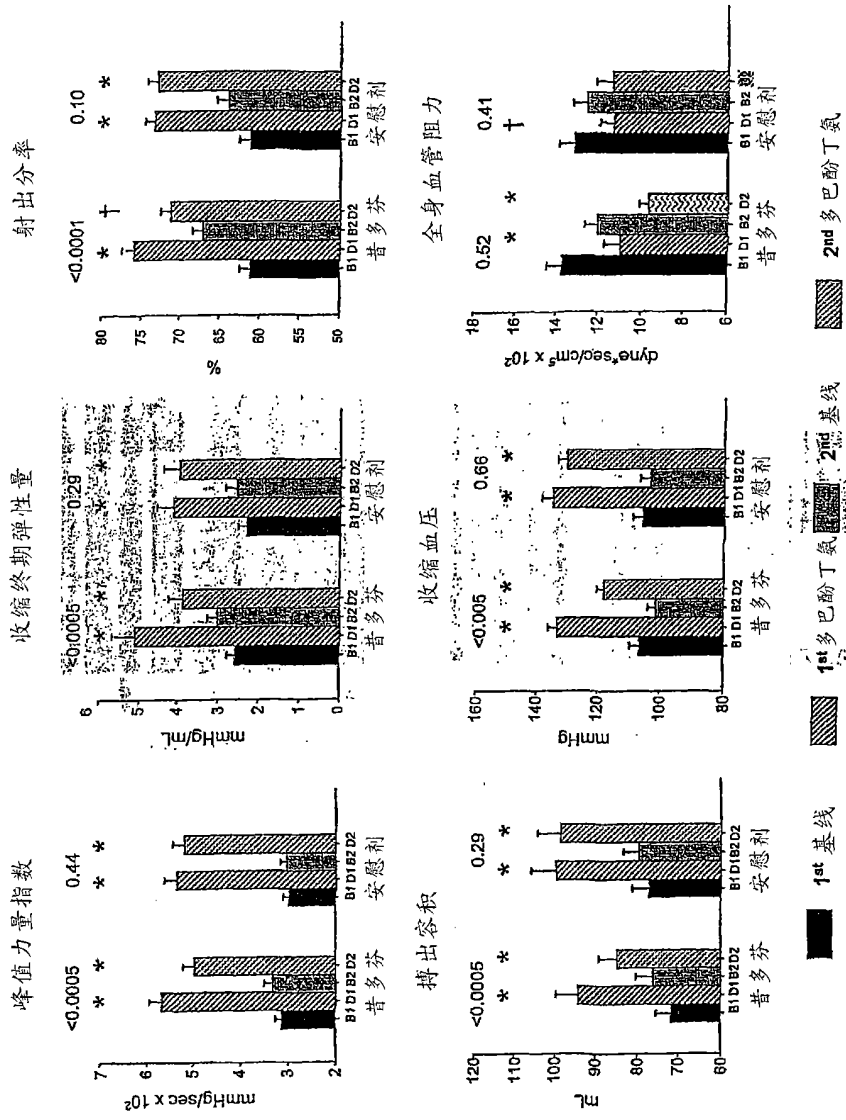


图19

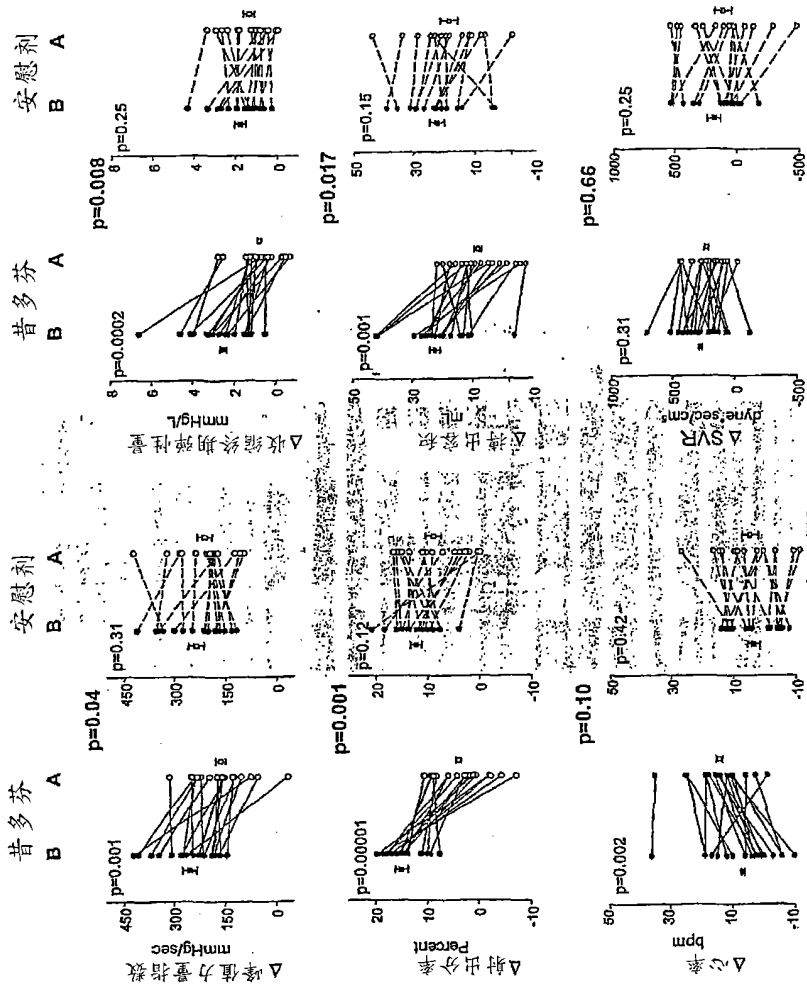
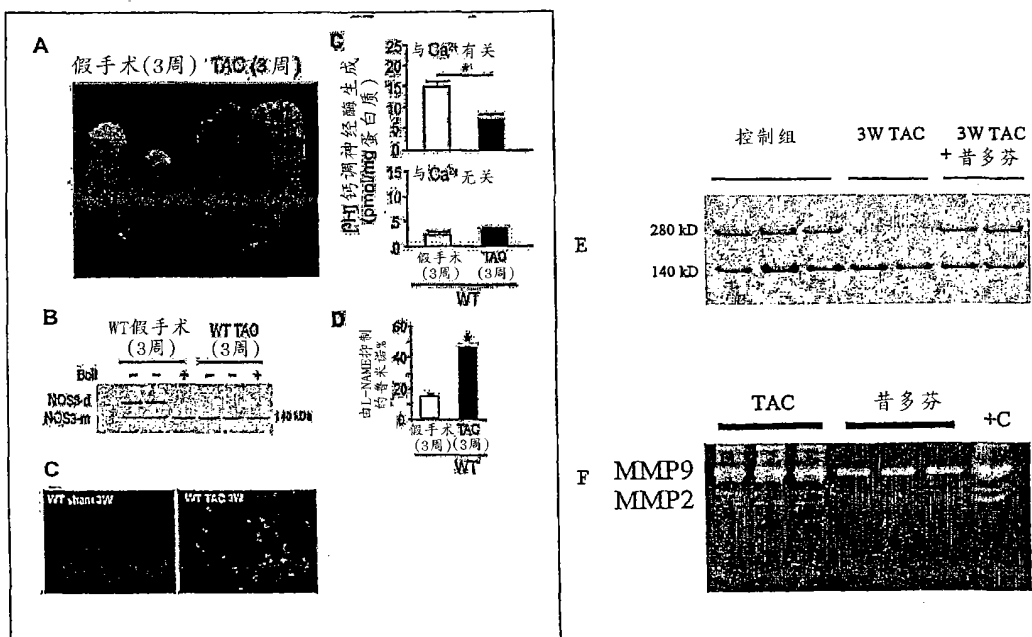


图20

PDE5a 对NOS3耦合和MMP活化作用的效能



Takimoto, et al. *JCI*, 2005; 115:1221-1231

图21

PDE5a 抑制作用和RhoA/Rho激酶

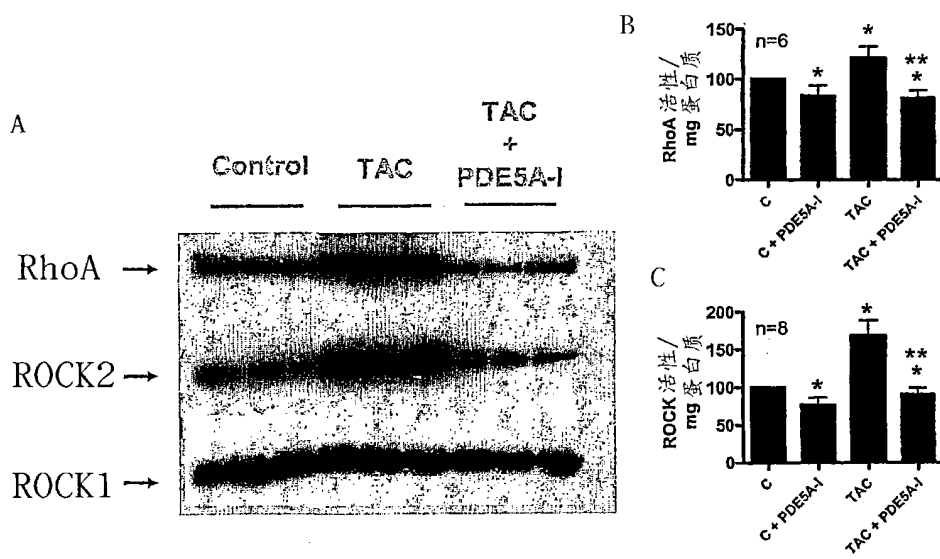


图22

由TAC和IL-6(gp130)刺激作用所增加的
STAT3磷酸化受昔多芬合并治疗而减弱

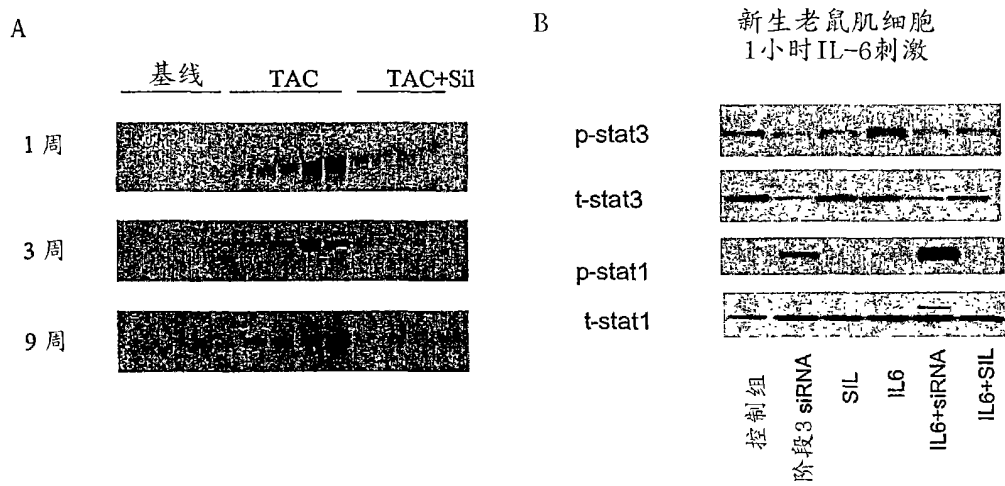


图23

昔多芬Rx增进心肌能量

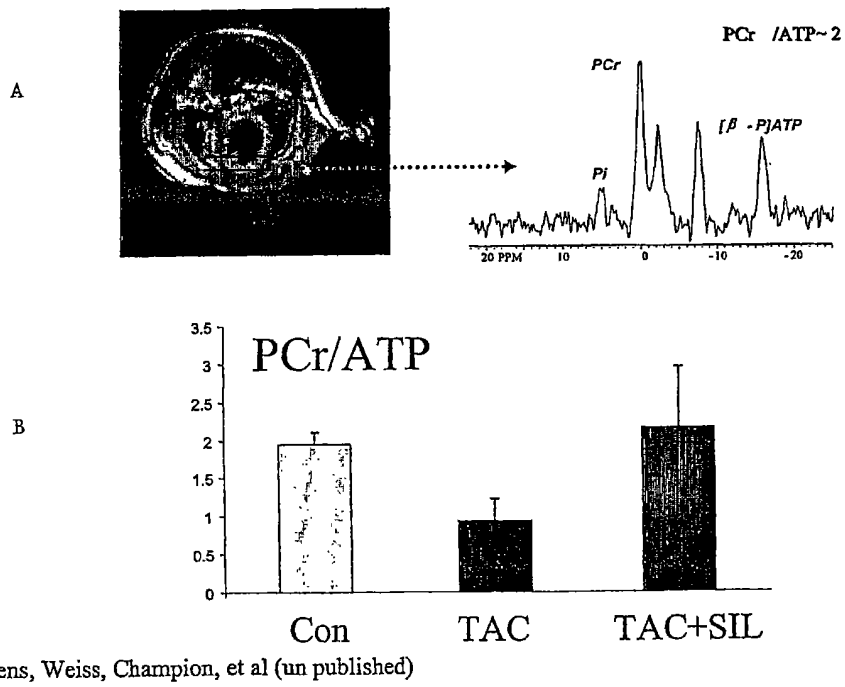


图24