



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101891747 B

(45) 授权公告日 2012. 04. 25

(21) 申请号 201010221658. 7

A61P 9/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 07. 02

A61P 11/06 (2006. 01)

(73) 专利权人 张南

A61P 1/00 (2006. 01)

地址 210008 江苏省南京市玄武区进香河路
33 号 3 幢 602

A61P 3/10 (2006. 01)

专利权人 钟荣

苏州麦迪仙医药科技有限公司

(56) 对比文件

CN 1071118 C, 2001. 09. 19, 权利要求 1.

US 6077841 A, 2000. 06. 20, 说明书实施例 .

(72) 发明人 张南 钟荣

审查员 旭昀

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 赵艳

(51) Int. Cl.

C07D 487/04 (2006. 01)

A61K 31/519 (2006. 01)

A61P 15/10 (2006. 01)

A61P 7/02 (2006. 01)

A61P 9/12 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 7 页

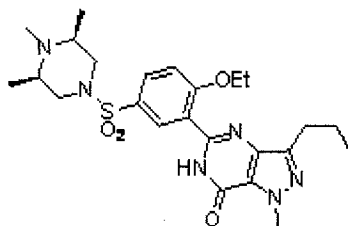
(54) 发明名称

抑制 5 型磷酸二酯酶的化合物及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了具有抑制 5 型磷酸二酯酶活性的新化合物 5-【2- 乙氧苯基 -5-(3,4,5- 三甲基哌嗪基)- 磺酰基】-1- 甲基 -3- 丙基 -1,6- 二氢 -7H- 吡唑并 [4,3-d] 嘧啶 -7- 酮和它的盐如枸橼酸盐,还公开了新化合物和它的枸橼酸盐的制备方法,以及含有新化合物或它的盐如枸橼酸盐的药物组合物,经实验研究发现, ZTH-5、ZTH-5 的盐如 ZTH 能有效抑制 5 型磷酸二酯酶的活性,因此可作为 5 型磷酸二酯酶抑制剂,或者作为 5 型磷酸二酯酶抑制药的有效成分, ZTH-5、ZTH-5 的盐如 ZTH 具有开发成为新一代治疗勃起功能障碍、抑制血小板聚集与抗血栓、降低肺动脉高压与抗心血管疾病、抗哮喘和治疗糖尿病性胃轻瘫药物的潜力。

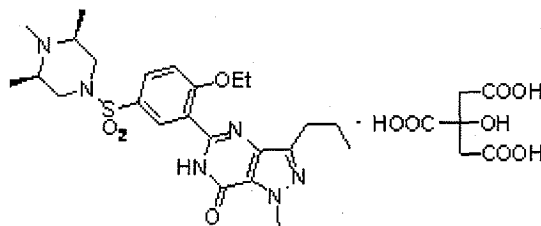
1. 式 I 表示的化合物,或者其药学上可接受的盐:



(I)

式 I 的化合物的化学名称为 5-【2-乙氧苯基-5-(3,4,5-三甲基哌嗪基)-磺酰基】-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮。

2. 式 II 表示的 5-【2-乙氧苯基-5-(3,4,5-三甲基哌嗪基)-磺酰基】-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮枸橼酸盐:



(II)。

3. 制备权利要求 1 所述式 I 的化合物的方法,其特征在于:包括以下步骤,

(1) 在 2,6-二甲基哌嗪和二碳酸二叔丁酯中加入四氢呋喃,室温反应,然后将四氢呋喃浓缩至尽,得 3,5-二甲基-1-叔丁氧基羰基哌嗪;

(2) 在步骤 (1) 中的 3,5-二甲基-1-叔丁氧基羰基哌嗪依次加入四氢呋喃,碳酸钾,碘甲烷,室温反应过夜,然后过滤,浓缩,往残余物中加入水与二氯甲烷,并用二氯甲烷洗涤,合并有机层,饱和盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩,残余物柱层析,得到 3,4,5-三甲基-1-叔丁基羰基哌嗪,所述柱层析使用的层析溶剂为甲醇和二氯甲烷的混合溶剂,并且甲醇:二氯甲烷=1:20;

(3) 将步骤 (2) 中的 3,4,5-三甲基-1-叔丁基羰基哌嗪溶于二氧六环中,冷却,缓慢滴加饱和盐酸二氧六环溶液,室温搅拌,然后减压蒸去溶剂,得到 1,2,6-三甲基哌嗪;

(4) 将 5-(2-乙氧苯基)-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮滴入到氯磺酸中,保持反应液温度不高于 25℃,室温反应,然后将反应液倾入碎冰中,室温机械搅拌,保持温度不高于 25℃,然后过滤,干燥,得 5-(2-乙氧苯基-5-氯磺酰基)-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮;

(5) 将步骤 (4) 中的 5-(2-乙氧苯基-5-氯磺酰基)-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮,步骤 (3) 中 1,2,6-三甲基哌嗪,三乙胺加入到四氢呋喃中,室温搅拌过夜,然后蒸去溶剂,往残余物中加入水与二氯甲烷,分离,二氯甲烷层依次以饱和碳酸氢钠水溶液、饱和盐水溶液洗涤,然后干燥,浓缩,残余物以乙醇重结晶得式 I 的化合物。

4. 制备权利要求 2 所述式 II 表示的化合物的方法,其特征在于:包括:在权利要求 1 所述式 I 的化合物中加入无水甲醇,搅拌升温至回流,溶清后加入枸橼酸,回流反应完毕后,冷却至室温,过滤,甲醇洗涤,干燥得式 II 的化合物。

5. 权利要求 1 中所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备 5 型磷酸二酯酶抑制剂中

的应用。

6. 权利要求 2 中所述的 5-【2- 乙氧苯基 -5-(3,4,5- 三甲基哌嗪基)- 磺酰基】-1- 甲基 -3- 丙基 -1,6- 二氢 -7H- 吡唑并 [4,3-d] 嘧啶 -7- 酮枸橼酸盐在制备 5 型磷酸二酯酶抑制剂中的应用。

7. 药物组合物,其中含有权利要求 1 中所述的化合物或其药学上可接受的盐作为有效成分,并含有常规药用载体和 / 或赋形剂。

8. 药物组合物,其中含有权利要求 2 中所述的 5-【2- 乙氧苯基 -5-(3,4,5- 三甲基哌嗪基)- 磺酰基】-1- 甲基 -3- 丙基 -1,6- 二氢 -7H- 吡唑并 [4,3-d] 嘧啶 -7- 酮枸橼酸盐作为有效成分,并含有常规药用载体和 / 或赋形剂。

抑制 5 型磷酸二酯酶的化合物及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及抑制 5 型磷酸二酯酶的化合物和它的盐、其制备方法以及含有该化合物或它的盐的药物组合物。

背景技术

[0002] 环磷酸腺苷 (cAMP) 和环磷酸鸟苷 (cGMP) 是重要的细胞内第二信使,其在细胞内水平的高低对调节细胞的各种功能具有重要意义。参与调节细胞内 cAMP 和 cGMP 水平的酶类包括腺苷酸环化酶 (AC)、鸟苷酸环化酶 (GC) 和磷酸二酯酶 (PDE),这几种酶的平衡协调使细胞内的 cAMP 和 cGMP 水平维持在正常范围内。在某些疾病状态如高血压、心绞痛等情况下,可发现细胞内 cAMP 和 cGMP 水平下降。为提高细胞内 cAMP 和 cGMP 的水平,可通过激动 AC、GC 和抑制 PDE 两种途径来实现,而第二种途径效果更佳。近年来,人们对研究和开发 PDE 抑制剂表现出极大热情,并且已在选择性 PDE 同功酶抑制剂的临床应用方面取得突破性进展。目前,cDNA 分子克隆实验结果已证明哺乳动物至少有 10 种 PDE 基因家族存在。对于每一种 PDE 基因家族来说,由于拼接差异的存在,又出现了多种 PDE 同功酶亚型,其中,5 型磷酸二酯酶 (PDE5) 家族能选择性水解 cGMP,广泛地分布于机体各组织器官中。

[0003] PDE5 抑制剂具有如下药理作用和临床应用:

[0004] (1) 抑制血小板聚集与抗血栓:理想的抗血栓药物应具有抑制血小板聚集而无血管平滑肌舒张作用,避免造成缺血部位进一步缺血。PDE3 和 PDE5 抑制剂均有抑制血小板聚集作用,但是相对来说由于 PDE5 抑制剂的血管平滑肌舒张作用较弱,故其在治疗动脉血栓性疾病方面具有明显的优势。经典的 PDE5 抑制剂双嘧达莫 (dipyriamole) 就具有良好的抗血栓作用;

[0005] (2) 降低肺动脉高压与抗心血管疾病:肺血管阻力异常往往是导致心血管疾病的重要原因。在动物模型试验中,选择性 PDE5 抑制剂扎普司特 (zaprinast) 能显著增加一氧化氮作用时间和强度,具有较强的降低肺动脉高压作用,临床用于治疗心绞痛、高血压和心肌梗死。最新报道,PDE5 抑制剂 E-4010 能提高野百合碱诱导的高血压大鼠的存活率;

[0006] (3) 抗哮喘:有文献报道,猪作为动物模型的实验表明,PDE5 抑制剂 SR-265579 对组胺诱导所致支气管扩张有治疗作用;

[0007] (4) 治疗糖尿病性胃轻瘫:有报道,对糖尿病大鼠,PDE5 抑制剂枸橼酸西地那非 (sildenafil) 能逆转推迟的胃排空,对糖尿病并发的消化系统植物神经病变有一定的治疗改善作用;

[0008] (5) 治疗勃起功能障碍:由于 PDE5 广泛分布于阴茎海绵体中,PDE5 抑制剂可导致阴茎海绵体中 cGMP 水平上升,经一系列生理生化反应,使得血管平滑肌舒张,阴茎勃起。与前列腺素 E1 不同,PDE5 抑制剂不会引起病理性勃起,它的这种作用仍需要性刺激。

[0009] 基于 PDE5 抑制剂上述的药理作用,我们通过化学分子修饰方法改造枸橼酸西地那非 (sildenafil) 的化学结构生产出新的化合物和它的枸橼酸盐,即 5-【2-乙氧苯基-5-(3,4,5-三甲基哌嗪基)-磺酰基]-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并 [4,3-d]

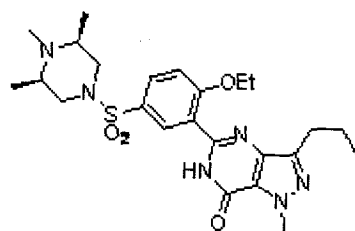
嘧啶-7-酮和其枸橼酸盐 (ZTH), 我们发现 ZTH 能有效地抑制 PDE5 酶的活性, 则诞生了本发明。

发明内容

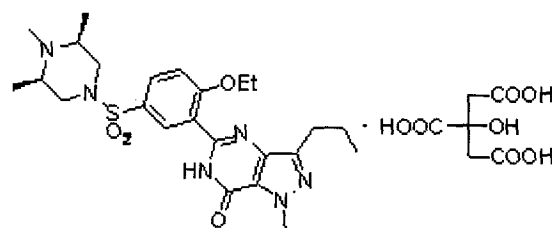
[0010] 本发明的第一个目的是提供一种具有抑制 5 型磷酸二酯酶活性的新化合物和它的盐如枸橼酸盐; 本发明的第二个目的是提供新化合物和它的枸橼酸盐的制备方法; 本发明的第三个目的是提供含有新化合物或它的盐如枸橼酸盐的药物组合物。

[0011] 本发明提供了式 I 表示的化合物, 以及式 II 表示的该化合物药用枸橼酸盐:

[0012]



(I)



(II)

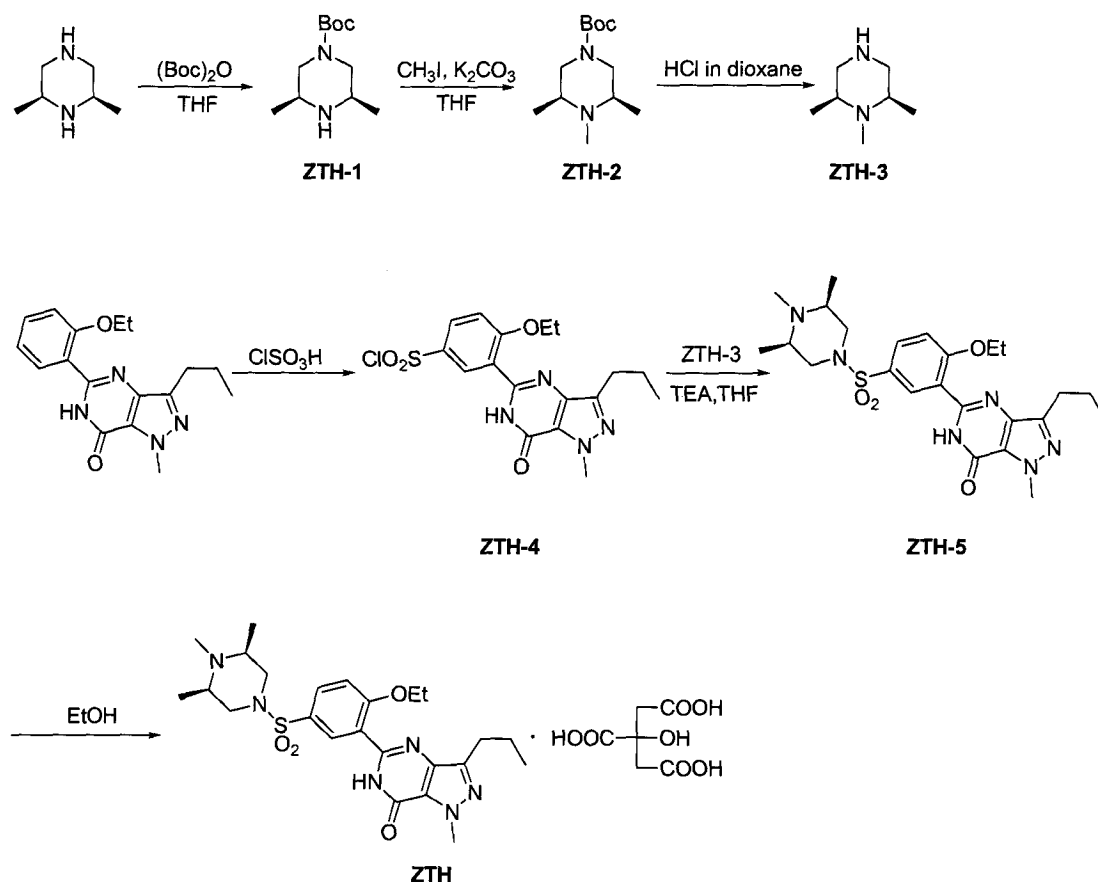
[0013] 式 I 的化合物的化学名称为 5-【2-乙氧苯基-5-(3,4,5-三甲基哌嗪基)-磺酰基】-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮, 通过核磁共振技术阐明其结构和质谱计算分子量:

[0014] $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, MeOD) δ 8.180-8.185 (d, $J = 2\text{Hz}$, 1H), 7.880-7.908 (dd, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.8\text{Hz}$, 1H), 7.356-7.379 (d, $J = 9.2\text{Hz}$, 1H), 4.284-4.337 (q, $J = 14\text{Hz}$, 2H), 4.234 (s, 3H), 3.575-3.603 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 2H), 2.865-2.902 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 2.377 (br, 2H), 2.261 (s, 3H), 2.112-2.168 (t, $J = 11.2\text{Hz}$, 2H), 1.795-1.851 (m, 2H), 1.465-1.500 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.090-1.105 (d, $J = 6\text{Hz}$, 6H), 0.978-1.015 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H). MS 503 [M+H] $^+$

[0015] 式 II 中的枸橼酸盐, 是由式 I 的化合物与枸橼酸相反应制得的, 式 II 的化学名称为 5-【2-乙氧苯基-5-(3,4,5-三甲基哌嗪基)-磺酰基】-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮枸橼酸盐, 通过核磁共振分析: $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 8.164-8.170 (d, $J = 2.4\text{Hz}$, 1H), 7.914-7.942 (dd, $J_1 = 2.4\text{Hz}$, $J_2 = 8.8\text{Hz}$, 1H), 7.363-7.385 (d, $J = 8.8\text{Hz}$, 1H), 4.276-4.329 (q, $J = 14\text{Hz}$, 2H), 4.231 (s, 3H), 3.746-3.776 (d, $J = 11.2\text{Hz}$, 2H), 2.986 (br, 2H), 2.858-2.895 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 2H), 2.792 (s, 2H), 2.739 (s, 2H), 2.590 (s, 3H), 2.406-2.464 (t, $J = 11.6\text{Hz}$, 2H), 1.784-1.839 (m, 2H), 1.448-1.483 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H), 1.253-1.269 (d, $J = 6.4\text{Hz}$, 6H), 0.972-1.009 (t, $J = 7.2\text{Hz}$, 3H).

[0016] 式 I 的化合物, 主要以顺式 2,6-二甲基哌嗪与 5-(2-乙氧苯基)-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮作为起始原料, 经多步反应合成得到的, 合成路线如下图所示:

[0017]



[0018] 在 2,6-二甲基哌嗪和二碳酸二叔丁酯中加入四氢呋喃, 室温反应, 然后将四氢呋喃浓缩至尽, 得 3,5-二甲基-1-叔丁氧基羰基哌嗪 (ZTH-1), 经核磁共振和质谱分析, $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CDCl_3) δ 3.8-4.1 (br, 2H), 2.75-2.80 (m, 2H), 2.2-2.5 (br, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.052-1.067 (d, $J = 6\text{Hz}$, 6H). MS 215 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0019] 在 ZTH-1 中依次加入四氢呋喃, 碳酸钾, 碘甲烷, 室温反应过夜, 然后过滤, 浓缩, 往残余物中加入水与二氯甲烷, 并用二氯甲烷洗涤, 合并有机层, 饱和盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩, 残余物柱层析 (甲醇: 二氯甲烷 = 1 : 20), 得到 3,4,5-三甲基-1-叔丁基羰基哌嗪 (ZTH-2), 经核磁共振和质谱分析, $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, MeOD) δ 4.505-4.533 (m, 2H), 4.110-4.134 (m, 2H), 2.943 (s, 3H), 2.779 (br, 2H), 2.196 (s, 9H), 1.782-1.797 (d, $J = 6\text{Hz}$, 6H). MS 229 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0020] 将 ZTH-2 溶于二氧六环中, 冷却, 缓慢滴加饱和盐酸二氧六环溶液, 室温搅拌, 然后减压蒸去溶剂, 得到 1,2,6-三甲基哌嗪 (ZTH-3), 经核磁共振和质谱分析, $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, MeOD) δ 4.505-4.533 (m, 2H), 3.722 (br, 2H), 3.611-3.644 (m, 2H), 3.310-3.423 (m, 2H), 2.937 (s, 3H), 1.493-1.506 (d, $J = 5.2\text{Hz}$, 6H). MS 129 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0021] 将 5-(2-乙氧苯基)-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮滴入到氯磺酸中, 保持反应液温度不高于 25°C , 室温反应, 然后将反应液倾入碎冰中, 室温机械搅拌, 保持温度不高于 25°C , 然后过滤, 干燥, 得 5-(2-乙氧苯基-5-氯磺酰基)-1-甲

基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮(ZTH-4),经核磁共振和质谱分析,¹H-NMR(400MHz, DMSO) δ 7.871-7.876(s, 1H), 7.700-7.727(dd, $J_1 = 2\text{Hz}$, $J_2 = 8.4\text{Hz}$, 1H), 7.098-7.119(d, $J = 8.4\text{Hz}$, 1H), 4.125-4.161(m, 5H), 2.778-2.816(t, $J = 7.6\text{Hz}$, 2H), 1.700-1.756(m, 2H), 1.303-1.337(t, $J = 6.8\text{Hz}$, 3H), 0.919-0.956(t, $J = 7.6\text{Hz}$, 3H). MS 411[M+H]⁺

[0022] 将 ZTH-4、ZTH-3、三乙胺加入到四氢呋喃中,室温搅拌过夜,然后蒸去溶剂,往残余物中加入水与二氯甲烷,分离,二氯甲烷层依次以饱和碳酸氢钠水溶液、饱和盐水溶液洗涤,然后干燥,浓缩,残余物以乙醇重结晶得式 I 的化合物(ZTH-5)。

[0023] 在 ZTH-5 中加入无水甲醇,搅拌升温至回流,溶清后加入枸橼酸,回流反应完毕后,冷却至室温,过滤,甲醇洗涤,干燥得式 II 的化合物(ZTH)。

[0024] ZTH-5、ZTH-5 的盐如 ZTH 为吡唑并嘧啶酮类化合物,化学结构与 cGMP 近似,可以与 cGMP 竞争结合 PDE5 的催化区,从而抑制 PDE5 对 cGMP 的降解,增加 cGMP 的浓度,保证 cGMP 浓度维持在正常水平。ZTH-5、ZTH-5 的盐如 ZTH 能有效抑制 5 型磷酸二酯酶的活性,因此可作为 5 型磷酸二酯酶抑制剂,或者作为 5 型磷酸二酯酶抑制药的有效成分,ZTH-5、ZTH-5 的盐如 ZTH 具有开发成为新一代治疗勃起功能障碍、抑制血小板聚集与抗血栓、降低肺动脉高压与抗心血管疾病、抗哮喘和治疗糖尿病性胃轻瘫药物的潜力。

具体实施方式

[0025] (1)ZTH-5(5-【2-乙氧苯基-5-(3,4,5-三甲基哌嗪基)-磺酰基】-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮)的制备:

[0026] 1,3,5-二甲基-1-叔丁氧基羰基哌嗪(ZTH-1)的制备:

[0027] 将 2,6-二甲基哌嗪(11.4g,100mmol,1eq)和二碳酸二叔丁酯(21.8g,100mmol,1eq)加入 250ml 单口瓶中,再加入 100 毫升四氢呋喃,室温反应 4 小时。四氢呋喃浓缩至尽,得 21.4g 橘黄色油状物 ZTH-1,收率 100%;

[0028] 2,3,4,5-三甲基-1-叔丁基羰基哌嗪(ZTH-2)的制备:

[0029] 将 ZTH-1(10.7g,50mmol,1eq)加入 250ml 单口瓶中,依次加入 100ml 四氢呋喃,碳酸钾(10.35g,75mmol,1.5eq),碘甲烷(8.52g,60mmol,1.2eq),室温反应过夜。过滤,浓缩,往残余物中加入 100 毫升水与 100 毫升二氯甲烷,并用二氯甲烷(50 毫升×2 次)洗涤,合并有机层,饱和盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩,残余物柱层析(甲醇:二氯甲烷=1:20)得到 5.7 克橘黄色油状物 ZTH-2,收率 50%;

[0030] 3,1,2,6-三甲基哌嗪(ZTH-3)的制备:

[0031] 将 ZTH-2(11.4g,50mmol,1eq)溶于 100 毫升二氧六环中,冷却至 0℃,缓慢滴加饱和盐酸二氧六环溶液(4M,25ml,2eq),室温搅拌 2 小时,减压蒸去溶剂,得到白色固体粗品 ZTH-3,不经纯化,直接用于下一步;

[0032] 4,5-(2-乙氧苯基-5-氯磺酰基)-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮(ZTH-4)的制备:

[0033] 在-10℃下,将 5-(2-乙氧苯基)-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮(50g,160mmo)加入到 100ml 氯磺酸中,滴加过程中,保持反应液温度不高于 25℃,滴加完毕,室温反应 3 小时,将反应液倾入碎冰中,机械搅拌,保持温度不高于

25℃,加毕,室温搅拌 1 小时,过滤,干燥,得 50g 白色固体 ZTH-4,收率 75.9% ;

[0034] 5、5-【2-乙氧苯基-5-(3,4,5-三甲基哌嗪基)-磺酰基]-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮(ZTH-5)的制备:

[0035] 将 ZTH-4(36g,10mmol,1eq),ZTH-3(17.6g,10mmol,1eq),三乙胺(60.6g,60mmol,6eq)加入到 500 毫升四氢呋喃中,室温搅拌过夜,蒸去溶剂,往残余物中加入 200 毫升水与 200 毫升二氯甲烷,分离,二氯甲烷层依次以饱和碳酸氢钠水溶液、饱和盐水溶液洗涤,干燥,浓缩,残余物以十倍量乙醇重结晶得 32g 白色晶体 ZTH-5,再以 50 倍量乙醇重结晶得 16.5g 白色晶体 ZTH-5,收率 37%。

[0036] (2)ZTH(5-【2-乙氧苯基-5-(3,4,5-三甲基哌嗪基)-磺酰基】-1-甲基-3-丙基-1,6-二氢-7H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-7-酮枸橼酸盐)的制备:

[0037] 在 500 毫升反应瓶中,加入 15 克化合物 ZTH-5、270 毫升无水甲醇,搅拌升温至回流,溶清后加入 12.5 克枸橼酸,回流反应约 1.5 小时,反应毕,冷却至室温,过滤,3 次×5 毫升甲醇洗涤,干燥得 15 克白色固体 ZTH。

[0038] 上述(1)和(2)为制备实施例,下述(3)为实验实施例。

[0039] (3)ZTH 对 PDE5 抑制作用的研究

[0040] 1、ZTH 对 PDE5 作用 cGMP 的抑制效果:

[0041] 实验方法:

[0042] 利用酶联免疫系统检测体外不同浓度 ZTH 对 PDE5 降解 cGMP 的抑制作用效果。按照 Amersham 公司的 cGMP 生物转化酶联免疫检测系统试剂盒(cGMP biotrack enzymeimmunoassay system,EIA)操作步骤,检测 cGMP 的浓度。以枸橼酸西地那非作为阳性对照。

[0043] 配制试剂:

[0044] ZTH、枸橼酸西地那非的不同药物浓度的配制:

[0045] 分别称取一定量的 ZTH 悬浮于 ddH₂O,加入 DMSO(药物:DMSO=1mol:1L)使其溶解,加样孔 100 μl 中最终浓度为 10⁻⁴mol·L⁻¹、10⁻⁵mol·L⁻¹、10⁻⁶mol·L⁻¹、10⁻⁷mol·L⁻¹、10⁻⁸mol·L⁻¹、10⁻⁹mol·L⁻¹、10⁻¹⁰mol·L⁻¹、10⁻¹¹mol·L⁻¹、10⁻¹²mol·L⁻¹。

[0046] 枸橼酸西地那非对照药物同样按上述方法配制。

[0047] PDE5 工作液的配制:

[0048] 吸取一定量的 PDE5,相应体积的 EIA 缓冲液稀释,使最终浓度为 1u/μl, -80℃低温保存备用。

[0049] cGMP 的配制:

[0050] 称取一定量的 cGMP(cGMP,Na),分别溶于相应体积的 EIA 缓冲液中,cGMP 终浓度为 3200fmol/50 μl, -20℃低温保存备用。

[0051] 实验内容:

[0052] PDE5 对 cGMP 的降解作用:

[0053] PDE5 与 cGMP 混合,加样孔 100 μl 内含 3200fmolcGMP,30℃作用 20min,以检测 PDE5 对 cGMP 的降解作用。

[0054] ZTH 对 PDE5 的抑制作用:

[0055] ZTH 和枸橼酸西地那非阳性对照药分别与 cGMP 混合并充分混匀(同时设以 DMSO

的 ddH₂O 溶液作为药品阴性对照),加入 PDE5 3u 30℃作用 20min。加样孔 100 μl 体积中含有 3200fmolcGMP,药物浓度可以为 $10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-6}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-7}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-8}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-9}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-10}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-11}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-12}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,以检测不同浓度的 ZTH、阳性对照药对 PDE5 降解 cGMP 作用的抑制。将上述测定样品加入被抗体包被好的测定孔后,各加入 100 μl 的抗血清中止反应,置于 4℃作用 15-18h,随后加入 cGMP peroxidase conjugate 50 μl 中止反应,作用 3h 后洗板,加入 TMB 200 μl 进行显色,在 BIORAD 450 酶标仪以 630nm 波长下进行读数。根据所测得的 cGMP 吸光度值,利用 EIA 吸光度公式计算 % B/BO[(标准或样本 OD-NSB OD) × 100/(0 标准 OD-NSB OD)],通过线形回归拟合 S 型曲线和 PROBIT 回归函数,计算 ZTH、枸橼酸西地那非阳性对照药物对于 PDE5 的 IC₅₀。

[0056] 实验结果:

[0057] PDE5 对 cGMP 的降解:

[0058] PDE5 与 cGMP 在 30℃作用 20 分钟,PDE5 可将 3200fmol cGMP 降解至 1600fmol 左右。

[0059] ZTH 对 PDE5 降解 cGMP 作用的抑制:

[0060] 分别比较 $10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-6}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-7}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-8}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-9}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-10}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-11}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-12}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的 ZTH 和对照药物以及 DMSO ddH₂O 溶液组对 PDE5 降解 cGMP 作用的抑制,根据不同浓度 ZTH 抑制 PDE5 对 cGMP 降解所得到的不同吸光度(OD 值),利用 EIA 吸光度公式计算 % B/BO[(标准或样本 OD-NSB OD) × 100/(0 标准 OD-NSB OD)],计算药物的 IC₅₀ 值。通过回归线形拟合,数据可拟合为 S 型曲线 ($p < 0.05$);通过 PROBIT 回归函数计算 IC₅₀,ZTH 的 IC₅₀ 值为 $2.12 \times 10^{-9}\text{M}$,而枸橼酸西地那非阳性对照药物为 $6.958 \times 10^{-9}\text{M}$ 。

[0061] 2、ZTH 对 PDE5 作用 cAMP 的影响:

[0062] 实验方法:

[0063] 利用酶联免疫系统检测体外不同浓度 ZTH 对 PDE5 作用 cAMP 的影响。按照 Amersham 公司的 cAMP 生物转化酶联免疫检测系统试剂盒(cAMP biotrack enzymeimmunoassay system,EIA)操作步骤,检测 cAMP 的浓度。以枸橼酸西地那非作为对照。

[0064] 配制试剂:

[0065] cAMP 的配制

[0066] 称取一定量的 cAMP(cAMP,Na),分别溶于相应体积的 EIA 缓冲液中,cAMP 终浓度为 1600fmol/50 μl, -20℃低温保存备用。

[0067] ZTH、枸橼酸西地那非的配制、PDE5 工作液的配制同上。

[0068] 实验内容:

[0069] PDE5 对 cAMP 的降解作用:

[0070] PDE5 与 cAMP 混合,加样孔 100 μl,内含 1600fmol cAMP,30℃作用 20min,以检测 PDE5 对 cAMP 的降解作用。

[0071] ZTH 对 PDE5 作用 cAMP 的影响:

[0072] ZTH 和阳性对照药与 cAMP 混合并充分混匀(同时设以 DMSO 的 ddH₂O 溶液作为药品阴性对照),加入 PDE5 3u 30℃作用 20min。加样孔 100 μl 体积中含有 1600fmolcAMP,药物浓度为 $10^{-4}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-5}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-6}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-7}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-8}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-9}\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、

$10^{-10}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10^{-11}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $10^{-12}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。将上述测定样品加入被抗体包被好的测定孔后各加入 $100\mu\text{L}$ 的抗血清中止反应,并置于 4°C 作用 2h,随后加入 cAMP peroxidase conjugate $50\mu\text{L}$ 中止反应,作用 1h 后洗板,加入 TMB $150\mu\text{L}$ 进行显色,在酶标仪以 630nm 波长下进行读数。根据所测得的 cAMP 吸光度值,利用 EIA 吸光度公式计算 $\% \text{B}/\text{BO}[(\text{标准或样本 OD}-\text{NSB OD})\times 100/(\text{O 标准 OD}-\text{NSB OD})]$,通过线形回归拟合 S 型曲线和 PROBIT 回归函数,计算 ZTH、枸橼酸西地那非阳性对照药物对于 PDE5 的 IC_{50} 。

[0073] 实验结果:

[0074] PDE5 对 cAMP 的降解作用:

[0075] PDE5 对 cAMP 无降解作用。

[0076] ZTH 对 PDE5 作用 cAMP 影响:

[0077] 加 ZTH 组、对照药组、 ddH_2O 药品阴性对照组之间 OD 值无显著性差异 ($p > 0.05$),无法拟合 S 形曲线 ($p > 0.05$)。

[0078] 实验结论:

[0079] ZTH 为吡唑并嘧啶酮类化合物,化学结构与 cGMP 近似,可以与 cGMP 竞争结合 PDE5 的催化区,从而抑制 PDE5 对 cGMP 的降解,增加 cGMP 的浓度。

[0080] 通过研究 ZTH 对 PDE5 降解 cGMP 作用的抑制效果,计算 ZTH 的 IC_{50} 值为 $2.12\times 10^{-9}\text{M}$,阳性对照药物为 $6.958\times 10^{-9}\text{M}$ 。结果提示,ZTH 可以抑制 PDE5 对 cGMP 的降解并具有剂量依赖性,是一种很好的 PDE5 抑制剂,其抑制 PDE5 酶的活性明显强过枸橼酸西地那非,有望成为新一代治疗勃起功能障碍、抑制血小板聚集与抗血栓、降低肺动脉高压与抗心血管疾病、抗哮喘和治疗糖尿病性胃轻瘫药物的潜力。

[0081] 上述实验实施例中,虽然只公开了 ZTH 的实验数据,但是 ZTH 是 ZTH-5 的枸橼酸盐,ZTH-5 与 ZTH 结构相近,也就是说 ZTH-5、ZTH-5 的除枸橼酸盐以外的盐与 ZTH 结构均相近,具有共同的吡唑并嘧啶酮类结构,因此从 ZTH 的实验效果可以推导出 ZTH-5、ZTH-5 的除枸橼酸盐以外的盐都具有抑制 PDE5 对 cGMP 的降解作用,成为 PDE5 抑制剂,也有望成为新一代治疗勃起功能障碍、抑制血小板聚集与抗血栓、降低肺动脉高压与抗心血管疾病、抗哮喘和治疗糖尿病性胃轻瘫药物的潜力。