



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 111447930 A

(43)申请公布日 2020.07.24

(21)申请号 201880078272.X

(22)申请日 2018.11.23

(30)优先权数据

17203377.1 2017.11.23 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.03

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/082450 2018.11.23

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/101970 EN 2019.05.31

(71)申请人 奥斯陆大学医院公司

地址 挪威奥斯陆

(72)发明人 J·M·阿伦森 J·斯科格斯特德

(74)专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728

代理人 王庆云 尹吉伟

(51)Int.Cl.

A61K 31/44(2006.01)

A61K 31/4985(2006.01)

A61K 31/522(2006.01)

A61K 31/53(2006.01)

A61K 31/5513(2006.01)

A61P 9/06(2006.01)

权利要求书9页 说明书33页 附图17页

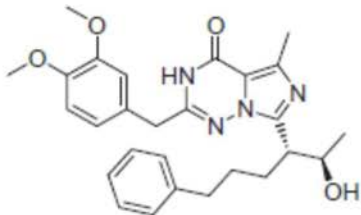
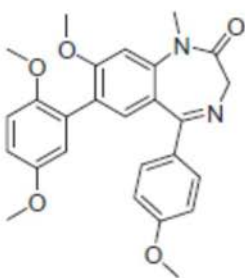
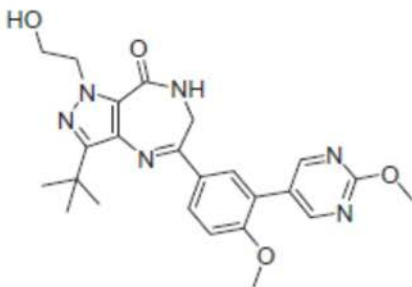
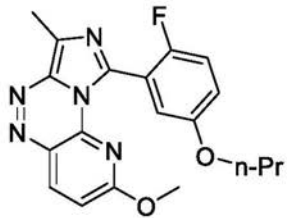

(54)发明名称

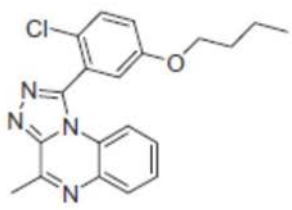
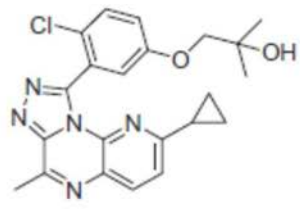
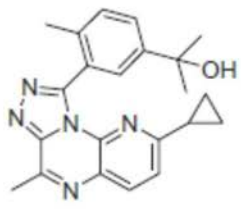
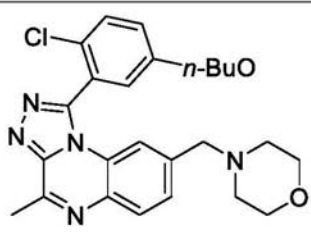
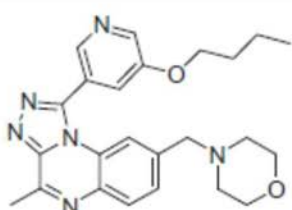
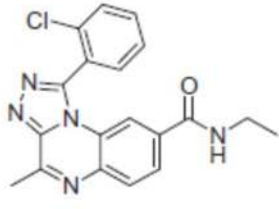
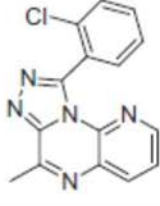
心动过速的治疗

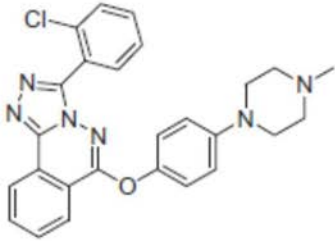
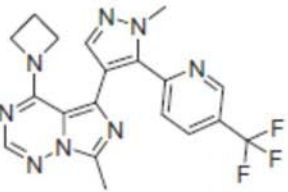
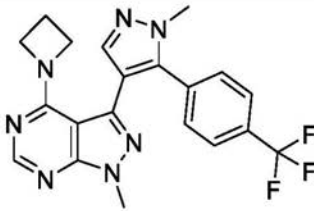
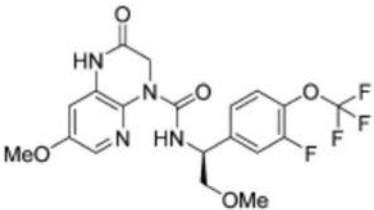

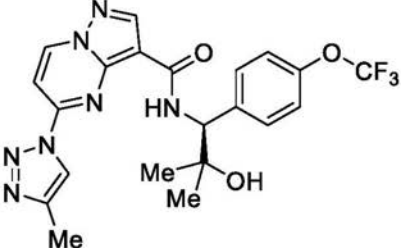
(57)摘要

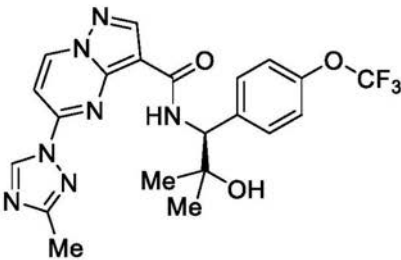
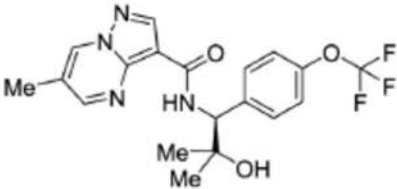
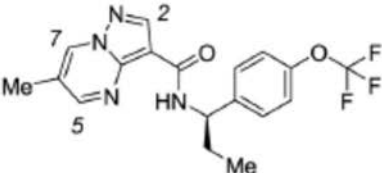
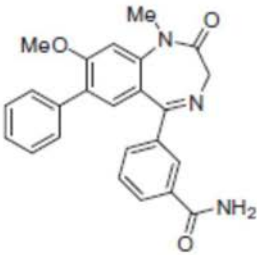
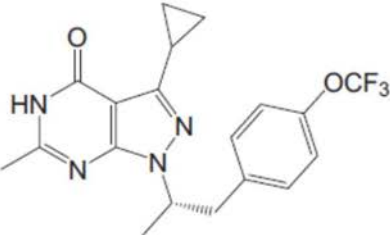
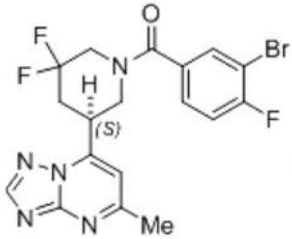
本发明提供用于治疗心动过速或快速性心律失常的选择性PDE2抑制剂的化合物。这类化合物特别适合于治疗以下病状中的任一种：房性心动过速、心房颤动、心房扑动、阵发性室上性心动过速、室性早搏(PVC)、心室颤动和室性心动过速，并且可以单独使用或用于与其它常规心血管药物(例如 β -阻断剂)组合疗法。具体来说，本发明提供用于治疗患有心力衰竭、CPVT或长QT综合征或具有患有心力衰竭、CPVT或长QT综合征的风险的患者的室性心动过速的选择性PDE2抑制剂的化合物。

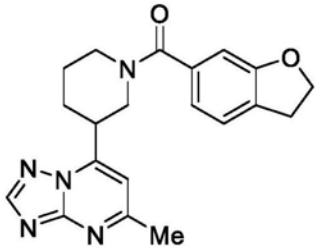
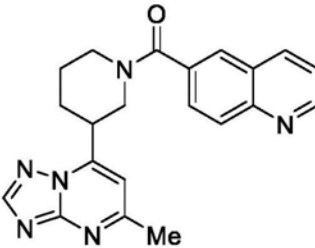
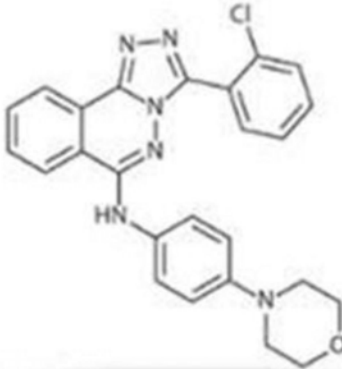
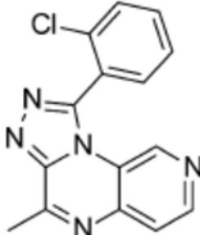
1. 一种化合物,其为用于治疗或预防受试者的室性心动过速的选择性PDE2抑制剂。
2. 根据权利要求1所述的使用的化合物,其中所述化合物与至少一种其它PDE类型(例如至少一种其它人PDE类型)相比,抑制PDE2(例如人PDE2)活性的选择性为至少10倍。
3. 根据权利要求2所述的使用的化合物,其中所述化合物与所有其它PDE类型相比(例如与所有其它人PDE类型相比),抑制PDE2的活性(例如人PDE2)的选择性为至少10倍。
4. 根据权利要求2或权利要求3所述的使用的化合物,其中所述选择性为至少20倍,优选地至少30倍,更优选地至少50倍,例如至少100倍。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的化合物,其中所述化合物以小于约100nM,优选地小于约50nM,例如小于约10nM的IC₅₀值抑制PDE2,例如人PDE2。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的化合物,其中所述化合物选自以下中的任一种、其药学上可接受的盐或前药:

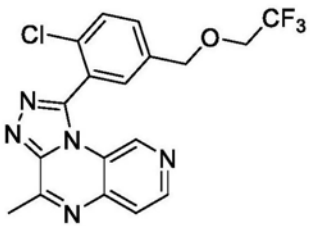
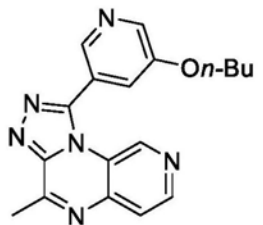
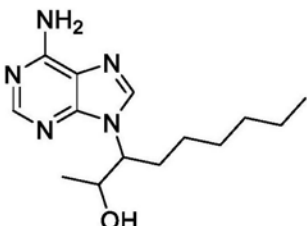
化合物	名称
	BAY 60-7550 2-(3,4-二甲氧基苯甲 基)-7-[(2R,3R)-2-羟基-6-苯基 己-3-基]-5-甲基咪唑并 [5,1-f][1,2,4]三嗪-4(3H)-酮
	
	
	
	

	Lu AF64280
	PF-05180999
	
	TAK-915 N-((1 <i>S</i>)-1-(3-氟-4-(三氟甲氧基)苯基)-2-甲氧基乙基)-7-甲氧基-2-氧代-2,3-二氢吡啶并[2,3- <i>b</i>]吡嗪-4-(1 <i>H</i>)-甲酰胺
	N-(1 <i>S</i>)-2-羟基-2-甲基-1-(4-(三氟甲氧基)-苯基)丙基)-5-(1 <i>H</i> -吡唑-1-基)吡唑并[1,5- <i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺
	N-(1 <i>S</i>)-2-羟基-2-甲基-1-(4-(三氟甲氧基)-苯基)丙基)-5-(4-甲基-1 <i>H</i> -1,2,3-三唑-1-基)吡唑并[1,5- <i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺

	<p>N-(1<i>S</i>)-2-羟基-2-甲基-1-(4-(三氟甲氧基)-苯基)丙基)-5-(3-甲基-1<i>H</i>-1,2,4-三唑-1-基)吡唑并[1,5-<i>a</i>]嘧啶-3-甲酰胺</p>
	
	
	<p>ND-7001 3-(8-甲氧基-1-甲基-2-氧代-7-苯基-2,3-二氢-1<i>H</i>-苯并[e]-[1,4]二氮杂卓-5-基)苯甲酰胺</p>
	<p>PDM-631 ((<i>S</i>)-3-环丙基-6-甲基-1-(1-(4-(三氟甲氧基)苯基)丙-2-基)-1,5-二氢-4<i>H</i>-吡唑并[3,4-<i>d</i>]嘧啶-4-酮</p>
	<p>DNS-8254 (5<i>S</i>)-1-[(3-溴-4-氟苯基)羰基]-3,3-二氟-5-{5-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-<i>a</i>]嘧啶-7-基}吡啶</p>

	<p>1-[2,3-二氢-1-苯并呋喃-5-基)羰基]-3-{5-甲基-[1,2,4]-三唑并[1,5-a]嘧啶-7-基}哌啶</p>
	<p>6-[(3-{5-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-a]嘧啶-7-基}哌啶-1-基)羰基]喹诺酮</p>
	
	

	
	
	EHNA (赤型-9-(2-羟基-3-壬基)腺嘌呤)

7. 根据权利要求1所述的使用的化合物,其中所述化合物选自TAK-915 (N-((1S)-1-(3-氟-4-(三氟甲氧基)苯基)-2-甲氧基乙基)-7-甲氧基-2-氧代-2,3-二氢吡啶并[2,3-b]吡嗪-4-(1H)-甲酰胺);ND-7001 (3-(8-甲氧基-1-甲基-2-氧代-7-苯基-2,3-二氢-1H-苯并[e]-[1,4]二氮杂卓-5-基)苯甲酰胺);如在权利要求6中所定义的PF-05180999或Lu AF64280;和其药学上可接受的盐和其前药。

8. 根据权利要求1所述的使用的化合物,其中所述化合物为TAK-915 (N-((1S)-1-(3-氟-4-(三氟甲氧基)苯基)-2-甲氧基乙基)-7-甲氧基-2-氧代-2,3-二氢吡啶并[2,3-b]吡嗪-4-(1H)-甲酰胺),或如在权利要求6中所定义的PF-05180999,或其药学上可接受的盐或前药。

9. 根据权利要求1所述的使用的化合物,其中所述化合物为BAY 60-7550 (2-(3,4-二甲氧基苯甲基)-7-[(2R,3R)-2-羟基-6-苯基己-3-基]-5-甲基咪唑并[5,1-f][1,2,4]三嗪-4(3H)-酮)、ND-7001 (3-(8-甲氧基-1-甲基-2-氧代-7-苯基-2,3-二氢-1H-苯并[e]-[1,4]二氮杂卓-5-基)苯甲酰胺)、如在权利要求6中所定义的PF-05180999,或如在权利要求6中所定义的Lu AF64280,或其药学上可接受的盐或前药。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的化合物,其用于治疗先前已患有心肌梗死的受试者、患有心力衰竭的受试者,或易患心动过速的受试者,例如遗传性易患儿茶酚胺能型多形性室性心动过速 (CPVT) 的受试者。

11. 根据权利要求1到9中任一项所述的使用的化合物,其用于治疗患有心力衰竭、CPVT或长QT综合征或具有患有心力衰竭、CPVT或长QT综合征的风险的受试者,

12. 根据权利要求10或权利要求11所述的使用的化合物,其中所述受试者选自以下中

的任一种：

先前诊断患有心律失常和/或对心律失常治疗的受试者，例如用抗心律失常药物，如 β -阻断剂进行治疗的受试者；

具有植入的心脏除颤器 (ICD) 的受试者；和

对心律失常进行长期治疗的受试者，例如已用 β -阻断剂进行治疗至少6个月的受试者。

13. 根据权利要求12所述的使用的化合物，其中所述受试者具有植入的心脏除颤器 (ICD) 并且正在用抗心律失常药物，例如 β -阻断剂进行治疗。

14. 根据权利要求13所述的使用的化合物，其中所述 β -阻断剂为 β_1 -选择性 β -阻断剂，例如美托洛尔。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的化合物，其中所述受试者是哺乳动物受试者，优选地为人。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的使用的化合物，其用于与一种或多种心血管药物，优选地用于治疗高血压、心力衰竭、心律失常和/或梗死后心肌再灌注综合征的组合法，例如其中所述药物选自以下中的任一种： β -阻断剂、钙拮抗剂、ACE-抑制剂、ATII/-阻断剂和抗心律失常药物。

17. 根据权利要求16所述的使用的化合物，其中所述 β -阻断剂为 β_1 -选择性 β -阻断剂，例如美托洛尔。

18. 一种药物组合物，其包含如在权利要求1到9中任一项中所定义的选择性PDE2抑制剂以及一种或多种心血管药物，例如抗心律不齐药物，和任选地与至少一种药学上可接受的载体或赋形剂组合。

19. 根据权利要求18所述的组合物，其中所述抗心律失常药物为 β -阻断剂，优选地为 β_1 -选择性 β -阻断剂，例如美托洛尔。

20. 一种治疗需要这类治疗的受试者 (优选地哺乳动物受试者，例如人) 的室性心动过速的方法，所述方法包含向所述受试者给药如在权利要求1到9中任一项中所定义的选择性PDE2抑制剂或根据权利要求18或权利要求19所述的药物组合物的步骤。

21. 根据权利要求20所述的治疗的方法，其中所述受试者先前已罹患心肌梗死、患有心力衰竭，或易患心动过速，例如其中所述受试者遗传性易患儿茶酚胺能型多形性室性心动过速 (CPVT)。

22. 根据权利要求20所述的治疗的方法，其中所述受试者患有心力衰竭、CPVT或长QT综合征或具有患有心力衰竭、CPVT或长QT综合征的风险。

23. 根据权利要求20到22中任一项所述的治疗的方法，其中所述受试者是选自以下中的任一种：

先前诊断患有心律失常和/或对心律失常治疗的受试者，例如用抗心律失常药物，如 β -阻断剂进行治疗的受试者；

具有植入的心脏除颤器 (ICD) 的受试者；和

对心律失常进行长期治疗的受试者，例如已用 β -阻断剂进行治疗至少6个月的受试者。

24. 根据权利要求23所述的治疗的方法，其中所述受试者具有植入的心脏除颤器 (ICD) 并且正在用抗心律失常药物，优选地 β -阻断剂，例如 β_1 -选择性 β -阻断剂，如美托洛尔进行治疗。

25. 根据权利要求20到24中任一项所述的治疗的方法, 其中所述方法另外包含向所述受试者给药 (例如同时, 分别或依次) 一种或多种心血管药物, 优选地用于治疗高血压、心力衰竭、心律失常和/或梗死后心肌再灌注综合征的药物的步骤, 例如其中所述药物选自以下中的任一种: β -阻断剂、钙拮抗剂、ACE-抑制剂、ATII/-阻断剂和抗心律失常药物。

26. 根据权利要求25所述的治疗的化合物, 其中所述 β -阻断剂为 β_1 -选择性 β -阻断剂, 例如美托洛尔。

27. 一种根据权利要求1到9中任一项中所定义的选择性PDE2抑制剂或根据权利要求18或权利要求19所述的药物组合物的用途, 其用于制造用于治疗受试者的室性心动过速的药剂。

28. 根据权利要求27所述的用途, 其中所述受试者根据权利要求21到24中任一项所定义。

29. 根据权利要求27或权利要求28所述的用途, 其中所述治疗另外包含向所述受试者给药 (例如同时, 分别或依次) 一种或多种心血管药物, 优选地用于治疗高血压、心力衰竭、心律失常和/或梗死后心肌再灌注综合征的药物, 例如其中所述药物选自以下中的任一种: β -阻断剂、钙拮抗剂、ACE-抑制剂、ATII/-阻断剂和抗心律失常药物。

30. 根据权利要求29所述的用途, 其中所述 β -阻断剂为 β_1 -选择性 β -阻断剂, 例如美托洛尔。

心动过速的治疗

技术领域

[0001] 本发明大体上涉及心动过速或快速性心律失常的治疗和/或预防。具体地,本发明涉及磷酸二酯酶2 (PDE2) 抑制剂在用于治疗 and/或预防这类病状,特别是说室性心动过速的方法中的用途。

背景技术

[0002] 心律失常是一组心律异常的病状,要么太快要么太慢。心跳过快(通常成人高于每分钟100次跳动)被称为“心动过速”,而心跳过慢(通常少于每分钟60次跳动)的心率被称为“心动过缓”。与正常心律不规律相关的心动过速可能被称为“快速性心律失常”。然而,术语“心动过速”和“快速性心律失常”在所属领域中通常互换使用,并且出于实用目的,临床医生可使用其来描述与增加心律相关的任何心律紊乱。尽管许多心率失常不严重,但某些可能使受试者易患如心力衰竭、中风或心脏骤停的并发症。

[0003] 心率失常的产生是由于异常脉冲的形成(增加自律性和触发的活动)、异常脉冲传导(重新进入机制)和与心脏电传导系统相关的问题。心率失常可沿两个轴进行分类:慢速与快速(心动过缓与心动过速)和房性与室性。

[0004] 室上性心动过速包括心房性心动过速、心房颤动、心房扑动和阵发性室上性心动过速。室性心律失常包括室性早搏(PVC)、心室颤动和室性心动过速。室性心动过速是通常规律和快速心率的类型,其起因于心脏的心室不适当的电活动。它可能发生在心肌梗死期间或之后、心脏衰竭或肥大的心脏中、心肌病或结构正常的心脏中,并可能导致心脏骤停。

[0005] 大多数心率失常,包括心动过速,可使用药品、如起搏器等医疗程序或通过手术(例如消融)有效治疗。举例来说,当前用于室性快速性心律失常的医药治疗策略包括阻断 β -肾上腺素受体的药剂和阻断 Ca^{2+} 、 Na^{+} 和 K^{+} 通道的阻断剂。然而,尽管有最佳治疗,但这些药剂通常证明对患有室性快速性心律失常的患者无效。 β -阻断剂的最佳剂量通常受副作用(例如心动过缓、低血压、疲劳等)限制,而在心力衰竭期间由于对收缩力的负面影响,不经常使用 Ca^{2+} 阻断剂。结构性心脏病患者尤其禁用 Na^{+} 阻断剂,并且也禁用某些 K^{+} 阻断剂,因为它具有致心率失常作用(Priori, S.G.等人,室性心率失常患者管理和预防心源性猝死的2015ESC指南:由欧洲儿科和先天性心脏病学会(AEPC)认可的欧洲心脏病学会(ESC)的室性心率失常患者管理和预防心源性猝死特别工作组(2015ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death:The Task Force for the Management of Patients with Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology(ESC).Endorsed by:Association for European Paediatric and Congenital Cardiology(AEPC).《欧洲心脏杂志(Eur Heart J)》,2015.36(41):2793-867;和Al-Khatib等人,《美国心脏病学会指南(Guidelines from AHA)》,2017)。

[0006] β -阻断剂(如美托洛尔)是大多数类型的快速性心律失常,包括室性心动过速的标

准治疗。用于治疗严重(可能致命)的异常心律(如室性心动过速、阵发性室上性心动过速和心房颤动)的其它药物包括盐酸普罗帕酮(Rythmol)。它可用于恢复正常的心律并维持规律、稳定的心跳。普罗帕酮是1C类抗心率失常药物,具有局部麻醉作用,并且对心肌膜具有直接稳定作用。与Rythmol相关的不良副作用最常发生于肠胃、心血管和中枢神经系统。在约20%的患者中,由于不良反应,必须停止用Rythmol的治疗。

[0007] 因此,仍需要用于治疗或预防心动过速,特别是室性心动过速的新药物。我们在本文中提出通过抑制PDE2局部和选择性激活 Na^+/K^+ -ATP酶(钠钾三磷酸腺苷酶或“NKA”,也称为 Na^+/K^+ 泵或钠-钾泵)作为这类病症的新的治疗策略。此机制与常规药物,如 β -阻断剂和1类抗心率失常药物的机制不同,常规药物通过靶向 β -肾上腺素能受体、钙通道、 Na^+ 通道或 K^+ 通道来治疗室性心动过速。

[0008] PDE2是哺乳动物中发现的许多不同的磷酸二酯酶(PDE)中的一种。PDE酶家族通过水解控制来调节次级信使环核苷酸cAMP和/或cGMP的细胞内水平。这些环状核苷酸在所有哺乳动物细胞中用作细胞内信号分子。PDE酶通过破坏磷酸二酯键形成相应的单磷酸酯来水解cAMP和/或cGMP。

[0009] 根据底物特异性、抑制剂敏感性以及最近基于序列同源性,将不同的PDE细分为11个家族(PDE1到PDE11)。11个家族由21个基因编码,为几个家族提供多个成员。在同一家族中的PDE在功能上相关。PDE具有不同的底物特异性—一些是cAMP选择性水解酶(PDE4、PDE7和PDE8),而另一些是cGMP选择性水解酶(PDE5、PDE6和PDE9)。其它的,包括PDE2,是负责水解cAMP和cGMP的双底物PDE。

[0010] 几种PDE抑制剂,特别是PDE3、PDE4和PDE5抑制剂已被批准用于临床应用。PDE3抑制剂(例如米力农)可用于心血管治疗。PDE2在大脑中示出最高表达,但在其它组织中也有发现。抑制PDE2导致cAMP和cGMP水平升高,这可改善认知功能。迄今为止,PDE2抑制剂主要在文献中被证明用于治疗各种认知障碍,例如用于神经元发育、学习和记忆,用于治疗神经障碍和神经退行性疾病,如痴呆、阿尔茨海默病等。几种PDE2抑制剂已针对认知障碍进行了I期临床试验,包括TAK-915(武田(Takeda))、ND-7001(Neuro3d/Evotec)和PF-05180999(辉瑞(辉瑞))。举例来说,Mikami等人,《药物化学杂志(J. Med. Chem.)》,2017, 60(18):7677-7702, TAK-915的经口给药示出提高在小鼠大脑中3',5'-环单磷酸鸟苷(cGMP)水平并且改善大鼠的认知能力。由于这些研究,所述化合物进入人临床试验。

[0011] 描述PDE2抑制剂的其它文献包括EP 3026051、WO 2005/021037和WO2012/168817。在EP 3026051中,建议所述化合物具有PDE2A抑制活性,并可用作精神分裂症、阿尔茨海默病等的预防或治疗药物。在WO 2005/021037中,已知的PDE2抑制剂与已知的肺表面活性剂组合用于治疗肺部病变,特别是ARDS(成人呼吸窘迫综合征)、IRDS(婴儿呼吸窘迫综合征)、ALI(急性肺损伤)和支气管哮喘。在WO 2012/168817中描述用作PDE2抑制剂和/或CYP3A4抑制剂的各种化合物,并且提出用于治疗中枢神经系统障碍、认知障碍、精神分裂症和痴呆的化合物。这些文件均未提出在任何心脏相关病症的治疗中使用任何PDE2抑制剂。

[0012] PDE2也在心脏组织中表达,已有一些推测(尽管没有得到支持)涉及PDE2抑制剂在治疗或预防心律失常中的用途(参见例如WO 2006/072612、WO 2004/089953、WO 2016/073424和WO 2006/024640)。举例来说,WO 2004/089953和WO 2006/024640涉及新的PDE2抑制剂,假定,其可能有效治疗或预防极其广泛的病状,包括肺炎、关节炎、视网膜盲、阿尔茨

海默病等。基于PDE2在心肌中的存在,这些文件提出所述化合物可具有保护免受“心律失常”的潜力,但没有提供证据支持这一点。也没有任何文献表明在这些文献中公开的化合物是否适合于治疗或预防任何特定组的心律失常,更不用说室性心动过速。在此背景下,已经不可能预测到如本文所证明的,PDE2抑制剂将必然适合于治疗心动过速。

[0013] 术语“心律失常”广义地定义需要不同治疗方法的一系列不同的心律紊乱。心律失常的起源(房性与室性)和类型(快速性心律失常与缓慢型心律失常)都非常重要,在开始治疗之前做出决定。房性心律失常通常以与室性心律失常完全不同的方式治疗。举例来说,腺苷和强心苷(例如地高辛)用于治疗各种房性心律失常,但可能诱发或加重室性心律失常。类似地,在缓慢型心律失常的情况下通常禁用适合于快速性心律失常的治疗。举例来说, β -阻断剂(如美托洛尔)是用于快速性心律失常的治疗,但导致缓慢型心律失常。因此, β -阻断剂(例如美托洛尔)在所有类型的缓慢型心律失常中都禁用。心律失常的治疗也可取决于潜在的原因或病状。心力衰竭或心肌梗死后室性快速性心律失常的治疗与遗传性疾病(如CPVT和长QT综合征)的室性快速性心律失常的治疗不同。举例来说,氟卡尼(一种 Na^+ 通道阻断剂,是1类抗心律失常药物)通常用于CPVT和长QT综合征,但在心力衰竭和心肌梗塞后禁用。因此,根据起源和类型,心律失常可分为需要不同治疗方法的不同组。对“心律失常”的治疗的一般性提及不足以表明可治疗哪种类型的心律失常。

[0014] 与现有技术相比,本发明涉及心动过速,特别是室性心动过速的治疗或预防。其他人积极地教导远离本文提出的发现。举例来说,Vettel, C.等人(磷酸二酯酶2保护免受儿茶酚胺诱发的心律失常,并保留心肌梗塞后的收缩功能(Phosphodiesterase 2 Protects Against Catecholamine-Induced Arrhythmia and Preserves Contractile Function After Myocardial Infarction)《循环研究(Circ Res)》,2017.120(1):120-132)表明严重缺血性损伤后,更大的PDE2丰度可保护免受心律失常并改善收缩力。因此,他们提出激活PDE2作为保护心脏免受心律失常和收缩功能障碍的治疗策略。WO 2005/035505进一步警告PDE抑制剂可提高心率,甚至引起心律失常。这与我们在此提出的支持PDE2抑制剂在心动过速的治疗中的使用的发现相反。

[0015] NKA的降低活性已被鉴定为几种心律失常的重要上游贡献者(Faggioni, M.和B. C. Knollmann, 低血钾的心律失常保护: Ca^{2+} 激活的 K^+ 电流在心室中的新作用(Arrhythmia Protection in Hypokalemia: A Novel Role of Ca^{2+} -Activated K^+ Currents in the Ventricle)《循环(Circulation)》,2015.132(15):1371-3),但据我们所知,不存在NKA的特定激活剂。本文提出的发现示出,PDE2抑制可强烈激活患有心力衰竭和遗传性心律失常综合征的小鼠(锚蛋白 $^{+/-}$ 小鼠,长QT综合征和儿茶酚胺能型多形性室性心动过速(CPVT)小鼠)的NKA并预防快速性心律失常。增加superAKAP(具有高特异性的肽取代AKAP的RII-PKA)减弱PDE2抑制预防心律失常的能力。连同示出superAKAP消除PDE2抑制对NKA电流的作用的数据,这表明PDE2通过调节在局部域中的cAMP水平来调节NKA并预防室性快速性心律失常。

[0016] 如本文所述,作为抗心律失常治疗的PDE2抑制以两种方式表示新颖的治疗策略: 1) 作为NKA的激活剂;和2) 通过在离散域中靶向cAMP水平。在随附实例中提供的数据还表明,PDE2在人类肥大和衰老中被上调,因为我们发现在心肌细胞特异性核中PDE2-mRNA的表达增加。这与先前的数据一致(Mehel, H.等人,磷酸二酯酶2在人类衰竭的心脏中被上调并

且在心肌细胞中减弱 β -肾上腺素响应 (Phosphodiesterase-2 is up-regulated in human failing hearts and blunts beta-adrenergic responses in cardiomyocytes) 《美国心脏病学会杂志 (J Am Coll Cardiol) 》, 2013.62 (17) :1596-606) 并且指出PDE2抑制可能是人类慢性心脏病中理想的抗心律失常目标。

[0017] 我们在本文报告了一种新颖的治疗策略, 即PDE2抑制, 用于治疗和/或预防心动过速, 特别是室性心动过速。具体来说, 我们发现一种新型的NKA调节机制, 其中PDE2通过与NKA和PKA-R11相互作用来局部调节NKA活性。尽管不希望受理论的结扎, 但我们认为此机制是心力衰竭、锚蛋白B^{+/}-小鼠和CPVT体内和分离的心室肌细胞中所见的抗心律失常作用的基础。这通过以下发现支持: PDE2抑制主要通过增加通过NCX的Ca²⁺的挤出 (增加NKA活性的下游作用) 来减少细胞内Ca²⁺负载, 并且因为superAKAP消除体内的抗心律失常作用, 这破坏局部AKAP结合的PKA-R11。

发明内容

[0018] 本发明提供用于治疗受试者的心动过速或快速性心律失常的选择性PDE2抑制剂。

[0019] 本发明另外提供治疗需要这类治疗的受试者的心动过速或快速性心律失常的方法, 所述方法包含向所述受试者给药治疗有效量的选择性PDE2抑制剂的步骤。

[0020] 本发明另外提供选择性PDE2抑制剂在制造用于治疗受试者的心动过速或快速性心律失常的药剂中的用途。

[0021] 本发明还提供一种包装, 其包含: (i) 选择性PDE2抑制剂或包含选择性PDE2抑制剂的药物组合物; (ii) 与(i)治疗受试者的心动过速或快速性心律失常的使用有关的印刷说明和/或标签。

[0022] 本发明另外提供用于治疗需要这类治疗的受试者的心动过速或快速性心律失常的组合法的方法, 所述方法包含向所述受试者给药治疗有效量的选择性PDE2抑制剂, 并且同时或分别地 (例如依次) 一种或多种心血管药物, 例如抗心律失常药物的步骤。

[0023] 本发明还提供药物组合物, 其包含选择性PDE2抑制剂和一种或多种心血管药物, 例如抗心律不齐药物, 任选地与至少一种药学上可接受的载体或赋形剂组合。

具体实施方式

[0024] 本发明提供用于治疗受试者的心动过速或快速性心律失常的选择性PDE2抑制剂。如本文所定义, “治疗”还包括预防性治疗, 即预防。

[0025] 如本文所用, 术语“心动过速”是指心律升高, 即过快的心律。通常, 这可指成年人的心率高于每分钟100次跳动。术语“快速性心律失常”是指与正常心律不规律 (即异常心律) 相关的心动过速。在某些情况下, 这些术语在所属领域中可互换使用, 以描述与心律增加相关的任何心律紊乱。

[0026] 本发明具体来说涉及治疗和/或预防室性心动过速, 例如预防室性心动过速的治疗。如本文所用, 术语“室性心动过速”是指异常且非常快的心律, 其始于心脏的心室, 并且是由心脏的电系统的功能障碍引起的。更具体地, 它是指每分钟大于100次跳动的脉冲, 其中至少三个连续的异常心跳接连源自心室。

[0027] 在一个实施例中, 本发明涉及在减少的副作用下治疗或预防室性心动过速。减少

的副作用包括但不限于减少以下不良事件中的一种或多种：疲劳头晕、运动耐力降低、心动过缓、恶心、腹泻、心力衰竭加重、头痛、肺毒性（间质性肺炎、急性呼吸窘迫综合征、弥漫性肺泡出血）、甲状腺功能不全、肝毒性、眼球改变和QT延长。

[0028] 用于本发明的化合物是PDE2的选择性抑制剂，优选地如本文所定义的人PDE2的选择性抑制剂。“PDE2的抑制剂”是具有阻断磷酸二酯酶2 (PDE2) 的降解作用的任何化合物。应该相应地解释“人PDE2的抑制剂”。在一个实施例中，用于本发明的化合物是PDE2A的选择性抑制剂，例如人PDE2A的选择性抑制剂。

[0029] 如本文所用，术语“选择性PDE 2抑制剂”是指与其它PDE类型相比选择性地抑制PDE2的化合物，即与其它PDE类型，并且尤其以下中的一种或多种相比，其抑制PDE2更强烈：PDE1、PDE3、PDE4、PDE5和PDE10。具体来说，化合物可比其抑制PDE10更强烈地抑制PDE2。更特别地，化合物可比抑制所有其它PDE类型更强烈地抑制PDE2。

[0030] 优选的用于本发明的化合物是那些选择性人PDE2抑制剂，即与其它人PDE类型相比选择性地抑制人PDE2的化合物，例如比以下中的一种或多种更强烈抑制人PDE2的化合物：人PDE1、人PDE3、人PDE4、人PDE5和人PDE10。具体来说，化合物可比其抑制人PDE10更强烈地抑制人PDE2。更特别地，化合物可比抑制所有其它人PDE类型更强烈地抑制人PDE2。

[0031] 用于本发明的PDE2抑制剂对抑制PDE2 (例如人PDE2) 的活性的选择性可至少为与至少一种其它PDE类型 (例如人PDE类型) 相比，优选地与PDE10 (例如人类PDE10) ，例如与所有其它PDE类型 (例如所有其他人PDE类型) 相比的10倍。在一些实施例中，选择性的程度 (例如，与所有其它PDE类型或所有其它人PDE类型相比) 将为至少20倍，例如至少30倍或至少50倍。在其它实施例中，选择性的程度 (例如，与所有其它PDE类型或所有其它人类PDE类型相比) 可为至少100倍、至少200倍、至少300倍、至少400倍、至少500倍或至少1000倍。

[0032] 用于本发明的PDE2活性的抑制剂通常将以小于约100nM，优选地小于约50nM，小于约40nM、小于约30nM、小于约20nM或小于约10nM的IC₅₀值 (产生对底物水解的50%抑制的浓度) 抑制PDE2，例如人PDE2。在一些实施例中，化合物可以值小于5nM或小于1nM的IC₅₀抑制PDE2，例如人PDE2。用于测量PDE活性和用于确定IC₅₀值的方法在所属领域中是众所周知，并且例如在Weeks等人，《国际重要研究杂志 (Int. J. Impot. Res.) 》17:5-9, 2005, 和Souness等人，《英国药理学杂志 (British Journal of Pharmacology) 》118:649-658, 1996中描述，其全部内容以引用的方式并入本文中。

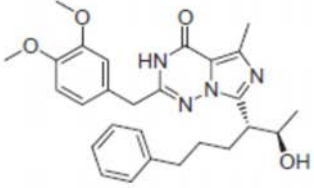
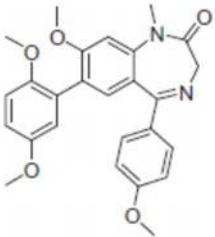
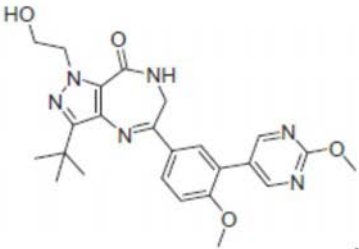
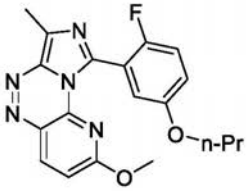

[0033] 多种PDE2抑制剂是已知的，并且在文献和较早的专利出版物中对其进行了描述，以及其制造方法。具有期望的PDE2抑制活性的任何化合物可用于本发明，并且可例如使用所属领域众所周知的PDE抑制和选择性测定法容易地确定这类化合物，如以下出版物中的任一个中描述的那些，其全部内容以引用的方式并入本文中：Boess等人 (《神经药理学 (Neuropharmacology) 》47:1081-1092, 2004) ；Maehara等人 (《欧洲药理学杂志 (European Journal of Pharmacology) 》811:110-116, 2017；Gomez等人 (《药物化学杂志 (J. Med. Chem.) 》60:2037-2051, 2017；和Rombouts等人 (《美国化学学会药物化学快报 (ACS Med. Chem. Lett.) 》6:282-286, 2015) 。

[0034] 适合用于本发明的PDE2抑制剂的实例包括在以下文献中的任一个中描述的那些，其全部内容以引用的方式并入本文中：Trabanco等人，关于选择性磷酸二酯酶2A (PDE2A) 抑制剂：专利审查 (Towards selective phosphodiesterase2A (PDE2A)

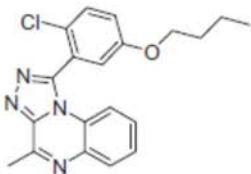
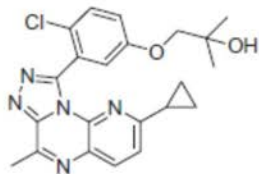
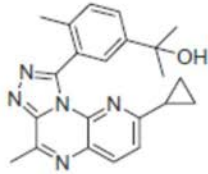
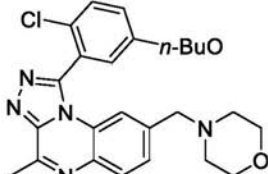
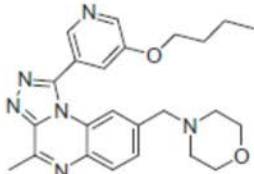
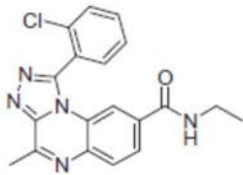
inhibitors:a patent review) (2010-存在),关于治疗专利的专家意见 (Expert Opinion on Therapeutic Patents), 26 (8):933-946, 2016; WO 2002/050078 (拜耳 (Bayer)); WO 2004/089953 (安达制药公司 (Altana Pharma AG)); WO 2006/024640 (安达制药公司); WO 2006/072612 (安达制药公司); WO 2006/072615 (安达制药公司); WO 2004/41258 (Neuro3d); EP 1548011 (Neuro3d); EP 1749824 (Neuro3d); WO 2005/041957 (辉瑞产品公司 (Pfizer Products Inc.)); WO 2005/061497 (辉瑞产品公司); WO 2010/054253 (生物疗法有限公司和惠氏公司 (Biotie Therapies GmbH and Wyeth)); WO 2012/104293 (勃林格殷格翰国际公司 (Boehringer Ingelheim International GmbH)); WO 2014/019979 (勃林格殷格翰国际公司); WO 2013/000924 (杨森制药公司 (Janssen Pharmaceutica NV)); US 2012/0214791 (辉瑞); WO 2012/168817 (辉瑞); WO 2014/010732 (武田); EP 3 026 051 (武田); WO 2005/021037 (辉瑞); Mikami等人,《药物化学杂志》60:7677-7702, 2017; Mikami等人,《化学与药学通报 (Chem.Pharm.Bull.)》65 (11):1058-1077, 2017; Masood等人,《药理学与实验疗法杂志 (JPET)》331 (2):690-699, 2009; Gomez等人,《生物有机药物化学快报 (Bioorg.Med.Chem.Lett.)》23:6522-6527, 2013; Maehara等人,《欧洲药理学杂志 (European Journal of Pharmacology)》811:110-116, 2017; Gomez等人,《药物化学杂志》60:2037-2051, 2017; Rombouts等人,《美国化学学会药物化学快报》6:282-286, 2015; Redrobe等人,《精神药理学 (Psychopharmacology)》231:3151-3167, 2014; 和Buijnsters等人,《美国化学学会药物化学快报》5:1049-1053, 2014。也可使用任何此类化合物的药学上可接受的盐或前药。

[0035] 用于本发明的选择性PDE2抑制剂的具体实例包括以下化合物,其药学上可接受的盐和前药:

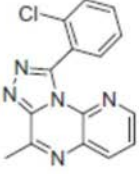
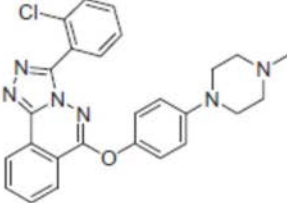
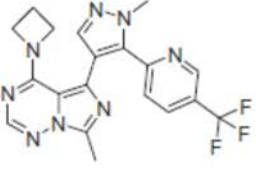
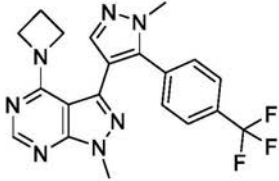
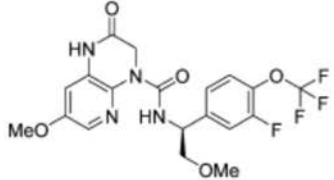
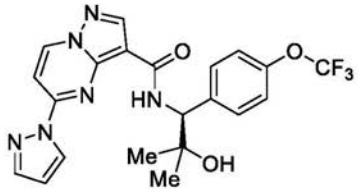
[0036]

化合物	名称	PDE2A IC ₅₀ 或 Ki 值*	选择性数据*
	BAY 60-7550 2-(3,4-二甲氧基苯甲基)-7-[(2R,3R)-2-羟基-6-苯基己-3-基]-5-甲基咪唑并[5,1-f][1,2,4]三嗪-4(3H)-酮	IC ₅₀ = 4.7 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	相对于其它 PDE > 50 倍选择性
		IC ₅₀ = 6 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	
		IC ₅₀ = 3.3 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	
		IC ₅₀ = 7.12 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	PDE10 IC ₅₀ = 282 nM
		IC ₅₀ = 4.12 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	PDE10 IC ₅₀ > 500 nM

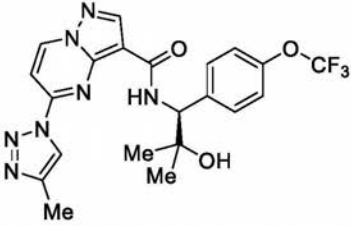
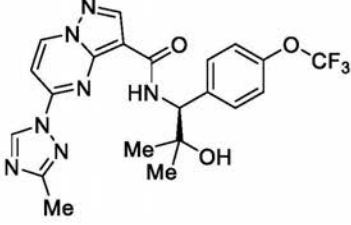
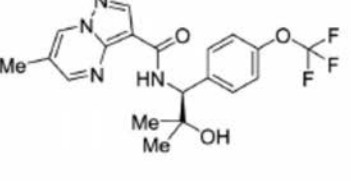
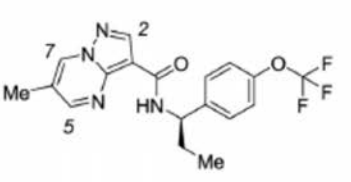
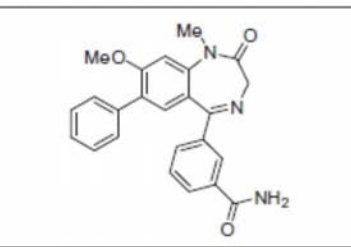
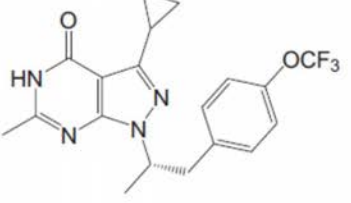
[0037]

		IC ₅₀ = 3 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利 的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	PDE10 IC ₅₀ > 1000 nM
		IC ₅₀ = 5 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利 的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	PDE10 IC ₅₀ = 1488 nM
		IC ₅₀ = 12 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利 的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	PDE10 IC ₅₀ = 2403 nM
		IC ₅₀ = 8 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利 的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	PDE10 IC ₅₀ = 1622 nM
		IC ₅₀ = 10 nM (Buijnsters 等 人,《美国化学 学会药物化学 快报》5: 1049-1053, 2014)	rPDE10 IC ₅₀ = 4183 nM 相对于所 有 PDE > 210 倍选择 性
		IC ₅₀ = 0.29 nM (根据在 Trabanco 等人, 关于治疗专利 的专家意见, 26(8): 933-946, 2016 中的 pIC ₅₀ 值计算)	PDE10 IC ₅₀ = 21 nM

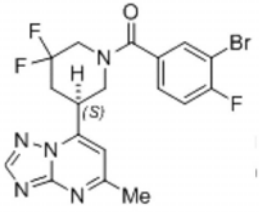
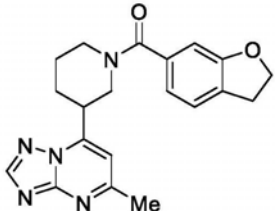
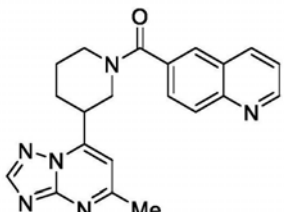
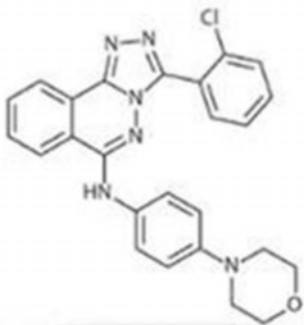
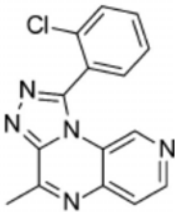
[0038]

		IC ₅₀ = 15 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利 的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	
	Lu AF64280	Ki = 20 nM (Redrobe 等人, 《精神药理学》 231: 3151-3167, 2014)	PDE10 Ki = 1800 nM
	PF-05180999	IC ₅₀ = 1.61 nM (US 2012/ 0214791; Gomez 等人, 《药物化学杂 志》60: 2037-2051, 2017)	PDE 选择 性: 相对于 PDE10A 2000x
		IC ₅₀ = 2.30 nM (Trabanco 等人, 关于治疗专利 的专家意见, 26(8): 933-946, 2016)	相对于 PDE 家族 的其它成 员> 500 倍 选择性
	TAK-915 N-((1S)-1-(3-氟-4-(三 氟甲氧基) 苯基)-2-甲氧基乙 基)-7-甲氧基-2-氧代 -2,3-二氢吡啶并 [2,3-b]吡嗪-4-(1H)-甲 酰胺	IC ₅₀ = 0.61 nM (Mikami 等人, 《药物化学杂 志》60: 7677-7702, 2017)	PDE 选择 性: 4100 x (相对于 PDE1A)
	N-(1S)-2-羟基-2-甲基 -1-(4-(三氟甲氧基)-苯 基)丙基)-5-(1H-吡唑 -1-基)吡唑并[1,5-a]嘧 啶-3-甲酰胺	IC ₅₀ = 5.4 nM (Mikami 等人, 《化学与药学通 报》65(11): 1058-1077, 2017)	相对于其 它 PDE 630 倍选择 性

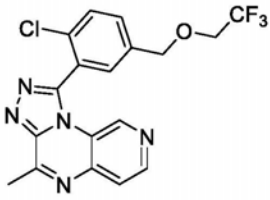
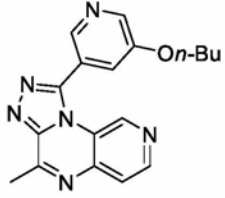
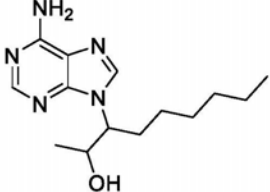
[0039]

	N-(1S)-2-羟基-2-甲基-1-(4-(三氟甲氧基)-苯基)丙基)-5-(4-甲基-1H-1,2,3-三唑-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺	IC ₅₀ = 5.4 nM (Mikami 等人, 《化学与药学通报》 65(11): 1058-1077, 2017)	相对于其它 PDE 690 倍选择性
	N-(1S)-2-羟基-2-甲基-1-(4-(三氟甲氧基)-苯基)丙基)-5-(3-甲基-1H-1,2,4-三唑-1-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺	IC ₅₀ = 11 nM (Mikami 等人, 《化学与药学通报》 65(11): 1058-1077, 2017)	相对于其它 PDE 610 倍选择性
		IC ₅₀ = 5.1 nM (Mikami 等人, 《化学与药学通报》 65(11): 1058-1077, 2017)	
		IC ₅₀ = 24 nM (Mikami 等人, 《化学与药学通报》 65(11): 1058-1077, 2017)	
	ND-7001 3-(8-甲氧基-1-甲基-2-氧代-7-苯基-2,3-二氢-1H-苯并[e]-[1,4]二氮杂卓-5-基)苯甲酰胺	K _i = 114 nM (Masood 等人, 《药理学与实验疗法杂志》 331(2): 690-699, 2009)	
	PDM-631 ((S)-3-环丙基-6-甲基-1-(1-(4-(三氟甲氧基)苯基)丙-2-基)-1,5-二氢-4H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-4-酮	IC ₅₀ = 1.5 nM (Maehara 等人, 《欧洲药理学杂志》 811: 110-116, 2017)	相对于其它 PDE > 2000 倍选择性 (在 1 μM 下小于 10%抑制)

[0040]

	<p>DNS-8254 (5S)-1-[(3-溴-4-氟苯基)羰基]-3,3-二氟-5-{5-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-a]嘧啶-7-基}哌啶</p>	<p>IC₅₀ = 8 nM (Gomez 等人,《药物化学杂志》60: 2037-2051, 2017)</p>	<p>PDE10A IC₅₀ = 1700 nM</p>
	<p>1-[2,3-二氢-1-苯并呋喃-5-基]羰基-3-{5-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-a]嘧啶-7-基}哌啶</p>	<p>IC₅₀ = 3 nM (Gomez 等人,《药物化学杂志》60: 2037-2051, 2017)</p>	
	<p>6-[(3-{5-甲基-[1,2,4]三唑并[1,5-a]嘧啶-7-基}哌啶-1-基)羰基]喹诺酮</p>	<p>IC₅₀ = 2 nM (Gomez 等人,《药物化学杂志》60: 2037-2051, 2017)</p>	
		<p>IC₅₀ = 4.2 nM (US 7851472)</p>	
		<p>hPDE2A IC₅₀ = 29 nM (Rombouts 等人,《美国化学学会药物化学快报》6: 282-286, 2015)</p>	<p>rPDE10 IC₅₀ = 480 纳米</p>

[0041]

		hPDE2A IC ₅₀ = 3 nM (Rombouts 等人,《美国化学学会药物化学快报》6: 282-286, 2015)	rPDE10 IC ₅₀ = 2450 nM
		hPDE2A IC ₅₀ = 54 nM (Rombouts 等人,《美国化学学会药物化学快报》6: 282-286, 2015)	rPDE10 IC ₅₀ = 3800 nM
	EHNA (赤型-9-(2-羟基-3-壬基)腺嘌呤)		

[0042] *取自列出的出版物的值

[0043] 优选的用于本发明的是以下选择性PDE2抑制剂: TAK-915、ND-7001、PF-05180999、Lu AF64280和其药学上可接受的盐或前药。特别优选的用于本发明的是PF-05180999、TAK-915,其药学上可接受的盐和其前药。

[0044] 这类化合物的PDE抑制活性可通过所属领域已知的方法测试,包括在以下中的任一个中描述的那些,其全部内容以引用的方式并入本文中: Boess等人,《神经药理学》47: 1081-1092, 2004; Maehara等人,《欧洲药理学杂志》811: 110-116, 2017; Gomez等人,《药物化学杂志》60: 2037-2051, 2017; Rombouts等人,《美国化学学会药物化学快报》6: 282-286, 2015; 和Redrobe等人,《精神药理学》231: 3151-3167, 2014。化合物对各种PDE的特异性的确定可能涉及一种测定法,以分离特定PDE家族,以关于cGMP/cAMP降解测量PDE活性,并测试所讨论的化合物抑制活性的程度。

[0045] 本文描述的PDE2抑制剂化合物中的任一种均可以药学上可接受的盐的形式使用。本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指本文描述的化合物中的任一种的任何药学上可接受的有机或无机盐。药学上可接受的盐可包括一种或多种额外的分子,如抗衡离子。抗衡离子可以是任何使母体化合物上电荷稳定的有机或无机基团。

[0046] 如果用于本发明的PDE2抑制剂化合物是碱,那么可通过使游离碱与有机或无机酸反应来制备合适的药学上可接受的盐。出于此目的可使用的酸的非限制性实例包括盐酸、氢溴酸、硫酸、磺酸、甲磺酸、磷酸、富马酸、琥珀酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、马来酸、乙酸、三氟乙酸和抗坏血酸。如果用于本发明的PDE2抑制剂化合物是酸,那么可通过使游离酸与有机或无机碱反应来制备合适的药学上可接受的盐。适用于此目的的碱的非限制性实例包括碱金属和碱土金属的氢氧化物,例如氢氧化钠、氢氧化钾或氢氧化铯、氨和有机胺,如二乙胺、三乙胺、乙醇胺、二乙醇胺、环己胺和二环己胺。形成盐的程序是在所属领域中常规的。

[0047] 合适的盐的实例包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐和与磺酸的盐,例

如甲烷磺酸。其它合适的盐包括有机盐,如乙酸盐、柠檬酸盐和富马酸盐。

[0048] 可替代地,本文描述的PDE2抑制剂化合物中的任一种可以前药的形式提供。术语“前药”是指活性化合物的衍生物,其在使用条件下例如在体内进行转化以释放活性药物。前药在转化为活性药物之前可没有药理活性,但不一定。如本文所用,术语“前药”延伸到在生理条件下转化成本文描述的活性PDE2抑制剂化合物中的任一种的任何化合物。合适的前药包括在生理条件下水解成所需PDE2抑制剂的化合物。

[0049] 前药通常可通过掩蔽母体分子中的一个或多个官能团而获得,所述官能团被认为至少部分是使用前基团的活性所必需的。如本文所用,“前基团”是指用于掩蔽在活性药物内的官能团并且在指定的使用条件下(例如向身体给药)进行转化(例如断裂)以释放官能团并且因此提供活性药物。前基团通常经由在使用条件下(例如体内)可断裂的一个或多个键与活性药物的官能团连接。前基团的断裂可在使用条件下自发发生,例如借助于水解,或可通过其他物理或化学手段,例如通过酶,通过暴露于温度变化,或通过暴露于温度变化等来催化或诱发。在通过其它物理或化学手段诱导断裂的情况下,这些裂解可能是使用条件所固有的,例如靶向部位的pH条件,或这些可为外源供应的。

[0050] 适用于掩蔽在活性化合物中的官能团以提供前药的各种各样的前基团是在所属领域中众所周知的。举例来说,羟基官能团可被掩蔽为可在体内水解以提供母体羟基的酯、磷酸酯或磺酸酯。酰胺官能团可在体内水解以提供母体氨基。羧基可以掩盖为可在体内水解以提供母体羧基的酯或酰胺。合适的前基团的其它实例对于所属领域技术人员将是显而易见的。可根据需要,例如根据前药的期望的油或水溶解度,其预期的给药模式和/或其在靶向部位处产生活性药物化合物的代谢模式选择前基团的确切性质。前基团可为例如亲水的或亲脂的,以便根据需要增加或减少水溶解度。前基团的选择还可赋予其它期望特性,例如增强的胃肠道吸收,改善的药物稳定性等。

[0051] 本文描述的PDE2抑制剂适用于治疗心动过速或快速性心律失常。举例来说,这些可用于治疗以下病症中的任一种:房性心动过速、心房颤动、心房扑动、阵发性室上性心动过速、室性早搏(PVC)、心室颤动和室性心动过速。在优选实施例中,化合物可用于治疗室性心动过速。与心律失常相关的病状的治疗形成本发明的优选方面,例如快速性心律失常。

[0052] 在一个实施例中,本文描述的化合物因此可用于治疗或预防以下病状中的任一种:房性心动过速、心房颤动、心房扑动、阵发性室上性心动过速、室性早搏(PVC)、心室颤动和室性心动过速,例如治疗或预防与心律失常相关的任何这类病状。

[0053] 在一个实施例中,本文描述的PDE2抑制剂旨在用于治疗或预防或室性心动过速。受试者预防室性心动过速的治疗为本发明的优选实施例。用于治疗合适受试者(例如患者)包括被诊断为易患室性心动过速的受试者,和先前经历至少一次室性心动过速发生并因此易患进一步的发作的受试者。这类受试者的治疗旨在减少,优选地消除进一步的室性心动过速事件的发生。

[0054] 心动过速或快速性心律失常(例如室性心动过速)可为获得的,或它们可为先天性的。举例来说,它们可与多种与心脏有关的病症相关或由其引起,包括但不限于以下中的任一种:先天性心力衰竭、高血压、心肌梗死(在心肌梗塞期间或之后)、充血心力衰竭、再灌注损伤或伤害、局部缺血、心绞痛、扩张型心肌病、梗死后心力衰竭、动脉粥样硬化性外周动脉疾病、糖尿病、肥大型心肌病、心肌炎、通道病(例如长QT综合征、儿茶酚胺能型多形性室性

心动过速综合征 (CPVT) 或Brugada综合征)、限制性心肌病、浸润性心脏病 (例如淀粉样变性) 和肺泡低氧导致肺动脉高压和右心室衰竭。

[0055] 如本文所用,术语“治疗 (treatment/treating和treat)”包括针对受试者的确定的疾病或病症的治疗和预防方法。具体来说,这些措施包括: (i) 预防疾病的发生或降低疾病发生的风险,特别是当受试者可能易患所述病症但尚未被诊断为患有所述病症时; (ii) 抑制病症,特别是阻止其进一步发展 (进展) 或延缓其发作;和 (iii) 缓解病症,特别是引起疾病的消退,直到达到期望的结果。

[0056] 可受益于根据本发明的治疗方法的受试者 (例如患者) 包括但不限于以下中的任一种: 先前患有心肌梗死的受试者; 患有心力衰竭的受试者; 和可能易患本文描述的心动过速病状中的任一种的受试者, 例如遗传性易患这类病状的受试者, 例如, 儿茶酚胺能型多形性室性心动过速 (CPVT) 其中异常快速和不规律的心跳 (心动过速) 响应于身体活动或情绪应激被触发。患有以下病状中的任一种或可能易患以下病状中的任一种的受试者特别适合于根据本文所述方法治疗: 心力衰竭、心肌梗死后、心肌炎、肥大型心肌病、CPVT、长QT综合征和Brugada综合征。可根据本发明治疗的优选的一组受试者 (例如患者) 包括患有心力衰竭、CPVT或长QT综合征或具有心力衰竭、CPVT或长QT综合征的风险的那些。

[0057] 在一个实施例中, 本发明涉及治疗和/或预防患有以下病状中的任一种或可能易患以下病状中的任一种的受试者的室性心动过速: 心力衰竭、心肌梗死后、心肌炎、肥大型心肌病、CPVT、长QT综合征和Brugada综合征。

[0058] CPVT和长QT综合征为遗传性综合征, 伴有室性心动过速的高风险。目前, 几乎所有患有这些病状的患者都接受某种形式的抗心律失常治疗。尽管心力衰竭涵盖不同范围的病状, 但通常可为室性心动过速的相关的风险。具体来说, 本发明涉及患有心力衰竭、CPVT或长QT综合征或具有心力衰竭、CPVT或长QT综合征的风险的受试者的室性心动过速的治疗和/或预防。

[0059] 可能易患心动过速 (例如室性心动过速) 的受试者包括先前已诊断心律失常 (例如室性心动过速) 和/或对心律失常治疗的受试者, 例如已开处抗心律失常药 (例如 β -阻断剂) 以控制异常心律的受试者或具有植入的心脏除颤器 (ICD) 的受试者。具有ICD的症状性心力衰竭患者可特别受益于本文公开的治疗方法。

[0060] ICD通常植入具有室性心动过速和/或心源性猝死的高风险的患者中, 例如患有心力衰竭或长QT综合征的患者。在装置植入的1到3年内, 将有20%-35%的患者将经历适当电击, 即ICD将可能致命的室性心动过速转变成正常心律。但是, 三分之一的患者也可能经历不适当的电击, 即ICD产生了不必要的电击。每当ICD电击时, 由于心脏功能下降, 这引起死亡率增加2-5倍。因此, 重要的是能够减少患者可能遭受的不适当的ICD电击的数量。这可通过使用有效的药品来治疗或预防潜在的心脏疾病 (例如室性心动过速) 来实现。在一个实施例中, 本文描述的方法因此可用于治疗或预防具有植入的ICD的患者的室性心动过速, 具体来说, 减少或最小化患者可能遭受的不适当的ICD电击的次数。

[0061] 进行对于如室性心动过速的心律失常的长期治疗的受试者 (例如, 已开处 β -阻断剂至少6个月或至少12个月那些) 可特别受益于本文描述的治疗方法。尽管 β -阻断剂通常可为室性心动过速的第一线治疗, 但它们的疗效因病情和患者不同而异。本文描述的方法可用于治疗常规治疗 (例如, 使用 β -阻断剂) 不足以治疗心律失常 (尤其室性心动过速) 的患

者,或在常规药物(例如 β -阻断剂)禁用(例如AV阻断)或受试者不耐受。

[0062] 在一个实施例中,治疗方法可用于治疗患有ICD的患者,以最小化VA诱发的症状和/或减少不适当的ICD电击(例如,在CPVT中特别常见)。

[0063] 在一个实施例中,治疗方法可用于治疗具有ICD的患者,这些患者也正在接受对心律失常,如室性心动过速的常规治疗。此类患者包括具有ICD并正在接进行 β -阻断剂治疗的患者(例如,已开处 β -阻断剂至少6个月或至少12个月的患者)。

[0064] 如本文所用,“治疗有效量”是指将导致期望的药理学和/或治疗效果的量,即有效实现其预期目的的PDE2抑制剂的量。尽管各个患者的需求可变化,但是确定有效量的活性剂的最佳范围在所属领域技术人员的能力范围内。通常,根据包括医学病状的性质及其严重性的多种因素来选择用本文所描述的化合物中的任一种治疗疾病或病状的剂量方案。

[0065] 如本文所用,“受试者”通常将是哺乳动物。术语“哺乳动物”包括例如狗、猫、牛、绵羊、马和人。优选地,受试者将是人。

[0066] 本文描述的PDE2抑制剂将通常以药物组合物的形式给药。可使用容易获得的成分以常规方式配制药物组合物。因此,可将PDE2抑制剂与一种或多种常规载体、稀释剂和/或赋形剂结合,以产生药物组合物,如常规盖伦制剂,如片剂、丸剂、粉末、锭剂、小药囊、扁囊剂、酏剂、混悬剂(如注射液或输注液)、乳剂、溶液、糖浆、气溶胶(如固体或在液体介质)、软膏、明胶软胶囊和硬胶囊、栓剂、无菌可注射溶液、无菌包装的粉末等。

[0067] 合适的赋形剂、载体或稀释剂为乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯胶、磷酸钙、碳酸钙、乳糖钙、玉米淀粉、aglinates、黄芪胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水糖浆、水、水/乙醇、水/二醇、水/聚乙烯、二醇、丙二醇、甲基纤维素、甲基羟基苯甲酸酯、丙基羟基苯甲酸酯、滑石、硬脂酸镁、矿物油或脂肪物质,如硬脂肪或其合适的混合物。也可使用用于获得持续释放的配制物的试剂,如羧聚亚甲基、羧甲基纤维素、邻苯二甲酸醋酸纤维素或聚醋酸乙烯酯。组合物可另外包括润滑剂、润湿剂、增粘剂、着色剂、粒化剂、崩解剂、粘合剂、渗透活性剂、乳化剂、悬浮剂、防腐剂、甜味剂、调味剂、吸附增强剂,例如用于鼻腔递送(胆汁盐、卵磷脂、表面活性剂、脂肪酸、螯合剂)等。可配制药物组合物,以便通过采用所属领域众所周知的方法在向患者给药后提供PDE2抑制剂的快速、持续或延迟释放。

[0068] 在这类组合物中的活性成分(即PDE2抑制剂)可占配制物的约0.01重量%到约99重量%,优选地约0.1重量%到约50重量%,例如10重量%。

[0069] 给药可通过医学领域已知的任何合适的方法,包括例如经口、肠胃外(例如,肌内、皮下、腹膜内或静脉内)、经皮、口腔、直肠或体表给药,或通过吸入给药。优选的给药途径为经口和肠胃外(例如静脉内或腹膜内)。因此,用于本发明的优选的配制物是片剂、胶囊剂或静脉内溶液。

[0070] 片剂通常通过直接压片或制粒程序制备,例如使用标准流化床技术。片剂优选用薄膜包衣或另一种包衣例如肠溶包衣来包衣。胶囊优选地是明胶胶囊。注射用组合物可以是即用溶液或在给药前溶解的干燥材料。所有静脉内组合物都是无菌的。可以使用任何灭菌方法,如加热灭菌和无菌制剂。

[0071] 单位剂量将根据所选的PDE2抑制剂和所治疗的疾病或病症而变化。通常,单位剂量将从0.1mg到500mg;更优选地,1mg到300mg变化。典型的日剂量可为0.1mg到2克,更优选

地1mg到1g,例如1mg到600mg。

[0072] 受试者的每kg体重的典型的日剂量可从0.01mg/kg到50mg/kg,优选地0.1mg/kg到40mg/kg,例如1mg/kg到20mg/kg或5mg/kg到10mg/kg变化。

[0073] 剂量方案将根据临床情况而变化。典型的平均剂量将是每天一次、两次或三次,优选地每天一次或两次。

[0074] 待给药的活性化合物的精确剂量和治疗过程的长度将取决于许多因素,包括例如受试者的年龄和体重、需要治疗的具体病状和其严重程度以及给药途径。合适的剂量可容易地由所属领域技术人员确定。

[0075] 可单独使用本文描述的PDE2抑制作为抗心律失常治疗,例如,在这种方法比已知的治疗选项(例如,用 β -阻断剂治疗)更有效,和/或在与当前治疗无关的情况下,例如在这些可在任何给定的患者组中禁用的情况下。替代地,本文描述的治疗方法中的任一种可有利地与有效治疗待治疗的病症或疾病的一种或多种额外的活性剂组合给药,即作为当前方案的附加疗法。这类治疗方法可涉及同时、分开或顺序给药PDE2抑制剂,或含有PDE2抑制剂和额外的活性剂的药物组合物。在活性物质同时给药的情况下,这些可以组合制剂的形式提供。因此,本文描述的组合物可另外含有一种或多种这类活性剂。

[0076] 可与PDE2抑制剂共同给药的其它活性剂可包括心血管药物。举例来说,PDE2抑制剂可与一种或多种治疗高血压、心力衰竭、心律失常和/或梗死后心肌再灌注综合征的药物共同给药。这类药物的实例包括 β -阻断剂、钙拮抗剂、ACE-抑制剂、ATII/阻断剂和抗心律失常药物。在一个实施例中,心血管药物可为 β -阻断剂,例如 β_1 -选择性 β -阻断剂,如醋丁洛尔、阿替洛尔、倍他洛尔、比索洛尔、塞利洛尔、美托洛尔、奈必洛尔或艾司洛尔。在特定实施例中,美托洛尔可与PDE2抑制剂共同给药以治疗或预防本文描述的病状中的任一种,特别是治疗或预防室性心动过速。

[0077] 以下实例仅作为说明并参考附图给出:

[0078] 图1:通过cAMP和局部AKAP-结合PKA调控的NKA电流。A)用于NKA电流测量的方案概述。将分离的心肌细胞电压钳在-20mV,外部灌流并用对具有称 Na^+ 浓度的溶液进行内部透析(左图)。NKA电流通过从过灌流(右图)去除 K^+ 来测量。B)增加cAMP浓度对NKA电流的影响。*对于0cAMP, $p < 0.05$ 。来自2-5只大鼠的6-13个ARVM。C) 20 μM superAKAP对NKA电流的影响。来自2只大鼠的6-7个ARVM。*对于100 μM cAMP, $p < 0.05$ 。

[0079] 图2:PDE2调节NKA活性。A)三种不同的PDE2抑制剂对NKA电流的影响。来自3只大鼠的5-8个ARVM。将来自相对于Bay 60-7550的对照和相对于PF05180999的对照的NKA电流配对。*对于对照, $p < 0.05$ 。B) PDE2KO与WT小鼠的NKA电流。来自3只小鼠的7-8个肌细胞。*对于WT, $p < 0.05$ 。C) PDE3和PDE4抑制对NKA电流的影响。D)在用异丙肾上腺素和PDE抑制剂治疗后,在磷酸神经膜(PLM)上的ser68处的磷酸化。

[0080] 图3:NKA和PDE2共定位并相互作用。A-B)在ARVM中NKA和PDE2的邻近连接测定*对于不使用或仅使用单种抗体的实验, $p < 0.05$ 。C)在HEK293细胞中NKA和PDE2的共免疫沉淀。

[0081] 图4:PDE2抑制降低 Ca^{2+} 瞬变幅度和SR Ca^{2+} 负载。A)在ARVM中,Bay60-7550对 Ca^{2+} 瞬变幅度(左)(来自3只大鼠的12个ARVM)、 Ca^{2+} 挤出速率(中)(来自3只大鼠的12个ARVM)和SR Ca^{2+} 负载(右)(来自3只大鼠的11个ARVM)的影响。*对于对照, $p < 0.05$ 。B-C) Bay 60-7550对

Ca²⁺瞬变的代表性示踪(B),示踪示出典型的咖啡因反应(C)。D)在PDE2K0与WT中的Ca²⁺瞬变幅度(左)(来自3只小鼠的14-16个肌细胞)、Ca²⁺挤出速率(中间)(来自3只小鼠的14-16个肌细胞)和SR Ca²⁺负载(右)(来自3只小鼠的11-14个肌细胞)。*对于WT, $p < 0.05$ 。

[0082] 图5:PDE2抑制增加NCX依赖性Ca²⁺的挤出。A)示出用于测量主要Ca²⁺挤出蛋白的方案代表性示踪。B) Bay 60-7550对SERCA2活性(左)(来自3只大鼠的10个ARVM)、NCX活性(中)(来自3只大鼠的11个ARVM)和非-SERCA2/非-NCX Ca²⁺挤出(右)(来自2只大鼠的5个ARVM)的影响。*对于对照, $p < 0.05$ 。D)在PDE2K0与WT中, SERCA2活性(左)(来自3只小鼠的10-14个肌细胞)、NCX活性(中间)(来自3只小鼠的10-14个肌细胞)和S非-SERCA2/非-NCXCa²⁺挤出(右)(来自3只小鼠的4-5个肌细胞)。*对于WT, $p < 0.05$ 。D)用SBFI测量的细胞内Na⁺。代表性示踪(左)和平均数据(右)。来自3只大鼠的6个ARVM。

[0083] 图6:PDE2抑制对LTCC和RyR活性没有影响。A-B)用Bay 60-7550治疗的LTCC的代表性示踪(A)和平均数据(B)。来自3只大鼠的5个ARVM。C-D)用Bay 60-7550治疗的Ca²⁺闪烁频率的代表性示踪(C)和平均数据(D)。来自2只大鼠的6个ARVM。E)用Bay 60-7550的Na⁺电流的平均数据。来自3只大鼠的6-7个ARVM。

[0084] 图7:PDE2抑制可减少结扎后HF和AnkB^{+/+}的细胞心率失常。A)结扎后的HF(来自3只小鼠的6个心肌细胞)和SHAM(来自1只小鼠的2个心肌细胞)的肌细胞中用Bay 60-7550的NKA电流。*对于对照, $p < 0.05$ 。B) Bay60-7550对结扎后HF细胞中Ca²⁺瞬变幅度(左)(来自3只小鼠的11-12个心肌细胞)和Ca²⁺挤出速率(右)(来自3只小鼠的10-12个细胞)的影响。*对于对照, $p < 0.05$ 。C)从结扎后的HF肌细胞中检测Ca²⁺波的方案的代表性示踪。D)在从结扎后HF小鼠(来自3只小鼠的11-12个肌细胞)、ANKB^{+/+}小鼠(来自3只小鼠的18个肌细胞)和WT(AnkB^{+/+})小鼠(来自3只小鼠的11-13个心肌细胞)分离的肌细胞中的Ca²⁺波频率。*对于对照, $p < 0.05$ 。

[0085] 图8:PDE2抑制保护结扎后HF小鼠免受心室性心动过速和死亡。A)结扎后HF小鼠体内心律失常的方案。B)来自HF小鼠的代表性ECG示踪,示出VT(双向VT和多病灶VT)和窦性心律的实例。C)在HF小鼠中,用Bay60-7550的室性心动过速和死亡(左)以及QT时间(右)(在两组中n=5)。*对于载体, $p < 0.05$ 。D)在HF小鼠中用PF05180999的室性心动过速(左)和QT间期(右)(在两组中n=5)。

[0086] 图9:PDE2抑制作用保护AnkB^{+/+}小鼠免受室性心动过速。A)在AnkB^{+/+}小鼠体内心律失常的方案。B)在AnkB^{+/+}小鼠中,用Bay 60-7550的室性心动过速(左)和QT间期(右)(在两组中n=8)。*对于载体, $p < 0.05$ 。D)在AnkB^{+/+}小鼠中,用PF05180999的室性心动过速(左)和QT间期(右)(在两组中n=5)。*对于载体, $p < 0.05$ 。

[0087] 图10:PDE2抑制作用增加NKA电流,并通过cAMP的局部池预防细胞心率失常。A)平均数据(左)和代表性示踪(右)显示用Bay 60-7550治疗后(2只小鼠,每只小鼠重复2次),在小鼠心室肌细胞中总体细胞内cAMP水平。异丙肾上腺素用作阳性对照。B)在NKA和PKA催化位点与PKA RII之间的共免疫沉淀。C)用superAKAP/RIAD治疗后(3只大鼠的5-8个ARVM)用EHNA的NKA电流。*对于RIAD, $p < 0.05$ 。D)在用superAKAP预治疗后,来自结扎后的HF小鼠(来自3只小鼠的10-14个心肌细胞)和AnkB^{+/+}小鼠(来自2只小鼠的10-13个心肌细胞)的用Bay 60-7550的肌细胞中的Ca²⁺波。*对于superAKAP, $p < 0.05$ 。

[0088] 图11:在用superAKAP预治疗后,在结扎后的HF小鼠和AnkB^{+/+}小鼠中,PDE2的抑制

作用不再保护其免于室性心动过速。A) 在结扎后的HF小鼠和用Bay 60-7550和superAKAP/乱序物的AnkB^{+/-}小鼠的体内心律失常的方案。B) HF小鼠的用Bay 60-7550和superAKAP/乱序物的室性心动过速(左)和QT间期(右)(在两组中n=6)。* = 对于载体, p<0.05。D) 在AnkB^{+/-}小鼠中, 用Bay 60-7550和superAKAP/乱序物的室性心动过速(左)和QT间期(右)(在两组中n=5)。

[0089] 图12: 提出的NKA的局部PDE2调节机制。A) 我们提出PDE2和NKA组装在一个公共域中, 其中PDE2局部调节cAMP水平和AKAP结合的PKA-RII活性。PKA-RII使磷酸神经膜磷酸化, 这调节NKA活性。B) 用superAKAP, 它破坏来自AKAP的PKA-RII, PDE2不再能够调节NKA。

[0090] 图13: 在人心脏肥大和衰老以及在结扎后HF的大鼠中PDE2-mRNA表达增加。来自分离和分类的心肌细胞核的mRNA测序数据。

[0091] 图14: PDE2抑制可保护结扎后的HF小鼠免受室性心动过速。在HF小鼠中具有历史对照(n=15)、ND-7001(n=5)和LuAF64280(n=3)的室性心动过速。* = 对于对照, p<0.05。

[0092] 图15: 在预防Ca²⁺诱发的室性心律失常方面, PDE2抑制优于β-阻断剂, A) 在AnkB^{+/-}小鼠中进行慢性基准测试研究的方案。B) 在四个治疗组中ECG记录的代表性示踪。C) 示出在四个治疗组中存在室性快速性心律失常和室性心动过速的平均数据。对照11只小鼠, 美托洛尔15只小鼠, Bay 60-7550 13只小鼠, Bay 60-7550+美托洛尔15只小鼠。D) 在四个治疗组中注射治疗剂(左)或咖啡因(右)的QT时间。* = p<0.05。

[0093] # = p<0.01。

[0094] 图16: PDE2抑制RyR活性无影响。A) 在场刺激的ARVM中, PDE2抑制对Ca²⁺闪烁频率、Ca²⁺瞬变幅度和SR Ca²⁺负载的代表性示踪和平均数据。来自3只大鼠的18个ARVM。

[0095] * = 对于对照, p<0.05。B) 在非刺激的ARVM中, PDE2抑制对Ca²⁺闪烁频率和SR Ca²⁺负载的代表性示踪和平均数据。来自3只大鼠的19个(Bay60-7550)和22个(对照)ARVM。C) 在皂苷渗透的ARVM中, PDE2抑制对Ca²⁺闪烁频率的代表性示踪和平均数据。来自3只大鼠的25个(Bay 60-7550)和24个(对照)ARVM。

[0096] 图17: PDE2抑制对其他抗心律失常目标没有影响。A) PDE2抑制对LTCC的影响。来自3只大鼠(两组)的8个(对照)和10个(Bay 60-7550)ARVM。B) PDE2抑制对来自3只大鼠的7个(两组)ARVM背景K⁺电流的影响。C) PDE2抑制对Na⁺电流的影响。来自3只大鼠的7个(对照)和8个(Bay 60-7550)ARVM。D) PDE2抑制对动作电位持续时间的影响。* = 相对于对照, p<0.05。

[0097] 图18: PDE2抑制保护CPVT小鼠免受室性心动过速。在CPVT小鼠中具有对照(n=6)和Bay 60-7550(n=7)的室性心动过速。* = 相对于对照, p<0.05。

[0098] 实例

[0099] 实例1

[0100] 进行以下方法以证明磷酸二酯酶2A抑制激活Na⁺/K⁺-ATP酶并预防室性心动过速。

[0101] 方法:

[0102] 动物模型

[0103] 根据美国国家卫生研究院(US National Institutes of Health)公布的实验动物护理和使用指南(Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)中的建议进行所有动物研究(NIH公开第85-23号, 1996年revised)。项目批准是由挪威国家动物研究委

员会授予的(FDU 2146、7016和7040)。将~300g体重的雄性Wistar大鼠(丹麦Møllegaard)在空调房间中12:12h的昼夜循环每个笼子存储两只,并随意获取食物和水。将小鼠在相似的条件存储,并且每个笼子最多允许六只小鼠。在C57BL6/J小鼠中,通过标准的升主动脉缩窄术进行主动脉结扎,并示踪小鼠14-16周。如先前所述,通过超声心动图和验尸检查证实充血性心力衰竭的发生(Aronsen, J.M.等人,基于磁共振成像和超声心动图的心脏功能障碍程度,对梗死后大鼠进行了非侵入性分层(Noninvasive stratification of postinfarction rats based on the degree of cardiac dysfunction using magnetic resonance imaging and echocardiography)《美国生理学杂志-心脏与循环生理学(American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology)》,2017.312(5):H932-H942)。按先前的描述饲养锚蛋白B^{+/-}小鼠(Mohler, P.J.等人,锚蛋白-B突变导致4型长-QT心律失常和心源性猝死(Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death)《自然(Nature)》,2003.421(6923):634-9)。条件性基因敲除PDE2A小鼠与 α -MHC MerCreMer小鼠杂交,并用于用如先前所描述的方法测试PDE2A的心肌细胞特异性作用(Hougen, K.等人,Cre-loxP DNA重组是Tg(α MHC-MerCreMer)小鼠可能只有最小的非特异性转录变化且无心肌病(Cre-loxP DNA recombination is possible with only minimal unspecific transcriptional changes and without cardiomyopathy in Tg(α MHC-MerCreMer)mice)《美国生理学杂志-心脏与循环生理学》,2010.299(5):H1671-H1678)。

[0104] 细胞分离

[0105] 在4%异氟醚、65%N₂O和31%O₂中麻醉雄性Wistar大鼠,并在2%异氟醚、66%N₂O和32%O₂下进行插管和通气。通过消除疼痛反射证实深层手术麻醉。静脉内给药150IE肝素以预防切除术后血栓形成。切下心脏并立即在4℃的0.9%NaCl中冷却。在具有用缓冲液A(以mM计:Hepes 25、NaCl 130、KCl 5.4、NaH₂PO₄ 0.4、MgCl₂ 0.5、D-葡萄糖22,pH 7.4)的经改良的Langendorff装置中在37℃下对主动脉进行插管并逆行灌注冠状动脉2-4分钟,然后用含有0.8g/L胶原蛋白酶II(美国沃辛顿生物化学公司(Worthington Biochemical Corporation,USA))和6.7 μ M CaCl₂的缓冲液A 18-22分钟。在将LV切成小块(在添加了500 μ L 2%BSA的8-10mL灌注液中)之前,去除心房和右心室游离壁,并通过用巴斯德移液管小心移液1min进行机械分离。通过尼龙网(200 μ m,Burmeister, Lørenskog,挪威)过滤心肌细胞悬液,并在室温下沉降。沉淀后(~5min),立即除去上清液。对于单细胞实验和生成用于cAMP的测量原代培养物,心肌细胞在含有1) 0.1%BSA和0.1mM CaCl₂, 2) 0.1%BSA和0.2mM CaCl₂,和3) 0.05%BSA和0.5mM CaCl₂的缓冲剂A中洗涤三次。为了产生用于邻近连接测定的原代培养物,将心肌细胞在具有降低的BSA浓度(0.1%、0.05%和0%)的缓冲液A中洗涤三次。

[0106] 在假或AB操作之后基于如最近描述的类似方案从PDE2缺陷型小鼠、锚蛋白^{+/-}小鼠和C57BL6/J小鼠分离左心室肌细胞(Ackers-Johnson, M.等人,用于从成年小鼠心脏同时分离活的心脏肌细胞和非心肌细胞的简化无兰根道尔夫氏方法(A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes From the Adult Mouse Heart)《循环研究》,2016.119(8):909-20)。将小鼠在5%异氟醚和95%O₂的组合中麻醉,并通过5%异氟醚和95%O₂的组合防护罩通风。通

过消除疼痛反射证实深层手术麻醉。打开胸腔,切下降主动脉和下腔静脉。将具有5mM EDTA的7mL缓冲液A注入右心室。此后,将主动脉夹住并切除心脏。在2至5min内,将10mL缓冲液,然后将3mL没有EDTA的缓冲液注入左心室。然后在~20min内将含有0.8mg/mL胶原蛋白酶II的预热溶液A注入左心室。去除心房和右心室,并且其余程序与上文基于兰根道尔夫氏分离描述的程序类似。

[0107] 邻近连接测定

[0108] 将分离的心肌细胞在室温下于PBS中洗涤两次,转移至4%多聚甲醛(PFA)中并轻轻摇动30min,然后在PBS中再次洗涤两次。接下来,将心肌细胞悬液转移到0.8cm²的孔中,每个孔涂布有8μg层粘连蛋白(英杰(Invitrogen)),并在37℃下培育2h。PBS被于PBS中0.1%Triton X100替换,并且在37℃下培育10min。然后根据制造商的方案用Duolink II专用系统(0link Bioscience,瑞典乌普萨拉)进行邻近连接测定(Soderberg,0.等人,通过邻近连接原位直接观察单个内源蛋白复合物(Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation)《自然方法(Nat Methods)》,2006.3(12):995-1000)。

[0109] 在Zeiss LSM 710共聚焦显微镜上扫描心肌细胞(通过MBS 488/543双向色镜激发543nm HeNe激光,在565-589nm处收集发光)。使用ImageJ 1.44p软件(<http://imagej.nih.gov/ij>)通过测量全细胞平均灰度值来分析单细胞细胞内荧光强度。校正了背景荧光信号的结果。

[0110] 全细胞电压钳实验

[0111] 使用Axoclamp 2B或2A放大器和pCLAMP软件(两者均为美国加利福尼亚州福斯特市Axon仪器(Axon Instruments,Foster City,CA,USA))在分离的心肌细胞中进行全细胞连续电压钳。在分析之前,信号以10kHz采样并用低通滤波器滤波。在实验期间和实验之间,所有放大器和程序设置均保持恒定。在37℃下对细胞进行灌流,并且将灌流系统布置为可快速切换溶液。

[0112] NKA电流:

[0113] 宽尖膜片移液管(1.5-2.5MΩ)填充有内部溶液(以mM计,根据以下修改Despa,S.和D.M.Bers,Na/K泵电流和[Na]⁺(i)在兔心室肌细胞中:局部[Na]⁺(i)消耗和Na缓冲(Na/K pump current and[Na]⁺(i) in rabbit ventricular myocytes:local[Na]⁺(i) depletion and Na buffering)《生物物理杂志(Biophys J)》,2003.84(6):4157-66.:NaCl 17、KCl 13、K-天冬氨酸85、TEA-Cl 20、HEPES 10、MgATP 5、MgCl₂ 0.7(游离Mg²⁺~1.0mM,使用斯坦福Maxchelator)、BAPTA 3、CaCl₂ 1.15(游离Ca²⁺150nM),pH=7.2(用KOH调节)。到达全细胞接入后,将细胞在-20mV透析至少4分钟。在其余实验中的保持电位为-20mV。在大多数细胞中,串联电阻为3-6MΩ,并且丢弃任何串联电阻>9MΩ的细胞。

[0114] 将细胞在溶液A(mM)中成膜片:NaCl 140、Hepes 5、KCl 5.4、CaCl₂ 1、MgCl₂ 0.5、D-葡萄糖5.5和NaH₂PO₄ 0.4。将pH调节到7.4。到达全细胞接入后,细胞用溶液B灌流(以mM计):N-甲基-D-葡萄糖胺108、NaCl 17、D-葡萄糖10、HEPES 5、KCl 15、NiCl₂ 5、BaCl₂ 2、MgCl₂ 1,pH调节到7.4HCl。在实验当天将5μM cAMP和肽(1或20μM superAKAP或1μM RIAD)添加到内部溶液中。NKA电流是通过迅速去除细胞外KCl(用等量的TrisCl代替)引起的。使用具有对称的Na⁺浓度的溶液(即,在灌流和内部溶液中相同浓度的Na⁺)'以便减少细胞内Na

⁺梯度对NKA电流的影响。在实验当天,将100nM Bay 60-7550、100nM PF05180999或10 μ M EHNA添加到灌流中,以测量PDE2抑制对NKA电流的影响。执行配对和非配对记录,但在一个数据集中保持一致。在配对的记录中,在同一个细胞中测量在对照条件下和用PDE2抑制剂期间的NKA电流,但在记录之间具有至少5分钟。我们轮流选择一个细胞中第一个记录的NKA电流是否用PDE2抑制剂,以最小化任何不希望的时间依赖性影响。NKA电流与细胞电容有关,以解决细胞大小的差异。

[0115] L型Ca²⁺电流(LTCC):

[0116] 宽尖膜片移液管(1.4–1.8M Ω)填充有内部溶液(以mM计,根据以下修改:Leroy,J.等人,磷酸二酯酶4B在心脏L型Ca(2)(+)通道中复合调节Ca(2)(+)电流保护小鼠免受室性心律失常(Phosphodiesterase 4B in the cardiac L-type Ca(2)(+) channel complex regulates Ca(2)(+) current and protects against ventricular arrhythmias in mice)《临床研究杂志(J Clin Invest)》,2011.121(7):2651–61;CsCl 122、HEPES 10、MgATP 10、MgCl₂ 0.7(游离Mg²⁺~0.6mM)、Na₂磷酸二肌酐5、EGTA 10、CaCl₂ 0.2(游离Ca²⁺ 3nM),pH 7.2(用CsOH)。在所有记录中,串联电阻在4–8M Ω 之间。保持电位为–45mV,Ca²⁺瞬变由在0.125Hz下从–45到0mV的100ms方压阶跃触发。细胞在溶液A中成膜片,但是在到达全细胞接入之后,应用溶液C(以mM计,根据以下修改:Leroy,J.等人,磷酸二酯酶4B在心脏L型Ca(2)(+)通道中复合调节Ca(2)(+)电流保护小鼠免受室性心律失常《临床研究杂志》,2011.121(7):2651–61;NaCl 118、CsCl 20、D-葡萄糖5、MgCl₂ 1.8、HEPES 10、NaH₂PO₄ 0.8、CaCl₂ 1.8,pH 7.4(用NaOH)。在开始记录之前,使内部溶液平衡至少4分钟。在LTCC完全稳定之前不开始录制。对照记录和用Bay 60-7550的记录在同一细胞中进行。

[0117] Na⁺电流:

[0118] 低电阻移液管(1.4–2.5M Ω)填充有内部溶液(以mM计,根据以下修改:Leroy,J.等人,磷酸二酯酶4B在心脏L型Ca(2)(+)通道中复合调节Ca(2)(+)电流保护小鼠免受室性心律失常《临床研究杂志》,2011.121(7):2651–61;CsCl 122、HEPES 10、MgATP 5、MgCl₂ 0.7(游离Mg²⁺~0.6mM)、Na₂磷酸二肌酐5、EGTA 10、CaCl₂ 0.2(游离Ca²⁺ 3nM),pH 7.2(用CsOH)在所有记录中,串联电阻在4–7.5M Ω 之间。细胞在溶液A中成膜片;但是到达在全细胞接入之后,应用溶液D:N-甲基-D-葡萄糖胺125、NaCl 10、CsCl 5、D-葡萄糖5、MgCl₂ 1.2、HEPES 10、NiCl₂ 5,pH 7.4(用CsOH)。在实验当天添加20 μ M硝苯地平以抑制L型Ca²⁺通道。保持电位为–80mV。Na⁺电流以不连续模式(切换速率9kHz)通过在1Hz下施加从–80mV到–10mV的保持电位的50ms方压阶跃来测量。通过对称的Na⁺溶液和低串联电阻可维持良好的电压控制。在这些实验之前,运行具有–10mV增量步长(在–70mV到+50mV的范围内(均从–80mV保持电位))的多步方案,以确定产生最大峰值电流的测试电位,在对照和Bay 60-7550之间没有差异。在开始记录之前,使内部溶液平衡至少4分钟。在Na⁺电流完全稳定之前,不开始记录。对照记录和用Bay 60-7550的记录大多在分开的细胞中执行。然而,在细胞的子集中,对照和Bay 60-7550在同一细胞中记录。

[0119] 场刺激实验

[0120] 全细胞Ca²⁺瞬变:

[0121] 在装有5 μ M Fluo4-AM的场刺激的心肌细胞中记录Ca²⁺瞬变10–15分钟(美国尤金的分子探针公司(Molecular Probes,Eugene,USA)),然后进行5分钟去酯化。在同一个细胞

(大鼠心室肌细胞)或PDE2K0或WT心室肌细胞中用或不用100nM Bay 60-7550的情况下执行实验。在用肽的实验中,将心肌细胞用1 μ M TAT结合肽(superAKAP或相应的乱序肽)培育20分钟。在记录在期间,然后用含有相同肽的溶液A灌流肌细胞。

[0122] 用Cairn Research Optoscan单色仪(激发485nm,长波发射515nm)(英国Faverham的Cairn Research Ltd.)获得细胞荧光。在每个实验后获得无细胞荧光,并从示踪中减去以校正背景荧光。在开始记录之前,在0.5Hz下刺激细胞至少3分钟,或直到Ca²⁺瞬变稳定。丢弃没有稳定的Ca²⁺瞬变(基线和Ca²⁺峰值水平)的细胞。然后停止场刺激,并添加短暂脉冲的10mM咖啡因。SR Ca²⁺含量记录为咖啡因引起的Ca²⁺瞬变的峰值。在灌流中添加10mM Ni²⁺以阻断NCX活性后,进行相同的实验。通过从常规的瞬变(τ)、咖啡因瞬变(τ_{caff})和用Ni²⁺的咖啡因瞬变(τ_{Ni})的Ca²⁺挤出相的单指数拟合获得 τ 值。SERCA2速率常数计算为场刺激的Ca²⁺瞬变和咖啡因引起的Ca²⁺瞬变的速率常数之间的差(Trafford, A.W., M.E. Diaz和D.A. Eisner, 在咖啡因产生的收缩Ca瞬变的瞬变刺激期间肌质网Ca含量和肌膜通量的测量(Measurement of sarcoplasmic reticulum Ca content and sarcolemmal fluxes during the transient stimulation of the systolic Ca transient produced by caffeine)《纽约科学院年鉴(Ann N Y Acad Sci)》,1998.853:368-71),而 τ_{caff} 解释为在不存在任何 τ_{Ni} 的差的情况下通过NCX的Ca²⁺挤出。

[0123] 用于检测细胞性心律失常的方案:

[0124] 在每次刺激频率后停止刺激15秒钟之前,将从结扎后HF小鼠、AnkB^{+/-}小鼠和WT(AnkB^{+/+})的分离的心室肌细胞在0.5Hz下预处理3min,在1Hz下预处理1分钟。在如先前描述的停顿期间检测Ca²⁺波和/或自发收缩(Aronsen, J.M., 等人, 低血钾症通过降低Na(+), K(+)-ATP酶 α 2活性引起在心室肌细胞中Ca(2+)过载和Ca(2+)波(Hypokalaemia induces Ca(2+) overload and Ca(2+) waves in ventricular myocytes by reducing Na(+), K(+)-ATPase α 2 activity)《生理学杂志(J Physiol)》,2015.593(6):1509-21)。纳入标准为棒状和横纹状心肌细胞,并且在电刺激前10秒通过目测检查无Ca²⁺波。在用或不用100nM Bay60-7550的情况下记录细胞心律失常。在实验的子集中,用100nM Bay 60-7550和与1 μ M TAT结合乱序肽或superAKAP检测细胞性心律失常。在用肽的实验中,在方案开始前,将细胞与肽一起培育20分钟。

[0125] 全细胞Na⁺测量:

[0126] 为了测量胞质Na⁺浓度,在0.05%Pluronic F-127的存在下,在室温下将分离的大鼠心室肌细胞装入10 μ M SBFI中120分钟,然后进行20分钟的去酯化。用光电倍增管(美国新泽西州Photon Technology International)在用溶液A灌流并且在0.5Hz下场刺激的肌细胞中检测SBFI比率。如先前描述使用单激发(340nm)和双比率发射(410nm/590nm)(Baartscheer, A., C.A. Schumacher和J.W. Fiolet, 以发射率模式用SBFI测量在大鼠心室肌细胞中胞质钠的小变化(Small changes of cytosolic sodium in rat ventricular myocytes measured with SBFI in emission ratio mode)《分子和细胞心脏病学杂志(J Mol Cell Cardiol)》,1997.29(12):3375-83)。在开始记录之前(通常为10分钟),在1Hz下采样信号并使其稳定。应用100nM Bay 60-7550以研究PDE2抑制对胞质Na⁺的作用。

[0127] 通过将细胞用含有0和20mM Na⁺的溶液灌流来校准每个细胞。在此范围内,假定SBFI信号与细胞内Na⁺水平是线性的,如先前所描述(Despa, S. 等人, 在大鼠和兔心室肌细

胞中细胞内 $[Na^+]$ 和 Na^+ 泵率(Intracellular $[Na^+]$ and Na^+ pump rate in rat and rabbit ventricular myocytes)《生理学杂志》,2002.539(Pt 1):133-43)。制备两种不同的校准溶液,并将它们混合以达到所需的 Na^+ 浓度。两种校准溶液均包含(以mM计)短杆菌肽0.01、哇巴因0.1、Hepes 5、葡萄糖5.5、EGTA 2,用TrisBase调节到pH 7.2。具有 $145Na^+$ 的校准溶液还包含(以mM计):葡糖酸Na 115、NaCl 30、KCl 0。具有 $145K^+$ 的校准溶液包含(以mM计):葡糖酸K115、KCl 30、NaCl 0。

[0128] 共焦 Ca^{2+} 测量:

[0129] 用共焦显微镜(Zeiss LSM Live7)以线扫描模式记录 Ca^{2+} 闪烁,如先前所描述(Louch,W.E.等人,在心肌梗死后在鼠心肌细胞中T-小管结构紊乱和 Ca^{2+} 释放的同步性降低(T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca^{2+} release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction)《生理学杂志》,2006.574(Pt 2):519-33)。简单地说,跨细胞纵向绘制512像素线,扫描时间为1.5ms。紧接在终止刺激之后记录 Ca^{2+} 闪烁之前,在1Hz下场刺激大鼠心室肌细胞3分钟。几秒钟后,应用10mM咖啡因来测量SR Ca^{2+} 负载。 Ca^{2+} 闪烁频率与SR Ca^{2+} 负载有关,以防止负载依赖性对闪烁频率的影响。在用和不用Bay60-7550的情况下,在同一细胞中测量 Ca^{2+} 闪烁。使用ImageJ(NIH)中的SparkMaster检测和分析 Ca^{2+} 闪烁(Picht,E.等人,SparkMaster:用ImageJ进行自动钙闪烁分析(SparkMaster:automated calcium spark analysis with ImageJ)《美国生理学-细胞生理学期刊(Am J Physiol Cell Physiol)》,2007.293(3):C1073-81)。

[0130] 心律失常的体内记录

[0131] 在4%异氟醚、65% N_2O 和31% O_2 中麻醉结扎后的HF小鼠、 $AnkB^{+/-}$ 小鼠和WT($AnkB^{+/+}$)小鼠,并在2%异氟醚、66% N_2O 和32% O_2 下进行通气。通过消除疼痛反射证实深层手术麻醉。每隔一只小鼠被随机分配到一个治疗组中,而另一只则被分配到另一组中。努力确保在一次比较中使用同窝对照(例如媒剂与Bay 60-7550)。通过将小鼠肢体附着到手术台上内置的ECG电极上进行单导ECG记录,将所述手术台预热到40℃以维持稳定的体温。在整个方案期间,通过VEVO2100软件(加拿大多伦多Visualsonics)连续记录ECG,并且未过滤信号。在开始方案之前,记录基线ECG3-5分钟,并且极少数情况下小鼠在此期间出现心室期外收缩,将它们排除在外,并在药物注射之前停止方案。小鼠首先腹膜内注射(i.p.)Bay 60-7550或媒剂(3mg/kg)或PF05180999(1mg/kg),使其工作10分钟(Vettel,C.等人,磷酸二酯酶2保护免受儿茶酚胺诱发的心律失常,并保留心肌梗塞后的收缩功能《循环研究》,2017.120(1):120-132),然后第一次注射咖啡因(120mg/kg i.p.)。在用肽的实验中,i.p.注射5mM(通过假定肽在人体液相中的自由分布计算,所述人体液相假定为人体的总重量的0.7)的TAT结合superAKAP或乱序肽5分钟后注射咖啡因。在用 $AnkB^{+/-}$ 小鼠的实验中,第一次注射后10分钟,第二次i.p.注射咖啡因(120mg/kg i.p.)。再方案结束后,通过切除心脏处死动物,获得肺和心脏的重量,并将左心室转移到Eppendorf管中,并立即移动到液氮中并存储在-80℃下。在整个方案期间记录ECG。使用VEVO软件分析ECG。

[0132] 用于免疫印迹的心肌细胞裂解物的制备

[0133] 将具有10mM BDM的非无菌溶液A预热到37℃,并在塑料孔中用在溶液A/BDM中的4%层粘连蛋白涂布1小时。如上所描述分离大鼠心室肌细胞,再悬浮于溶液A/BDM中,铺在层粘连蛋白涂布的孔中,并在37℃下培育1小时。然后将细胞在溶液A/BDM中轻轻洗涤,并再

次在37℃下培育1小时。然后如所示添加肽、异丙肾上腺素或抑制剂,并使其平衡10分钟。最后,在热(90℃-100℃)裂解缓冲液(1%SDS、2mM Na_3VO_4 、10mM Tris-HCl、10mM NaF、 dH_2O , pH 7.4)中收集细胞,转移到液氮并且在-80℃存储下

[0134] 免疫沉淀

[0135] 将来自HEK293转染的细胞的裂解物与抗体一起培育2小时,然后在4℃下过夜添加50μL蛋白A/G PLUS琼脂糖珠(sc-2003,圣克鲁兹生物技术(Santa Cruz Biotechnology))。将免疫络合在冷的IP缓冲液(20mM HEPES, pH 7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、1%Triton X-100),在4℃下在3000g下离心1分钟,在SDS负载缓冲液中煮沸,并通过免疫印迹分析。未用FLAG-PDE2转染的HEK293细胞用于对照。

[0136] 免疫印迹

[0137] 在印迹到PVDF膜上之前,在4%-15%或15%SDS-PAGE上分析免疫沉淀。在室温下, PVDF膜和肽膜将在TBST中的1%酪蛋白或5%牛奶中阻挡60min,然后在4℃下与一级抗体一起培育过夜,在TBS-T中洗涤三次10min并且与HRP-结合一级或二级抗体一起培育。将印迹在ECL Prime(通用电气医疗集团(GE Healthcare), RPN2232)中培育,并通过LAS-4000(日本东京富士胶片(Fujifilm, Tokyo, Japan))检测化学发光信号。

[0138] 抗体

[0139] Ser68-PLM是William Fuller的礼物。在来自HEK293细胞的免疫沉淀中,使用抗FLAG和抗GFP印迹FLAG-PDE2和GFP-NKA。在邻近连接测定实验中使用PDE2和NKA α_1 抗体。

[0140] cAMP测量

[0141] 将成年小鼠的心室肌细胞用含有GloSensor(美国普洛麦格(Promega, United States))的5型腺病毒转染,并在cAMP测量之前使其培育48小时。传感器与cAMP结合,并在与cAMP结合时发出与cAMP水平成比例的光信号。

[0142] 核分离与分选/mRNA测序

[0143] 如先前描述进行核分离/分选和mRNA测序(Thienpont, B. 等人, H3K9二甲基转移酶EHMT1/2保护免受病理心脏肥大(The H3K9 dimethyltransferases EHMT1/2 protect against pathological cardiac hypertrophy)《临床研究杂志》, 2017.127(1):335-348)。

[0144] 统计

[0145] 数据以平均值±S.E表示。对于电压钳和场刺激实验,我们使用双尾学生t检验,而在所有关于细胞和体内心律失常的实验中均采用了Fisher精确检验。 $p < 0.05$ 被认为是显著的。

[0146] 结果

[0147] PDE2调节NKA活性

[0148] 我们进行电压钳方案,其中将分离的大鼠心室肌细胞暴露于对称浓度的 Na^+ (即在灌流和内部溶液中类似的 Na^+ 浓度),以减少细胞内 Na^+ 梯度的不希望的影响。在去除饱和浓度的细胞外 K^+ (从15mM到0mM [K^+])后,将NKA电流测量为 K^+ -敏感电流(见图1A)。NKA电流以浓度-响应-依赖性方式增加(图1B),而高剂量的superAKAP破坏来自AKAP的PKA-RI和PKA-RII(Gold等人, AKAP对PKA调节亚基的特异性的分子基础(Molecular basis of AKAP specificity for PKA regulatory subunits)《分子细胞(Mol. Cell.)》2006Nov 3;24(3):383-95)减小NKA电流(图1C)。这表明NKA活性受cAMP的局部调控,并且通过抑制cAMP降解的

磷酸二酯酶PDE2-4来增加cAMP可能会增加NKA电流,这是我们接下来要测试的。

[0149] 用三种不同的药理学抑制剂(EHNA、PF05180999和Bay 60-7550)的PDE2抑制强烈增加NKA电流(图2A),而用西洛酰胺的PDE3抑制或用咯利普兰的PDE4抑制均没有可检测的影响(图2C)。我们还发现在PDE2缺陷小鼠模型中NKA电流增加(图2B),进一步加强了PDE2调节NKA活性的发现。

[0150] 与功能记录一致,我们还发现在抑制PDE2之后,在其PKA磷酸化的主要位点丝氨酸68上,磷酸神经膜(PLM)的磷酸化增加。我们还发现随着PDE4抑制,PLM ser-68磷酸化增加,而不存在PDE3抑制作用(图2D)。

[0151] PDE2和NKA共同定位和相互作用

[0152] PDE2似乎是调节NKA活性的主要cAMP-PDE。如果PDE2通过局部调节作用调节NKA,那么此相互作用可靶向专门用于治疗目的。为了研究PDE2和NKA是否位于同一细胞内隔室,我们进行邻近连接测定(Duolink®),其用于用30-40nm分辨率检测在蛋白质之间的细胞内共定位(Soderberg, O.等人,通过邻近连接原位直接观察单个内源蛋白复合物《自然方法》,2006.3(12):995-1000)。在图3A中的亮点(右图)表明在PDE2和NKA之间在完整的大鼠心室肌细胞中共定位,而其他图像为阴性对照。图3B显示光点的定量,当存在NKA和PDE2抗体时,右边的三个条形图显示出更高水平的光点。然后,我们单独在HEK293细胞中共表达FLAG标记的PDE2和GFP标记的NKA或GFP-NKA,和免疫沉淀的FLAG。当与FLAG-PDE2共表达时,用GFP标记的NKA的水平更高,这示出PDE2和NKA共免疫沉淀(图3C)。这些结果指示,PDE2和NKA在细胞中共定位,为提出通过PDE2局部调节NKA活性的提供结构基础。

[0153] PDE2抑制降低Ca²⁺瞬变幅度和SR Ca²⁺负载

[0154] 已示出PDE2调节NKA活性并与NKA共定位,我们接下来想研究PDE2是否影响在心室肌细胞中的Ca²⁺体内平衡。首先,我们测量在Fluo4-AM负载,场刺激的大鼠心室肌细胞中的Ca²⁺瞬变,并且我们观察到在应用Bay 60-7550之后,Ca²⁺瞬变幅度减小而对Ca²⁺挤出速率没有更改(图4A-B)用咖啡因的快速脉冲测量SR Ca²⁺负载(图4C),并且根据观察到的Ca²⁺瞬变幅度降低,我们发现在PDE2抑制之后SR Ca²⁺负载降低(图4A,右图)。我们还在来自PDE2KO小鼠的分离的心室肌细胞中进行相同的实验,我们发现类似的结果,其中Ca²⁺瞬变幅度和SR Ca²⁺负载降低,而对Ca²⁺挤出速率没有影响(图4D)。

[0155] PDE2抑制增加NCX介导的Ca²⁺挤出

[0156] 在PDE2抑制之后,Ca²⁺瞬变幅度和SR Ca²⁺负载的减少可通过在心室肌细胞中主要Ca²⁺处置蛋白(即L型Ca²⁺通道、RyR、NCX、SERCA)或非SERCA/非NCXCa²⁺挤出蛋白(PMCA和线粒体单向转运体)的活性改变来解释。为了阐明PDE2抑制后各种Ca²⁺处置蛋白在Ca²⁺体内平衡中的作用,我们进行一系列实验,其中我们测量其在应用Bay 60-7550之后的活性。我们发现在PDE2抑制后,对大鼠心室肌细胞中的SERCA功能或非SERCA/非-NCX活性没有任何影响,而通过NCX的Ca²⁺挤出显著增加(图5A-B)。在PDE2KO小鼠中进行的实验中也发现了相同的模式,通过NCX的Ca²⁺挤出增加以及SERCA和非-SERCA/非-NCX Ca²⁺处置蛋白的活性未改变(图5C)。改变的NKA活性可通过局部或总体的Na⁺的改变影响NCX活性(Despa, S., J.B.Lingrel和D.M.Bers,在心脏肌细胞中Na⁺/K⁺)-ATP酶α2-异构体优选地调节Ca²⁺瞬变和肌质网Ca²⁺释放(ATPase α2-isoform preferentially modulates Ca²⁺ transients and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in cardiac myocytes)《心血

管研究 (Cardiovasc Res) 》,2012.95 (4) :480-6) ,但我们无法使用SBFI来检测总体细胞内 Na^+ 的任何差异(图5D) ,表明涉及局部 Na^+ 梯度。

[0157] 在电压钳的大鼠心室肌细胞中,我们发现PDE2抑制对L型 Ca^{2+} 电流(图6A-B) 或 Na^+ 电流(图6E) 没有任何影响。我们还在共聚焦显微镜上使用线扫描模式测量在Fluo4-AM-负载的大鼠心室肌细胞中的 Ca^{2+} 闪烁,并且显示在对照和PDE2抑制之间 Ca^{2+} 闪烁频率没有差异,表明未改变RyR活性(图6C-D) 。

[0158] 因此,PDE2抑制导致NKA电流增加,通过NCX的 Ca^{2+} 挤出增加, Ca^{2+} 瞬变幅度和SR Ca^{2+} 负载降低,并且这些结果与以下推理相一致:1) NKA活性增加导致局部细胞内 Na^+ 减少,2) 和减少的细胞内 Na^+ 增加通过NCX进行 Ca^{2+} 外排的驱动力,这意味着更多的 Ca^{2+} 通过NCX从肌细胞中挤出,3) 最后,通过NCX的更多的肌膜 Ca^{2+} 挤出意指较少的 Ca^{2+} 可用于通过SERCA进行细胞内 Ca^{2+} 循环,其最终效果是将 Ca^{2+} 从细胞中去除,产生较小的 Ca^{2+} 瞬变和较小的SR Ca^{2+} 负载。

[0159] PDE2抑制预防细胞性心动过速

[0160] Ca^{2+} 过载是心律失常的公认的原因 (Pogwizd, S.M. 和 D.M. Bers, 在心力衰竭中触发心律失常的细胞基础 (Cellular basis of triggered arrhythmias in heart failure) 《心血管医学发展趋势 (Trends Cardiovasc Med) 》,2004.14 (2) :61-6; 和 Kranias, E.G. 和 D.M. Bers, 钙和心肌病 (Calcium and cardiomyopathies) 《亚细胞生物化学 (Subcell Biochem) 》,2007.45:523-37) 产生 Ca^{2+} 波 (Aronsen, J.M., 等人, 低血钾症通过降低 Na^+ 、 K^+ -ATP酶 α 2活性引起在心室肌细胞中 Ca^{2+} 过载和 Ca^{2+} 波《生理学杂志》,2015.593 (6) :1509-21) 和有害的继发效应 (Pezhouman, A. 等人, 低血钾诱发的心室颤动的分子基础 (Molecular Basis of Hypokalemia-Induced Ventricular Fibrillation) 《循环》,2015.132 (16) :1528-1537) ,并且相反,减少细胞内 Ca^{2+} 的药剂,如 Ca^{2+} 通道阻断剂可保护免于心律失常。心力衰竭为具有超大风险的室性心律失常的疾病 (Pogwizd, S.M. 和 D.M. Bers, 在心力衰竭中触发心律失常的细胞基础《心血管医学发展趋势》,2004.14 (2) :61-6, 而锚蛋白B综合征为引起4型长-QT综合征的遗传病 (Mohler, P.J. 等人, 锚蛋白-B突变导致4型长-QT心律失常和心源性猝死《自然》,2003.421 (6923) :634-9) 。因为PDE2抑制降低 Ca^{2+} 瞬变幅度,因此我们假设PDE2抑制将防止心力衰竭小鼠和锚蛋白 $\text{B}^{+/-}$ 小鼠 (长QT综合征) 的心室肌细胞中的 Ca^{2+} 波。首先,我们证实PDE2抑制增加患有心力衰竭的结扎后小鼠的心室肌细胞中的NKA电流并减少了 Ca^{2+} 瞬变(图7A-B) 。我们从心力衰竭小鼠和锚蛋白 $\text{B}^{+/-}$ 小鼠 (长QT综合征) 的心肌细胞中检测到大量的 Ca^{2+} 波,但是用PDE2抑制, Ca^{2+} 波大大减少或消除(图7C-D) 。在WT小鼠 (锚蛋白 $\text{B}^{+/-}$ 小鼠同窝小鼠) ,在 Ca^{2+} 波频率方面没有差异,这正如期望考虑在对照条件期间 Ca^{2+} 波的低频(图7D, 右图) 。

[0161] 总之,在已知的心律失常模型中,PDE2抑制预防细胞性心动过速。

[0162] PDE2抑制预防心力衰竭和锚蛋白 $\text{B}^{+/-}$ 综合征 (长QT综合征) 的小鼠室性心动过速

[0163] 为了测试PDE2抑制是否预防体内室性心动过速,我们进行其中我们向麻醉结扎后HF小鼠和Ank $\text{B}^{+/-}$ 小鼠急性地注射120mg/kg咖啡因的方案 (Kannankeril, P.J. 等人, 具有R176Q心脏利阿诺定受体突变的小鼠呈现儿茶酚胺诱发的室性心动过速和心肌病 (Mice with the R176Q cardiac ryanodine receptor mutation exhibit catecholamine-induced ventricular tachycardia and cardiomyopathy) 《美国国家科学院院刊 (Proc

Natl Acad Sci U S A》, 2006.103 (32):12179-84) 并用单导ECG监测心律(在图8A和9A中概述的方案)。方案还在WT动物中测试, 其中一次咖啡因注射不足以引起心律失常(数据未示出), 而束结扎后的HF小鼠和AnkB^{+/-}小鼠均表现出室性心律失常。正常窦性心律和室性心动过速的实例如图8B所示, 并且我们观察到的典型室性心动过速是双向室性心动过速和多病灶室性心动过速。在用Bay 60-7550的实验中, 接受媒剂注射(对照)的心力衰竭小鼠中有5个中有4个(80%)发生了室性心动过速和心脏骤停, 而看到接受具有3mg/kg Bay 60-7550的注射的心力衰竭小鼠的此结果为5个中有0个(0%) (Vettel, C. 等人, 磷酸二酯酶2保护免受儿茶酚胺诱发的心律失常, 并保留心肌梗塞后的收缩功能《循环研究》, 2017.120 (1): 120-132) (图8C)。在Bay 60-7550组中的1只小鼠发生室性心律失常, 但并未明显发展为心脏骤停。在用PF05180999的实验中, 接受媒剂注射(对照)的心力衰竭小鼠中有5个中有4个(80%)发生了室性心动过速和心脏骤停, 而看到接受具有1mg/kg PF05180999的注射的心力衰竭小鼠的此结果为5个中有1个(20%) (图8D)。

[0164] 对于锚蛋白B^{+/-}小鼠(长QT综合征)的Bay 60-7550实验中, 在对照组(媒剂注射)中8个中有5个(63%)发生了室性心动过速(图8D)。此外, 2只小鼠发生了室上性心动过速(数据未示出)。相比之下, 干预组(Bay 60-7550注射)中, 8个中有0个(0%)发生了室性心动过速(图9C)或室上性心动过速(数据未示出)。在用PF05180999的实验中, 在对照组(媒剂注射)中, 5个中有5个(100%)发生了室性心动过速, 而用1mg/kg PF05180999的5个中有1个(20%)发生了室性心动过速(图9D)。

[0165] QT延长是室性心动过速的已知危险因素 (Osadchii, O.E., 低钾血症对豚鼠和兔子心脏的机电窗、激发波长和复极梯度的影响 (Impact of hypokalemia on electromechanical window, excitation wavelength and repolarization gradients in guinea-pig and rabbit hearts) 《科学公共图书馆综合卷 (PLoS One)》, 2014.9 (8): e105599)。我们观察到, 在结扎后的HF和AnkB^{+/-}小鼠中, 在媒剂组中, 从基线ECG到咖啡因注射后的QT间隔增加, 而Bay 60-7550和PF05180999组的QT间隔没有差异(图8C-D和9C-D, 右图)。

[0166] 概括地说, 我们发现PDE2抑制在已建立的心律失常小鼠模型中预防有害的室性心动过速和QT延长。这指出PDE2抑制是在各种临床环境中(例如在心力衰竭患者中)治疗心动过速的新目标。

[0167] NKA的PDE2调节取决于局部PKA-RII活性

[0168] 因为PDE2和NKA在完整的心室肌细胞中共定位, 所以一种有趣的可能性是NDE的PDE2调节取决于局部cAMP梯度和局部PKA活性。与此想法一致, 在用Bay 60-7550治疗后, 我们未检测到cAMP水平有任何总体升高或降低。我们使用异丙肾上腺素作为阳性对照, 并且应用20nM异丙肾上腺素大大提高cAMP水平(图10A)。建立低剂量的RIAD和superAKAP (1μM), AKAP结合的PKA-RI (RIAD) 和PKA-RII (superAKAP) 的高特异性破坏剂, 而更高浓度的superAKAP (20μM) 破坏PKA-RI和PKA-RII (Gold等人, AKAP对PKA调节亚基的特异性的分子基础, 《分子细胞》2006Nov 3; 24 (3): 383-95)。在将superAKAP (高剂量和低剂量) 透析到电压钳的心肌细胞后, PDE2抑制作用不改变NKA电流。然而, 在存在RIAD (PKA-RI破坏剂) 的情况下, PDE2抑制仍增加NKA电流, 这表明NKA的PDE2调节仅取决于AKAP结合的局部PKA-RII活性, 而不是PKA-RI (图10C)。我们还发现在NKAα2与PKA和PKARIIα上的催化位点之间的正的

co-IP (图10B), 这支持由NKA、PDE2和AKAP结合的PKA-RII组成的局部调节复合物的想法 (对于建议的模型参见图12)。

[0169] PDE2抑制的抗心律失常作用取决于AKAP结合的PKA-RII

[0170] 我们提出PDE2抑制通过调节局部cAMP池激活NKA并预防室性心律失常, 因此我们假设在应用superAKAP之后, 被PDE2抑制所预防的细胞和体内心律失常将重新出现。如图10C所示, 与TAT-乱序肽相比, 当细胞与TAT-superAKAP一起培育并且灌流时, 在存在Bay 60-7550的情况下, 存在Ca²⁺波的频率增加。在结扎后的HF和AnkB^{+/-}中, 以及在测试的两个频率下看到Ca²⁺波的量增加 (图10D)。

[0171] 我们还测试superAKAP在体内逆转PDE2抑制的抗心律失常作用的能力, 如图11A所示。在Bay 60-7550治疗期间, 当向小鼠注射TAT-superAKAP时, 结扎后的HF小鼠 (6只中有4只) 和AnkB^{+/-}小鼠 (5只中有3只) 出现室性心律不齐。然而, 在Bay 60-7550治疗期间, 当向小鼠注射TAT-乱序物时, 在结扎后的HF小鼠 (6只中有0只) 和AnkB^{+/-}小鼠 (5只中有0只) 中未观察到心律失常。这些结果证实, PDE2抑制通过调节激活NKA的局部信号传导域来预防细胞和体内心动过速。

[0172] PDE2在人肥大和衰老的心肌细胞中上调

[0173] 为了使PDE2抑制成为将来的心律失常治疗选择, 需要确定PDE2存在于人心脏组织和疾病中。尽管先前已报告PDE2在人心力衰竭中被上调 (Mehel, H. 等人, 磷酸二酯酶2在人类衰竭的心脏中被上调并且在心肌细胞中减弱β-肾上腺素响应《美国心脏病学会杂志》, 2013.62 (17): 1596-606), 对左心室组织进行这些分析, 其还含有其它细胞类型 (Thienpont, B. 等人, H3K9二甲基转移酶EHMT1/2保护免受病理心脏肥大《临床研究杂志》, 2017.127 (1): 335-348)。我们对分离和分类的心肌细胞核进行mRNA测序, 并且发现PDE2A-mRNA表达在人左心室肥大和老年人中上调。在结扎后的HF的大鼠的心肌细胞核中PDE2A-mRNA表达也增加 (图13)。因此, 发现PDE2A在相关疾病模型中的心肌细胞中上调, 这意味着PDE2A可被靶向用于人类的抗心律失常的目的。

[0174] 结论:

[0175] 我们已示出, PDE2抑制通过新抗心律失常机制强烈预防结扎后的HF小鼠和异型接合锚蛋白B^{+/-}小鼠 (长QT综合征) 的室性心动过速, 其中PDE2抑制通过调节局部PKA活性来增加NKA活性, 最终导致心肌细胞Ca²⁺负载减少, 以及细胞和体内心律失常性降低。在PDE2抑制后, 通过NCX的Ca²⁺挤出增多, 这为减少心肌细胞的Ca²⁺负载提供机制, 而我们手中没有其它Ca²⁺处置蛋白受到PDE2抑制的调节, 包括LTCC、RyR、SERCA2和非SERCA2-非NCX Ca²⁺挤出蛋白。通过NCX的Ca²⁺挤出增加可通过PDE2对NCX的直接作用或下游细胞内Na⁺的改变来解释。先前已示出, β-肾上腺素信号传导的激活和随后PLM的磷酸化负面地调节NCX (Cheung, J.Y. 等人, 通过磷酸神经膜调节心脏Na⁺/Ca²⁺交换剂 (Regulation of cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger by phospholemman) 《纽约科学院年鉴》, 2007.1099: 119-34; 和Wanichawan, P. 等人, 开发防止钠/钙交换剂1 (NCX1) 的磷酸神经膜 (PLM) 抑制的高亲和力肽 (Development of a high-affinity peptide that prevents phospholemman (PLM) inhibition of the sodium/calcium exchanger 1 (NCX1)) 《生物化学杂志 (Biochem J)》, 2016.473 (15): 2413-23)。因此, PDE2抑制将不太可能通过对PLM的作用增加通过NCX的Ca²⁺挤出。NKA激活导致细胞内Na⁺减少, 这可能对NCX具有下游影响, 如我们的研究小组和其他人先前示出的

(Aronsen, J.M., 等人, 低血钾症通过降低Na⁺、K⁺-ATP酶 α 2活性引起在心室肌细胞中Ca²⁺过载和Ca²⁺波《生理学杂志》, 2015.593 (6) :1509-21; 以及Despa, S., J.B.Lingrel和D.M.Bers, 在心脏肌细胞中Na⁺/K⁺-ATP酶 α 2-异构体优选地调节Ca²⁺瞬变和肌质网Ca²⁺释放《心血管研究》, 2012.95 (4) :480-6)。NKA和NCX已示出在局部Na⁺结构域中的相互作用, 其中对Ca²⁺体内平衡和收缩力的下游影响通过整体细胞内Na⁺的变化不佳地预测(Despa, S., J.B.Lingrel和D.M.Bers, 在心脏肌细胞中Na⁺/K⁺-ATP酶 α 2-异构体优选地调节Ca²⁺瞬变和肌质网Ca²⁺释放《心血管研究》, 2012.95 (4) :480-6)。在本研究中, 我们没有发现细胞内Na⁺的整体的变化, 尽管使用SBFI的细胞内Na⁺测量的灵敏度低(Baartscheer, A., C.A.Schumacher和J.W.Fiolet, 以发射率模式用SBFI测量在大鼠心室肌细胞中胞质钠的小变化《分子和细胞心脏病学杂志》, 1997.29 (12) :3375-83; 和Swift, F.等人, Na⁺/K⁺-ATP酶 α 2到异构体调节大鼠心肌细胞的收缩力(The Na⁺/K⁺-ATPase α 2-isoform regulates cardiac contractility in rat cardiomyocytes)《心血管研究》, 2007.75 (1) :109-17), 表明观察到对NCX的作用是由于在受限域中局部Na⁺池的NKA调节。

[0176] 降低NKA活性是一个新兴的致心律失常途径, 通过传统洋地黄诱发的心律失常显而易见, 但我们组最近也强调降低的NKA活性(Aronsen, J.M., 等人, 低血钾症通过降低Na⁺、K⁺-ATP酶 α 2活性引起在心室肌细胞中Ca²⁺过载和Ca²⁺波《生理学杂志》, 2015.593 (6) :1509-21) 和Pezhouman等人(Pezhouman, A.等人, 低血钾诱发的心室颤动的分子基础《循环》, 2015.132 (16) :1528-1537) 在低血钾诱发的心律失常中起作用(Faggioni, M.和B.C.Knollmann, 低血钾的心律失常保护:Ca²⁺激活的K⁺电流在心室中的新作用《循环》, 2015.132 (15) :1371-3)。尽管这意味着增加的NKA活性可具有抗心律失常的作用, 但不存在此类NKA激活剂, 因此尚无此机会。我们在这里报告, PDE2抑制将NKA活性提高30%-50%。我们和其他人先前曾报告, NKA活性的类似降低具有很强的致心律失常作用。其先前也有示出, 总NKA活性的小变化可转化成收缩力的大的下游影响(Despa, S., J.B.Lingrel和D.M.Bers, 在心脏肌细胞中Na⁺/K⁺-ATP酶 α 2-异构体优选地调节Ca²⁺瞬变和肌质网Ca²⁺释放《心血管研究》, 2012.95 (4) :480-6), 取决于NKA异构体和与NCX的共定位。

[0177] 先前的研究发现PDE2的过量表达保护免受儿茶酚胺引起心律失常(Vettel, C.等人, 磷酸二酯酶2保护免受儿茶酚胺诱发的心律失常, 并保留心肌梗塞后的收缩功能《循环研究》, 2017.120 (1) :120-132), 这显然与我们的发现形成了对比。PDE2是双特异性PDE, 降解cGMP和cAMP, 但具有不同的亲和性和最大速度比(Bender, A.T. and J.A.Beavo, 环核苷酸磷酸二酯酶:分子调节临床应用(Cyclic nucleotide phosphodiesterases:molecular regulation to clinical use.)《药理学综述(Pharmacol Rev)》, 2006.58 (3) :488-520)。重要的是, 已示出PDE2活性高度分隔, 调节在特定域中的cAMP水平, 表明PDE2在各个域中可能具有高度分化的作用(Zaccolo, M. and M.A.Movsesian, cAMP和cGMP信号传导交叉干扰:磷酸二酯酶的作用和对心脏病理生理的影响(cAMP and cGMP signaling cross-talk:role of phosphodiesterases and implications for cardiac pathophysiology)《循环研究》, 2007.100 (11) :1569-78)。在儿茶酚胺诱发的 β -肾上腺素受体激活后, 预期的PDE2的过度表达限制cAMP的细胞内升高(Vettel, C.等人, 磷酸二酯酶2保护免受儿茶酚胺诱发的心律失常, 并保留心肌梗塞后的收缩功能《循环研究》, 2017.120 (1) :120-132)。但是, 尚不

清楚在特定的隔室中cAMP是否发生了改变,或观察到的有益效果是否是由于cAMP水平的整体降低。在本研究中,我们报告PDE2抑制增加NKA电流,减少细胞内Ca²⁺负载,并防止细胞和体内心动过速,而无需预先激活β-肾上腺素受体。我们发现在没有激活β-肾上腺素受体的情况下,在PDE2抑制后,cAMP水平没有整体增加(或降低),这表明PDE2抑制通过调节cAMP水平的特定域是有益的。我们提出PDE2抑制特异性激活NKA,对Ca²⁺处置蛋白几乎没有影响。我们的方法与先前的研究在两个重要方面不同:1)β-肾上腺素受体的激活导致细胞内cAMP的整体增加;2)PDE2的过度表达不一定改变在特定域中的cAMP,但可能反映cAMP水平的一般总体下降。先前的研究发现在PDE2抑制后对心脏肥大有有益作用,但在破坏局部PKA活性后所述作用消除(Zoccarato, A. 等人,由磷酸二酯酶2调节的cAMP局部池抑制心肌肥大(Cardiac Hypertrophy Is Inhibited by a Local Pool of cAMP Regulated by Phosphodiesterase 2)《循环研究》,2015.117(8):707-19)。连同我们在本研究中的发现,这表明PDE2抑制由于在特定域中cAMP的增加是有益的,而提出的PDE2过表达的有益效果可能是由于整体cAMP降解的非特异性作用。

[0178] 实例2

[0179] 用其它已知的PDE2抑制剂重复实施例1的方法以证明其在预防小鼠室性心动过速中的活性。

[0180] 心律失常的体内记录

[0181] 在AB后1周,使用与实施例1中描述相同的实验装置在HF小鼠中测试ND-7001(10mg/kg)和LuAF64280(20mg/kg)。DMSO用于对照注射。在注射PDE2抑制剂和随后的咖啡因之前,在所有小鼠中验证了明显的心脏重塑。

[0182] 结果

[0183] PDE2抑制预防患有心力衰竭小鼠的室性心动过速

[0184] ND-7001和LuAF64280保护HF小鼠免受VT:ND-7001 0/5(0%)形成了VT;LuAF64280 0/3(0%)形成了VT(图14)。总体来说,四种PDE2抑制剂Bay 60-7550、PF05180999、ND-7001和LuAF64280保护HF小鼠免受VT。

[0185] 结论

[0186] 已经示出在建立的模型中另外两种PDE2抑制剂预防室性心动过速。

[0187] 实例3

[0188] 针对美托洛尔和与美托洛尔(常用抗心律失常药物)组合测试PDE2抑制剂Bay 60-7550的抗心律失常作用。

[0189] 心律失常的体内记录

[0190] 以与实施例1中所描述的相同的方式针对美托洛尔测试PDE2抑制剂Bay60-7550的抗心律失常作用。我们还包括接受对照注射以及Bay 60-7550和美托洛尔组合的组。将小鼠随机分配到治疗组,但是具有预定的组大小。所有组治疗五天;5.5mg/kg美托洛尔(参见Zhou, Q. 等人,卡维地洛及其新类似物抑制心律失常性存储过载诱发的Ca²⁺释放(Carvedilol and its new analogs suppress arrhythmogenic store overload-induced Ca²⁺release)《自然·医学(Nat.Med.)》2011.17(8):1003-9)每天注射一次(早晨),而3mg/kg Bay 60-7550和对照每天注射两次(早晨和晚上)。对于慢性注射,将Bay 60-7550溶解在5%的乙醇和95%葵花籽油中,并且对照组接受相同的媒剂。仅美托洛尔组中的

注射中添加5%乙醇,以最小化乙醇依赖性的影响。在第五天,我们记录所有动物在接受最终注射前的基线ECG。在心律失常方案之前10-20min给予最终注射。如实施例1中所描述进行最终注射、麻醉、心律失常激发、ECG记录和ECG分析。

[0191] 结果

[0192] 在预防Ca²⁺诱发的室性心律失常方面,PDE2抑制优于β-阻断剂

[0193] 临床上,β-阻断剂是预防室性快速性心律失常的最常用的抗心律失常药物,无论是在HF还是遗传性心律失常综合征中(参见Al-Khatib,S.M.等人,患有室性心律失常和预防心源性猝死的患者的2017AHA/ACC/HRS管理指南:美国心脏病学会/美国心脏协会临床实践指南工作组和心律学会的报告(2017AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death:A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society)《循环》2017)。抗心律失常的作用机制主要是阻断cAMP/PKA依赖性的β-肾上腺素受体下游的影响,而我们提出PDE2抑制的抗心律失常作用是由于NKA的特异性激活和细胞内Ca²⁺水平的降低。我们研究以下问题:首先,在预防Ca²⁺诱发的室性心律失常方面,PDE2抑制是否优于β-阻断剂?第二,当与β-阻断剂组合时,PDE2抑制的抗心律失常作用仍然存在吗?为了回答这些问题,我们将55只Ank^{B+}/—小鼠随机分为四组:媒剂、美托洛尔(5.5mg/kg)、Bay 60-7550(3mg/kg)或Bay 60-7550(3mg/kg)和美托洛尔(5.5mg/kg)的组合。所有小鼠接受注射五天,并在最后一天,向小鼠注射咖啡因(120mg/kg)以诱发室性心律失常(图15A)。在媒剂组中,8/11发生了VT,并且11/11发生了室性心律失常(VT、室性双足(ventricular bigemini)或耦合的室性心动过速(VES))。在美托洛尔组中,5/15发生了VT,并且14/15发生了室性心律失常(VT、室性双足和耦合的VES)。相比之下,用Bay 60-7550治疗的小鼠室性心律失常明显减少(4/13,VT和室性双足),而2/13形成了VT。在接受美托洛尔和Bay 60-7550的组合的组中,有0/15小鼠患有VT并且2/15的患有室性心律失常(室性双足)(图15B和C)。在美托洛尔注射后,单独使用美托洛尔和与Bay 60-7550组合时,QT延长。与美托洛尔和媒剂组相比,在接受咖啡因注射后接受Bay 60-7550的组均未发生QT延长(图15D)。

[0194] β-阻断剂构成现代抗心律不齐治疗的基石,但我们的结果表明,PDE2抑制可以补充甚至提供这种作用的相加效应。

[0195] 结论

[0196] 结果清楚地表明,单独或与美托洛尔组合的PDE2抑制比对照或单独美托洛尔更有效地预防Ca²⁺诱发的室性心律失常。许多心脏病患者已经在使用β-阻断剂,因此重要的发现是PDE2抑制剂和β-阻断剂的组合优于单独的β-阻断剂。这表明PDE2抑制作为附加疗法是有效的,在某些临床环境中可能高度相关。

[0197] 实例4

[0198] 在实施例1的实验的扩展中,还研究关于BAY 60-7550的Ca²⁺电流、Na⁺电流、K⁺电流和动作电位(AP)。

[0199] L型Ca²⁺电流(LTCC)

[0200] 宽尖膜片移液管(1.4-1.8MΩ)填充有内部溶液(以mM计,根据以下修改:Leroy,

J., 等人, 磷酸二酯酶4B在心脏L型Ca (2) (+) 通道中复合调节Ca (2) (+) 电流保护小鼠免受室性心律失常《临床研究杂志》2011. 121 (7) : 2651-61) : CsCl 122、HEPES 10、MgATP 5、MgCl₂ 0.7 (游离Mg²⁺ 0.6mM)、Na₂磷酸二肌酐5、EGTA 10、CaCl₂ 0.2 (游离Ca²⁺ 3nM) cAMP 0.005, pH 7.2 (用CsOH)。在所有记录中, 串联电阻在4-8MΩ之间。从-45mV的保持电位到在-45mV到55mV (10mV) 阶跃的范围内的各种测试电位进行100ms电压阶跃。

[0201] Na⁺电流

[0202] 低阻力移液管 (1.4-2.5MΩ) 填充有内部溶液 (以mM计, 根据以下修改: Leroy, J., 等人, 磷酸二酯酶4B在心脏L型Ca (2) (+) 通道中复合调节Ca (2) (+) 电流保护小鼠免受室性心律失常《临床研究杂志》2011. 121 (7) : 2651-61) : CsCl 122、HEPES 10、MgATP 5、MgCl₂ 0.7 (游离Mg²⁺ 0.6mM)、Na₂磷酸二肌酐5、EGTA 10、CaCl₂ 0.2 (游离Ca²⁺ 3nM) cAMP 0.005, pH 7.2 (用CsOH)。在所有记录中, 串联电阻在4-7.5MΩ之间。细胞在溶液A中成膜片: 但是到达在全细胞接入之后, 应用溶液D (以mM计) : N-甲基-D-葡萄糖胺125、NaCl 10、CsCl 5、D-葡萄糖5、MgCl₂ 1.2、HEPES 10、NiCl₂ 5, pH 7.4 (用CsOH)。在实验当天添加20μM硝苯地平以抑制L型Ca²⁺通道。保持电位为-80mV。从-80mV的保持电位到在-80mV到70mV (15mV) 阶跃的范围内的各种测试电位进行50ms电压阶跃。

[0203] 背景K⁺电流

[0204] 在如先前描述测量K⁺电流 (参见Aronsen, J.M., 等人, 低血钾症通过降低Na (+)、K (+)-ATP酶α2活性引起在心室肌细胞中Ca (2+) 过载和Ca (2+) 波《生理学杂志》, 2015. 593 (6) : 1509-21)。简单来说, 从-80mV的保持电位到在-170mV至50mV (10mV) 阶跃的范围内的各种测试电位进行500ms电压阶跃。在接近脉冲末期的稳定阶段分析电流。对照记录和用Bay 60-7550的记录在同一细胞中进行。移液管电阻为2-2.5MΩ, 其中串联电阻为4-8MΩ。

[0205] 动作电位 (AP)

[0206] 通过3-ms的超阈值电流注入触发AP。移液管溶液含有 (以mM计) : KCl 130、NaCl 10、HEPES 10、MgATP 5、MgCl₂ 1、EGTA 0.5、cAMP 0.005, 用KOH将pH调节到7.2。细胞用溶液A灌流。移液管电阻为2-2.5MΩ, 其中串联电阻为4.8-9.3MΩ。在20% (APD₂₀)、50% (APD₅₀)、70% (APD₇₀) 和90% (APD₉₀) 下分析AP, 其中0%为峰值电位并且100%为静止膜电位, 并且在给定相对电位下, 测量实际膜电位。对照记录和用Bay 60-7550的记录在同一细胞中进行。

[0207] 结果

[0208] PDE2抑制具有高的靶特异性

[0209] 目前抗心律失常治疗可分为1-4类抗心律失常, 包括Na⁺、K⁺和Ca²⁺通道的抑制剂。在图16c中, 我们示出PDE2抑制对Ca²⁺电流没有作用。这里我们还发现PDE2抑制对电压钳制的ARVM中的Ca²⁺电流 (图17a)、K⁺电流 (图17b) 或Na⁺电流 (图17c) 没有作用。预期Na⁺、K⁺和Ca²⁺电流的抑制增加动作电位持续时间 (APD)。相比之下, 我们观察到PDE2抑制缩短APD₅₀、APD₇₀和APD₉₀处的AP (图17d), 这与PDE2抑制选择性地增加NKA活性而不影响Na⁺、K⁺和Ca²⁺电流的模型一致。这些结果示出PDE2抑制以高特异性激活NKA, 而对其他先前已知的抗心律失常目标没有影响。

[0210] 结论

[0211] 目前室性心律失常的药理学治疗策略包括I-IV类抗心律失常药物。然而, 结构性

心脏病患者由于其致心律失常作用而禁用某些抗心律失常药物。新的抗心律不齐策略应优先靶向特定的心律失常机制,而不会产生太多脱靶效应。我们的结果表明,PDE2抑制剂激活NKA,而不影响 Ca^{2+} 处置蛋白和离子通道,包括SERCA、RyR、非-SERCA-非-RyR Ca^{2+} 挤压蛋白、 Ca^{2+} 电流、 Na^{+} 电流和 K^{+} 电流(向内整流作用和延迟整流作用)。我们认为,此高水平的特异性源自NKA和PDE2之间的紧密相互作用。

[0212] 通过使用各种各样的分子生物学和成像技术,我们示出NKA和PDE2在心肌细胞中相互作用和共定位,并且PDE2抑制在NKA周围局部增加cAMP,而cAMP没有整体增加。另外,NKA的PDE2调节在superAKAP(具有高特异性的肽,取代AKAP的RII-PKA)存在下减弱与此一致,在superAKAP的存在下,PDE2抑制不预防心力衰竭或 $\text{Ank}^{\text{B}+/ -}$ 的VT,这示出抗心律失常作用取决于局部cAMP域。因此,PDE2抑制作为抗心律失常的治疗代表以两种方式的新的治疗策略:1)作为NKA的激活剂;2)通过靶向在离散域中的cAMP水平。

[0213] 实例5

[0214] 心律失常的体内记录

[0215] 如先前描述育成CPVT小鼠(Lehnart SE等人,漏 Ca^{2+} 释放通道/利阿诺定受体2引起小鼠癫痫和心源性猝死(Leaky Ca^{2+} release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice),《临床调查杂志(Journal of Clinical Investigation)》2008年6月118(6):2230-45)。在CPVT小鼠中测试Bay 60-7550(3mg/kg)。为了诱发室性心动过速,向小鼠注射60mg/kg咖啡因和50ng/kg异丙肾上腺素。50%乙醇用于对照注射。

[0216] 结果

[0217] PDE2抑制预防患有CPVT的小鼠的室性心动过速

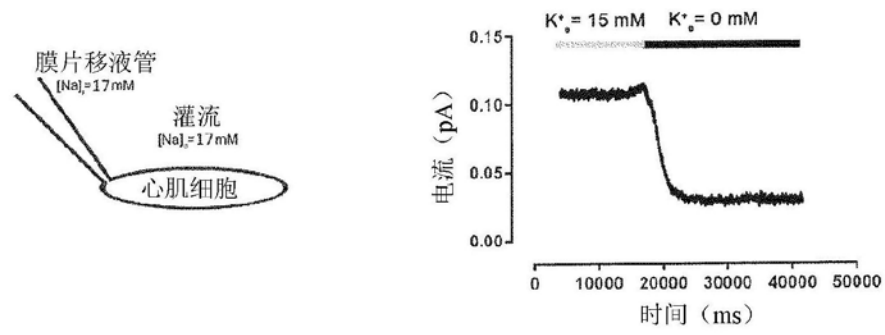
[0218] Bay 60-7550保护CPVT小鼠免受VT:Bay 60-7550 2/7(28%)发生VT;与对照的100%(6/6)相比(图18)。总体来说,PDE2抑制在HF、锚蛋白 $\text{B}^{+/ -}$ (长QT综合征)和CPVT三种不同的小鼠模型中预防心室性心动过速。

[0219] 结论

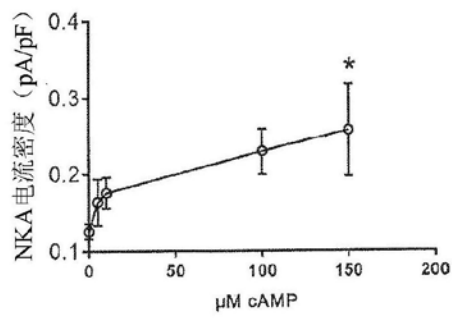
[0220] 已经示出PDE2抑制保护免受具有增加的室性心动过速风险的额外心脏疾病。

A

用于NKA电流测量的实验方案



B



C

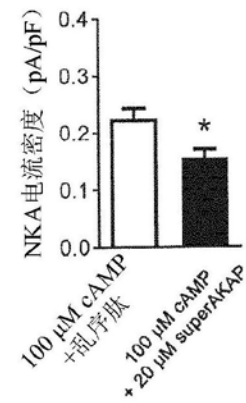


图1

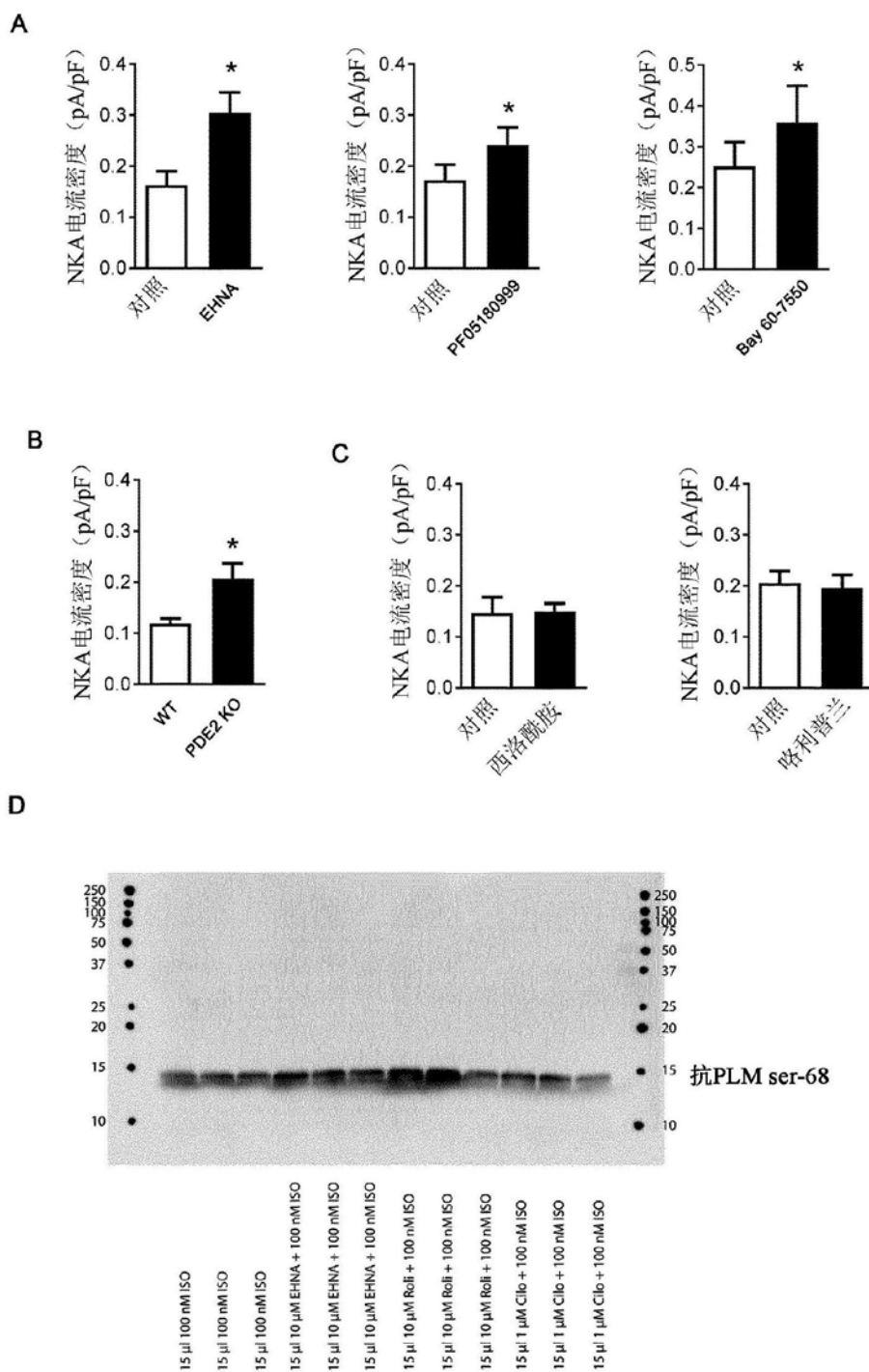
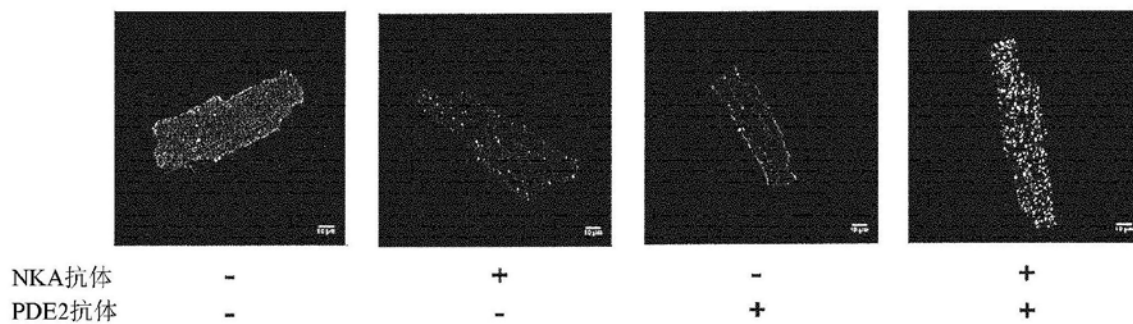


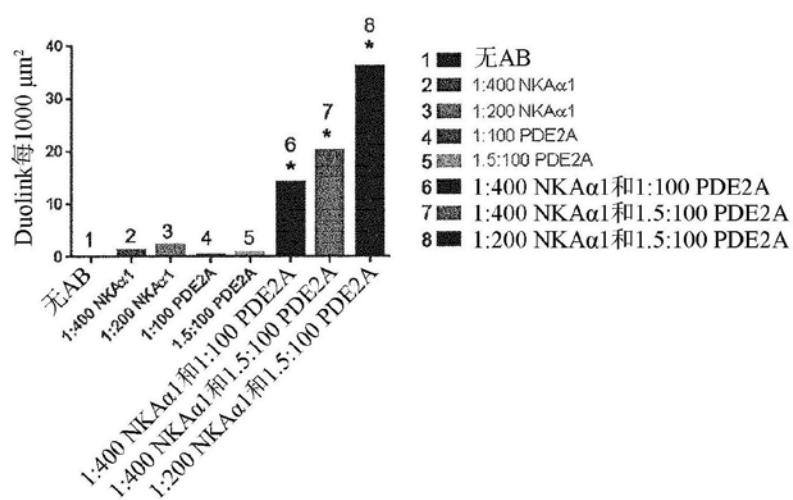
图2

A

在小鼠心室肌细胞中NKA和PDE2的邻近连接测定



B



C

在HEK293细胞中NKA和PDE2的共免疫沉淀

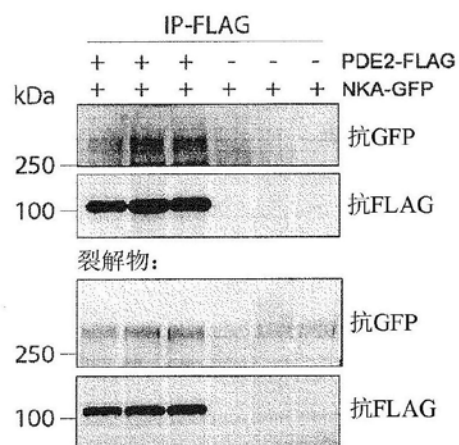


图3

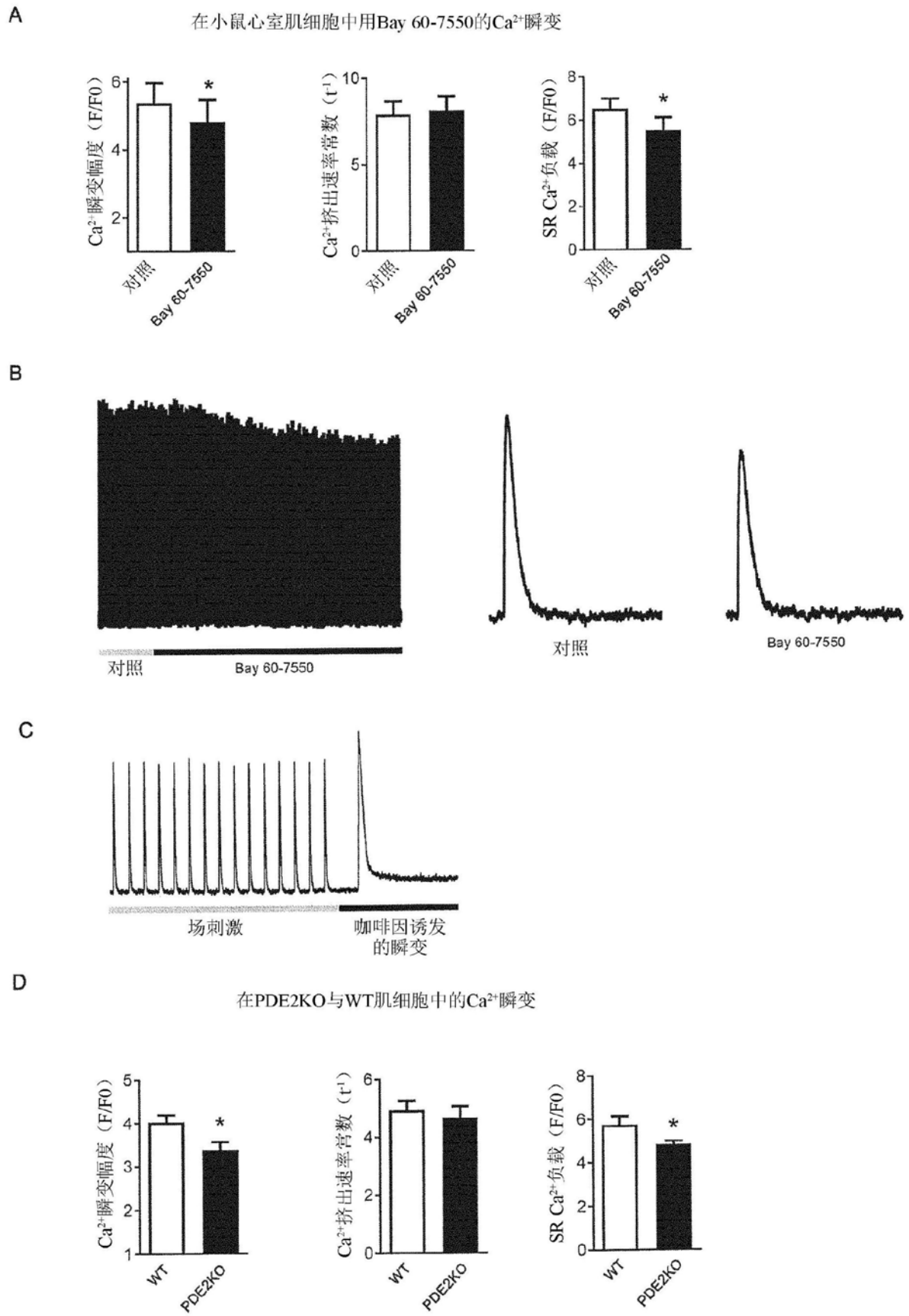


图4

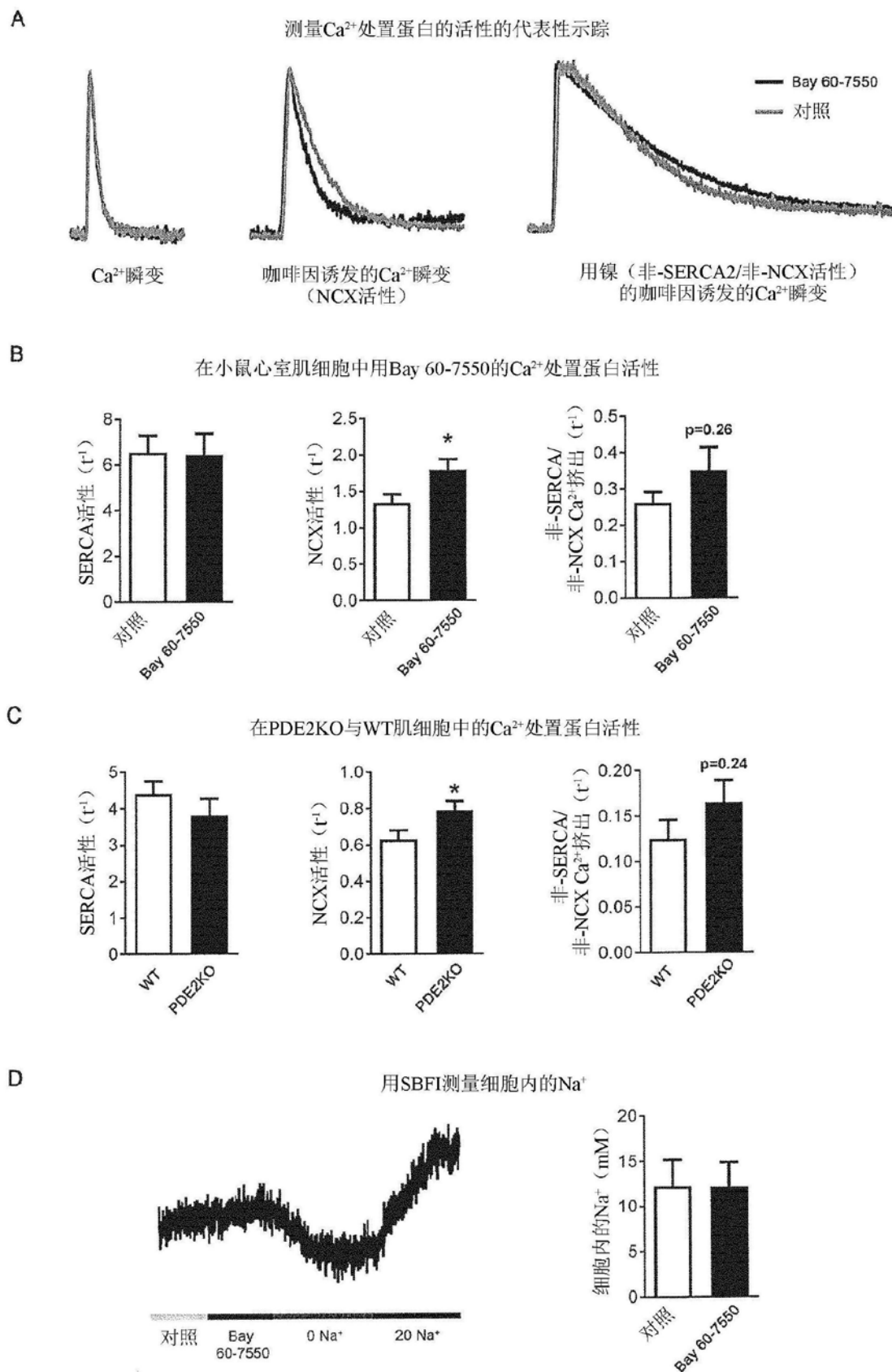
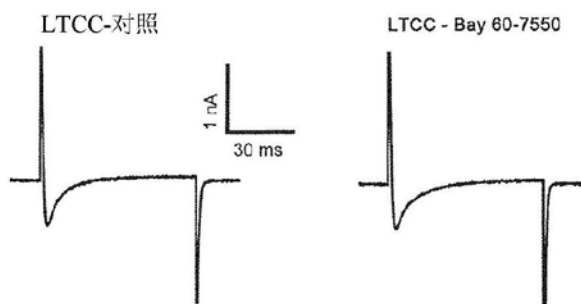
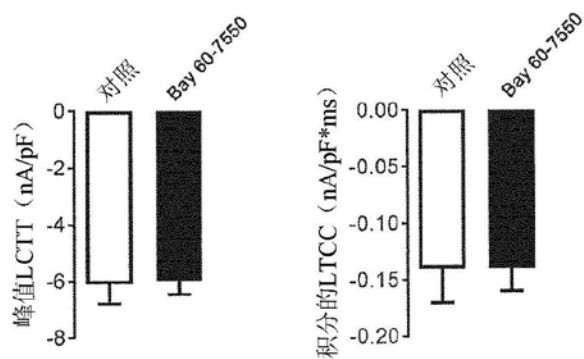


图5

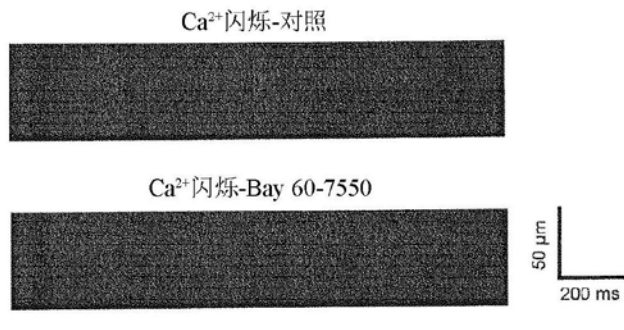
A

在小鼠心室肌细胞中用Bay 60-7550的L型Ca²⁺电流的代表性示踪

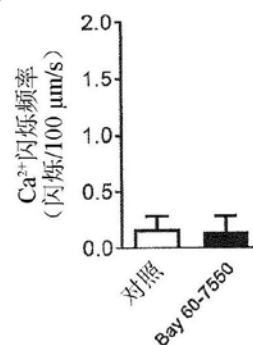
B

在小鼠心室肌细胞中用Bay 60-7550的L型Ca²⁺电流

C

在小鼠心室肌细胞中用Bay 60-7550的Ca²⁺闪烁测量

D



E

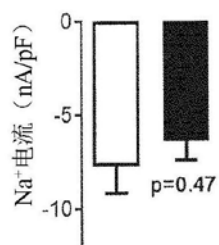
在小鼠心室肌细胞中用Bay 60-7550的Na⁺电流

图6

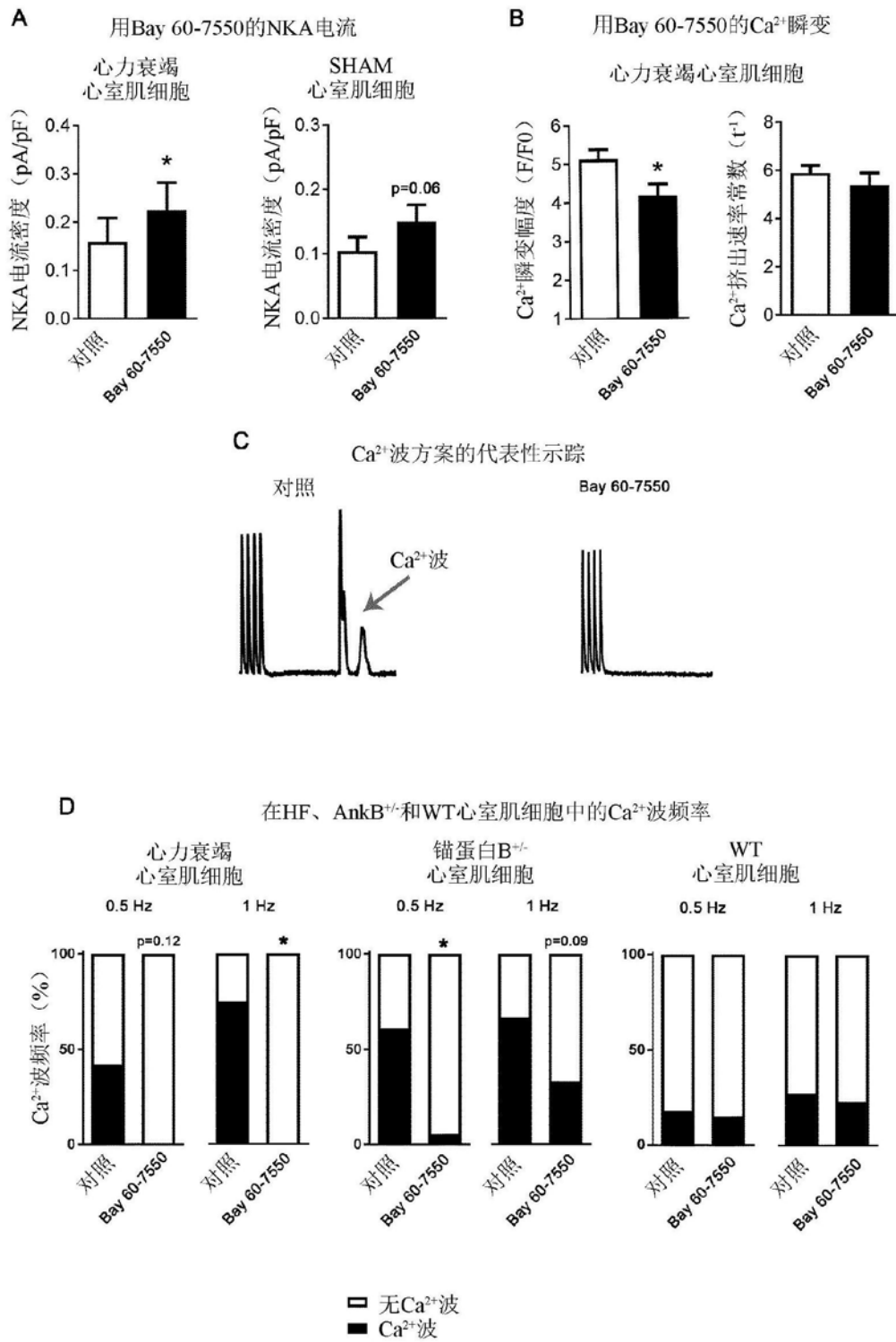


图7

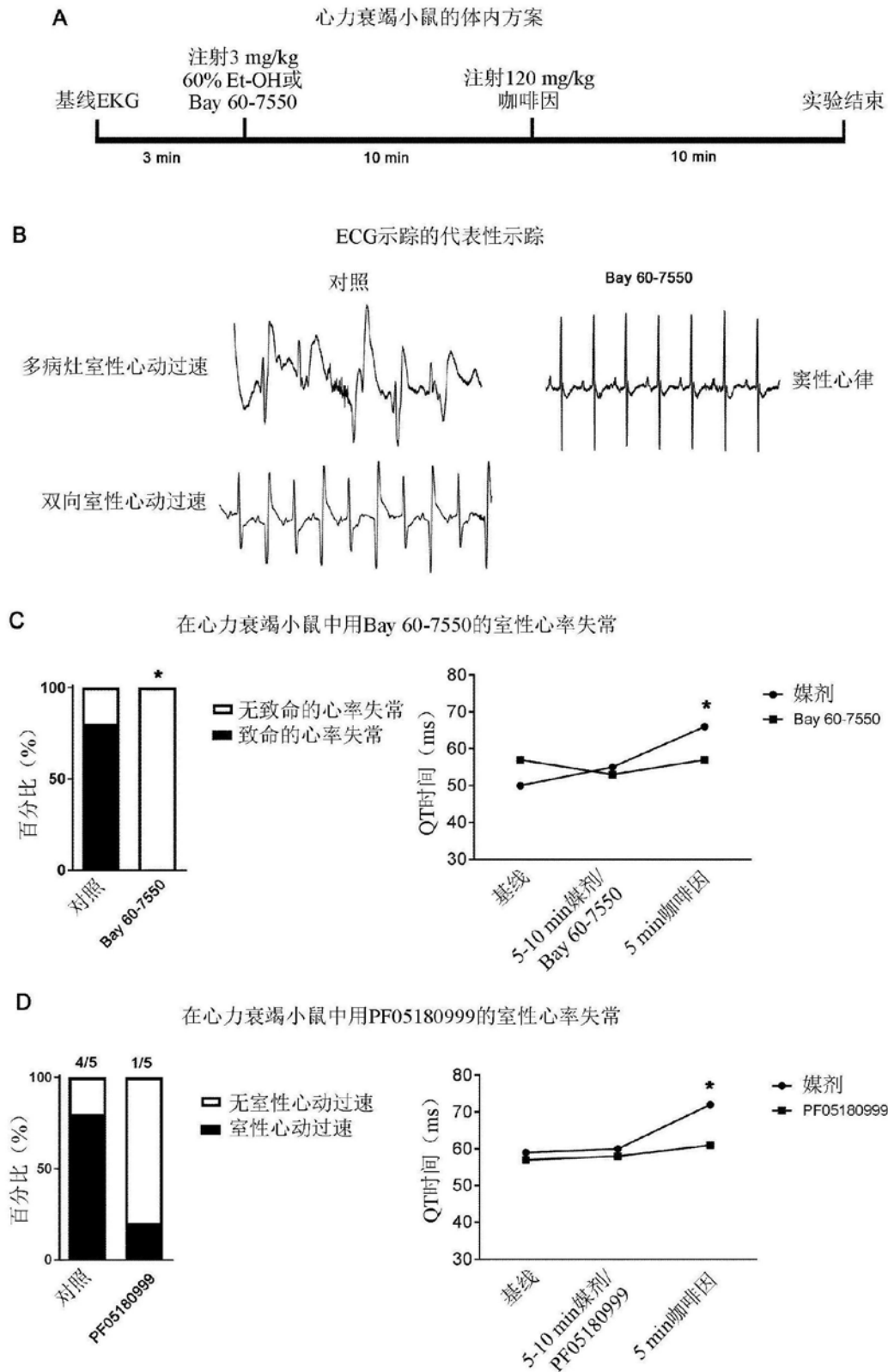


图8

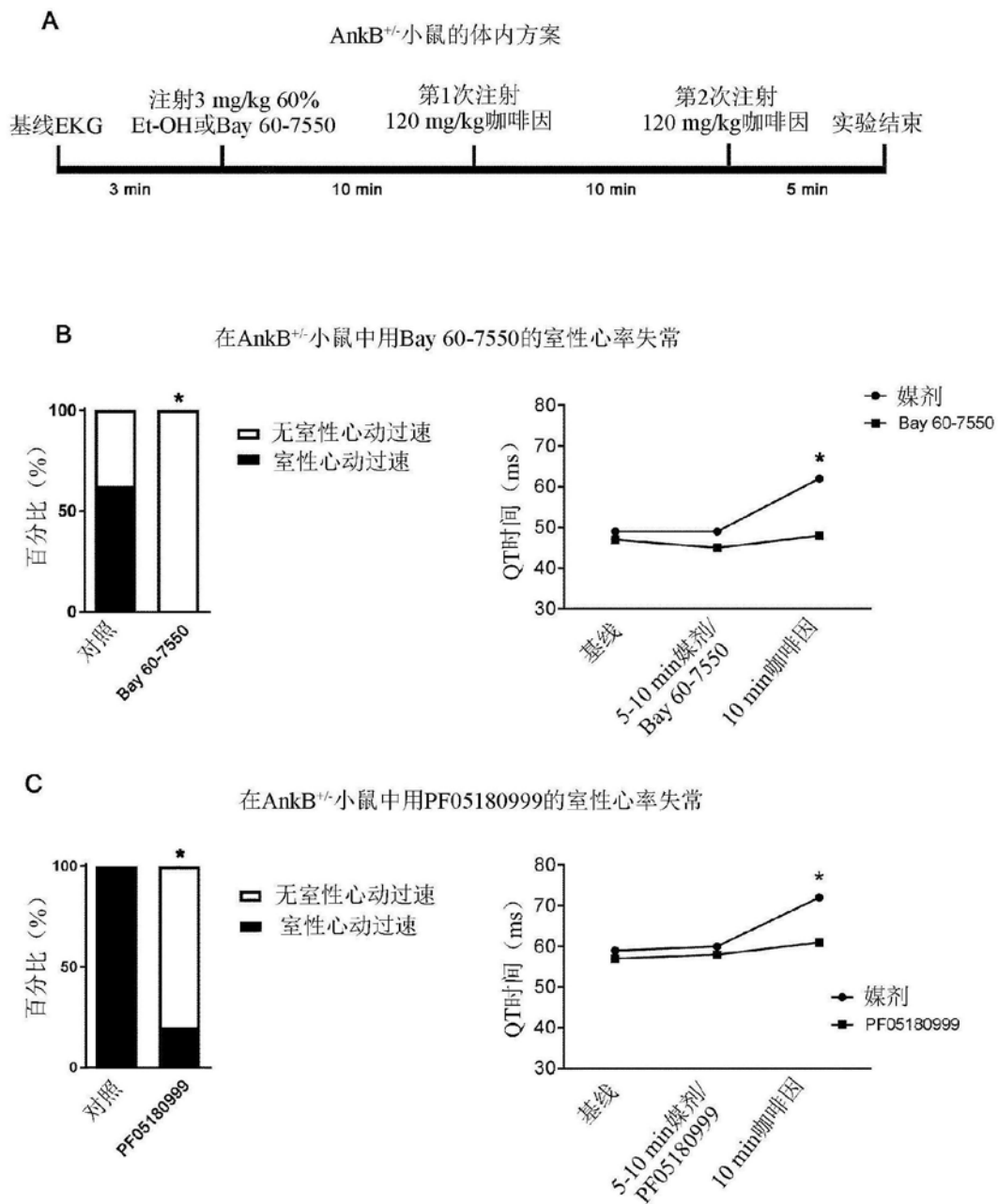


图9

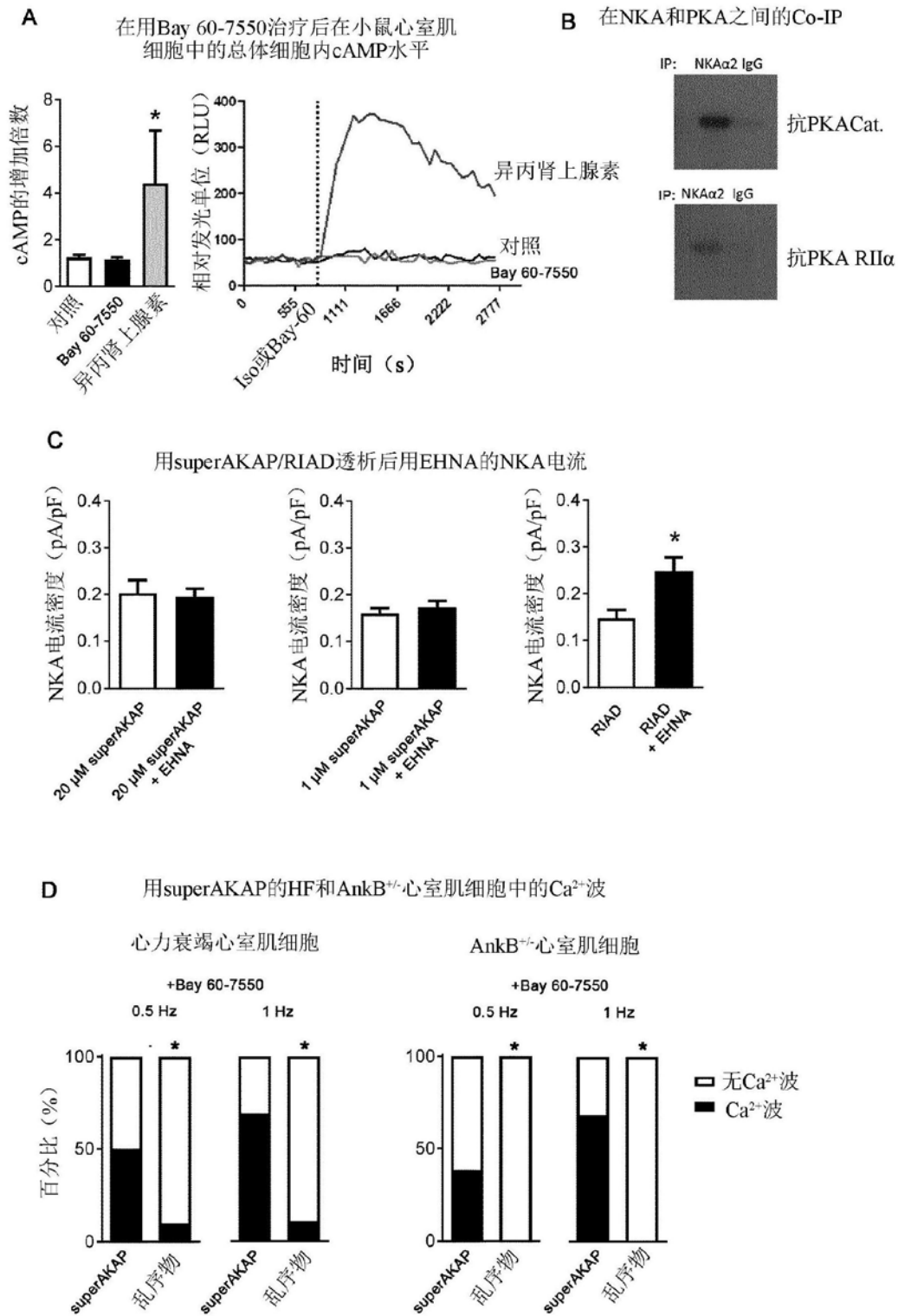


图10

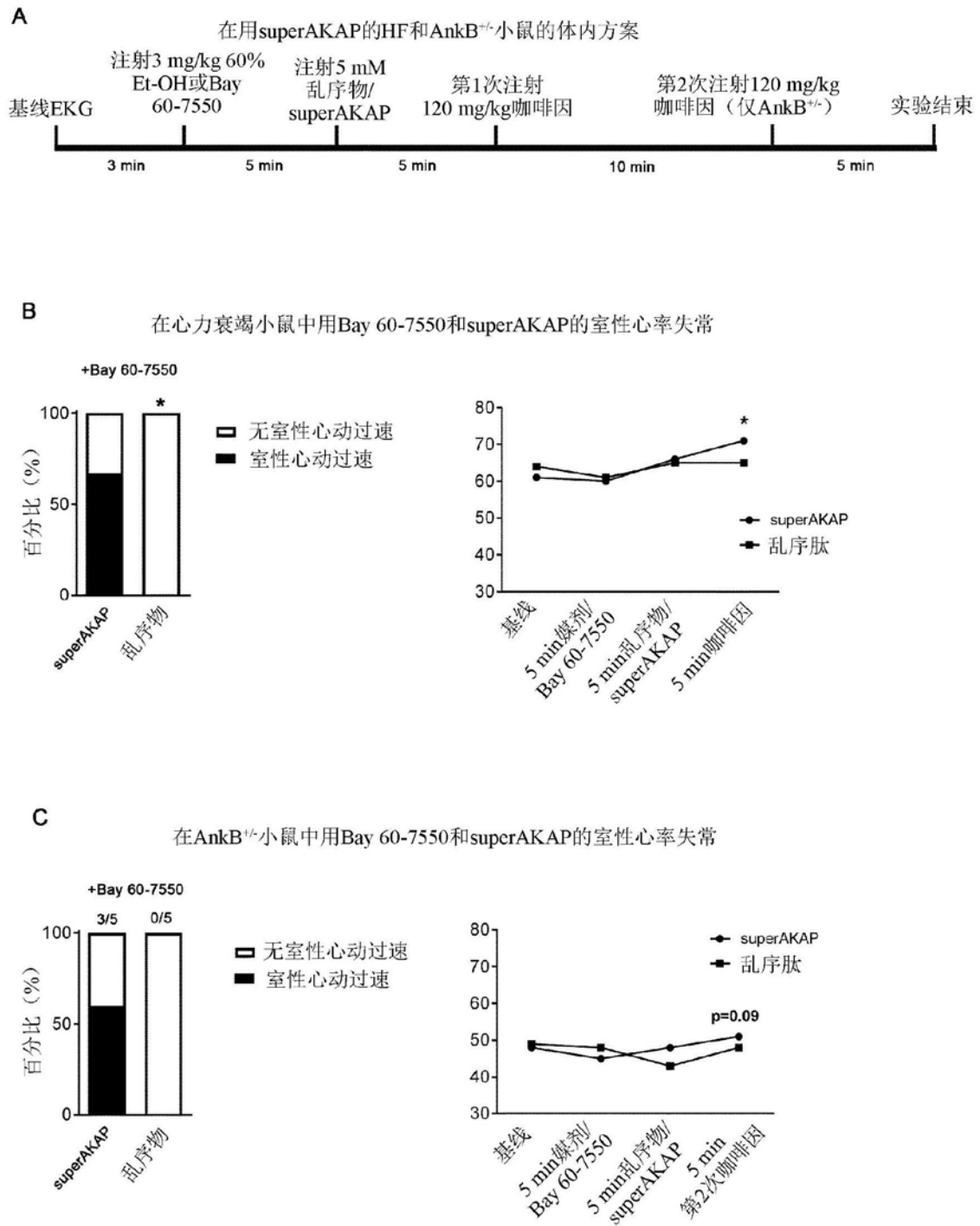
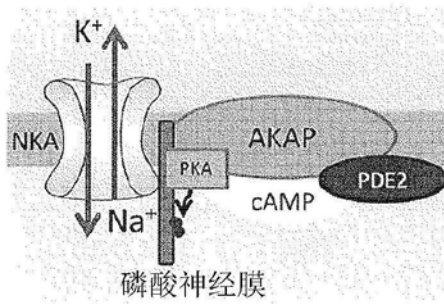


图11

A

提出的局部调节机制



B

提出的破坏局部AKAP结合的PKA-RII的机制

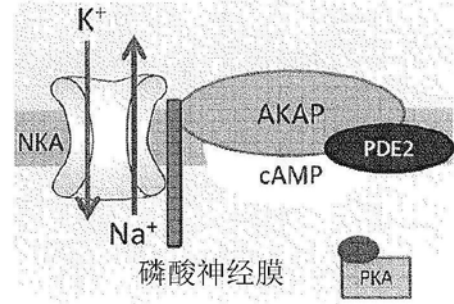


图12

心肌细胞特异的PDE2A-mRNA表达

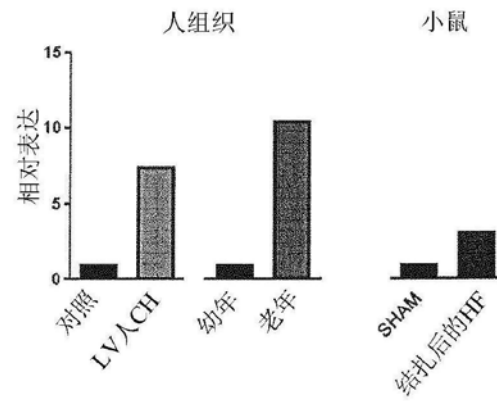


图13

A

在HF小鼠中用PDE2的室性心动过速

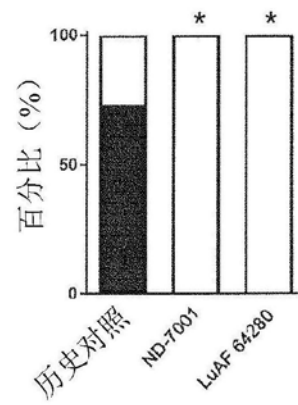


图14

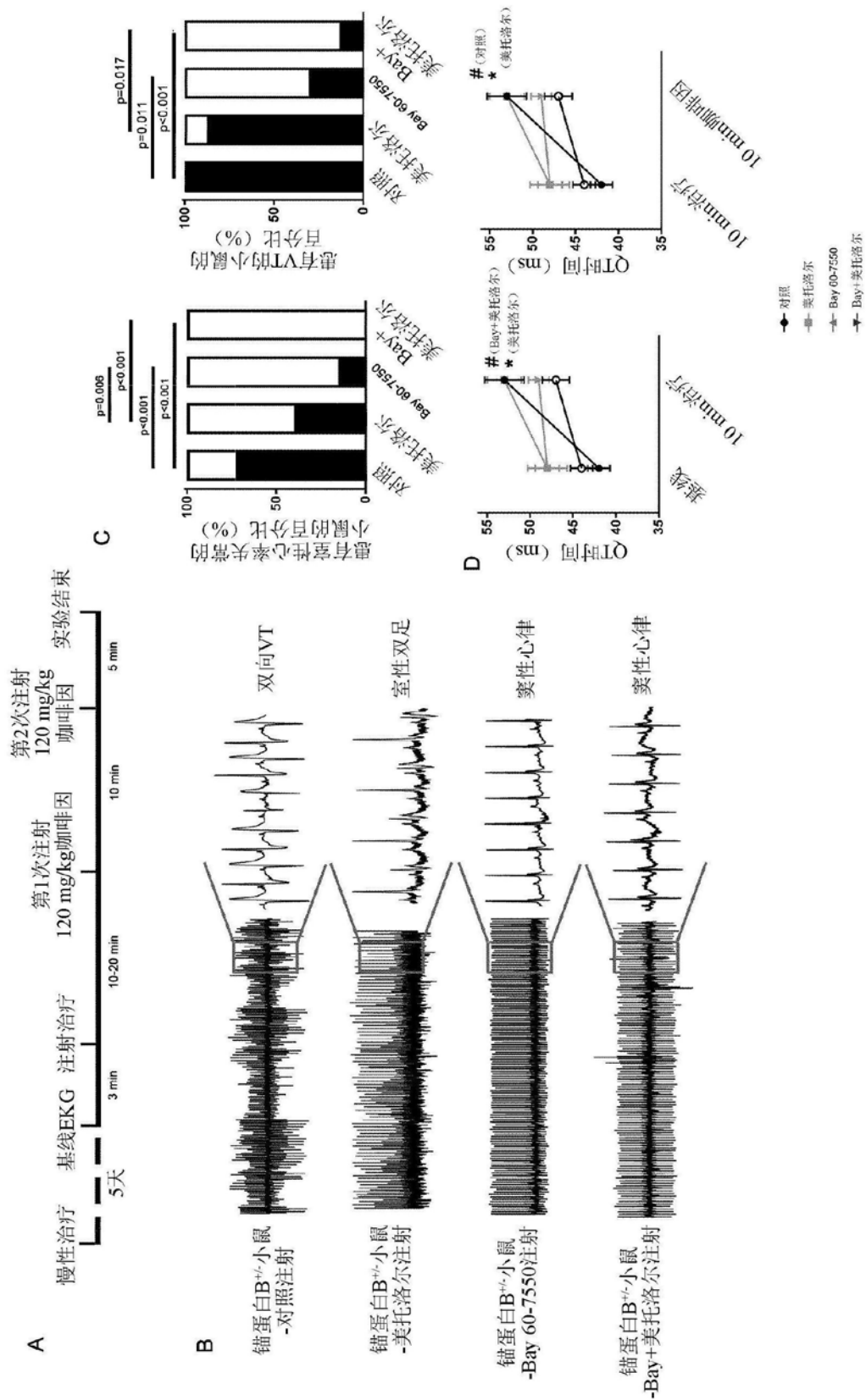


图15

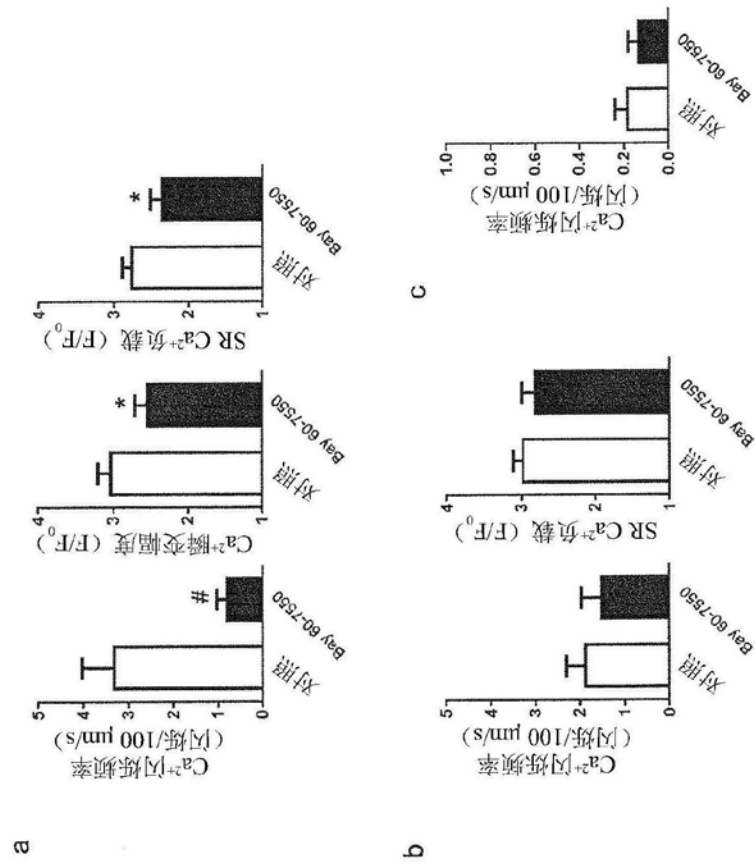


图16

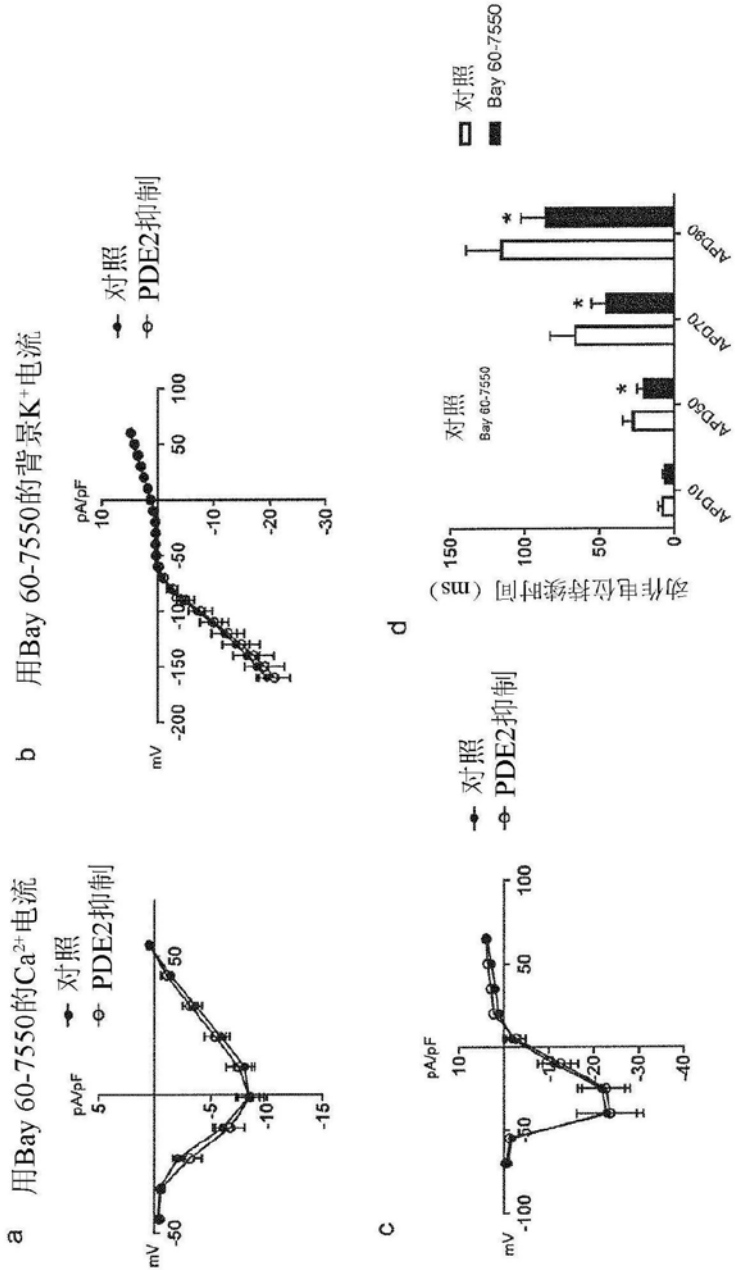
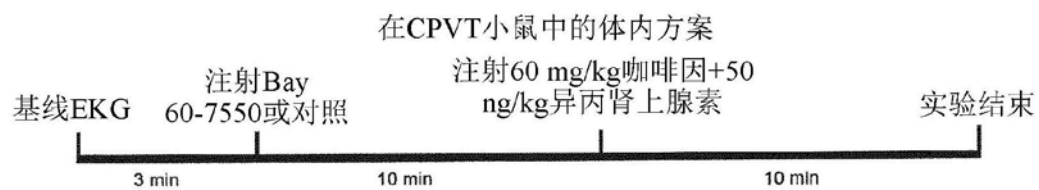


图17

A**B**

在CPVT小鼠中用Bay 60-7550的室性心动过速

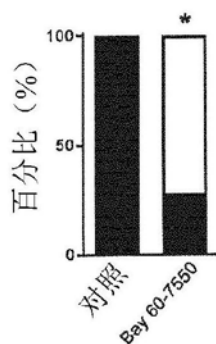


图18