



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 91109007.X

[51] Int.Cl<sup>5</sup>

C07D213/46

[43] 公开日 1992年4月8日

[22] 申请日 91.9.18

[30] 优先权

[32] 90.9.20 [33] US [31] 07 / 585,411

[32] 90.10.11 [33] US [31] 07 / 595,506

[71] 申请人 默里尔多药物公司

地址 美国俄亥俄

[72] 发明人 罗伯特·J·迪纳斯坦

杰弗里·S·萨鲍

基斯·A·迪克玛

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

代理部

代理人 黄革生

C07D215/12 C07D233/60

C07D239/26 C07D307/46

C07D333/16 A61K 31/44

A61K 31/47 A61K 31/505

A61K 31/34 A61K 31/38

说明书页数: 43 附图页数: 1

[54] 发明名称 钙摄入抑制剂

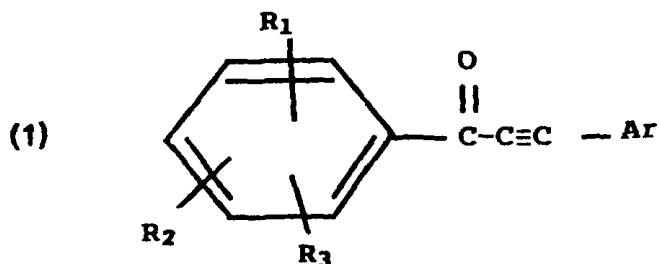
[57] 摘要

本发明涉及 1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮、这些化合物作为白细胞和血小板中钙摄取抑制剂的应用、以这些化合物作为活性成分的药用组合物以及它们的制备方法。

> 20 <

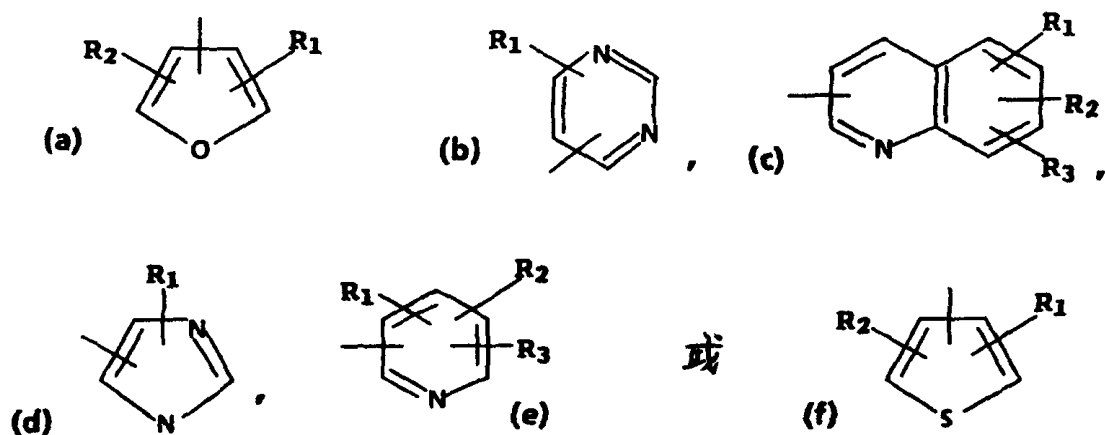
# 权 利 要 求 书

1. 式 ( I ) 所示的化合物:



其中

$R_1$ 、 $R_2$  和  $R_3$  彼此独立, 为氢;  $C_1 - C_6$  烷基;  $C_1 - C_6$  烷氧基; 卤素;  $-N(Y_1)(Y_2)$ , 其中  $Y_1$  和  $Y_2$  彼此独立, 为氢或  $C_1 - C_6$  烷基; 或  $XZ - (Q) - (CH_2)_n - O -$ , 其中  $Q$  为苯基或萘基,  $n = 0$  或  $1$ ,  $X = C_1 - C_6$  烷氧基或  $-N(Y_1)(Y_2)$ , 其中  $Y_1$  和  $Y_2$  的定义同前, 且  $Z = 0, 1, 2$ ; 其中  $Ar$  为下式残基:



2. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-(4-二甲氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮。

3. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-苯基-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮。

4. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-苯基-3-(3-吡啶基)-2-丙炔-1-酮。

5. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-(4-二乙基氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮。

6. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-苯基-3-(2-咪唑基)-2-丙炔-1-酮。

7. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-苯基-3-(苯硫-2-基)-2-丙炔-1-酮。

8. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-苯基-3-(2-呋喃基)-2-丙炔-1-酮。

9. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-(4-二乙基氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮。

10. 根据权利要求1的化合物, 其中该化合物为1-(4-二乙基氨基苯基)-3-(4-喹啉基)-2-丙炔-1-酮。

11. 抑制需要治疗的患者的白细胞中钙摄入的方法, 它包括给该患者服用钙摄入抑制有效量的权利要求1的化合物。

12. 根据权利要求11的方法, 其中患者患有免疫疾病。

13. 根据权利要求11或12的方法, 其中患者患有类风湿

性关节炎。

14 . 根据权利要求 11 或 12 的方法，其中患者有免疫血管炎。

15 . 根据权利要求 11 的方法，其中患者患有炎性疾病。

16 . 根据权利要求 11 的方法，其中患者患有中性白细胞皮肤病。

17 . 抑制需要治疗患者的血小板中钙摄入的方法，它包括给该患者服用钙摄入有效抑制量的权利要求 1 的化合物。

18 . 根据权利要求 17 的方法，其中患者患有心血管疾病。

19 . 根据权利要求 17 的方法，其中患者患有心肌梗塞。

20 . 根据权利要求 17 的方法，其中患者患有局部缺血损伤。

钙摄入抑制剂

本申请是1990年9月20日递交的申请系列号07/585,411的部分继续申请。本发明涉及1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮,这些化合物作为白细胞和血小板中钙摄入抑制剂的应用,以这些化合物作为活性成分的医药组合物,及其制备方法。

多形核白细胞(白细胞)提供了抵御微生物感染的基本方式。对入侵微生物的反应可激活细胞氧化过程(产生羟基自由基)和非氧化过程(消化酶;髓过氧化物酶;弹性蛋白酶等),以有效地杀伤微生物。然而,白细胞对外来攻击的反应也可造成对宿主组织的破坏,并在许多非感染性疾病状态的发病机理中起着重要作用。

白细胞具有各种各样的机制,使之能够产生由细胞表面受体发起的对外来攻击的反应。受体激活或总体细胞激活导致细胞生理学的改变,进而使其自身变为“被激活的”。激活的细胞内信号分子常常被称为第二信使,而第一信使则是细胞外激活配基本身。

许多细胞中的主要第二信使之一是钙离子( $Ca^{+2}$ )。已知细胞表面受体产生细胞内钙信号有两种方式。其一是激活磷脂酶C。该酶产生三磷酸肌醇,后者又可在细胞内释放储存的钙。另外,细胞受体可开放或关闭闸门控制的离子通道,以使钙从细胞外进入。细胞浆膜中的 $Ca^{+2}$ 通道是两种类型的:(1)由小的瞬变离子流筒

单地改变跨膜电压时而激活的电压敏感性钙通道，或（2）由受体配基直接打开的受体操纵通道。第一种机制主要在电压敏感性细胞如神经元和肌肉细胞中发挥作用。许多细胞，如白细胞，基本上都不是电压敏感性细胞，但具有功能上与胞浆膜上受体敏感性  $Ca^{+2}$  通道相联的细胞表面受体。对某些配基的连接即可激活这些受体，从而打开通道并使  $Ca^{+2}$  进入细胞溶质，然后在其中发挥第二信使作用。

当细胞被激活时，即相当于  $Ca^{+2}$  流入，细胞内结合  $Ca^{+2}$  的结构即依赖它们对钙的相对亲和性和特异性，对这些改变起反应。少数  $Ca^{+2}$  依赖性蛋白质是已知的。已发现并鉴定了特征的第一种蛋白质是见于电活性骨骼肌细胞中的肌钙蛋白 C。后来发现的钙结合蛋白质是普遍存在于电压和受体敏感性细胞内的调钙蛋白。在许多细胞蛋白质中，已知由调钙蛋白以  $Ca^{+2}$  依赖方式调节的是某些形式的环核苷酸磷酸二酯酶和腺苷酸环化酶、以及膜结合的钙依赖性 ATP 酶、磷酸化酶激酶、肌球蛋白轻链激酶，并知道了它们与有丝分裂器之纺锤体和肌动蛋白丝之维管束的联系。虽然还不知道那些钙依赖性或受  $Ca^{+2}$  依赖性酶影响之蛋白质的总数，但已明确的是，钙作为激活这些过程的手段是必不可少的。

当白细胞被激活时，可发生许多在导致细胞内钙介导的疾病状态中起重要作用的过程。例如白细胞。主要是嗜中性白细胞，被认为在下列疾病的症状和宿主组织损伤中起组成作用：痛风、类风湿性关节炎、免疫性脉管炎、肾小球肾炎、肠道炎性疾病、成人呼吸窘迫综合症、肺气肿、哮喘、与溶血有关的热损伤以及慢性炎症部

位的恶性肿瘤 (Malech and Gallin, 1987)。因此, 可望抑制白细胞中的钙摄入, 以缓碍或减慢此与钙摄入有关的免疫和炎性疾病的进程。

白细胞中  $\text{Ca}^{+2}$  摄入和免疫与炎性疾病的改善也可扩展到那些与皮肤和真皮组织有关的疾病。包括于所列的那些局部相关炎性疾病中的是与皮肤和真皮有关的疾病, 它们包括中性白细胞皮肤病、慢性皮炎、牛皮癣、接触性皮炎、特应性和脂溢性皮炎, 以及痤疮。

钙也是血小板中的重要介导体, 其中已知  $\text{Ca}^{+2}$  是血液凝固之固有途径中必要的介导体。例如, 已经知道在血液凝固过程和血栓形成中需要  $\text{Ca}^{+2}$ , 且如果加入螯合剂如 EDTA, 柠檬酸盐或草酸盐结合  $\text{Ca}^{+2}$ , 这可在体外并在某种程度上在体内抑制这些过程。已认识到  $\text{Ca}^{+2}$  是血纤维蛋白溶解级联的必要成分, 并且是可在治疗上调整纤维蛋白溶解反应的活性机制。

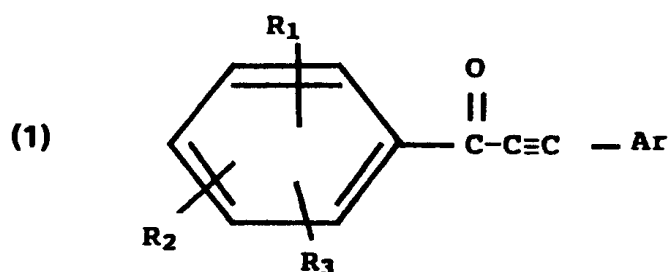
血小板的基本功能之一是在血管损伤部位发挥的, 在其中它们形成凝块聚集体以封闭伤口。这一反应也可有许多有害的副作用, 例如在局部缺血再灌注期间, 血栓形成可导致动脉阻塞, 进而引起心肌梗死。因此在许多情况下期望抑制血小板中  $\text{Ca}^{+2}$  的摄入, 以控制血栓溶解反应。

$\text{Ca}^{+2}$  借助各种形式受体介导的激活作用或释放细胞内储存进入细胞溶质中, 是与白细胞激活和血小板聚集的某些细胞活动严格相关的。改变  $\text{Ca}^{+2}$  迁移的途径提供了一种调节白细胞和血小板反应的机制。因此, 可以期望用抑制  $\text{Ca}^{+2}$  迁移的化合物来缓解与白

细胞激活有关的Ca<sup>2+</sup>依赖性病理过程，抑制免疫和炎性疾病及解决某些血栓溶解状态中与血小板凝集有关的问题。

本发明涉及新的1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮衍生物，它们可用作与急、慢性炎性的免疫性疾病，包括皮肤和真皮组织的相关疾病有关的白细胞中钙摄入的抑制剂。最后，本发明还涉及使用1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮衍生物治疗心血管系统的钙依赖性病理过程，包括血栓溶解系统的疾病。

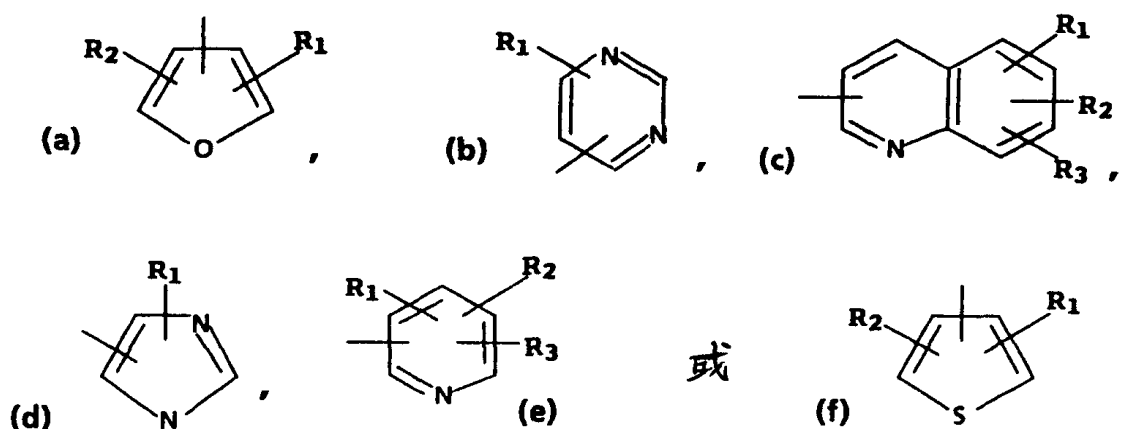
本发明涉及式(1)化合物及其可药用的盐：



其中R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>和R<sub>3</sub>彼此独立，为氢；C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基；

C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基；卤素；-N(Y<sub>1</sub>)(Y<sub>2</sub>)，其中Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>彼此独立，为氢或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基；或X<sub>z</sub>-(Q)-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-，其中Q为苯基或萘基，n=0或1，X=C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基或-N(Y<sub>1</sub>)(Y<sub>2</sub>)，其中Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>的定义同上，z=0, 1, 2；

其中Ar为下式残基：

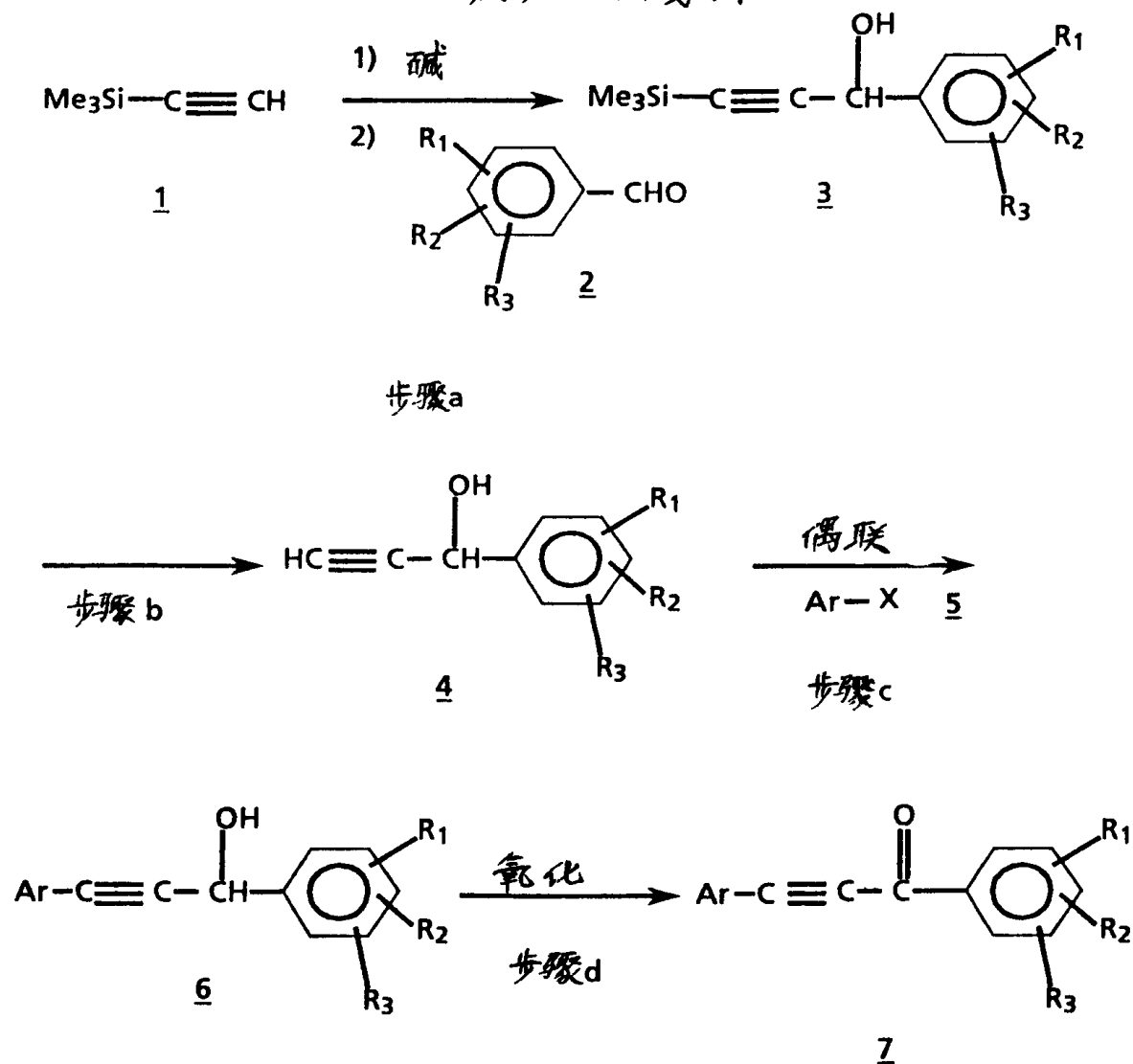


本发明也提供了一种抑制患者钙摄入的方法，它包括给患者服用治疗有效抑制量的式 ( I ) 化合物。

这里所用的术语“ $C_1 - C_6$  烷基”指具有 1 - 6 个碳原子的直链或支链饱和烃基。它包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、正己基等。术语“ $C_1 - C_6$  烷氧基”指甲氧基、乙氧基、丙氧基等。也应知道，术语  $X^z - (Ar) - (CH_2)_n - O -$  具体包括苄氧基、(4-甲氧基苄氧基)、(4-二甲基氨基)苄氧基等。术语“卤素”指氟、氯、溴或碘原子。

可利用本领域普通技术人员非常熟悉和知道的方法和技术制备式 ( I ) 化合物。反应路线 A 提出了一个制备式 ( I ) 化合物的总的合成方案，其中所有取代基的定义同前 (除非另有说明)。

### 反应路线 A



X = Cl, Br, I

一般来说，按照反应路线A的四步方法可制备出结构式7的1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮。

在步骤a中，首先在合适的非质子传递溶剂（如四氢呋喃）中将三甲基硅乙炔（1）与非亲核碱（如六甲基二硅氮烷基锂）反应，然后将所产生的乙炔化锂与结构式2的合适苯甲醛反应，产生相应的 $\alpha$ -（三甲硅烷基）-乙炔基-1-苯甲醇化合物（结构式

3)。

在步骤 b 中，可利用本领域普通技术人员所熟知和知道的技术和方法除去合适的  $\alpha$ -[ (三甲硅烷基) 乙炔基 ] 一苯甲醇化合物 (结构式 3) 中的三甲硅烷基官能度。例如，可在适当的非质子传递溶剂 (如四氢呋喃) 中将合适的  $\alpha$ -[ (三甲硅烷基) 乙炔基 ] 一苯甲醇化合物 (结构式 3) 与氟化四正丁基铵反应，产生相应的  $\alpha$ - (乙炔基) 一苯甲醇化合物 (结构式 4)。

在步骤 c 中，可在适当的偶联催化剂如二 (三苯膦) 一氯化钨 (II) 及催化量碘化铜 (I) 存在的情况下将合适的  $\alpha$ - (乙炔基) 苯甲醇化合物 (结构式 4) 与合适的芳基卤 (结构式 5) 在合适的碱性溶剂 (如二乙胺) 中偶联，产生相应的  $\alpha$ -[ (芳基) 乙炔基 ] 一苯甲醇化合物 (结构式 6)。

在步骤 d 中，可利用本技术领域普通技术人员所熟知和欣赏的技术和方法将合适的  $\alpha$ -[ (芳基) 乙炔基 ] 苯甲醇化合物 (结构式 6) 氧化成相应的 1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮化合物 (结构式 7)。例如，可利用 Swern 氧化反应 (二甲亚砜、草酰氯和三乙胺)、在合适非质子传递溶剂 (如二氯甲烷) 中的重铬酸吡啶 翁氧化反应或在合适非质子传递溶剂 (如二氯甲烷) 中的锰酸钡氧化反应将合适的  $\alpha$ -[ (芳基) 乙炔基 ] 苯甲醇化合物 (结构式 6) 氧化成相应的 1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮化合物 (结构式 7)。

用于反应路线 A 所示总的合成步骤的起始物质是本领域普通技术人员易于得到的。

以下实施例代表反应路线A所述的典型合成方法。这些实施例应当仅仅被看作是对本发明的说明而不是对本发明范围的任何限制。本文中以下术语的意义是：“g”代表克；“mmol”代表毫摩尔；“ml”代表毫升；“bp”代表沸点；“°C”代表摄氏度；“mmHg”代表毫米汞柱；“mp”代表熔点；“mg”代表毫克；“μm”代表微摩尔；“μg”代表微克。

### 实施例1

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮

步骤a：4-二甲基氨基-α-(三甲硅烷基)乙炔-1-苯甲醇

将六甲基二硅氮烷基锂(12 ml于四氢呋喃中的1 M溶液，12 mmol)置于氩气环境中并冷却至0 °C。加入三甲硅乙炔(1.7 ml, 12 mmol)后于0 °C搅拌1小时。再加入4-二甲基氨基苯甲醛(1.49 g, 10 mmol)的四氢呋喃(25 ml)溶液，温热至室温并搅拌3小时。将该混合物倒入乙醚和水中，分离有机相并真空蒸发溶剂。通过硅胶(20%乙酸乙酯/己烷)过滤油状物，并通过真空蒸发溶剂，得到2.26 g标题化合物。

步骤b：4-二甲基氨基-α-(乙炔基)-1-苯甲醇

将4-二甲基氨基-α-(三甲硅烷基)-乙炔基-1-苯甲醇(2.26 g, 9.13 mmol)和四氢呋喃(11 ml)的

混合物置于氩气环境下。滴加氟化四-正丁基铵（于四氢呋喃中的 11 ml 1 M 溶液，11 mmol e）。于室温下搅拌 1 小时后在乙醚和水之间分配。分离有机相，经氯化钠饱和水溶液洗涤、MgSO<sub>4</sub> 干燥、过滤及真空浓缩后产生 1.37 g (85.6%) 标题化合物。

步骤 c：4-二甲基氨基- $\alpha$ -(4-吡啶基)乙炔基] 苯甲醇

将 4-溴吡啶盐酸化物 (0.78 g, 4 mmol)、4-二甲基氨基- $\alpha$ -(乙炔基)苯甲醇 (0.88 g, 5 mmol) 和二乙胺 (25 ml) 置于氩气环境下。向其中加入二(三苯膦)氯化钨(II) (140 mg) 后再加入碘化铜(I) (20 mg)。于室温下搅拌过夜并过滤。真空蒸发溶剂后再通过硅胶 (2:1 乙酸乙酯/己烷) 过滤。再通过真空蒸发溶剂和重结晶 (25% 乙酸乙酯/己烷) 后，产生 0.5 g 标题化合物；mp 117 °C。

步骤 d：1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮

将重铬酸吡啶 鎗 (1.75 g) 和二氯甲烷 (20 ml) 置于氩气环境下并冷却至 0 °C。加入 4-二甲基氨基- $\alpha$ -(4-吡啶基)乙炔基] 苯甲醇和 4-二甲基氨基- $\alpha$ -(乙炔基) 苯甲醇的 1:1 混合物 (0.8 g)。过滤搅拌，同时温热至室温。用乙醚稀释并过滤掉铬盐。通过硅胶层析 (乙酸乙酯/己烷, 2:1) 纯化后产生 0.94 g 标题化合物；mp 143-145 °C。

## 实施例 2

1-苯基-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮

步骤 a:  $\alpha$ -[(三甲硅烷基)乙炔基]-苯甲醇

将六甲基二硅氮烷基锂(于四氢呋喃中的 20 ml 1M 溶液, 20 mmol)置于氩气环境下并冷却至 0 °C。滴加三甲基硅乙炔(2.83 ml, 20 mmol)并于 0 °C 搅拌 1 小时。加入苯甲醛(2.03 ml, 200 mmol)的四氢呋喃(10 ml)溶液后,使其温热至室温并搅拌 1 小时。将该混合物倒入乙醚及水中,分离有机相并真空蒸发溶剂。通过硅胶(20%乙酸乙酯/己烷)过滤油状物和真空蒸发溶剂后产生 4.09 g 标题化合物。

步骤 b:  $\alpha$ -(乙炔基)-苯甲醇

将  $\alpha$ -[(三甲硅烷基)乙炔基]苯甲醇(4.09 g, 20 mmol)和四氢呋喃(25 ml)的混合物置于氩气环境下并冷却至 0 °C。滴加氟化四-正丁基铵(于四氢呋喃中的 25 ml 1M 溶液, 25 mmol)后让其温热至室温,并搅拌 1 小时。将其在乙醚和水之间分配。然后分离出有机相,用氯化钠饱和水溶液洗涤并真空浓缩。通过硅胶层析(15%乙酸乙酯/己烷)纯化及通过蒸馏进一步纯化后得到 2.15 g 标题化合物; bp 100-110 °C @ 0.1 mmHg。

步骤 c:  $\alpha$ -[(4-吡啶基)乙炔基]-苯甲醇

将 4-溴吡啶盐酸盐(2.33 g, 12 mmol)、 $\alpha$ -

(乙炔基)-苯甲醇(1.95 g, 14.8 mmol)和二乙胺(25 ml)置于氩气环境下。向其中加入二(三苯膦)氯化钯(II)(105 mg)后再加入碘化铜(I)(59 mg)。于室温下搅拌3小时。真空蒸发溶剂后,在乙酸乙酯(50 ml)中搅拌残余物并过滤固体。真空蒸发溶剂并通过硅胶层析(4:3乙酸乙酯/己烷)纯化后得到0.4 g粗产物,经重结晶(己烷/氯仿)后产生0.2 g标题化合物; mp 93-96 °C。

步骤d: 1-苯基-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮  
将草酰氯(于二氯甲烷中的0.5 ml 2 M溶液, 1 mmol)置于氩气环境下并用干冰/丙酮浴冷却。加入二甲基亚砜(0.14 ml, 2 mmol)并于-70 °C搅拌10分钟,再加入 $\alpha$ -[(4-吡啶基)乙炔基]-苯甲醇(0.18 g, 0.86 mmol)的二氯甲烷(1 ml)溶液。于-78 °C搅拌20分钟后加入三乙胺(0.56 ml, 4 mmol),除去冷却浴并搅拌45分钟。倒入硅胶中并用60%乙酸乙酯/己烷洗脱。经真空蒸发溶剂和重结晶(己烷/氯仿)后产生58.1 mg标题化合物; mp 74-75 °C。

### 实施例3

1-苯基-3-(3-吡啶基)-2-丙炔-1-酮

步骤a:  $\alpha$ -[(三甲硅烷基)乙炔基]-苯甲醇

将六甲基二硅氮烷基锂(于四氢呋喃中的12 ml 1 M溶液, 12 mmol)置于氩气环境下,并冷却至0 °C。加入三甲基

硅乙炔 ( 1 . 7 m l , 1 2 m m o l ) 并于 0 ° C 搅拌 1 小时。加入苯甲醛 ( 1 . 0 6 g , 1 0 m m o l ) 的四氢呋喃 ( 2 5 m l ) 溶液后让其温热至室温并搅拌 3 小时。将混合物倒入乙醚和水中, 分离有机相并真空蒸发溶剂。通过硅胶 ( 2 0 % 乙酸乙酯 / 己烷 ) 过滤油状物及真空蒸发溶剂后得到标题化合物。

步骤 b :  $\alpha$  - ( 乙炔基 ) - 苯甲醇

将  $\alpha$  - [ ( 三甲硅烷基 ) 乙炔基 ] - 苯甲醇 ( 1 . 8 7 g , 9 . 1 3 m m o l ) 和四氢呋喃 ( 1 1 m l ) 的混合物置于氩气环境下。滴加氟化四 - 正丁基铵 9 于四氢呋喃中的 1 1 m l 1 M 溶液, 1 1 m m o l ) , 于室温下搅拌 1 小时, 并在乙醚和水之间分配。分离有机相, 用氯化钠饱和水溶液洗涤, 再经 M g S O <sub>4</sub> 干燥、过滤及真空浓缩后得到标题化合物。

步骤 c :  $\alpha$  - [ ( 3 - 吡啶基 ) 乙炔基 ] - 苯甲醇

将 3 - 溴吡啶盐酸盐 ( 0 . 7 8 g , 4 m m o l ) 、  $\alpha$  - ( 乙炔基 ) - 苯甲醇 ( 6 6 1 m g , 5 m m o l ) 和二乙胺 ( 2 5 m l ) 的混合物置于氮气环境下。加入二 ( 三苯膦 ) 氯化钯 ( II ) ( 1 4 0 m g ) 及碘化铜 ( I ) ( 2 0 m g ) 。于室温下过夜搅拌后过滤。真空蒸发溶剂并通过硅胶 ( 2 : 1 乙酸乙酯 / 己烷 ) 过滤。经真空蒸发溶剂和重结晶 ( 2 5 % 乙酸乙酯 / 己烷 ) 后得到标题化合物。

步骤 d : 1 - 苯基 - 3 - ( 3 - 吡啶基 ) - 2 - 丙炔 - 1 - 酮

将重铬酸吡啶季铵 ( 1 . 7 5 g ) 和二氯甲烷 ( 2 0 m l ) 置于氩气环境下并冷却至 0 ° C 。加入  $\alpha$  - [ ( 3 - 吡啶基 ) 乙炔基 ]

一苯甲醇 (663 mg, 3.2 mmol)。在过夜搅拌的同时将其温热至室温。用乙醚稀释并过滤铬盐。通过硅胶层析 (2:1 乙酸乙酯/己烷) 纯化后得到标题化合物。

#### 实施例 4

1-(4-二乙基氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮

步骤 a:  $\alpha$ -[(三甲硅烷基)乙炔基]-(4-二乙基氨基)-苯甲醇

将六甲基二硅氮烷基锂 (于四氢呋喃中的 12 ml 1M 溶液, 12 mmol) 和四氢呋喃 (40 ml) 置于氩气环境下并冷却至 0 °C。加入三甲基硅乙炔 (1.69 ml, 12 mmol) 并于 0 °C 搅拌 45 分钟。加入 4-二乙基氨基苯甲醛 (1.77 g, 10 mmol) 的四氢呋喃 (10 ml) 溶液。移去冷却浴并于室温下搅拌 1 小时。倒入乙醚和水中, 分离有机相并用  $MgSO_4$  干燥。再经过滤和真空蒸发溶剂后得到 2.8 g 标题化合物。

步骤 b:  $\alpha$ -[乙炔基]-(4-二乙基氨基)苯甲醇

将  $\alpha$ -[乙炔基]-(4-二乙基氨基)-苯甲醇 (2.8 g) 的四氢呋喃 (15 ml) 溶液置于氩气环境下并冷却至 0 °C。向其中加入 1M 氟化四-正丁基铵的四氢呋喃 (15 ml, 15 mmol) 溶液。移去冷却浴并于室温下搅拌 2 小时后, 将其倒入乙醚和水中, 分离有机相, 然后用氯化钠的饱和水溶液洗涤。经真空蒸发溶剂后产生暗色油状物。将其倒入硅胶上用 20% 乙酸乙酯/己烷洗

脱，产生 1.67 g 标题化合物。

步骤 c： $\alpha$ -[(4-吡啶基)乙炔基]-(4-二乙基氨基)-苯甲醇

将 4-溴吡啶盐酸盐 (1.40 g, 7.2 mmol)、 $\alpha$ -[(乙炔基]-(4-二乙基氨基)苯甲醇 (1.67 g, 8.2 mmol) 及二乙胺 (35 ml) 置于氩气环境下。加入二(三苯膦)氯化钨(II) (0.2 g) 和碘化铜(I) (70 mg) 后于室温下过夜搅拌。滤掉固体，真空蒸发二乙胺并通过硅胶层析 (60% 乙酸乙酯/己烷) 纯化后，得到 1.4 g 标题化合物；mp 100-103 °C。

步骤 d：1-(4-二乙基氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮

将  $\alpha$ -[(4-吡啶基)乙炔基]-(4-二乙基氨基)-苯甲醇 (1.4 g)、重铬酸吡啶季铵 (2.82 g) 及二氯甲烷 (25 ml) 混合。于室温下过夜搅拌，用 4 倍体积的乙醚稀释。滤掉固体铬盐并真空蒸发溶剂。用 20% 乙醚/己烷使残余物结晶。过滤浅黄色固体并风干后得到 0.16 g (第一次收集物) 和 0.23 g (第二收集物) 标题化合物；mp 85-87 °C。

### 实施例 5

1-(4-二乙基氨基苯基)-3-(4-嘧啶基)-2-丙炔-1-酮

步骤 c： $\alpha$ -[(4-嘧啶基)乙炔基]-(4-二乙基氨基)

基) - 苯甲醇

将 4-溴嘧啶 (1.75 g, 11 mmol)、 $\alpha$ -[乙炔基]-[4-二乙基氨基]苯甲醇 (实施例 1, 步骤 b)

(2.45 g, 14 mmol) 和二乙胺 (75 ml) 置于氩气环境下。加入双(三苯膦)氯化钯(II) (240 mg) 及碘化铜(I) (40 mg) 后, 于室温下搅拌 3 小时。过滤掉固体, 真空蒸发二乙胺, 再通过硅胶层析 (60% 乙酸乙酯/己烷) 纯化后得到 0.79 g 标题化合物; mp 131-134 °C。

步骤 d: 1-[4-二乙基氨基苯基]-3-[4-嘧啶基]-2-丙炔-1-酮

混合  $\alpha$ -[4-嘧啶基]乙炔基-[4-二乙基氨基]-苯甲醇 (0.7 g) 和锰酸钡 (1 g) 及二氯甲烷 (25 ml)。室温下过夜搅拌后倒入硅胶上, 并用 60% 乙酸乙酯/己烷洗脱和重结晶 (氯仿/己烷), 得到 0.35 g 标题化合物; mp 180-182 °C。

#### 实施例 6

1-[4-二乙基氨基苯基]-3-[4-喹啉基]-2-丙炔-1-酮

步骤 c:  $\alpha$ -[4-喹啉基]乙炔基-[4-二乙基氨基]-苯甲醇

将 4-溴喹啉 (2.08 g, 10 mmol)、 $\alpha$ -[乙炔基]-[4-二乙基氨基]苯甲醇 (实施例 1, 步骤 b)

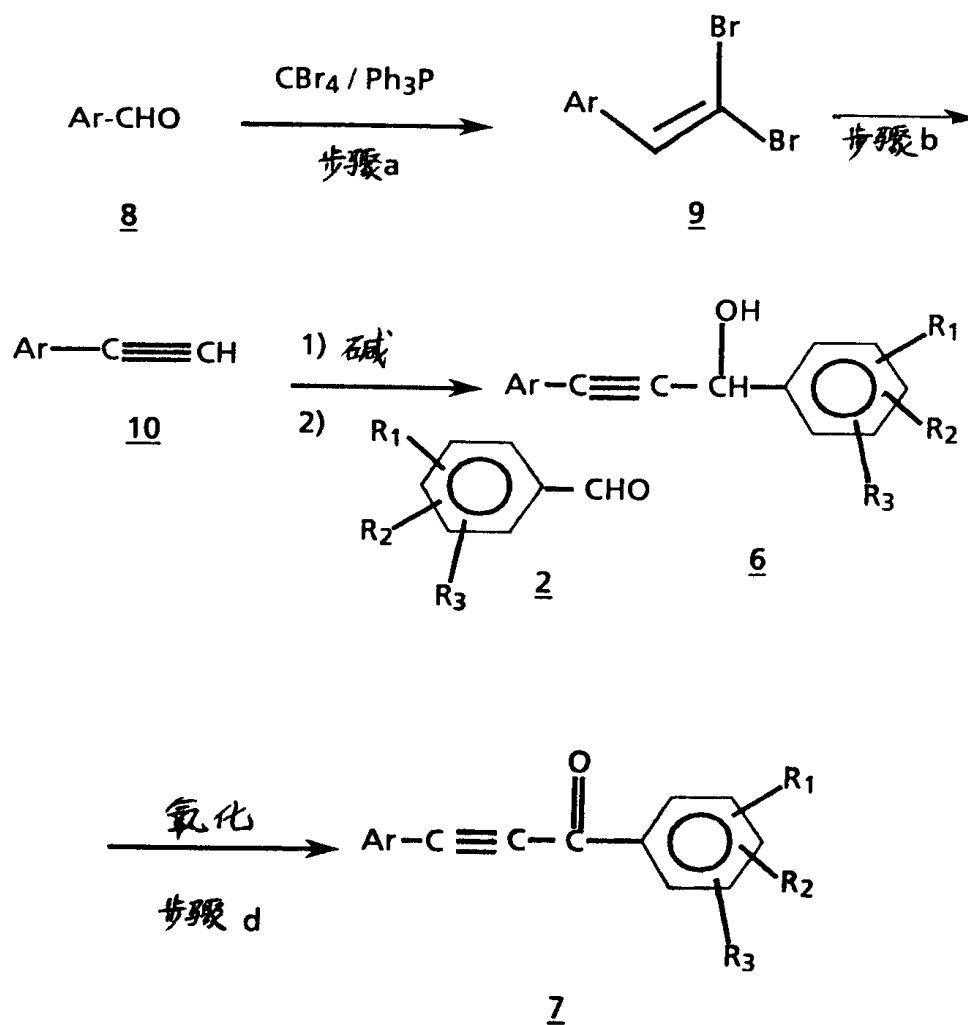
(2.10 g, 12 mmol) 和二乙胺 (50 ml) 置于氩气环境下。加入双(三苯膦)氯化钯(II) (230 mg) 及碘化铜(I) (35 mg) 后于室温搅拌 3 小时。滤掉固体, 真空蒸发二乙胺, 再经硅胶层析 (60% 乙酸乙酯/己烷) 纯化和重结晶 (20% 乙醚/己烷) 后得到 1.9 g 标题化合物; mp 115–117 °C。

步骤 d: 1-(4-二乙基氨基苯基)-3-(4-喹啉基)-2-丙炔-1-酮

将  $\alpha$ -[(4-喹啉基)乙炔基]-(4-二乙基氨基)-苯甲醇 (1.81 g, 6 mmol) 和二氯甲烷 (100 ml) 混合并于冰水浴上冷却。加入锰酸钡 (2.31 g, 9 mmol) 并移去冷却浴, 于室温搅拌 16 小时后倒入硅胶上, 用 60% 乙酸乙酯/己烷洗脱和重结晶 (氯仿/己烷), 得到 0.51 g 标题化合物; mp 163–165 °C。

或者, 按照反应路线 B 所提出的方法制备式 (I) 化合物, 其中所有取代基的定义如前所述 (除非另有说明)。

## 反应路线 B



一般地，在四步骤方法中可制备 1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮化合物（结构式 7）。

在步骤 a 中，通过合适的芳基醛化合物（结构式 8）与四溴化碳和三苯膦在合适的非质子传递溶剂（如二氯甲烷中）反应可制备结构式 9 的合适 2', 2'-二溴苯乙烯。

在步骤 b 中，通过将合适的 2', 2'-二溴苯乙烯化合物（结构式 9）在合适的非质子传递溶剂（如四氢呋喃）中与非亲核碱（如正丁基锂）反应可制备合适的芳基乙炔化合物（结构式 10）。

在步骤 c，可通过以下方式制备合适的  $\alpha$ -[(芳基)乙炔基]-苯甲醇化合物（结构式 6）：首先将结构式 10 的合适芳基乙炔与非亲核碱（如六甲基二硅氮烷基锂）反应，然后将所产生的乙炔化锂与合适的苯甲醛化合物（结构式 2）反应，从而产生适当的  $\alpha$ -[(芳基)乙炔基]-苯甲醇化合物（结构式 6）。

在步骤 d，利用本技术领域熟知且在反应路线 A 中已叙述过的技术和方法将合适的  $\alpha$ -[(芳基)乙炔基]-苯甲醇化合物（结构式 6）氧化成相应的 1-苯基-3-芳基-2-丙炔-1-酮化合物（结构式 7）。

用于反应路线 B 所述总的合成方法的起始物，本领域普通技术人员易于获得。

以下实施例代表了反应路线 B 所述的典型合成。这些实施例应当仅看作是对本发明的说明而不是对本发明范围的任何限制。

## 实施例 7

1-苯基-3-(2-咪唑基)-2-丙炔-1-酮

步骤 a: 2-(2', 2'-二溴乙烯基)-咪唑

混合四溴化碳 (49.8 g, 150 mmol) 和二氯甲烷 (75 ml) 并冷却至 0 °C。向其中滴加三苯膦 (78.6 g, 300 mmol) 的二氯甲烷 (75 ml) 溶液。于 0 °C 搅拌 30 分钟后, 再滴加 2-咪唑-羧醛 (7.57 g, 78.8 mmol) 的二氯甲烷 (75 ml) 溶液。移去冷却浴, 并于室温下搅拌, 直至反应完全。倒入乙醚和水上后分离有机层, 并干燥 (MgSO<sub>4</sub>)。过滤, 真空蒸发溶剂。再通过硅胶层析纯化后得到标题化合物。

步骤 b: 2-咪唑基乙炔

将 2-(2', 2'-二溴乙烯)咪唑 (5.6 g, 22.3 mmol) 和四氢呋喃 (70 ml) 置于氩气环境下并冷却至 -78 °C。滴加正丁基锂 (18.7 ml 于己烷中的 2.5 M 溶液, 46.8 mmol)。于 -78 °C 搅拌 1 小时后移去冷却浴, 并于室温下搅拌至反应完全。倒入乙醚和水中后分离有机层, 用 MgSO<sub>4</sub> 干燥: 经过滤、真空蒸发溶剂和通过硅胶层析纯化后产生标题化合物。

步骤 c:  $\alpha$ -(2-咪唑基)乙炔基-1-苯甲醇

将六甲基二硅氮烷基锂 (3 ml 于四氢呋喃中的 1 M 溶液, 3 mmol) 置于氩气环境下并冷却至 0 °C。加入 2-咪唑基乙炔 (276 mg, 3 mmol) 的四氢呋喃 (20 ml) 溶液, 并于 0 °C 搅拌直至阴离子形成完全。加入苯甲醛 (297 mg, 2.8

mmol)的四氢呋喃溶液，移去冰浴，于室温下搅拌直至反应完全。倒入乙醚和水中，分离有机层，并干燥(MgSO<sub>4</sub>)。过滤，真空蒸发溶剂，再通过硅胶层析纯化后产生标题化合物。

步骤d：1-苯基-3-(2-咪唑基)-2-丙炔-1-酮  
将重铬酸吡啶鎓(0.75g, 2mmol)和二氯甲烷(15ml)置于氩气环境下并冷却至0℃。加入α-[2-咪唑基)乙炔基]-苯甲醇(297mg, 1.5mmol)。过夜搅拌，缓慢温热至室温。用乙醚稀释并滤掉铬盐。通过硅胶层析纯化后得到标题化合物。

#### 实施例8

1-苯基-3-(苯硫-2-基)-2-丙炔-1-酮

步骤a：2-(2', 2'-二溴乙烯基)-噻吩

将四溴化碳(49.8g, 150mmol)和二氯甲烷(75ml)混合并冷却至0℃。滴加三苯膦(78.6g, 300mmol)的二氯甲烷(75ml)溶液。于0℃搅料30分钟。并滴加2-噻吩-羧醛(8.75g, 78.8mmol)的二氯甲烷(75ml)溶液。移去冷却浴；并于室温搅拌至反应完全。倒入乙醚和水中，分离有机层并干燥(MgSO<sub>4</sub>)。过滤并真空蒸发溶剂，再通过硅胶层析纯化后得到标题化合物。

步骤b：(苯硫-2-基)乙炔

将2-(2', 2'-二溴乙烯基)噻吩(5.97g, 22.3mmol)和四氢呋喃(70ml)置于氩气环境下并冷

却至 $-78^{\circ}\text{C}$ 。滴加正丁基铵于己烷中的 $18.7\text{ ml } 2.5\text{ M}$ 溶液， $46.8\text{ mmol}$ 。于 $-78^{\circ}\text{C}$ 搅拌1小时后，移去冷却浴，并于室温下搅拌至反应完全。然后将它们倒入乙醚和水上，分离有机层并干燥( $\text{MgSO}_4$ )。过滤并真空蒸发溶剂。通过硅胶层析纯化后得到标题化合物。

步骤c： $\alpha$ -[ (苯硫-2-基)乙炔]-1-苯甲醇

将甲基二硅氮烷基锂(于四氢呋喃中的 $3\text{ ml } 1\text{ M}$ 溶液， $3\text{ mmol}$ )置于氩气环境下并冷却至 $0^{\circ}\text{C}$ 。加入(苯硫-2-基)乙炔( $324\text{ mg}$ ， $3\text{ mmol}$ )的四氢呋喃( $20\text{ ml}$ )溶液，并于 $0^{\circ}\text{C}$ 搅拌至阴离子形成完全。加入苯甲醛( $297\text{ mg}$ ， $2.8\text{ mmol}$ )的四氢呋喃溶液，移去冰浴并于室温搅拌至反应完全。倒入乙醚和水中。分离有机层并干燥( $\text{MgSO}_4$ )。过滤，真空蒸发溶剂。再通过硅胶层析纯化后得到标题化合物。

步骤d： $1$ -苯基- $3$ -(苯硫- $2$ -基)- $2$ -丙炔- $1$ -酮

将重铬酸吡啶 铵( $0.75\text{ g}$ ， $2\text{ mmol}$ )和二氯甲烷( $15\text{ ml}$ )置于氩气环境下并冷却至 $0^{\circ}\text{C}$ 。加入 $\alpha$ -[ (2-苯硫基)乙炔基]-1-苯甲醇( $321\text{ mg}$ ， $1.5\text{ mmol}$ )。过夜搅拌，同时缓慢温热至室温。用乙醚稀释并过滤铬盐。再通过硅胶层析纯化后得到标题化合物。

## 实施例9

$1$ -苯基- $3$ -(2-呋喃基)- $2$ -丙炔- $1$ -酮

步骤 a：2-(2', 2'-二溴乙烯基)呋喃

将四溴化碳(49.8 g, 150 mmol)和二氯甲烷(75 ml)混合, 并冷却至0℃。滴加三苯膦(78.6 g, 300 mmol)的二氯甲烷(75 ml)溶液。于0℃搅拌30分钟后滴加2-呋喃-羧醛(7.57 g, 78.8 mmol)的二氯甲烷(75 ml)溶液。移去冷却浴并于室温下搅拌至反应完全。然后倒入乙醚和水中, 分离有机层, 并用MgSO<sub>4</sub>干燥。过滤, 真空蒸发溶剂, 再通过硅胶层析纯化后产生标题化合物。

步骤 b：2-呋喃基乙炔

将2-(2', 2'-二溴乙烯基)呋喃(5.6 g, 22.3 mmol)和四氢呋喃(70 ml)置于氩气环境下, 并冷却至-78℃。滴加正丁基锂(于己烷中的18.7 ml 2.5 M溶液, 46.8 mmol)。于-78℃搅拌1小时, 移去冷却浴后于室温下搅拌, 直至反应完全。然后倒入乙醚和水中, 分离有机层并干燥(MgSO<sub>4</sub>)。过滤, 真空蒸发溶剂。通过硅胶层析纯化后得到标题化合物。

步骤 c：α-(2-呋喃基)-乙炔基-苯甲醇

将六甲基二硅氮烷基锂(于四氢呋喃中的3 ml 1 M溶液, 3 mmol)置于氩气环境下并冷却至0℃。加入2-呋喃基乙炔(276 mg, 3 mmol)的四氢呋喃(20 ml)溶液, 于0℃搅拌至阴离子形成完全。加入苯甲醛(297 mg, 2.8 mmol)的四氢呋喃溶液, 移去冰浴, 并于室温搅拌至反应完全。然后倒入乙醚和水中, 分离有机层和干燥(MgSO<sub>4</sub>)。过

滤，真空蒸发溶剂，再通过硅胶层析纯化后得到标题化合物。

步骤 d：1-苯基-3-(2-呋喃基)-2-丙炔-1-酮  
将重铬酸吡啶 铵 (0.75 g, 2 mmol) 和二氯甲烷 (15 ml) 置于氩气环境下并冷却至 0 °C。加入  $\alpha$ -[(2-呋喃基)乙炔基]-1-苯甲醇 (297 mg, 1.5 mmol)。过夜搅拌，同时缓慢温热至室温。用乙醚稀释，并过滤铬盐。再通过硅胶层析纯化后得到标题化合物)。

以下化合物可按照按照类似于以上实施例 1-9 中所述的方法制备：

1-苯基-3-(2-吡啶基)-2-丙炔-1-酮；

1-苯基-3-(1-咪唑基)-2-丙炔-1-酮；

1-苯基-3-(3-咪唑基)-2-丙炔-1-酮；

1-苯基-3-(苯硫-3-基)-2-丙炔-1-酮；

1-苯基-3-(2-呋喃基)-2-丙炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(2-吡啶基)-2-丙炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(3-吡啶基)-2-丙炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(3-咪唑基)-2-丙炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(2-咪唑基)-2-丙炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(1-咪唑基)-2-丙

炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(2-苯硫基)-2-丙

炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(苯硫-3-基)-2-

丙炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(2-咪喃基)-2-丙

炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(3-咪喃基)-2-丙

炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(2-嘧啶基)-2-丙

炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(3-嘧啶基)-2-丙

炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(2-喹啉基)-2-丙

炔-1-酮；

1-(4-二甲基氨基苯基)-3-(3-喹啉基)-2-丙

炔-1-酮。

本发明的一个实施方案提供了一种抑制白细胞中钙摄入的方法。本文所用的术语“抑制”是指任何减慢、干扰、阻止或终止钙摄入到白细胞内的过程，而不一定要求完全地消除钙摄入到受影响之细胞或组织内。

术语钙和钙离子( $\text{Ca}^{+2}$ )在本文中可以互换使用，是指可主动参予白细胞之细胞过程的钙元素及其离子状态。此外，应明确的是，由式(I)的化合物抑制钙摄入白细胞内可影响钙的一种或多种元素状态，并不应限于钙的离子形式和/或其与任何特定相反离子的联系；例如，已知的氯化钙、碳酸钙、氟化钙等，都应被认为是在本文所限定之钙的定义范围内。

钙摄入到白细胞中是白细胞激活的信号过程之一并作为传达到细胞的第二信使。钙的摄入常常要依赖于某些第一信使，如配基与细胞表面受体结合。配基对其受体的结合可打开 $\text{Ca}^{+2}$ 通道，使 $\text{Ca}^{+2}$ 进入细胞溶质，然后发挥其第二信使功能。当细胞被激活时，即可发生与 $\text{Ca}^{+2}$ 流入相应的许多过程，导致或有助于免疫性或炎症性疾病。

白细胞包括一类在组织学和生物化学上不同于免疫系统其他细胞的免疫系统细胞。本文所说的白细胞包括五大类细胞：嗜中性细胞、嗜碱细胞、嗜曙红细胞、巨噬细胞和淋巴细胞。各类细胞又可进一步分成不同的细胞类型；例如，嗜中性细胞可包括多形核白细胞。就其衍生于原始骨髓干细胞来说，各大类白细胞是相互关联的。虽然本文中普遍使用了术语嗜中性细胞，但它是作为说明白细胞作用的例子代表了衍生于骨髓干细胞的所有细胞，而且并不意味着对使用式(I)化合物的任何限制，这些限制可能是阻止任何特定类型白细胞或免疫

系统细胞之作用的原因或征象。再者，该过程内白细胞的作用是限制或终止钙的摄入以影响疾病过程的治愈，但它不受多细胞或组织类型所影响之疾病的限制，而且包含了细胞的复杂相互作用和组织相互作用。本发明的一个实施方案是抑制白细胞中钙的摄入，其中抑制作用导致了对白细胞之吞噬功能的有利调整。因此，可以根据被抑制的功能性对白细胞进行分类；例如，可以使用吞噬细胞或具有吞噬功能之细胞等术语，将包括于本文中称为白细胞的细胞分为不同的群或亚群。

白细胞对各种炎症和免疫状态起反应。在这些过程中，受体激活或整个细胞激活可因其中白细胞被激活而改变了细胞的生理学。术语“激活”常常是指白细胞逐渐被激活的过程或状态，特征在于在细胞渐被激活或保持激活状态时可对钙的摄入起反应。

因白细胞激活而激活的氧化和非氧化机制在许多免疫疾病过程的发展中起着重要作用。作为细胞防御系统的一部分，包括宿主的有害症状和组织损伤，参予白细胞的激活是部分地依赖于钙的。其中白细胞，特别是嗜中性白细胞被认为在宿主症状和组织损伤中起必要作用的非感染性疾病包括痛风、类风湿性关节炎、免疫性脉管炎、肾小球肾炎、中性白细胞性皮肤病、肠道炎性疾病、心肌梗塞、成人呼吸窘迫综合症、肺气肿、哮喘、与溶血有关的热损伤，以及慢性炎症部位的恶性肿瘤 (Malech and Gallin, 1987)。

发现在许多自身免疫病，如痛风、自身免疫性关节炎、自身免疫性脉管炎及某些形式的肾小球肾炎中，嗜中性白细胞积聚于关节部位，并可破坏关节和软组织。虽然许多疾病过程参与这些疾病的病理生理改变，但文献中已明确报导嗜中性白细胞集中到该区域，并可能

对这些疾病的大部分可观察到的组织病理学方面负责。其中，在模型系统中所进行的许多研究已经证明，由嗜中性白细胞激活引起的非氧化过程，特别是嗜中性白细胞弹性蛋白酶及其他蛋白水解和糖酵解酶的释放可直接损伤宿主组织。

许多皮肤病变都与嗜中性白细胞渗入皮肤的外层和真皮组织有关。就其中嗜中性白细胞参予疾病进程的皮肤病来说，其包括但不限于牛皮癣状皮肤病，如见于 Sweet 氏综合症和 Behcet 氏病中的脉管性嗜中性白细胞性皮肤病，以及坏疽性脓皮病。在这些疾病过程中，嗜中性白细胞加剧和维持炎性症状，加重组织损伤并可能进而延缓治愈。

许多其他疾病，如肠道炎性疾病和心肌梗塞都与特定器官内中性白细胞功能有缺陷有关。动物实验研究提示，肠道内嗜中性白细胞循环异常，可导致这些细胞的异常激活。同样，已显示嗜中性白细胞被吸收到心肌组织的梗塞部位并在增加心肌梗塞后组织损伤程度中起作用。

包括成人呼吸窘迫综合症 (ARDS)、肺气肿和哮喘在内的许多呼吸道疾病的发病都与嗜中性白细胞浸润及病情加重有关。嗜中性白细胞介导的肺组织氧化损伤可能是这些呼吸道疾病发病机理中的一个重要组成部分。此外，嗜中性白细胞积聚与弹性蛋白酶的释放可能对发生于肺气肿病变中的组织破坏有重要作用，且可能在变态反应性哮喘病的炎性反应后期起重要作用。变态反应期间嗜中性白细胞释放其成分，可能是由肥大细胞释放组织胺而出现的。

在疾病的一般性发病机理中，嗜中性白细胞活化可能与补体激活有关。已经知道，补体可激活嗜中性白细胞，同时产生羟基自由基。

嗜中性白细胞活化时产生羟基自由基，可能与红细胞脆性有关，而且血管内溶血与补体激活有关。

本文所用的术语“炎症”被看作是一种最常涉及免疫系统中白细胞的过程，并且是参与“炎症状态”的过程。在临床上，炎症的基本征象可包括下列一种或多种症状：红、肿、热、痛、功能丧失及发烧。而伴随炎症而发生的某些细胞活动可包括但不限于白细胞激活、白细胞游动和迁移，以及白细胞渗出。还考虑到，在存在早期或潜在炎症状态的任何条件下，白细胞可能构成其基本病因或可使疾病状态或条件持续存在或发展。其中，卷入炎性状态的过程在本文中被认为包括免疫系统的白细胞和已在“免疫性疾病”患者中作过评述的那些细胞及受可用式(I)化合物处理之白细胞影响的条件。还考虑到，影响钙摄入白细胞的本发明化合物，被认为在有关炎性和/或免疫性疾病状态的改善中是相当有益的。

发展如本发明所述的方法，以消除嗜中性白细胞反应或失活嗜中性白细胞氧化代谢产物及颗粒内容物，对于在这些非感染性炎症性疾病中限制组织破坏将是有益的。

血小板是血液中衍生于骨髓巨核细胞的无核细胞。血小板还参与血液凝固过程并帮助修复血管壁的破损。血小板形成血凝块并修复受损血管组织的反应也有许多有害的副作用；例如，在局部缺血再灌注期间，血栓形成和相关的血小板聚集可最终导致动脉阻塞。本领域内也已充分了解到，动脉和静脉壁的关闭或阻塞可导致心肌梗塞的发生。另外，已知在血液凝固和血栓形成过程中均需要钙；例如，本领域已明确证实，可用能结合钙的EDTA及其他螯合剂来调整凝血反应。因此可以预见，抑制钙摄入血小板内，可使其本身作为一种可行

的方法，借以在治疗上调节血小板激活作用，包括血管活性介质的释放及血小板团聚体的形成，从而将其用于治疗需要这种治疗的病人。

本文所使用的术语“病人”，是指温血动物，如患有特殊免疫性疾病的哺乳动物。应明确的是，狗、猫、大鼠、小鼠、马、牛、羊和人都是本文所指范围内的动物。

据信式(I)的化合物可对白细胞和血小板内钙的摄入发挥其抑制作用，从而提供了在包括炎性和免疫性疾病中参予免疫调节的可靠的钙依赖性机制。但应明确的是，本发明并不只限于任何特定理论或为解释在其有效性及其最终应用而提出的机制。另外，还应明确的是，式(I)化合物这个术语还包括了包括衍生物(1a)、(1b)、(1c)和(1d)在内的其所有残基。

如本领域技术人员所熟知的，某些炎性和免疫性疾病中的各种疾病状态都是以钙摄入白细胞内为特征的。本文所说的导致钙摄入白细胞内的现象，是指导致初始条件的初始现象，或者是与保持炎症或免疫状态相关的现象。此外，本领域技术人员也很清楚，某些心血管疾病的特征即在于存在导致血小板内钙摄入的现象，而且这些现象可以是导致有关病理状态的起始过程，也可以是保持心血管疾病状态的相关过程。

更具体地说，本发明提供了治疗患有白细胞内钙依赖性疾病状态之病人的方法，其中所说的疾病状态可以是但不只限于炎性或免疫性疾病，该方法包括给病人使用抑制钙摄入有效量的式(I)化合物。

抑制钙摄入治疗有效量的式(I)化合物是指所用剂量可有效地控制卷入免疫性疾病状态之白细胞的激活。术语“控制激活”是指所有可以减缓、干扰、阻止或终止免疫性疾病的进程，但不一定要求完

全地消除所有病症。

再者，本领域技术人员也十分了解，某些心血管病的特征即在于存在导致血小板内钙摄入的现象，而且这些现象可以是指导致有关病理状态的起始过程，也可以是维持心血管疾病状态的相关过程。

本发明还提供了治疗患有血小板中钙依赖性疾病状态之病人的方法，其中所说的疾病状态可以是但不只限于心血管病，该方法包括给予病人抑制钙摄入有效量的式(I)化合物。

式(I)化合物的抑制钙摄入治疗上的有效量是指在控制参予心血管疾病状态之血小板功能中有效的剂量。术语控制参予心血管病的血小板功能，是指减缓、干扰、阻止或终止心血管病的进展，而不一定要求完全消除所有病症。

作为本领域技术人员的诊断医师，使用常规技术并观察在类似环境下得到的结果，很容易地确定在免疫或心血管条件或疾病中的治疗上抑制有效量。在确定治疗有效剂量时，诊断医师要考虑许多因素，这些因素包括但不只限于：哺乳动物的品种、其大小、年龄、健康状况、所涉及的特定疾病、疾病的程度或严重性、病人的个体反应性、所使用的特殊化合物、给药方式、所用制剂的生物可利用性特征、选用的剂量、合并使用的药物及其他相关条件等。

式(I)化合物的治疗有效量可从每天每公斤体重约 $0.1\text{mg}$ 至约 $100\text{mg}$ 。优选剂量为大约 $0.5 - 10\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 。

在有效治疗处于上述疾病状态的病人时，可以以治疗有效量，以使化合物能被生物利用的任何方式使用式(I)的化合物，包括口服和胃肠道外给药。例如，可经口服、皮下、肌肉内、静脉内、皮内、鼻内、直肠、局部等途径给药。一般优选的是口服给药。本领域技术

人员可以根据所选化合物的特殊性质、被治疗的疾病状态、病情发展阶段及其他相关条件来选择适当剂型及给药方式。

该化合物可以单独使用，或者与医学上可接受的载体或赋形剂结合制成药物组合物使用，可根据所选化合物的溶解度和化学性质、给药途径及标准医药实践来确定其比例和特征。虽然本发明的化合物自身是有效的，但为了提高稳定性、便于结晶及提高溶解度等目的，可以其医药上可接受的酸加成盐的形式来配制并给药。

在另一实施方案中，本发明提供了包括有效量的式(I)化合物，并混有或结合有一种或多种医药上可接受之载体或赋形剂的医药组合物。术语“抑制钙摄入有效量”当用于式(I)的化合物时，是指适于抑制白细胞中钙摄入的有效抑制量，其中所说的抑制作用是针对患有免疫或炎性疾病之病人的。另外，当用于式(I)的化合物时，术语“抑制钙摄入有效量”也是指适于抑制血小板中钙摄入的有效抑制量，其中所说的抑制作用是针对患有心血管系统疾病之病人的。

可按医药领域中已知的方法制备该医药组合物。可作为活性成分之载体或介质的药用载体或赋形剂可以是固体、半固体或液体材料。适用的载体或赋形剂是本领域中已知的。该医药组合物可适于口服、胃肠道外或局部使用，并可以片剂、胶囊剂、栓剂、溶液剂、悬浮剂等形式给药。

本发明的化合物可以与惰性稀释剂或可食用载体一起口服给药。可以将其包装在白明胶胶囊中或者压成药片。为口服治疗给药之目的，化合物内可掺入赋形剂，并可以片剂、锭剂、胶囊剂、酏剂、悬浮剂、糖浆、囊剂、可嚼树脂胶等形式使用。这些制剂中，作为活性成

分至少应含有4%的本发明化合物，但可根据不同剂型有所变化，且通常可在单位重量的4%至大约70%之间。存在于组合物中之化合物的量应能达到适当剂量。最好将根据本发明的组合物和制剂制成口服剂量单位形式，且可含有5.0—300mg本发明的化合物。

片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等还可含有一种或多种下列辅助剂：粘结剂如微晶纤维素、黄耆胶或白明胶；赋形剂如淀粉或乳糖；崩解剂如藻酸、Primogel、玉米淀粉等；润滑剂如硬脂酸镁或Sterotex；助流剂如胶体二氧化硅；增甜剂如蔗糖或糖精；或香味剂如薄荷、水杨酸甲酯或橙香剂。如剂量单位形式是胶囊时，除含上述材料外，还可含有聚乙二醇或脂油等液态载体。其他剂量单位形式可含有其他各种改变该剂量单位之物理形式的材料，如包被剂。为此，可用糖、紫胶或其他包被剂包被片剂或丸剂。糖浆剂除含有本发明化合物外，还可含有蔗糖作为甜味剂、某些防腐剂、染料、着色剂及食用香料。用于制备上述各种组合物的材料应是药物纯的，并且在所用剂量下是无毒的。

为了进行胃肠道外治疗给药，可将本发明的化合物掺入溶液或悬浮液中。这些制剂至少应含有占其重量0.1%的本发明化合物，但可以在0.1—50%之间变化。存在于这些组合物中的本发明化合物的量应能达到适当的剂量。最好将根据本发明的组合物和制剂制成含有5.0—100mg本发明化合物的胃肠道外给药的剂量单位。

本发明的式(I)化合物也可以局部给药，此时载体可适当地包含溶液、软膏或凝胶基剂。例如，基剂可包括一种或多种下列材料：凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、水和醇等稀释剂，以及乳化剂和稳定剂。局部给药的配方中可含有约0.1—10%(w/v)

的式(I)化合物或其医药上可接受的盐。

溶液或悬浮液还可含有一种或多种下列辅助剂：无菌稀释剂如注射用水、盐水、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂；抗菌剂如苯甲醇或羟苯甲酸甲酯；抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂如乙二胺四乙酸；缓冲剂如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐；以及调节溶液离子强度的试剂如氯化钠或右旋糖。胃肠道外给药的制剂可以封装在玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶内。

应指出的是，本文所使用的下列术语和缩写符号彼此是可以替代使用的：多形核白细胞(PMNL)，(4-(2-羟乙基)-1-哌嗪-乙磺酸(HEPES)、用于表示离心期间所产生之离心力的重力的倍增因数(Xg)、毫升(mL)、摄氏度(°C)、钙离子(Ca<sup>+2</sup>)、毫微米(nm)、二甲基亚砷(DMSO)、亚乙基双(氧亚乙基次氨基)四乙酸(EGTA)、克(g)、毫克(mg)、毫微克(ng)、摩尔(M)、毫摩尔(mM)、微摩尔(μM)、调理化酵母聚糖(OZ)、佛波醇肉豆冠酸乙酸酯(PMA)、甲酰-甲硫氨酰-亮氨酰-苯丙氨酸(fMLP)、白三烯B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)。

常常用一个三字母缩写符号“MDL”、一个空格、及一个5或6位数字来代表这些化合物。其中应了解的是下列有代表性的化合物：1-苯基-3-((4-苄氧基)苯基)-2-丙炔-1-酮(MDL 100, 225)；1-苯基-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮(MDL 101, 098)；1-(4-二甲氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙炔-1-酮(MDL 102, 175)；1-苯基-3-((4-苄氧基)苯基)-2-丙炔-1-酮(MDL

101, 097); 1-(4-二甲氨基苯基)-3-(4-吡啶基)-2-丙烯-1-酮(MDL 101, 240); 1-苯基-3-(4-吡啶基)-2-丙烯-1-酮(MDL 29, 355); 1-(4-二乙氨基苯基)-3-(4-喹啉基)-2-丙炔-1-酮(MDL 102, 387)。

可在体外检测细胞内钙或检测所释放的过氧化物阴离子、髓过氧化物酶等因子来估计白细胞对激活信号(刺激剂)的反应。另外,可用动物水肿模型来估计白细胞对体内刺激的反应,如可使用角叉胶诱导的大鼠爪水肿模型、佐剂诱导的路易斯大鼠关节炎模型,以及大鼠皮肤中的 Arthus 反应。本发明人已证实所要求化合物的使用方法及其在前述检测方法中的实用性。

### 材料

Sprague - Dawley 大鼠(150 - 250g) 得自 Harlan Sprague - Dawley (Indianapolis, IN)。添加 20mM HEPES 并调到 pH 7.4 的 Hank 氏平衡盐(HBSS, Gibco, Grand Island, NY)。酪蛋白酸钠购自 ICN Biochemical (Cleveland, OH)。Fura-2/AM 购自 Molecular Probes (Eugene, OR)。离子霉素(Ionomycin) 购自 Cal Biochem. (San Diego, CA)。过氧化物歧化酶购自 DDI Pharmaceuticals (Mountain View, CA)。所有其他试剂均得自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。所有购买的试剂都在收到后即使用。

### 多形核白细胞(PMNL)的分离

腹腔注射 6 mL 80% 酪蛋白酸钠后,从腹腔渗出液中得到大鼠

PMNL。注射后18小时，用二氧化碳吸入法杀死大鼠，用Hank氏平衡盐溶液(HBSS)冲洗腹腔。离心浓缩PMNL后，经高渗溶解法除去污染的红细胞。然后将PMNL离心洗涤( $400 \times g$ ，10分钟)两次并重新悬浮于HBSS中。经锥虫兰排除试验证明细胞存活率大于90%，且经Wright-Giemsa染色证明90%以上的细胞是PMNL。

### 细胞内钙的测定

使用Fura-2作为荧光指示剂(Grynkiwicz et al., 1985)测得细胞内钙水平。使用Korchak等人(1988)的方法使Fura-2作乙酰基甲基酯(Fura-2/AM)填入PMNL中。具体地说，使 $1 \times 10^8$ 个PMNL/mL在HBSS中与 $10 \mu M$  Fura-2/AM于 $37^\circ C$ 保温10分钟。用HBSS将细胞悬液稀释10倍并继续保温20分钟。然后离心(在 $25^\circ C$ 下以 $400 \times g$ 离心8分钟)分离细胞，并且将PMNL( $1 \times 10^7$ 细胞/毫升)重新悬浮于含有1%牛血清白蛋白的HBSS中。细胞于室温保存并在3小时内使用。

使用双波长荧光光度计(Photon Technology International, New Brunswick, NJ)测定细胞内钙水平。2 mL PMNL悬浮液( $1 \times 10^7$ 个细胞/mL)于 $37^\circ$ 下进行磁力搅拌。细胞与化合物于 $37^\circ C$ 预保温15分钟，然后即活化之。此时将化合物溶解于DMSO中并直接加入细胞悬液内，终细胞悬液内的DMSO不超过0.3%。加入化合物或载体及刺激剂所引起的总的体积改变不超过3%。随着向悬浮于含1%BSA之HBSS中的PMNL内加入 $7 \mu M$ 离子霉素(ionomycin)确

定最大钙水平，以校准细胞内钙浓度。然后用 20 mM EGTA 处理 1 小时，以得到最小钙水平。使用 Grynkiewicz 等人 (1985) 的方法定量分析细胞内钙水平，并假定 Fura-2 的  $K_D$  为 240 nM。在三个不同的时刻进行并重复各实验，而且钙改变的图形代表了这些重复实验的典型数据。

### 髓过氧化物酶 (MPO) 释放

使用 MPO 催化的邻联茴香胺的氧化作用来检测 MPO 释放。实验是在 96 孔微量滴定板 (Webster and Henson, 1978) 中进行的。各孔中的 50  $\mu$ l 等分的 PMNL 悬浮液 ( $2 \times 10^7$  细胞/mL, 在 HBSS 中) 加入 50  $\mu$ l 含有载体 (0.3% DMSO) 或抑制剂的 HBSS, 于 37  $^{\circ}$ C 下保温 30 分钟。DMSO 的终浓度绝不要超过 0.3%, 而且在各实验的整个过程中均保持不变。为激活 PMNL, 加入 50  $\mu$ l 下列物质中的一种并于 37  $^{\circ}$ C 下保温 30 分钟: N-甲酰-Met-Leu-Phe (fMLP; 0.1  $\mu$ M)、佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯 (PMA, 200 ng/mL)、或大鼠血清调理的酵母聚糖 (OZ; 2.6  $\mu$ g/mL, 按 Ward 等人, 1983 所述方法制备)。可向含有化合物或载体的 50  $\mu$ l HBSS 中加入刺激剂, 以避免改变抑制剂浓度。于 22  $^{\circ}$ C 下以 600  $\times$ g 将滴定板离心 5 分钟, 以终止细胞激活过程。由各小孔内除去等分的上清液 (100  $\mu$ l), 移入 96 孔平底微量滴定板中进行 MPO 分析。向各等份上清液内加入 100  $\mu$ l 新制备的含有 50  $\mu$ l 0.2 M 磷酸钠缓冲液 (pH 6.2)、25  $\mu$ l 3.9 mM 邻联茴香胺和 25  $\mu$ l 0.015 M 过氧化氢的溶液。用不含过氧化氢的同一溶液作为空白对照。混合各孔内容物并在暗处室温下保温约 15 分钟。测定样品在

450 nm 处的吸光率。

### 过氧化物阴离子(SOA)的产生

使用 Leslie (1987) 所述者相似的方法检测过氧化物阴离子的产生, 实验是在过氧化氢酶存在下, 用微量滴定板完成的 (Arthur et al., 1987)。大鼠 PMNL 悬浮液 ( $2 \times 10^7$  个细胞, 在 HBSS 中) 的等分样品 ( $50 \mu l$ ) 与  $50 \mu l$  含有载体 (0.3% DMSO) 或化合物的 HBSS 在  $37^\circ C$  下保温 30 分钟。然后向各样品中加入  $100 \mu l$  含有  $5.98 mg/ml$  细胞色素 C (Sigma III 型) 和  $0.1 mg/ml$  过氧化氢酶, 并适当情况下加有化合物的缓冲液。进行分光光度检测的空白对照孔中含有未被刺激的细胞及细胞色素 C、过氧化氢酶和 SOD。为了激活 PMNL, 加入  $75 \mu l$  PMA 或 OZ 以达到细胞激活剂的终浓度 (再加如上所述的 MPO 释放中的载体或抑制剂), 并于  $37^\circ C$  继续保温 60 分钟。于  $4^\circ C$  下以  $600 \times g$  离心 5 分钟以终止激活过程。然后将上清液的等分样品 ( $200 \mu l$ ) 移入第二个平底微量滴定板中, 并在 550 nm 处进行分光光度检测。

## 实施例 10

### 各种刺激剂对 PMNL 细胞内钙的影响

用 fMLP 刺激预充填 Fura-2 的大鼠 PMNL，并定时监测细胞内钙的水平（图 1）。趋化肽 fMLP 产生了双相反应，第一个峰在给予肽刺激物 30 秒钟后达到最大值，第二个峰在给予肽刺激物后 100 秒钟达到最大值。

该双相反应与 korchak 等人对人嗜中性白细胞所作实验的结果一致，其中反应峰相当于细胞内钙的早期释放（如由对 LTB<sub>4</sub> 的反应产生的）。相当于刺激后约 100 秒出现的第二个峰的第二个反应相与细胞外钙的流入有关。本领域技术人员可以理解到，双相反应意味着第一个相是细胞内钙的释放，第二个相当于细胞外钙的流入。

将 PMNL 与 MDL 102, 175、MDL 102, 387 或 MDL 101, 098 在附图 1 所示浓度下预保温后导致细胞内钙改变的第二个曲线的选择性浓度依赖性抑制。可以看出，由 MDL 102, 175、MDL 102, 387 和 MDL 102, 387 的活性所代表的式 (1) 化合物对第二个反应峰的抑制，有效地抑制了被处理之 PMNL 的钙摄入。但是，在高浓度 ( $> 100 \mu\text{m}$ ) 时，化合物开始影响第一相（数据未示出）。对照反应——其中式 (1) 化合物未包括在 fMLP 刺激物中，也显示出所观察到的双相反应。

### 实施例 1 1

化合物对大鼠 PMNL 酶释放及过氧化物阴离子产生的影响

在含有  $Ca^{+2}$  的 HBSS 中分离鼠 PMNL。如下表所总结的，在细胞松弛素 B 存在下、或在加入调理的酵母多糖或离子霉素的情况下，用 fMLP 刺激大鼠 PMNL 可导致髓过氧化物酶的释放（fMLP/MPO、OZ/MPO 和 ION/MPO，分别见 2、4 和 6 栏）。加入 MDL 102, 175 或 MDL 101, 098，显示出在给定浓度下对两种反应的剂量依赖性抑制。同样，PMA 和 OZ 所诱导的过氧化物阴离子的产生也被所加入的 MDL 102, 175 或 MDL 101, 098 以剂量依赖性方式所抑制（PMA/SOA 和 OZ/SOA 分别见第 2 和第 10 栏）。这些数据也与在大鼠丧失细胞外钙情况下所看到的影响相符（数据未示出）。

## 刺激物对MDL 102, 175抑制鼠

### PMN MPO和SOA的影响

1 浓度 ( $\mu\text{M}$ ) MDL 102,175	2 IMLP/MPO	3 SEM	4 OZ/MPO	5 SEM	6 ION/MPO	7 SEM	8 PMA/SOA	9 SEM	10 OZ/SOA	11 SEM
100	113.1	2.3	117.8	2.6	83.4	14.3	100.0	2.6	89.8	4.3
30	104.5	2.4	106.7	2.4	20.5	8.6	77.7	9.2	75.7	2.1
10	70.6	6.2	78.5	7.9	21.3	6.3	49.7	12.7	44.1	5.8
3	27.9	8.0	26.6	5.2	1.5	8.7	13.5	8.2	15.4	4.3
1	12.6	7.8	16.9	7.3	0.8	2.2	-20.2	11.3	-15.0	6.2

SEM是前面各编号实验之均值的标准误

## 刺激物对MDL 101, 098抑制鼠PMN

### MPO和SOA的影响

1 浓度 ( $\mu\text{M}$ ) MDL 102,175	2 IMLP/MPO	3 SEM	4 OZ/MPO	5 SEM	6 ION/MPO	7 SEM	8 PMA/SOA	9 SEM	10 OZ/SOA	11 SEM
100	96.2	1.8	97.2	4.5	88.4	4.1	97.2	2.3	115.0	10.1
30	80.8	9.0	92.2	1.1	12.7	2.7	70.0	10.3	61.5	8.3
10	34.9	5.7	48.7	8.6	5.7	2.5	29.1	5.8	20.3	5.0
3	7.5	6.1	14.7	7.7	0.0	1.3	-4.3	10.6	-7.5	6.6
1	2.9	4.4	5.4	10.9	-2.8	0.7	-30.7	7.9	-18.0	3.9

SEM是前面各编号实验之均值的标准误

## 实施例 1 2

### 芥子油诱导的小鼠耳水肿

将体重 30—60 g 的 Charles River 雄性 CD-1 小鼠随机地分成几组。在胶膜注射前 30 分钟或口服给药前 1 小时，将它们的右耳注射 20  $\mu$ l 芥子油（于丙酮中的 10% 异硫氰酸盐）。30 分钟后处死小鼠。从每耳钻取直径 8 mm 的活组织进行检查并称重。用重量增加的百分数表示左耳（对照组）和右耳（处理组）重量的不同。芥子油诱导的小鼠耳水肿试验结果示于下表。

### 芥子油诱导的小鼠耳水肿

化合物	剂量 (mg/kg)	给药途径	抑制百分数
MDL101,098	100	腹膜注射	68.2 $\pm$ 5.8
	30		56.8 $\pm$ 6.4
	10		38.6 $\pm$ 13.1
MDL101,098	100	口服	43.9 $\pm$ 15.6
	30		6.4 $\pm$ 27.7
	10		38.5 $\pm$ 34.9

MDL102,175	100	腹膜注射	68.2±5.8
	30		56.8±6.4
	10		38.6±13.1
MDL102,175	100	口服	43.9±15.6
	30		6.4±27.7
	10		38.5±34.9

### 实施例 13

#### 角叉胶诱导的大鼠爪水肿

使用体重为 90—100 g 的 Charles River 雄性 Sprague Dawley 大鼠。在爪的底部表面注射 1% 角叉胶溶液 (0.05 cc) 以诱导左右爪的炎症。对照爪则注射等体积的盐水。爪部注射之前 1 小时口服或腹腔内注射药物 (1 cc/100 g)。角叉胶注射后 3 小时检测对照爪和发炎爪之体积的差异。将各爪浸入水银池内并记录所排除之水银的体积。将动物爪均匀地浸入水银中, 达到毛与皮肤结合部分之细线的开始处。使用连有线路记录仪的静脉压转换器检测所排出之水银的微小体积变化。各组检测均取 4 只大鼠的平均值, 每组各检测 3 次。角叉胶诱导的大鼠爪水肿试验的结果如下所示。

### 角叉胶诱导的大鼠爪水肿

化合物	途径	抑制%
MDL 101, 098	口服	42.4
MDL 102, 175	口服	19.8
MDL 101, 098	腹膜注射	64.8
MDL 102, 175	腹膜注射	73.2

