

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 31/165

C07C233/65 A61P 43/00



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00805452.5

[45] 授权公告日 2005 年 3 月 23 日

[11] 授权公告号 CN 1193748C

[22] 申请日 2000.2.10 [21] 申请号 00805452.5

[30] 优先权

[32] 1999. 2.23 [33] US [31] 60/135,511

[32] 1999. 8.31 [33] US [31] 09/386,601

[86] 国际申请 PCT/US2000/003663 2000.2.10

[87] 国际公布 WO2000/050026 英 2000.8.31

[85] 进入国家阶段日期 2001.9.24

[71] 专利权人 安克进药物公司

地址 美国北卡罗来纳州

[72] 发明人 G·A·麦克诺顿 - 史密斯

G·C·里格登 J·W·施特克尔

审查员 雷耀龙

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 7 页 说明书 33 页 附图 1 页

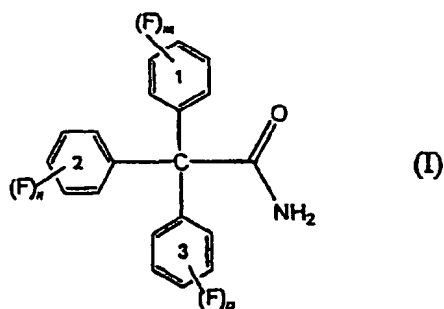
[54] 发明名称 Gardos 通道拮抗剂

[57] 摘要

本发明公开了新型的钾流通抑制剂。相对于非氟取代的同类物,这些抑制剂表现出令人惊讶的对生物介质中降解的抗性和提高的体内半衰期。这些化合物的使用方法包括治疗镰刀形细胞病、预防红细胞脱水和抑制钾流通。

ISSN 1000-4742

1.一种具有如下结构的化合物:



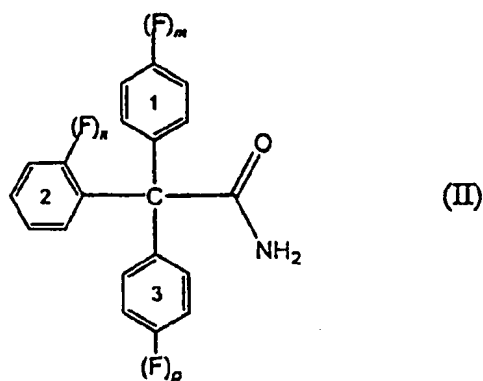
5 其特征在于, 其中,

m、n 和 p 各选自 0 和 1, 且 m、n 和 p 中至少一个是 1;

当 m、n 和 p 都是 1 时, 环 1 和环 2 上的氟取代基各位于如下位置: 乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位或乙酰胺取代基的对位; 环 3 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的对位; 和

10 当 p 是 0, m 是 1 和 n 是 1 时, 环 1 上的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位, 环 2 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位或乙酰胺取代基的对位。

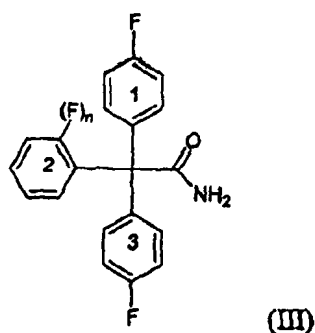
2.如权利要求 1 所述的具有如下结构的化合物:



其特征在于, 其中

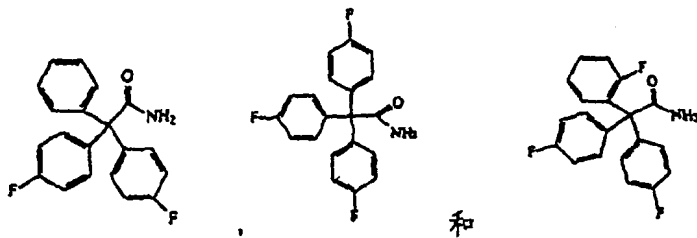
15 m、n 和 p 各选自 0 和 1, 且 m、n 和 p 中至少一个是 1。

3.如权利要求 2 所述的具有如下结构的化合物:

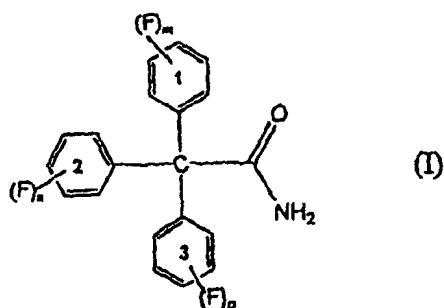


其特征在于,  $n$  是 0 或 1。

4.如权利要求 1 所述的化合物, 其特征在于, 所述的化合物的结构选自:



5. 一种药物组合物, 它包含与药学上可接受的赋形剂混合的化合物, 所述的化合物具有如下结构:



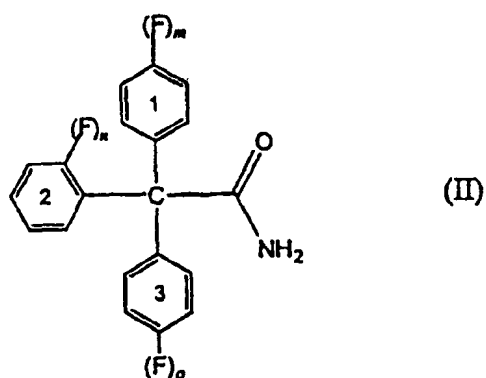
其特征在于, 其中

$m$ 、 $n$  和  $p$  各选自 0 和 1, 且  $m$ 、 $n$  和  $p$  中至少一个是 1;

10 当  $m$ 、 $n$  和  $p$  都是 1 时, 环 1 和环 2 上的氟取代基各位于如下位置: 乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位或乙酰胺取代基的对位; 环 3 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的对位; 和

当  $p$  是 0,  $m$  是 1 和  $n$  是 1 时, 环 1 上的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位, 环 2 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位或乙酰胺取代基的对位。

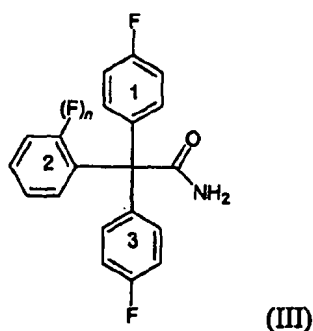
15 6.如权利要求 5 所述的药物组合物, 所述的化合物具有如下结构:



其特征在于, 其中

m、n 和 p 各选自 0 和 1, 且 m、n 和 p 中至少一个是 1。

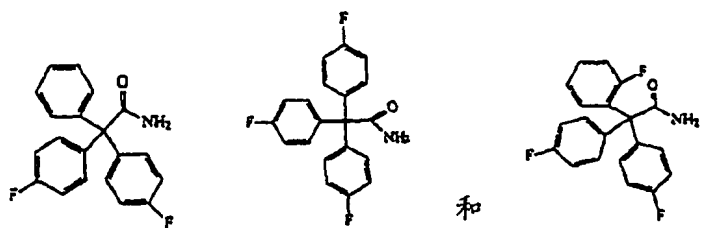
7.如权利要求 6 所述的药物组合物, 所述的化合物具有如下结构:



5

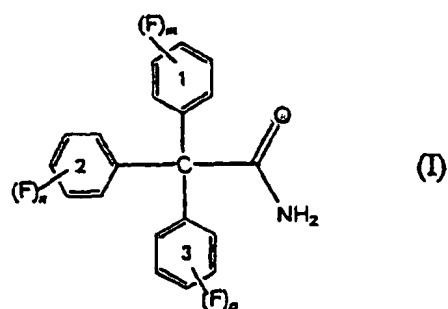
其特征在于, n 是 0 或 1。

8.如权利要求 5 所述的药物组合物, 其特征在于, 所述的化合物的结构选自:



10

9.一种体外抑制细胞钾流通的方法, 其特征在于, 所述的方法包括将所述的细胞与有效量的具有如下结构的化合物接触:



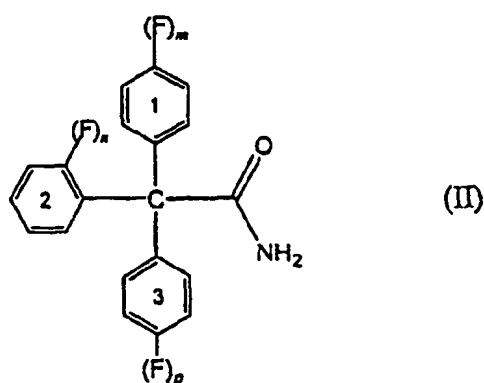
其中

m、n 和 p 各选自 0 和 1，且 m、n 和 p 中至少一个是 1；

当 m、n 和 p 都是 1 时，环 1 和环 2 上的氟取代基各位于如下位置：乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位或乙酰胺取代基的对位；环 3 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的对位；和

当 p 是 0，m 是 1 和 n 是 1 时，环 1 上的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位，环 2 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位或乙酰胺取代基的对位。

10.如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述的化合物具有如下结构：

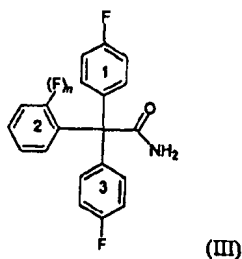


10

其中

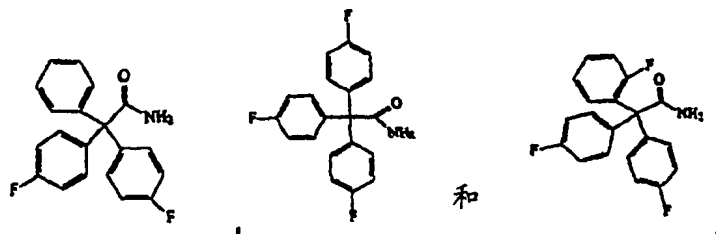
m、n 和 p 各选自 0 和 1，且 m、n 和 p 中至少一个是 1。

11.如权利要求 8 所述的方法，所述的化合物具有如下结构：



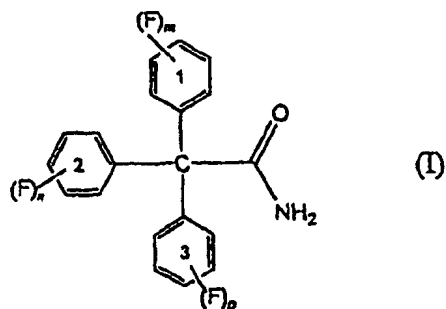
其特征在于,  $n$  是 0 或 1。

12. 如权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 所述的化合物的结构选自:



13. 如权利要求 9 所述的方法, 其特征在于, 所述的细胞是红细胞。

5 14. 一种体外减少红细胞脱水的方法, 其特征在于, 所述的方法包括将红细胞与剂量能有效减少脱水的化合物接触, 所述的化合物具有如下结构:



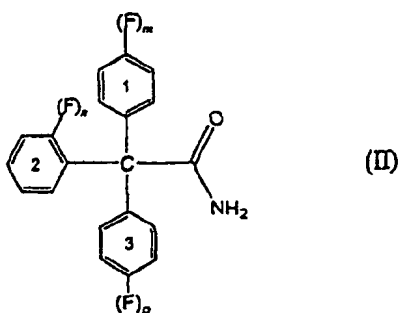
其中

$m$ 、 $n$  和  $p$  各选自 0 和 1, 且  $m$ 、 $n$  和  $p$  中至少一个是 1;

10 当  $m$ 、 $n$  和  $p$  都是 1 时, 环 1 和环 2 上的氟取代基各位于如下位置: 乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位或乙酰胺取代基的对位; 环 3 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的对位; 和

当  $p$  是 0,  $m$  是 1 和  $n$  是 1 时, 环 1 上的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位, 环 2 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位或乙酰胺取代基的对位。

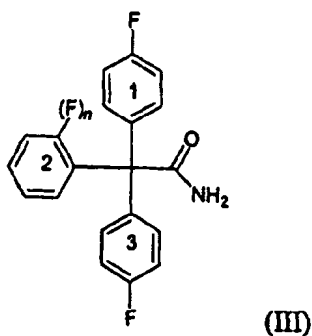
15 15. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述的化合物具有如下结构:



其中

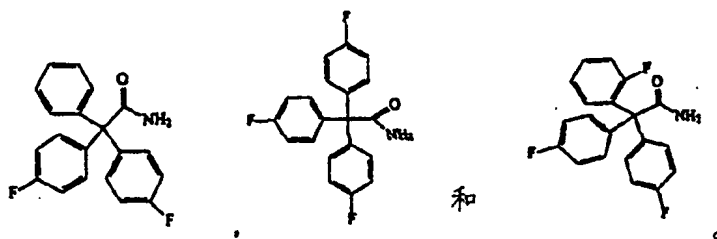
m、n 和 p 各选自 0 和 1，且 m、n 和 p 中至少一个是 1。

16. 如权利要求 15 所述的方法，所述的化合物具有如下结构：

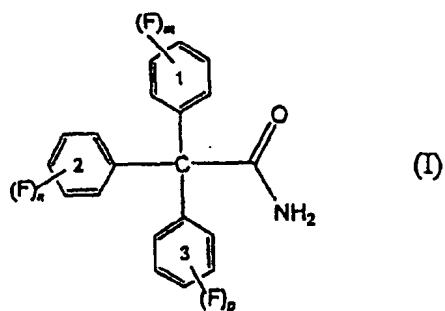


5 其特征在于，n 是 0 或 1。

17. 如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述的化合物的结构选自：



18. 具有如下结构的化合物在制备治疗或预防镰刀形细胞病的药物中的应用：



10

其中

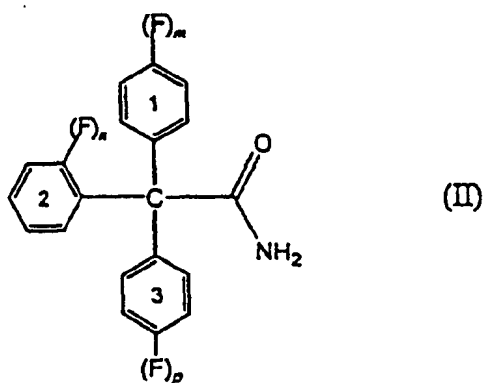
m、n 和 p 各选自 0 和 1，且 m、n 和 p 中至少一个是 1；

当 m、n 和 p 都是 1 时，环 1 和环 2 上的氟取代基各位于如下位置：乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位或乙酰胺取代基的对位；环 3 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的对位；和

15

当  $p$  是 0,  $m$  是 1 和  $n$  是 1 时, 环 1 上的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位, 环 2 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位或乙酰胺取代基的对位。

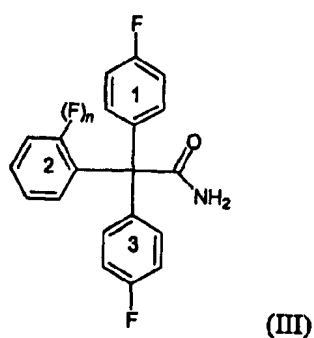
19. 如权利要求 18 所述的应用, 其特征在于, 所述的化合物具有如下结构:



5 其中

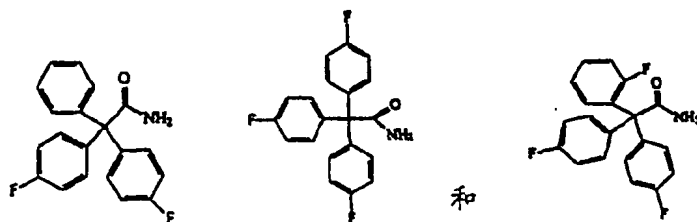
$m$ 、 $n$  和  $p$  各选自 0 和 1, 且  $m$ 、 $n$  和  $p$  中至少一个是 1。

20. 如权利要求 19 所述的应用, 所述的化合物具有如下结构:



其特征在于,  $n$  是 0 或 1。

10 21. 如权利要求 18 所述的应用, 其特征在于, 所述的化合物的结构选自:





## Gardos 通道拮抗剂

## 5 与相关申请的相互参照

本申请要求,享有 1999 年 3 月 24 日申请的 U.S.临时申请 No.60/135,511 的优先权, 本文将其内容全部纳入作为参考。

## 发明领域

10 本发明涉及作为红细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -激活钾通道(Gardos 通道)的特异性、强效和安全的抑制剂的有机化合物。具体说, 本发明涉及氟取代的三芳基甲烷基抑制剂, 其在体外生物介质中表现出明显提高的抗降解耐受性, 且相对于其非氟化同源物表现出延长的半衰期。

## 15 发明背景

镰刀形红细胞病在西非发现已有几个世纪。镰刀形细胞贫血和镰刀形血红蛋白(Hb S)的存在是在分子水平认识到的第一种遗传疾病。现已认识到其形态学和临床结果是由于 $\beta$ 珠蛋白链第 6 位上缬氨酸替代了甘氨酸所致(Ingram, Nature 178:792-794(1956))。此氨基酸的改变以及该疾病状况起源是因单个核苷酸取代的结果(Marotta 等人, J.Biol.Chem.252:5040-5033(1977))。

20 镰刀形细胞病患者发病和死亡的主要原因是由镰刀形细胞导致的血管堵塞, 其造成急性和慢性形式的反复疼痛发作, 随着时间的推移还导致进行性器官损伤。很久以前人们就认识到并接受: 镰刀形细胞完全脱氧合而致的畸形和变形是由镰刀形血红蛋白-血红蛋白 S(Hb S)的聚合和胞内胶凝造成的。Eaton  
25 等人, Blood 70:1245(1987)对此现象进行了详细的综述和讨论。在红细胞通过血管系统过程中的任何时候 Hb S 都可能发生胞内胶凝和聚合。所以, 含有非聚合血红蛋白 S 的镰刀形细胞病患者的红细胞可能通过微循环并返回到肺, 而非镰刀形化也可能在血管中或在毛细管中变成镰刀形。

相对于正常毛细管转运时间胞内胶凝时间的滞后决定了产生这些事件的

各自可能性(Eaton 等人, Blood 47:621(1976))。而滞留时间取决于血红蛋白的氧合状态,脱氧合会缩短滞留时间。如果热动力学上有可能发生胞内胶凝,或若静脉氧压的滞留时间多于 15 秒,细胞将不会变成镰刀形。如果滞留时间在 1—15 秒之间,红细胞将可能在静脉中变成镰刀形。如果滞留时间少于 1 秒,红细胞将在毛细管中变成镰刀形。

对于在毛细管中变成镰刀形的红细胞而言,随后可能发生许多事件。这些事件从不影响运送时间、到毛细管暂时闭合,到更长久的阻断,最终可能导致局部缺血或周围细胞的堵塞、和随后红细胞的破裂。

正常红细胞含有大约 70%水。水透过正常红细胞膜只要千分之一秒。细胞水的缺失将导致胞浆粘度呈指数增高,细胞血红蛋白平均浓度(MCHC)上升至约 32g/dl 以上。由于胞浆粘度是红细胞变形和变成镰刀形的主要决定性因素,红细胞脱水会造成流变和病理结果。对红细胞脱水的调节被认为是一种重要的治疗镰刀形细胞病的方法。由于细胞水随胞内离子浓度渗透性的变化而变化,所以维持红细胞的钾浓度特别重要(Stuart 等人, Brit J.Haematol.69:1—4(1988))。

已尝试了许多方法来治疗性处理脱水的镰刀形细胞(通过降低血浆摩尔渗透压浓度来减少血红蛋白 S 的聚合),但效果有限,这些方法包括:静脉输注蒸馏水(Gye 等人, Am.J.Med.Sci.266:267—277(1973));给予抗利尿激素加压素并输入高流体并限制盐(Rosa 等人, M.Eng.J.Med.303:1138—1143(1980));Charache 等人, Blood 58:892—896(1981));用莫能菌素增加镰刀形细胞的阳离子含量(Clark 等人, J.Clin.Invest.70:1074—1080(1982));Fahim 等人, Life Sciences 29:1959—1966(1981));静脉给予枸橼酸西替地尔(Benjamin 等人, Blood 67:1442—1447(1986));Berkowitz 等人, Am.J.Hematol.17:217—223(1984));Stuart 等人, J.Clin.Pathol.40:1182—1186(1987));和使用己酮可可碱(Stuart 等人, 如上)。

其他治疗性处理脱水的镰刀形细胞方法,包括通过靶向钙依赖性钾通道来调节红细胞的钾流通(Ishi 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.94(21):11651—6(1997))。该钙激活的钾通道也称作 Gardos 通道(Brugnara 等人, J.Clin.Invest.92:520—526(1993))。最近,显示了一种克隆的人电导中间体的钙激活钾通道(hIK1)与 Gardos 通道具有类似的生物物理和药理特性(Ishi, 同上)。

已采用一些方法来抑制 Gardos 通道包括给予红细胞咪唑、硝基咪唑和三唑

抗真菌剂如氯三苯甲咪唑(Brugnara 等人的美国专利 No.5,273,992)。氯三苯甲咪唑(一种含咪唑的抗真菌剂)已表现出是正常和镰刀形红细胞 Gardos 通道的特异性强抑制剂,且能防止体外和体内镰刀形细胞的  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性脱水(Brugnara,同上; De Franceschi 等人, J.Clin.Invest.93:1670—1676(1994))。当其能与稳定 Hb S 氧合构型的化合物联合应用时,氯三苯甲咪唑将诱导进一步减少微孔滤器的阻塞速率,还可能减弱不可逆镰刀形细胞的形成(Stuart 等人, J.Haematol.86:820—823(1994))。据信其他含有杂芳基咪唑样基团的化合物,通过 Gardos 通道的抑制,也可用于降低镰刀形红细胞的脱水,这些化合物包括咪康唑、益康唑、布康唑、奥康唑(oxiconazole)和硫康唑。虽已证明这些化合物能有效地减少镰刀形细胞的脱水,但发现其他咪唑化合物不能够抑制 Gardos 通道和防止钾的流失。

由于镰刀形细胞贫血是一种慢性病,所以用于治疗该病的药物应设计成能理想地表现出某些特性,这些特性对用于治疗可治愈疾病(如真菌感染)的药物中不是必须的。临床所用的 Gardos 通道抑制剂在长期给药过程中应表现出极低的毒性,应具有良好的生物可利用性,应对 Gardos 通道有高度特异性,且与该通道的相互作用应很强。

虽然氯三苯甲咪唑和某些相关的化合物已表现出能抑制 Gardos 通道和防止钾流失,但这些化合物作为治疗镰刀形细胞贫血的临床药物还欠理想。主要是因为长期给予咪唑抗真菌药将导致肝细胞毒性(参见 Rodriguez 等人, Toxicology 6:83—92(1995);Findor 等人, Medicina 58:277—81(1998);和 Rodriguez 等人, J.Biochem.Toxicol.11:127—31(1996))。药物的毒性倾向必须与其他特性(如生物可利用性、靶选择性和效力)平衡。

目前已知的 Gardos 通道抑制剂在体内的半衰期和生物可利用性很低。这些缺陷与这些药物特别受到关注,因为它们必须在人的一生中大部分时间内定期地使用。对这些药物,患者遵从剂量制度是关键,因此疗法越简单患者就越可能遵守。由于 Gardos 通道抑制剂生物可利用性低,必须频繁给药,用错剂量的风险升高,结果血浆中的药物水平不足以防止红细胞脱水。除了频繁给药外,与生物可利用性较好的同类药物相比,生物可利用性低的药物通常必须给予较高的剂量。而较高的剂量,产生不良副作用和毒性是非常现实的问题。

除了生物可利用性低外, 已知的 Gardos 通道抑制剂(如氯三苯甲咪唑)与 Gardos 通道相互作用的效力也很低。这些化合物的低生物利用度和体内的迅速清除加剧了它们的低效力。许多已知的 Gardos 通道抑制剂的另一个缺点是它们与钙激活钾通道的相互作用不是特异性的: 这些药物易与非 Gardos 通道的其他钙激活钾通道反应。总之, 已知的 Gardos 通道抑制剂的效力低、特异性低和生物可利用性低使得需要较高剂量和较频繁给药, 从而增加了发生不良副作用和毒性的危险性。

从目前已知的 Gardos 通道抑制剂的上述缺点来看, 在治疗镰刀形细胞贫血中寄望于如下的实质性进展, 即发现一种不含咪唑作为结构成分的 Gardos 通道抑制剂, 它应具有良好的生物可利用性、代谢和排泄慢, 与 Gardos 通道的相互作用强而具特异性。令人惊讶的是, 本发明提供了具有这些特性的 Gardos 通道抑制剂。

#### 附图简述

图 1 是化合物 1(静脉内(◆)、口服(▲))、化合物 3(静脉内(\*)、口服(●))和化合物 18(静脉内(■)、口服(×))的平均血浆浓度与时间关系图。剂量为静脉内(1mg/kg)和口服(10mg/kg)。

#### 发明概述

对治疗和/或预防镰刀形细胞病而言, 通过阻断 Gardos 通道来减少镰刀形红细胞脱水是一种非常有效的治疗方法。能抑制 Gardos 通道减少镰刀形细胞脱水的化合物是非常理想的, 而且是本发明的一个目的。虽然证明是有效的, 但目前已开发的咪唑为基础的 Gardos 通道抑制剂受许多缺点(包括已有充分记载的肝细胞毒性)牵制。抑制剂效力低、与非 Gardos 通道的其他钙激活钾通道的非特异性相互作用和生物可利用性低, 每一种缺点都使得需要给予更高剂量的抑制剂和较频繁的给药, 从而加剧了这种毒性。

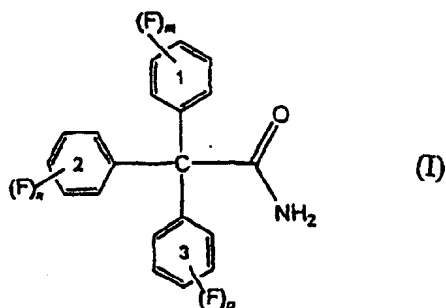
与这些已知的药物相反, 可药用的第二代 Gardos 通道抑制剂将在生物内部环境中表现出延长的稳定性和对 Gardos 通道的强效力和选择性。在生物内部环境(如微粒体制剂)中培育 2 小时后, 理想药物的降解应小于 60%, 且对 Gardos

通道的  $IC_{50}$  不超过 30nM。另外，这些药物对 Gardos 通道的选择性至少是对其他钾通道(如  $I_{Ks}$ )的 100 倍。

现已发现 Gardos 通道的三苯基乙酰胺基抑制剂(其中一个或多个苯基被一个或多个氟原子或含氟基因所取代)，相对于氯三苯甲咪唑和非氟化的三苯基乙酰胺类似物而言，体内的半衰期和体外的代谢稳定性都提高到令人惊奇的程  
5 度。例如，在肝微粒体制备物中培育 2 小时后，氯三苯甲咪唑(19)94.2%降解，而 2 小时后 87%的非氟化三苯基甲基乙酰胺(20)降解。与其明显相反，在相似的培育后本发明的代表性二氟化合物 3 和 5 的降解分别为 24%和 29%。

虽然对氟化三苯基咪唑抗真菌剂的研究表明：这些氟化制剂比它们的氯化  
10 同类物代谢慢，但这些制剂的药理活性也比同类的氯化衍生物要低(参见 Conte 等人, Arneim-Forsch./Drug Res.42:854-858(1992);和 Bartoli 等人, Arneim-Forsch./Drug Res.42:832-835(1992))。但出人意料地，对本发明的化合物观察到相反的倾向：氟化的化合物不仅效力更强，而且与氯三苯甲咪唑相比是 Gardos 通道的选择性更好的抑制剂。例如化合物 3 和 5 对 Gardos 通道比氯三苯甲咪唑  
15 强约 8 和 10 倍。另外，相对于其他钾离子通道(如  $I_{Ks}$ )对 Gardos 通道的选择性，化合物 3 和 5 是氯三苯甲咪唑的 16 和 17 倍。

所以，本发明一方面提供一种具有式(I)结构的化合物：



其中，

20 m、n 和 p 各选自 0 和 1，且 m、n 和 p 中至少一个是 1；

当 m、n 和 p 都是 1 时，环 1 和环 2 上的氟取代基各位于如下位置：乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位或乙酰胺取代基的对位；环 3 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的对位；和

当 p 是 0，m 是 1 和 n 是 1 时，环 1 上的氟取代基位于乙酰胺取代基的对  
25 位，环 2 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位或乙酰胺取代基的对位。

第二方面,本发明提供了一种药物组合物,包含与药学上可接受的赋形剂混合的式(I)的化合物。可在本发明的方法中使用这种制剂。

通过改变患病细胞的细胞离子流通量来控制疾病(如镰刀形细胞病)是一种非常有效的方法。另外,通过对细胞离子流在疾病过程和正常生理过程中作用的基本了解,可以提供新型的治疗方式、方案和药物。那些改变细胞离子流通的化合物(尤其是那些抑制钾流通的化合物),是非常理想的药物和阐明这些离子流通基本机理的探针。类似地,在基础研究和治疗应用中使用这些化合物的方法,是研究人员和临床医生武库中的有价值的工具。所以这些化合物和方法也是本发明的一个发明目的。

10 因此,本发明的第三方面提供一种抑制细胞钾流通的方法。该方法包括使细胞与大量能有效抑制钾流通的式(I)的化合物接触。

治疗镰刀形细胞病的一个重要治疗方法是通过操纵红细胞的细胞离子流通来防止或阻滞红细胞的脱水。故本发明另一方面提供了减少红细胞脱水的方法。该方法包括使红细胞与用量能有效减少红细胞脱水的式(I)化合物接触。

15 第五方面,本发明提供了治疗或预防镰刀形细胞病的方法。该方法包括给予患镰刀形细胞病的病人治疗有效量的具有呈式(I)结构的化合物。

本发明的化合物代表一类新型的钙激活钾流通的抑制剂,其表现出对代谢降解有优良的抗性,相对于它们的非氟化的同类物,它们对 Gardos 通道的选择性和效力有所提高。所以在第六方面,本发明提供一种方法来提高钾通道抑制剂(包括三苯基甲基部分)在生物介质中对降解的抵抗力。

20

本发明的这些和其他目的和优点经过下详细描述和实施例将会明白。

发明和优选实施例详述

简写和定义

25 “MCHC”是“细胞血红蛋白平均浓度”。

“SAD-1”指镰刀形细胞病(如 Trudel 等人, EMBO J.,10(11):3157-3165(1991)所述)的转基因小鼠模型。

本文所用的“生物介质”指体内和体外生物微环境。体外“生物介质”的例子包括(但不限制于)细胞培养物、组织培养物、匀浆、血浆和血液。体内应

用通常在哺乳动物(优选人)中进行。

“氟代烷基”指包括烷基或取代的烷基基团的“取代的烷基”的一个亚类，可以是部分氟化的或全氟化的。氟取代可以仅是烷基部分的取代或可与其他任何取代或取代基团联合。

5

## 引言

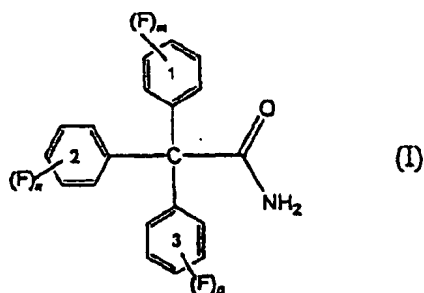
如上所述，通过抑制 Gardos 通道来阻断镰刀形细胞脱水，是一种有效的治疗和/或预防镰刀形细胞病的治疗方法。体外研究表明氯三苯甲咪唑(一种含咪唑的抗真菌药)封阻镰刀形红细胞中的  $\text{Ca}^{2+}$  激活的  $\text{K}^{+}$  流通和细胞脱水(Brugnara 等人, J.Clin.Invest.92:520—526(1993))。对镰刀形细胞病的转基因小鼠模型(SAD-1 小鼠)的研究(Trudel 等人, EMBO J.11:3157—3165(1991))，显示口服氯三苯甲咪唑，能抑制红细胞 Gardos 通道，增加红细胞  $\text{K}^{+}$  含量，减少细胞血红蛋白平均浓度(MCHC)和降低细胞密度(De Franceschi 等人, J.Clin.Invest. 93:1670—1676(1994))。另外，口服氯三苯甲咪唑治疗患镰刀形细胞病患者，能抑制 Gardos 通道和降低红细胞脱水(Brugnara 等人, J.Clin.Invest. 97:1227—1234(1996))。其他抑制体外 Gardos 通道的抗真菌药包括咪康唑、益康唑、布康唑、奥康唑和硫康唑(Brugnara 等人的美国专利 No.5,273,992)。所有这些化合物都含有类咪唑环，即含有 2 个或多个氮的杂芳环。

虽然咪唑基 Gardos 通道抑制剂显示有效，但至今发现它们受几种缺点所阻挠，包括已有明确记录的潜在的肝细胞毒性。抑制剂效力低、与 Gardos 通道以外的钾通道的非特异性相互作用和生物可利用性低(每一种缺点都使得需要给予更高剂量的抑制剂和较频繁的给药)加剧了这种毒性。

为了提供能抑制 Gardos 通道的优良药物，必须满足三个药物标准。首先，这些化合物在生物微环境中必须稳定，如在生物微环境中 2 小时后至少保留 40% 化合物完整。其次，这些化合物必须是 Gardos 通道的强抑制剂，对该通道的  $\text{IC}_{50}$  小于或等于 30nM。除对 Gardos 通道的效力外，这些化合物与该通道的相互作用必须是选择性的。这些化合物的选择性如  $\text{IC}_{50}$  比率( $\text{I}_{\text{Ks}}$ /Gardos)测定的必须大于或等于 80。

化合物

第一方面，本发明提供了式(I)结构的化合物：



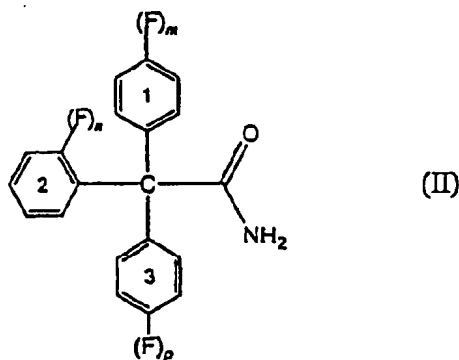
其中，

5        m、n 和 p 各选自 0 和 1，且 m、n 和 p 中至少一个是 1；

当 m、n 和 p 都是 1 时，环 1 和环 2 上的氟取代基各位于如下位置：乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的间位或乙酰胺取代基的对位；环 3 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位、乙酰胺取代基的对位；和

10        当 p 是 0，m 是 1 和 n 是 1 时，环 1 上的氟取代基位于乙酰胺取代基的对位，环 2 上的取代基位于乙酰胺取代基的邻位或乙酰胺取代基的对位。

在一优选实施例中，本发明的化合物为式(II)结构：

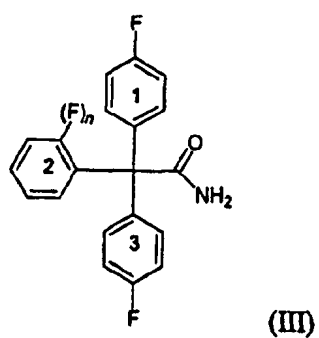


其中 m、n 和 p 各是 0 和 1，且 m、n 和 p 中至少一个是 1。

表 1 列出了具有此结构的化合物，包括化合物 1-5。

15        在另一优选实施例中，本发明的化合物具有式 III 的结构：



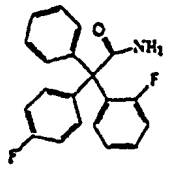
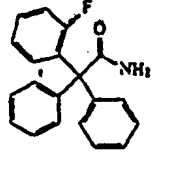
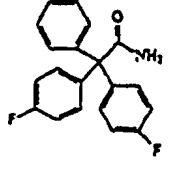
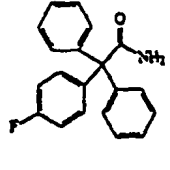
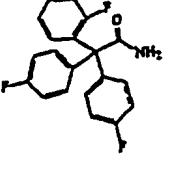
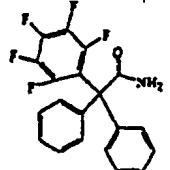
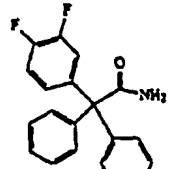
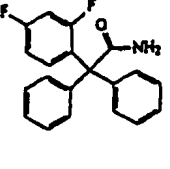
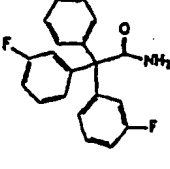
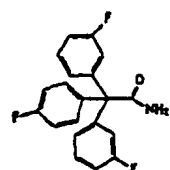
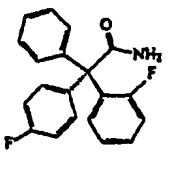
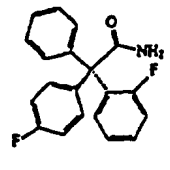
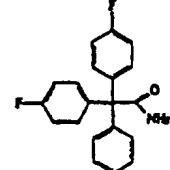
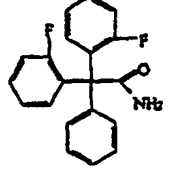
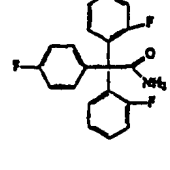


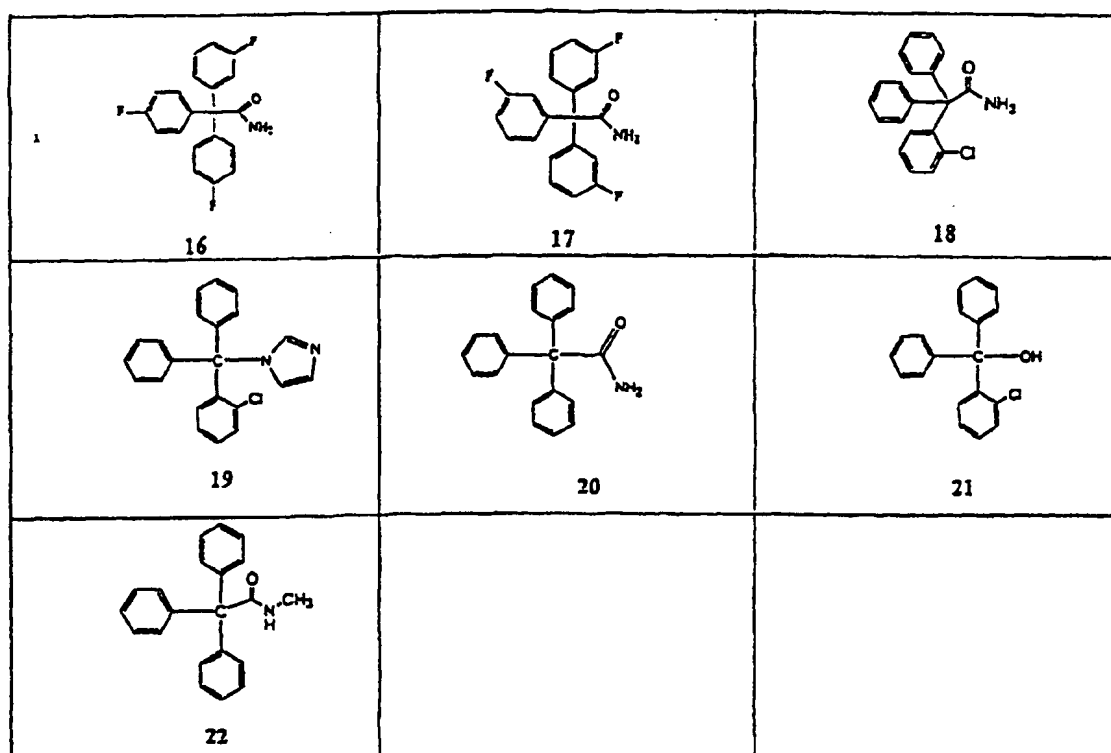
其中  $n$  是 0 或 1。

表 1 列出了具有此结构的化合物，包括化合物 3 和 5。

表 1 还列出了与本发明化合物结构非常相近的化合物。与本发明化合物结构相近的化合物可作为评估本发明氟化化合物优点和出人意料特性和益处的“基线”。

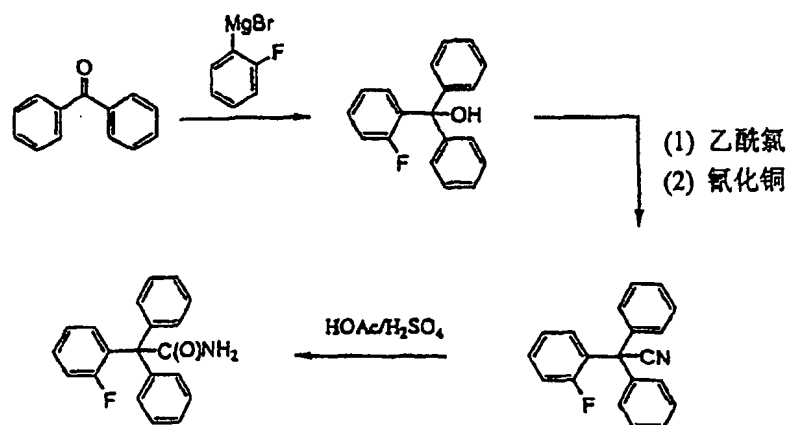
表 1

|                                                                                           |                                                                                           |                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| <br>1    | <br>2    | <br>3    |
| <br>4    | <br>5    | <br>6    |
| <br>7   | <br>8   | <br>9   |
| <br>10 | <br>11 | <br>12 |
| <br>13 | <br>14 | <br>15 |



### 化合物的合成

可用有机合成领域的标准技术制备本发明的化合物。可购得适当的起始材料  
5 料和试剂，或可用标准有机化学方法制备。优选实施例显示了优选方法。流程1 列出了一合成路线的例子。



### 流程 1

在流程 1 中，由相应的氟取代的三苯基甲醇(由氟取代的二苯甲酮和将苯基  
10 或氟取代的苯基加到二苯甲酮上的试剂制备)进行氟取代的三苯基乙酰胺的合成。随后通过将三苯基甲醇与乙酰氯接触，然后再与氰化铜接触，将氟取代的

三苯基甲醇转变成相应的氟取代的三苯基乙腈。将中间体腈与硫酸和冰醋酸的混合物反应，可以形成乙酰胺。其他合成氟取代的三苯基甲烷(尤其是乙酰胺)的途径是本领域技术人员能力范围内的。

## 5 化合物的稳定性

对作为 Gardos 通道抑制剂的药物化合物而言，必须证明候选化合物具有可接受的体内生物可利用性和稳定性。当在生物培养基(如微粒体制剂)中培育 2 小时后，该化合物至少保留 40%完整的初始量时，判断该化合物具有足够水平的稳定性。这种稳定水平对治疗慢性综合症(如镰刀形细胞贫血)特别重要。对接受镰刀形细胞贫血治疗的患者而言，在他们一生中必须有规律地接受抗镰刀形细胞药(如 Gardos 通道抑制剂)治疗。其他方面，这种终身治疗方案则对患者(遵守该方案)产生了严重危险性。如果由于遵守差，患者体系中该药物的滴度下降，这就使产生镰刀形细胞、伴发性疼痛和身体和生理损害的危险性升高。能增加体内停留时间和生物可利用度的化合物可以简化剂量方案(即每天的剂量较小和/或给药次数较少)。另外，降低给予的化合物量可减少该药物和/或其代谢物导致的副作用。所以，提供具有良好生物可利用性和体内稳定性提高的 Gardos 通道抑制剂是非常理想的。

可用本领域已知的方法检验这些化合物在各种生物微环境中的稳定性。在一实施例中，在体外制备物中检验这种化合物的稳定性。在一优选实施例中，体外制备物是肝微粒体制备物。这种体外试验的结果提供了本发明化合物体内相关的稳定性数据。其他可用于分析本发明化合物稳定性的体外试验是本领域已知的。

除体外方法外，在一定范围的动物模型中还可进行体内分析如药物动力学研究。可以不同剂量和/或不同途径(如 i.v.、i.p.、p.o.)，将一种或多种本发明的化合物给予动物(较佳地为大鼠)。然后在系列时间点收集血液、尿液和/或粪便样品，分析样品中本发明化合物和/或化合物的代谢产物的存在和/或浓度。

可用适当的参数比较不同化合物的数据。参数例子包括半衰期、生物利用度、预定时间后化合物保留完整的量等。在一优选实施例中，采用预定时间后化合物保留完整的量。本文所用的“完整”指未被代谢或未被降解成与初始化

合物不同品种的化合物。

在一优选实施例中,预定时间约为2小时到72小时,更佳地是4小时—24小时。在另一优选实施例中,2小时预定时间后保留的完整化合物量至少为初始样品的40%,较佳地至少50%,更佳地至少70%。

- 5 任何能检测且较佳地能定量检测这种化合物和/或代谢产物的方法都适用于本发明化合物的分析。这些方法包括(但不限制于):光谱方法(如NMR(如 $^{19}\text{F}$  NMR)、MS、IR、UV/vis)、色谱方法(如LC、GC、HPLC)和联用光谱和色谱方法的混合法(如GC/MS、LC/MS、LC/MS/MS)。另外,这些方法可使用可检测标记物如标记有放射性同位素(如 $^3\text{H}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{14}\text{C}$ )或荧光标记物(如荧光素、若丹
- 10 明)的本发明化合物。体内分析小有机分子(尤其是那些适用于生物活性分子的)存在的其他方法对本领域技术人员而言是显然懂得的。

#### 化合物活性

- 为了开发可用于Gardos通道抑制剂的药物,候选化合物必须证明具有对该
- 15 靶通道的可接受的活性。如果化合物对Gardos通道的 $\text{IC}_{50}$ 不大于30nM,则判断这些化合物足够有效。

如以上对化合物稳定性所述,这种活性水平对治疗慢性综合症(如镰刀形细胞贫血)非常重要。对Gardos通道效力为30nM的Gardos通道抑制剂能很好地应付处理关于患者顺从性和副作用的各种担心。

- 20 可用本领域已知的方法分析本发明化合物对离子通道(如Gardos通道)的活性。例如,参见Brugnara等人,J.Biol.Chem.268(12):8760—8768(1993)。用该参考文献所述的方法,可分析本发明化合物对Gardos通道的抑制及其 $\text{IC}_{50}$ 。

- 在一示范性试验中,可用人血红细胞分析测试化合物对红细胞Gardos通道的抑制。可用可检测的物质(如 $^{86}\text{Rb}$ )测定抑制程度。在一示范性试验中,使用
- 25  $^{86}\text{Rb}$ ,通过使红细胞与 $^{86}\text{Rb}$ 和测试化合物接触分析Gardos通道抑制剂,并测定被细胞摄取的 $^{86}\text{Rb}$ 量。该试验的各种变化形式对本领域技术人员显然懂得的。

通过如Brugnara等人,J.Clin.Invest.92:520—526(1993)所公开的方法,用红细胞试验本发明化合物的效力。简单地说,使红细胞与测试化合物和含 $^{86}\text{Rb}$ 的介质接触。可从一参数如细胞摄入 $^{86}\text{Rb}$ 的线性最小平方斜率,计算 $^{86}\text{Rb}$ 转

运的初始速率。用计算机辅助的非线性曲线拟合，用标准方法可计算出抑制常数。

其他分析离子通道活性和影响离子通道的试剂的活性的方法是本领域已知的。选择适当的试验方法在本领域技术人员的能力范围之内。参见如 Hille,B.,  
5 “兴奋性膜的离子通道”，Sinaner Associates,Inc.Sunderland, MA(1992)。

下表2列出了用本发明的化合物和其他相关化合物对 Gardos通道和红细胞抑制试验的结果。表2中的化合物编号与表1所列出的化合物结构可交叉参考。

表 2

| 化合物<br>编号# | IC <sub>50</sub> 效力对<br>Gardos(nM) | Est. IC <sub>50</sub> 效力<br>对 I <sub>Ks</sub> (nM) | 完整%<br>(2 小时后) | 选择性<br>(I <sub>Ks</sub> 对 Gardos) |
|------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| 1          | 9                                  | 2000                                               | 64             | 220                               |
| 2          | 15                                 | N.D.                                               | 80             | N.D.                              |
| 3          | 12                                 | 1500                                               | 76             | 130                               |
| 4          | 13                                 | N.D.                                               | 80             | N.D.                              |
| 5          | 10                                 | 1400                                               | 71             | 140                               |
| 6          | 37                                 | N.D.                                               | N.D.           | N.D.                              |
| 7          | 14                                 | 1200                                               | 15             | 90                                |
| 8          | 34                                 | 5700                                               | 39             | 170                               |
| 9          | 30                                 | 3200                                               | 3              | 110                               |
| 10         | 12                                 | 1300                                               | 59             | 110                               |
| 11         | 5                                  | 1300                                               | 78             | 260                               |
| 12         | 5                                  | 1800                                               | 44             | 360                               |
| 13         | 14                                 | 1100                                               | 53             | 80                                |
| 14         | 30                                 | N.D.                                               | 46             | N.D.                              |
| 15         | 15                                 | N.D.                                               | 53             | N.D.                              |
| 16         | 17                                 | 1900                                               | 57             | 110                               |
| 17         | 13                                 | 4000                                               | 18             | 310                               |
| 18         | 10                                 | 7300                                               | 6              | 730                               |

|                |     |      |    |    |
|----------------|-----|------|----|----|
| 19<br>(氯三苯甲咪唑) | 100 | 820  | 4  | 8  |
| 20             | 50  | 1100 | 13 | 22 |
| 21             | 500 | 2600 | 35 | 5  |
| 22             | 100 | 2600 | 8  | 26 |

N.D.= 未测得

### 化合物选择性

对作为药用 Gardos 通道抑制剂的化合物而言, 候选化合物必须证明对该靶  
5 通道具有可接受的选择性。某化合物对  $I_{Ks}$  的  $IC_{50}$  与其对 Gardos 通道的  $IC_{50}$  的比例至少为 80 时, 判断该化合物对 Gardos 通道的选择性足够充分。如 Turgeon 等人, Circulation Research 75:879—86(1994)所述, 在豚鼠肌细胞上用全细胞碎片堆方法记录了  $I_{Ks}$  电流。

相对于其他钾离子通道, 某具体化合物对 Gardos 通道的选择性可方便地以  
10 两种化合物的有关结合量(如  $IC_{50}$ )来测定。在一优选实施例中, 用如上所述测定的活性确定了选择性, 其他分析离子通道活性和作用于该离子通道的试剂的活性的方法是本领域已知的。选择适当的试验方法在本领域技术人员能力范围内的。见如 Hille, B., “兴奋性膜的离子通道”, Sinaner Associates, Inc. Sunderland, MA(1992)。

15 表 2 列出了对本发明化合物和其他密切相关的化合物的选择性测定结果。相对于  $I_{Ks}$ (一示范性钾离子通道)确定了这些化合物对 Gardos 通道的选择性。表 2 中的化合物编号与表 1 所列出的化合物结构可交叉参考。

由上述结果可以看出, 证明相对于对其他钾离子通道(如  $I_{Ks}$ ), 本发明的化合物对 Gardos 通道具有显著的选择性。另外, 本发明的化合物还是 Gardos 通  
20 道的强抑制剂。而且, 相对于非氟化化合物(如氯三苯甲咪唑)这些化合物的体内半衰期显著增加。

在一实施例中, 本发明的化合物是钾流通(如那些受 Gardos 通道介导的)的强、选择性和稳定的抑制剂。

较佳地, 本发明的化合物在生物微环境中是稳定的, 如在生物微环境中培

育2小时后,体外微粒体酶制备物中至少保留40%完整的化合物,较佳地为50%以上,更佳地在70%以上。

不希望束缚于具体理论,现认为本发明化合物的某些结构特征(即用氟取代氢)决定了这些化合物的稳定性、选择性和效力。所以在一优选实施例中,本发明的抑制剂含有一芳基部分,其中芳基的至少一个氢原子被含有氟原子的基团取代。在该实施例中,本发明包括能抑制钾离子流通的化合物的氟化衍生物,尤其是那些具有 Gardos 通道抑制活性的(如抗真菌药,如咪康唑、益康唑、布康唑、奥康唑和硫康唑)。其他具有钾离子通道抑制活性,尤其是 Gardos 通道抑制活性且至少一个芳基部分带有至少一个氟原子的化合物也在本发明的范围之中。

在一优选实施例中,芳基部分是苯基。在另一优选实施例中,芳基部分是三苯基甲基的一个组成部分。

可单独给予本发明的化合物,或以药物组合物的形式给予,药物组合物中活性化合物与一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂混合。所以,除影响细胞离子流通(如 Gardos 通道抑制活性)的化合物外,本发明还提供含有本发明化合物的药物制剂。

### 药物制剂

第二方面,本发明提供含有与药学上可接受的赋形剂混合的本发明式(I)化合物的药物制剂。在一优选实施例中,这些化合物是式(II)化合物,更佳地为式(III)化合物。

可以将本文所述的化合物或其药学上可接受的加成盐或水合物制备成制剂用各种给药途径或模式送递给患者。合适的给药途径包括(但不限制于)吸入法、透皮、口服、眼用、直肠、透粘膜、肠道和肠胃外给药,包括肌注、皮下和静脉内注射。

本文所述的化合物或其药学上可接受的盐和/或水合物可以单独给予、与本发明的其他化合物联合给予、和/或与其他治疗剂混合给予。对与本发明化合物共同给予的治疗剂的选择,部分取决于所治疗的病症。

例如,当给予患镰刀形细胞病患者时,本发明的化合物可与治疗与镰刀形



细胞病通常相关的疼痛、感染和其他症状和副作用的制剂混合给予。这些制剂包括如止痛药、抗菌素等。这些化合物还可与含有常用于治疗镰刀形细胞病的其他制剂联合给予,包括丁酸酯和丁酸酯衍生物(Perrine 等人, N.Engl.J.Med.328(2):81-86(1993))、羟基脲(Charache 等人, N.Engl.J.Med.323(20):1317-1322(1995));促红细胞生成素(Goldberg 等人, N.Engl J Med.323(6):366-372(1990));和食用盐如镁(De Franceschi 等人, Blood 88(648a):2580(1996))。

用于本发明的药物组合物可以用一种或多种生理可接受的载体以常规方法制备,所述的载体包括便于将活性化合物加工成药物的赋形剂和辅助剂。合适的制剂取决于所选的给药途径。

10 对注射而言,可将本发明的试剂制备成水溶液,较佳地用生理相容的缓冲液如 Hanks 溶液、Ringer 溶液或生理盐水。在一优选实施例中,制剂包括水和酒精和/或乙二醇。该制剂中其他有用的成分包括例如表面活性剂、乳化剂和诸如乙氧基化油等材料。一典型制剂包括本发明的化合物、聚(乙二醇)400、乙醇和水(比例为 1:1:1)。另一典型制剂包括本发明的化合物、水、聚(乙二醇)400  
15 和 Cremophor(聚乙二醇)-EL。

对透粘膜给药(如颊、直肠、鼻、眼等)而言,在制剂中采用适用于待渗透的屏障的渗透剂。这些渗透剂通常是本领域已知的。

对口服给药,通过将活性化合物与本领域已知的药学上可接受的载体混合,不难制备这种化合物。这些载体可以将本发明的化合物配制成片剂、丸剂、  
20 糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等,让接受治疗的患者口服摄入。可将用于口服的药物制备物与固态赋形剂混合,任选地研磨得到的混合物,加入适当的辅助剂后加工此颗粒混合物,如果需要得到片剂或糖衣药丸芯。合适的赋形剂特别指填充剂如糖(包括乳糖、蔗糖、甘露糖或山梨糖醇)、纤维素制备物(如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯粉、明胶、黄蓍树胶、甲基  
25 纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要,可加入崩解剂如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐(如海藻酸钠)。

在糖衣药丸芯上加上适当的涂层。出于该目的,可使用浓缩糖液,可任选地含有阿拉伯树胶、滑石粉、聚乙烯吡咯烷酮、聚羧乙烯凝胶、聚乙二醇和/

或二氧化钛、光泽剂(lacquer)溶液、和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可将染料或色素加到片剂或糖衣丸涂层中，以鉴别或检定活性化合物剂量的不同组合。

可用于口服的药物制备物包括由明胶制备的推入型胶囊、以及由明胶和增塑剂(如甘油或山梨糖醇)制备的密封软胶囊。这种推入型胶囊可含有与填充剂(如乳糖)、结合剂(如淀粉)和/或润滑剂(如滑石粉或硬脂酸镁)和任选地稳定剂混合的活性组分。在软胶囊中，可将活性组分溶解于或悬浮于适当的液体中，如脂肪油、液态石蜡、或液态聚乙二醇。另外，可加入稳定剂。所有用于口服给药的制剂都应适用于口服给药的剂量。

10 对颊给药，可用常规方法将组合物制备成片剂或锭剂形式。

对吸入法给药，通常可用适当的推进剂(如二氟二氯甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适的气体)，从压缩包装或喷雾器以气雾剂形式送递本发明的化合物。对压缩的气雾剂而言，剂量单位由送递计量的一阀门所确定。可将用于吸入器或吹入器的胶囊和药丸(cartridge)(如明胶)制备成含有本发明化合物和适当粉末基料(如乳糖或淀粉)的粉末混合物。

可将这些化合物制备成通过注射(如造影剂团注射或连续输液)进行肠胃外给药。可将注射用的制剂制备成单位剂量，如装在安瓿中或多剂量容器中(添加有防腐剂)。这些组合物可以油性或水性载体制成悬浮剂、溶液或乳剂形式，且可含有制药用的试剂如悬浮剂、稳定剂和/或加入分散剂，如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐如海藻酸钠。

用于肠胃外给药的药物制剂包括呈水溶液形式的活性成分水溶液，如以上静脉内给药所述的那些。另外，也可将活性化合物的悬浮液制成适当的油状注射用悬浮剂。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油如芝麻油、或合成的脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯、或脂质体。含水的注射用悬浮剂可包含增加悬浮剂粘度的物质，如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地，悬浮剂还可含有合适的稳定剂或增加化合物溶解性的试剂，以制备高浓度的溶液。

另外，在使用前，活性成分可以粉末形式与适当载体(如无菌无热源水)混合。

也可将化合物制备成直肠用组合物，如栓剂或留置灌肠剂，如含有常规的

栓剂碱如可可豆油或其他甘油酯。

除上述制剂外，还可将化合物制备成储存制剂。通过植入或透皮送递(如皮下或肌内)、肌内注射或透皮贴片，可以给予长效制剂。所以例如可与适当的聚合或疏水材料(如以可接受油配的乳剂)或离子交换树脂、或低(sparingly)溶解性

5 衍生物如低溶度盐，制备这些化合物。

药物组合物还可含有合适的固相或凝胶相载体或赋形剂。这些载体或赋形剂的例子包括(但不限制于)碳酸钙、磷酸钙、各种糖、淀粉、纤维素衍生物、明胶和聚合物如聚乙二醇。

## 10 有效剂量

适用于本发明的药物组合物包括含有治疗有效量(即能有效实现预定目的的量)的活性成分的组合物。具体应用的实际有效量取决于其所治疗的疾病。例如，当用于减少镰刀形细胞脱水和/或延缓红细胞变成镰刀形或原位变形的方  
15 中，这些组合物应含有能实现此结果的有效量的活性成分。有效量的确定是在本领域技术人员能力范围中的，尤其是在本文详细公开的提示下。

对任何本文所述的化合物，可由细胞培养物试验初步确定治疗有效量。靶血浆浓度是能诱导 Gardos 通道抑制的活性化合物的浓度。在一优选实施例中，Gardos 通道的活性被至少抑制了 25%。能对 Gardos 通道钾流通产生至少约 50%、75%、或甚至 90%或更高抑制的活性化合物靶血浆浓度是优选的。可监  
20 测患者 Gardos 通道的抑制百分比，以评估血浆药浓度达到的适合程度，可上下调节剂量以达到理想的抑制百分比。

如本领域所知，可由动物模型确定用于人的治疗有效量。例如，配制用于人的剂量以达到在动物中所发现的有效循环浓度。特别有用的镰刀形细胞病的动物模型是 SAD-1 小鼠模型(Trudel 等人，EMBO J.11:31573165(1991))。如上  
25 所述，通过监测 Gardos 通道抑制和上下调节剂量，可调节用于人的剂量。由显示出类似药物活性的已知化合物(如氯三苯甲咪唑和其他抗真菌药)的人体数据，也可确定治疗有效量(参见 Brugnara 等人，JPET273:266272(1995))；Benzaquen 等人，Nature Medicine 1:534—540(1995)；Brugnara 等人，J.Clin.Invest. 97(5):1227—1234(1996))。根据所给予的化合物与氯三苯甲咪唑相比的相对生

物利用度和效力可调节给药的剂量。

根据上述方法和本领域已知的其他方法,对剂量进行调节以达到对人的最大效率在本领域普通技术人员的能力范围之内。

对局部给药而言,给予的化合物的体循环浓度并不十分重要。在这种情况下,给予的化合物要在局部地区达到有效浓度以实现所需的结果。

对预防和/或治疗镰刀形细胞病(包括慢性镰刀形细胞贫血和急性镰刀形细胞危象)而言,认为给予的化合物达到 0.001IM 到 20IM 的循环浓度是有效的,0.01IM 到 5IM 是优选的。

本发明化合物的患者口服(这是预防和治疗慢性镰刀形细胞病发作的优选模式)剂量,通常范围约为 1mg/天到 10,000mg/天,较佳地约 10mg/天到 1,000mg/天,更佳地约 50mg/天到 500mg/天。从患者体重来看,通常范围约为 0.1 到 15mg/kg/天,更常为 0.1—15mg/kg/天,最常为 1 到 10mg/kg/天。

其他给药模式,可个别调节剂量和间隔时间以使所给予的化合物的血浆水平能有效治疗所治疗的具体临床病症。例如在一实施例中,若急性镰刀形细胞危象是最主要的临床表现,本发明的化合物可以相对高的浓度每天多次给予。另外在一实施例中,若患者仅表现出周期性的镰刀形细胞危象,不频繁、周期性或无规律时,则以最低有效浓度给予本发明的化合物,且给药次数较少较为理想。这就提供了一种与个体镰刀形细胞病程度相匹配的治疗方案。

用本文所提供的方法,可以有计划安排有效的预防或治疗方案,而基本不具有毒性且对治疗的具体患者所出现的临床症状完全有效。这种计划应包括考虑如下因素来仔细选择活性化合物:例如化合物的效力、相对生物可利用性、患者体重、不良副作用的存在和严重程度、给药的优选模式和所选试剂的毒性。

#### 化合物毒性

某具体化合物的毒性与其治疗效之间的比例是它的治疗性指数,可以  $ID_{50}$ (致死总数 50%的化合物量)与  $ED_{50}$ (对总数 50%有效的化合物量)的比例表达。表现出高治疗指数的化合物是优选的。获自细胞培育试验和/或动物研究的治疗指数数据可配制用于人的剂量范围。这些化合物的剂量较佳地应处于能诱导  $ED_{50}$  而无毒性或极小的血浆浓度范围内。根据所用的剂量形式和所用的给药

途径，该范围中的剂量可以有所不同。参见 Fingl 等人，In:THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS,Ch,1, 第1页，1975。可由医生根据患者的症状和使用化合物的具体方法选择确切的配方、给药途径和剂量。

5

#### 方法

除了上述化合物和药物制剂以外，本发明还提供许多使用本发明化合物的方法。这些方法包括从那些可用于实验室的方法以探测基础机理(如药物动力学、药物活性、病因和疾病发展等)。

10 所以，本发明第三方面提供了抑制细胞钾流通的方法。该方法包括使细胞与有效量的式 I 结构的化合物接触。在一优选实施例中，该化合物具有式 I 的结构，更佳地是具有式 III 的结构。

本发明这方面具有广泛的用途，但较佳地是作为研究钾流通的基本机理和调节钾流通试剂活性的机制的模式。另外，还可将本发明的化合物用于发现调  
15 节钾流通的新药的工具有。例如，可将本发明的化合物用于试验(如竞争性试验)中，以测试假定的钾流通抑制剂的效力。可在体外和体内进行本发明的这些方法。通过例如改进本领域已知的方法将本发明的化合物加入其中，可进行本发明的试验。这些改进是本领域技术人员能力内的事。

在另一优选实施例中，用这种方法来治疗或预防受到调节性钾流通影响的  
20 疾病。在一优选实施例中，该疾病是镰刀形细胞病。

第四方面，本发明提供了一种减少红细胞脱水的方法。该方法包括使红细胞与有效量的式 I 结构的化合物接触。在一优选实施例中，该化合物具有式 II 的结构，更优选的是具有式 III 结构。

本发明这方面可用于以下范围的目的，包括红细胞脱水机理的研究、抑制  
25 逆转红细胞脱水的化合物的研究、治疗或预防与红细胞脱水相关的疾病。

第五方面，本发明提供了一种治疗或预防镰刀形细胞病的方法。该方法包括给予患镰刀形细胞病的患者治疗有效量的式 I 结构的化合物。在一优选实施例中，该化合物具有式 II 的结构，更佳地是具有式 III 的结构。

本发明这方面可用于预防急性镰刀形细胞的发病或改善该病的影响。另

外,该方法还可用于治疗 and/或预防慢性镰刀形细胞病。该方法可单独采用本发明化合物,或较佳地使用本发明的药物配方。有关的给药模式、剂量水平的选择和给药的频率如上所述。

5 第六方面,本发明提供了提高钾通道抑制剂(包括苯基部分)在生物介质中对降解的抵抗力。该方法包括用含苯基的基团取代抑制剂苯基上的氢原子。

可用含许多结构的钾通道抑制剂来实施本方法。对抑制剂结构的唯一限制是在抑制剂结构部分必需存在一苯环。在一优选实施例中,此苯环是三苯基甲基部分。在另一优选实施例中,在与生物介质接触 2 小时后,被降解的化合物不到 60%。

10 可用本文所公开的方法或有机化学的其他标准方法,实施以氟基团取代氢。可由易从商业供应商如 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee,WI)得到的氟-芳基化合物,制备具有所需取代的许多化合物。另外,有许多标准合成途径来制备适用于制备本发明方法所用的化合物的起始物。

在选择转化成氟衍生物的靶化合物时,技术人员明白理想的是用对 Gardos  
15 通道具有已知活性的含芳基化合物起始。已证明本领域已知的许多具有抗真菌特性的化合物有 Gardos 通道活性。所以,技术人员可选择具有抗真菌活性的试剂或这些化合物的类似物,来制备它们的氟化类似物。用本文所述的方法和本领域已知的其他方法,技术人员可以常规地进行对这些新化合物效力和生物降解抵抗力的试验。另外,通过采用这些方法的常规实验,技术人员可以很快速  
20 分析一种或多种含芳基的分子对 Gardos 通道的活性。然后可以如上所述制备和分析有希望成为靶标的氟衍生物。

### 使药物特性最佳化

#### a.对代谢的抗性

25 本发明 Gardos 通道的三苯基乙酰胺基抑制剂,其中一个或多个苯基基团被一个或多个氟原子或含氟基团所取代,相对于其他已知的抑制剂(如氯三苯甲咪唑)具有出人意料的高度代谢稳定性。例如,在肝微粒体制备物中培育 2 小时后,氯三苯甲咪唑 19 降解了 94.2%。而类似培育后,本发明的氟化化合物如 3 和 5 分别仅降解了 24%和 29%。这些氟化的三苯基乙酰胺也比它们的非氟化类似物

明显更稳定。例如，类似培育后非氟化化合物 20 降解了 87%。

虽然在氟取代后观察到稳定性升高的总趋势，但这对所有氟化衍生物并非都正确。例如，在微粒体制备物中培育 2 小时后，在两个苯环上 3- 和 3'- 位 (9) 有取代的三苯基乙酰胺降解了 97%。所以在这种情况中，相对于氯三苯甲咪唑和非氟化的氯三苯甲咪唑，氟取代明显增加了降解量。

类似地，在一个环上有两个氟取代的类似化合物也迅速降解。例如，在微粒体培养物中培育 2 小时后，在 2-、4- (8) 和 3-、4- 位 (7) 有取代的衍生物分别降解了 61% 和 85%。另外，那些三个苯环之一有单取代的化合物也迅速降解。例如，在微粒体制备物中培育 2 小时后，在 3-、3'- 和 3''- 位 (17) 有取代的衍生物降解 82%。

综上所述，业已发现只有所选择的取代模式才能赋予氟化的三苯基乙酰胺所需的稳定性水平。还观察了具有取代模式化合物的效力和选择性的类似变化。

#### 15 b. 效力

用氟取代苯环上氢的一个出人意料的结果是显著提高了本发明化合物(相对于氯三苯甲咪唑和非氟化的三苯基乙酰胺)对 Gardos 的效力。例如，非氟化三苯基乙酰胺 20 对 Gardos 通道的  $IC_{50}$  为 50nM。与其相比，类似物单氟化三苯基乙酰胺 2 的  $IC_{50}$  为 15nM，效力提高了 330%。

20 虽然观察到氟化三苯基乙酰胺衍生物效力增加的总趋势，但某些取代模式相对于未取代的亲代化合物看来效力改善得更多。这种总趋势的一方面是多环取代的衍生物通常比单环取代的衍生物效力更强。例如，化合物 8 在一个环上的 2- 和 4- 位有两个氟取代，它的  $IC_{50}$  为 34nM。与其相比，化合物 12 在一个环的 2- 位上有一个氟取代，在另一个环的 4 位有一个氟取代，它的  $IC_{50}$  为 5nM。这反映了化合物 12 比化合物 8 效力提高近 700%。另外，化合物 12 比非氟化的母体化合物 20 效力大 1000%。这反映效力增加超过氯三苯甲咪唑 2000%!

除了效力增加的趋势外，化合物效力的改善程度却无法从每个环上的取代数事先预测。例如，化合物 9 在一个环的 3- 位有氟取代、在另一个环的 3' 位

有一个氟取代, 它的  $IC_{50}$  为 30nM。类似的化合物 11 在一个环的 2-位有一氟取代, 在另一环的 4'-位有一氟取代, 它的  $IC_{50}$  为 5nM, 化合物 11 比化合物 9 效力高 600%。

如上所述, 已发现通过慎重地选择氟取代的数量和氟取代基在三苯基乙酰胺上的位置, 可操纵这些化合物对 Gardos 通道的效力。令人惊讶的是, 观察到这些化合物对 Gardos 通道选择性的类似影响。

### c. 选择性

除了效力和生物可利用性外, 通过抑制离子流治疗镰刀形细胞贫血的药物还必需对其靶离子通道具有选择性。药物与靶以外通道的相互作用很可能导致不良的和潜在的危险性副作用。例如, 已知氯三苯甲咪唑和它的一些类似物与肌细胞延迟整流钾电流  $I_{Ks}$  的慢成分相互反应。此电流的阻断与心室纤维性颤动导致的猝死相关(Turgeon 等人, *Circulation Research* 75:879-86(1994))。所以, 表现出对 Gardos 通道选择性(相对于  $I_{Ks}$ )的化合物可能证明是更安全 and 有效的药物。

在 Gardos 通道抑制剂的一个或多个环上氟化的另一个出人意料的结果, 是这些化合物对 Gardos 的选择性相对于其他钾通道有所提高。与氯三苯甲咪唑和非氟化的母体三苯基乙酰胺相比, 本发明的几种氟取代的三苯基乙酰胺表现出它们对 Gardos 通道的选择性(相对于  $I_{Ks}$ )明显提高。例如, 化合物 3 和化合物 5 对 Gardos 通道(相对于  $I_{Ks}$ )的选择性比氯三苯甲咪唑分别高约 16 和 18 倍。另外, 这些化合物比未取代的三苯基乙酰胺母体 20 对 Gardos 通道的选择性高 6 倍。

已发现氟取代的三苯基甲烷衍生物(尤其是氟取代的含氮化合物如三苯基乙酰胺)能有效地抑制红细胞的 Gardos 通道。另外, 氟取代的化合物表现出生物介质中的降解有抵抗力, 相对于未被氟取代的相应化合物达到了令人惊讶的水平。

用以下实施例进一步说明本发明的化合物、组合物和方法。这些实施例仅起说明作用, 对本发明的权利要求无任何限制。

### 实施例



实施例 1 说明了本发明化合物的合成和定性方法。用该实施例所详述的方法可以分离得到基本纯形式的本发明的化合物且收率良好。

1 实施例 2 说明了对本发明化合物在生物介质抵抗降解的分析。在该实施例中，用人肝微粒体形成生物介质。发现相对于非氟化的三苯基甲基化合物，本  
5 发明的化合物表现出对微粒体制备物引起的降解作用的明显抵抗力。

实施例 3 列出了在大鼠中对本发明化合物进行的药物动力学研究。发现本发明的氟化化合物在体内表现出相对于非氟化的衍生物半衰期有所增加。

实施例 4 描述了一种生物试验用于检测本发明化合物对钾通道(Gardos 通道)的抑制。

10

### 实施例 1

本实施例说明了本发明化合物的合成和定性方法。用以下所述的方法分离了基本纯形式的本发明化合物且收率良好。本实施例提供了常规范围的方法，可用以合成除特别说明以外的本发明的化合物。

15

#### 1.1 材料和方法

除非特别指出可直接使用得到的试剂。用 Franco 等人, J.Chem.Soc.Perkins Trans.II,443(1998)的方法制备不能购得的氟化苯基锂试剂和氟化苯酮。所有这些水份敏感的反应都是用烘干的玻璃器皿在氮气中进行的。用 TLC 在硅胶  
20 60F<sub>254</sub> 上监测反应，并用 Hanessian 染料碳化探测 (Khadem 等人, Anal.Chem.1958,30,(1965))。用 Selecto 硅胶 (32—63IM) 进行柱层析。在 Electrothermal IA9000 单元上测定熔点且不校正。室温在 CDCl<sub>3</sub> 中用 Varian (Gemini 2000)NMR 仪记录 <sup>1</sup>H(300MHz)和 <sup>19</sup>F(282MHz)波谱。用四甲基硅烷作为内参照。用 CHIRACEL<sup>5</sup> OD—R 柱通过手性技术进行化合物 1 的手性分离，  
25 用乙腈/水洗脱。

#### 1.2 化合物 1 的制备

从可购得的前体分四步制备化合物 1，收率为 28%。

##### 1.2a (2-氟苯基)-(4-氟苯基)苯基甲醇的合成

将苯基溴化镁(1.83ml,5.5mmol)逐滴加入搅拌中的以叔丁基甲醚(12ml)中配的 2,4'-二氟二苯酮(1.09, 5.0mmol)溶液中。添加完毕后, 将反应物加热回流 3 小时。溶液冷却至室温, 倾倒入冰冻的 1.0M HCl(aq)(20ml)中。用 EtOAc(3×10ml)提取有机层, 并干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。减压浓缩得到所需的产物(2-氟苯基)-5-(4-氟苯基)苯基甲醇, 呈浅褐色油性, 无需进一步纯化可直接用于下一步骤。

#### 1.2b (2-氟苯基)-(4-氟苯基)苯基乙腈的合成

室温将(2-氟苯基)-(4-氟苯基)苯基甲醇(1.47g,5.0mmol)加到二氯甲烷(10ml)配的 20%乙酰氯溶液中。搅拌得到的溶液 12 小时, 然后蒸发除去溶剂。  
10 在残留物中加入甲苯(2×20ml), 蒸发得到粗制的 2-氟苯基-(4-氟苯基)苯基氯甲烷, 其无需纯化可直接用于下一步骤。

在残留物中加入氰化铜(0.50g,5.5mmol), 将得到的混合物 130℃加热 2.5 小时。一旦反应物冷却到 110℃, 就加入甲苯(30ml), 剧烈搅拌此混合物 10 分钟。过滤反应混合物, 减压除去溶剂。在此粗制物质中加入热己烷(30ml), 剧烈搅拌此混合物 30 分钟。过滤并用更多的己烷洗涤, 得到所需的呈白色固体的  
15 的氰化物, 无需进一步纯化可直接使用。

#### 1.2c (2-氟苯基)-(4-氟苯基)苯基乙酰胺(1)的合成

室温将浓硫酸(10ml)和冰醋酸(10ml)溶液加到粗制的(2-氟苯基)-(4-氟苯基)苯基乙腈(1.48g,5.0mmol)中。搅拌得到的橙红色溶液, 130℃加热 3 小时。将反应物冷却至 0℃, 逐滴加入氢氧化铵中和。加入水(30ml), 用氯仿(3×30ml)提取有机层。合并有机组分, 依次用水(2×10ml)和盐水(20ml)洗涤。干燥有机相( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 减压浓缩。将己烷(30ml)加到得到的浅褐色油中, 引发沉淀。研磨沉淀, 依次用热己烷(30ml)洗涤。己烷/二氯甲烷结晶得到呈白色晶体的所需产  
25 物(2-氟苯基)-(4-氟苯基)苯基乙酰胺(0.45g,1.4mmol,28%,4 步)。

### 1.3 化合物 3 的制备

从购得的前体分 3 步制备化合物 3, 收率为 58%。

#### 1.3a 合成二(4-氟苯基)苯基甲醇

室温将苯基溴化镁(100ml,0.1mol)逐滴加到搅拌中的以叔丁基甲醚(150ml)配的 4, 4'-二氟二苯酮(20g,0.092mol)溶液中。添加完毕后, 加热回流反应物 3 小时。将溶液冷却至室温, 倾倒入冰冻的 1.0M HCl(100ml)水溶液中。用 EtOAc(2 × 50ml)提取有机层, 并干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。减压浓缩得到呈浅褐色油的二(4-氟苯基)苯基甲醇。真空干燥 2 小时后, 得到的粗制物质无需进一步纯化直接用于下一反应。

### 1.3b 合成二(4-氟苯基)苯基乙腈

室温将二(4-氟苯基)苯基甲醇(0.092mol)加到二氯甲烷(50ml)配的 20%乙酰氯溶液中。搅拌此紫色溶液 12 小时, 然后蒸发除去溶剂。将甲苯(100ml)加到残留物中, 然后蒸发, 得到粗制的二(4-氟苯基)苯基氯甲烷, 其无需纯化可直接用于下一步骤。

在残留物中加入氰化铜(8.24g,0.11mol), 将得到的混合物 140℃加热 3 小时。反应物冷却到 100℃, 加入甲苯(100ml)。剧烈搅拌此混合物 10 分钟, 冷却至室温, 通过硅藻短衬垫过滤, 减压除去溶剂得到棕色固体。在此粗制物质粉中加入热己烷(100ml), 剧烈搅拌此混合物 4 小时。过滤并加入己烷洗涤, 得到所需的呈白色固体的二(4-氟苯基)苯基乙腈(18.9g,67%)。

### 1.3c 合成二(4-氟苯基)苯基乙酰胺(3)

室温将浓硫酸(50ml)和冰醋酸(50ml)溶液加到二(4-氟苯基)苯基乙腈(18.9g,0.06mol)中。搅拌得到的橙红色溶液, 130℃加热 3 小时。将反应物冷却至 0℃, 倾倒入冰水(150ml)中, 用氢氧化铵中和。用氯仿(3 × 100ml)提取有机层, 合并有机组分, 用盐水(2 × 50ml)洗涤。干燥有机相( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), 减压浓缩, 得到橙黄色固体。用热己烷(100ml)搅拌此固体 30 分钟, 然后过滤。从二氯甲烷/己烷结晶得到呈白色结晶固体的二(4-氟苯基)苯基乙酰胺(3)(16.9g,0.052mmol,87%)。

## 1.4 制备化合物 5

从购得的前体分 4 步制备化合物 5, 收率为 66%。

#### 1.4a 合成二(4-氟苯基)-2-氟苯基甲醇

室温将对氟苯基溴化镁(124ml,0.12mol)逐滴加到搅拌中的以叔丁基甲醚(100ml)配的 2,4'-二氟二苯酮(24.5g,0.11mol)溶液中。添加完毕后,加热回流反应物 3 小时。然后将该溶液冷却至室温,倾倒入冰冻的 1.0M HCl(aq)(100ml)中。用 EtOAc(3×70ml)提取有机层,并干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。减压浓缩,得到浅黄色油性的二(4-氟苯基)-2-氟苯基甲醇,其无需进一步纯化可直接用于下一反应。

#### 1.4b 合成二(4-氟苯基)-2-氟苯基乙腈

10 室温将二氯甲烷(60ml)配的 20%乙酰氯溶液加到粗制的二(4-氟苯基)-2-氟苯基甲醇中。搅拌此溶液 12 小时,然后蒸发除去溶剂。在残留物中加入甲苯(100ml),然后蒸发得到粗制的二(4-氟苯基)-2-氟苯基氯己烷,其无需纯化可直接用于下一步骤。

在此粗制物质中加入氰化铜(12g,0.13mol),160℃加热此混合物 3 小时。将反应物冷却至 110℃左右,加入甲苯(100ml),剧烈搅拌此混合物 10 分钟。冷却混合物,用短硅石柱过滤,减压浓缩。在此粗制物质中加入热己烷(100ml),剧烈搅拌混合物 30 分钟。过滤并用更多己烷洗涤后得到呈白色固体的所需的二(4-氟苯基)-2-氟苯基乙腈(25.3g,70%)。

#### 20 1.4c 合成二(4-氟苯基)-2-氟苯基乙酰胺(5)

室温将浓硫酸(10ml)和冰醋酸(10ml)溶液加到二(4-氟苯基)-2-氟苯基乙腈(5.0g,0.015mol)中。搅拌得到的橙红色溶液,130℃加热 2 小时。将反应物冷却至 0℃,倾倒在冰上(50g)。逐滴加入氢氧化铵中和。加入  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (100ml),用加入的  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (3×30ml)提取有机层。依次用水(2×10ml)和盐水(20ml)洗涤合并的有机组分。干燥( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )有机相,减压浓缩得到黄色/橙色固体。将固体制成粉末,反复用热己烷(50ml)洗涤,直到滤液不再有颜色。从己烷/二氯甲烷结晶得到呈白色晶体的二(4-氟苯基)-2-氟苯基乙酰胺(5)(4.89g,0.0145mmol,94%)。

### 1.5 制备化合物 16

从购得的前体分 4 步制备化合物 16, 收率为 11%。

#### 1.5a 合成二(4-氟苯基)-3-氟苯基甲醇

78℃将正丁基锂(4ml,10mmol)逐滴加到搅拌中的以 THF(25ml)配的溴-3-氟苯(1.75g,10mmol)溶液中。20 分钟后加入 4, 4'-二苯甲酮(1.96g,9mmol)。让反应物升温至 0℃, 为时 30 分钟。加入饱和 NH<sub>4</sub>Cl(aq)(30ml), 继续搅拌 30 分钟。加入 EtOAc(20ml), 分出有机相, 用盐水(20ml)洗涤, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 减压浓缩。柱层析纯化残留物(100%己烷对 100%CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 得到二(4-氟苯基)-3-氟苯基甲醇(2.81g,92%)。

10

#### 1.5b 合成二(4-氟苯基)-3-氟苯基乙腈

室温在二氯甲烷(10ml)配的 20%乙酰氯溶液中加入二(4-氟苯基)-3-氟苯基甲醇(999mg,3.18mmol)。搅拌此紫色溶液 12 小时, 然后蒸发除去溶剂。在残留物中加入甲苯(20ml), 然后蒸发得到粗制的二(4-氟苯基)-3-氟苯基氯甲烷, 其无需纯化可直接用于下一步骤。

在此粗制物质中加入氰化铜(344mg,3.82mol), 140℃加热此混合物 3 小时。将反应物冷却至 110℃左右, 加入甲苯(50ml), 剧烈搅拌此混合物 10 分钟。将混合物冷却至室温, 用短硅石柱过滤, 减压除去溶剂得到米色固体。在此粉末状粗制物质中加入热己烷(100ml), 剧烈搅拌混合物 1 小时。过滤并用更多己烷洗涤后得到呈白色固体的所需的二(4-氟苯基)-3-氟苯基乙腈, 其无需纯化可直接使用。

#### 1.5c 合成二(4-氟苯基)-3-氟苯基乙酰胺(16)

室温将浓硫酸(10ml)和冰醋酸(10ml)溶液加到二(4-氟苯基)-3-氟苯基乙酰胺(3.18mmol)中。搅拌得到的橙色溶液, 130℃加热 3 小时。将反应物冷却至 0℃, 倾倒到冰水(50ml)中, 用氢氧化铵中和。用氯仿(3×50ml)提取有机层。用盐水(2×10ml)洗涤合并的有机组分, 干燥(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 减压浓缩得到黄色/橙色固体。用热己烷(50ml)搅拌固体 30 分钟, 并过滤。从二氯甲烷/己烷结晶得到呈白色晶体的二(4-氟苯基)-3-氟苯基乙酰胺(16)(147mg,0.43mmol,11%, 4

步)。

#### 1.6 用 $^1\text{H}$ 和 $^{19}\text{F}$ NMR 光谱定性化合物及其熔点

联用  $^1\text{H}$  和  $^{19}\text{F}$  NMR 光谱定性本发明的化合物，并测定化合物的熔点。

1:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.39-7.26 (8H, m), 7.15-6.90 (5H, m), 5.83 (1H, brs), 5.72 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -103.4 (1F, s), -115.8 (1F, s); m.p 180-181  $^{\circ}\text{C}$ .

2:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.37-7.28 (6H, m), 7.15-7.05 (2H, m), 6.93 (1H, dt,  $J=8$  and 2 Hz), 5.90 (1H, brs), 5.68 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -103.4 (1F, m); m.p 210  $^{\circ}\text{C}$ .

3:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.37-7.20 (9H, m), 7.04-6.91 (4H, m), 5.81 (1H, brs), 5.71 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -115.7 (2F, s); m.p 180-181  $^{\circ}\text{C}$ .

4:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.37-7.24 (12H, m), 6.97 (2H, t,  $J=8.5$  Hz), 5.83 (1H, brs), 5.75 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -116.2 (1F, s); m.p 193-194  $^{\circ}\text{C}$ .

5:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.41-7.34 (1H, m), 7.29-7.23 (4H, m), 7.16 (1H, ddd,  $J=18.1, 8.1$  和  $1.2$  Hz), 7.15 (1H, d,  $J=7.7$  Hz), 7.05-6.97 (4H, m), 6.93-6.87 (1H, dt,  $J=8.0$  和  $1.4$  Hz), 5.90 (1H, brs), 5.74 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -103.3 (1F, s), -115.5 (2F, s); m.p 168-169  $^{\circ}\text{C}$ .

6:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.64-7.54 (4H, m), 7.40-7.34 (6H, m), 5.70 (2H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 137.3 (2F, d,  $J=19.2$  Hz), -155.8 (1F, t,  $J=21.4$  Hz), -161.9 (2F, dd,  $J=21.4$  和  $17.1$  Hz).

7:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.37-7.31 (6H, m), 7.28-7.20 (5H, m), 7.12-7.04 (2H, m), 5.90 (1H, brs), 5.74 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -137.8 to -137.9 (1F, m), -140.3 to -140.4 (1F, m); m.p 174-175  $^{\circ}\text{C}$ .

8:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.37-7.28 (10H, m), 6.95-6.83 (2H, m), 6.81-6.75 (1H, m), 5.92 (1H, brs), 5.80 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -99.1 (1F, dd,  $J=19.2$  和  $8.5$  Hz), -111.6 (1F, m); m.p 187-188  $^{\circ}\text{C}$ .

9:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.38-7.22 (7H, m), 7.09-6.96 (6H, m), 5.83 (1H, brs), 5.77 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -112.6 (2F, dd,  $J=17.1$  and  $6.4$  Hz); m.p 195-196 $^{\circ}\text{C}$ .

13:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.26-7.19 (6H, dd,  $J=9.0$  和  $5.4$  Hz), 7.20-7.01 (6H, t,  $J=8.7$  Hz), 5.83 (1H, brs), 5.69 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -115.3 (3F, s); m.p 180-181  $^{\circ}\text{C}$ .

14:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.39-7.27 (9H, m), 7.17-7.03 (4H, m), 5.90 (1H, brs), 5.85 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -102.9 (2F, s); m.p 166-167  $^{\circ}\text{C}$ .

15:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.41-7.34 (2H, m), 7.29-7.23 (4H, m), 7.17-7.05 (4H, m), 6.99 (2H, t,  $J=8.7$  Hz), 5.78(2H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -103.0 (2F, s), -115.9 (1F, m); m.p 187-188  $^{\circ}\text{C}$ .

16:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.34-7.20 (6H, m), 7.06-6.97 (6H, m), 5.90 (1H, brs), 5.71 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -112.2 (1F, dd,  $J=17.1$  和  $7.4$  Hz), -115.1 to -115.2 (2F, m); m.p 165-166  $^{\circ}\text{C}$ .

17:  $^1\text{H}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : 7.35-7.21 (3H, m), 7.06-6.97 (9H, m), 7.17-7.05 (4H, m), 5.96 (1H, brs), 5.76 (1H, brs);  $^{19}\text{F}$  NMR  $\Gamma(\text{CHCl}_3)$ : -112.2 (3F, dd,  $J=17.1$  和  $8.5$  Hz); m.p 186-188 $^{\circ}\text{C}$ .

## 实施例 2

本实施例说明了对本发明化合物在生物介质中抗降解的试验。在本实施例

中，用人肝微粒体形成生物介质。发现相对于非氟化的三苯基甲基化合物，本发明的化合物表现出对耐微粒体制备物的降解作用具有明显的抗性。

## 2.1 材料和方法

5 测试了 17 种氟化的三芳基甲烷化合物、氯三苯甲咪唑和氯化的三芳基甲烷化合物 18，在人肝微粒体反应混合物中的体外代谢稳定性。反应混合物含有 1.0mg/ml 人肝微粒体蛋白质、100mM 磷酸钾(pH 7.4)、10mM  $MgCl_2$  和生成 NADPH 的系统。37℃以 5IM 浓度测试化合物，且计算 2 小时后该混合物中保留的完整化合物的量，以初始剂量的百分比表示。

10

## 2.2 结果

本研究的结果表明本发明的氟化化合物比类似物非氟化的化合物对生物微环境中的降解抗性提高。上表 2 列出了这些结果。

## 15 实施例 3

本实施例描述了用大鼠对本发明化合物的药物动力学研究。发现本发明的氟化化合物显示其体内半衰期比非氟化的衍生物长。

## 3.1 材料和方法

20 用大鼠进行药物动力学研究发现在苯环上所选的氟取代，将化合物体外的代谢稳定性增加到体内的研究中。将化合物 1、化合物 3 和化合物 18 给予 3—5 只雌性 Spargue—Dawley 大鼠，在测定  $T_{1/2}$  和口服生物利用度前剂量为 1mg/kg i.v.和 10mg/kg p.o.。从给药前和 p.o.给药后 24 小时的 9 个时间点，以及给药前和 i.v.给药后 24 小时的 11 个时间点收集血样。制备样品并用 LC  
25 —MS/MS 分析化合物血浆浓度。

## 3.2 结果

如从体外代谢数据所预计的那样，化合物 18 的口服利用度很差，在给药后 0.25 和 1 小时血浆中的水平极低(31—65ng/ml)，且给药后 2 小时的样品中



没有可检测水平。通过 i.v.途径，自血流清除的速率非常快。因为口服给药样品中的血浆水平非常低，以至于不能计算化合物 18 的生物利用度百分比。

与化合物 18 得到的结果明显相反的是，化合物 1 具有好得多的口服生物利用度(35%)，计算出化合物 3 的口服利用度为 100%。

5 图 1 显示了本药物动力学实验的结果。

#### 实施例 4

实施例 4 描述了测定本发明化合物对血红细胞中钙激活的钾通道（Gardos 通道）的抑制的生物试验。

10

##### 4.1 材料和方法

用改良的 Flux 缓冲液(MFB:140mM NaCl;5mM KCl;10mM Tris;0.1mM EGTA;pH=7.4)洗涤肝素化的（Heparinized）全血 3 次。然后用  $^{86}\text{Rb}$ (5 $\mu\text{Ci/ml}$ ) 培育洗涤过的细胞 3 小时。培育后，用冷 MFB 洗涤 PBC 3 次。然后用本发明的测试化合物培育洗涤过的载有  $^{86}\text{Rb}$  的 RBC 10 分钟。然后加入 20 $\mu\text{l/ml}$  MFB 溶液(含有 10mM  $\text{CaCl}_2$  和 100 $\mu\text{M}$  A23187，一种钙离子载体)，引发  $^{86}\text{Rb}$  流通。在培育介质中产生终浓度 200 $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  和 2 $\mu\text{M}$  A23187。培育细胞 10 分钟，离心沉降，除去上清液。在 Wallace Microbeta 液体闪烁计数器中通过 Cerenkov 发射计数样品。用水裂解 RBC，然后用乙醇：氯仿(50：50)混合液沉淀蛋白质  
15 测定总 RBC  $^{86}\text{Rb}$  含量。用微量离心管离心 20 分钟后，分开水层和有机层，取出水层并计数。以初始细胞的  $^{86}\text{Rb}$  含量的百分比表示流出量。  
20

##### 4.2 结果

上述生物试验表明本发明的化合物是优良的 Gardos 通道抑制剂。上表 2  
25 列出了抑制研究的数据结果。

可以理解本文所述的实施例和实例仅起说明的作用，那些本领域技术人员可能建议的各种改进或变化都在本申请的精神和范围中，且视为在本发明所附的权利要求范围中。本文所引用的所有出版物、专利和专利申请都全部纳入本文作为参考。

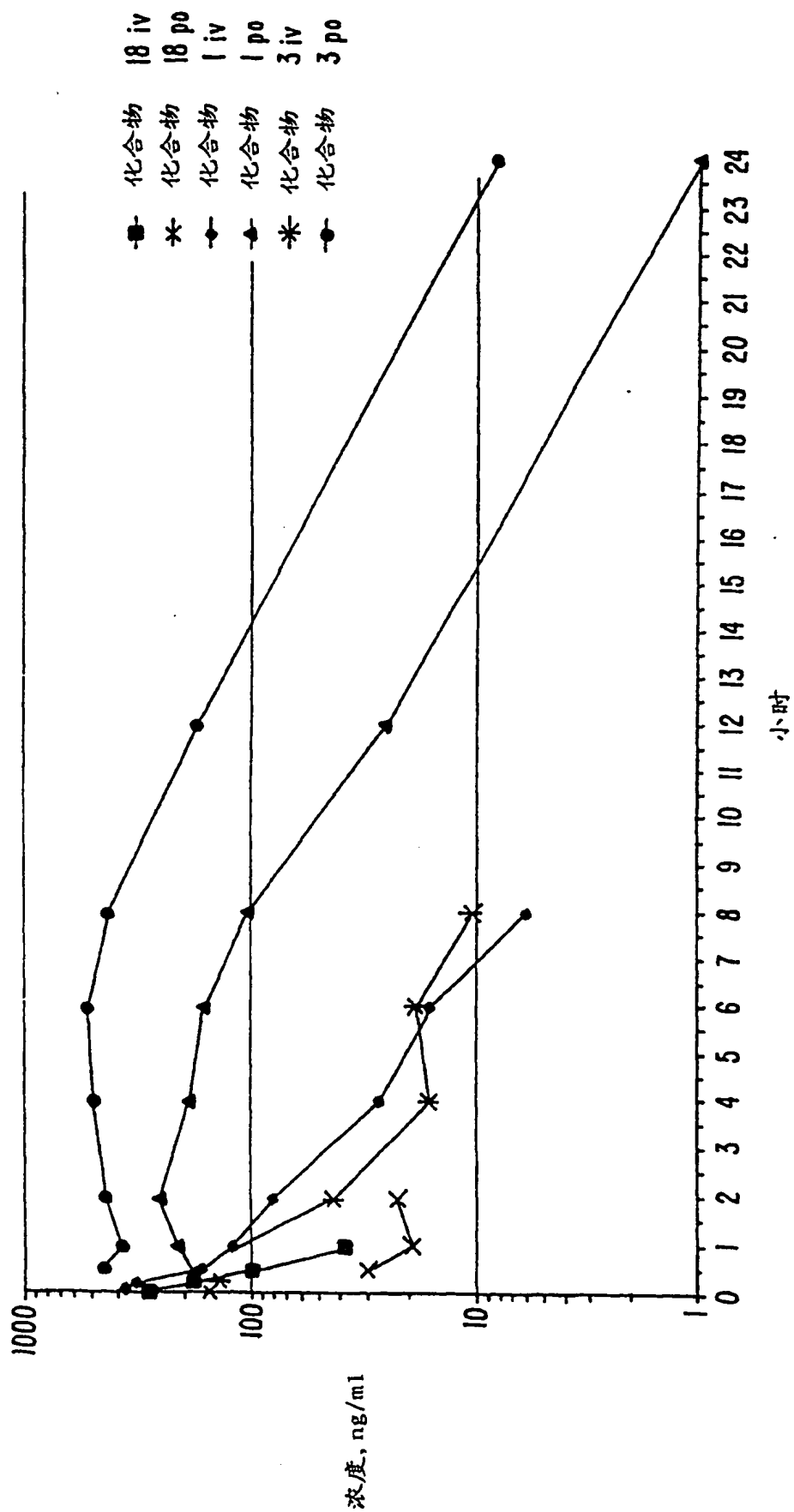


图 1