

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810092041.2

[51] Int. Cl.

A61K 31/352 (2006.01)

A61P 9/06 (2006.01)

C07D 311/30 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 1 日

[11] 公开号 CN 101273984A

[22] 申请日 2008.2.29

[21] 申请号 200810092041.2

[30] 优先权

[32] 2007. 3. 2 [33] US [31] 60/892556

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

共同申请人 中国科学院上海药物研究所

[72] 发明人 李贵荣 刘柱柏 秦国伟 王红兵

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 关立新 刘 玥

权利要求书 5 页 说明书 35 页 附图 13 页

[54] 发明名称

黄酮化合物作为钾通道抑制剂的用途

[57] 摘要

本发明提供一种使用抑制超快激活的延迟整流钾电流( $I_{kur}$ 或 $I_{Ksus}$ ), 瞬间外向钾电流( $I_{to}$ ), 以及乙酰胆碱活化钾电流( $I_{KAch}$ )的先导黄酮化合物刺槐素, 以及其衍生物和类似物治疗或预防人类房性心律失常(纤颤)的方法。

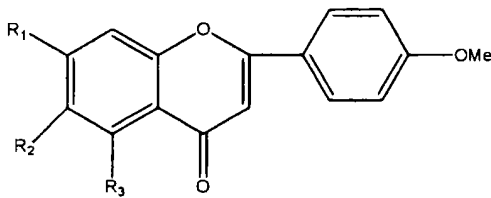
1. 一种药物组合物，其包含与药学上可接受的赋形剂一起制剂的一定量的刺槐素或其药学活性的衍生物、类似物、盐、苷、酯、酰胺或立体异构体，所述量能有效地抑制需要它的患者的钾通道功能。

2. 根据权利要求1的组合物，其包含从植物来源中分离的刺槐素或其类似物。

3. 根据权利要求1的组合物，其中所述组合物是从化学合成获得的刺槐素或其衍生物。

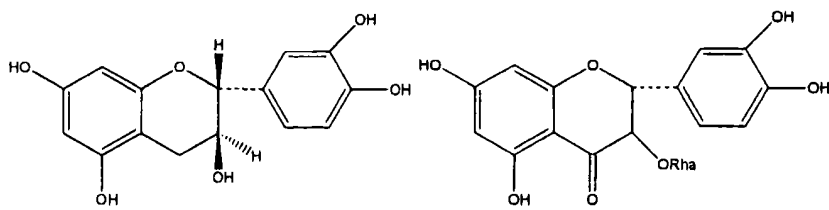
4. 根据权利要求1的组合物，其包含分离的刺槐素。

5. 根据权利要求1的组合物，其包含具有下式的分离的化合物：



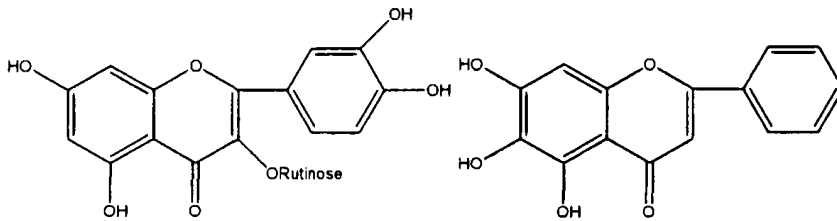
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
OH	H	OH
CH <sub>3</sub> COO	H	OH
苯甲酸酯	H	OH
CH <sub>3</sub> O	H	OH
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O	H	OH
OH	H	对甲氧基苯甲酸酯
对甲氧基苯甲酸酯	H	OH
H	H	H
H	Cl	H
H	CH <sub>3</sub>	H

6. 根据权利要求1的组合物，其包含选自下列的分离的化合物：



A-9

A-10



A-11

和

A-12

7. 一种治疗患者中心律失常的方法，其中所述方法包括向患者给药有效量的刺槐素或其药学活性衍生物、类似物、盐、苷、酯、酰胺或立体异构体。

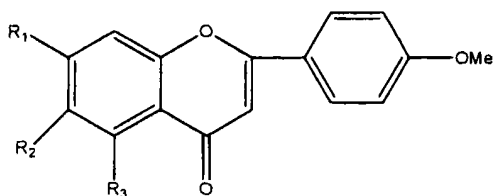
8. 根据权利要求7的方法，其中所述心律失常为心房颤动。

9. 根据权利要求7的方法，其中所述方法包括给药从植物来源中分离的刺槐素或其类似物。

10. 根据权利要求7的方法，其中所述方法包括给药从化学合成获得的刺槐素或其衍生物。

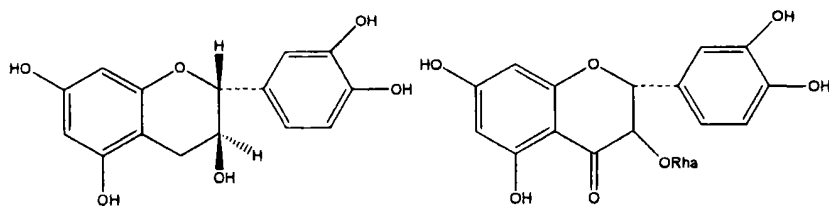
11. 根据权利要求7的方法，其中所述方法包括给药分离的刺槐素。

12. 根据权利要求7的方法，其中所述方法包括给药具有下式的分离的化合物：



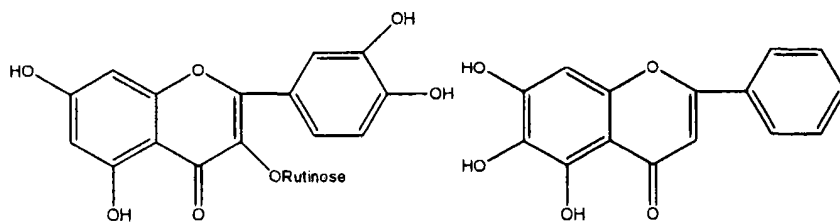
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
OH	H	OH
CH <sub>3</sub> COO	H	OH
苯甲酸酯	H	OH
CH <sub>3</sub> O	H	OH
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O	H	OH
OH	H	对甲氧基苯甲酸酯
对甲氧基苯甲酸酯	H	OH
H	H	H
H	Cl	H
H	CH <sub>3</sub>	H

13. 根据权利要求7的方法，其中所述方法包括给药选自下列的化合物：



A-9

A-10



A-11

和

A-12

14. 根据权利要求7的方法，其中所述患者是人类。

15. 一种抑制患者中钾通道功能的方法，其中所述方法包括向患者给药在药学上可接受的赋形剂中的有效量的刺槐素或其药学活性衍生物、类似物、盐、苷、酯、酰胺或立体异构体。

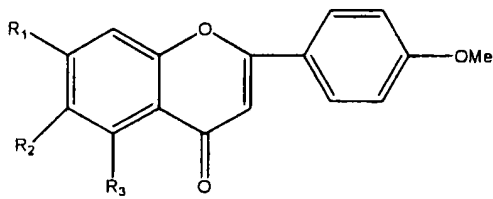
16. 根据权利要求15的方法，其中所述方法包括给药从植物来源中分离的

刺槐素或其类似物。

17. 根据权利要求15的方法，其中所述方法包括给药从化学合成获得的刺槐素或其衍生物。

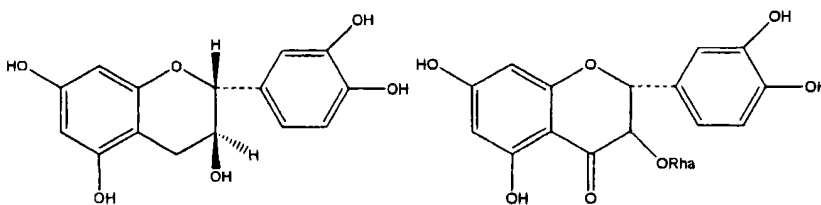
18. 根据权利要求15的方法，其中所述方法包括给药分离的刺槐素。

19. 根据权利要求15的方法，其中所述方法包括给药具有下式的分离的化合物：



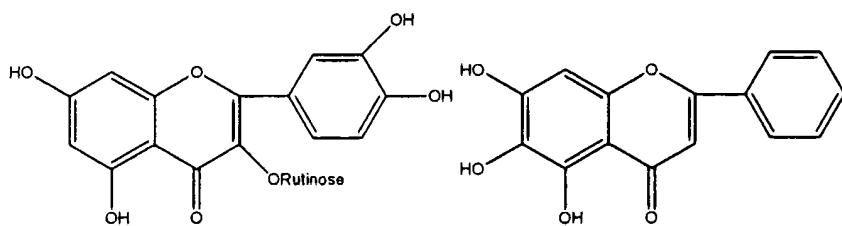
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
OH	H	OH
CH <sub>3</sub> COO	H	OH
苯甲酸酯	H	OH
CH <sub>3</sub> O	H	OH
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O	H	OH
OH	H	对甲氧基苯甲酸酯
对甲氧基苯甲酸酯	H	OH
H	H	H
H	Cl	H
H	CH <sub>3</sub>	H

20. 根据权利要求15的方法，其中所述方法包括给药选自下列的化合物：



A-9

A-10



A-11

和

A-12

21. 根据权利要求 15 的方法，其中所述患者是人类。

## 黄酮化合物作为钾通道抑制剂的用途

### 交叉参考相关申请

本申请要求享有2007年3月2日递交的系列号60/892,556的美国临时申请权益。

### 技术领域

本发明涉及黄酮化合物刺槐素及其衍生物和类似物作为钾通道抑制剂和作为抗心房颤动剂的用途。

### 背景技术

心房颤动的(AF)是心律失常的最常见的形式。AF的发病率随年龄而增加:患病率从50岁人群的0.5%,增加了65岁以上人群的5%,并至80岁以上人群的接近10%(Benjamin等,1998;Wang等,2003)。由于AF增加了死亡、充血性心力衰竭和包括中风在内的栓塞现象的危险,其为发病率和死亡率的一个主要原因(Benjamin等,1998;Wang等,2003)。AF被认为是在老龄人群中的一个影响寿命的威胁,并且因此成为一种主要的公共健康忧虑(Lloyd-Jones等,2004;Lip和Tse,2007)。

抗心律失常药物治疗法仍然是抑制AF和其复发的主要方法。第III类抗心律失常药在治疗AF方面有效(Nademanee,1992;Roden,1993),但具有重要的缺陷,例如诱发严重的室性心律失常(例如,长期QT综合症)(Roden和Anderson,2006)。因此,目前抑制AF的策略中的一个主要目标是研发优先作用于房性而非室性电参数的抗心律失常药(Burashnikov等,2007;Blaauw等,2004)。

第III类抗心律失常药是选择性延长心肌动作电位持续时间而没有明显的心脏抑制的药物。目前已有的药物例如索他洛尔和胺碘酮具有第III类性质(Sharma等,1999;Nattel和Singh,1999),但是它们也有其他作用。索他洛尔也具有导致心脏抑制的第II类作用( $\beta$ -肾上腺素受体阻断),并且在某些易感

患者中禁用 (D'Aloia 等, 2005; DeWitt 和 Waksman, 2004)。胺碘酮具有多种电生理学活性, 并且由于副作用而受到限制 (Nademanee, 1992)。

其他第 III 类抗心律失常药包括多非利特(UK-68, 798), 阿莫兰特(H234/09) 和 E-4031。这些化合物, 包括索他洛尔, 显示了  $I_{kr}$  的突出的阻断作用。然而, 胺碘酮是  $I_{ks}$  的阻断剂 (Balsler 等, 1991), 并且也阻断  $I_{Na}$  和  $I_{Ca}$ 。

因为  $I_{kr}$  同时存在于人类心脏的心房和心室中 (Wang 等, 1994; Li 等, 1996b),  $I_{kr}$  阻断剂增加心房和心室中的动作电位持续时间和不应性。理论上, 它们代表了用于治疗比如 AF 的心律失常的可能有用的试剂; 然而, 这些药物由于其具有在低心率时增加心律失常危险而具有易患性。例如, 当使用这些化合物时观察到尖端扭转型室性心动过速 (torsades de points) (Roden 和 Anderson, 2006)。在低心率时的该增强的作用被称为“逆向频率依赖性”, 其不同于频率不依赖性或者频率依赖性作用 (Hondeghem, 1992)。

在完整的人类心房肌细胞中, 已经鉴别了一种超快激活的延迟整流  $K^+$  电流  $I_{kur}$ , 也称为持续外向  $K^+$  电流 ( $I_{ksus}$  或者  $I_{so}$ ) (Wang 等, 1993)。这种电流具有与那些在 HEK293 细胞中稳定表达的克隆的人类心脏  $K^+$  通道 hKv1.5 类似的性质和动力学 (Fedida 等, 1993)。这种超快激活的延迟整流  $I_{kur}$  被发现功能性存在于人类心脏的心房中, 但不存在于心室中 (Li 等, 1996b)。因为  $I_{kur}$  是快速活化的, 并且具有有限的慢速失活,  $I_{kur}$  被认为对人类心房的复极化很重要。 $I_{kur}$  的阻断将会选择性地减慢在人类心房中复极化和延长不应性, 而不会引起心室复极化的延迟。一种选择性  $I_{kur}$  阻断剂在去极化后将不会产生心律失常和在用现有第 III 类药物治疗时观察到的获得性长期 QT 综合症。因此, 人类心房  $I_{kur}$  和/或人类 Kv1.5 被认为是研发选择性抗心房颤动药物的潜在靶点 (Brendel 和 Peukert, 2003; Peukert 等, 2003)。然而, 目前并没有这种市售可获得的药物。

### 发明简述

本发明提供黄酮化合物和它们作为钾通道功能抑制剂的用途。在一个实施方案中, 本发明提供抑制作为治疗房性心律失常的靶点的人类心房  $I_{kur}$  和  $I_{to}$  的化合物。

在一个具体实施方案中, 本发明涉及刺槐素用于及相关的化合物治疗心房颤动 (AF) 的用途。



刺槐素具有优良的性质,使其作为一个优选的  $I_{Kur}$  通道阻断剂特别有用。本发明的这些化合物可用于治疗哺乳动物包括人类中的疾病,并且特别用于治疗人类 AF。

#### 附图说明

图 1A 和 1B 显示了 XLH-I 对代表性人类心房肌细胞的瞬变外向钾电流( $I_{to}$ , 图 1A) 和持续钾电流 ( $I_{Kur}$ , 图 1B) 的作用。

图 2A, 2B, 2C 显示了刺槐素对  $I_{Kur}$  的作用。图 2A. 刺槐素对  $I_{Kur}$  的时间依赖型作用,以及对清除 (washout) 恢复 (97%) 的抑制作用。图 2B. 被 3、10 和 30  $\mu$ M 刺槐素抑制的电压依赖型  $I_{Kur}$ 。图 2C. 刺槐素在 +40mV ( $n=8-20$  个试验) 抑制  $I_{Kur}$  的浓度响应关系。

图 3A, 3B, 3C 显示了刺槐素对人类心房肌细胞中  $I_{to}$  的作用。图 3A. 在代表性细胞中刺槐素对  $I_{to}$  的时间依赖型作用。在 3  $\mu$ M 时刺槐素可逆地同时降低了  $I_{to}$  和  $I_{Kur}$ 。图 3B. 用在插图中显示的方案记录电压依赖型  $I_{to}$ 。用 10  $\mu$ M 维拉帕米抑制  $I_{Kur}$  至阻断  $I_{Kur}$ , 并且用 3 和 10  $\mu$ M 刺槐素降低剩余的  $I_{to}$ 。图 3C. 刺槐素在 +40mV ( $n=7-16$  个试验) 抑制  $I_{to}$  的浓度响应关系。

图 4A 和 4B 显示了刺槐素对  $I_{to}$  动力学的作用。图 4A. 稳态 (steady-state) 活化和失活的电压依赖型不变 10  $\mu$ M 刺槐素的影响。图 4B. 刺槐素减慢  $I_{to}$  从失活的恢复。

图 5A、5B、和 5C 显示了刺槐素对人类心房肌细胞的动作电位的作用。图 5A. 在代表性细胞中 (左侧) 用 5 和 10  $\mu$ M 刺槐素, 和在另一种细胞 (右侧) 中用 50  $\mu$ M 的 4-AP 在 2Hz 时记录的动作电位。图 5B. 在 50%、75% 和 90% 复极化时的动作电位平均值 ( $APD_{50}$ ,  $APD_{75}$  和  $APD_{90}$ )。  $n=6 * P < 0.05$ ;  $P < 0.01$  对对照组。图 5C. 刺槐素 (10  $\mu$ M) 引起 APD 的轻度依赖型延长 ( $n=7$ ,  $P=NS$ , 0.5Hz 对 2Hz)。

图 6A、6B 和 6C 显示了刺槐素对在豚鼠心房肌细胞中  $I_{KACh}$  的抑制。图 6A. 在豚鼠心房肌细胞中细胞膜电流用 2s 的变速从 -120 到 +50mV 记录。5  $\mu$ M 卡巴胆碱显著地增加了细胞膜电导率。3  $\mu$ M 刺槐素降低了升高的电导率。图 6B. 细胞膜电流用 300ms 电压步骤方案记录。图 6C. 在有和没有刺槐素时卡巴胆碱诱导的  $I_{KACh}$  的  $I-V$  关系。3 和 10  $\mu$ M 刺槐素实质上阻断了  $I_{KACh}$  ( $n=5$ , 在 -100 到

-80mV, 在-50 到+60mV 时  $P < 0.01$  )。

图 7A-7F 显示了刺槐素对在豚鼠心室肌细胞中  $I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$  和  $I_{K1}$  没有作用。图 7A. 在代表性细胞中记录的  $I_{Na}$  迹线。图 7B. 在有和没有 30 和 100  $\mu$  M ( $n=5-6$ ) 刺槐素时的  $I_{Na}$  的  $I-V$  关系。图 7C. 心脏细胞中记录的  $I_{CaL}$  迹线。图 7D. 在有和没有 30 和 100  $\mu$  M 刺槐素时 ( $n=5-7$ ) 的  $I_{CaL}$  的  $I-V$  关系。图 7E. 在代表性细胞中用插图中显示的电压方案记录的  $I_{K1}$  迹线。图 7F. 在有和没有 30 和 100  $\mu$  M 刺槐素 ( $n=6$ ) 时的  $I_{K1}$  的  $I-V$  关系。

图 8A、8B、8C 和 8D 显示了刺槐素对在 HEK293 细胞中稳定表达的  $I_{hERG}$  和  $I_{ks}$  的作用。图 8A 30  $\mu$  M 刺槐素可逆地抑制电压依赖型  $I_{hERG}$ 。图 8B 刺槐素阻断  $I_{hERGtail}$  的浓度响应关系 (+40mV,  $n=8-14$  个试验)。图 8C 在稳定表达 hKCNQ1/hKCNE1 基因的 HEK293 细胞中, 用 30  $\mu$  M 刺槐素抑制电压依赖型  $I_{ks}$ 。图 8D 用 +40mV ( $n=7-12$  试验) 刺槐素抑制  $I_{Ks,step}$  的浓度响应关系。

图 9A、9B、9C 和 9D 显示了刺槐素和奎尼丁对离体兔心脏的心率和 ECG 的 QTc 间期的作用。图 9A. 30  $\mu$  M 刺槐素不影响 ECG 参数。图 9B. 10  $\mu$  M 奎尼丁降低心率, 并且延长 ECG 的 QTc 间期。图 9C. 在 30  $\mu$  M 刺槐素或 10  $\mu$  M 奎尼丁前后的心率平均值 (相对处理前  $P < 0.01$ )。图 9D. 30  $\mu$  M 刺槐素或 10  $\mu$  M 奎尼丁前后的 ECG 的 QTc 间期的平均值 (相对处理前  $P < 0.01$ )。

图 10A、10B 和 10C 显示了麻醉狗中的用于测定左右心房 ERP 和 S2 诱导 AF 的单相动作电位 (MAPs) 被刺槐素阻止。图 10A. 用 S1 和 S2 刺激的 ERP 测定。图 10B. 当在 200msBCL 测量右心房 ERP 时, S2 触发持续的 AF。图 10C. 用 5mg/kg 刺槐素处理 2h 后不再触发 AF。

图 11A、11B、11C 显示了刺槐素和索他洛尔对麻醉狗中左心房 ERP 和 QTc 的作用。图 11A. 相对于基础水平 (在十二指肠内给药前, 相对载体, ANOVA\* $P < 0.05$ ) 250 和 200ms 的 BCLs 对左心房 ERP 的改变百分比。图 11B. 索他洛尔, 而非刺槐素, 显示了 ERP 的“可逆速率依赖性”延长 (数据来自给药后三小时)。图 11C. 索他洛尔, 而非刺槐素, 在麻醉狗中延长了 QTc 间期 ( $P < 0.05$ )。

图 12A 和 12B 显示了麻醉狗中的 AF 诱导作用。图 12A. 代表性的记录显示使用分别引入右心房和左心室的 MAP 记录和起搏导管记录的 ECG (线 II) 和 MAP 迹线。图 12B. 用伴有连续两侧迷走神经刺激和心室起搏的 100msBCL

的 S1-S2 刺激（箭头）产生 AF。ECG 符合心室起搏节律。

图 13A 和 13B 显示了麻醉狗中 AF 的发生率和药物对 AF 诱导的作用。图 13A. 2.5、5 和 10mg/kg 刺槐素，而非赋形剂，在十二指肠内给药后 1.5-2.5h 降低了 AF 发生率。索他洛尔也在麻醉狗中降低了 AF 发生率。图 13B. 5 和 10mg/kg 刺槐素显著地抑制了 AF（相对赋形剂\* $P < 0.05$ ，Fisher 精确检验）。

### 发明详述

本发明提供黄酮化合物和它们作为钾通道功能抑制剂的用途。在一个实施方案中，本发明提供抑制用作房性心律失常治疗靶点的人类心房  $I_{Kur}$  和  $I_{to}$  的化合物。

在本文阐述的一个具体实施方案中，黄酮化合物被用于治疗心房颤动。在一个优选的实施方案中，刺槐素被用于治疗人类心房颤动。

根据本发明，发现天然黄酮刺槐素是一种用于治疗 AF 的新的、口服有效的、心房选择性的、抗心律失常的药物。有利地，发现刺槐素优选地抑制  $I_{Kur}$  和  $I_{to}$ ，延长人类心房肌细胞中的 APD，延长 ERP，和预防麻醉狗中的 AF 诱导。除了阻断心房  $I_{Kur}$ ， $I_{to}$  和  $I_{KACh}$  以外，刺槐素的抗过氧化作用和抗炎作用也是有益的。

研究了来自中文称为“雪莲花”（*Saussurea laniceps* 的全草）的 Snow-Lotus-Flowers 的乙醇提取物对人类心房肌细胞的细胞膜电流的作用。乙醇提取物的氯仿部分提取物（XLH-1）显示了对人类心房肌细胞的  $I_{Kur}$  和  $I_{to}$  的基本抑制（图 1）。然后，从 XLH-1 提取物中分离出一些化合物（化合物 A、B、C 和 D）。在人类心房肌细胞中的一系列实验后，发现化合物 A 具有对人类心房肌细胞的  $I_{Kur}$  和  $I_{to}$  的阻断作用。然后，化合物 A 的化学结构被鉴定为刺槐素。

刺槐素是一种黄酮化合物（5,7-二羟基-4'-甲氧黄酮），广泛分布在植物色素中，通常存在于维管植物中，并且与自然界中的大部分颜色有关（Cody, 1988）。刺槐素被报道具有抗过氧化、抗炎和抗疟活性（Liao 等, 1999; Kraft 等, 2003），增强 HL-60 细胞中的分化诱导活性（Kawaii 等, 2000），和对一些种类的癌症产生抗癌作用，所述癌症包括人类前列腺癌、肺癌和 HepG2（Singh 等, 2005; Pan 等, 2006; Hsu 等, 2004）。另外，刺槐素也可抑制谷胱甘肽降解、细胞色

素 P450 和拓扑异构酶 I-催化 DNA 再连接(Zhang 等, 1997; Doostdar 等, 2000)。

除了刺槐素, 本发明还涉及其衍生物、类似物、盐、苷、酯、酰胺和/或立体异构体的用途。

根据本发明, 刺槐素抑制  $I_{Kur}$  和  $I_{to}$ , 延长人类心房肌细胞的动作电位持续时间, 且阻断豚鼠心房细胞中的  $I_{KAch}$ 。这种化合物对豚鼠的心室肌细胞  $I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$  和  $I_{K1}$  没有作用, 并且显示对在 HEK293 细胞中稳定表达的 hERG 通道和  $I_{Ks}$  通道有弱抑制作用。重要地, 刺槐素不会增加麻醉狗和离体兔心脏的 EGC 的 QTc 间期。

人们普遍认为心脏复极化和不应性由内向  $Ca^{2+}$  和外向  $K^{+}$  电流的平衡来决定。 $I_{Kur}$  和  $I_{to}$  是人类心房的主要外向电流, 并因此在人类心房复极化中起重要作用 (Courtemanche 等, 1999)。从前的研究证实  $I_{Kur}$  功能地存在于人类心脏的心房中, 但是不存在于心室中 (Li 等, 1996b)。因此,  $I_{Kur}$  是选择性抗 AF 药物的很有吸引力的靶点 (Nattel 等, 2002)。

根据本发明, 发现刺槐素以浓度依赖性方式抑制人类心房的  $I_{Kur}$ ,  $IC_{50}$  为 3.2  $\mu M$  (图 2)。该浓度比以前在抗过氧化、抗炎和抗诱变研究中的低 (Pan 等, 2006; Cholbi 等, 1991; Kraft 等, 2003)。另外, 刺槐素阻断  $I_{to}$ ,  $IC_{50}$  为 9.2  $\mu M$  (图 3), 并且在不影响电流的电压依赖性下减慢  $I_{to}$  从失活的恢复 (图 4)。刺槐素对  $I_{to}$  的抑制作用也有助于延长人类心房的 APD。5 和 10  $\mu M$  的刺槐素显著延长了 APD 在 0.5、1.0 和 2.0 Hz 的复极化 50%、75% 和 90% (图 5)。APD 的延长增加了有效不应期和终止了 AF。

迷走神经刺激缩短了心房 APD 和有效不应期, 因此迷走神经紧张在 AF 中起重要作用 (Schauerte 等, 2000; Zipes 等, 1974)。乙酰胆碱活化的钾电流  $I_{KAch}$  终由毒蕈碱 M 受体活化调节大多数迷走神经刺激的的心脏反应 (Hashimoto 等, 2006; Liu 和 Nattel, 1997)。 $I_{KAch}$  和/或 M 受体表达在 AF 患者中 (Bosch 等, 1999) 和在狗的实验性心衰诱导的 AF 中被上调 (Shi 等, 2004)。因此,  $I_{KAch}$  的阻断将终止增加迷走神经紧张诱导的 AF。选择性  $I_{KAch}$  阻断剂 tertiapin, 一种蜂毒多肽, 终止了由刺激狗迷走神经而引起的 AF (Hashimoto 等, 2006)。

根据本发明, 发现 3 和 10  $\mu M$  刺槐素基本上抑制了豚鼠心房肌细胞的卡巴胆碱诱发的  $I_{KAch}$  (图 6), 表明刺槐素对终止  $I_{KAch}$  活化诱导的 AF 有效。

30-100  $\mu M$  刺槐素显示对豚鼠心室肌细胞的心脏  $I_{Na}$ 、 $I_{CaL}$  和  $I_{K1}$  没有抑制作

用(图7)。这些结果表明刺槐素将不会降低心脏传导速度或收缩性,并且将不会如在第I和第II类抗心律失常药中观察到的一样使细胞膜去极化。

另一方面,刺槐素抑制  $I_{hERG}$ , 在 HEK293 细胞系中的  $IC_{50}$  为  $32.4 \mu M$ , 并且也抑制  $I_{Ks}$ , 在稳定表达 hKCNQ1/hKCNE1 通道的 HEK293 细胞中的  $IC_{50}$  为  $81.4 \mu M$  (图8)。然而,刺槐素 ( $30 \mu M$ ), 相对于奎尼丁 ( $10 \mu M$ ), 不影响离体低血钾兔心脏中的心率,且不会造成 QTc 延长(图9)。

已经提议过快延迟整流电流  $I_{kur}$  (或  $Kv1.5$ ) 的阻断作为一种用于研究更安全和可能更有效地心房抗心律失常药物的一个新靶点 (Pecini 等, 2005)。有四种结构不同的合成的抗心律失常药物已被描述具有  $I_{kur}$  阻断作用, 以及描述了它们的作用范围部分: NIP-141 (Seki 等, 2002), AVE0118 (de Haan 等, 2006; Gogelein 等, 2004), RSD1235 (Fedida 等, 2005), 和 DPO-1 (Regan 等, 2006)。

如上讨论的, 确定刺槐素, 一种  $I_{kur}$  阻断剂, 也阻断  $I_{to}$  和  $I_{KAch}$ 。这些性质对于终止 AF 是有利的。

刺槐素 ( $5mg/kg$ ) 在十二指肠内给药后的麻醉狗中显著延长了心房 ERP 而不延长 QTc 间期 (图 10&11, 表 1&2), 不同于索他洛尔, 因为索他洛尔同时延长了心房 ERP 和 QTc。这些结果表明刺槐素具有抗 AF 潜在作用而没有致心律失常潜在性。实际上, 在麻醉狗中证实了抗 AF 效果, 因为 5 和  $10mg/kg$  刺槐素显著地避免了 AF 诱发 (图 13)。

另外, 在两周的观察期间, 在用刺槐素最大口服剂量 ( $900mg/kg$ ) 的小鼠中没有发现动物死亡, 表明刺槐素具有低急性毒性或没有急性毒性。

最后, 一个比较研究(表3)表明所研究的衍生物/类似物对于  $Kv1.5$  和 hERG 通道具有较小的离子通道选择性 (A-2) 或者对于  $Kv1.5$  具有较少的作用 (A-4、A-5、A-6、A-2-11、A-2-12、A-2-13、A-2-14) 或没有作用 (A-9、A-10、A-11、A-12)。

表 1 显示刺槐素和索他洛尔对麻醉狗中右心房 ERP 的作用

BCL	ERP (ms)		
	300	250	200ms
刺槐素 5mg/kg (n=5)			
处理前	100.8±7.9	96.5±6.9	87.2±7.9
1	108.5±3.7	98.8±3.6	89.5±2.7
2	118.5±5.3*	118.5±11.6*	104.5±8.9*
3	124.1±9.7*	112.3±6.3*	106.5±7.9*
4 处理后	125.2±11.2*	116.4±11.2*	105.1±7.5*
索他洛尔 5mg/kg (n=5)			
处理前	100.3±9.4	96.3±8.3	88.7±3.9
1	128.1±8.6*	122.5±6.6*	99.4±3.2
2	143.1±12.2*	128.6±8.9*	105.1±5.1*
3	138.5±8.7*	128.2±7.6*	111.3±9.3*
4 处理后	139.4±8.3*	126.3±6.9*	112.8±9.1*
赋形剂 (n=4)			
处理前	108.1±6.2	99.1±6.4	93.1±6.1
1	111.9±6.5	106.3±5.9	98.1±7.1
2	108.8±7.3	100.1±9.2	93.2±8.2
3	108.2±9.0	98.1±10.4	91.8±9.2
4 处理后	100.5±8.9	96.9±9.8	91.3±8.7

\*相对于处理前 P&lt;0.05

表2 显示刺槐素和索他洛尔对麻醉狗中左心房 ERP 的作用

BCL	ERP (ms)		
	300	250	200ms
刺槐素 5mg/kg (n=5)			
处理前	105.1±3.9	89.9±3.5	94.4±3.4
1	122.1±9.4*	116.5±8.3*	106.5±7.2*
2	125.1±7.8*	119.8±8.0*	110.1±6.8*
3	126.7±8.6*	122.5±8.9*	113.5±7.9*
4 处理后	125.1±7.8*	118.9±7.5*	111.5±6.5*
索他洛尔 5mg/kg (n=5)			
处理前	99.4±3.7	94.3±3.1	88.8±3.7
1	115.6±5.7	113.8±9.2*	99.4±3.2*
2	125.6±8.5*	116.9±3.2*	105.1±5.1*
3	132.5±12.4*	120.1±2.6*	109.3±7.5*
4 处理后	135.6±6.9*	121.9±6.7*	107.6±4.2*
赋形剂对照 (n=4)			
处理前	107.8±7.4	100.1±7.7	94.5±7.1
1	107.5±8.2	104.3±8.1	97.5±6.9
2	103.8±6.3	101.9±6.5	97.3±5.9
3	99.9±6.7	92.5±5.3	88.2±5.8
4	100.1±7.1	92.5±4.1	86.3±6.8

\*相对于 P&lt;0.05 处理前

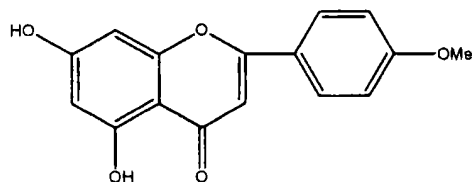
表3 显示刺槐素与其衍生物/类似物对 Kv1.5 和 hERG 通道阻断作用的比较观察

化合物/衍生物	Kv1.5 (IC <sub>50</sub> , μM)	hERG (IC <sub>50</sub> , μM)
刺槐素	3.4	32.4
A-2	2.04	4.1
A-4	9.0	21.9
A-5	23.5	13.0
A-6	13.7	57.9
A-9	NE	NE
A-10	NE	NT
A-11	NE	NE
A-12	NE	NE
A-2-11	WE	NT
A-2-12	WE	NT
A-2-13	WE	NT
A-2-14	WE	NT

注：NE，无效；NT，没有测定；WE，作用弱（100 μM 时抑制作用<50%）

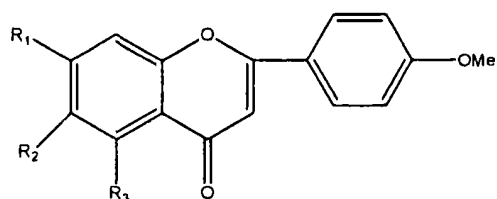
### 刺槐素及其衍生物和类似物

#### 刺槐素的结构



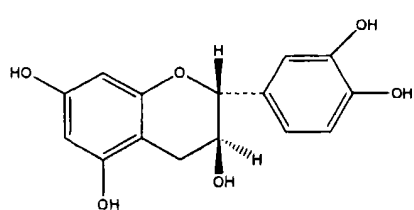
#### 合成的衍生物



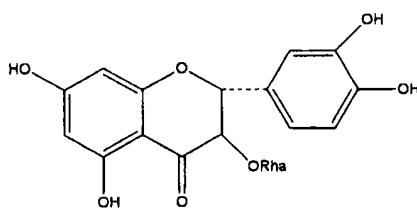


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
A	OH	H	OH
A-02-11-11	CH <sub>3</sub> COO	H	OH
A-02-11-12	苯甲酸酯	H	OH
A-02-11-13	CH <sub>3</sub> O	H	OH
A-02-11-14	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O	H	OH
A-2	OH	H	对甲氧基苯甲酸酯
A-3	对甲氧基苯甲酸酯	H	OH
A-4	H	H	H
A-5	H	Cl	H
A-6	H	CH <sub>3</sub>	H

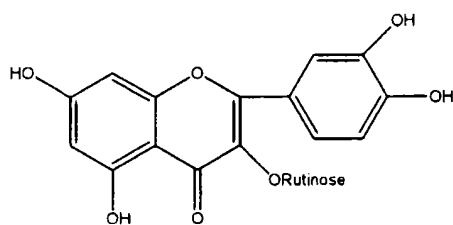
### 自然来源的类似物



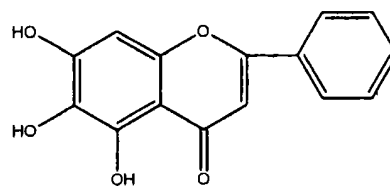
A-9



A-10



A-11



A-12

### 刺槐素及其衍生物的物理数据

### 刺槐素

刺槐素:一种浅黄色粉末;  $C_{16}H_{12}O_5$ ; MW.284; mp 263°C;  $^1H$ -NMR (400MHz, DMSO): 6.82 (s, H-3), 6.47 (d,  $J=1.9Hz$ , H-8), 6.18 (d,  $J=1.9Hz$ , H-6), 7.98 (d,  $J=8.8Hz$ , H-2', 6'), 7.07 (d,  $J=8.8Hz$ , H-3', 5'), 3.85 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>).

### 合成的衍生物

**A-02-11-11**: 一种浅黄色粉末;  $C_{18}H_{14}O_6$ ; MW.326; mp 279°C;  $^1H$ -NMR (400MHz, DMSO): 6.82 (s, H-3), 6.45 (d,  $J=1.9Hz$ , H-8), 6.12 (d,  $J=1.9Hz$ , H-6), 7.98 (d,  $J=8.8Hz$ , H-2', 6'), 7.07 (d,  $J=8.8Hz$ , H-3', 5'), 3.85 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 2.01 (s).

**A-02-11-12**: 一种浅黄色粉末;  $C_{23}H_{16}O_6$ ; MW.388; mp 282°C;  $^1H$ -NMR (400MHz, DMSO): 6.81 (s, H-3), 6.43 (d,  $J=1.9Hz$ , H-8), 6.16 (d,  $J=1.9Hz$ , H-6), 7.97 (d,  $J=8.8Hz$ , H-2', 6'), 7.02 (d,  $J=8.8Hz$ , H-3', 5'), 3.85 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 7.20~7.42 (m).

**A-02-11-13**: 一种浅黄色粉末;  $C_{17}H_{14}O_5$ ; MW.298; mp 174°C;  $^1H$ -NMR (400MHz, DMSO): 6.80 (s, H-3), 6.46 (d,  $J=1.9Hz$ , H-8), 6.16 (d,  $J=1.9Hz$ , H-6), 7.97 (d,  $J=8.8Hz$ , H-2', 6'), 7.02 (d,  $J=8.8Hz$ , H-3', 5'), 3.86 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.84 (s, 7-OCH<sub>3</sub>).

**A-02-11-14**: 一种浅黄色粉末;  $C_{18}H_{16}O_5$ ; MW.312; mp 165°C;  $^1H$ -NMR (400MHz, DMSO): 6.80 (s, H-3), 6.45 (d,  $J=1.9Hz$ , H-8), 6.17 (d,  $J=1.9Hz$ , H-6), 7.96 (d,  $J=8.8Hz$ , H-2', 6'), 7.01 (d,  $J=8.8Hz$ , H-3', 5'), 3.83 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3.89 (dd,  $J=5.0Hz$ ), 1.33 (t,  $J=5.1Hz$ ).

**A-2**: 一种浅黄色粉末;  $C_{24}H_{18}O_7$ ; MW.418; mp 275°C;  $^1H$ -NMR (400MHz, DMSO): 6.80 (s, H-3), 6.42 (d,  $J=1.9Hz$ , H-8), 6.13 (d,  $J=1.9Hz$ , H-6), 7.93 (d,  $J=8.8Hz$ , H-2', 6'), 7.01 (d,  $J=8.8Hz$ , H-3', 5'), 3.85 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 7.79 (d,  $J=8.2Hz$ , 2H), 6.92 (d,  $J=8.2Hz$ , 2H), 3.74 (s, -OCH<sub>3</sub>).

**A-3**: 一种浅黄色粉末;  $C_{24}H_{18}O_7$ ; MW.418; mp 265°C;  $^1H$ -NMR (400MHz, DMSO): 6.85 (s, H-3), 6.32 (d,  $J=1.9Hz$ , H-8), 6.21 (d,  $J=1.9Hz$ , H-6),

7.92 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-2', 6'), 7.03 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-3', 5'), 3.85 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 7.75 (d,  $J=8.2\text{Hz}$ , 2H), 6.99 (d,  $J=8.2\text{Hz}$ , 2H), 3.82 (s, -OCH<sub>3</sub>).

**A-4:** 一种浅黄色粉末; C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>; MW.252; mp 164°C; <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO): 6.71 (s, H-3), 6.92-7.64 (m, H-5, 6, 7, 8), 7.86 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-2', 6'), 6.82 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-3', 5'), 3.73 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>).

**A-5:** 一种浅黄色粉末; C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub>; MW.286; mp 194°C; <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO): 6.67 (s, H-3), 7.34 (d,  $J=1.2\text{Hz}$ , H-5), 7.12 (m, H-7), 6.89 (m, H-8), 7.56 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-2', 6'), 6.82 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-3', 5'), 3.75 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>).

**A-6:** 一种浅黄色粉末; C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>; MW.266; mp 179°C; <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO): 6.73 (s, H-3), 7.21 (d,  $J=1.2\text{Hz}$ , H-5), 7.02 (m, H-7), 6.72 (m, H-8), 7.83 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-2', 6'), 6.80 (d,  $J=8.8\text{Hz}$ , H-3', 5'), 3.71 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>), 2.35 (s, 6-CH<sub>3</sub>).

#### 自然来源的类似物

**A-9:** 一种白色非晶形粉末; C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>; m.p.246-247°C;  $[\alpha]_D^{20} 52.3$  (c 0.128, 在 MeOH 中); LC-MS: 290 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD): 6.92 (1H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 2'-H), 6.69 (1H, d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 5'-H), 6.74 (1H, dd,  $J=8.0, 2.0\text{Hz}$ , 6'-H), 5.88 (1H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 8'-H), 5.86 (1H, d,  $J=2.0\text{Hz}$ , 6-H), 4.76 (1H, s, 2-H), 4.11 (1H, m, 3-H), 2.80 (1H, dd,  $J=17.0, 4.5\text{Hz}$ , 4-H), 2.68 (1H, dd,  $J=17.0, 3.0\text{Hz}$ , 4-H).

**A-10:** 白色针状物; C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>; LC-MS: 466 [M]<sup>+</sup>; m.p.166-168°C;  $[\alpha]_D^{25} +110.5$  (0.15, MeOH); <sup>1</sup>H-NMR (DMSO, 400MHz): 12.60 (1H, s, 5-OH), 10.5 (1H, s, 7-OH), 7.13 (1H, Ar-H), 6.85 (2H, m, Ar-H), 5.93 (2H, s, 6, 8-H), 5.30 (1H, d,  $J=10\text{Hz}$ , 2-H), 4.97 (1H, d,  $J=10\text{Hz}$ , 3-H), 4.70 (1H, d,  $J=7\text{Hz}$ , 1''-H).

**A-11:** 一种黄色粉末; C<sub>24</sub>H<sub>16</sub>O<sub>9</sub>; m.p.190-192°C; LC-MS: 610 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz): 6.13 (1H, d,  $J=1.8\text{Hz}$ , H-6), 6.32 (1H, d,  $J=1.8\text{Hz}$ , H-8), 7.61 (1H, d,  $J=2.1\text{Hz}$ , H-2'), 6.81 (1H, d, 8.4Hz, H-5'), 7.57 (1H,

dd,  $J=2.1, 8.4\text{Hz}$ , H-6'), 5.05 (1H, d,  $J=7.2\text{Hz}$ , H-1''); 4.47 (1H, s, H-1'''), 1.07 (3H, d,  $J=6\text{Hz}$ , CH<sub>3</sub>-6''').

**A-12**: 一种黄色粉末; C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>; m.p.273-275°C; LC-MS: 270 [M]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz): 12.70 (1H, s, C<sub>5</sub>-OH), 10.60 (1H, s, C<sub>7</sub>-OH), 8.48 (1H, s, C<sub>6</sub>-OH), 8.04 (2H, m, C<sub>2,6</sub>-H), 7.57 (3H, m, C<sub>3,4,5</sub>-H), 6.91 (1H, s, C<sub>3</sub>-H), 6.62 (1H, s, C<sub>8</sub>-H)。

### 盐

盐也在本发明的范围内。除非另有说明, 提及本发明的黄酮类化合物应理解为包括提及其盐。如本文使用的术语“盐”表示用无机和/或有机酸和碱形成的酸式和/或碱式盐。另外, 当一个化合物同时包含碱部分和酸部分时, 可以形成两性离子(“内盐”)并且被包括在如本文使用的术语“盐”中。

药学上可接受的(例如, 无毒, 生理可接受的)盐是优选的, 尽管其他盐也用于例如制备期间可能使用的分离或纯化步骤。例如, 可以通过将化合物与一定量比如等量的酸或碱在一种比如盐在其中沉淀的介质中或在一种随后冻干的水介质中反应形成所述化合物的盐。

根据本发明涉及的盐包括那些在申请号为 2007/0203157 的 US 专利中描述的, 将其以其全部引入本文作为参考。

### 立体异构体

本发明化合物的所有立体异构体, 例如由于不对称碳原子可存在的那些, 包括对映体形式(其可以在没有不对称碳原子的情况下存在)和非对映体形式, 都包括在本发明的范围内。本发明化合物的独立的立体异构体可以, 例如, 基本上不含有其他异构体(即大于 90%, 并且优选大于 95%), 或者可以例如, 作为外消旋化合物或与所有其他的, 或其他选择性的立体异构体的混合物。本发明的手性中心可以具有如 IUPAC1974 建议定义的 S 或 R 构型。

### 药物组合物

本发明也提供药物组合物, 其包含至少一种能够预防或治疗一种或多种前述病症的有效量的黄酮化合物或其盐和药学上可接受的赋形剂或稀释剂。本发

明的组合物可以包含其他下述的治疗剂，并且可以根据比如药物制剂领域中众所周知的那些技术例如，使用常规的固体或液体赋形剂或稀释剂，以及适于所需给药方式的一类药物添加剂（例如，赋形剂、粘合剂、防腐剂、稳定剂、芳香剂等）制剂。

除非另有上下文或明确语言说明，如本文使用的“药用载体”或“药用赋形剂”或其他这样的术语排除了在自然界中与刺槐素相关的化合物和材料。如此，除非另有上下文或明确语言说明，“药用载体”或“药用赋形剂”将不会包括，例如，自然界中的与黄酮有关的植物或自然未改变的（unaltered）植物材料。本文涉及“分离的”刺槐素（或其他“分离的”化合物）指合成制备的或在其天然存在于其中的一些或所有其他化合物中除去分离出来的刺槐素（或其他化合物）。

本发明的化合物可以用任何合适的方式给药，例如，口服，例如以片剂、胶囊、颗粒剂或粉末剂的形式；舌下给药；含服；非肠道给药，例如通过皮下、静脉、肌肉或胸骨内注射或输注技术（例如，灭菌可注射的含水或非水体溶液或混悬液）；经鼻给药例如通过吸入喷雾剂；局部给药，例如以乳膏或软膏的形式；或者经直肠给药例如以栓剂的形式；以包含无毒、药学可接受赋形剂或稀释剂的剂量单位制剂形式。

本发明的化合物可以，例如，以适于速释或缓释的方式给药。速释或缓释可以通过使用包含本发明的化合物的合适药物组合物获得，或者，特别在缓释的情况下，通过使用比如皮下植入物或渗透泵的装置获得。在其中给药所述化合物来预防或治疗心律失常的情况下，可以给药所述化合物以获得向正常窦性心律的化学转化，或者可以可任选地与电复律（electrical cardioconversion）合用。

用于口服给药的示例性组合物包括混悬液，其可包含，例如，赋予体积的微晶纤维素，作为混悬剂的海藻酸或海藻酸钠，作为粘度增强剂的甲基纤维素，以及本领域公知的甜味剂或矫味剂；和速释片剂，其可包含，例如，微晶纤维素、磷酸氢钙、淀粉、硬脂酸镁和/或乳糖和/或其它本领域公知的赋形剂、粘合剂、膨胀剂、崩解剂、稀释剂和润滑剂。所述化合物也可以通过舌下和/或含服给药方式经口腔递送。模制片、压制片剂或冻干片剂是可以使用的示例性形式。

示例性组合物包括本发明的化合物与比如甘露醇、乳糖、蔗糖和/或环糊精

的快速溶解稀释剂制剂而成的那些。而且，在这些制剂中包括的可以是高分子量赋形剂比如纤维素（微晶粉末纤维素）或聚乙二醇（PEG）。这种制剂也可以包括帮助粘膜粘附的赋形剂，比如羟丙基纤维素（HPC）、羟丙甲纤维素（HPMC）、羧甲基纤维素钠（SCMC）、马来酸酐共聚物（例如，Gantrez），以及控制释放的物质，比如聚丙烯酸共聚物（例如，卡波姆 934）。为了制备和使用，也可加入润滑剂、助流剂、芳香剂、着色剂和稳定剂。

用于鼻用气溶胶或吸入制剂的示例性组合物包括盐水溶液，其可包含，例如苯甲醇或其他适当的防腐剂，用于提高生物利用度的吸收促进剂，和/或其他本领域已知的增溶剂或分散剂。

用于胃肠外给药的示例性组合物包括注射液或混悬液，其可包含，例如适当的无毒的肠胃外可以接受的稀释剂或溶剂，比如甘露醇、1,3-丁二醇、水、林格溶液，等渗氯化钠溶液，或其他适当的分散剂或润湿剂和混悬剂，包括合成的甘油单酯或甘油二酯和包括油酸的脂肪酸。

用于直肠制剂的示例性组合物包括栓剂，其可包含，例如，适当的非刺激性赋形剂，例如常温下为固态但在直肠腔中液化和/或融解以释放药物的可可脂、合成甘油酯或聚乙二醇。

用于局部给药的示例性组合物包括局部载体，例如 Plastibase（与聚乙烯凝胶的矿物油）。

本发明化合物的有效量可以由本领域普通技术人员来确定，包括对于成年人示例性的剂量为每天大约 0.001 到 100mg/kg 体重的活性药物，其可以以单一剂量或以比如从 1 到 4 次每天的独立分开剂量的形式给药。应当理解对于任何特定患者的具体剂量水平和剂量频率可以变化，并且取决于多种因素，所述因素包括所使用的具体化合物的活性、该化合物的代谢稳定性和活性作用的时长、受试者的种族、年龄、体重、基本健康状态、性别和饮食、给药方式和时间、排泄速度、药物组合、以及特定病症的严重程度。用于治疗的优选受试者包括动物，最优选比如人类的哺乳动物，以及驯养动物比如狗、猫等，前述病症的受试者。

本发明的化合物可以单独使用或与彼此和/或其他适当的用于治疗上述病症或其他病症的治疗剂联合使用，所述其它治疗剂包括：其他抗心律失常药，例如第 I 类药物（例如，普罗帕酮），第 II 类药物（例如，carvadiol 和普萘洛尔），

第 III 类药物（例如，索他洛尔、多非利特、胺碘酮、阿齐利特和伊步利特），第 IV 类药物（例如，地尔硫卓和维拉帕米），5HT 拮抗剂（例如，舒兰色罗，serraline 和 tropsetron）；钙通道阻滞剂；环氧合酶抑制剂（即 COX-1 和/或 COX-2 抑制剂）例如阿司匹林、吲哚美欣、布洛芬、吡罗昔康、萘普生.RTM.、西乐葆.RTM.、万络.RTM.和 NSAID；抗血小板剂；利尿剂（diuretics）；以及在申请号 2007-0203157A1 的美国公开专利中阐述的其他药物，将其从其全部引入本文作为参考。

上述其他治疗剂，当与本发明化合物组合使用时，可以例如，以在 Physicians's Desk Reference (PDR) 中所标明的或其他通过本领域普通技术人员所决定的那些剂量使用。

## 材料与amp;方法

### 1.1 人类心肌细胞的制备

从进行了冠状动脉旁路移植术的患者（56.1±4.7 岁）中得到的人类右心耳样本中分离出心房细胞。得到人类组织的过程在患者同意的基础上被香港大学伦理委员会批准。所有患者没有室上性心律失常，并且心房在手术时很正常。在切除后，迅速将样本浸入充氧的、普通无  $\text{Ca}^{2+}$  心脏麻痹溶液以运至实验室。被像如前所述（Tian 等，2006；Gao 等，2004）酶解分离心房心肌细胞。简单地，切碎心房组织，并且在无  $\text{Ca}^{2+}$  的蒂罗德液中用 100% $\text{O}_2$  通过连续起泡轻轻搅拌 15 分钟（新配溶液中 5 分钟一次），然后在包含 150-200U/ml 胶原酶（CLS II, Worthington Biochemical, Freehold, NJ, UAS）、0.2mg/ml 的蛋白酶（XXIV 类, Sigma-Aldrich Chemical, St Louis, MO, USA）和 1mg/ml 牛血清白蛋白（Sigma-Aldrich）的类似溶液中培养 50 分钟。然后，在相同组分但不含蛋白酶的新配酶溶液中再培养该组块。在显微镜下监测分离细胞的质量和数量。当细胞产量接近最佳时，将该组块悬浮于一种包含（mM）10 KCl、120 K-谷氨酸、10  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.8  $\text{MgSO}_4$ 、10 牛磺酸、10 HEPES、0.5 EGTA、20 葡萄糖、10 甘露醇，pH 用 KOH 调节为 7.3 的高  $\text{K}^+$  培养基中，并且用移液管轻轻地吹。使用前，将分离出的肌细胞在培养基中于室温下保存至少一小时。

### 1.2 豚鼠心肌细胞的制备

在用苯巴比妥 (40mg/kg, i.p.) 麻醉后通过颈椎骨折脱位的方法处死任何性别的豚鼠(250-300g)。在本发明中, 涉及使用动物的过程由 the Animal Care and Use Committee for Teaching and Research of University of Hong Kong 根据 the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1996) 批准。如前所述 (Li 等, 2002a) 酶解分离豚鼠心的左心房和心室肌细胞, 并且将分离的肌细胞保存在  $K^+$  贮存培养基中。

### 1.3. 细胞系培养

将所建立的稳定表达 hERG 通道基因、Kv1.5 (Tang 等, 2007) 或者重组人类心脏 KCNQ1/KCNE1 通道电流 ( $I_{Ks}$ ) (Dong 等, 2006) 的 HEK293 细胞系单独保存在补充了 10% 胎牛血清并且包含 400  $\mu$ g/ml G418 (用于 hERG 或 Kv1.5 通道) 或 100  $\mu$ g/ml 潮霉素 (用于  $I_{Ks}$ ) 的达尔伯克改良的伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium) (invitrogen) 中。

### 1.4. 溶液和药物

用于样品转运的无  $Ca^{2+}$  心脏麻痹溶液包含 (mM) 50  $KH_2PO_4$ 、8  $MgSO_4$ 、5 腺苷、10 HEPES、140 葡萄糖、100 甘露醇、10 牛磺酸、pH 用 KOH 调至 7.3。蒂罗德溶液包含 (mM) 140 NaCl、5.4 KCl、1  $MgCl_2$ 、1  $CaCl_2$ 、0.33  $NaH_2PO_4$ 、10 HEPES、10 葡萄糖、pH 用 NaOH 调至 7.4。移液管溶液包含 (mM) 20 KCl、110K-天冬氨酸、1  $MgCl_2$ 、10 HEPES、5 EGTA、0.1 GTP、5  $Na_2$ -磷酸肌酸, 和 5  $Mg_2$ -ATP, pH 用 KOH 调至 7.2。为了记录  $I_{to}$  和  $I_{Kur}$ , 将  $BaCl_2$  (200  $\mu$ M) 和  $CdCl_2$  (200  $\mu$ M) 加入混悬液中以阻断  $I_{K1}$  和  $I_{CaL}$ 。使用阿托品 (1.0  $\mu$ M) 最小化在电流记录中的可能的  $I_{K_{Ach}}$  污染 (contamination)。为了记录  $I_{CaL}$ , 用 CsCl 替换移液管中的  $K^+$  和蒂罗德溶液。如前所述 (Li 等, 2002a), 在移液管和表面灌流溶液中无  $K^+$  和一个对称的  $Na^+$  (5mM) 的情况下记录  $I_{Na}$ 。

刺槐素最初从 TCM 雪莲花 (*Scoussurea tridactyla*) 中分离出和纯化, 然后如上述对化合物 A 的化学研究的部分中所述在实验室中合成。在 DMSO 中制备一种 100mM 刺槐素或其衍生物/类似物的储存溶液, 储存在 4°C 下。



### 1.5. 数据采集和分析

将一个包含分离细胞的溶液的小等分部分置于一个固定在反向显微镜的载物台上的开口灌注室 (1-ml) 中。使肌细胞附着在容器底部 5-10 分钟, 并且用蒂罗德溶液以 2-3ml/min 表面灌流。仅仅使用有清晰的交叉条纹的静止杆状细胞。对于电流记录在室温 (21-22°C) 下进行该研究或对于动作电位记录在 36°C 下进行该研究。

对于电生理记录使用整体细胞膜片钳技术。用 Brown-Flaming 钳拉入 (模型 P-97, Sutter Instrument Co, Novato, CA, UAS) 硅酸硼玻璃电极 (1.2mm OD), 当装满移液管溶液时其具有 2-3M $\Omega$  的端阻力。细胞膜电流采用 EPC-9 放大器和 Pulse 软件 (HEKA, Lambrecht, Germany) 以电压钳模式记录。使用 3-M KCl 琼脂盐桥作为对比电极。在移液管接触细胞前补偿端电位。在获得千兆欧姆密封时, 通过轻轻抽吸使细胞膜破裂以形成全细胞结构 (configuration)。用 Pulse 软件的锁进模块 (lock-in module) 直接测量细胞膜电容 (pF), 并且用于标准化各个细胞中的电流。串联电阻 ( $R_s$ ) 为 3-5M $\Omega$ , 通过补偿 50-70% 以最小化电压误差。使用多孔膜片结构记录人类心房细胞中的动作电位和 HEK293 细胞中的  $I_{Ks}$ , 如前所述 (Li 等, 2002b; Dong 等, 2006)。电流信号在 5kHz 被低通滤过, 并且储存在 IBM 兼容计算机的硬盘中。

### 1.6. 离体兔心脏的制备

用苯巴比妥 (30mg/kg, i.v.) 麻醉任意性别的新西兰白兔 (2-3kg), 将其心脏迅速移出并放于充氧的蒂罗德溶液中, 心脏固定于 Langendorff 系统上, 并且用包含 (mM) 129 NaCl、3.0 KCl、1 MgCl<sub>2</sub>、1.5 CaCl<sub>2</sub>、20 NaHCO<sub>3</sub>、0.9 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 葡萄糖 (pH7.3-7.4) 的 37°C 充氧 (95%O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) 蒂罗德溶液灌注。用 Powerlab 记录系统经两个分别装在心脏的心底和心尖的电极记录 ECG。根据 Van de Water 方程:  $QT_c = QT - 87 \times [(60/\text{心率}) - 1]$  用心率 (Q-Tc 间期) 矫正来自三个兔心脏 ECG 的测量的 QT 间期的平均 QT 间期, 如前所述 (Spence 等, 1998)。

### 1.7. 整体动物实验

该研究遵照 the US National Institutes of Health 分布的 the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH 出版号 85-23, 修订 1996), 并且被 the

Institutional Ethic Committee 批准。

### 1.7.1. 麻醉狗的体内电生理

用苯巴比妥 (30mg/kg, i.v.) 麻醉成年杂交狗 (12-15kg), 在实验中当需要时补充苯巴比妥。给该动物插管并通入室内空气。用体温控制系统保持体温在 37-38℃。将导管插入左股静脉以维持麻醉, 并向右心房导入单相动作电位记录-和起搏导管 (Boston Scientific Ltd)。分离并分开颈部的迷走神经。为了阻断心脏  $\beta$ -肾上腺作用, 每 2 小时以 0.25mg/kg i.v., 接着以 0.125 mg/kg i.v. 给药纳多络尔。在第四肋间隙进行左胸开胸术, 并且切开心包以提供至左心房的入口用于导入 MAP 导管。使用该导管分别记录左右心房的 MAP, 并且用于测量有效不应期 (ERP)。另外, 引入塑料管 (~0.8×12cm) 以通过胃部幽门给药至十二指肠, 因为刺槐素对于注射应用是水不溶性的。用厚棉绳结扎幽门以防止可能的十二指肠内容物反流。

在 30 分钟平衡期和用 2-ms 持续刺激测量心房兴奋阈后, 先用一系列 8 次基本刺激 (S1, 两次-舒张期震颤) 然后用相同过早刺激 (S2) 来测定心房 ERP。将 200, 250 和 300ms 的基础循环时间 (BCL) 同时应用于左右心房。最初, S2 在舒张晚期以 5-ms 递减传递直到应答不被在 MAP 记录上拍出的 S2 引出 (elicited)。ERP 被定义为无法扩布反应的最长的 S1-S2 间期, 对于每次测量重复该过程三次。连续监测 MAP、ECG 和血压信号并且使用多通道数据获得系统 (RM-6280C, Chengdu Instrument Ltd, Chengdu, China) 将其储存于 IBM 兼容 PC 电脑中。

在测量左右心房的 ERP 后, 将 10%PVP 400 (Sigma-Aldrich, 与 2ml DMSO 一起 20ml) 作赋形剂对照或 20ml 包含 5mg/kg 刺槐素的 10%PVP400 (处理组) 或 20ml 包含 5mg/kg 索他洛尔的 10%PVP 400 (阳性组) 通过给药管注入十二指肠。然后给药后每小时重复测量 ERP 6 小时。在每次 ERP 测量前检验左右心房的兴奋阈。

### 1.7.2. 麻醉狗的实验性 AF

迷走神经在 AF 的发生中起重要作用 (Chiou 等, 1997; Ziper 等, 1974; Liu 和 Nattel, 1997), 因此, 迷走神经过敏的 AF 模型一般被用来研究 AF 和抗

纤维颤动。通过将两个 MAP 导管分别引入右心房和左心室并刺激颈内分开的两侧迷走神经的刺激而在麻醉狗中产生持续的迷走神经过敏 AF。使用一个 15Hz, 0.2ms 持续电压阶跃 (60% 阈值) 的双极电极刺激迷走神经以诱导心率降低 75%。当连续刺激迷走神经时以 2ms 电压脉冲 (2.5Hz, 150% 舒张期震颤) 进行心室起搏。通过先用 BCL 100-ms S1 然后用 S2 持续 10 分钟产生 AF。在迷走神经持续刺激期间没有 AF 发生或者 AF 持续时间缩短被认为有效预防了在十二指肠给药后 0.5-4 小时内 AF 产生期的某个时间点的 AF。可以重复产生持续性 AF 并且通过停止迷走神经刺激而终止。在十二指肠给药前或给药的不同的时间点 (0.5、1、1.5、2、3 和 4 小时) 记录 AF 发生率和 AF 持续时间。

### 1.8. 急性毒性评价

用昆明小鼠 (18-20g, 50% 雌性和 50% 雄性) 测定刺槐素的急性毒性。在 DMSO 中制备刺槐素最大浓度 (263 mg/ml) 贮存液, 然后与 10% PVP400 混合以制备刺槐素口服混悬液。密切观察动物在两周的持续期内的死亡数和活动性。

### 1.9. 统计分析

组数据以平均值  $\pm$  S.E.M. 表示。用成对或不成对观察的 Student's t 检验来进行统计分析以评价两组平均值之间的显著性差异, 和多组的 ANOVA。用 Fisher 精确检验来分析定量数据。采用双边  $P < 0.05$  表示统计显著性差异。用 Pulsefit (HEKA) 和 Sigmaplot (SPSS, Chicago, IL) 进行非线性曲线拟合。

将本文涉及和引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物以其全部, 包括所有的图和表格, 引入作为参考至它们与本说明书的明确教导不矛盾的程度。

下面是阐述实施发明的过程的实施例。这些实施例不应该被解释为限制。除非另有说明, 所有的百分比为以重量计, 并且所有的溶剂混合物比例为以体积计。

### 实施例 1—刺槐素对人类心房肌细胞的 $I_{kr}$ 、 $I_{to}$ 和动作电位的作用

为了测定刺槐素对  $I_{kr}$  的作用, 在有和没有刺槐素的情况下, 在代表性人类心房细胞中先用 100ms 前脉冲至 +40mV 以部分失活  $I_{to}$ , 接着 10ms 间隔期后从

-50 至+50mV, 然后至-30mV 的 160ms 测试脉冲 (Tian 等, 2006; Gao 等, 2004) 记录电流的时间过程 (图 2A)。3  $\mu$  M 刺槐素在 8 分钟暴露时逐渐抑制  $I_{kur}$ , 该作用在清除时恢复 (94%)。图 2B 显示插图中显示的通过电压方案引出的电压依赖型  $I_{kur}$ 。3、10 和 30  $\mu$  M 刺槐素基本上抑制了末端电流和阶跃电流。在+40mV 评价从 0.3 到 100  $\mu$  M 刺槐素对  $I_{kur}$  抑制的浓度响应关系 (图 2C)。将数据拟合成 Hill 方程:  $E=E_{max}/[1+(IC_{50}/C)^b]$ , 其中 E 是在浓度 C 时电流的抑制百分数,  $E_{max}$  是完全抑制,  $IC_{50}$  是达到最大活性一半时的浓度, 且 b 是 Hill 系数。刺槐素抑制  $I_{kur}$  的  $IC_{50}$  是 3.2  $\mu$  M, 它的 Hill 系数是 0.8。

为了检查刺槐素对  $I_{to}$  的作用, 在有和没有刺槐素的情况下, 在一个代表性实验中记录  $I_{to}$  的时间过程 (图 3A)。3  $\mu$  M 刺槐素降低  $I_{to}$ , 该作用在清除时恢复 (95%)。然而, 刺槐素同时也降低持续电流 (即  $I_{kur}$ )。尽管所测的  $I_{to}$  为准稳态水平的峰值, 我们怀疑对于刺槐素对  $I_{to}$  效应的评价可能不准确。我们最近已经发现维拉帕米抑制  $I_{kur}$  而不降低  $I_{to}$  振幅, 同时它诱导在人类心房肌细胞中所测  $I_{to}$  的增加 (Gao 等, 2004)。因此, 使用 10  $\mu$  M 维拉帕米分离  $I_{to}$ , 如图 3B 所示。维拉帕米实际上增加  $I_{to}$  振幅。3 和 10  $\mu$  M 刺槐素基本上抑制电压依赖性  $I_{to}$  (图 3B)。刺槐素对  $I_{to}$  的抑制效应是浓度依赖性的;  $IC_{50}$  为 9.3  $\mu$  M (图 3C), Hill 系数为 0.9。

10  $\mu$  M 刺槐素不影响电压依赖性的  $I_{to}$  的稳态失活和活化 (图 4A)。然而, 10  $\mu$  M 刺槐素显著增加了  $I_{to}$  的恢复时间常数 ( $\tau$ : 对照组中  $102 \pm 12$ ms; 刺槐素组中  $136 \pm 17$ ms,  $P < 0.01$ ) (图 4B), 表明刺槐素减慢了  $I_{to}$  从失活的恢复。

刺槐素对  $I_{kur}$  和  $I_{to}$  的抑制表示该化合物延长人类心房肌细胞中动作电位持续时间 (APD)。因此, 我们用具有多孔膜片结构以电流钳模式在 36°C 记录动作电位, 以测定刺槐素对人类心房 APD 的作用。图 5A 说明了在有和没有刺槐素或 4-AP (一种已知的  $I_{kur}$  阻断剂) (Li 等, 1996b) 的情况下, 在代表性人类心房肌细胞中以 2Hz 记录的动作电位。5 或 10  $\mu$  M 刺槐素以平行对照方式延长 APD 而不影响静息细胞膜电位或动作电位振幅。该作用在清除时恢复。以 50%、75% 和 90% 复极化的 APD 显著增加 (图 5B)。刺槐素诱导  $APD_{50}$ 、 $APD_{75}$  和  $APD_{90}$  的微小速率依赖性升高。50  $\mu$  M 4-AP 比  $APD_{90}$  更延长  $APD_{50}$  (图 5A 的右图), 并且诱导  $APD_{50}$ 、 $APD_{75}$  和  $APD_{90}$  的可逆速率依赖性延长 (数据未显示)。这些结果表明刺槐素对人类心房 APD 的延长很可能不限于对  $I_{kur}$  和  $I_{to}$  的抑制。

### 实施例2—刺槐素对豚鼠心房肌细胞的乙酰胆碱活化钾通道的作用

在来自豚鼠心房肌细胞的左心房肌细胞中研究刺槐素对乙酰胆碱活化 ( $I_{K_{ACh}}$ ) 的作用, 因为在该物种的心房中没有表达  $I_{Kur}$  ( $Kv1.5$ ) 和  $I_o$  通道。用变速 (ramp) 方案 (图 6A) 和电压阶跃方案 (图 6B) 记录的细胞膜电流显示出  $5 \mu M$  卡巴胆碱增加细胞膜电导率, 且  $3 \mu M$  刺槐素显著逆转了增加的电导率。图 6C 显示通过在卡巴胆碱和卡巴胆碱加刺槐素前后的电流数字减影引起的卡巴胆碱活化的  $I_{K_{ACh}}$  的  $I-V$  关系。 $3$  和  $10 \mu M$  刺槐素基本上阻断了  $I_{K_{ACh}}$  (在  $-100$  至  $-80mV$  以及  $+50$  至  $+60mV$   $P < 0.01$ 。在  $-100$  和  $+50mV$  的测定电位下, 对照组的  $I_{K_{ACh}}$  从  $-338.3 \pm 61.5pA$  和  $147.2 \pm 30.1$  降低至  $-180.2 \pm 36.7$   $3 \mu M$  刺槐素降低至  $87.8 \pm 36.1$  ( $P < 0.01, n=5$ ),  $10 \mu M$  刺槐素降低至  $-75.6 \pm 21.1$  和  $55.7 \pm 26.2pA$  ( $P < 0.01, n=6$ )。

### 实施例3—刺槐素对其他心脏离子电流的作用

用豚鼠心室肌细胞研究刺槐素对其他心脏离子电流例如,  $I_{Na}$ 、 $I_{CaL}$  和  $I_{K1}$  的作用。图 7 图解了在使用如图所示的电压方案的不同细胞中记录的  $I_{Na}$ 、 $I_{CaL}$  和  $I_{K1}$  结果。 $30$  和  $100 \mu M$  刺槐素对  $I_{Na}$ 、 $I_{CaL}$  和  $I_{K1}$  没有作用。

在稳定表达 hERG 通道 (人类心脏  $I_{Kr}$  的  $\alpha$ -亚单位) 或  $I_{Ks}$  通道 (hKCNQ1/hKCNE1) 的 HEK293 细胞中测定刺槐素对  $I_{Kr}$  和  $I_{Ks}$  的效应。 $30 \mu M$  刺槐素抑制在代表性细胞中由电压方案引发的 hERG 通道电流的振幅 (插图, 图 8A), 并且该作用在清除时消失 (图 8A)。刺槐素抑制  $I_{hERGtail}$  的  $IC_{50}$  为  $32.4 \mu M$  (图 8B), 且它的 Hill 系数为  $0.9$ 。

图 8C 显示了刺槐素对在 HEK293 细胞系中稳定表达的  $I_{Ks}$  的作用。 $30 \mu M$  刺槐素显著抑制了  $I_{Ks}$  的振幅, 并且该效应清除时部分恢复 ( $83\%$ )。刺槐素以浓度依赖性方式降低在  $+20$  到  $+60mV$  的  $I_{Ks}$ 。刺槐素抑制  $I_{Ks}$  ( $+40mV$ ) 的  $IC_{50}$  为  $81.4 \mu M$  (图 8D) 且它的 Hill 系数为  $0.8$ 。

### 实施例4—刺槐素对在离体兔心中 ECG 的 QTc 间期的作用

上述抑制  $I_{hERG}$  和  $I_{Ks}$  的结果表明刺槐素可能具有延长 ECG 的 QTc 间期的潜力。兔心脏显著地表达  $I_{Kr}$  通道 (Salata 等, 1996), 并且已被用来评价心脏活性

剂的致心律失常作用 (Milberg 等, 2004; Weissenburger 等, 1993; Cahill 和 Gross, 2004)。因此, 该离体兔心脏用于研究刺槐素是否增加 QTc。用低血钾溶液 ( $3\text{mMK}^+$ ) 灌注该心脏。对于刺槐素有代表性的 ECG 记录显示在图 9A, 且对于奎尼丁显示在图 9B 中。 $30\ \mu\text{M}$  刺槐素对心率或 ECG 的 QTc 间期没有作用, 而  $10\ \mu\text{M}$  奎尼丁降低心率并且显著增加 QTc 间期。心率和 ECG 的 QTc 间期的平均值图解在图 9C&9D 中。这些结果表明刺槐素在低血钾情况下不会延长离体兔心脏的 ECG 的 QTc 间期。

#### 实施例 5—刺槐素对麻醉狗的心房不应期的作用

使用通过程序化的心脏刺激器引入 S1-S2 而得 300、250 和 200ms 的 BCLs 来测定麻醉狗的 ERPs (图 10A)。我们发现在十二指肠给药刺槐素 ( $5\text{mg/kg}$ ) 或索他洛尔 ( $5\text{mg/kg}$ ) 后, 在 300、250 和 200ms 的基础循环时间 (BCL) 的 4 小时观察期内, 左右心房 ERP 显著延长了 (表 1 和 2)。图 11A 显示左心房 ERP 的改变百分比的平均值的实例。在给药组中的心房 ERP 增加了 10-25%, 但是在对照组中没有增加。

发现当在麻醉狗中用 200msBCL 测量右 ERP 时 S2 触发持续性 AF (持续 >1 分钟)。在刺槐素组的一个动物中, 给药前 S2 诱导 AF (图 10B), 但是在刺槐素给药的两小时后没有 (图 10C)。在赋形剂组的另一个动物中, 当在观察期内测定右心房 ERP 时, 被 S2 总诱导 AF。这表明刺槐素可能具有抗 AF 作用。

如之前报道的 (Nademanee, 1992; Roden, 1993),  $5\text{mg/kg}$  索他洛尔显示可逆的速率依赖性延长 ERP 和增加 QTc 间期。然而, 刺槐素没有这种对 ERP 的可逆的速率依赖性作用 (图 11B), 并且不会延长 QTc 间期 (图 11C)。这些结果表明刺槐素可能是一种不会导致 QTc 延长的抗 AF 剂。

#### 实施例 6—刺槐素对麻醉狗心房颤动的作用

然后, 在麻醉狗中评价刺槐素对实验性 AF 的效应。在十二指肠给药后 0.5 到 4 小时期间的某个时间点, 从 100msBCL 对双侧迷走神经刺激的 S1-S2 刺激 (参见方法和图 12) 诱导 AF。AF 持续 10 分钟, 一旦迷走神经刺激停止就终止。在连续迷走神经刺激期间没有 AF 发生或者 AF 持续时间缩短被认为是代表抑制了 AF。药物治疗组的 AF 的发生率降低 (图 13A)。在赋形剂的每次 AF 诱

导实验中,在100%的动物中( $n=5$ )观察到持续性 AF,但是在2.5、5和10mg/kg 刺槐素组中,在50% (6中3),57% (7中4)和57% (7中4)的动物中和在索他洛尔组(5mg/kg)中在40% (5中2)的动物中没有观察到。

另外,在5mg/kg 刺槐素组中,两只狗在给药后两小时显示出 AF 的持续时间缩短(一只持续5分钟31秒,另一只持续6分12秒)。在10mg/kg 刺槐素组中,在一个动物中 AF 持续4分钟30秒,在另一个动物中 AF 持续7分钟11秒。在索他洛尔组中,在一个动物中观察到 AF 持续时间缩短(8分钟5秒)。在赋形剂组、2.5mg/kg 刺槐素组、5mg/kg 刺槐素组( $P<0.05$ )、10mg/kg 刺槐素组( $P<0.05$ )和5mg/kg 索他洛尔组中总的抗 AF 功效分别为0%、50%、85.7%、85.7%和60% (图13B)。这些结果表明刺槐素在麻醉狗中抑制了 AF 诱导。

#### 实施例7—在小鼠中的急性毒性

在动物禁食14小时后,用在最大体积的混悬液得到的最大刺槐素浓度评价在小鼠中体内急性毒性。以1.5小时的间隔给药三次0.3g/kg剂量的刺槐素。在两周的观察期内没有发生动物死亡,与赋形剂对照动物相比较,不存在异常活动。这一结果表明口服给药刺槐素具有低的急性毒性或没有急性毒性。

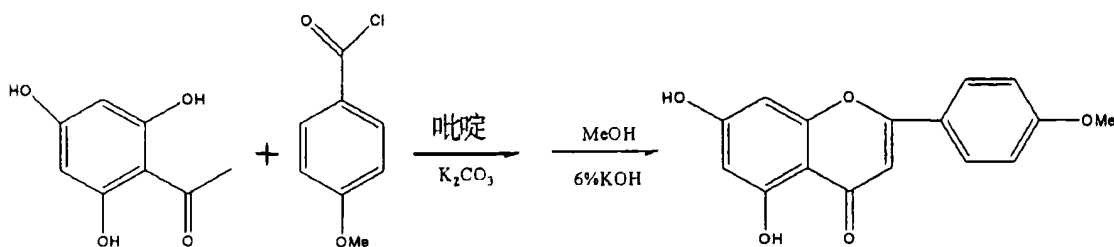
#### 实施例8—刺槐素及其衍生物/类似物对Kv1.5和hERG通道的作用的比较研究

在稳定表达这些通道基因的 HEK293 细胞中分别进行刺槐素及其衍生物/类似物对Kv1.5和hERG通道的效应的比较研究。如表3所述,刺槐素阻断Kv1.5通道的 $IC_{50}$  (3.4  $\mu$ M) 接近人类心房的  $I_{kr}$  (3.2  $\mu$ M) (图2)。尽管衍生物 A-2 对于阻断Kv1.5通道具有较小的 $IC_{50}$  (2.04  $\mu$ M), 其对hERG通道的阻断也比刺槐素更强。A-4、A-5和A-6的 $IC_{50}$ s比刺槐素的更大。其他衍生物/类似物研究对Kv1.5没有抑制效应或抑制作用弱。这些结果表明刺槐素是研发人类抗 AF 研究的理想化合物, 尽管可能不排除其他衍生物/类似物可能更好的作用。

#### 实施例9—刺槐素和其衍生物的制备

##### 刺槐素的合成

##### 反应方案:



### 制备过程:

向 80ml 无水吡啶溶液中连续加入 9.62g 2', 4', 6'-三羟基苯乙酮和 30g 无水  $K_2CO_3$  和 31g 4-甲氧基苯甲酰氯, 然后当将其在  $120^\circ C$  油浴中回流 3 小时后用氯仿萃取反应溶液, 并且用水 (100ml) 洗涤氯仿萃取液, 用无水  $K_2CO_3$  干燥氯仿液并用活性炭去色, 然后真空浓缩。将残余物用 60ml 无水乙醇溶解, 其沉淀在溶液中, 过滤, 得到 13.53g 中间体。

向 50ml 甲醇溶液中加入 6.3g 上述中间体和 6% KOH 溶液, 搅拌并回流 20 小时, 然后真空中回收大部分甲醇, 并且用氯仿萃取以除去一些无关成分, 在用 10% 乙酸酸化水相为 pH9 后获得沉淀物, 过滤, 水洗, 干燥, 最后得到 1.83g 刺槐素。

### A-02-11-11 的制备

向 0.75ml 吡啶中加入 30mg 刺槐素和 0.50ml 醋酸酐, 室温搅拌 2 小时, 层析残余物, 并用石油醚: 丙酮=2: 1 洗脱, 得到 A-02-11-11。

### A-02-11-12 的制备

向 0.75ml 吡啶中加入 30mg 刺槐素和 0.50ml 苯甲酸酐, 室温搅拌 2 小时, 层析残余物, 并用石油醚: 丙酮=2: 1 洗脱, 得到 A-02-11-12。

### A-02-11-13 的制备

向 0.75ml 吡啶中加入 30mg 刺槐素和几滴碘甲烷, 室温搅拌 2 小时, 层析残余物, 并用石油醚: 丙酮=2: 1 洗脱, 得到 A-02-11-13。



#### *A-02-11-14 的制备*

向 0.75ml 吡啶中加入 30mg 刺槐素和几滴溴乙烷，室温搅拌 24 小时，层析残余物，并用石油醚：丙酮=2：1 洗脱，得到 A-02-11-14。

#### *A-2 和 A-3 的制备*

向 80ml 无水吡啶溶液中连续加入 9.62g 2', 4', 6'-三羟基苯乙酮和 30g 无水  $K_2CO_3$  和 31g 4-甲氧基苯甲酰氯，然后当将其在 120°C 油浴中回流 3 小时后，用氯仿萃取反应溶液，并用水 (100ml) 洗涤氯仿萃取液，用无水  $K_2CO_3$  干燥氯仿液并用活性炭去色，然后真空浓缩。将残余物用 60ml 无水乙醇溶解，其沉淀在溶液中，过滤，得到 13.53g 中间体。用 TLC 分析残余物有三个点，然后层析，并用石油醚：丙酮=2：1 洗脱，得到 A-2 (203mg)、A-3 (50mg) 和刺槐素 (1.83g)。

#### *A-4 的制备*

向 0.8ml 无水吡啶溶液中连续加入 100mg 2'-羟基苯乙酮和 300mg 无水  $K_2CO_3$  和 125mg 4-甲氧基苯甲酰氯，然后当将其在 120°C 油浴中回流 3 小时后，用氯仿萃取反应溶液，并用水 (5ml) 洗涤氯仿萃取液 (10ml)，用无水  $K_2CO_3$  干燥氯仿液并用活性炭去色，然后真空浓缩。将残余物用 3ml 无水乙醇溶解，其沉淀在溶液中，过滤，得到 31mg A-4。

#### *A-5 的制备*

向 0.8ml 无水吡啶溶液中连续加入 100mg 5'-氯-2'-羟基苯乙酮和 300mg 无水  $K_2CO_3$  和 100mg 4-甲氧基苯甲酰氯，然后当将其在 120°C 油浴中回流 3 小时后，用氯仿萃取反应溶液，并用水 (5ml) 洗涤氯仿萃取液 (10ml)，用无水  $K_2CO_3$  干燥氯仿液并用活性炭去色，然后真空浓缩。残余物用 3ml 无水乙醇溶解，其沉淀在溶液中，过滤，得到 35mg A-5。

#### *A-6 的制备*

向 0.8ml 无水吡啶溶液中连续加入 100mg 2'-羟基-5'-甲基苯乙酮和 300mg 无水  $K_2CO_3$  和 100mg 4-甲氧基苯甲酰氯，然后将其在 120°C 油浴中回流 3 小时后，用氯仿萃取反应溶液，并用水 (5ml) 洗涤氯仿萃取液 (10ml)，用无水  $K_2CO_3$  干燥氯仿并用活性炭去色，然后真空浓缩。将残余物用 3ml 无水乙醇溶解，其沉淀在溶液中，过滤，得到 25mg A-6。

---

应当理解到本文描述的实施例和实施方案仅仅是用于说明的目的，本领域技术人员将根据其会提出多种变型和改变，并且其包括在本申请的精神和范围内。

### 参考文献

1. Balser JR, Bennett PB, Hondeghem LM 和 Roden DM (1991) Suppression of time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. Actions of quinidine and amiodarone. *Circ.Res.* **69**: 519-529.
2. Benjamin EJ, Wolf PA, D'Agostino RB, Silbershatz H, Kannel WB 和 Levy D (1998) Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart Study, *Circulation* **98**: 946-952.
3. Blaauw Y, Gogelein H, Tieleman RG, van Hunnik A, Schotten U 和 Allessie MA (2004) "Early" class III drugs for the treatment of atrial fibrillation: efficacy and atrial selectivity of AVE0118 in remodeled atria of the goat. *Circulation* **110**: 1717-1724.
4. Bosch RF, Zeng X, Grammer JB, Popovic K, Mewis C 和 Kuhlkamp V (1999) Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation. *Cardiovasc.Res.* **44**: 121-131.
5. Brendel J 和 Peukert S (2003) Blockers of the Kv1.5 channel for the treatment of atrial arrhythmias. *Curr.Med.Chem.Cardiovasc.Hematol. Agents* **1**: 273-287.
6. Burashnikov A, Di Diego JM, Zygmunt AC, Belardinelli L 和 Antzelevitch C (2007) Atrium-selective sodium channel block as a strategy for suppression of atrial fibrillation: differences in sodium channel inactivation between atria and ventricles and the role of ranolazine. *Circulation* **116**: 1449-1457.
7. Cahill SA 和 Gross GJ (2004) Propafenone and its metabolites preferentially inhibit  $I_{Kr}$  in rabbit ventricular myocytes. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **308**: 59-65.
8. Chiou CW, Eble JN 和 Zipes DP (1997) Efferent vagal innervation of the canine atria and sinus and atrioventricular nodes. The third fat pad. *Circulation* **95**: 2573-2584.
9. Cody V (1988) Crystal and molecular structures of flavonoids. *Prog.Clin.Biol.Res.* **280**: 29-44.
10. Courtemanche M, Ramirez RJ 和 Nattel S (1999) Ionic targets for drug therapy and atrial fibrillation-induced electrical remodeling: insights from a

mathematical model. *Cardiovasc.Res.* **42**: 477-489.

11. D'Aloia A, Faggiano P, Brentana L, Boldini A, Pedrihazzi C, Procopio R 和 Dei CL (2005) Sustained torsade de pointes occurring early during oral sotalol therapy for atrial fibrillation recurrence prophylaxis in a patient without heart disease. *Int. J. Cardiol.* **105**: 337-339.

12. de Haan S, Greiser M, Harks E, Blaauw Y, van Hunnik A, Verheule S, Allesie M, 和 Schotten U (2006) AVE0118, blocker of the transient outward current ( $I_{to}$ ) and ultrarapid delayed rectifier current ( $I_{Kur}$ ), fully restores atrial contractility after cardioversion of atrial fibrillation in the goat. *Circulation* **114**: 1234-1242.

13. DeWitt CR 和 Waksman JC (2004) Pharmacology, pathophysiology and management of calcium channel blocker and beta-blocker toxicity. *Toxicol.Rev.* **23**: 223-238.

14. Dong MQ, Lau CP, Gao Z, Tseng GN 和 Li GR (2006) Characterization of recombinant human cardiac KCNQ1/KCNE1 channels ( $I_{Ks}$ ) stably expressed in HEK 293 cells. *J.Membr.Biol.* **210**: 183-192.

15. Doostdar H, Burke MD 和 Mayer RT (2000) Bioflavonoids: selective substrates and inhibitors for cytochrome P450 CYP1A and CYP1B1. *Toxicology* **144**: 31-38.

16. Fedida D, Orth PM, Chen JY, Lin S, Plouvier B, Jung G, Ezrin AM, 和 Beatch GN (2005) The mechanism of atrial antiarrhythmic action of RSD1235. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* **16**: 1227-1238.

17. Fedida D, Wible B, Wang Z, Fermi B, Faust F, Nattel S, 和 Brown AM (1993) Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned  $K^+$  channel current. *Circ.Res.* **73**: 210-216.

18. Gao Z, Lau CP, Chiu SW, 和 Li GR (2004) Inhibition of ultra-rapid delayed rectifier  $K^+$  current by verapamil in human atrial myocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* **36**: 257-263.

19. Gogelein H, Brendel J, Steinmeyer K, Strubing C, Picard N, Rampe D, Kopp K, Busch AE, 和 Bleich M (2004) Effects of the atrial antiarrhythmic drug

AVE0118 on cardiac ion channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* **370**: 183-192.

20. Hashimoto N, Yamashita T 和 Tsuruzoe N (2006) Tertiapin, a selective  $I_{K_{ACH}}$  blocker, terminates atrial fibrillation with selective atrial effective refractory period prolongation. *Pharmacol.Res.* **54**: 136-141.

21. Hondeghem LM (1992) Development of class III antiarrhythmic agents. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **20 Suppl 2**: S17-S22.

22. Hsu YL, Kuo PL 和 Lin CC (2004) Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochem.Pharmacol.* **67**: 823-829.

23. Kawai S, Tomono Y, Katase E, Ogawa K, Yano M, Koizumi M, Ito C 和 Furukawa H (2000) Quantitative study of flavonoids in leaves of citrus plants. *J.Agric.Food Chem.* **48**: 3865-3871.

24. Kim YM, Guzik TJ, Zhang YH, Zhang MH, Kattach H, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM 和 Casadei B (2005) A myocardial Nox2 containing NAD (P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. *Circ.Res.* **97**: 629-636.

25. Kraft C, Jenett-Siems K, Siems K, Jakupovic J, Mavi S, Bienzle U 和 Eich E (2003) In vitro antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytother.Res.* **17**: 123-128.

26. Li GR, Feng J, Wang Z, Fermini B 和 Nattel S (1996a) Adrenergic modulation of ultrarapid delayed rectifier  $K^+$  current in human atrial myocytes. *Circ.Res.* **78**: 903-915.

27. Li GR, Feng J, Yue L, Carrier M, 和 Nattel S (1996b) Evidence for two components of delayed rectifier  $K^+$  current in human ventricular myocytes, *Circ.Res.* **78**: 689-696.

28. Li GR, Lau CP 和 Shrier A (2002a) Heterogeneity of sodium current in atrial vs epicardial ventricular myocytes of adult guinea pig hearts. *J.Mol.Cell Cardiol.* **34**: 1185-1194.

29. Li GR, Zhang M, Satin LS 和 Baumgarten CM (2002b) Biphasic effects

of cell volume on excitation-contraction coupling in rabbit ventricular myocytes. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **282**: H1270-H1277.

30. Liao YH, Houghton PJ 和 Hoult JR (1999) Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J.Nat.Prod.* **62**: 1241-1245.

31. Lip GY 和 Tse HF (2007) Management of atrial fibrillation, *Lancet* **370**: 604-618.

32. Liu L 和 Nattel S (1997) Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am.J.Physiol* **273**: H805-H816.

33. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, D'Agostino RB, Massaro JM, Beiser A, Wolf PA 和 Benjamin EJ (2004) Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation* **110**: 1042-1046.

34. Mihm MJ, Yu F, Carnes CA, Reiser PJ, McCarthy PM, Van Wagoner DR 和 Bauer JA (2001) Impaired myofibrillar energetics and oxidative injury during human atrial fibrillation. *Circulation* **104**: 174-180.

35. Milberg P, Ramtin S, Monnig G, Osada N, Wasmer K, Breithardt G, Haverkamp W 和 Eckardt L (2004) Comparison of the in vitro electrophysiologic and proarrhythmic effects of amiodarone and sotalol in a rabbit model of acute atrioventricular block. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* **44**: 278-286.

36. Nademanee K (1992) The amiodarone odyssey. *J.Am.Coll.Cardiol* **20**: 1063-1065.

37. Nattel S, Khairy P, Roy D, Thibault B, Guerra P, Talajic M 和 Dubuc M (2002) New approaches to atrial fibrillation management: a critical review of a rapidly evolving field. *Drugs* **62**: 2377-2397.

38. Nattel S 和 Singh BN (1999) Evolution, mechanisms, and classification of anti-arrhythmic drugs: focus on class III actions. *Am.J.Cardiol.* **84**: 11R-19R.

39. Pan MH, Lai CS, Wang YJ 和 Ho CT (2006) Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice, *Biochem.Pharmacol.* **72**: 1293-1303.

40. Pecini R, Elming H, Pedersen OD 和 Torp-Pedersen C (2005) New antiarrhythmic agents for atrial fibrillation and atrial flutter. *Expert. Opin. Emerg. Drugs* **10**: 311-322.

41. Peukert S, Brendel J, Pirard B, Bruggemann A, Belo-w P, Kleemann HW, Hemmerle H 和 Schmidt W (2003) Identification, synthesis, and activity of novel dockers of the voltage-gated potassium channel Kvl.5. *J. Med. Chem.* **46**: 486-498.

42. Pirard B, Brendel J 和 Peukert S (2005) The discovery of Kvl.5 blockers as a case study for the application of virtual screening approaches. *J. Chem. Inf. Model.* **45**: 477-485.

43. Regan CP, Wallace AA, Cresswell HK, Atkins CL 和 Lynch JJ, Jr. (2006) In vivo cardiac electrophysiologic effects of a novel diphenylphosphine oxide IKur blocker, (2-Isopropyl-5-methylcyclohexyl) diphenylphosphine oxide, in rat and nonhuman primate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**: 727-732.

44. Roden DM (1993) Current status of class III antiarrhythmic drug therapy. *Am. J. Cardiol.* **72**: 44B-49B.

45. Roden DM 和 Anderson ME (2006) Proarrhythmia. *Handb. Exp. Pharmacol.* 73-97.

46. Salata JJ, Jurkiewicz NK, Jow B, Folander K, Guinosso PJ, Jr., Raynor B, Swanson R 和 Fermini B (1996)  $I_k$  of rabbit ventricle is composed of two currents: evidence for Iks. *Am. J. Physiol* **271**: H2477-H2489.

47. Schauerte P, Scherlag BJ, Pitha J, Scherlag MA, Reynolds D, Lazzara R 和 Jackman WM (2000) Catheter ablation of cardiac autonomic nerves for prevention of vagal atrial fibrillation. *Circulation* **102**: 2774-2780.

48. Seki A, Hagiwara N 和 Kasanuki H (2002) Effects of NIP-141 on K currents in human atrial myocytes. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **39**: 29-38.

49. Sharma PP, Sarma JS 和 Singh BN (1999) Effects of sotalol on the circadian rhythmicity of heart rate and QT intervals with a noninvasive index of reverse-use dependency. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **4**: 15-21.

50. Shi H, Wang H, Li D, Nattel S 和 Wang Z (2004) Differential alterations of receptor densities of three muscarinic acetylcholine receptor subtypes and current

densities of the corresponding  $K^+$  channels in canine atria with atrial fibrillation induced by experimental congestive heart failure, *Cell Physiol Biochem.* **14**: 31-40.

51. Singh RP, Agrawal P, Yim D, Agarwal C 和 Agarwal R (2005) Acacetin inhibits cell growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure-activity relationship with linarin and linarin acetate. *Carcinogenesis* **26**: 845-854.

52. Spence S, Soper K, Hoe CM 和 Coleman J (1998) The heart rate-corrected QT interval of conscious beagle dogs: a formula based on analysis of covariance, *Toxicol.Sci.* **45**: 247-258.

53. Tang, Q, Jin, M. W, Xiang, J. Z, Dong, M. Q., Sun, H. Y, Lau, C. P 和 Li, G. R. The membrane permeable calcium chelator BAPTA-AM directly blocks human *ether a-go-go* related gene potassium channels stably expressed in HEK 293 cells. **74**, 1596-1607. 2007.

54. Tian M, Dong MQ, Chiu SW, Lau CP 和 Li GR (2006) Effects of the antifungal antibiotic clotrimazole on human cardiac repolarization potassium currents. *Br.J.Pharmacol.*, **147**: 289-297.

55. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Vasan RS, Leip EP, Wolf PA, D'Agostino RB, Murabito JM, Kannel WB 和 Benjamin EJ (2003) Temporal relations of atrial fibrillation and congestive heart failure and their joint influence on mortality: the Framingham Heart Study. *Circulation* **107**: 2920-2925.

56. Wang Z, Fermini B 和 Nattel S (1993) Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier  $K^+$  current similar to Kv1.5 cloned channel currents. *Circ.Res.*, **73**: 1061-1076.

57. Wang Z, Fermini B 和 Nattel S (1994) Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc.Res.* **28**: 1540-1546.

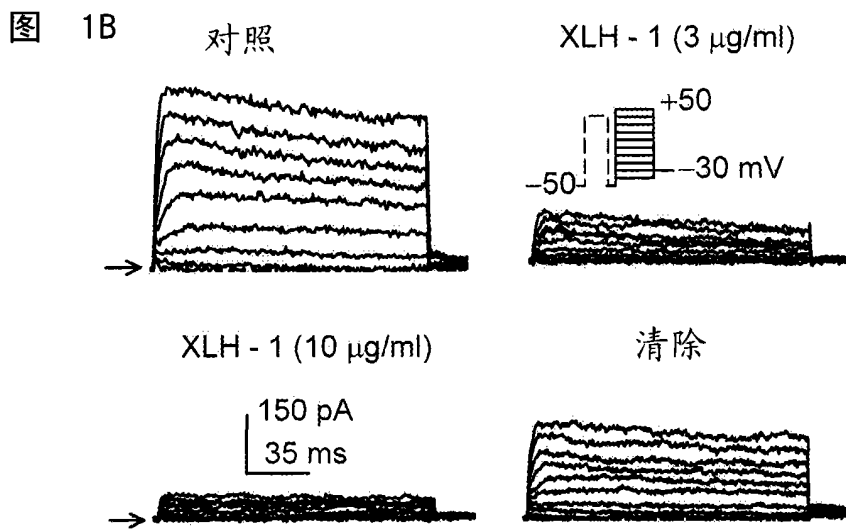
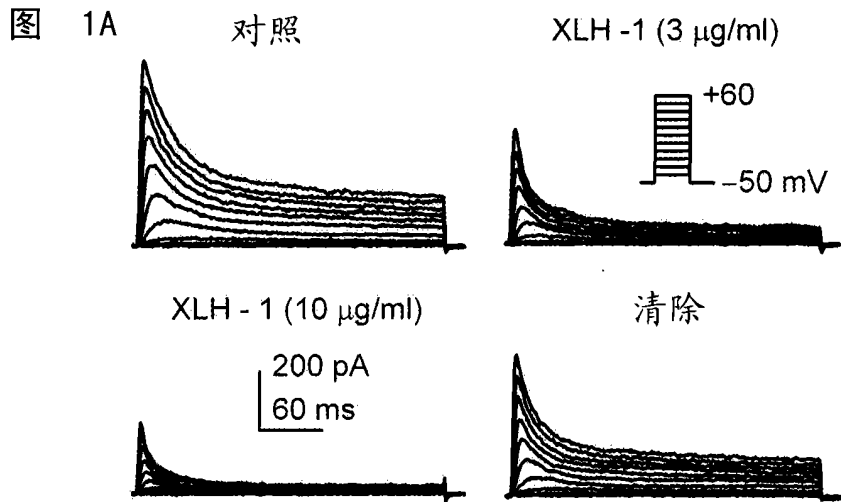
58. Weissenburger J, Davy JM 和 Chezalviel F (1993) Experimental models of torsades de pointes. *Fundam.Clin.Pharmacol.* **7**: 29-38.

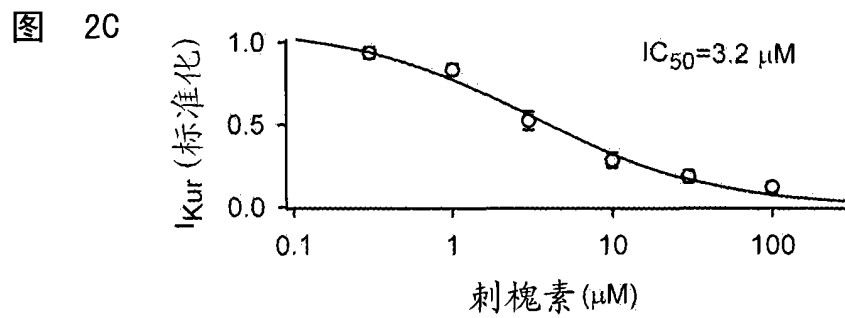
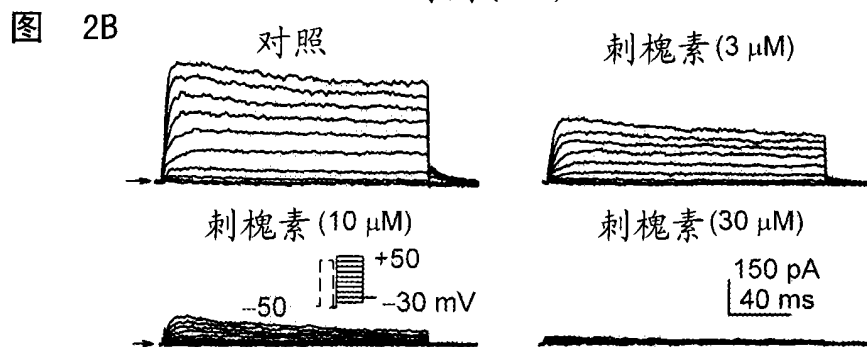
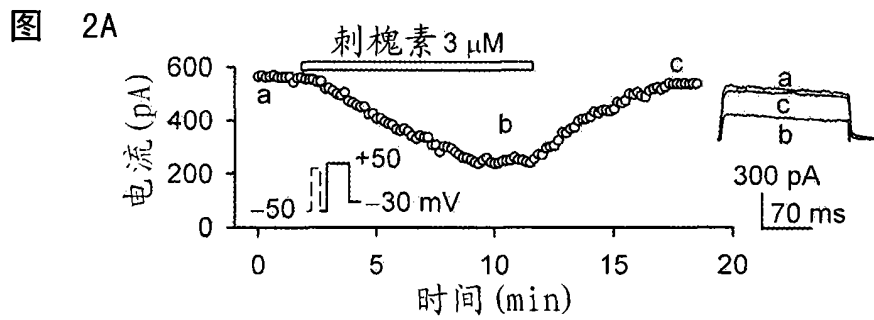
59. Zhang K, Yang EB, Tang WY, Wong KP 和 Mack P (1997) Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochem.Pharmacol.* **54**: 1047-1053.

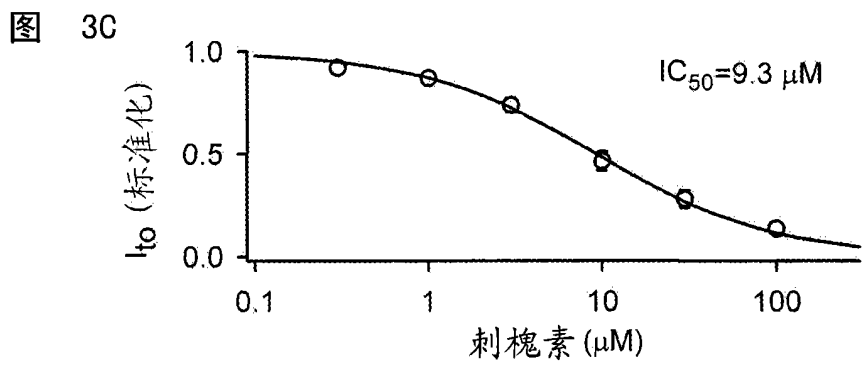
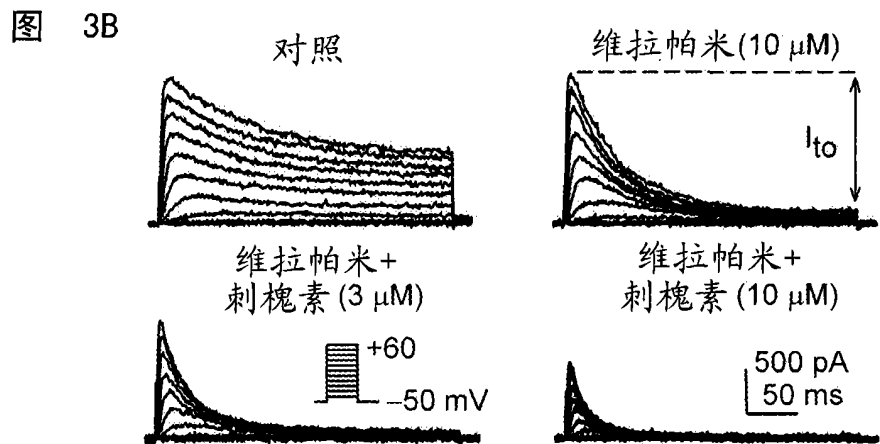
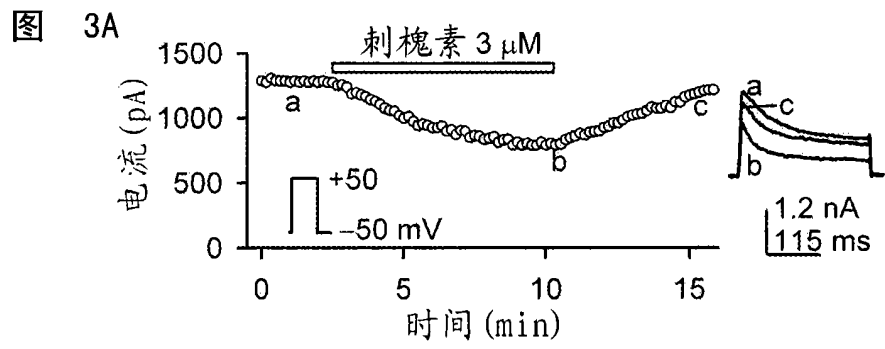
60. Zipes DP, Mihalick MJ 和 Robbins GT (1974) Effects of selective vagal

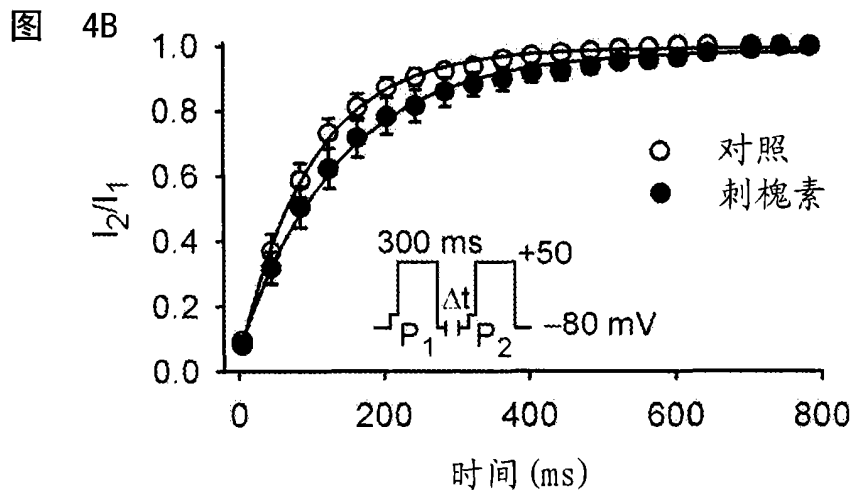
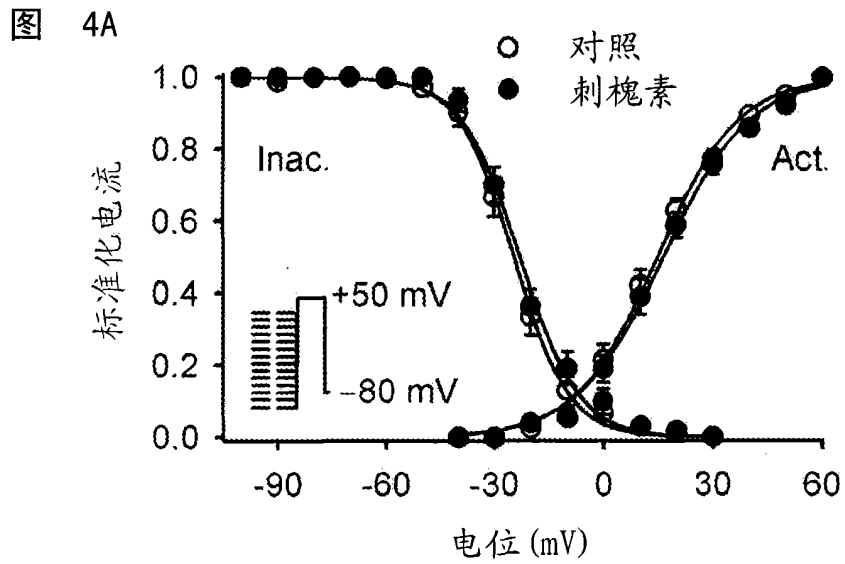


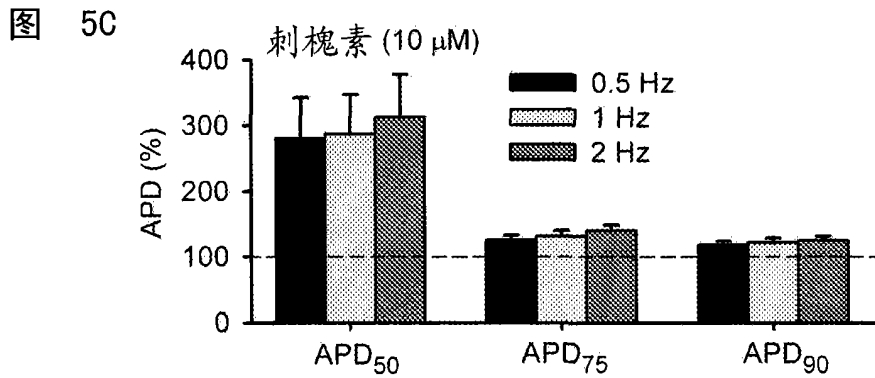
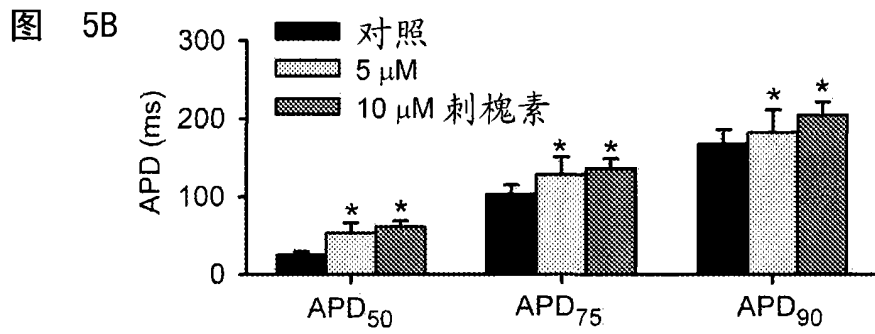
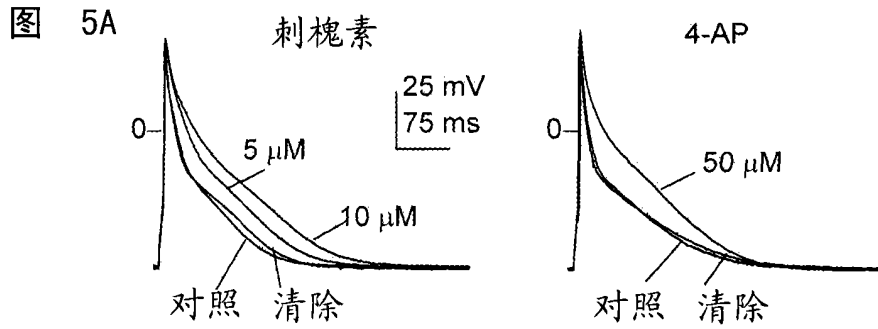
and stellate ganglion stimulation of atrial refractoriness. *Cardiovasc.Res.* **8**: 647-655.

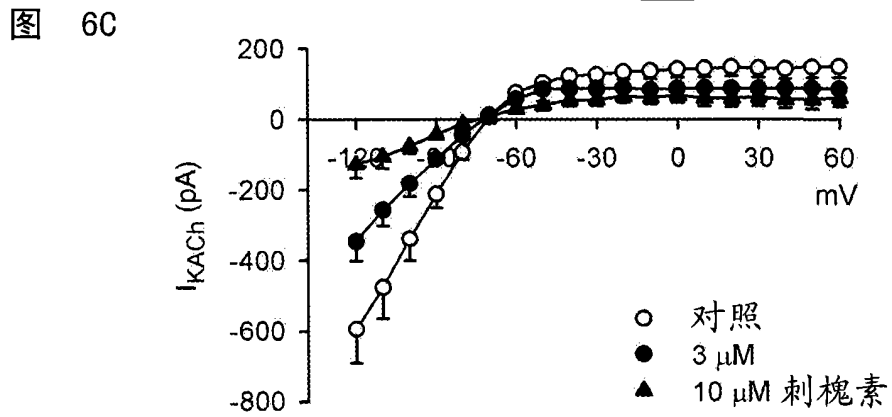
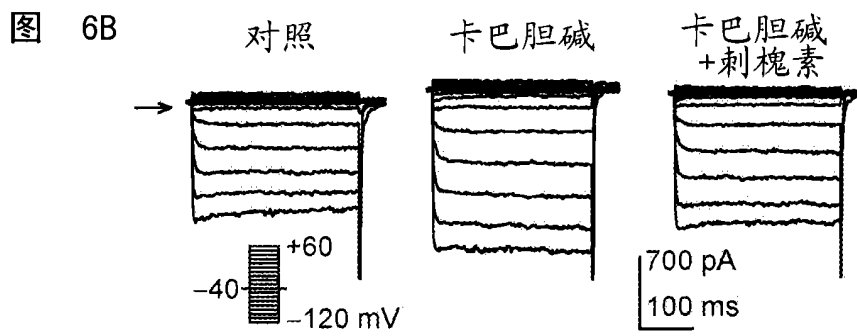
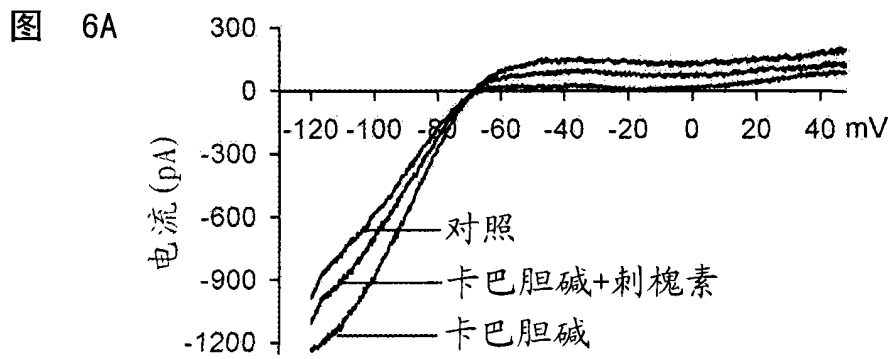


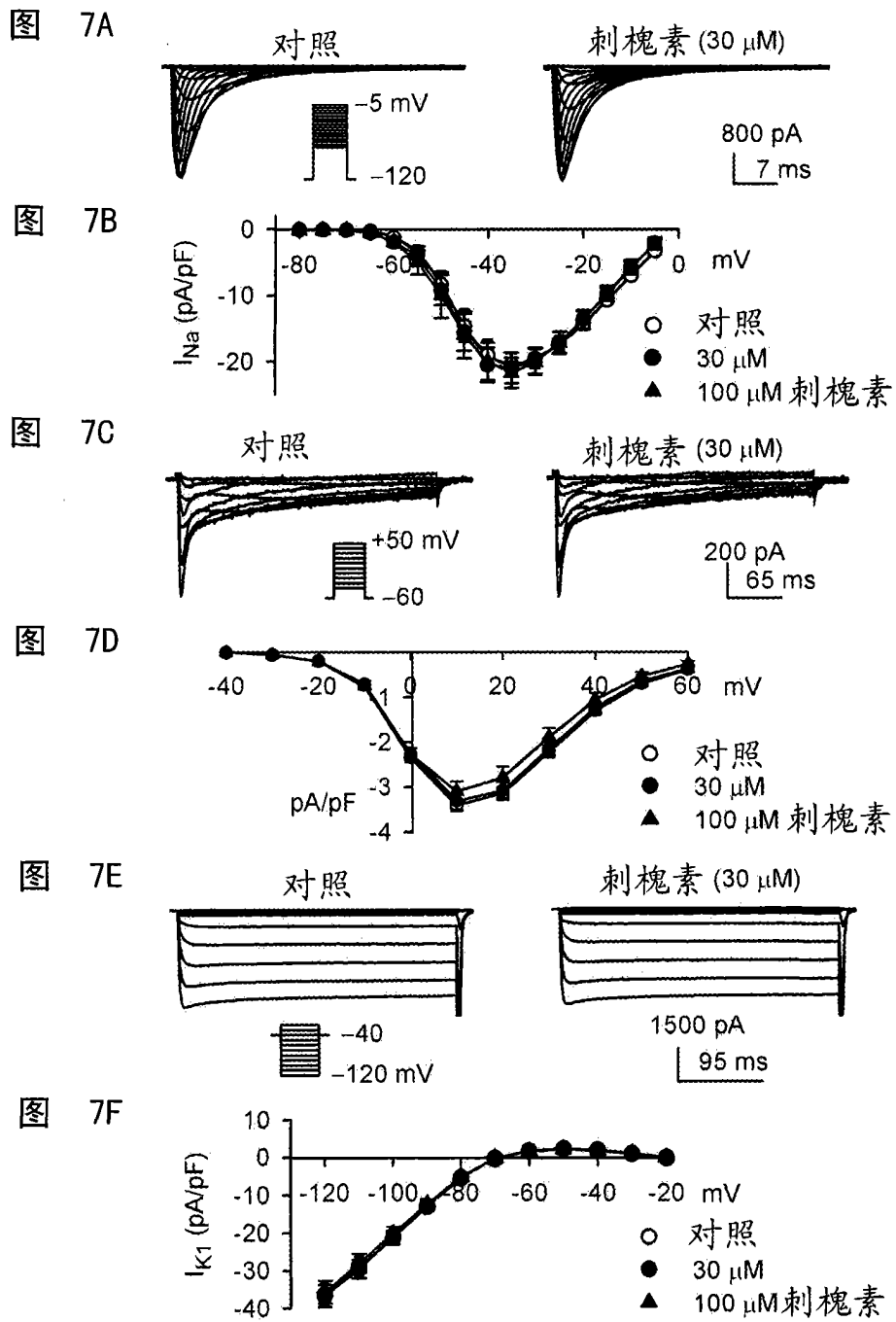




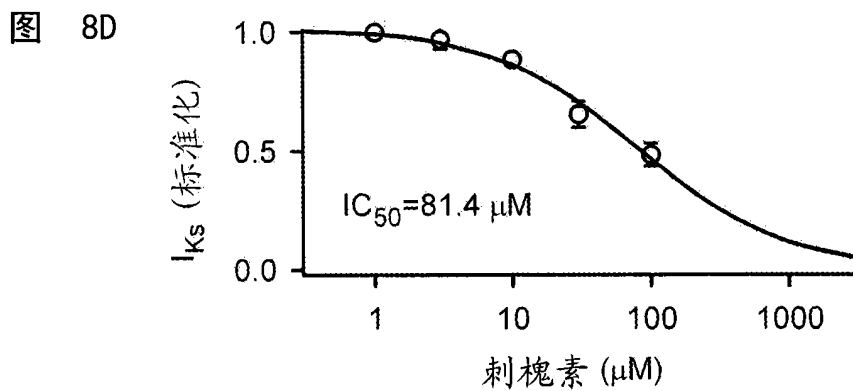
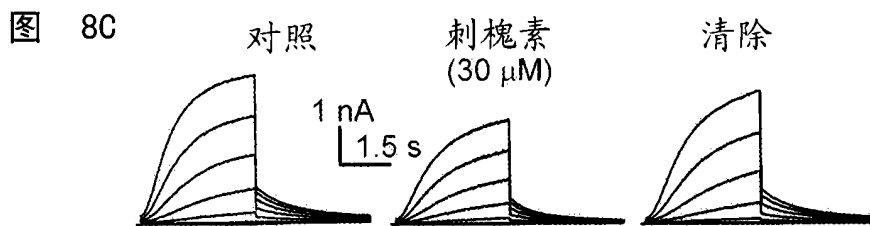
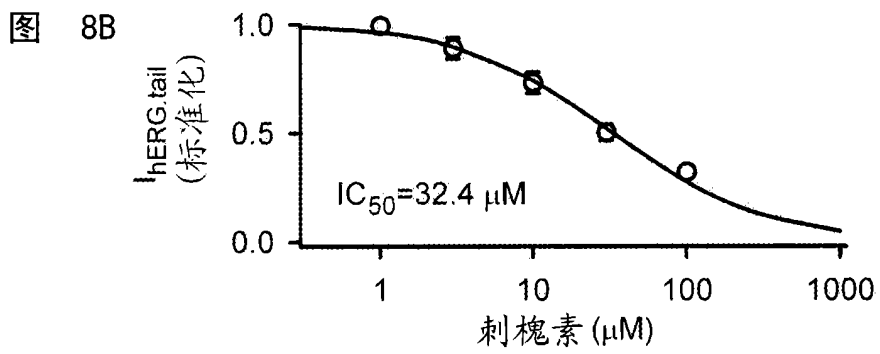
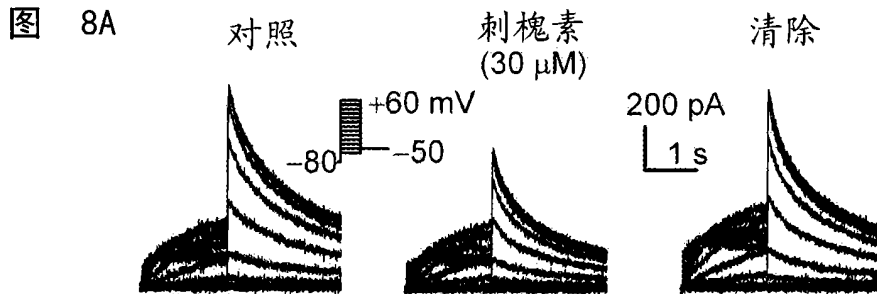


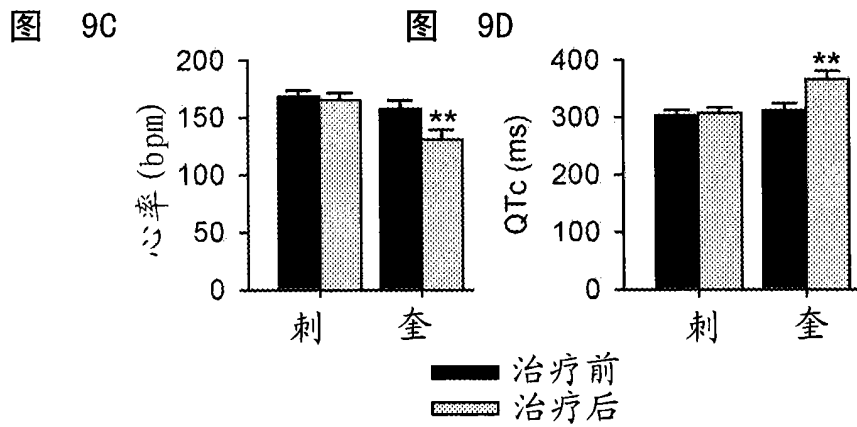
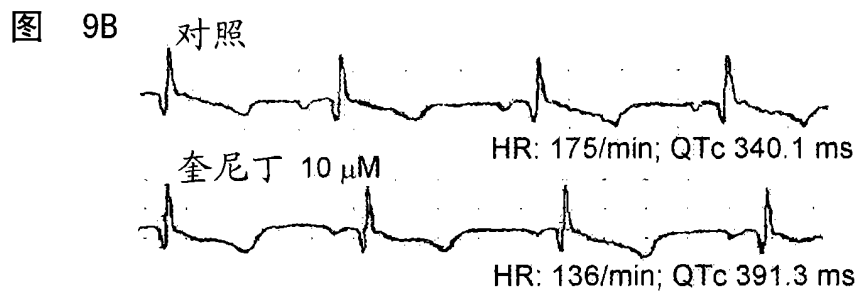
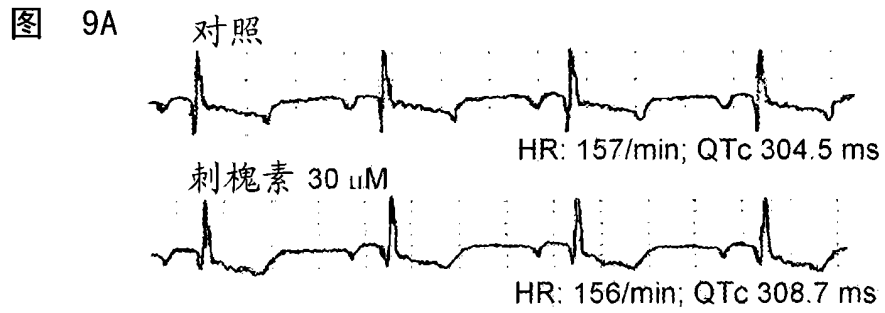












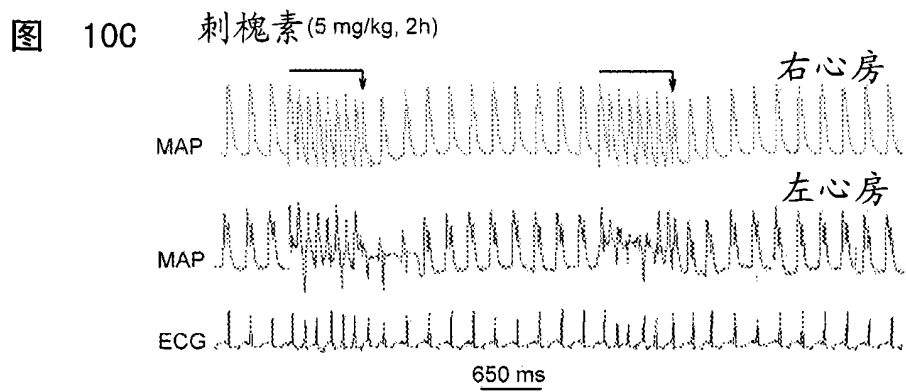
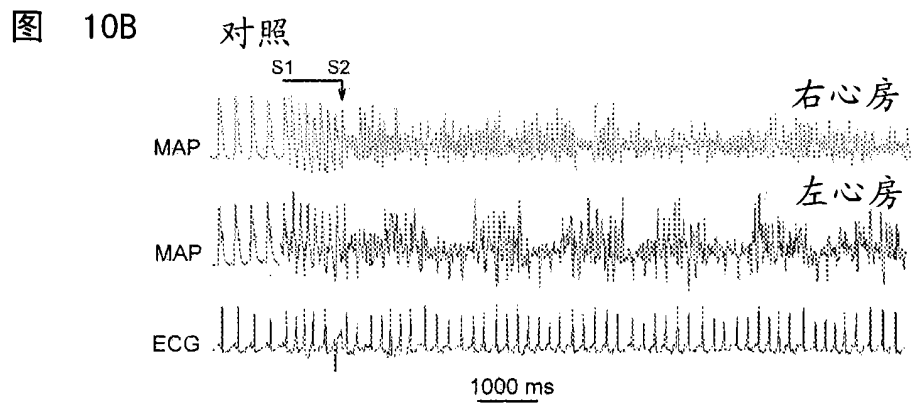
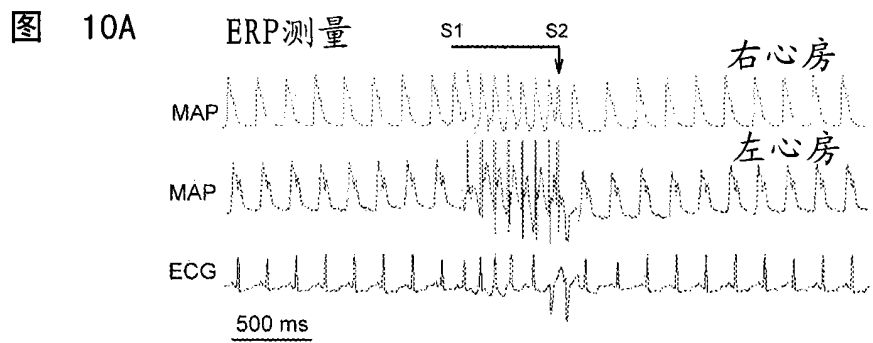


图 11A

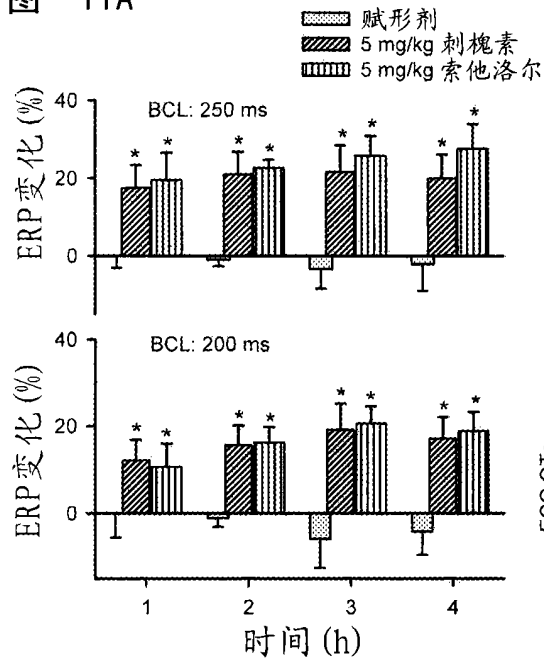


图 11B

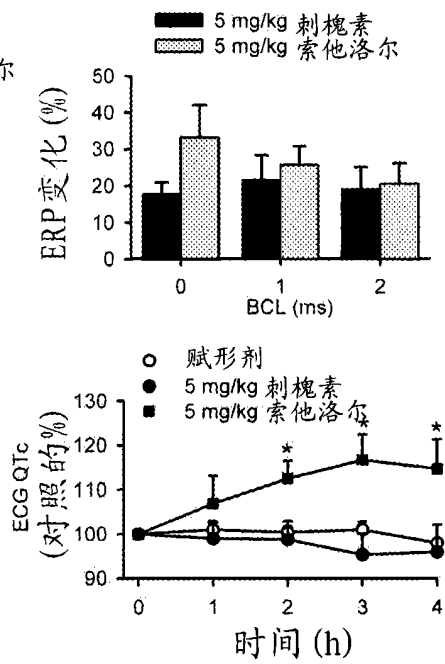


图 11C

图 12A

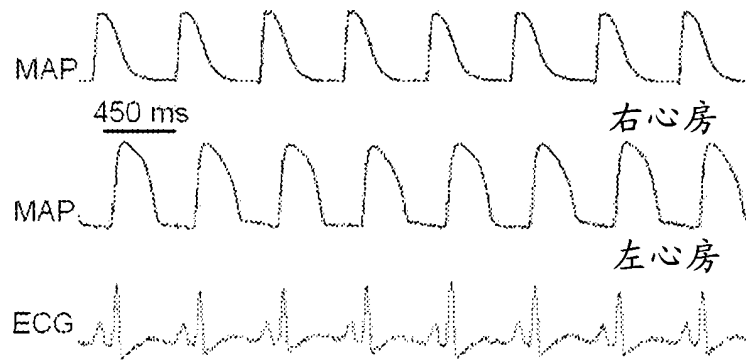


图 12B

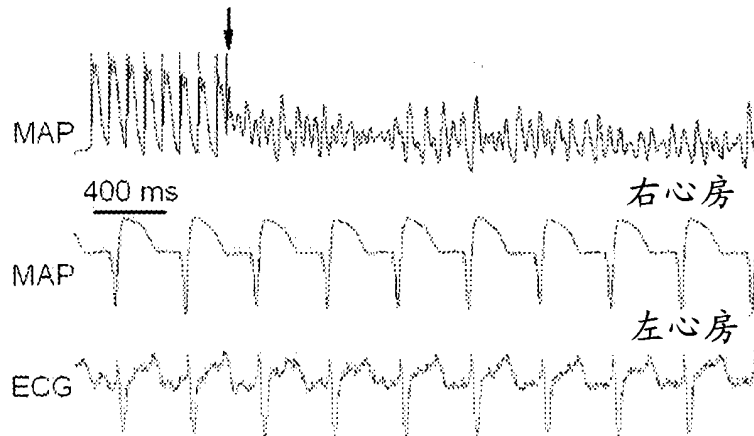


图 13A

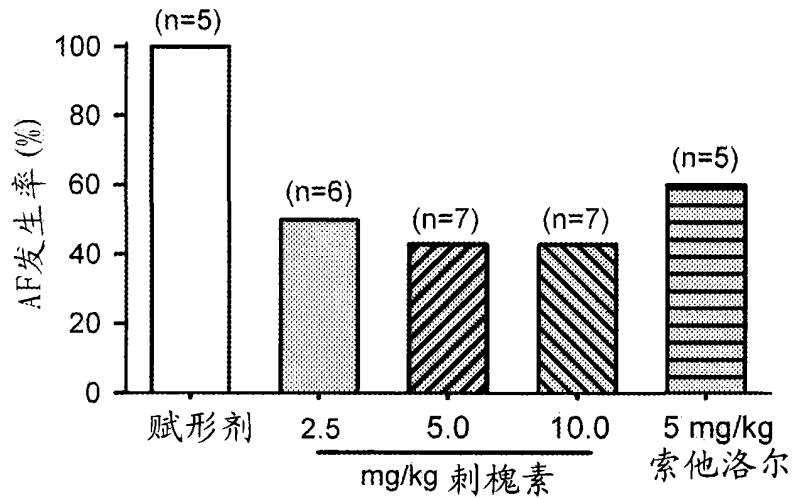


图 13B

