



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108707087 B

(45) 授权公告日 2020.10.16

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| (21) 申请号 201810716419.5            | C07D 307/54 (2006.01)  |
| (22) 申请日 2018.06.29                | C07D 211/34 (2006.01)  |
| (65) 同一申请的已公布的文献号                  | A61K 31/167 (2006.01)  |
| 申请公布号 CN 108707087 A               | A61K 31/4465 (2006.01)   |
| (43) 申请公布日 2018.10.26              | A61K 31/341 (2006.01)  |
| (73) 专利权人 河北医科大学                   | A61P 25/08 (2006.01)   |
| 地址 050017 河北省石家庄市中山路361号           | A61P 25/22 (2006.01)   |
| (72) 发明人 张海林 祁金龙 贾庆忠 杜肖娜 郝瀚        | A61P 29/00 (2006.01)   |
| (74) 专利代理机构 石家庄国域专利商标事务所有限公司 13112 | A61P 25/02 (2006.01)   |
| 代理人 黄慧慧 白海静                        | (56) 对比文件  |
| (51) Int. Cl.                      | WO 2016077724 A1, 2016.05.19                                       |
| C07C 231/02 (2006.01)              | CN 1761464 A, 2006.04.19   |
| C07C 233/43 (2006.01)              | CN 101056845 A, 2007.10.17   |
| C07C 233/44 (2006.01)              | CN 101790374 A, 2010.07.28   |
| C07D 295/15 (2006.01)              | 祁金龙. KCNQ2/3及CaCCs离子通道调节剂的设计合成与筛选以及高活性化合物的合成工艺优化.《河北医科大学》.2013,全文. |
|                                    | 审查员 韩玉英  |
|                                    | 权利要求书1页 说明书11页 附图2页  |

(54) 发明名称

一种4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物及其药物组合物与用途

(57) 摘要

本发明提供了一种4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物及其药物组合物与用途,该衍生物的化学通式如式I所示,其中,R为C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、环烷基、含杂原子的环烷基、芳环基或含杂原子的芳环基,所述杂原子选自N或O;n为0、1、2或3;所述药物组合物是以前述任意一种4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物为活性成分,同时含有一种或多种药学上可以接受的载体;该类衍生物以及药物组合物具有明显激活KCNQ通道电流,因此,该类衍生物能够在制备KCNQ钾通道开放剂中得到应用,还可作为抗癫痫药物制剂的活性成分,作为缓解焦虑症状药物制剂以及缓解神经性疼痛药物制剂的活性成分。

CN 108707087 B



## 一种4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物及其药物组合物与用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种化合物以及含有该化合物的药物组合物和其医药用途,具体地说是4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物、其药物组合物及其在作为KCNQ钾离子通道开放剂、制备抗癫痫、镇痛药物制剂中的应用。

### 背景技术

[0002] KCNQ钾通道是钾通道家族中的一个重要分支。目前,已知有许多类型的KCNQ钾通道存在于多种类型的细胞上。按KCNQ钾通道的结构特性主要分为5大类,即KCNQ1、KCNQ2、KCNQ3、KCNQ4、KCNQ5;其中,KCNQ1(又称KVLQT),主要分布于心脏;KCNQ2-5主要分布于中枢及外周神经系统、内耳(KCNQ4)、肌肉组织(KCNQ5)等。研究证实,KCNQ1与KCNE1共同编码组成心肌上的延迟整流钾离子通道(IKs),该通道的突变可以引起遗传性QT间期延长综合症(LQT,Sanguinetti MC,Ann N Y Acad Sci.1999,868:406-13);KCNQ4基因编码耳蜗外毛细胞和前庭器官1型毛细胞中和钾通道相关的分子,该基因的突变可导致遗传性耳聋;KCNQ2和KCNQ3通道共表达产生的电流是神经元M型钾电流的分子基础,M通道在调节神经细胞兴奋性方面发挥重要作用,KCNQ2/Q3基因突变导致的M通道功能改变可导致良性家族性新生儿惊厥症(BFNCs)等神经系统疾病(Maljevic S et al.,J Physiol.2008 586(7):1791-801)。KCNQ2/3通道的开放剂可降低神经元兴奋性,可用于治疗与过度神经元兴奋相关的疾病,如惊厥、癫痫和神经性疼痛等。

[0003] 癫痫是一种常见多发的以大脑神经元异常放电引发突然短暂反复发作为特征的神经系统疾病,严重威胁人类生命与健康,临床上癫痫的治疗主要依靠药物疗法。目前唯一一种被FDA批准上市的用于成人部分发作辅助治疗的KCNQ钾通道激动剂药物是瑞替加滨,其在体内、体外具有一定的抗惊厥特性,具有降低癫痫发作发病率的效力(Bialer et al.,Epilepsy Research 2002,52,31-71),但在瑞替加滨上市后,评价发现,该药存在诸如引起头晕、嗜睡、震颤等神经系统症状及尿潴留等副作用,其效果有待进一步验证。因此,发现并开发活性更高、选择性更好的新型KCNQ钾通道开放剂物,进而开发成得到新型安全有效的抗癫痫、镇痛新药,具有重要意义,可以为临床用药提供更多的选择。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的之一是提供一种4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物。

[0005] 本发明的目的之二是提供一种4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物的制备方法。

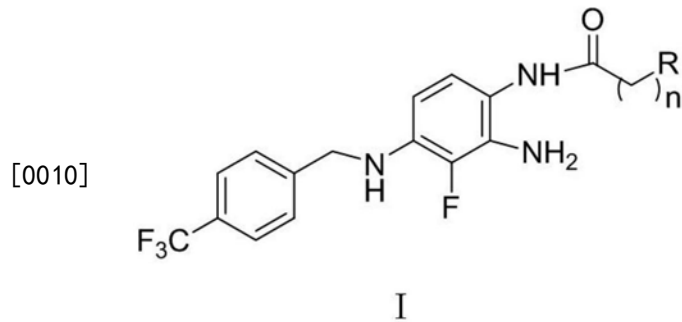
[0006] 本发明的目的之三是提供一种含有4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物的组合物的制备方法。

[0007] 本发明的目的之四是提供一种含有4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物在制备KCNQ钾通道开放剂中,特别是抗癫痫、抗焦虑和缓解神经性疼痛药物制剂中的应用。

用,为临床治疗提供更多用药选择。

[0008] 本发明的目的之一是这样实现的:

[0009] 一种4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物,该衍生物的化学通式如式I所示:



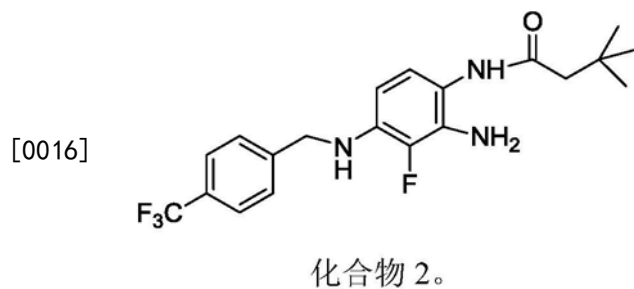
[0011] 其中,R为C<sub>1</sub>~C<sub>6</sub>烷基、环烷基、含杂原子的环烷基、芳环基或含杂原子的芳环基,所述杂原子选自N或O;n为0、1、2或3。

[0012] 优选地,所述烷基为甲基、乙基或叔丁基;所述环烷基为环戊基或环己基;所述含杂原子的环烷基为哌啶基;所述芳环基为苯基;所述含杂原子的芳环基为呋喃基。

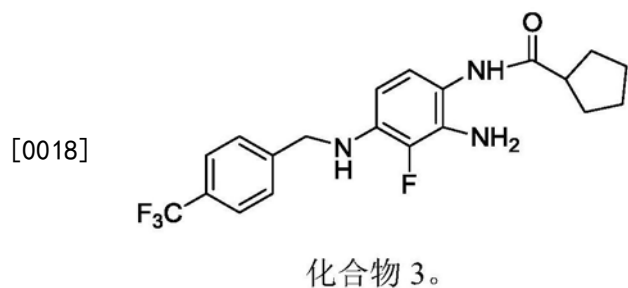
[0013] 更优选地,所述R为环戊基,n=1,其化合物结构式如下所示:



[0015] 更优选地,所述R为叔丁基,n=0,其化合物结构式如下所示:

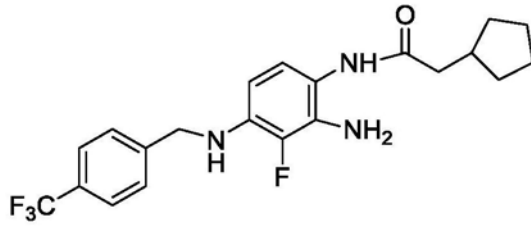


[0017] 更优选地,所述R为环戊基,n=0,其化合物结构式如下所示:



[0019] 更优选地,所述R为环戊基,n=1,其化合物结构式如下所示:

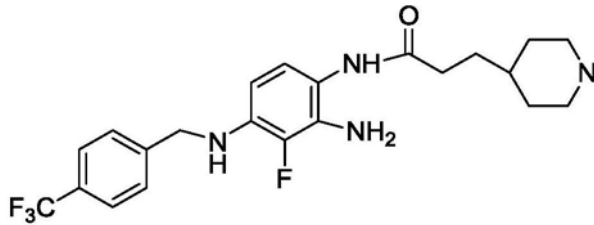
[0020]



化合物 4。

[0021] 更优选地,所述R为哌啶基,n=2,其化合物结构式如下所示:

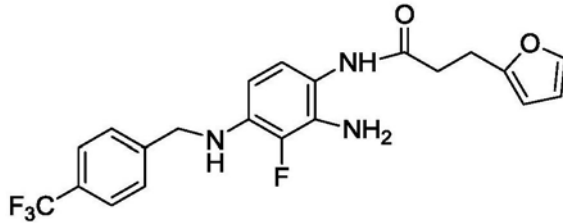
[0022]



化合物 5。

[0023] 更优选地,所述R为呋喃基,n=2,其化合物结构式如下所示:

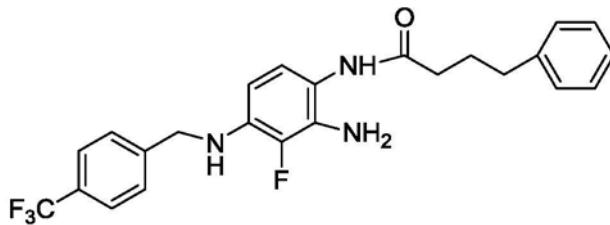
[0024]



化合物 6。

[0025] 更优选地,所述R为苯基且n=3时,其化合物结构式如下所示:

[0026]



化合物 7。

[0027] 依据以上表述,仅列举了几种含有通式I的具体化合物,用于对上述通式I及其取代基作更为详尽的解释,但其并非是本发明化合物的穷尽。

[0028] 本发明公开的化合物可以以游离碱或盐的形式存在。当以游离碱的形式存在时,在应用时,可选择生理上允许的无机酸(如盐酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷酸)、有机酸(如乙酸、丙酸、柠檬酸、马来酸、苹果酸、酒石酸、甲磺酸)成盐。

[0029] 本发明的目的之二是这样实现的:

[0030] 一种前述4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4-三苯胺衍生物的制备方法,包括如下步骤:

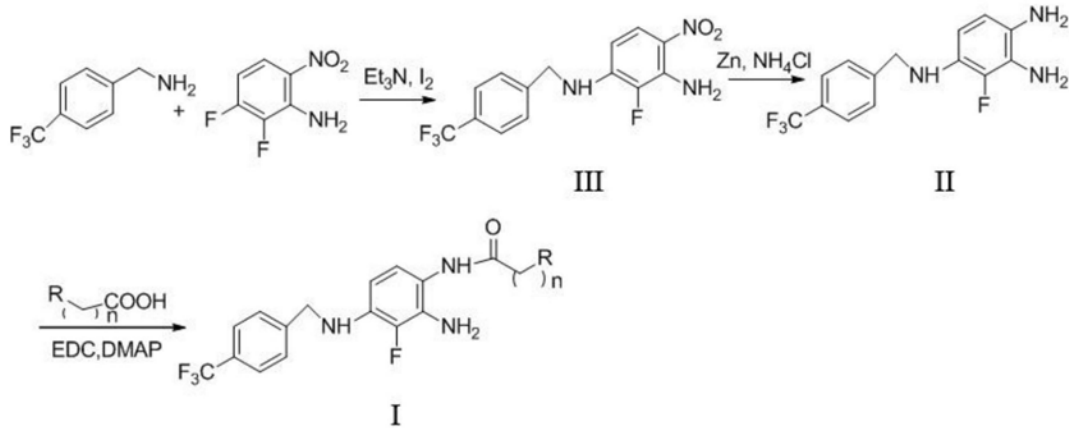
[0031] (a) 将对三氟甲基苯甲胺与2,3-二氟-6-硝基苯胺溶解在无水的DMSO中,在三乙胺为缚酸剂,碘为催化剂的条件下反应,得到中间体III,即2-氟-4-硝基-N<sup>1</sup>-(4-三氟甲基-苄

基)-1,3- 苯二胺;

[0032] (b) 将2-氟-4-硝基-N<sup>1</sup>-(4-三氟甲基-苄基)-1,3-苯二胺(中间体III)在锌粉饱和氯化铵体系中还原,得中间体II,即3-氟-N<sup>4</sup>-(4-三氟甲基-苄基)-1,2,4苯三胺;

[0033] (c) 将3-氟-N<sup>4</sup>-(4-三氟甲基-苄基)-1,2,4苯三胺(中间体II)及相应的R取代羧酸溶解于溶剂中,向其中加入盐酸EDC及DMAP反应,反应终止后,分液,从有机层中提取目标化合物I即得;

[0034] 合成反应式如下:



[0036] 步骤(c)中,3-氟-N<sup>4</sup>-(4-三氟甲基-苄基)-1,2,4苯三胺(中间体II)与R取代羧酸、盐酸EDC、DMAP的摩尔比为1:1:1~2:0.1~1。

[0037] 优选地,3-氟-N<sup>4</sup>-(4-三氟甲基-苄基)-1,2,4苯三胺(中间体II)与R取代羧酸、盐酸EDC、DMAP的摩尔比为1:1:2:0.5。

[0038] 本发明的目的之三是这样实现的:

[0039] 一种含有4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物的组合物,其是以前述任意一种4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物为活性成分,同时含有一种或多种药学上可以接受的载体;所述药学上可以接受的载体或稀释剂可选自药物制剂中常用的赋形剂、辅料或溶剂,如乳糖、蔗糖、糊精、滑石粉、明胶、琼脂、果胶、阿拉伯树胶、硬脂酸镁、硬脂酸、纤维素的低级烷基醚、玉米淀粉、马铃薯淀粉、树胶、糖浆、花生油、橄榄油、磷脂、脂肪酸、脂肪酸胺、单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯、着色剂、矫味剂、防腐剂、水、乙醇、丙醇、生理盐水、葡萄糖溶液等。

[0040] 该组合物具体的制备方法可按照制剂常规进行,如可以本发明化合物作为活性成份,与水、蔗糖、山梨醇糖、果糖等制备成口服液体制剂;也可以乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇糖等为赋形剂,以淀粉等为崩解剂,以硬脂酸、滑石粉等为润滑剂,明胶、聚乙烯醇为结合剂制备成片剂或胶囊剂;还可与生理盐水、葡萄糖溶液或盐水与葡萄糖组成的混合载体制备成注射液。还可制成无菌粉针剂以及各种缓释剂、混悬剂、乳剂等等。

[0041] 本发明的目的之四是这样实现的:

[0042] 本发明所提供的4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物能够在制备KCNQ钾通道开放剂中得到应用;其可明显激活KCNQ2、KCNQ3通道电流,对KCNQ4及KCNQ5没有明显的激活作用,具有较好的通道选择性。

[0043] 本发明所提供的4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物还可用于制备抗

癫痫药物制剂,其可作为抗癫痫药物制剂的活性成分,用于预防、抑制、缓解和治疗惊厥、癫痫发作、癫痫持续状态、癫痫综合症。

[0044] 本发明所提供的4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物还可用于制备抗焦虑药物制剂,其可作为抗焦虑药物制剂的活性成分,用于缓解焦虑症状。

[0045] 本发明所提供的4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物还可用于制备镇痛药物制剂,其可作为镇痛药物制剂的活性成分,用于神经性疼痛。

[0046] 同时,本发明所提供的4-(对三氟甲基苄基)-3-氟-1,2,4三苯胺衍生物及其药物制剂相对于已上市阳性对照药瑞替加滨具有更好的安全性。

[0047] 采用本发明化合物制成药剂后,可经口服或非口服给药。给药量可因药物剂型、给药频率、给药方式、病程、患者个体差异以及健康状况不同而各有不同,对成年人来说,每天4~40mg比较合适,医师可依据临床的实际情况进行必要的调整。

[0048] 本发明所述的化合物,经毒理学试验,尚未获得对人体有明显毒性作用的提示。

### 附图说明

[0049] 图1是全细胞膜片钳记录的化合物1对KCNQ2/3通道开放作用时程图。

[0050] 图2是全细胞膜片钳记录的化合物1对KCNQ2/3通道开放作用的量效曲线。

[0051] 图3是化合物1对KCNQ4 (Kv7.4) 通道亚型的开放作用。

### 具体实施方式

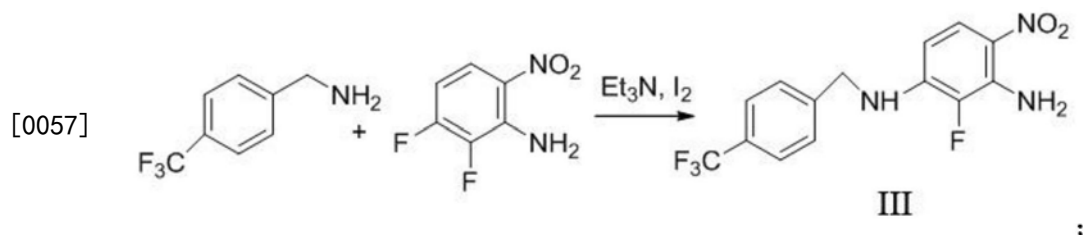
[0052] 下面结合实施例对本发明做进一步的阐述,下述实施例仅作为说明,并不以任何方式限制本发明的保护范围。

[0053] 实施例中所用试剂均为分析纯或化学纯,且均可通过商业渠道购买,或通过本领域普通技术人员熟知的方法制备。下述实施例均实现了本发明的目的。

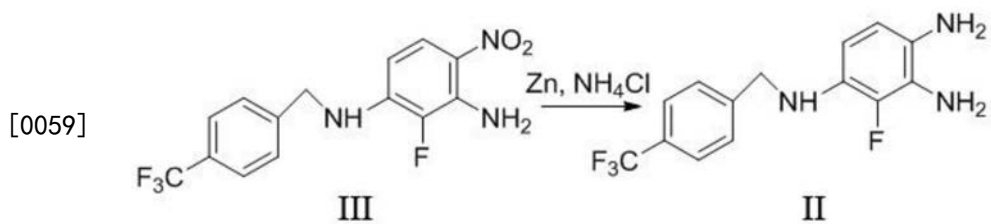
[0054] 在本发明中,编号相同的化合物为同一化合物。

[0055] 化学通式I所述的衍生物可通过下述通用合成路线合成,具体步骤如下:

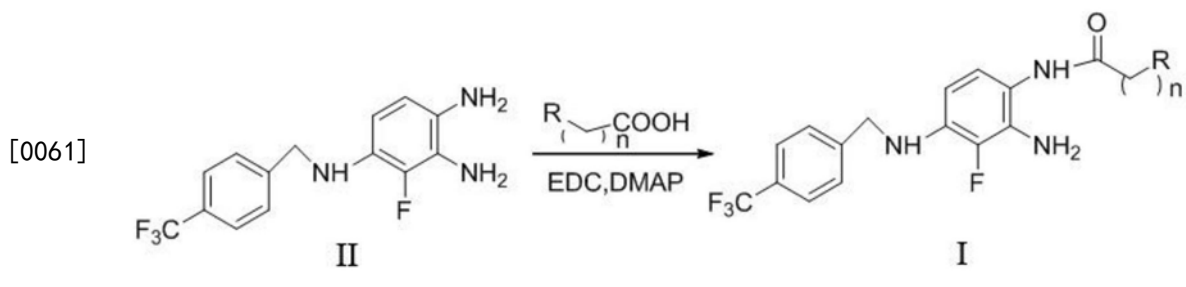
[0056] (1) 对三氟甲基苯甲胺与2,3-二氟-6-硝基苯胺溶解在无水DMSO中,三乙胺作为缚酸剂、微量碘作为催化剂的条件下反应过夜,得到黄色固体中间体III;



[0058] (2) 将中间体III在锌粉饱和氯化铵体系中还原,室温剧烈搅拌反应过夜,硅藻土过滤,洗涤、回收溶剂,得暗红色固体中间体II,可不经纯化直接用于下一步反应;



[0060] (3) 将中间体II及相应R取代羧酸溶解于无水二氯甲烷中,搅拌下投入盐酸EDC及DMAP反应过夜,加入水终止反应,分液,有机层反复水洗,回收溶剂,过硅胶色谱柱或用适量稀醇溶液重结晶,得到目标化合物I;



[0062] 所述取代基R为短链脂肪烃或环烷烃,所述化合物II与R取代羧酸、盐酸EDC、DMAP的摩尔比为1:1:1~2.5:0.1~1,优选1:1:2:0.5。

[0063] 实施例1

[0064] 按照上述通式制备方法制备化合物1 (N-(2-氨基-3-氟-4-(4-三氟甲基苄氨基)-苯基)-环戊基丙酰胺),具体步骤为:

[0065] (1) 中间体III (2-氟-4-硝基-N<sup>1</sup>-(4-三氟甲基-苄基)-1,3-苯二胺)的合成:

[0066] 将对三氟甲基苄胺 (2.43ml, 16.7mmol) 与2,3-二氟-6-硝基苯胺 (3g, 16.7mmol) 溶于70ml无水DMSO中,随后加入三乙胺 (2.7ml, 20.1mmol) 和单质碘 (50mg) 作为催化剂,制得反应混合物;将反应混合物在120℃反应24h,冷却到室温,加入200ml水稀释,乙酸乙酯萃取3次 (100ml×3),有机层无水硫酸镁干燥,减压回收溶剂,滤饼用石油醚/乙酸乙酯 (5:1) 混合溶剂洗涤,得黄色固体3.71g,产率67.3%,熔点:165.0~166.5℃,质谱分析[M+H]<sup>+</sup> 330.1。

[0067] (2) 中间体II (3-氟-N<sup>4</sup>-(4-三氟甲基-苄基)-1,2,4-苯三胺)的合成:

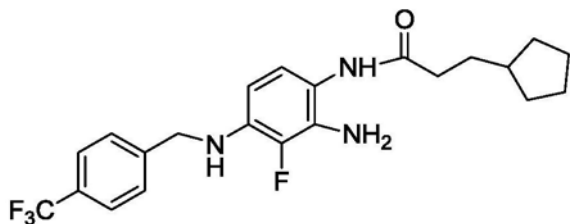
[0068] 向中间体III (3.3g, 10mmol) 的甲醇 (50ml) 溶液中加入锌粉 (3.3g, 50mmol),接着滴加饱和氯化铵溶液 (10ml);将反应混合物在室温下剧烈搅拌5h,直到反应物黄色基本完全褪去。垫上硅胶后过滤,滤饼用乙酸乙酯充分洗涤,滤液回收甲醇后,加水适量应乙酸乙酯萃取三次 (50ml×3),合并乙酸乙酯层并用无水硫酸钠干燥,回收溶剂,得暗红色固体2.5g,收率83%, [M+H]<sup>+</sup>300.1, HPLC检测纯度大于96%,无需纯化直接用于下一步反应。

[0069] (3) 化合物1的合成:

[0070] 将中间体II (1.52g, 5mmol) 和3-环戊基丙酸 (0.72ml, 5mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (20ml),向其中加入盐酸EDC (1.2g, 10mmol)、DMAP (0.4g, 2.5mmol),搅拌下室温反应过夜。反应完毕后,反应液充分水洗 (20ml×3),减压回收二氯甲烷,所得固体用无水乙醇淋洗,得白色固体物质(即化合物1) 1.75g,收率81.4%。



[0071]



化合物 1

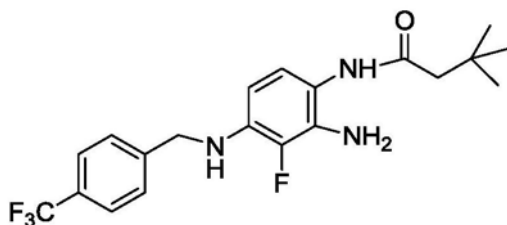
[0072] 所得白色固体物质的熔点 $203\sim 205^{\circ}\text{C}$ ;ESI离子源质谱分析 $[\text{M}+\text{H}]^{+}424.2$ , $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ ) &: 1.46~1.76 (m, 9H, Cyclopentyl-H), 1.08 (d, 2H,  $-\text{C}=\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.25 (t, 2H,  $\text{C}=\text{OCH}_2\text{CH}_2$ ), 4.38 (d, 2H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 4.58 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 5.77 (t, 1H,  $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 6.02 (t, 1H, Ph-H), 6.57 (d, 1H, Ph-H), 7.54 (d, 2H, Ph-H), 7.66 (d, 2H, Ph-H), 8.98 (s, 1H,  $\text{C}=\text{ONH}$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (125MHz, DMSO- $d_6$ ) &: 25.19 (Cyclopentyl  $\text{CH}_2$ ), 32.52 (Cyclopentyl  $\text{CH}_2$ ), 32.08 ( $\text{CH}_2$ ), 35.41 ( $\text{COCH}_2$ ), 46.16 (Cyclopentyl  $\text{CH}$ ), 100.06 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 127.34 ( $\text{CF}_3$ ), 171.98 ( $\text{C}=\text{O}$ ), 146.22 (CF), 141.61 (Ph-C), 139.79 (Ph-C), 134.40 (Ph-C), 131.42 (Ph-C), 127.90 (Ph-C), 125.96 (Ph-C), 125.56 (Ph-C), 123.80 (Ph-C), 121.51 (Ph-C), 115.57 (Ph-C)。

[0073] 实施例2

[0074] 化合物2 (N-(2-氨基-3-氟-4-(4-三氟甲基苄氨基)-苯基)-3,3-二甲基丁酰胺)的合成:

[0075] 将中间体II (1.52g, 5mmol) 和3,3-二甲基丁酸 (0.625ml, 5mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (20ml), 向其中加入盐酸EDC (1.2g, 10mmol)、DMAP (0.4g, 2.5mmol), 搅拌下室温反应过夜。反应完毕后, 反应液充分水洗 ( $20\text{ml}\times 3$ ), 减压回收二氯甲烷, 所得固体稀醇重结晶, 得白色固体物质 (即化合物2) 0.60g, 收率30.0%。

[0076]



化合物 2。

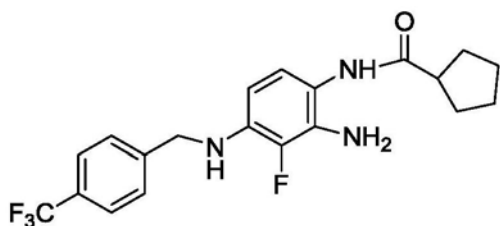
[0077] 所得白色固体物质的熔点 $162.9\sim 163.4^{\circ}\text{C}$ ;ESI离子源质谱分析 $[\text{M}+\text{H}]^{+}398.2$ 。

[0078] 实施例3

[0079] 化合物3 (N-(2-氨基-3-氟-4-(4-三氟甲基苄氨基)-苯基)-环戊基甲酰胺)的合成:

[0080] 将中间体II (1.52g, 5mmol) 和环戊基甲酸 (0.541ml, 5mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (20ml), 向其中加入盐酸EDC (1.88g, 12.5mmol)、DMAP (0.08g, 0.1mmol), 搅拌下室温反应过夜。反应完毕后, 反应液充分水洗 ( $20\text{ml}\times 3$ ), 减压回收二氯甲烷, 所得固体稀醇重结晶, 得白色固体物质 (即化合物3) 1.11g, 产率56.2%, 熔点 $222.9\sim 223.5^{\circ}\text{C}$ 。

[0081]



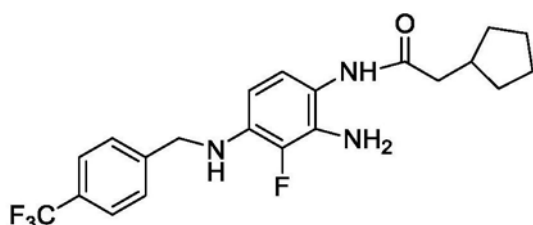
化合物 3。

[0082] 实施例4

[0083] 化合物4 (N-(2-氨基-3-氟-4-(4-三氟甲基苄氨基)-苯基)-环戊基乙酰胺) 的合成:

[0084] 将中间体II (1.52g, 5mmol) 和环戊基乙酸 (0.582ml, 5mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (20ml), 向其中加入盐酸EDC (0.6g, 5mmol)、DMAP (0.32g, 2.0mmol), 搅拌下室温反应过夜。反应完毕后, 反应液充分水洗 (20ml × 3), 减压回收二氯甲烷, 所得固体稀醇重结晶, 得白色固体物质 (即化合物4) 0.93g, 产率45.4%, 熔点196.9-197.5℃。

[0085]



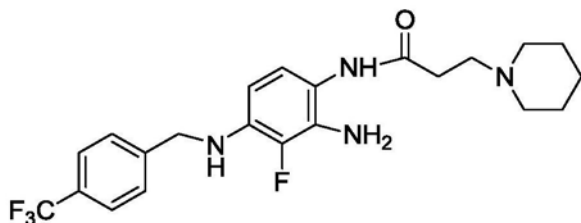
化合物 4。

[0086] 实施例5

[0087] 化合物5 (N-(2-氨基-3-氟-4-(4-三氟甲基苄氨基)-苯基)-3-哌啶-1-基丙酰胺) 的合成:

[0088] 将中间体II (1.52g, 5mmol) 和1-哌啶丙酸 (0.786mg, 5mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (20ml), 向其中加入盐酸EDC (1.2g, 10mmol)、DMAP (0.4g, 2.5mmol), 搅拌下室温反应过夜。反应完毕后, 反应液充分水洗 (20ml × 3), 减压回收二氯甲烷, 所得固体稀醇重结晶, 得白色固体物质 (即化合物5) 1.36g, 产率62.3%, 熔点202.1-203.5℃。

[0089]



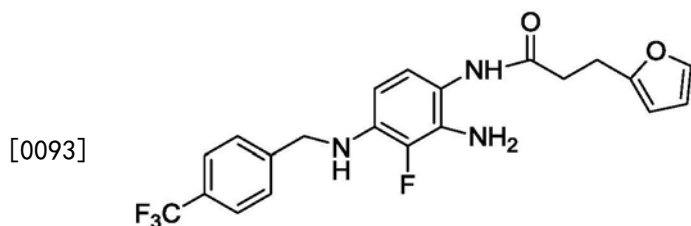
化合物 5。

[0090] 实施例6

[0091] 化合物6 (N-(2-氨基-3-氟-4-(4-三氟甲基苄氨基)-苯基)-3-咪唑-1-基-2-基丙酰胺) 的合成:

[0092] 将中间体II (1.52g, 5mmol) 和3-(2-咪唑) 丙酸 (0.695mg, 5mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (20ml), 向其中加入盐酸EDC (1.2g, 10mmol)、DMAP (0.4g, 2.5mmol), 搅拌下室温反应过夜。反应完毕后, 反应液充分水洗 (20ml × 3), 减压回收二氯甲烷, 所得固体稀醇重结晶, 得

白色固体物质(即化合物6) 0.69g,产率33.0%,熔点212.2-213.5℃。

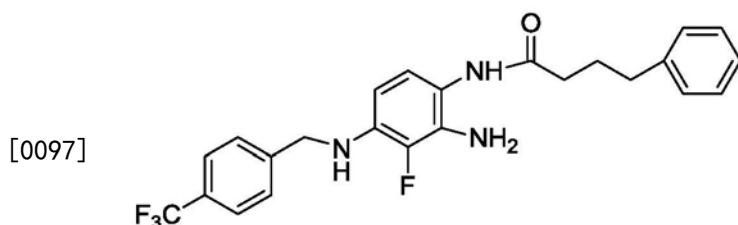


化合物 6。

[0094] 实施例7

[0095] 化合物7(N-(2-氨基-3-氟-4-(4-三氟甲基苄氨基)-苯基)-4-苯基丁胺)的合成:

[0096] 将中间体II (1.52g, 5mmol) 和苯丁酸 (0.821mg, 5mmol) 溶于干燥的二氯甲烷 (20 ml), 向其中加入盐酸EDC (0.6g, 5mmol)、DMAP (0.8g, 5mmol), 搅拌下室温反应过夜。反应完毕后, 反应液充分水洗 (20ml × 3), 减压回收二氯甲烷, 所得固体稀醇重结晶, 得白色固体物质(即化合物7) 0.93g, 产率41.6%, 熔点198.5-199.5℃。



化合物 7。

[0098] 实施例8原子吸收Rb<sup>+</sup>流出高通量测定

[0099] 以化合物1为例, 通过如下方法测试:

[0100] 原子吸收Rb<sup>+</sup>流出测定技术在钾离子通道调节剂的高通量筛选中更加安全快速, 并且具有直接反映离子通道活性及调节剂调节作用的特点。Rb与K有相近的原子大小, 并且钾离子通道对于Rb<sup>+</sup>具有通透性, 可以通过检测Rb<sup>+</sup>流出的浓度来测定钾通道的开放或关闭。Rb在 780nm有特异的原子吸收, 可以通过原子吸收的方法检测的Rb<sup>+</sup>浓度。故可以采用原子吸收光谱测定法通过测定Rb<sup>+</sup>流出的高通量测定技术用于筛选钾通道的开放剂或关闭剂。

[0101] 将处于对数生长期的稳转KCNQ2/3通道的CHO细胞以 $2 \times 10^4$ 个/孔的密度接种于96孔培养板。每个浓度设三重孔。并设相应浓度的溶媒对照孔。贴壁生长过夜后, 弃培养液, 加入200 $\mu$ l含RbCl的装载缓冲液, 在37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养3小时。然后弃去装载缓冲液, 用洗涤缓冲液洗涤3遍。若筛选通道开放剂, 在去极化缓冲液中稀释待测化合物, 并将200 $\mu$ l上述溶液加入细胞中, 反应10分钟。孵育10分钟后, 小心吸取200 $\mu$ l上清到另一块96孔板中, 用ICR8000原子吸收测定仪测定780nm处的Rb<sup>+</sup>原子吸收。按公式 $F_{supern} = (Rb_{supern}/cpd/Rb_{supern}/d) * 100$ 计算相对流出量。

[0102] 其测试结果表明, 原子吸收Rb<sup>+</sup>流出高通量测定技术测定的化合物1分别在0.03、0.1、0.3、1、3和10 $\mu$ M浓度下对稳转KCNQ2/3钾离子通道的CHO细胞的剂量依赖性的激活作用。RTG为实验阳性对照品Retigabine  $EC_{50} = 0.86 \pm 0.18 \mu$ M, 化合物1测量组 $EC_{50} = 0.15 \pm 0.04 \mu$ M。由此可见, 化合物1为KCNQ2/3钾离子通道高活性开放剂。

[0103] 部分化合物Rb<sup>+</sup>流出高通量测定结果见表1。从表1中可以看出,本发明所述化合物具有一定的钾通道开放活性。

[0104] 表1部分化合物性能检测

| 化合物编号 | KCNQ2/3 EC50( $\mu$ M) | 化合物纯度 (%) * | m/z (M+H) ** |
|-------|------------------------|-------------|--------------|
| 1     | 0.15 $\pm$ 0.04        | 99.5        | 424.2        |
| 2     | 0.21 $\pm$ 0.08        | 99.2        | 398.2        |
| 3     | 2.83 $\pm$ 0.21        | 99.1        | 396.4        |
| 4     | 0.58 $\pm$ 0.13        | 99.2        | 410.3        |
| 5     | 0.75 $\pm$ 0.12        | 99.0        | 439.2        |
| 6     | 3.58 $\pm$ 0.73        | 98.9        | 422.2        |
| 7     | 5.26 $\pm$ 0.82        | 99.3        | 446.2        |

[0106] \*HPLC面积归一化法

[0107] \*\*ESI MS正离子源Q1全扫描模式

[0108] 实施例9电生理膜片钳测定

[0109] 以化合物1为例,其测试方法:中国仓鼠卵巢细胞(CHO)的培养:稳转了KCNQ通道的CHO细胞培养于含有10%胎牛血清,100U/ml青霉素和链霉素的DMEM培养液中,胰酶消化传代。将细胞铺于12mm的圆形盖玻片上,24孔板培养。

[0110] 膜片钳技术记录细胞膜电流:膜片钳放大器采用HEKA-EPC10。电极内应用两性霉素B(终浓度0.1~0.2mg/ml)做打孔膜片钳记录。微电极抛光后,灌充电极内液,控制电阻值在2~4M $\Omega$ 。记录CHO细胞时所用电极内液为(mM):KCl 160,HEPES 5,MgCl<sub>2</sub> 3,CaCl<sub>2</sub> 1,EGTA 3,用KOH调pH至7.4;细胞外液成分为(mM):NaCl 160,KCl 2.5,HEPES 10, glucose 8,MgCl<sub>2</sub> 1,CaCl<sub>2</sub> 5。微电极与细胞膜形成巨阻封接后,在电压钳制下,开始进行电流记录。

[0111] 测试结果如图1~3所示,化合物1可以明显激活KCNQ2/3(Kv7.2/7.3),EC50值为0.38 $\pm$ 0.10 $\mu$ M,但是对KCNQ4(Kv7.4)的开放活性相对较小,具有较好的选择性。

[0112] 鉴于本发明化合物对KCNQ家族钾通道具有开放作用,因此认为它们可以用于增加哺乳动物(例如人)的电压依赖性钾通道的电流,适用于治疗KCNQ家族钾离子通道电流增加敏感的疾病,如癫痫、各种焦虑症,以及各种神经性疼痛。

[0113] 实施例10最大电惊厥(MES)实验模型

[0114] 以化合物1和化合物2为例,阳性对照药Retigabine(RTG)

[0115] 实验方法:昆明小鼠,雄性,18~22g;实验前三天将动物放置实验环境下使其适应环境,自由进食、饮水;室温23~25 $^{\circ}$ C;

[0116] 实验仪器为YLS-9A生理药理电子刺激仪:连续波输出;波宽20ms;间隙10ms;波数70;电压60V;限流3.5mA

[0117] 实验方法:正式实验前24h,进行小鼠筛选,将刺激仪按上述参数设定,用刺激仪的鳄鱼夹夹住小鼠双耳,启动刺激,以小鼠后肢强直为阳性指标,筛选合格(阳性)小鼠,剔除不达标的小鼠。正式实验时按照实验方案随机分组,每组10只,进行电刺激,不出现后肢强直为(阳性)有效。

[0118] 实验结果:空白对照组有效率0%;化合物1腹腔给药1mg/kg体重有效率100% (10/10);化合物2腹腔给药1mg/kg体重有效率90% (9/10);阳性对照药RTG腹腔给药10mg/kg体重有效率80% (8/10)。表明本发明化合物具有与RTG具有同样明显的抗惊厥表征作用。

[0119] 实施例11戊四唑 (PTZ) 诱导癫痫模型

[0120] 测试化合物1,阳性对照药Retigabine (RTG)

[0121] 实验条件:室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$

[0122] 实验动物:KM小鼠雌雄各半体重18-25g每组10-12只适应环境3天自由进食水

[0123] 实验方法:实验前一天每只动物标记以保证每只动物给药后测定时间相一致,实验动物前一晚禁食8h以上,造模前15min腹腔给予25%羟丙基 $\beta$ 环糊精溶解的待测药物,药物吸收后按85mg/kg PTZ (给药容积为0.1ml/10g) 体重颈背部皮下给药造模。PTZ给药后计时并及时放入透明观察箱内,保持环境安静,记录发作阈值和未发作的动物例数,每只小鼠观察 30min (阈值为注射PTZ后小鼠发生第一次广泛性的全身阵挛并丧失翻正反射为止的时间,如果30min内动物未发作,阈值按30min记录),比较动物发作阈值大小和造模后12小时内小鼠未死亡比例 (即保护率)。

[0124] 实验结果:模型组 (溶剂组) 发作阈值 $465 \pm 394$ 秒,保护率16.7% (2/12);阳性对照组 (RTG) 15mg/Kg体重发作阈值: $858.17 \pm 528.48$ s,保护率50% (6/12);化合物1 5mg/Kg体重发作阈值 $1185.96 \pm 134.28$ s,保护率100% (20/20);化合物1 3mg/Kg体重发作阈值 $867.21 \pm 152.51$ s,保护率100% (20/20);化合物1mg/Kg体重发作阈值 $1166.31 \pm 145.32$ s,保护率100% (20/20)。化合物1的发作阈值与保护率与模型组比较,差异均有统计学意义,各给药组与阳性对照药15mg/Kg比较没有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明本发明化合物对戊四唑所致癫痫的作用优于阳性对照药。

[0125] 实施例12

[0126] 按照本领域已知的方法制备片剂,每片含有下述成分:

|             |       |
|-------------|-------|
| 化合物 1       | 5 mg  |
| 乳糖          | 10 mg |
| [0127] 硬脂酸镁 | 1 mg  |
| 聚乙烯比咯烷酮     | 15 mg |

[0128] 本发明列举的实施例旨在阐明本发明公开的衍生物、其制备方法以及该类化合物具有明显激活KCNQ通道电流,实施例不单是说明它本身所述的具体的化合物及其合成方法及药物活性,同时也可以用来说明改变原料的种类和数量,合成其同系物和类似物,而不对本发明的范围构成任何限制。

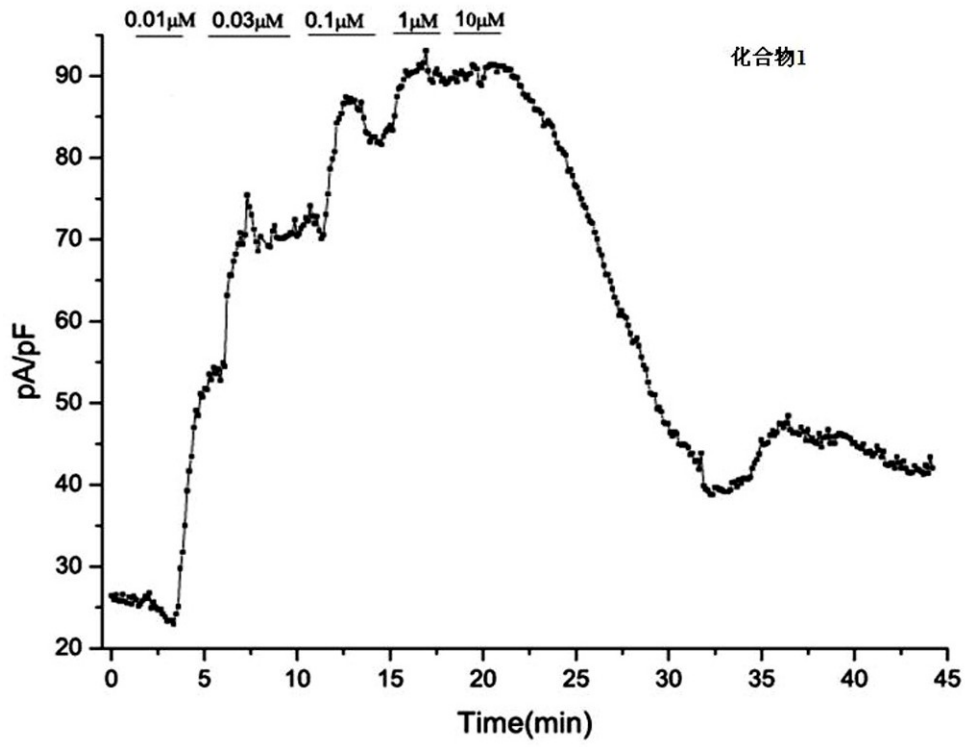


图1

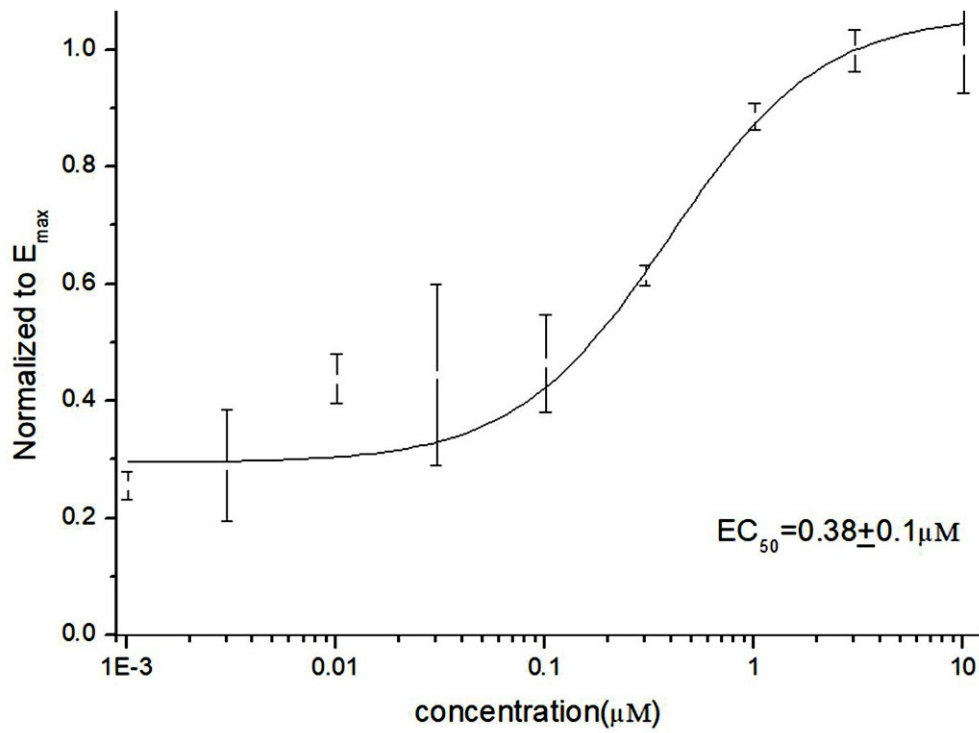


图2

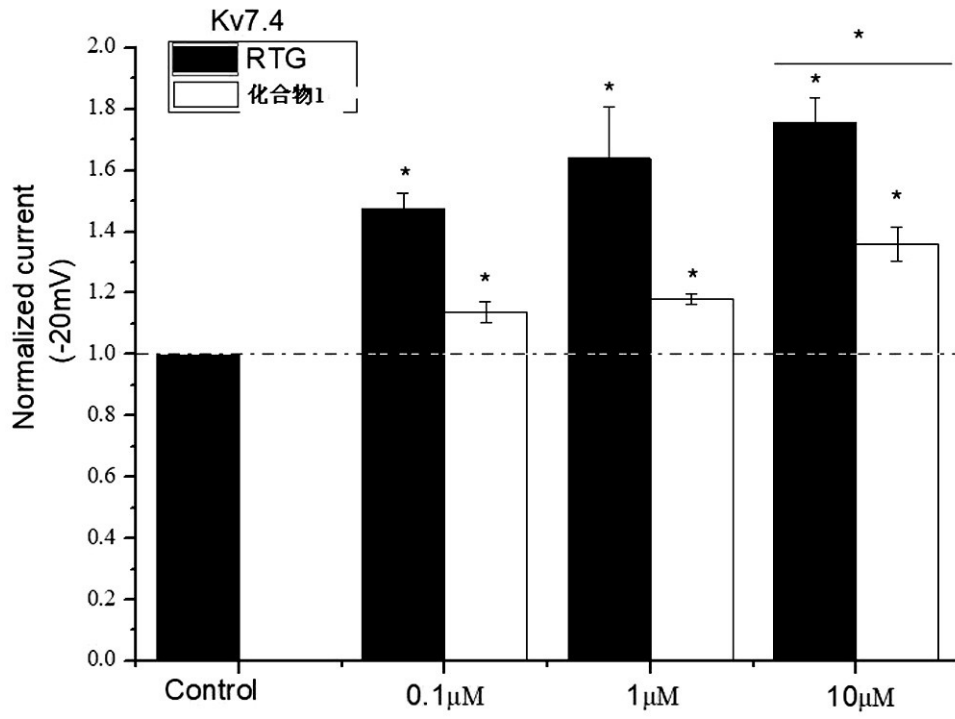


图3