

作为钾通道调节剂的化合物及其制备和应用

技术领域

5 本发明涉及生物医药领域，具体地涉及作为钾通道调节剂的化合物及其制备和应用。

背景技术

Kv7 钾通道是一类电压依赖性钾离子通道，具有低阈值激活、慢激活和非失活的特点。Kv7 钾通道具有五个家族成员(Kv7.1-Kv7.5)，所有的 Kv7 钾通道成员具有相似的拓扑学结构，即由四个亚基组成一个功能性通道，每个亚基包含六个跨膜片段(S1-S6)。其中 S4 是电压感受区，在感受膜电位变化和控制构象改变等方面具有重要作用；SS-S6 是通道孔区的主要组成部分，是钾通道开放剂的主要组合和作用区域。KV7.1 钾通道是一种非神经元通路，分布于外周组织，在心脏中表达，以介导心肌 I_{ks}，其突变可导致 Long Q-T 综合征。Kv7.2-Kv7.5 钾通道是神经元 M 电流的基础，广泛分布于神经系统中，具有多种生理活性。Kv7.2 和 Kv7.3 钾通道基因突变可导致多种不同的癫痫表型，如良性家族性新生儿惊厥(Benign familial neonatal convulsions, BFNC)，这些充分说明了 M 电流在调节神经元兴奋性中的作用。Kv7.4 钾通道高度表达于耳蜗和脑干听觉核的外毛细胞，其突变可能导致遗传性耳聋。Kv7.5 钾通道在骨骼肌和脑中高度表达，其突变可能导致视网膜病变。许多疾病如癫痫、焦虑、耳聋等，它们的共同特征是膜高度兴奋性，而 Kv7 钾通道作为 M 电流的分子基础，可通过感受膜电位的变化而开放，使抑制性钾电流上调，从而控制膜兴奋性，使得 Kv7 钾通道在以神经高度兴奋性为代表的疼痛和精神疾病中具有重要意义。

25 瑞替加滨(Retigabine)是治疗癫痫的药物，目前已经在英国、德国、丹麦获准上市。研究证实，瑞替加滨的作用与电压门控型钾离子通道(KCNQs)有关，其中作用于 KCNQ2/3 通道调节 M 型钾电流是其主要的作用机制。

瑞替加滨(RTG)是在 2011 年上市的首个用于辅助治疗成人部分发作性癫痫的 Kv7 钾通道开放剂。除具有抗癫痫作用外，RTG 还可用于治疗焦虑症、神经痛、神经退行性疾病等。RTG 在多种癫痫模型中均能有效地减少或阻止癫痫发作。RTG 对最大电休克(MES)模型导致的强直性发作和 PTZ 诱发的阵挛性发作均表现出有效的抗癫痫作用。此外，RTG 还可阻止 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)、青霉素、印防己毒素、海人酸(Kainic acid, KA)等所致的癫痫发作。点燃模型适用于多种抗癫痫药物的筛选，RTG 对该模型的效果要强于其它模型。由于 RTG 对所有的 Kv7 钾通道成员和其它通道的广泛作用，选择性较差，使得它具有潜在的不良作用。大量文献报道了 RTG 与中枢神经系统相关的不良事件发生

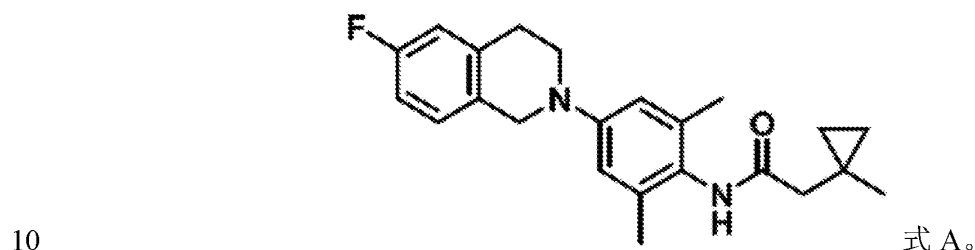
35

率较高，可导致头晕、疲劳、失语、言语障碍、平衡障碍等其它不良反应包括肾结石、尿潴留等肾脏和泌尿系统疾病，心脏骤停、短暂的非持续性室性心动过速等心脏相关疾病，还可导致视网膜变色、皮肤、指甲等蓝/紫色色素沉着等。

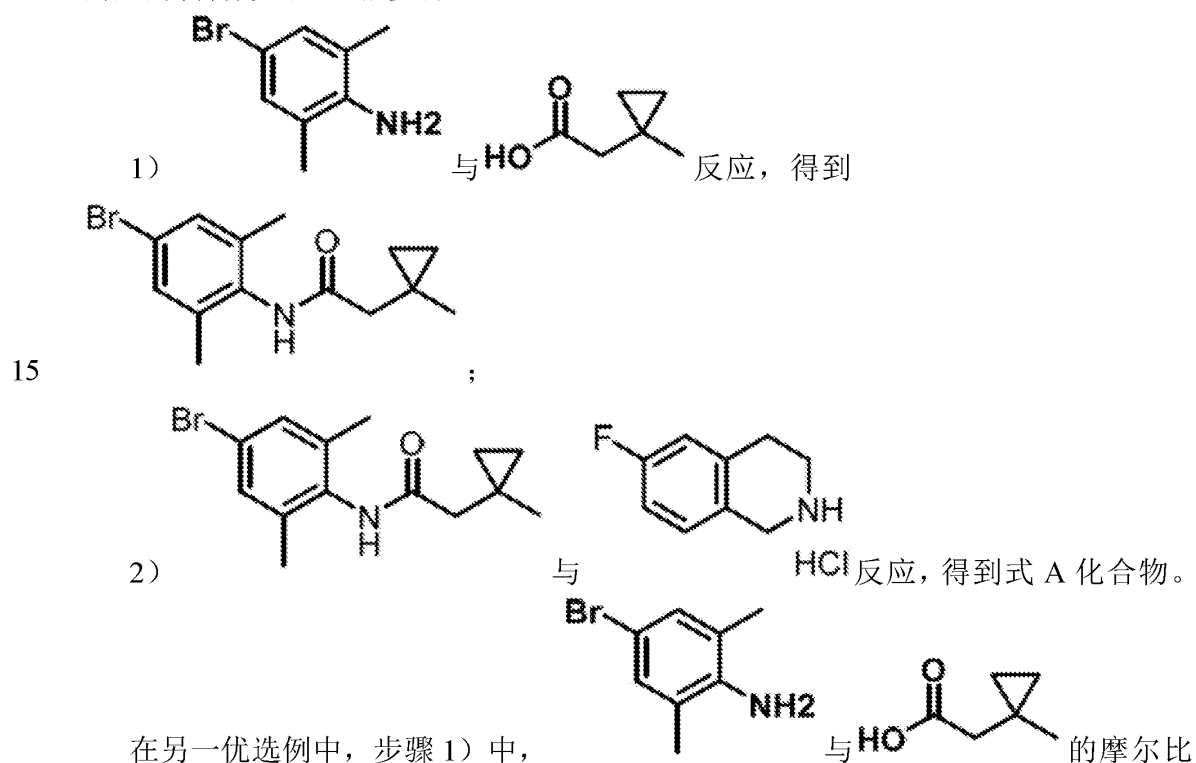
5 发明内容

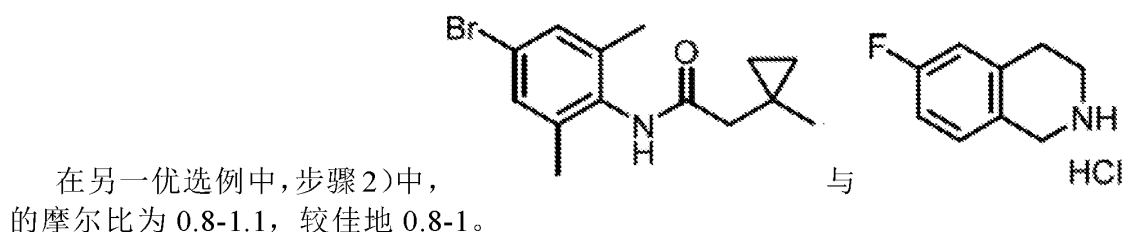
本发明的目的在于提供式 A 所示化合物及其制备方法和其作为钾通道调节剂的用途。

本发明的第一方面，提供了式 A 所示的化合物或其药学上可接受的盐，



本发明的第二方面，提供了一种本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐的制备方法，包括步骤：





5

本发明的第三方面,提供了一种本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制备药物,所述药物用于治疗或预防受到钾离子通道的调节影响的疾病、病症或病况。

10 本发明的第四方面,提供了一种本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制备药物,所述药物用于治疗或预防受到钾离子通道 KCNQ2 的调节影响的疾病、病症或病况。

本发明的第五方面,提供了一种本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制备药物,所述药物用于治疗或预防受到钾离子通道 KCNQ2/3 的调节影响的疾病、病症或病况。

15 本发明的第六方面,提供了一种本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制备药物,所述药物用于治疗或预防受到钾离子通道 KCNQ3 的调节影响的疾病、病症或病况。

20 本发明的第七方面,提供了一种本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制备药物,所述药物用于治疗或预防受到钾离子通道 KCNQ3/5 的调节影响的疾病、病症或病况。

本发明的第八方面,提供了一种本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐的用途,用于制备药物,所述药物用于治疗或预防受到钾离子通道 KCNQ4 的调节影响的疾病、病症或病况。

在另一优选例中,所述疾病、病症或病况为中枢神经系统疾病。

25 在另一优选例中,所述中枢神经系统疾病选自下组:癫痫、惊厥、炎症性疼痛、

神经性疼痛、偏头痛、抑郁、焦虑障碍、脑卒中、阿尔茨海默症、神经变性疾病、可卡因滥用、尼古丁戒断、酒精戒断、耳鸣。

5 本发明的第九方面，提供了一种药物组合物，包含一种或多种药学上可接受的载体和治疗有效量的一种或多种本发明第一方面所述的化合物或其药学上可接受的盐。

10 本发明的第十方面，提供了一种预防或治疗受到钾离子通道的调节影响的疾病、病症或病况的方法，包括步骤：将治疗有效量的本发明第一方面所述化合物或其药学上可接受的盐或本发明第九方面所述的药物组合物施用于所需患者。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

15

具体实施方式

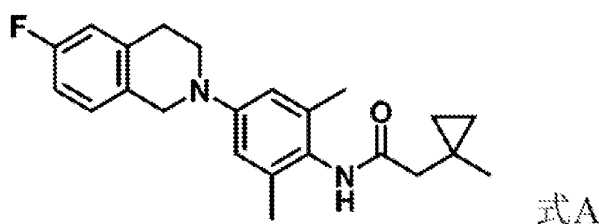
20 本发明人经过长期而深入的研究，通过结构优化，意外地制备了一个具有优异的钾通道开放活性、钾离子通道最大激动率、药代动力学（如脑血比性能等）、体内药效和安全性且结构新颖的式 A 所示化合物。在此基础上，发明人完成了本发明。

术语

在本发明中，除非特别指出，所用术语具有本领域技术人员公知的一般含义。

25 化合物

本发明提供了一种式 A 所示的化合物或其药学上可接受的盐。



式A

如本文所用，术语“药学上可接受的盐”指本发明化合物与酸或碱所形成的适合

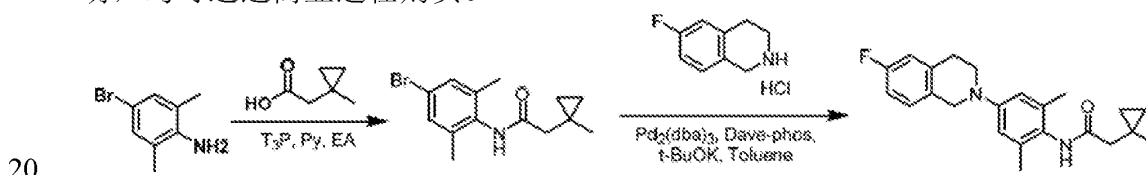
用作药物的盐。药学上可接受的盐包括无机盐和有机盐。一类优选的盐是本发明化合物与酸形成的盐。适合形成盐的酸包括但不限于：盐酸、氢溴酸、氢氟酸、硫酸、硝酸、磷酸等无机酸；甲酸、乙酸、三氟乙酸、丙酸、草酸、丙二酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、苦味酸、苯甲酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、苯磺酸、萘磺酸等有机酸；以及脯氨酸、苯丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸等氨基酸。

另一类优选的盐是本发明化合物与碱形成的盐，例如碱金属盐（例如钠盐或钾盐）、碱土金属盐（例如镁盐或钙盐）、铵盐（如低级的烷醇铵盐以及其它药学上可接受的胺盐），例如甲胺盐、乙胺盐、丙胺盐、二甲基胺盐、三甲基胺盐、二乙基胺盐、三乙基胺盐、叔丁基胺盐、乙二胺盐、羟乙胺盐、二羟乙胺盐、三羟乙胺盐，以及分别由吗啉、哌嗪、赖氨酸形成的胺盐。

制备方法

下面更具体地描述本发明式 A 结构化合物的制备方法，但这些具体方法不对本发明构成任何限制。本发明化合物还可以任选将在本说明书中描述的或本领域已知的各种合成方法组合起来而方便地制得，这样的组合可由本发明所属领域的技术人员容易地进行。

典型地，本发明化合物的制备工艺流程如下，其中所用原料和试剂如无特殊说明，均可通过商业途径购买。



药物组合物和施用方法

本发明的药物组合物包含安全有效量范围内的本发明化合物或其药理上可接受的盐及药理上可以接受的赋形剂或载体。其中“安全有效量”指的是：化合物的量足以明显改善病情，而不至于产生严重的副作用。通常，药物组合物含有 1-2000mg 本发明化合物/剂，更佳地，含有 5-1000mg 本发明化合物/剂。较佳地，所述的“一剂”为一个胶囊或药片。

“药学上可以接受的载体”指的是：一种或多种相容性固体或液体填料或凝胶物质，它们适合于人使用，而且必须有足够的纯度和足够低的毒性。“相容性”在此

指的是组合物中各组份能和本发明的化合物以及它们之间相互掺和，而不明显降低化合物的药效。药学上可以接受的载体部分例子有纤维素及其衍生物(如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素钠、纤维素乙酸酯等)、明胶、滑石、固体润滑剂(如硬脂酸、硬脂酸镁)、硫酸钙、植物油(如豆油、芝麻油、花生油、橄榄油等)、多元醇(如丙二醇、甘油、甘露醇、山梨醇等)、乳化剂(如吐温®)、润湿剂(如十二烷基硫酸钠)、着色剂、调味剂、稳定剂、抗氧化剂、防腐剂、无热原水等。

所述的药物组合物为注射剂、囊剂、片剂、丸剂、散剂或颗粒剂。

本发明化合物或药物组合物的施用方式没有特别限制，代表性的施用方式包括(但并不限于)：口服、瘤内、直肠、肠胃外(静脉内、肌肉内或皮下)、和局部给药。

10 用于口服给药的固体剂型包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这些固体剂型中，活性化合物与至少一种常规惰性赋形剂(或载体)混合，如柠檬酸钠或磷酸二钙，或与下述成分混合：(a) 填料或增容剂，例如，淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸；(b) 粘合剂，例如，羟甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖和阿拉伯胶；(c) 保湿剂，例如，甘油；(d) 崩解剂，例如，琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、藻酸、某些复合硅酸盐、和碳酸钠；(e) 缓溶剂，例如石蜡；(f) 吸收加速剂，例如，季胺化合物；(g) 润湿剂，例如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯；(h) 吸附剂，例如，高岭土；和(i) 润滑剂，例如，滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠，或其混合物。胶囊剂、片剂和丸剂中，剂型也可包含缓冲剂。

20 固体剂型如片剂、糖丸、胶囊剂、丸剂和颗粒剂可采用包衣和壳材制备，如肠衣和其它本领域公知的材料。它们可包含不透明剂，并且，这种组合物中活性化合物或化合物的释放可以延迟的方式在消化道内的某一部分中释放。可采用的包埋组分的实例是聚合物物质和蜡类物质。必要时，活性化合物也可与上述赋形剂中的一种或多种形成微胶囊形式。

25 用于口服给药的液体剂型包括药学上可接受的乳液、溶液、悬浮液、糖浆或酏剂。除了活性化合物外，液体剂型可包含本领域中常规采用的惰性稀释剂，如水或其它溶剂，增溶剂和乳化剂，例如，乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲酰胺以及油，特别是棉籽油、花生油、玉米胚油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油或这些物质的混合物等。

30 除了这些惰性稀释剂外，组合物也可包含助剂，如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、

甜味剂、矫味剂和香料。

除了活性化合物外，悬浮液可包含悬浮剂，例如，乙氧基化异十八烷醇、聚氧乙烯山梨醇和脱水山梨醇酯、微晶纤维素、甲醇铝和琼脂或这些物质的混合物等。

用于肠胃外注射的组合物可包含生理上可接受的无菌含水或无水溶液、分散液、
5 悬浮液或乳液，和用于重新溶解成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。适宜的含水和非水载体、稀释剂、溶剂或赋形剂包括水、乙醇、多元醇及其适宜的混合物。

用于局部给药的本发明化合物的剂型包括软膏剂、散剂、贴剂、喷射剂和吸入剂。活性成分在无菌条件下与生理上可接受的载体及任何防腐剂、缓冲剂，或必
10 要时可能需要的推进剂一起混合。

本发明化合物可以单独给药，或者与其他药学上可接受的其他化合物联合给药。

本发明治疗方法可以单独施用，或者与其它治疗手段或者治疗药物联用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的本发明化合物适用于需要治疗的哺乳动物(如人)，其中施用剂量为药学上认为的有效给药剂量，对于 60kg 体重的人而
15 言，日给药剂量通常为 1~2000mg，优选 5~1000mg。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

与现有技术相比，本发明具有以下主要优点：

(1) 所述化合物具有更优的药代动力学性能，如更优的脑血比、半衰期、暴
20 露量、代谢稳定性等性能；

(2) 所述化合物具有更好的钾离子通道开放活性、更优的钾离子通道最大激动率、更优的离子通道选择性、更优的体内药效以及更好的安全性；

(3) 所述化合物有望用于治疗 and/或预防受钾离子通道的活性影响的疾病和病症。
25

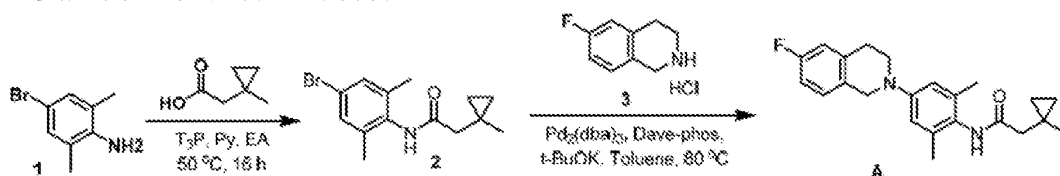
下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，

否则百分比和份数按重量计算。

除非另行定义，文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外，任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

5 以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

实施例 1 化合物 A 的制备



步骤一、化合物 2

10 将化合物 1 (2.0 g, 10.0 mmol, 1.0 eq) 溶于乙酸乙酯 (100 mL)，加入 2-(1-甲基环丙基)乙酸(cas:71199-15-0, 1.26 g, 11.0 mmol, 1.1 eq)、吡啶 (7.9 g, 99.96 mmol, 10.0 eq)和 T₃P (50%, 31.8 g, 49.97 mmol, 5.0 eq)，升温至 50 °C 搅拌 16 小时。冷却至 25 °C 后加水稀释，用乙酸乙酯 (3 x 100 mL) 萃取。合并后的有机相用饱和氯化钠溶液洗涤并用无水硫酸钠干燥，浓缩后的残留物用硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯=10/1)纯化得到化合物 2 (2.5 g, 84%) 为白色固体。

LCMS: [M+H]⁺ = 296.0

步骤二、化合物 A

20 将化合物 3(224mg, 0.61mmol, 1.2eq)溶于甲苯 (5 mL)，依次加入化合物 2(150 mg, 0.51mmol, 1.0 eq)、叔丁醇钾 (172mg, 1.53mmol, 3.0 eq)、Dave-phos (40 mg, 0.10 mmol, 0.2 eq)和 Pd₂(dba)₃(47 mg, 0.051 mmol, 0.1 eq)，氮气保护下升温至 80 °C 搅拌 16 小时。反应液冷却至 25 °C 后用乙酸乙酯 (30mL) 稀释，然后依次用水和饱和氯化钠溶液洗涤，有机相用无水硫酸钠干燥，浓缩后得到的残留物用硅胶柱层析(石油醚/乙酸乙酯=2/1)纯化，得到化合物 A(52.3 mg, 28%)。

LCMS: [M+H]⁺ = 367.2

25 ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.80 (s, 1H), 7.27-7.24 (m, 1H), 7.02–6.99 (m, 2H), 6.71 (s, 2H), 4.31 (s, 2H), 3.48 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.90 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.17 (s, 2H), 2.10 (d, 6H), 1.14 (s, 3H), 0.55-0.52 (m, 2H), 0.32–0.29 (m, 2H).

实施例 2 钾离子通道开放剂激动率测试 (FDSS/ μ CELL 检测)

1. 实验方法:

1.1 实验流程

细胞准备: CHO-KCNQ2 细胞培养于 175 cm² 培养瓶中, 待细胞密度生长到 60~80%,
5 移走培养液, 用 7 mL PBS (Phosphate Buffered Saline, 磷酸盐缓冲液) 洗一遍, 然后加入 3 mL 0.25% Trypsin 消化。待消化完全后加入 7 mL 培养液 (90% DMEM/F12 + 10% FBS + 500 μ g/mL G418) 中和, 800 rpm 离心 3 分钟, 吸走上清液, 再加入 5 mL 培养液重悬, 细胞计数。

细胞铺板: 根据细胞计数结果, 调整密度至 3×10^4 个/孔, 室温静置 30 分钟后,
10 放置于 37°C CO₂ 培养箱培养过夜, 培养 16-18 小时, 细胞密度达到约 80%。

荧光染料孵育: 弃去细胞培养液, 加入 80 μ L/孔的上样缓冲液, 室温避光孵育 60 分钟。

化合物孵育: 弃去上样缓冲液, 加入配制好的化合物溶液 80 μ L/孔, 室温避光孵育 20 分钟。

15 荧光数据采集: 采用 FDSS/ μ CELL 仪器进行实时荧光信号记录, 激发波长 480 nm、发射波长 540 nm, 每秒记录 1 次, 记录 10 秒基线后开始加入 20 μ L/孔的刺激缓冲液, 再持续记录至 180 秒结束。

1.2 溶液配制

上样缓冲液: 10mL/板, 配制方式如下:

成分	体积
PowerLoad™ 浓缩物, 100X (成分C)	100 μ L
FluxOR™ 试剂, 在DMSO中重建 (步骤1.2)	10 μ L
去离子水	8.8 mL
FluxOR™ 测试缓冲液, 10X (成分B)	1 mL
丙磺舒, 在去离子水中重建 (步骤1.1)	100 μ L
总体积	10mL

测试缓冲样: 100mL/板, 配制方式如下:

成分	体积
去离子水	8.9 mL
FluxOR™ 测试缓冲液, 10X (成分B)	1 mL
丙磺舒, 在去离子水中重建 (步骤1.1)	100 μ L
总体积	10 mL

刺激缓冲液: 5mL/板, 配制方式如下:

成分	体积	
	+ K ⁺	- K ⁺
去离子水	2.5 mL	3.5 mL
FluxOR™ 不含氯缓冲液, 5X (成分E)	1 mL	1 mL
K ₂ SO ₄ 浓缩物 (125mM的K ₂ SO ₄ 浓溶液, 成分F)	1 mL	/
Tl ₂ SO ₄ 浓缩物 (50mM的Tl ₂ SO ₄ 浓溶液, 成分G)	0.5 mL	0.5 mL
总体积	5 mL	5 mL

上述缓冲液来源于市售的试剂盒, 试剂盒名称为 FluxOR potassium ion

5 channel assay.

1.3 化合物准备

配制 20 mM 的 DMSO 化合物母液, 取 10 μ L 20 mM 的化合物母液至 20 μ L DMSO 溶液中, 3 倍连续稀释成 8 个中间浓度; 再分别取中间浓度的化合物至测试缓冲液中, 200 倍稀释得到需要测试的最终浓度, 取 80 μ L 加入至检测板中。

10 最高测试浓度为 100 μ M, 依次分别为 100, 33.33, 11.11, 3.70, 1.23, 0.41, 0.137, 0.045 μ M 共 8 个浓度。每个浓度 3 复孔。

最终测试浓度中的 DMSO 含量不超过 0.5%, 此浓度的 DMSO 对 KCNQ2 钾通道没有影响。

1.4 数据分析

15 实验数据由 Excel 2007、GraphPad Prism 5.0 软件进行分析, 统计 180 秒的比值计算激动效应。化合物激动效应由如下公式计算:

$$\text{激动百分比} = \frac{\text{加入化合物的荧光信号比值} - \text{未加化合物的荧光信号比值}}{\text{未加化合物的荧光信号比值}} \times 100\%$$

1.5 质量控制

环境：温度~25℃

试剂：Flux0RTM 检测试剂盒 (Invitrogen, Cat #F0017)

报告中的实验数据必须满足以下标准：Z' Factor > 0.5

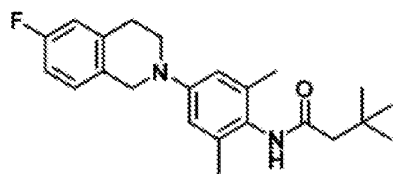
5 2. 测定结果：详见表1。

表 1

化合物	最大激动率 (%)
A	43.06
B	9.67

上述测试方法的参考文献：ZhaobingGao 等人. Journal of Biological Chemistry. 2010, 285 (36): 28322-28332.

10 化合物 B 为专利 W02008024398 及 W02011094186 公开化合物，其结构为



。通过对比化合物 A 与化合物 B 的最大激动率可以看出，将化合物 B 的叔丁基改为  后，化合物对钾离子通道 KCNQ2 的最大激动率大幅提高 (~4.5 倍)。

15 实施例 3 化合物通过血脑屏障能力的研究

1) 研究目的：为了获得待测化合物通过血脑屏障情况

2) 实验内容

取健康雄性 ICR 小鼠（体重范围为 18-22 克）9 只，分成 3 组，3 只鼠/组，禁食过夜后分别口服给予待测化合物，于时间点 1h、2h 和 4h 经心脏穿刺采血，采集至少 0.5 mL 全血至 EDTA-K₂ 抗凝管，半小时内，离心取血浆（6000 转，8 分钟，4℃），-20℃冻存备用。同时采集脑组织，经生理盐水冲洗干净后用吸水纸吸干，称重，-20℃冻存备用。

实验结果：根据所得血药浓度数据，采用 WinNonlin® 7.0 软件（美国 Pharsight 公司）的非房室模型计算给药后的药代动力学参数。

25 表 2 雄性 ICR 小鼠单次口服给药后各时间点的脑血比

	1h 脑血比	2h 脑血比	4h 脑血比
化合物 A	4.47	3.31	4.24
化合物 B	0.7	0.8	0.1

脑血比对神经类药物至关重要，脑血比越高，代表化合物透过血脑屏障的能力越强。从表 2 数据对比可知：本发明化合物 A 的脑血比显著优于专利 W02008024398 及 W02011094186 所公布的化合物 B（大于 4 倍）。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。