



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103508943 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 15

(21) 申请号 201210224002. X

A61P 29/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 06. 29

A61P 25/04 (2006. 01)

(71) 申请人 上海先声药物研究有限公司

地址 201321 上海市浦东新区芙蓉花路 118 号

申请人 江苏先声药物研究有限公司

(72) 发明人 陈焕明 梁波 赵忠强 曹文杰

李阿敏 陈德薪 高春华 张鹏

徐万美 陈雪莲 张丽丽

(74) 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任

公司 32218

代理人 徐冬涛 吕鹏涛

(51) Int. Cl.

C07D 213/75 (2006. 01)

C07D 239/47 (2006. 01)

A61K 31/513 (2006. 01)

A61K 31/4412 (2006. 01)

A61K 31/44 (2006. 01)

A61P 25/08 (2006. 01)

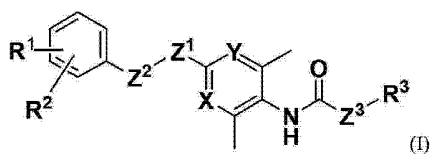
权利要求书2页 说明书28页

(54) 发明名称

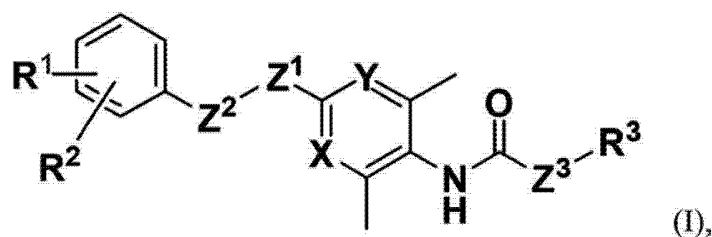
作为钾通道调节剂的化合物

(57) 摘要

本发明涉及一类作为钾通道调节剂的化合物, 其为式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐, 所述化合物或其药学上可接受的盐对治疗和预防受钾离子通道的活性影响的疾病和病症有效果。



1. 式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐,



其中,

Z^1 和 Z^2 各自独立地选自 O、NH 或 CH_2 , 且 Z^1 和 Z^2 中至少一个为 CH_2 ;

Z^3 为 O 或 $(\text{CH}_2)_n$;

n 为 1-6 的整数;

X 和 Y 各自独立地为 CH 或 N;

R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基、 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基、 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 杂芳基或 $\text{C}_4\text{-C}_8$ 杂环基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基、 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基、 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 杂芳基或 $\text{C}_4\text{-C}_8$ 杂环基独立可选地被一个或多个选自卤素、氰基、硝基、氨基、羟基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基、 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基、 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 杂芳基或 $\text{C}_4\text{-C}_8$ 杂环基的取代基所取代;

R^3 选自 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基独立可选地被一个或多个选自卤素、氰基、硝基、氨基或羟基的取代基所取代。

2. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中

R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基独立可选地被一个或多个选自卤素、氰基、硝基、氨基或羟基的取代基取代;

R^3 选自 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基独立可选地被一个或多个选自卤素、氰基、硝基、氨基或羟基的取代基取代。

3. 根据权利要求 2 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 R^1 和 R^2 各自独立地为氢、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基或卤代环丙基。

4. 根据权利要求 3 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 R^1 和 R^2 各自独立地为氢、氟、氯、溴、甲基或三氟甲基。

5. 根据权利要求 2 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 R^3 为甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基。

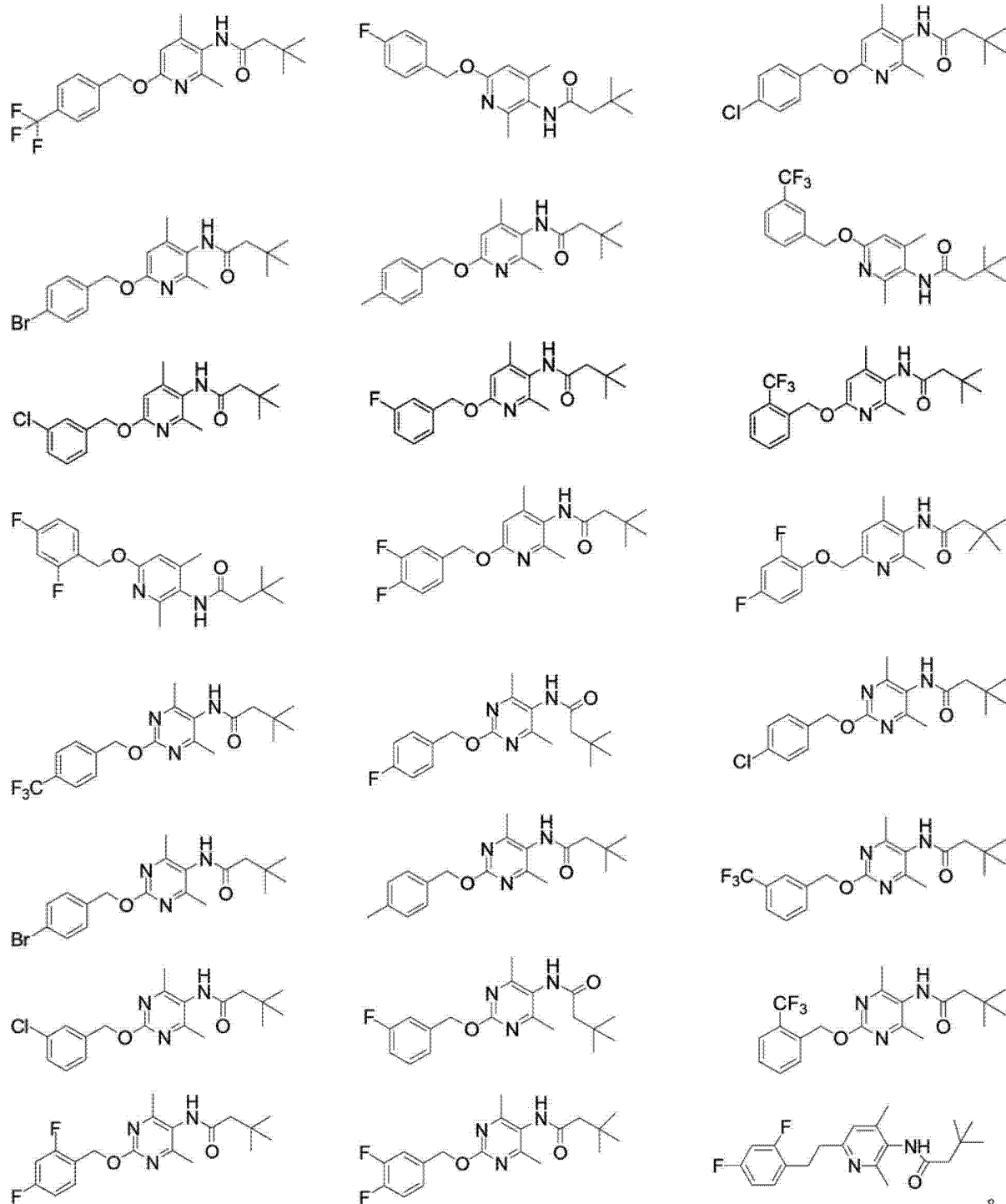
6. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 Z^1 或 Z^2 各自独立地为 O 或 CH_2 , 且 Z^1 和 Z^2 不同时为 O。

7. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 Z^3 为 CH_2 。

8. 根据权利要求 1 所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中 X 或 Y 各自独立地为 N 或 CH, 且 X 和 Y 不同时为 CH。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐, 其中化合物选

自：



10. 权利要求 1-8 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗受电压门控钾通道的激活影响的疾病或病症,或用于提高哺乳动物中 KCNQ2/3 通道的通道开放率。

11. 权利要求 1-8 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐在制备预防或治疗癫痫病、炎症性疼痛或神经性疼痛药物中的用途。

12. 一种药物组合物,其包括治疗有效量的权利要求 1-8 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

作为钾通道调节剂的化合物

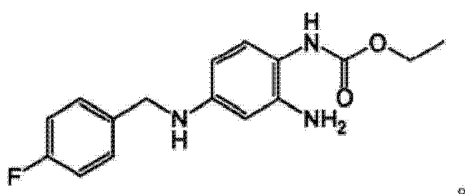
技术领域

[0001] 本发明涉及一类调节钾通道的化合物，该化合物对治疗和预防受钾离子通道的活性影响的疾病和病症有效果。

背景技术

[0002] 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 ($[I_{K(M)}]$) 是其主要的作用机制。瑞替加滨化学结构式为：

[0003]



[0004] KCNQs 是电压依赖性非失活钾通道家族成员。目前已知的 KCNQ 家族的基因共有 5 个，依照发现顺序分别命名为 KCNQ1-5，均编码钾离子通道亚单位。其中 KCNQ2 和 KCNQ3 在新皮层和海马广泛共同表达，它们的基因突变可导致家族性新生儿惊厥 (benign familial neonatal convulsions)。KCNQ2 和 KCNQ3 组成的异多聚体离子通道，是神经系统中 M 型钾电流的分子基础。而 M 型钾电流与维持膜电位稳定和细胞兴奋性关系密切。M 型钾电流 ($[I_{K(M)}]$) 是缓慢激活电压门控性 K^+ 通道的电流，属于阈下电压门控性 K^+ 电流。 $I_{K(M)}$ 通过控制动作电位的产生和频率，使细胞复极来调节神经元兴奋性。瑞替加滨的主要作用是提高 KCNQ2/3 亚基异聚体钾通道活性，增强 KCNQ2/3 通道的 K^+ 电流。(中国神经精神疾病杂志，2011, 37(2), 124-127)。对瑞替加滨的认识促进了在具有不同结构特征的化合物中大量寻找其他钾通道调节剂的工作。

发明内容

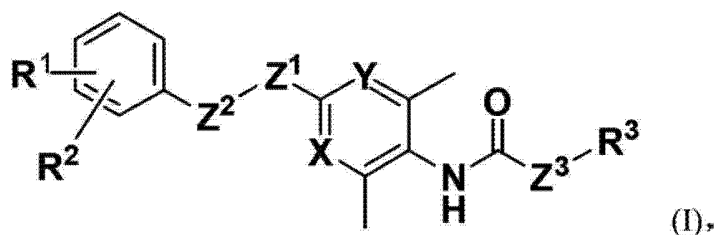
[0005] 本发明的目的是提供一类具有调节钾通道功能的化合物。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种上述化合物在医药方面的用途。

[0007] 本发明的目的可以通过以下措施达到：

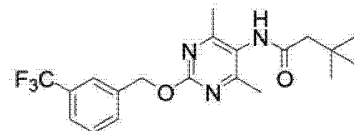
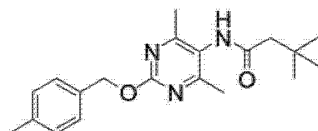
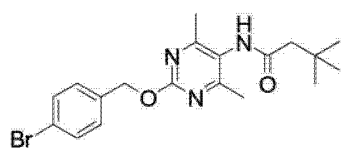
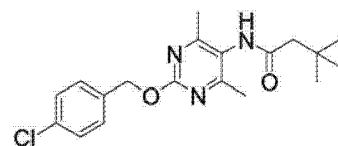
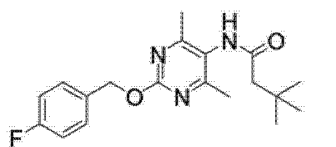
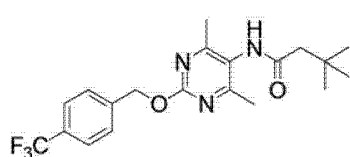
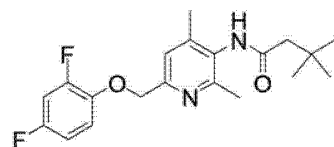
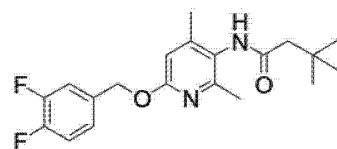
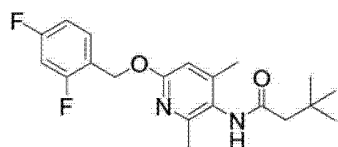
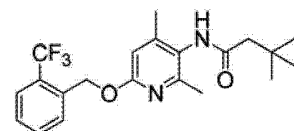
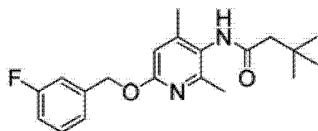
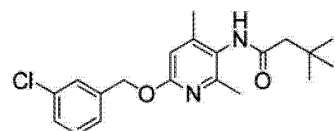
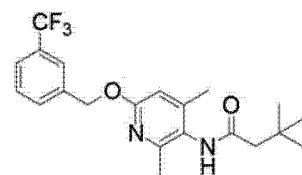
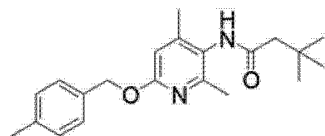
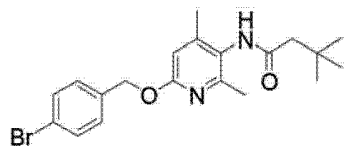
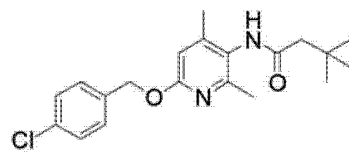
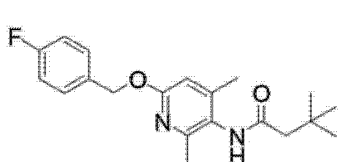
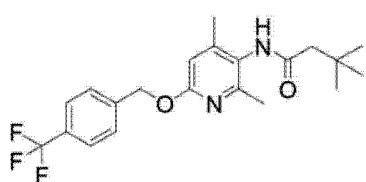
[0008] 式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐，

[0009]

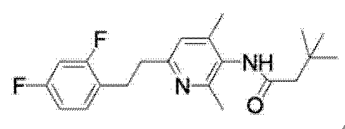
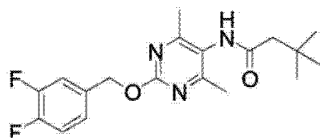
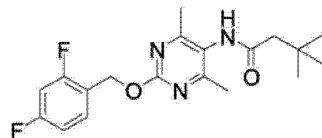
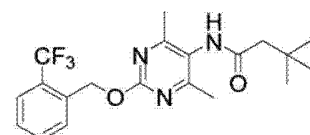
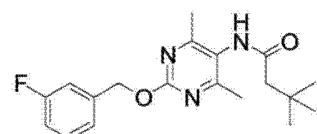
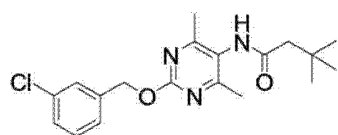


[0010] 其中，

- [0011] Z^1 和 Z^2 各自独立地选自 O、NH 或 CH_2 , 且 Z^1 和 Z^2 中至少一个为 CH_2 ;
- [0012] Z^3 为 O 或 $(\text{CH}_2)_n$;
- [0013] n 为 1-6 的整数;
- [0014] X 和 Y 各自独立地为 CH 或 N;
- [0015] R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基、 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基、 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 杂芳基或 $\text{C}_4\text{-C}_8$ 杂环基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基、 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基、 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 杂芳基或 $\text{C}_4\text{-C}_8$ 杂环基独立可选地被一个或多个选自卤素、氰基、硝基、氨基、羟基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基、 $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ 芳基、 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 杂芳基或 $\text{C}_4\text{-C}_8$ 杂环基的取代基所取代;
- [0016] R^3 选自 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基独立可选地被一个或多个选自卤素、氰基、硝基、氨基或羟基的取代基所取代。
- [0017] 在本发明的技术方案中,
- [0018] 优选地, R^1 和 R^2 可以各自独立地选自氢、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷氧基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烯基、 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 链烯基或 $\text{C}_2\text{-C}_6$ 炔基独立可选地被一个或多个选自卤素、氰基、硝基、氨基或羟基的取代基取代; 更优选地, R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基独立可选地被一个或多个选自卤素的取代基取代。
- [0019] R^1 进一步优选为氢、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基或卤代环丙基, 其最优选为氢、氟、氯、溴、甲基或三氟甲基。 R^2 进一步优选为氢、卤素、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 烷基、 $\text{C}_1\text{-C}_3$ 卤代烷基或卤代环丙基; 其最优选为氢、氟、氯、溴、甲基或三氟甲基。 进一步优选地, R^1 和 R^2 各自独立地选自氢、氟、氯、溴、甲基、三氟甲基、一个或多个卤素取代的甲基、乙基、一个或多个卤素取代的乙基、正丙基、一个或多个卤素取代的正丙基、异丙基、一个或多个卤素取代的异丙基、环丙基、一个或多个卤素取代的环丙基; 所述一个或多个卤素取代的甲基不包括三氟甲基。
- [0020] 优选地, R^3 选自 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基, 其中所述 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基、 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基独立可选地被一个或多个选自卤素、氰基、硝基、氨基或羟基的取代基取代。 更优选地, R^3 选自 $\text{C}_1\text{-C}_6$ 烷基或 $\text{C}_3\text{-C}_6$ 环烷基。 进一步优选地, R^3 选自甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基。 R^3 最优选为叔丁基。
- [0021] 优选地, Z^1 或 Z^2 各自独立地为 O 或 CH_2 , 且 Z^1 和 Z^2 不同时为 O。
- [0022] 优选地, Z^3 为 CH_2 。
- [0023] 优选地, X 或 Y 各自独立地为 N 或 CH, 且 X 和 Y 不同时为 CH。
- [0024] 在本发明的化合物或其药学上可接受的盐中, 特别优选选自下列化合物:
- [0025]



[0026]



[0027] 本发明中的术语除特别说明外,一般具有如下的含义。

[0028] 术语“烷基”表示具有所述数目之碳原子的直链或支链饱和烃基。术语“C₁-C₆ 烷基”是指具有 1-6 个碳原子的直链或支链饱和烃基。C₁-C₆ 烷基包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基、新戊基、正己基、异己基、2, 2- 二甲基丁基和 2, 3- 二甲基丁基等。术语“C₁-C₃ 烷基”是指具有 1-3 个碳原子的直链或支链饱和烃基。

[0029] 术语“烷氧基”表示 O-烷基。术语“C₁-C₆ 烷氧基”是指具有 O-C₁-C₆ 烷基。

[0030] 术语“卤素”为氟、氯、溴或碘。优选为氟、氯、溴。

[0031] 术语“卤代烷基”表示具有一个以上(包含一个)卤素取代基的烷基。

[0032] 术语“环烷基”表示全部为碳原子的饱和的单环或多环的环结构。术语“C₃-C₆ 环烷基”是指具有总共 3 至 6 个碳原子的饱和的单环或多环环结构。C₃-C₆ 环烷基包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基。

[0033] 术语“环烯基”是指具有至少一个环碳碳双键的单环或多环烷基取代基。术语“C₃-C₆ 环烯基”是指 3 至 6 个碳原子的环烯基。C₃-C₆ 环烯基包括但不限于环戊烯基、环丁烯基。

[0034] 术语“C₂-C₆ 链烯基”是指具有一个或多个碳碳双键并具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链烃基团。

[0035] 术语“C₂-C₆ 炔基”是指具有一个或多个碳碳三键并具有 2 至 6 个碳原子的直链或支链烃基团。

[0036] 术语“C₆-C₁₀ 芳基”表示 6 到 10 个碳原子的全碳单环或稠合多环基团,具有完全共轭的 π 电子系统。典型地包括但不限于苯环基、萘环基。

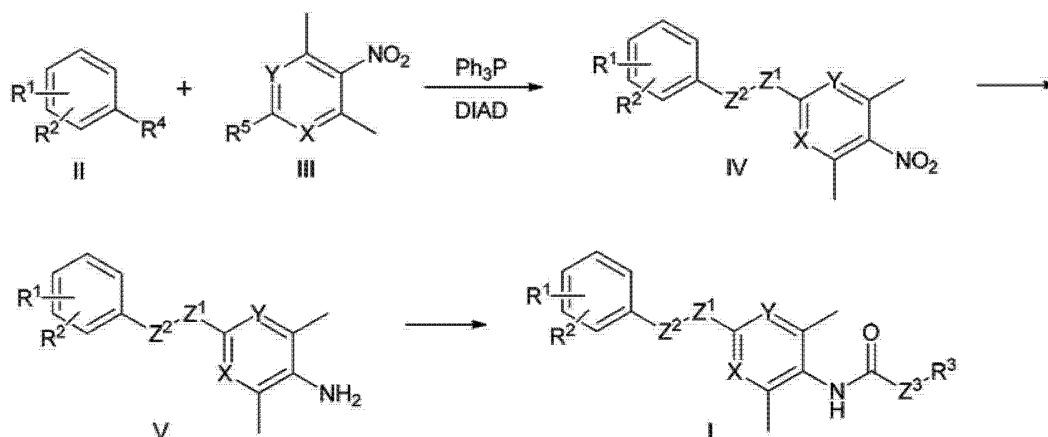
[0037] 术语“杂芳基”表示单环或稠合环基团,含有一个、两个、三个或四个选自 N、O 或 S 的环杂原子,其余环原子是 C,另外具有完全共轭的 π 电子系统。术语“C₃-C₁₀”杂芳基是指在其环中含有 3 至 10 个碳原子的杂芳基。C₃-C₁₀ 杂芳基包括但不限于吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、嘧啶、吡啶。

[0038] 术语“杂环基”即杂环烷基,表示含 1 个或多个 N、O 或 S 的杂原子的单环或稠合的环。术语“C₄-C₈ 杂环基”是指在其环中含有 4 至 8 个碳原子的杂环基。C₄-C₈ 杂环基包括但不限于哌嗪子基、吗啉代基、哌啶子基、吡咯烷基等。

[0039] “药学上可接受的盐”指的是本发明化合物的酸式盐或碱式盐,所述盐具有期望的药学活性并且在生物学上和在其他方面的均没有不合要求之处。酸式盐包括无机酸盐和有机酸盐。无机酸包括但不限于盐酸、硫酸、磷酸、甲磺酸,有机酸包括但不限于乙酸、三氯乙酸、丙酸、丁酸、马来酸、对甲苯磺酸、苹果酸、丙二酸、肉桂酸、柠檬酸、富马酸、樟脑酸、二葡萄糖酸、天冬氨酸、酒石酸,本发明化合物的药学上可接受的盐优选采用无机酸盐。

[0040] 本发明式 I 化合物的制备方法:

[0041]



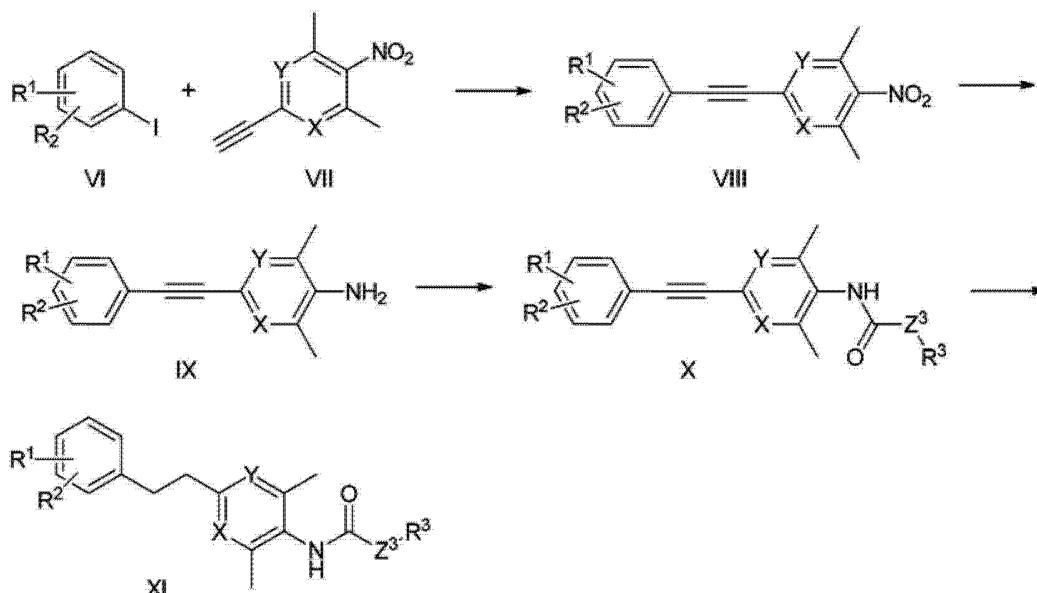
[0042] (a) R¹, R², R³, Z³, X, Y 的定义同式(I)结构中所述。Z¹ 和 Z² 各自独立地选自 O、NH 或 CH₂, 且 Z¹ 和 Z² 中有一个为 CH₂。R⁴ 为 CH₂OH, R⁵ 为 OH 或 NH₂; 或者, R⁴ 为 OH 或 NH₂, R⁵ 为

CH₂OH。

[0043] 式(II)化合物与式(III)化合物在三苯基膦和偶氮二羧基二异丙酯的存在下,发生 Mitsunobu 反应,得到式(IV)化合物。式(IV)化合物在锌粉、连二亚硫酸钠或者硫代硫酸钠等还原剂的作用下硝基还原为氨基,得到式(V)化合物。式(V)化合物与相应的酰氯反应,得到式(I)化合物。

[0044] 式(I)化合物可以使用盐酸乙醚溶液酸化,直接获得其盐酸盐。

[0045]



[0046] (b) R¹, R², R³, Z³, X, Y 的定义同式(I)结构中所述。式(VI)化合物与式(VII)化合物在碘化亚铜、双三苯基膦氯化钯的作用下发生 Sonogashira 偶联反应,得到式(VIII)化合物。式(VIII)化合物被连二亚硫酸钠等还原剂还原得到式(IX)化合物。式(IX)化合物与相应酰氯反应得到式(X)化合物。式(X)化合物经钯碳催化氢化得到式(XI)化合物。

[0047] 本发明还提供了一种式(I)化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于治疗或预防受 M 型钾电流的增强影响的疾病或病症。

[0048] 本发明还提供了一种式(I)化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于预防或治疗受电压门控钾通道的激活影响的疾病或病症。所述疾病或病症优选地为癫痫病、炎症性疼痛或神经性疼痛。

[0049] 本发明还提供了一种式(I)化合物或其药学上可接受的盐在制备药物中的用途,所述药物用于提高哺乳动物中 KCNQ2/3 通道的通道开放率。

[0050] 本发明还提供了一种药用组合物,所述组合物包含治疗有效量的式(I)化合物或其药学上可接受的盐,以及药学上可接受的载体。

[0051] 药用组合物的目的是促进化合物对生物体的给药。

[0052] 治疗有效量,可以是在某种程度上缓解对象中的疾病或病症的一种或多种症状、使与疾病或病症相关或是其病因的一种或多种生理或生物化学参数部分或完全恢复正常、和/或降低疾病或病症的发作可能性的量。

[0053] 药学上可接受的载体指的是对有机体不引起明显的刺激性和不干扰所给予化合物的生物活性和性质的赋形剂或稀释剂。

[0054] 赋形剂指的是加入到药用组合物中以进一步便于给予化合物的惰性物质。赋形剂的实例包括(不局限于) 碳酸钙、磷酸钙、多种糖类和多种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0055] 本文中术语“钾通道调节剂”指能够引起钾通道电流增加的化合物。它也指能够增加 KCNQ2/3 通道开放率的化合物。

[0056] 术语“药学上可接受的盐”表示保留母体化合物的生物有效性和性质的那些盐。这类盐包括：

[0057] (1) 与酸成盐,通过母体化合物的游离碱与无机酸或有机酸的反应而得；

[0058] (2) 存在于母体化合物中的酸性质子被金属离子代替或者与有机碱配位化合所生成的盐。

[0059] 本发明中所述化合物或其药学上可接受的盐可以通过电生理实验、铯流实验、原子吸收 Rb^+ 流出高通量测定实验等方法检测其药理活性。

[0060] 膜片钳技术被称为研究离子通道的“金标准”，是离子通道功能学研究最重要的技术。膜片钳技术运用微玻管电极接触细胞膜，以千兆欧姆以上的阻抗使之对接，使与电极尖开口处相接的细胞膜小片区域(膜片) 与其周围在电学上分隔，在此基础上固定电位，对此膜片上的离子通道的离子电流进行检测记录。运用膜片钳技术对 KCNQ 钾通道调节剂进行功能学验证。

[0061] 铯流测定技术作为基于荧光的实验，在钾离子通道调节剂的高通量筛选中得到广泛的运用。铯流检测利用了 KCNQ 钾通道对铯离子的通透性，通过检测铯流入的浓度来测定钾通道的开放或关闭。当通道刺激开放以后，铯离子从细胞外的溶液进入到细胞内，和细胞内铯敏感性的染料结合，通过荧光信号检测铯离子的跨膜流动，用于筛选钾通道的调节剂。

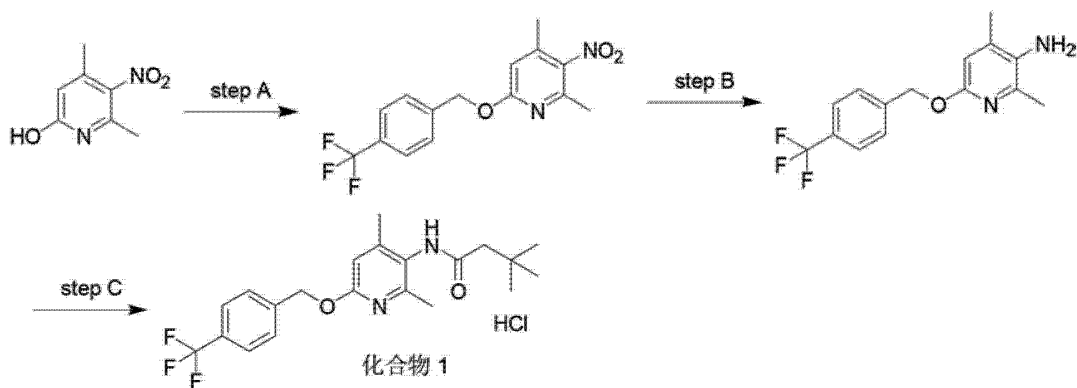
[0062] 原子吸收 Rb^+ 流出测定技术在钾离子通道调节剂的高通量筛选中更加快速、可靠，并且具有直接反映离子通道活性及调节剂调节作用的特点。 Rb^+ 与 K^+ 有相近的原子大小，并且钾离子通道对于 Rb^+ 具有通透性，可以通过检测 Rb^+ 流出的浓度来测定钾通道的开放或关闭。 Rb^+ 在 780nm 有特异的原子吸收，可以通过原子吸收的方法检测 Rb^+ 浓度。故可以采用原子吸收光谱测定法通过测定 Rb^+ 流出的高通量测定技术用于筛选钾通道的开放剂或阻断剂。

具体实施方式

[0063] 下面通过非限定性实施例来对本发明进行说明，应当理解为，此处描述的优选实施例仅用于说明和解释本发明，并不用于限定本发明。

[0064] 实施例 1 N- (6- (4- 三氟苄氧基) -2, 4- 二甲基 -3- 基) -3, 3- 二甲基丁酰胺盐酸盐

[0065]



[0066] 6-(4-三氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 1A)

[0067] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-吡啶(174mg, 1.03mmol), 4-三氟甲基苄醇(219mg, 1.24mmol) 及三苯基膦(380mg, 1.45mmol) 溶于 10mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯(314mg, 1.55mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 2 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=20:1 纯化得到化合物 1A, 白色固体(300mg, 96% 收率)。MS: 327 (M+H)⁺。

[0068] 6-(4-三氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物 1B)

[0069] 化合物 1A (300mg, 0.92mmol)、氯化铵(197mg, 3.68mmol) 和 锌粉(241mg, 3.68mmol) 溶于 50mL 甲醇及 10mL 水中, 70℃ 反应 1 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 1B, 直接用于下一步反应(215mg, 80% 收率)。

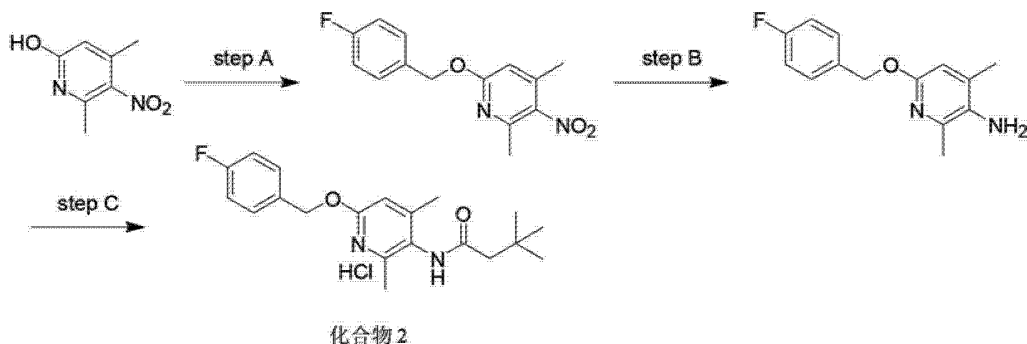
[0070] N-(6-(4-三氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 1)

[0071] 氢化钠(35mg, 0.88mmol) 于 0℃ 加至化合物 1B (215mg, 0.73mmol) 的 10mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.12mL, 0.88mmol), 室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物 1C, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 1 的盐酸盐, 为白色固体(80mg, 29% 收率)。

[0072] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ: 7.62 (d, J=7.6Hz, 2H), 7.55 (d, J=7.6Hz, 2H), 6.62 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.40 (s, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.29 (s, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.15 (s, 9H)。

[0073] 实施例 2 N-(2,4-二甲基-6-(3-三氟甲基)苯甲氧基吡啶)-3-基-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0074]



[0075] 2,4-二甲基-6-(4-氟苄氧基)-3-硝基吡啶的制备(化合物 2A)

[0076] 将 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基吡啶(350mg, 2.08mmol) 溶于 10mL 干燥的四氢呋喃溶液中, 氮气保护下依次加入 4-氟苄醇(297mg, 2.36mmol), 三苯基膦(1.03g, 3.93mmol), 降温至 0℃, 缓慢滴加偶氮二羧基二异丙酯(794mg, 3.93mmol)。滴加完毕后, 室温搅拌三小时。旋干四氢呋喃, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=20:1 过柱纯化得到化合物 2A, 白色固体(460mg, 86% 收率)。

[0077] 2,4-二甲基-6-(4-氟苄甲氧基)-3-氨基吡啶的制备(化合物 2B)

[0078] 化合物 2A (460mg, 1.70mmol) 与连二亚硫酸钠(2.32g, 13.32mmol) 溶于 10mL 甲醇及 1mL 水中, 于封管中 90℃ 反应 3 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 2B, 直接用于下一步反应(410mg, 100% 收率)。MS: 247.5 (M+H⁺)。

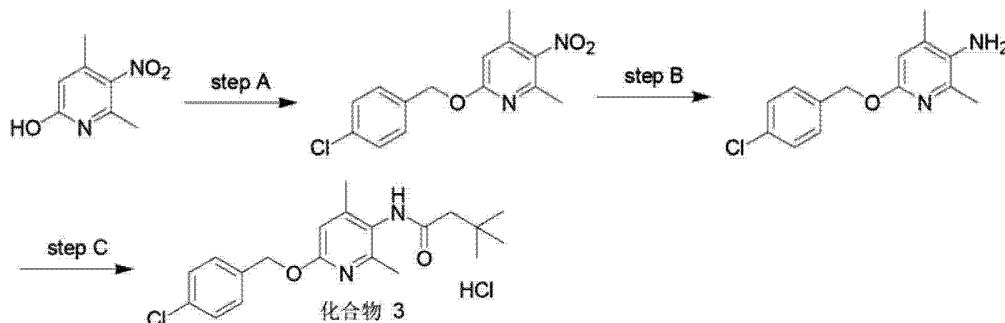
[0079] N-(2,4-二甲基-6-(3-三氟甲基)苄甲氧基吡啶)-3-基-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 2)

[0080] 氢化钠(100mg, 2.50mmol) 于 0℃ 加至化合物 2B (410mg, 1.66mmol) 的 20mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 1 小时, 降温至 0℃, 滴加 3,3-二甲基丁酰氯(448mg, 3.33mmol), 该反应液继续室温搅拌 1 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=30:1 过柱纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 2 的盐酸盐, 为白色固体(145mg, 23% 收率)。MS: 345.7 (M+H⁺)。

[0081] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ : 9.31 (brs, 1H), 7.50-7.53 (m, 2H), 7.19-7.24 (t, J₁=8.8Hz, J₂=9.2Hz, 2H), 6.74 (brs, 1H), 5.31 (s, 2H), 2.29 (s, 3H), 2.23 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.04 (s, 9H)。

[0082] 实施例 3 N-(6-(4-氯)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0083]



[0084] 6-(4-氯)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 3A)

[0085] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-吡啶(336mg, 2.0mmol), 4-氯苄醇(342mg, 2.4mmol) 及三苯基膦(681mg, 2.6mmol) 溶于 20mL 四氢呋喃中, 偶氮二羧基二异丙酯(606mg, 3.0mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 2 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=20:1 纯化得到化合物 3A, 白色固体(191mg, 33% 收率)。MS: 293 [M+H]⁺。

[0086] 6-(4-氯)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物 3B)

[0087] 化合物 3A (191mg, 0.65mmol) 与氯化铵(139mg, 2.6mmol) 和锌粉(170mg, 2.6mmol) 溶于 10mL 甲醇及 1mL 水中, 70℃ 反应 1 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 3B, 直接用于下一步反应(120mg, 70% 收率)。

[0088] N-(6-(4-氯)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物

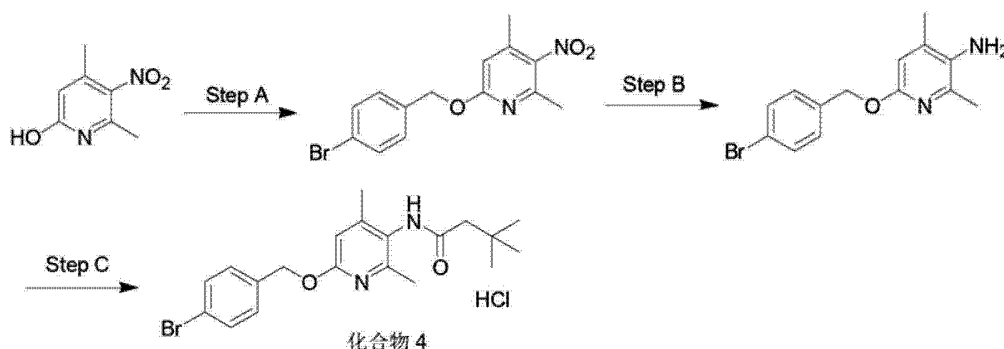
3)

[0089] 氢化钠(20mg, 0.51mmol)于0℃加至化合物 3B (120mg, 0.46mmol) 的 5mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3, 3-二甲基丁酰氯(68mg, 0.51mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 =5:1 纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 3 的盐酸盐, 为白色固体(40mg, 24% 收率)。

[0090] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{CDCl}_3\text{-d}_1$) δ : 7.40 (d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 7.33 (d, $J=8.0\text{Hz}$, 2H), 6.77 (s, 1H), 6.55 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.31 (s, 2H), 2.21 (s, 3H), 1.15 (s, 9H).

[0091] 实施例 4 N-(6-(4-溴苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0092]



[0093] 6-(4-溴苄氧基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 4A)

[0094] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-吡啶(600mg, 3.57mmol), 4-溴苄醇(0.8g, 4.29mmol) 及三苯基膦(1.87g, 7.14mmol) 溶于 50mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯(1.4mL, 7.14mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 =20:1 纯化得到化合物 4A, 白色固体(440mg, 37% 收率)。MS: 282.7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0095] 6-(4-溴苄氧基)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物 4B)

[0096] 化合物 4A (440mg, 1.3mmol) 与硫代硫酸钠(1.82g, 10.5mmol) 溶于 26mL 甲醇及 2.6mL 水中, 于封管中 90℃ 反应 4 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 4B, 直接用于下一步反应(390mg, 97% 收率)。

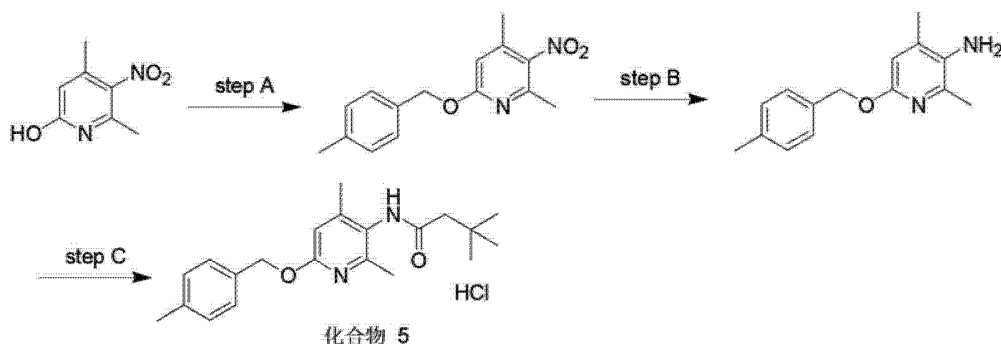
[0097] N-(6-(4-溴苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 4)

[0098] 氢化钠(100mg, 2.55mmol)于0℃加至化合物 4B(390mg, 1.27mmol)的 40mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3, 3-二甲基丁酰氯(0.35mL, 2.55mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 =1:1 纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 4 的盐酸盐, 为白色固体(300mg, 58% 收率)。MS: 405.7 $(\text{M}+\text{H}^+)$ 。

[0099] $^1\text{H NMR}$ (400MHz, DMSO-d_6) δ : 9.31 (brs, 1H), 7.58 (d, $J=6.4\text{Hz}$, 2H), 7.42 (d, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 6.74 (brs, 1H), 5.31 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.15 (s, 2H), 1.04 (s, 9H).

[0100] 实施例 5 N-(6-(4-甲基苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0101]



[0102] 6-(4-甲基苄氧基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 5A)

[0103] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-吡啶(400mg, 2.38mmol), 4-甲基苄醇(0.35g, 2.85mmol) 及三苯基膦(1.25g, 4.76mmol) 溶于 50mL 四氢呋喃中, 偶氮二羧基二异丙酯(0.92mL, 4.76mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 = 20:1 纯化得到化合物 1A, 白色固体(330mg, 51% 收率)。MS: 273[M+H]⁺。

[0104] 6-(4-甲基苄氧基)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物 5B)

[0105] 化合物 1A (320mg, 1.12mmol) 与硫代硫酸钠(1.64g, 9.40mmol) 溶于 26mL 甲醇及 2.6mL 水中, 于封管中 90℃ 反应 4 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 1B, 直接用于下一步反应(208mg, 73% 收率)。

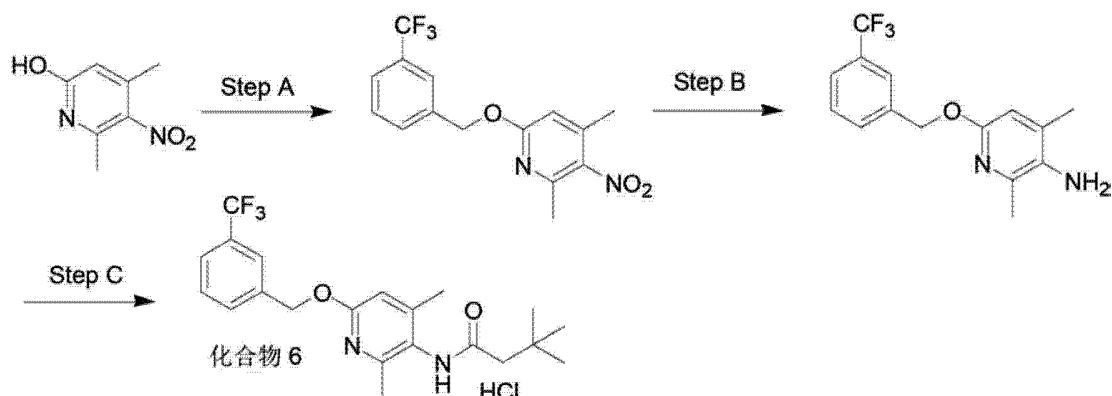
[0106] N-(6-(4-甲基苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 5)

[0107] 氢化钠(39.6mg, 1.65mmol) 于 0℃ 加至化合物 1B(200mg, 0.83mmol) 的 40mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3,3-二甲基丁酰氯(442.6mg, 3.30mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 = 1:1 纯化得到化合物 5C, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 5C 的盐酸盐, 为白色固体(150mg, 61% 收率)。MS: 340.5(M+H⁺)。

[0108] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 9.36-9.33(brs, 1H), 7.35-7.33(d, J=8Hz, 2H), 7.20-7.18(d, J=8.0Hz, 2H), 6.80-6.78(brs, 1H), 5.29(s, 2H), 2.306-2.288(s, 6H), 2.28-2.20(s, 3H), 2.142-2.125(s, 2H), 1.08-1.02(s, 9H)。

[0109] 实施例 6 N-(2,4-二甲基-6-(3-三氟甲基)苯甲氧基吡啶)-3-基-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0110]



[0111] 2,4-二甲基-6-(3-三氟甲基苄氧基)-3-硝基吡啶的制备(化合物 6A)

[0112] 将 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基吡啶(350mg, 2.08mmol)溶于 15mL 干燥的四氢呋喃溶液中,氮气保护下依次加入 3-三氟甲基苄醇(0.44g, 2.50mmol),三苯基膦(1.09g, 4.16mmol),降温至 0℃,缓慢滴加偶氮二羰基二异丙酯(0.84mg, 4.16mmol)。滴加完毕后,室温搅拌三小时。旋干四氢呋喃,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=30:1 过柱纯化得到化合物 6A,白色固体(589mg, 86% 收率)。

[0113] 2,4-二甲基-6-(3-三氟甲基苄氧基)-3-氨基吡啶的制备(化合物 6B)

[0114] 化合物 6A (586mg, 1.80mmol)与连二亚硫酸钠(2.05g, 11.77mmol)溶于 20mL 甲醇及 2mL 水中,于封管中 90℃反应 3 小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,得到化合物 6B,直接用于下一步反应(809mg, 100% 收率)。MS: 297.5 (M+H⁺)。

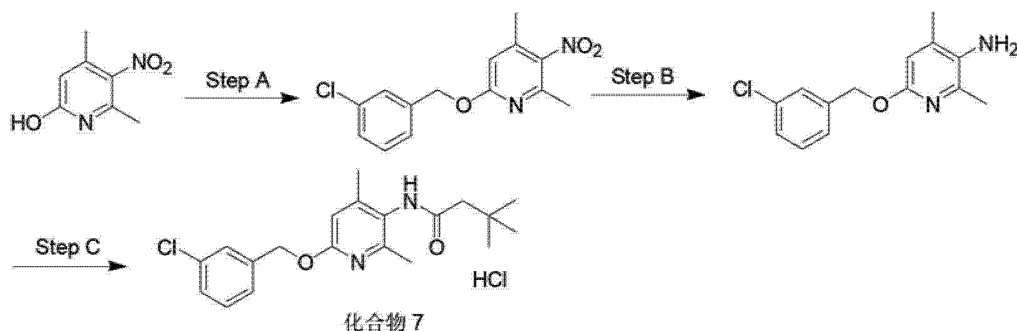
[0115] N-(2,4-二甲基-6-(3-三氟甲基)苄氧基吡啶)-3-基-3,3-二甲基丁酰胺酸盐的制备(化合物 6)

[0116] 氢化钠(107mg, 2.68mmol)于 0℃加至化合物 6B (530mg, 1.79mmol)的 10mL 四氢呋喃溶液中,室温搅拌 1 小时,降温至 0℃,滴加 3,3-二甲基丁酰氯(482mg, 3.58mmol),该反应液继续室温搅拌 3 小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=5:1 过柱纯化得到化合物,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 6C 的盐酸盐,为白色固体(150mg, 19% 收率)。MS: 395.8 (M+H⁺)。

[0117] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 9.29(s, 1H), 7.85(s, 1H), 7.78(d, J=3.8Hz, 1H), 7.70(d, J=7.6Hz, 1H), 7.63-7.65(m, 1H), 6.75(s, 1H), 5.42(s, 2H), 2.28(s, 3H), 2.23(s, 2H), 2.15(s, 3H), 1.06(s, 9H)。

[0118] 实施例 7 N-(6-(3-氯苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0119]



[0120] 6-(3-氯苄氧基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 7A)

[0121] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-吡啶(600mg, 3.57mmol), 3-氯苄醇(0.5mL, 4.29mmol) 及三苯基膦(1.87g, 7.14mmol) 溶于 50mL 四氢呋喃中, 偶氮二羧基二异丙酯(1.4mL, 7.14mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1 纯化得到化合物 7A, 白色固体(540mg, 52% 收率)。

[0122] 6-(3-氯苄氧基)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物 7B)

[0123] 化合物 7A (540mg, 1.73mmol) 与硫代硫酸钠(2.4g, 13.8mmol) 溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中, 于封管中 90℃ 反应 4 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 7B, 直接用于下一步反应(450mg, 93% 收率)。

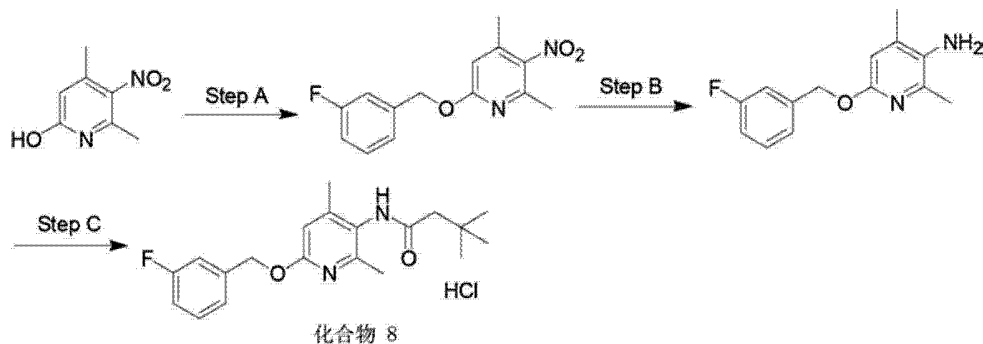
[0124] N-(6-(3-氯苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 7)

[0125] 氢化钠(132mg, 3.44mmol) 于 0℃ 加至化合物 7B(450mg, 1.72mmol) 的 40mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.48mL, 3.44mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用二氯甲烷/甲醇=30:1 纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 7 的盐酸盐, 为白色固体(170mg, 28% 收率)。MS: 361.7 (M+H⁺)。

[0126] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ : 9.49 (brs, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.42-7.44 (m, 3H), 6.89 (brs, 1H), 5.37 (s, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 2.19 (s, 2H), 1.06 (s, 9H)。

[0127] 实施例 8 N-(6-(3-氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0128]



[0129] 6-(3-氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 8A)

[0130] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-吡啶(600mg, 3.57mmol), 3-氟苄醇(0.54g, 4.28mmol) 及三苯基膦(1.87g, 7.14mmol) 溶于 20mL 四氢呋喃中, 偶氮二羧基二异丙酯(1.4mL, 7.14mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=20:1 纯化得到化合物 8A, 白色固体(450mg, 46% 收率)。

[0131] 6-(3-氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物 8B)

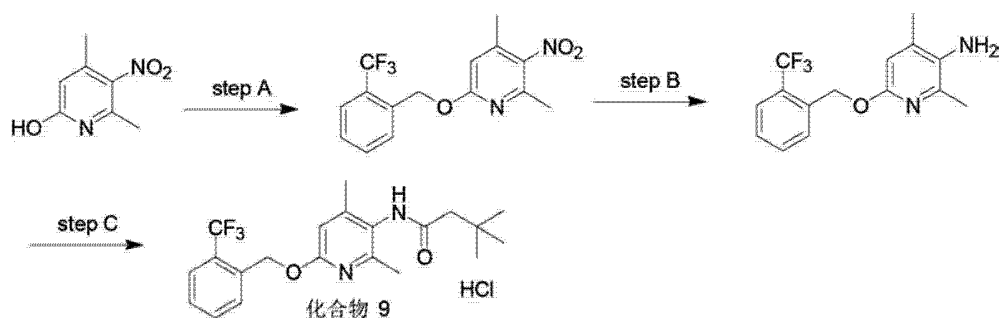
[0132] 化合物 8A (450mg, 1.63mmol) 与连二亚硫酸钠(2.27g, 13mmol) 溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中, 于封管中 90℃ 反应 4 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 8B, 直接用于下一步反应(270mg, 67% 收率)。

[0133] N-(6-(3-氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 8)

[0134] 氢化钠(53mg, 2.2mmol)于0℃加至化合物 8B (270mg, 1.1mmol)的 15mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 30 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3, 3-二甲基丁酰氯(0.61mL, 4.4mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 8 的盐酸盐, 为白色固体(264mg, 70% 收率)。MS: 345 (M+H)⁺. ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ : 9.21 (s, 1H), 7.43-7.40 (m, 1H), 7.30-7.26 (m, 2H), 7.15-7.14 (m, 1H), 6.68 (s, 1H), 5.34 (s, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.21 (s, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.06 (s, 9H).

[0135] 实施例 9 N-(6-(2-三氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0136]



[0137] 6-(2-三氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 9A)

[0138] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-吡啶(174mg, 1.03mmol), 2-三氟甲基苄醇(219mg, 1.24mmol)及三苯基膦(380mg, 1.45mmol)溶于 10mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯(314mg, 1.55mmol)于 0℃滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 2 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯=20:1 纯化得到化合物 9A, 白色固体(300mg, 96% 收率)。MS : 327 [M+H]⁺。

[0139] 6-(2-三氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物 9B)

[0140] 化合物 9A (143mg, 0.44mmol)与氯化铵(70mg, 1.32mmol)和锌粉(86mg, 1.32mmol)溶于 5mL 甲醇及 1mL 水中, 70℃反应 1 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 9B, 直接用于下一步反应(145mg, 100% 收率)。

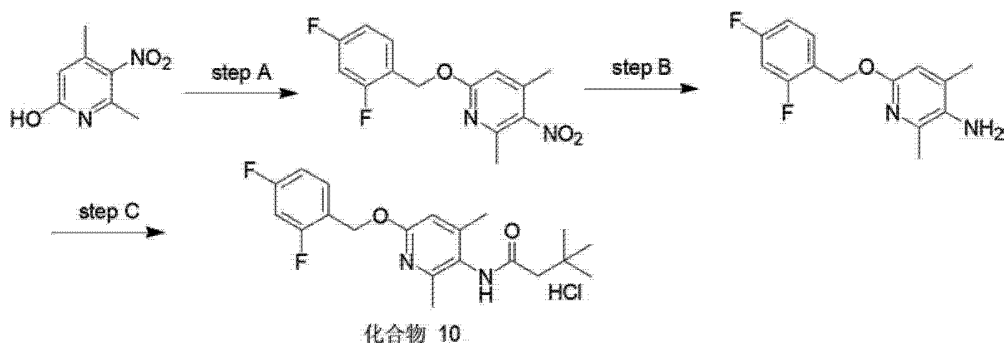
[0141] N-(6-(2-三氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 9)

[0142] 氢化钠(20mg, 0.5mmol)于 0℃加至化合物 9B (145mg, 0.5mmol)的 2mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3, 3-二甲基丁酰氯(0.07mL, 0.5mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 9 的盐酸盐, 为白色固体(50mg, 26% 收率)。

[0143] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ : 7.67 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.53 (t, J=7.6Hz, 2H), 7.39 (t, J=7.6Hz, 2H), 5.53 (s, 2H), 2.37 (s, 3H), 2.28 (s, 2H), 2.20 (s, 3H), 1.14 (s, 9H).

[0144] 实施例 10 N-(6-((2,4-二氟苄氧基)-2,4-二甲基吡啶-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0145]



[0146] 6-((2,4-二氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶(化合物 10A)

[0147] 将化合物 4,6-二甲基-5-硝基吡啶-2-羟基(600mg, 3.57mmol), 2,4-二氟苯甲醇(617mg, 4.29mmol) 和三苯基磷(1.9g, 7.14mmol) 溶于 50ml 四氢呋喃中。在 0℃ 滴加偶氮二甲酸乙丙酯(1.4mL, 7.14mmol)。反应液在室温搅拌反应 1 个小时。旋干四氢呋喃溶液。粗品经过柱色谱提纯(石油醚/乙酸乙酯=20:1) 得到化合物 10A, (550mg, 50% 产率)。

[0148] 6-((2,4-二氟苄氧基)-2,4-二甲基吡啶-3-胺(化合物 10B)

[0149] 化合物 10A (500mg, 1.7mmol), 锌粉(331mg, 5.1mmol), 和氯化铵(276mg, 5.1mmol) 溶于 20ml 甲醇中, 70℃ 回流反应 2 小时。反应结束, 过滤反应液, 滤液旋干。粗品经过柱色谱提纯(石油醚/乙酸乙酯=80:1) 得到化合物 10B, 白色固体(220mg, 67% 产率)。

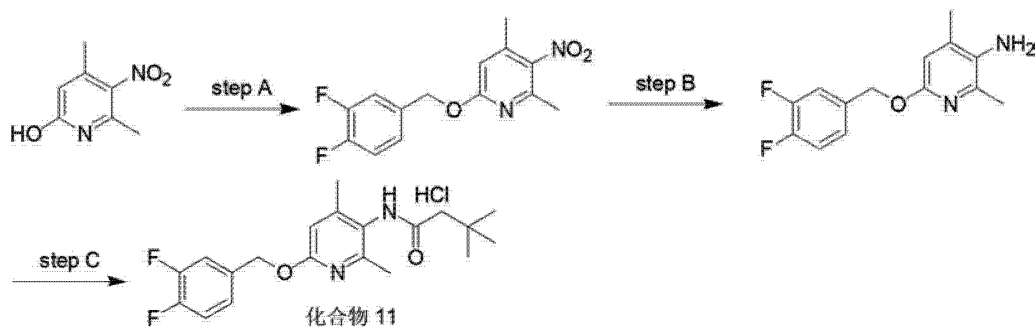
[0150] N-(6-((2,4-二氟苄氧基)-2,4-二甲基吡啶-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐(化合物 10)

[0151] 含量 60% 的氢化钠(33.3mg, 0.83mmol) 在 0℃ 时加入到化合物 10B (200mg, 0.76mmol) 的四氢呋喃溶液中, 该混合物室温搅拌 40 分钟, 然后 3,3-二甲基叔丁酰氯(116ul, 0.83mmol) 在 0℃ 被滴加入以上的混合液中。反应液进一步室温搅拌反应 2 小时。反应结束, 加入水, 用乙酸乙酯提取, 粗品经过柱色谱提纯(石油醚/乙酸乙酯=1:1) 得到化合物 1, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 10 的盐酸盐, 为白色固体, (250mg, 91% 产率)。MS: 363.2 (M+H⁺)。

[0152] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ: 9.31 (brs, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 6.71 (s, 1H), 5.33 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.22 (s, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.06 (s, 9H)。

[0153] 实施例 11 N-(6-((3,4-二氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0154]



[0155] 6-((3,4-二氟苄氧基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 11A)

[0156] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-吡啶(336mg, 2.0mmol), 3,4-二氟苄醇(346mg, 2.4mmol) 及三苯基磷(681mg, 2.6mmol) 溶于 20mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯

(606mg, 3.0mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 2 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 = 50:1 纯化得到化合物 11A, 白色固体 (546mg, 93% 收率)。MS: 295[M+H]⁺。

[0157] 6-((3, 4-二氟苄氧基)-2, 4-二甲基-3-氨基吡啶)的制备(化合物 11B)

[0158] 化合物 11A (546mg, 1.86mmol) 与氯化铵 (298mg, 5.58mmol) 和锌粉 (365mg, 5.58mmol) 溶于 50mL 甲醇及 1mL 水中, 70℃ 反应 1 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 得到化合物 11B, 直接用于下一步反应 (444mg, 91% 收率)。

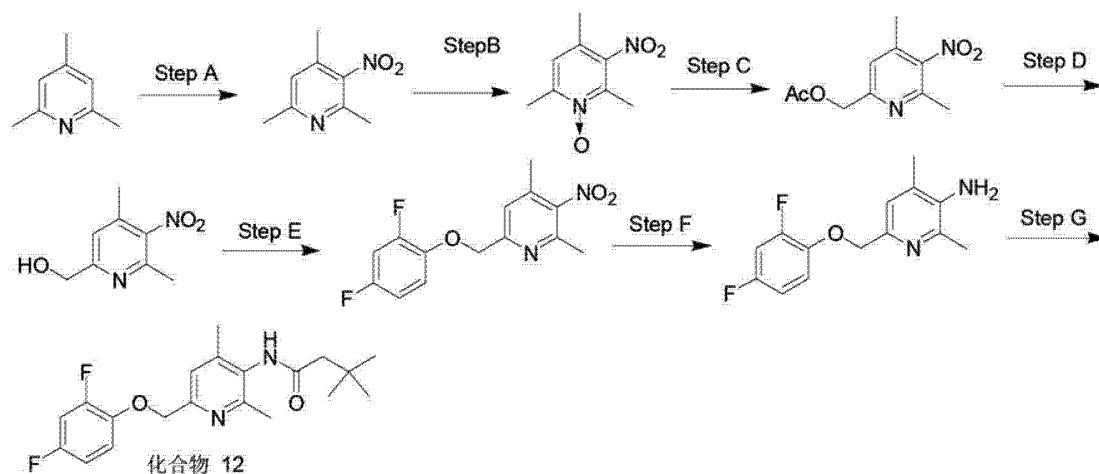
[0159] N-(6-((3, 4-二氟苄氧基)-2, 4-二甲基-3-基)-3, 3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 11)

[0160] 氢化钠 (74mg, 0.1.85mmol) 于 0℃ 加至化合物 11B (444mg, 1.68mmol) 的 10mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3, 3-二甲基丁酰氯 (249mg, 1.85mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 = 5:1 纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 11 的盐酸盐, 为白色固体 (150mg, 25%yield)。MS: 363[M+1]⁺。

[0161] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃-d₁) δ: 9.30 (s, 1H), 7.53-7.56 (m, 2H), 7.33-7.48 (m, 2H), 6.73 (s, 1H), 5.76 (brs, 1H), 5.31 (s, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.23 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 1.05 (s, 9H)。

[0162] 实施例 12 N-(6-((2, 4-二氟苄氧基)甲基)-2, 4-二甲基吡啶-3-)-3, 3-二甲基丁酰胺

[0163]



[0164] 2, 4, 6-三甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 12A)

[0165] 2, 4, 6-三甲基吡啶 (10mL, 75.6mmol) 于 0℃ 滴加到浓硫酸 (24mL) 与发烟硝酸 (8mL) 的混合液中, 加热回流 2h。反应完成后, 将反应液倾倒入冰水中, 氢氧化钾调节 pH 值至碱性, 水相乙酸乙酯萃取, 有机层无水 Na₂SO₄ 干燥, 减压旋干溶剂得到目标物, 为黄色固体 (10.6g, 84% 收率)。

[0166] N-氧代-2, 4, 6-三甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 12B)

[0167] 化合物 12A (3.4g, 0.02mol) 溶于 100mL 二氯甲烷中, 之后加入间氯过氧苯甲酸 (6.06g, 0.025mol), 反应液于室温搅拌 5h, 使用饱和碳酸氢钠溶液洗涤, 连二硫酸钠洗涤, 乙酸乙酯萃取, 有机层饱和食盐水洗, 干燥, 减压旋干溶剂得到目标化合物 (3.73g, 100% 收率)。

率)。

[0168] (4,6-二甲基-5-硝基吡啶-2-)乙酸甲酯的制备(化合物12C)

[0169] 化合物12B(3.73g,0.02mol)溶于100mL乙酸中回流4h,反应完成后,减压蒸去过量的溶剂,剩余物使用水洗,乙酸乙酯萃取,柱层析硅胶柱石油醚:乙酸乙酯=5:1分离纯化得到12C为固体(3.75g,66%收率)。

[0170] (4,6-二甲基-5-硝基吡啶-2-)甲醇的制备(化合物12D)

[0171] 化合物12C(3.75g,0.17mol)溶于10mL水中,加入氢氧化钾(1.83g,33.5mmol)溶于10mL水的溶液,反应液加热回流5h,减压旋干溶剂,加入水,乙酸乙酯萃取,1N HCl调节pH至中性,有机层使用柱层析硅胶柱石油醚:乙酸乙酯=5:1分离纯化得到12D为黄色液体(1.6g,53%收率)。

[0172] 6-((2,4-二氟苄氧基)甲基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物12E)

[0173] 化合物12D(800mg,4.98mmol),2,4-二氟苄醇(0.78g,5.97mmol)及三苯基膦(2.6g,9.96mmol)溶于50mL四氢呋喃中,偶氮二羧基二异丙酯(2mL,9.96mmol)于0℃滴加至该混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌3小时。旋干溶剂,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=2:1纯化得到化合物12E,白色固体(760mg,58%收率)。

[0174] 6-((2,4-二氟苄氧基)甲基)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物12F)

[0175] 化合物12E(760mg,2.59mmol)与连二亚硫酸钠(1.8g,10.3mmol)溶于30mL甲醇及3mL水中,于封管中90℃反应4小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,得到化合物12F,直接用于下一步反应(760mg,100%收率)。

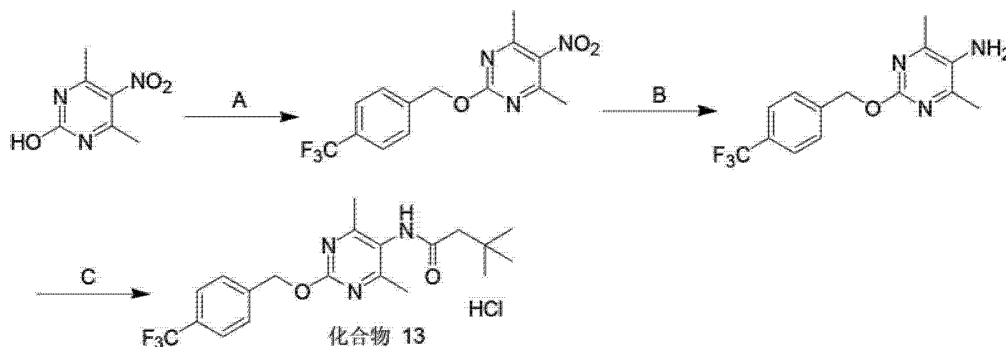
[0176] N-(6-((2,4-二氟苄氧基)甲基)-2,4-二甲基吡啶-3)-3,3-二甲基丁酰胺的制备(化合物12)

[0177] 氢化钠(230mg,5.76mmol)于0℃加至化合物12F(760mg,2.88mmol)的40mL四氢呋喃溶液中,室温搅拌40分钟后,降温至0℃,滴加3,3-二甲基丁酰氯(0.8mL,5.76mmol),该反应物继续室温搅拌2小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用制备高效液相色谱纯化得到化合物12为白色固体(100mg,10%收率)。

[0178] ^1H NMR(400MHz, DMSO- d_6) δ : 6.90-6.96(m, 2H), 6.78-6.79(m, 2H), 5.15(s, 2H), 2.50(s, 3H), 2.32(s, 2H), 2.27(s, 3H), 1.17(s, 9H)。

[0179] 实施例13 N-(2-(4-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0180]



[0181] 2-(4-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基嘧啶的制备(化合物13A)

[0182] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-嘧啶(300mg,1.78mmol),4-三氟甲基苄醇

(0.3mL, 2.14mmol) 及三苯基膦(0.93g, 3.55mmol) 溶于 50mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯(0.7mL, 3.55mmol) 于 0℃滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 = 10:1 纯化得到化合物 13A, 油状液体(490mg, 85% 收率)。MS : 327.9 [M+H]⁺。

[0183] 2-(4-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物 13B)

[0184] 化合物 13A (490mg, 1.5mmol) 与连二亚硫酸钠(2.09g, 12mmol) 溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中, 于封管中 90℃反应 4 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 粗品使用二氯甲烷 / 甲醇 = 10:1 纯化得到化合物 13B, 油状液体(210mg, 47% 收率)。

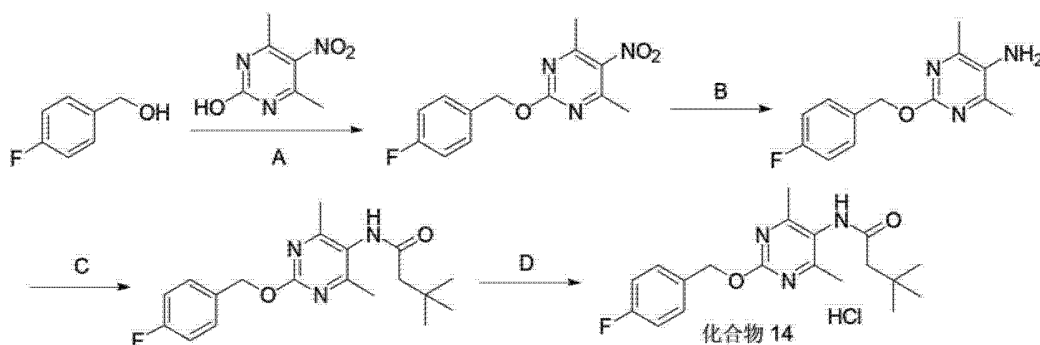
[0185] N-(2-(4-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 13)

[0186] 氢化钠(54mg, 1.4mmol) 于 0℃加至化合物 13B (210mg, 0.7mmol) 的 40mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.4mL, 2.8mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 = 1:1 纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 13 的盐酸盐, 为白色固体(160mg, 57% 收率)。MS: 396.7 (M+H⁺)。

[0187] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ : 7.55-7.61 (m, 4H), 7.28 (d, J=5.2Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 2.32 (s, 6H), 2.26 (s, 2H), 1.10 (s, 9H)。

[0188] 实施例 14 4N-(2-(4-氟苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0189]



[0190] 2-(4-氟苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基嘧啶的制备(化合物 14A)

[0191] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-嘧啶(300mg, 1.78mmol), 4-氟苄醇(0.23mL, 2.11mmol) 及三苯基膦(0.93g, 3.55mmol) 溶于 25mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯(0.7mL, 3.55mmol) 于 0℃滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯 = 10:1 纯化得到化合物 14A, 油状液体(437mg, 89% 收率)。

[0192] 2-(4-氟苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物 14B)

[0193] 化合物 14A (427mg, 1.54mmol) 与连二亚硫酸钠(2.15g, 12.3mmol) 溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中, 于封管中 90℃反应 4 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 用乙酸乙酯(3×20mL) 萃取滤液, 经减压蒸干后得粗品(287mg, 75% 收率)。

[0194] 4N-(2-(4-氟苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 14)

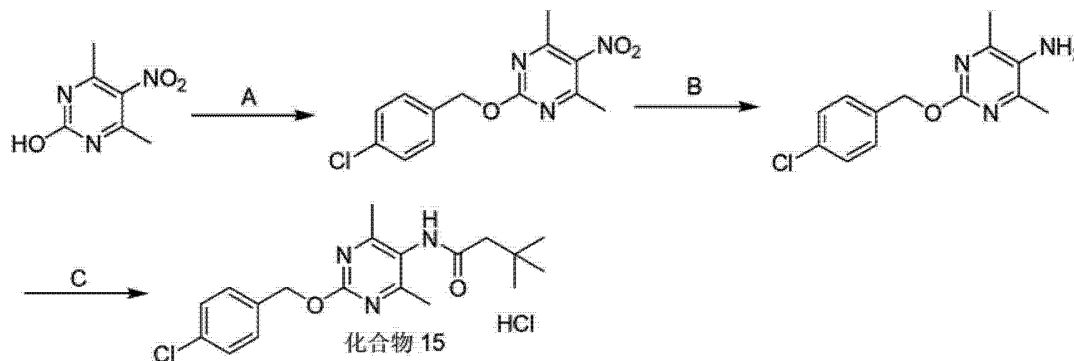
[0195] 氢化钠(53mg, 2.3mmol) 于 0℃加至化合物 14B (287mg, 1.16mmol) 的 10mL 四氢呋喃

喃溶液中,室温搅拌 30 分钟后,降温至 0℃,滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.645mL,4.65mmol),该反应物继续室温搅拌 2 小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到盐酸盐化合物,为白色固体(260mg,65% 收率)。

[0196] ^1H NMR(CDCl_3 , 400MHz): δ 7.49–7.46 (m, 2H), 7.08–7.03 (m, 2H), 6.78 (brs, 1H), 5.39 (s, 2H), 2.42 (s, 6H), 2.32 (s, 2H), 1.16 (s, 9H). MS: 346 ($\text{M}+\text{H}^+$).

[0197] 实施例 15 N-(2-(4-氯苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0198]



[0199] 2-(4-氯苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基嘧啶的制备(化合物 15A)

[0200] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-嘧啶(500mg,2.96mmol),4-氯苄醇(504mg,3.55mmol)及三苯基膦(930mg,3.55mmol)溶于 50mL 四氢呋喃中,偶氮二羰基二异丙酯(896mg,4.44mmol)于 0℃滴加至该混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1 纯化得到化合物 15A,油状液体(550mg,61% 收率)。MS: 294.1 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 。

[0201] 2-(4-氯苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物 15B)

[0202] 化合物 15A (550mg,1.88mmol)与硫代硫酸钠(2.38g,13.68mmol)溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中,于封管中 90℃反应 4 小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,粗品使用二氯甲烷/甲醇=10:1 纯化得到化合物 15B,油状液体(450mg,91% 收率)。

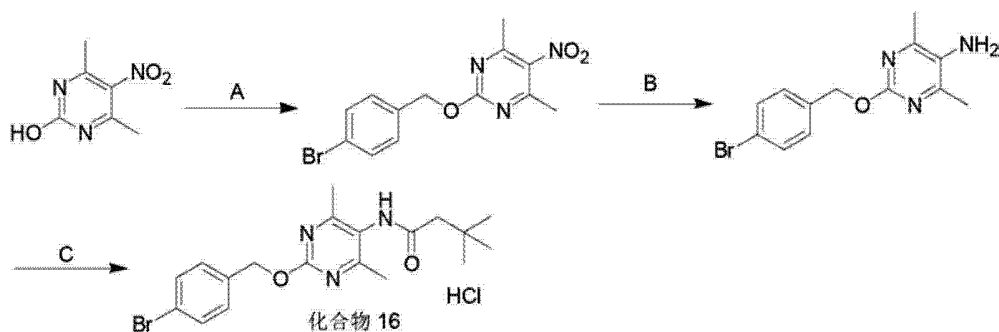
[0203] N-(2-(4-氯苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 15)

[0204] 氢化钠(84mg,1.96mmol)于 0℃加至化合物 15B (345mg,1.3mmol)的 10mL 四氢呋喃溶液中,室温搅拌 40 分钟后,降温至 0℃,滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.26mL,1.5mmol),该反应物继续室温搅拌 2 小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 15 的盐酸盐,为白色固体(350mg,75% 收率)。MS: 362.2 ($\text{M}+\text{H}^+$)。

[0205] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ : 9.54 (s, 1H), 7.78 (d, $J=8\text{Hz}$, 1H), 7.69–7.75 (m, 2H), 7.55–7.59 (m, 1H), 5.50 (s, 2H), 5.07 (s, 1H), 2.27 (s, 6H), 2.24 (s, 2H), 1.04 (s, 9H)。

[0206] 实施例 16 N-(2-(4-溴苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0207]



[0208] 2-(4-溴苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基咪唑的制备(化合物 16A)

[0209] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-咪唑(100mg, 0.59mmol), 4-溴苄醇(132mg, 0.71mmol) 及三苯基膦(186mg, 0.89mmol) 溶于 50mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯(180mg, 0.71mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1 纯化得到化合物 16A, 油状液体(168mg, 85% 收率)。MS: 338.0 [M+H]⁺。

[0210] 2-(4-溴苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基咪唑的制备(化合物 16B)

[0211] 化合物 16A (500mg, 1.48mmol) 与硫代硫酸钠(2.38g, 13.68mmol) 溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中, 于封管中 90℃ 反应 4 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 滤液经减压蒸干后, 粗品使用二氯甲烷/甲醇=10:1 纯化得到化合物 16B, 油状液体(455mg, 99% 收率)。

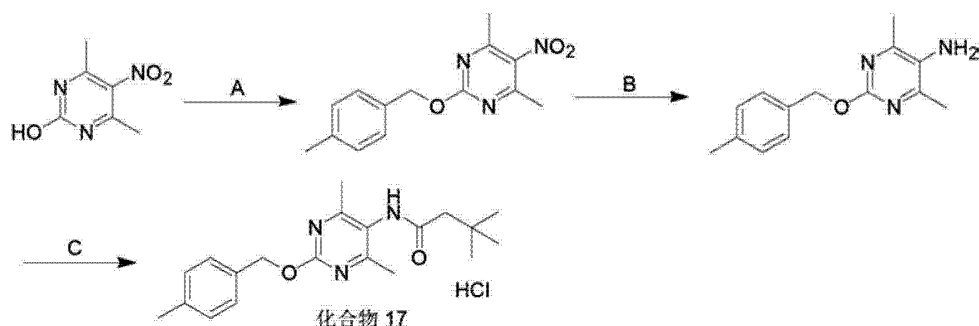
[0212] N-(2-(4-溴苄氧基)-4,6-二甲基-咪唑-5-基)-3,3'-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 16)

[0213] 氢化钠(36mg, 0.85mmol) 于 0℃ 加至化合物 16B(174mg, 0.57mmol) 的 40mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 40 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3,3'-二甲基丁酰氯(0.114mL, 0.85mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 16 的盐酸盐, 为白色固体(185mg, 73% 收率)。396.7 (M+H)⁺。

[0214] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ: 9.54 (s, 1H), 7.78 (d, J=8Hz, 1H), 7.69-7.75 (m, 2H), 7.55-7.59 (m, 1H), 5.50 (s, 2H), 5.07 (s, 1H), 2.27 (s, 6H), 2.24 (s, 2H), 1.04 (s, 9H)。

[0215] 实施例 17 N-(2-(4-甲基苄氧基)-4,6-二甲基-咪唑-5-基)-3,3'-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0216]



[0217] 2-(4-甲基苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基咪唑的制备(化合物 17A)

[0218] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-咪唑(300mg, 1.78mmol), 4-甲基苄醇(0.3mL, 2.14mmol) 及三苯基膦(0.93g, 3.55mmol) 溶于 50mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯

(0.7mL, 3.55mmol)于0℃滴加至该混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌3小时。旋干溶剂,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1纯化得到化合物17A,油状液体(350mg, 71.4%收率)。MS: 274.3[M+H]⁺。

[0219] 2-(4-甲基苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物17B)

[0220] 化合物17A(350mg, 1.26mmol)与硫代硫酸钠(1.75g, 10.08mmol)溶于30mL甲醇及3mL水中,于封管中90℃反应4小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,粗品使用二氯甲烷/甲醇=10:1纯化得到化合物17B,油状液体(180mg, 58%收率)。

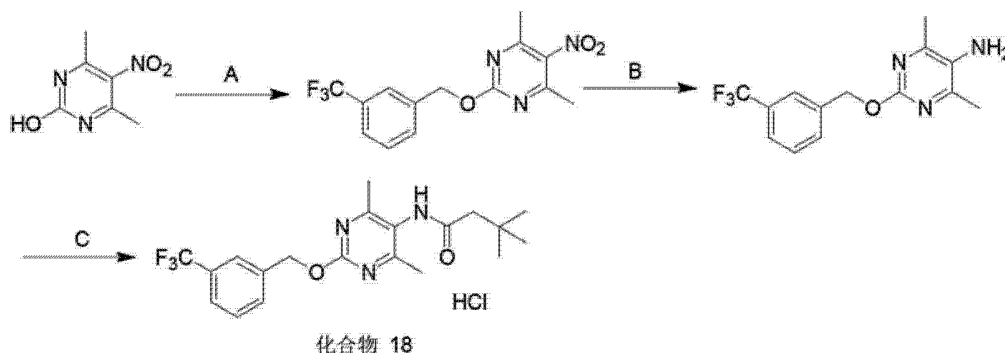
[0221] N-(2-(4-甲基苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物17)

[0222] 氢化钠(58mg, 1.46mmol)于0℃加至化合物17B(180mg, 0.73mmol)的40mL四氢呋喃溶液中,室温搅拌40分钟后,降温至0℃,滴加3,3-二甲基丁酰氯(0.38mL, 2.92mmol),该反应物继续室温搅拌2小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1纯化得到化合物,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物17的盐酸盐,为白色固体(170mg, 70%收率)。MS: 342(M+H)⁺。

[0223] ¹H NMR(400MHz, CDC13) δ: 7.39-7.37(d, J=8Hz, 2H), 7.18-7.16(d, J=8, 2H), 6.70(s, 1H), 5.38(s, 2H), 2.40(s, 6H), 2.36(s, 3H), 2.31(s, 2H), 1.04(s, 9H)。

[0224] 实施例18 N-(2-(3-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0225]



[0226] 2-(3-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基嘧啶的制备(化合物18A)

[0227] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-嘧啶(300mg, 1.78mmol), 3-三氟甲基苄醇(0.3mL, 2.14mmol)及三苯基膦(0.93g, 3.55mmol)溶于50mL四氢呋喃中,偶氮二羰基二异丙酯(0.7mL, 3.55mmol)于0℃滴加至该混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌3小时。旋干溶剂,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1纯化得到化合物18A,油状液体(500mg, 86%收率)。MS: 327.9[M+H]⁺。

[0228] 2-(3-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物18B)

[0229] 化合物18A(200mg, 0.61mmol)与硫代硫酸钠(0.85g, 4.88mmol)溶于12mL甲醇及1.2mL水中,于封管中90℃反应4小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,粗品使用二氯甲烷/甲醇=10:1纯化得到化合物18B,油状液体(180mg, 99%收率)。

[0230] N-(2-(3-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物18)

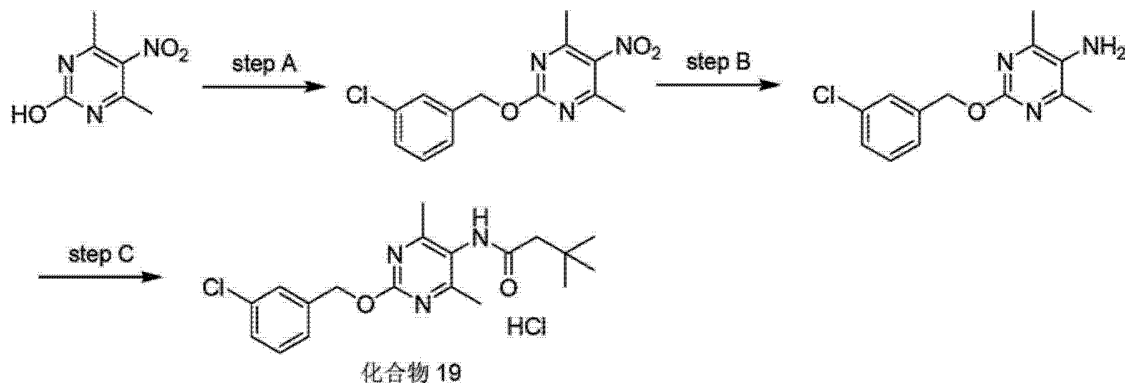
[0231] 氢化钠(186mg, 4.85mmol)于0℃加至化合物18B(360mg, 1.21mmol)的50mL四氢呋喃

喃溶液中,室温搅拌 40 分钟后,降温至 0℃,滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.67mL,4.85mmol),该反应物继续室温搅拌 2 小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 18 的盐酸盐,为白色固体(100mg,21% 收率)。MS:396.7 (M+H⁺)。

[0232] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ :7.75(s, 1H), 7.63(d, J=7.6Hz, 1H), 7.55(d, J=7.6Hz, 1H), 7.43-7.47(m, 2H), 5.41(s, 2H), 2.30(s, 6H), 2.24(s, 2H), 1.07(s, 9H)。

[0233] 实施例 19 N-(2-(3-氯苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-氨基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0234]



[0235] 2-(3-氯苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基嘧啶的制备(化合物 19A)

[0236] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-嘧啶(300mg,1.78mmol),3-氯苄醇(303.5mL,2.12mmol)及三苯基膦(0.93g,3.55mmol)溶于 50mL 四氢呋喃中,偶氮二羰基二异丙酯(0.7mL,3.55mmol)于 0℃滴加至该混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1 纯化得到化合物 19A,油状液体(430mg,82.5% 收率)。MS : 294[M+H]⁺。

[0237] 2-(3-氯苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物 19B)

[0238] 化合物 19A(420mg,1.43mmol)与硫代硫酸钠(1.99g,11.46mmol)溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中,于封管中 90℃反应 4 小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,粗品使用二氯甲烷/甲醇=10:1 纯化得到化合物 19B,油状液体(220mg,57% 收率)。

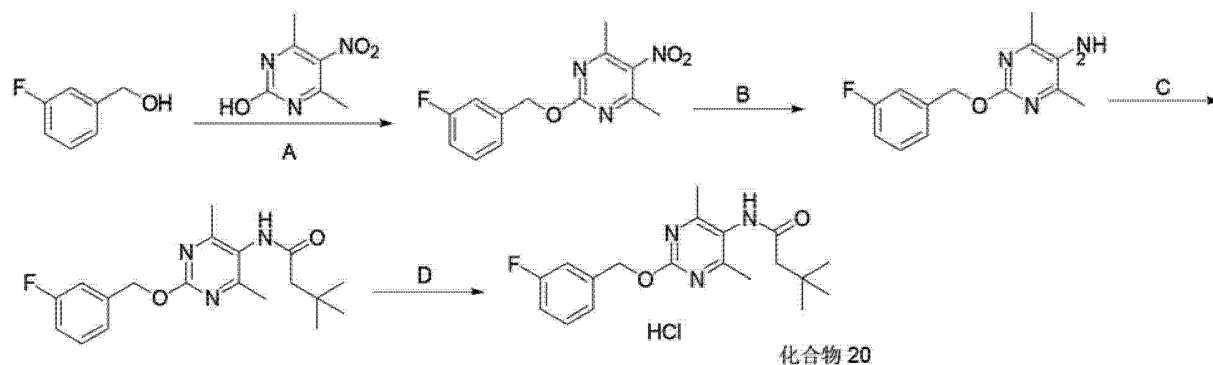
[0239] N-(2-(3-氯苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-氨基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 19)

[0240] 氢化钠(40mg,1.67mmol)于 0℃加至化合物 19B(220mg,0.84mmol)的 40mL 四氢呋喃溶液中,室温搅拌 40 分钟后,降温至 0℃,滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.46mL,3.36mmol),该反应物继续室温搅拌 2 小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 19 的盐酸盐,为白色固体(240mg,79.7% 收率)。MS:362 (M+H⁺)。

[0241] ¹H NMR(400MHz, CDCl₃) δ :7.52(s, 1H), 7.51-7.36(m, 1H), 7.32-7.29(m, 2H), 6.66(s, 1H), 5.40(s, 2H), 2.44(s, 6H), 2.33(s, 2H), 1.17(s, 9H)。

[0242] 实施例 20 N-(2-(3-氟苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0243]



[0244] 2-(3-氟苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基咪唑的制备(化合物 20A)

[0245] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-咪唑(300mg, 1.78mmol), 3-氟苄醇(0.23mL, 2.11mmol) 及三苯基膦(0.93g, 3.55mmol) 溶于 25mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异丙酯(0.7mL, 3.55mmol) 于 0℃ 滴加至该混合液中, 滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1 纯化得到化合物 20A, 油状液体(420mg, 85% 收率)。

[0246] 2-(3-氟苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基咪唑的制备(化合物 20B)

[0247] 化合物 20A (420mg, 1.52mmol) 与连二亚硫酸钠(2.11g, 12.1mmol) 溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中, 于封管中 90℃ 反应 4 小时, 反应完成后, 过滤除去固体, 用乙酸乙酯(3×20mL) 萃取滤液, 经减压蒸干后得粗品(343mg, 92% 收率)。

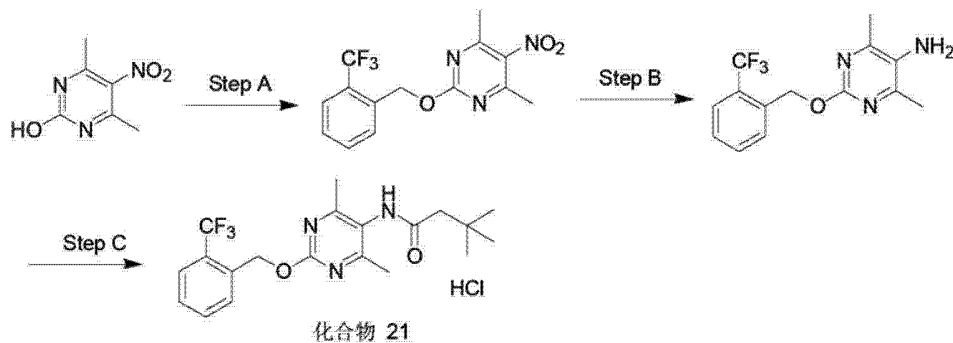
[0248] N-(2-(3-氟苄氧基)-4,6-二甲基-咪唑-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 20)

[0249] 氢化钠(64mg, 2.78mmol) 于 0℃ 加至化合物 20B(343mg, 1.39mmol) 的 10mL 四氢呋喃溶液中, 室温搅拌 30 分钟后, 降温至 0℃, 滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.77mL, 5.56mmol), 该反应物继续室温搅拌 2 小时, 反应完成后加入水, 乙酸乙酯萃取, 粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物 20, 该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到盐酸盐化合物, 为白色固体(320mg, 67% 收率)。

[0250] ^1H NMR (MeOD, 400MHz): δ 7.42-7.38 (m, 1H), 7.31-7.29 (m, 1H), 7.26-7.22 (m, 1H), 7.08-7.03 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 2.38 (s, 6H), 2.35 (s, 2H), 1.15 (s, 9H). MS: 346 ($\text{M}+\text{H}^+$).

[0251] 实施例 21 N-(2-(2-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-咪唑-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0252]



[0253] 2-(2-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基咪唑的制备(化合物 21A)

[0254] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-咪唑(300mg, 1.78mmol), 2-三氟甲基苄醇(0.3mL, 2.14mmol) 及三苯基膦(0.93g, 3.55mmol) 溶于 50mL 四氢呋喃中, 偶氮二羰基二异

丙酯(0.7mL, 3.55mmol)于0℃滴加至该混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌3小时。旋干溶剂,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1纯化得到化合物21A,油状液体(560mg, 96% 收率)。MS :327.9[M+H]⁺。

[0255] 2-(2-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物21B)

[0256] 化合物21A(560mg, 1.71mmol)与硫代硫酸钠(2.38g, 13.68mmol)溶于30mL 甲醇及3mL 水中,于封管中90℃反应4小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,粗品使用二氯甲烷/甲醇=10:1纯化得到化合物21B,油状液体(330mg, 65% 收率)。

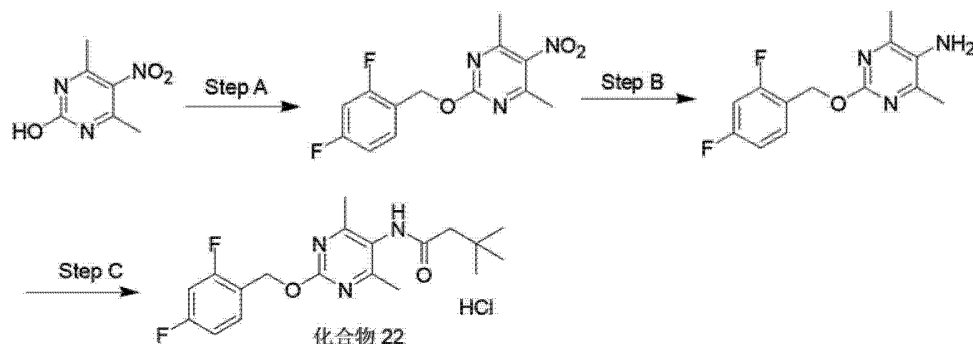
[0257] N-(2-(2-三氟甲基苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物21)

[0258] 氢化钠(77mg, 2mmol)于0℃加至化合物21B(297mg, 1mmol)的40mL 四氢呋喃溶液中,室温搅拌40分钟后,降温至0℃,滴加3,3-二甲基丁酰氯(0.56mL, 4mmol),该反应物继续室温搅拌2小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=1:1纯化得到化合物,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物21的盐酸盐,为白色固体(280mg, 75% 收率)。MS:396.7(M+H⁺)。

[0259] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ :9.54(s, 1H), 7.78(d, J=8Hz, 1H), 7.69-7.75(m, 2H), 7.55-7.59(m, 1H), 5.50(s, 2H), 5.07(s, 1H), 2.27(s, 6H), 2.24(s, 2H), 1.04(s, 9H)。

[0260] 实施例22 N-(2-(2,4-二氟苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0261]



[0262] 2-(2,4-二氟苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基嘧啶的制备(化合物22A)

[0263] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-嘧啶(300mg, 1.78mmol), 2,4-二氟苄醇(0.24mL, 2.13mmol)及三苯基膦(0.93g, 3.55mmol)溶于50mL 四氢呋喃中,偶氮二羰基二异丙酯(0.7mL, 3.55mmol)于0℃滴加至该混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌3小时。旋干溶剂,粗品使用石油醚/乙酸乙酯=10:1纯化得到化合物22A,油状液体(373mg, 71% 收率)。

[0264] 2-(2,4-二氟苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物22B)

[0265] 化合物22A(373mg, 1.26mmol)与硫代硫酸钠(1.76g, 10.11mmol)溶于30mL 甲醇及3mL 水中,于封管中90℃反应4小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,粗品使用二氯甲烷/甲醇=10:1纯化得到化合物22B,油状液体(330mg, 99% 收率)。

[0266] N-(2-(2,4-二氟苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物22)

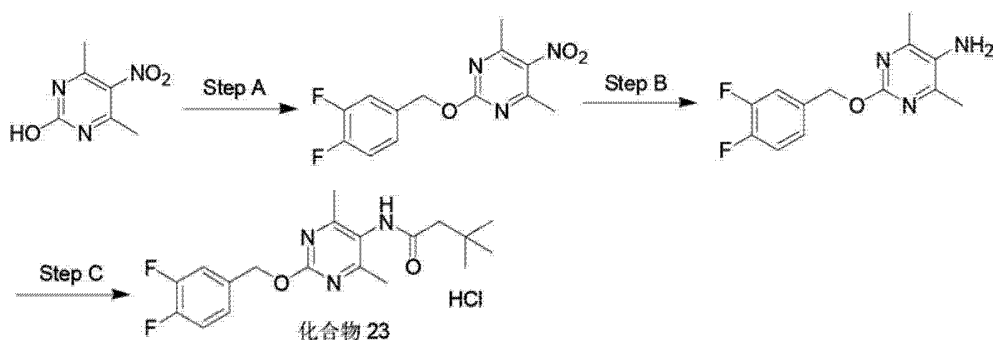
[0267] 氢化钠(60mg, 2.5mmol)于0℃加至化合物22B(330mg, 1.25mmol)的10mL 四氢呋喃溶液中,室温搅拌30分钟后,降温至0℃,滴加3,3-二甲基丁酰氯(0.69mL, 4.98mmol),

该反应物继续室温搅拌 2 小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物 22,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 22 的盐酸盐,为白色固体(323mg,71% 收率)。MS:364.7 (M+H⁺)。

[0268] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ :9.52(s, 1H), 7.85-7.61(m, 1H), 7.34-7.29(m, 1H), 7.15-7.12(m, 1H), 5.36(s, 2H), 2.26(s, 6H), 2.24(s, 2H), 1.06(s, 9H)。

[0269] 实施例 23 N-(2-(3,4-二氟苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐

[0270]



[0271] 2-(3,4-二氟苄氧基)-4,6-二甲基-5-硝基嘧啶的制备(化合物 23A)

[0272] 4,6-二甲基-5-硝基-2-羟基-嘧啶(300mg,1.78mmol),3,4-二氟苄醇(0.24mL,2.13mmol)及三苯基膦(0.93g,3.55mmol)溶于 50mL 四氢呋喃中,偶氮二羧基二异丙酯(0.7mL,3.55mmol)于 0℃滴加至该混合液中,滴加完毕后继续室温搅拌 3 小时。旋干溶剂,粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯=10:1 纯化得到化合物 23A,油状液体(452mg,86% 收率)。

[0273] 2-(3,4-二氟苄氧基)-4,6-二甲基-5-氨基嘧啶的制备(化合物 23B)

[0274] 化合物 23A(452mg,1.53mmol)与硫代硫酸钠(2.2g,12.6mmol)溶于 30mL 甲醇及 3mL 水中,于封管中 90℃反应 4 小时,反应完成后,过滤除去固体,滤液经减压蒸干后,粗品使用二氯甲烷 / 甲醇=10:1 纯化得到化合物 23B,油状液体(294mg,72% 收率)。

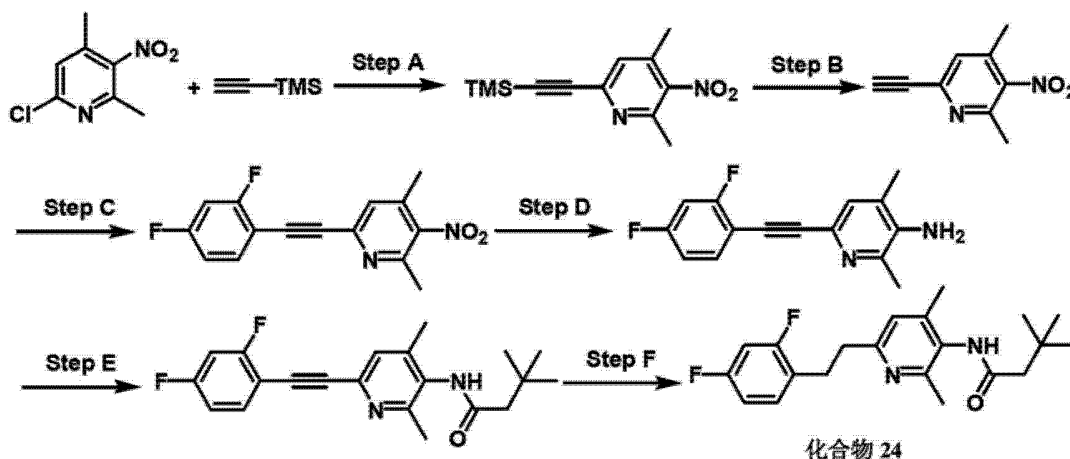
[0275] N-(2-(3,4-二氟苄氧基)-4,6-二甲基-嘧啶-5-基)-3,3-二甲基丁酰胺盐酸盐的制备(化合物 23)

[0276] 氢化钠(53mg,2.22mmol)于 0℃加至化合物 23B(294mg,1.11mmol)的 10mL 四氢呋喃溶液中,室温搅拌 30 分钟后,降温至 0℃,滴加 3,3-二甲基丁酰氯(0.62mL,4.44mmol),该反应物继续室温搅拌 2 小时,反应完成后加入水,乙酸乙酯萃取,粗品使用石油醚 / 乙酸乙酯=1:1 纯化得到化合物,该目标物使用盐酸乙醚溶液酸化后得到化合物 23 的盐酸盐,为白色固体(291mg,72% 收率)。MS:364.7 (M+H⁺)。

[0277] ¹H NMR(400MHz, DMSO-d₆) δ :9.44(s, 1H), 7.58-7.52(m, 1H), 7.49-7.42(m, 1H), 7.35-7.32(m, 1H), 5.33(s, 2H), 2.28(s, 6H), 2.24(s, 2H), 1.06(s, 9H)。

[0278] 实施例 24 N-(6-(2,4-二氟苄基乙基)-2,4-二甲基吡啶-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺的制备(化合物 24)

[0279]



[0280] 2,4-二甲基-3-硝基-6-((三甲基硅基)乙炔基)吡啶的制备(化合物 24A)

[0281] 6-氯-2,4-二甲基-3-硝基吡啶(500mg, 2.6mmol), 双三苯基膦氯化钯(127mg, 0.18mmol) 和碘化亚铜(39.6mg, 0.21mmol) 溶于四氢呋喃(15mL) 和三乙胺(7mL) 的混合溶液中, 氮气保护下缓慢滴加乙炔基三甲基硅烷(0.55mL, 4.0mmol), 加热至 80℃ 反应 12 小时。冷却至室温, 过滤除去不溶物, 旋干溶剂, 柱层析(石油醚:乙酸乙酯=35:1) 得化合物 24A(634mg, 98% 收率)。MS: 249(M+H⁺)。

[0282] 6-乙炔基-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 24B)

[0283] 冰水浴下, 缓慢滴加四丁基氟化铵(3mL, 3.0mmol, 1M 的四氢呋喃溶液) 到化合物 24A 的四氢呋喃(20mL) 溶液中, 继续搅拌 10 分钟, 旋干溶剂, 柱层析(石油醚:乙酸乙酯=20:1) 得化合物 24B(440mg, 99% 收率)。MS: 177(M+H⁺)。

[0284] 6-((2,4-二氟苯基)乙炔基)-2,4-二甲基-3-硝基吡啶的制备(化合物 24C)

[0285] 化合物 24B(430mg, 2.4mmol), 2,4-二氟-1-碘苯(0.38mL, 2.9mmol) 和碘化亚铜(11.4mg, 0.06mmol) 溶于三乙胺(8mL), 氮气保护下加入双三苯基膦氯化钯(84mg, 0.12mmol), 在 35℃ 下反应 12 小时。真空旋干溶剂, 柱层析(石油醚:乙酸乙酯=15:1) 得化合物 24C(400mg, 58% 收率)。MS: 289(M+H⁺)。

[0286] 6-((2,4-二氟苯基)乙炔基)-2,4-二甲基-3-氨基吡啶的制备(化合物 24D)

[0287] 在化合物 24C(288mg, 1mmol) 的甲醇(10mL) 和水(1mL) 混合溶液中加入保险粉(1.5g, 8.7mmol), 回流 1 小时, 冷却到室温, 过滤, 旋干得到化合物 24D(258mg, 99% 收率)。MS: 259(M+H⁺)。

[0288] N-(6-((2,4-二氟苯基)乙炔基)-2,4-二甲基吡啶-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺的制备(化合物 24E)

[0289] 零度和氮气保护下, 在化合物 24D(258mg, 1mmol) 的无水四氢呋喃溶液中慢慢的加入氢化钠(48mg, 2mmol), 然后在室温下反应 0.5 小时, 加入叔丁基乙酰氯继续在室温下反应 12 小时, 反应结束后, 用水终止反应, 乙酸乙酯萃取(3X20mL), 合并有机相, 用饱和食盐水洗, 用无水硫酸钠干燥, 过滤, 旋干过柱得到化合物 24E(132mg, 37% 收率)。MS: 357(M+H⁺)。

[0290] N-(6-(2,4-二氟苯基乙基)-2,4-二甲基吡啶-3-基)-3,3-二甲基丁酰胺的制备(化合物 24)

[0291] 化合物 24E(132mg, 0.37mmol) 和钯碳(13.2mg, 10%) 溶于甲醇(10mL), 室温下常压

氢化 12 小时。硅藻土过滤除去钨碳,真空旋干溶剂过柱得到化合物 24(110mg, 83% 收率)。¹H NMR(CDCl₃, 400MHz): δ 7.16–7.10 (m, 1H), 6.84 (brs, 1H), 6.79–6.72 (m, 3H) 2.98–2.94 (m, 4H), 2.47 (s, 3H), 2.30 (s, 2H), 2.19 (s, 3H), 1.15 (s, 9H). MS: 361 (M+H⁺).

[0292] 实施例 25

[0293] (a) 电生理实验方法:

[0294] CHO 细胞瞬时转染 KCNQ₂ 通道,在室温条件记录电流。记录期间,细胞用细胞外液 (140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 1.5mM MgCl₂, 10mM HEPES and 10mM Glucose, pH 7.4) 灌流。电极(阻抗 3–5 兆欧)用高硼硅玻璃吸管拉制(Sutter instrument BF150–86–10),并充满细胞内液(145mM, KCl, 1mM MgCl₂, 5 EGTA, 10mM HEPES and 5mM Mg²⁺-ATP, pH 7.3)。数据用 Axopatch 200B 放大器 (Molecular Device) 采集,信号经过频率 1kHz 过滤并用软件 pClamp10 交互界面 DigiData 1440AD 频率 10kHz 采样。系列阻抗经过 60–80% 的代偿。在 –80mV 钳制细胞,每 10mV 为一步长,电压从 –80mV 升到 +50mV 刺激 2 秒,记录信号。化合物对 KCNQ₂ 通道的作用包括整体电导增加和 V_{1/2} (半数最大激活电压) 左移。通过标准的指数方程获得电压激活曲线(G–V 曲线),并计算 V_{1/2}。

[0295] (b) 铯流实验方法

[0296] 第一天

[0297] 第一步:培养细胞

[0298] 1. 在 75cm² 的培养瓶中用完全培养基(DMEM/F12 Gibco, 添加 500ug/mL G418)培养 KCNQ₂ 稳定表达细胞株,密度 80–90%。

[0299] 2. PBS 清洗细胞一次

[0300] 3. 加入 1mL 0.25% 胰酶 (Trypsin-EDTA Gibco, Cat#25200) 孵育,直到细胞变圆,易脱落。

[0301] 4. 加入 10ml 完全培养基终止胰酶的消化,用巴斯德管反复吹吸,使细胞彻底脱落。

[0302] 5. 转移消化液到 50ml 的 Falcon 管中,每分钟 1000 转离心 5 分钟。

[0303] 6. 吸弃培养基,并用小体积(0.5mL)的完全培养基重新悬浮细胞。

[0304] 第二步:细胞接种

[0305] 细胞接种到 96 孔板中 (Corning, Cat#3894)。接种完毕后,轻轻敲打 96 孔板边缘使细胞分散,常温避光 30 分钟,然后 37° C 孵育 16–18 小时。

[0306] 第二天

[0307] 1. 过夜孵育后,更换培养基,加入上样缓冲液 (FluxOR™ detection kit Invitrogen), 室温避光孵育 90 分钟。

[0308] 2. 丢弃上样缓冲液,加入实验缓冲液。

[0309] 3. 细胞板中加入化合物。

[0310] 4. 细胞和化合物室温避光孵育 20 分钟。

[0311] 5. 把细胞板放入检测仪器中 (FDSS Hamamatsu)。

[0312] 6. 每 2 秒检测一次荧光信号,检测 10 秒。第 10 秒在细胞板中加入刺激缓冲液。

[0313] 每秒检测荧光信号,检测 180 秒。

[0314] 7. 检测仪器监测数据质量。

[0315] (c) 原子吸收 Rb^+ 流出高通量测定

[0316] 将处于对数生长期的稳转 KCNQ2/Q3 通道的 CHO 细胞以 2×10^4 个 / 孔的密度接种于 96 孔培养板。每个浓度设三复孔。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 μl 含 RbCl 的装载缓冲液, 在 37°C 、5% CO_2 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 μl 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 μl 上清到另一块 96 孔板中, 用 ICR8000 自动高通量原子吸收测定仪测定 780nm 处的 Rb^+ 原子吸收, 计算相对流出量。

[0317]

编号	细胞铯流测试				手动电生理测试		Rb ⁺ 流出测试	
	激活百分数			平均 激活 百分 数	I/I_0	$-\Delta V_{1/2}$ (mV)	EC50 (μM)	Efficacy (% of basal Rb ⁺ efflux)
瑞替加滨	46.84	73.91	89.36	70.03	2.12 ± 0.32	40.0 ± 2.8	0.35	210
1	93.21	96.45	127.11	105.59				
2	183.33	161.18	143.26	162.59	2.95 ± 0.17	28.1 ± 1.29	0.03	220
3	58.94	68.25	111.64	79.61				
4	60.67	59.72	111.58	77.32				
5	177.12	179.17	151.89	169.39				
6	105.64	76.58	103.65	95.29				
7	77.31	78.49	108.19	88.00				
8	157.01	138.90	156.26	150.72				
9	112.01	86.37	142.65	113.68			0.11	235
10	187.00	174.60	206.74	189.45	3.01 ± 0.28	53.62 ± 2.56	0.04	175
11	107.69	90.00	89.89	95.86				
12	96.59	102.41	75.27	91.42	2.05 ± 0.28	20.3 ± 1.73	0.5	235
13	103.49	100.81	121.06	108.46			0.30	185
15	133.43	67.65	90.91	97.33	2.05 ± 0.16	41.52 ± 1.48	0.32	235
16	134.41	66.96	95.53	98.97	1.59 ± 0.019	23.1 ± 2.17	0.09	265
17	186.23	139.93	132.30	152.82	2.81 ± 0.34	40.41 ± 1.83	0.09	245
18	103.83	69.35	97.55	90.24			0.51	167
19	133.33	73.68	97.94	101.65				
20	138.64	121.18	108.38	122.73				
21	74.32	54.44	54.39	61.05			1.58	200
22	124.61	110.99	141.36	125.66				
23	109.68	65.34	113.69	96.24				
24	88.51	97.78	101.16	95.82				

[0318]

[0319] 在细胞铯流测试中, 平均激活百分数越大, 表示相应化合物的活性越高。在电生理测试中 I/I_0 越大, 表示相应化合物的活性越高; $-\Delta V_{1/2}$ (mV) 越大, 表示相应化合物的活

性越高。在 Rb⁺ 流出测试中, EC₅₀ 越小, 表示相应化合物的活性越高。