

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D235/26



[12] 发明专利说明书

C07D263/60 C07D277/68

A61K 31/4184 A61K 31/423

A61K 31/429 A61P 9/00

A61P 11/08 A61P 13/10

A61P 13/12 A61P 25/00

[21] ZL 专利号 99813936. X

[45] 授权公告日 2004 年 12 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 1177831C

[22] 申请日 1999.12.3 [21] 申请号 99813936. X

[30] 优先权

[32] 1998.12.4 [33] DK [31] PA199801610

[86] 国际申请 PCT/DK1999/000681 1999.12.3

[87] 国际公布 WO2000/034248 英 2000.6.15

[85] 进入国家阶段日期 2001.5.31

[71] 专利权人 神经研究公司

地址 丹麦巴勒鲁普

[72] 发明人 L·托伊博 P·克里斯托弗森

D·斯特罗贝克 B·S·詹森

审查员 耿文军

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 2 页 说明书 24 页

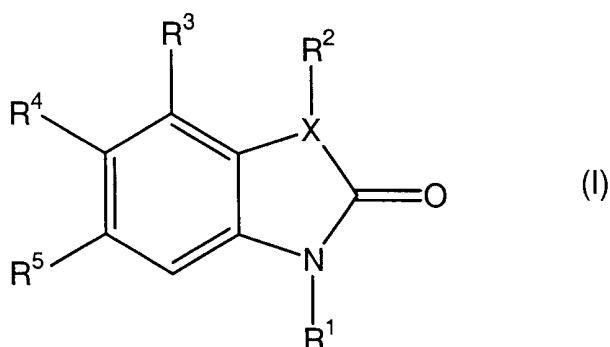
[54] 发明名称 作为离子通道调节剂的新的苯并咪
唑啉酮一、苯并噁唑啉酮一或苯并噻
唑啉酮衍生物

[57] 摘要

本发明涉及离子通道调节剂。更具体地，本发明涉及一类特殊的化合物，它们已被证明是有用的 SK_{Ca}，IK_{Ca}和/或 BK_{Ca}通道调节剂。进一步地，本发明涉及使用这些 SK/IK/BK 通道调节剂制备药物及含有 SK/IK/BK 通道调节剂的药物组合物。本发明 SK/IK/BK 通道调节剂治疗或缓解与 SK/IK/BK 通道有关的疾病或状况。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 具有下列通式的化合物或其制药上可接受的盐类或其水合物:



其中

X 代表 N; 并且

R¹ 代表氢, 烷基, 或环烷基;

R² 代表氢, 烷基, 或环烷基; 并且

R³ 和 R⁴ 各自独立地代表卤素, -NO₂, -CN, 或 CF₃; 和

R⁵ 代表氢。

2. 权利要求 1 中所述的化合物, 其中 R¹ 和 R² 中的一个代表氢, 烷基或环烷基, 和 R¹ 和 R² 中的另一个代表烷基或环烷基。

3. 权利要求 2 中所述的化合物, 其中 R¹ 和 R² 各自独立地代表烷基或环烷基。

4. 权利要求 1 中所述的化合物, 其中 R³ 和 R⁴ 各自独立地代表卤素。

5. 权利要求 1 中所述的化合物, 其为

1-乙基-4,5-二氯苯并咪唑啉酮;

1,3-二乙基-4,5-二氯苯并咪唑啉酮;

或其制药上可接受的盐类或其水合物。

6. 含有治疗有效量权利要求 1-5 中所述的化合物或其制药上可接受的加成盐类以及至少一种制药上可接受的载体或稀释剂的药物组合物，该组合物可用来治疗或缓解对 SK_{Ca}，IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道的调节有反应的疾病或失调或症状。

7. 权利要求 6 中所述的药物组合物，其可以用于治疗或缓解呼吸道疾病，例如哮喘、囊纤维化、慢性阻塞性肺疾病和鼻溢，惊厥，血管痉挛，冠状动脉痉挛，肾失调，多囊性肾疾病，膀胱痉挛，尿失禁，膀胱外流阻塞，敏感性肠综合症，胃肠道功能失调，分泌性腹泻，局部缺血，大脑局部缺血，局部缺血性心脏病，心绞痛，冠心病，创伤性脑损伤，精神病，焦虑，抑郁，痴呆，记忆力和注意力减弱，老年性痴呆，痛经，发作性睡眠，雷诺疾病，间歇性跛行，斯耶格伦综合症，偏头疼，心律失常，高血压，失神发作，肌强直性肌营养不良，口腔干燥，II 型糖尿病，高胰岛素血症，早产，秃顶，癌症以及免疫抑制。

8. 权利要求 1-5 任意一个中所述的化合物用于制备用于治疗或缓解包括人类哺乳动物的一些失调或疾病或症状的药物组合物的用途，所述的失调或疾病或症状对 SK_{Ca}，IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道的调节有反应。

9. 权利要求 8 中所述的用途，其中疾病、失调或症状为哮喘、囊纤维化、慢性阻塞性肺疾病和鼻溢，惊厥，血管痉挛，冠状动脉痉挛，肾功能失调，多囊性肾疾病，膀胱痉挛，尿失禁，膀胱外流阻塞，敏感性肠综合症，胃肠道功能失调，分泌性腹泻，局部缺血，大脑局部缺血，局部缺血性心脏病，心绞痛，冠心病，创伤性脑损伤，精神病，焦虑，抑郁，痴呆，记忆力和注意力减弱，老年性痴呆，痛经，发作性睡眠，雷诺疾病，间歇性跛行，斯耶格伦综合症，偏头疼，心律失常，高血压，失神发作，肌强直性肌营养不良，口腔干燥，II 型糖尿病，高胰岛素血症，早产，秃顶，癌症以及免疫抑制。

说明书

作为离子通道调节剂的新的苯并咪唑啉酮-、
苯并噁唑酮-或苯并噻唑啉酮衍生物

本发明涉及离子通道调节剂。更具体地，本发明涉及一类特殊的化合物，它们已被证明是有用的 SK_{Ca} 、 IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道调节剂。进一步地，本发明涉及使用这些 SK/IK/BK 通道调节剂制备药物及含有 SK/IK/BK 通道调节剂的药物组合物。

本发明 SK/IK/BK 通道调节剂可用于治疗或缓解与 SK/IK/BK 通道有关的疾病或症状。

离子通道是透膜蛋白质，其可以催化无机离子的跨膜转运。离子通道参与该过程的许多方面，包括动作电位的生成和定时、突触传导、激素分泌以及肌肉收缩等。

许多药物通过离子通道的调节发挥作用。这种例子有抗癫痫化合物如苯妥英和拉莫三嗪，它们能够阻断脑中的电位依赖 Na^+ -通道，抗高血压药物如硝苯吡啶和硫氮革酮，它们能够阻断平滑肌细胞中的电位依赖 Ca^{2+} -通道，胰岛素释放刺激剂如优降糖和甲磺丁脲，其可以阻断胰腺中 ATP 调节的 K^+ -通道。

所有的哺乳动物细胞在它们的细胞膜上表达 K^+ -通道，该通道在调节膜电位中起着主要的作用。在神经和肌肉细胞中，它们可以调节动作电位的频率和形成，神经递质的释放以及支气管和血管的舒张程度。

从分子的观点来看， K^+ -通道代表了一个最大和最多样性的离子通道家族。总的来说它们又可再分为五个大的亚家族：电位活化的 K^+ -通道 (K_v)，长 QT 有关的 K^+ -通道 (K_{vLQT})，内部调整 (K_{TP})，两孔 K^+ -通道 (K_{TP})，以及 Ca^{2+} 活化 K^+ -通道 (K_{Ca})。

在后一组中， Ca^{2+} 活化 K^+ -通道由三个细分的亚型组成：SK 通道，IK 通道和 BK 通道。SK、IK 和 BK 是指单通道传导（小、中、和大传导 K 通

道)。SK、IK 和 BK 通道在电位、钙敏感性、药理学活性、分布和功能方面均有所不同。

在许多中枢神经和神经节中存在 Ca^{2+} 活化 SK 通道，它们的基本作用是在一或几个动作电位后使神经细胞超极化，以防止致癫痫活动的长链接反应发生。SK 通道还存在于几种外周细胞中，包括骨骼肌、腺体、肝细胞和 T-淋巴细胞中。

在正常的骨骼肌细胞中 SK 通道并不显著，但它们的数量在去神经肌肉中却显著地增加，患有肌强直性肌肉营养障碍患者的肌肉内具有大量 SK 通道的事实提示人们它在疾病形成方面的作用。

存在一些 SK 通道阻断剂，例如蜂毒明肽、苯磺阿曲库铵、双哌雄双酯和筒箭毒碱，它们均为带正电荷的分子，用作孔阻断剂。

Ca^{2+} 活化的 IK 通道与 Ca^{2+} 活化的 SK 通道具有许多共同的特征，由于其具高度的 K 选择性，可被低于微摩尔浓度的 Ca^{2+} 活化，并具有内部调整传导作用。然而，它们也存在许多不同点，IK 通道的单位传导比 SK 通道的单位传导高 4-5 倍，IK 通道的分布严格限制在血液和脉管系统中。因此 IK 通道在神经系统和肌肉中没有表达，但在内皮细胞和内皮起源的细胞及红细胞中却有表达。

在红细胞中（其中 IK 通道被称为 Gardos 通道），细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高打开了通道并引起钾的流失和细胞脱水，这种情况在镰刀型贫血中有所加剧。对于镰刀型贫血而言，保证的治疗方法涉及特定的 IK 通道的阻断。

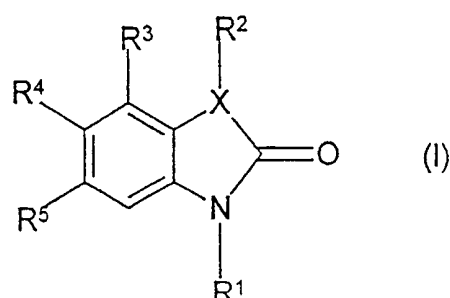
IK 通道还与肾的微脉管系统有关，它们对缓激肽的血管扩张作用负有责任。脓毒性休克期间血压降低是由于内皮细胞 NO 生成的增加所致，这些细胞中的 IK 通道对 Ca^{2+} 外流的保持负有责任，因为 Ca^{2+} 外流活化了 Ca^{2+} 敏感的 NO-合成酶。

在脑毛细内皮细胞中，被内皮素（其由神经元和神经胶质生成）活化的 IK 通道分流过量的 K^+ 进入血液。嗜中性粒细胞（即可使身体抵抗入侵微生物的移动吞噬细胞）在紧张的刺激之后经历大量的去极化作用，已经证明 IK 通道与刺激的粒细胞去极化作用有关。 Ca^{2+} 活化 BK 通道存在于

许多细胞中，例如大多数中枢和外周神经细胞、纹状肌肉细胞、心细胞、呼吸道平滑肌细胞，脉管系统，胃肠道和膀胱细胞，包括胰腺 b-细胞和肾小管细胞在内的内-和外分泌腺体细胞。

根据本发明，现已发现，具体组的化合物具有有价值的 SK_{Ca} ， IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道调节剂活性。

本发明的第一个方面涉及由下列通式表示的新化合物：



其中

X 代表 N，O 或 S；并且

R^1 代表氢；烷基；环烷基；羟基；烷氧基；酰基；苯基或苄基，所述的苯基或苄基可被下列取代基一或多次取代，它们是：卤素， $-NO_2$ ， $-CN$ ， CF_3 ，烷基，环烷基，羟基，烷氧基；式 $-CH_2CN$ 基团；式 $-CH_2CO_2R'$ 基团，其中 R' 代表氢或烷基；式 $-CH_2CONR^{IV}R^V$ 基团，其中 R^{IV} 和 R^V 各自独立地代表氢或烷基；或式 $-CH_2C(=NOH)NH_2$ 基团；

R^2 代表氢；烷基；环烷基；苯基或苄基，所述的苯基或苄基可被下列取代基一或多次取代：卤素， $-NO_2$ ， $-CN$ ， CF_3 ，烷基，环烷基，羟基和烷氧基；并且

R^3 ， R^4 和 R^5 各自独立地代表氢，卤素， $-NO_2$ ， $-CN$ ， CF_3 ；烷基；烷氧基；苯基或苄基，所述苯基或苄基可被下列取代基一或多次取代：卤素， $-NO_2$ ， $-CN$ ， CF_3 ，烷基，环烷基，羟基和烷氧基；式 $-SO_2NR''R'''$ 基团，其中 R'' 和 R''' 各自独立地代表氢或烷基；

或 R^5 如上所定义，并且 R^3 和 R^4 一起形成另外的 4-7 元稠合环，该稠合环可以是芳香的或部分饱和的，并且该稠合环可被下列取代基一或多次任意取代卤素， $-NO_2$ ， $-CN$ ， CF_3 ，或式 $-SO_2NR''R'''$ 基团，其中 R'' 和 R'''

各自独立地代表氢或烷基。

本发明第二个方面提供了包含治疗有效量本发明化合物或其制药上可接受的加成盐类以及至少一种制药上可接受的载体或稀释剂的药物组合物，该组合物可用来治疗或缓解对 SK_{Ca} 、 IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道的调节有反应的疾病或失调或症状。

本发明另一个方面涉及本发明化合物用于制备用于治疗或缓解哺乳动物（包括人类）的一些失调或疾病或症状的药物组合物的用途，所述的失调或疾病或状况对 SK_{Ca} 、 IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道的调节有反应。

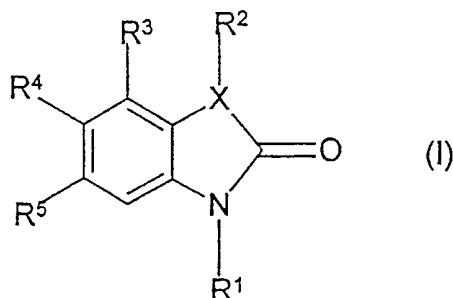
本发明的最后一个方面涉及治疗或缓解有生命体动物（包括人类）的一些失调或疾病或状况的方法，所述的失调或疾病或状况对 SK_{Ca} 、 IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道的调节有反应，其包括给予需要治疗的有生命体动物（包括人类）治疗有效量的本发明化合物。

根据本发明，现已发现具体的一些化合物具有有价值的作为 SK_{Ca} 、 IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道调节剂活性。

SK/IK/BK 调节剂

在本发明中，能够影响 SK_{Ca} 、 IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道的化合物被指定为 SK/IK/BK 通道调节剂。本发明 SK/IK/BK 通道调节剂可以通过开放（活化）通道或抑制（阻断）通道来影响离子通道。

本发明 SK/IK/BK 通道调节剂属于由下列通式表示的特定类型化合物：



其中

X 代表 N, O 或 S; 并且

R^1 代表氢; 烷基; 环烷基; 羟基; 烷氧基; 酰基; 苯基或苄基, 所述的苯基或苄基可被下列取代基一或多次取代, 它们是: 卤素, $-NO_2$, $-CN$,

17
CF₃, 烷基, 环烷基, 羟基, 烷氧基; 式-CH₂CN 基团; 式-CH₂CO₂R' 基团, 其中 R' 代表氢或烷基; 式-CH₂CONR^{IV}R^V 基团, 其中 R^{IV} 和 R^V 各自独立地代表氢或烷基; 或式-CH₂C(=NOH)NH₂ 基团;

R² 代表氢; 烷基; 环烷基; 苯基或苄基, 所述的苯基或苄基可被下列取代基一或多次取代: 卤素, -NO₂, -CN, CF₃, 烷基, 环烷基, 羟基和烷氧基; 并且

R³, R⁴ 和 R⁵ 各自独立地代表氢, 卤素, -NO₂, -CN, CF₃; 烷基; 烷氧基; 苯基或苄基, 所述的苯基或苄基可被下列取代基一或多次取代: 卤素, -NO₂, -CN, CF₃, 烷基, 环烷基, 羟基和烷氧基; 式-SO₂NR''R''' 基团, 其中 R'' 和 R''' 各自独立地代表氢或烷基;

或 R⁵ 如上所定义, 并且 R³ 和 R⁴ 一起形成另外的 4-7 元稠合环, 该稠合环可以是芳香或部分饱和的, 并且该稠合环可被下列取代基一或多次任意取代: 卤素, -NO₂, -CN, CF₃, 或式-SO₂NR''R''' 基团, 其中 R'' 和 R''' 各自独立地代表氢或烷基。

在优选的实施方案中, R¹ 代表氢或烷基。

在另一个优选的实施方案中, R² 代表氢或烷基。

在第三个优选的实施方案中, R³, R⁴ 和 R⁵ 各自独立地代表氢或烷基。

在最优选的实施方案中, 本发明化合物为

1- 乙基-4, 5-二氯苯并咪唑啉酮;

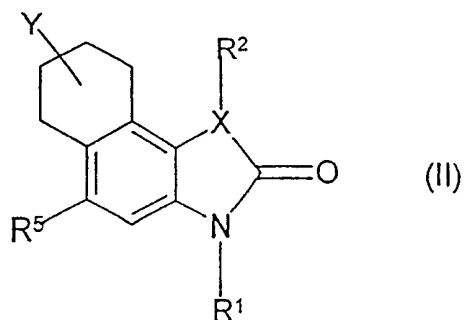
1, 3-二乙基-4, 5-二氯苯并咪唑啉酮;

3-乙基-5-氯苯并噁唑啉酮;

或其制药上可接受的盐类或其氧化物或水合物。

在另一个优选的实施方案中, R³ 和 R⁴ 一起形成 5-或 6-元稠合环, 该稠合环可为可为杂环, 其可是芳香、饱和或部分饱和的, 其可被下列取代基一或多次任意取代: 卤素, -NO₂, -CN, CF₃ 或式-SO₂NR''R''' 基团, 其中 R'' 和 R''' 各自独立地代表氢或烷基。

在更优选的实施方案中, 本发明化合物可由下列通式代表:



其中

R^1 , R^2 , R^5 和X定义同上; 并且

Y 代表氢, 卤素, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, CF_3 , 或式 $-\text{SO}_2\text{NR}''\text{R}'''$ 基团, 其中 R'' 和 R''' 各自独立地代表氢或烷基。

在优选的实施方案中, 本发明化合物为式 II 化合物, 其中 R^1 代表氢或烷基。

在另一个优选的实施方案中, 本发明化合物为式 II 化合物, 其中 R^2 代表氢或烷基。

在第三个优选的实施方案中, 本发明化合物为式 II 化合物, 其中 Y 代表氢。

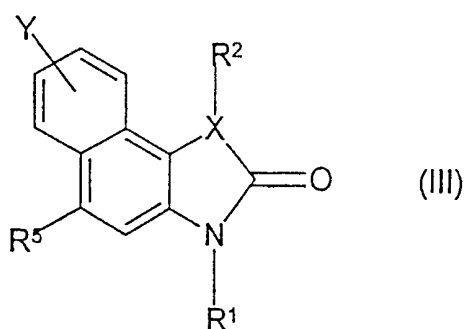
在最优选的实施方案中, 本发明化合物为

1,3-二乙基-5,6,7,8-四氢萘并[1,2-d]咪唑啉酮; 或

1-乙基-5,6,7,8-四氢萘并[1,2-d]咪唑啉酮;

或其制药上可接受的盐类或其氧化物或水合物。

在另一个优选的实施方案中, 本发明化合物可由下列通式代表:



其中

R^1 , R^2 , R^5 和X定义同上; 并且

Y 代表氢, 卤素, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, CF_3 , 或式 $-\text{SO}_2\text{NR}''\text{R}'''$ 基团, 其中 R'' 和 R''' 各自独立地代表氢或烷基。

在优选的实施方案中，本发明化合物为式 III 化合物，其中 R¹ 代表氢或烷基。

在另一个优选的实施方案中，本发明化合物为式 III 化合物，其中 R² 代表氢或烷基。

在第三个优选的实施方案中，本发明化合物为式 III 化合物，其中 Y 代表氢。

在最优选的实施方案中，本发明化合物为

3-乙基-萘并[1,2-d]噁唑啉酮；

3-乙基-萘并[1,2-d]咪唑啉酮；或

3-乙基-喹诺啉并[5,6-d]咪唑啉酮；

或其制药上可接受的盐类或其氧化物或水合物。

在另一个优选的实施方案中，本发明化合物由式 I 表示，其中 R³ 和 R⁴ 一起形成 5 元稠合杂环，该稠合环可被下列取代基一或多次任意取代：卤素，-NO₂，-CN，CF₃。在更优选的实施方案中，杂环为 1,2 或 4-咪唑基，1,2,3,4-或 2,1,3,4-四唑基，噻二唑基-3,4 或 5-基，噻唑-2,4 或 5-基，或者为 2 或 3-噻吩基。

在最优选的实施方案中，化合物为 3-苄基-(2,1,3-噻二唑并)[4,5-g]苯并咪唑啉酮或其制药上可接受的盐类或其氧化物或水合物。

取代基的定义

在本发明中，卤素代表氟、氯、溴或碘原子。

在本发明中，烷基代表一价的饱和直链或支链烃链。优选烃链含有 1-12 个碳原子 (C₁₋₁₂-烷基)，更优选含有 1-6 个碳原子 (C₁₋₆-烷基，低级烷基)，包括戊基，异戊基，新戊基，叔戊基，己基和异己基。在优选的实施方案中，烷基代表 C₁₋₄-烷基，包括丁基，异丁基，仲丁基以及叔丁基。在最优选的实施方案中，烷基代表 C₁₋₃-烷基，特别是甲基，乙基，丙基或异丙基。

在本发明中，环烷基代表环烷基，优选含有 3-7 个碳原子 (C₃₋₇-环烷基)，包括环丙基，环丁基，环戊基和环己基。

在本发明中，烷氧基代表“烷基-O”基团，其中烷基如上定义。

在本发明中，酰基代表羧基或烷基羰基，其中烷基如上定义。本发明优选的酰基包括甲酰基，乙酰基和丙酰基。

在本发明中，杂环烷基为环烷基，在其环结构中含有一或多个杂原子。优选的杂原子包括氮(N)，氧(O)，和硫(S)。环结构中的一或多个可以是芳香环(即杂芳基)，且饱和或部分饱和。本发明优选的杂环单环基团包括5-和6-元杂环单环基团。

本发明优选的芳香杂环单环基团的实例包括 1,3,2,4-或 1,3,4,5-二噁二唑基，二噁三嗪基，二噁嗪基，1,2,3-, 1,2,4-, 1,3,2-或 1,3,4-二噁唑基，1,3,2,4-或 1,3,4,5-二噻二唑基，二噻三嗪基，二噻嗪基，1,2,3-二噻唑基，2-或 3-呋喃基，呋喃基，1,2或 4-咪唑基，异吡唑基，异噻唑-3,4-或 5-基，1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5-或 1,3,4-噁二唑基-3,4-或 5-基，异噁唑-3,4-或 5-基，1,2,3-, 1,2,4-, 1,2,5-或 1,3,4-噁二唑基-3,4-或 5-基，噁四嗪基，噁三嗪基，1,2,3,4-或 1,2,3,5-噁三唑基，噁唑基-2,4-或 5-基，2或 3-吡嗪基，1,3-或 4-吡唑基，3或 4-哒嗪基，2,3或 4-吡啶基，2,4或 5-嘧啶基，1,2或 3-吡咯基(吡咯基)，1,2,3,4-或 2,1,3,4-四唑基，噻二唑 3,4-或 5-基，噻唑-2,4-或 5-基，2或 3-噻吩基，1,2,3-, 1,2,4-, 1,3,5-三嗪基，以及，1,2,3-, 1,2,4-, 2,1,3-或 4,1,2-三唑基。最优选的杂环基团是 1,2或 4-咪唑基，1,2,3,4-或 2,1,3,4-四唑基，噻二唑基-3,4或 5-基，噻唑-2,4-或 5-基以及 2-或 3-噻吩基。

本发明优选的饱和或部分饱和杂环单环基团包括，1,3,5,6,2-二噁二嗪基，1,2,3,4,5-, 1,2,3,5,4-二噁二唑基，二噁烷基，1,3-二间二氧杂环戊烯基，1,3,5,6,2-二噻二嗪基，1,2,3,4,5-或 1,2,3,5,4-二噻二唑基，2-异咪唑基，异吡咯基，异四唑基，1,2,3-或 1,2,4-异三唑基，吗啉基，噁二嗪基，1,2,4-, 1,2,6-, 1,3,2-, 1,3,6-或 1,4,2-噁嗪基，哌嗪基，高哌嗪基，哌啶基，1,2-, 1,3-或 1,4-吡喃基以及 1,2,3-吡咯烷基。

制药上可接受的盐类

本发明 SK/IK/BK 通道调节剂可以任意适合给药的形式提供。合适的形式包括制药上可接受的盐类以及本发明化合物的前药形式。

制药上可接受的酸加成盐类的实例包括（但不限于）非毒性无机和有机酸加成盐类，例如衍生自乙酸的乙酸盐，衍生自阿康酸的阿康酸盐，衍生自抗坏血酸的抗坏血酸盐，衍生自苯磺酸的苯磺酸盐，衍生自苯甲酸的苯甲酸盐，衍生自肉桂酸的肉桂酸盐，衍生自柠檬酸的柠檬酸盐，衍生自 4,4'-甲撑双（3-羟基-2-萘酸）的 4,4'-甲撑双（3-羟基-2-萘酸）盐，衍生自庚酸的庚酸盐，衍生自甲酸的甲酸盐，衍生自富马酸的富马酸盐，衍生自谷氨酸的谷氨酸盐，衍生自马来酸的马来酸盐衍生自乙醇酸的乙醇酸盐，衍生自盐酸的盐酸盐，衍生自氢溴酸的氢溴酸盐，衍生自乳酸的乳酸盐，衍生自丙二酸的丙二酸盐，衍生自扁桃酸的扁桃酸盐，衍生自甲磺酸的甲磺酸盐，衍生自萘-2-磺酸的萘-2-磺酸盐，衍生自硝酸的硝酸盐，衍生自高氯酸的高氯酸盐，衍生自磷酸的磷酸盐，衍生自邻苯二甲酸的邻苯二甲酸盐，衍生自水杨酸的水杨酸盐，衍生自山梨酸的山梨酸盐，衍生自硬脂酸的硬脂酸盐，衍生自琥珀酸的琥珀酸盐，，衍生自硫酸的硫酸盐，，衍生自酒石酸的酒石酸盐，，衍生自甲苯-对-磺酸的对-甲苯磺酸盐等等。这些盐类可用本领域已知的方法来制备。

其它被认为不是制药上可接受的酸（例如草酸）也可用于盐类制备过程，所述盐类在获得本发明化合物及其制药上可接受酸加成盐的过程中可用作中间体。

本发明化合物的金属盐类包括碱金属盐类，例如含有羧基的本发明化合物的钠盐。

本发明化合物可以非溶剂合物形式或以带有制药上可接受的溶剂（例如水、乙醇等）的溶剂合物形式提供。溶剂合物形式也包括水合物形式，例如单水合物、二水合物、半水合物、三水合物、四水合物等。对于本发明而言，通常认为溶剂合物形式等价于非溶剂合物形式。

立体异构体

本发明 SK/IK/BK 通道调节剂可以 (+) 和 (-) 以及外消旋体形式存在。这些异构体的外消旋体以及单独的异构体本身也在本发明的范围之内。

通过已知的方法和技术可将外消旋体拆分为光学对映体。分离非对映体盐的一种方法是利用光学活性的酸，并用碱处理释放出光学活性的胺化合物。另一个将外消旋体拆分为光学对映体的方法是基于在光学活性的基质上进行层析。因此本发明外消旋化合物可以拆分为它们的光学对映体，例如通过 d-或 l-（酒石酸、扁桃酸或樟脑磺酸）盐的分步结晶。

还可以使本发明化合物与光学活性的活化羧酸（例如衍生自 (+) 和 (-) 苯基丙氨酸、 (+) 和 (-) 苯基甘氨酸、 (+) 和 (-) 樟脑酸）进行反应形成非对映体酰胺或使本发明化合物与光学活性的氯代甲酸酯或类似物进行反应形成氨基甲酸酯非对映体来制备本发明化合物。

其它拆分光学异构体的方法在本领域内是已知。这类方法包括 *Iaques J Collet A & Wilen S* “对映体、外消旋体及其拆分”，John Wiley 和 Sons, New York (1981) 中所描述的。

生物活性

根据本发明，现已发现本发明靛红衍生物具有有价值的 SK_{Ca}、IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道调节剂的活性。

采用常规的电生理方法（例如斑贴夹技术（Patch-clamp））或常规的分光镜方法（例如 FLIPR 分析，即荧光图象平面读数器，可从 Molecular Devices 购得）可以测定 SK/IK/BK 通道调节活性。这些方法通常包含使本发明化合物作用于含有 SK_{Ca}、IK_{Ca} 或 BK_{Ca} 的细胞，接着测定含有 SK_{Ca}、IK_{Ca} 或 BK_{Ca} 细胞的膜电位，以便确定由本发明化合物引起的膜电位的变化。

在实施例 6 中，用电生理斑贴夹技术（Patch-clamp）证明了本发明化合物的生物活性。

基于本发明化合物的生物活性，认为它们可以用于治疗或缓解对 SK_{Ca}、IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道的调节有反应的疾病或症状。这些疾病或状况

血管痉挛，冠状动脉痉挛，肾失调，多囊性肾疾病，膀胱痉挛，尿失禁，膀胱外流阻塞，敏感性肠综合症，胃肠道功能失调，分泌性腹泻，局部缺血，大脑局部缺血，局部缺血性心脏病，心绞痛，冠心病，创伤性脑损伤，精神病，焦虑，抑郁，痴呆，记忆力和注意力减弱，早老性痴呆，痛经，发作性睡眠，雷诺(Reynaud's)疾病，间歇性跛行，斯耶格伦(Sjorgren's)综合症，偏头疼，心律失常，高血压，失神发作，肌强直性肌营养不良，口腔干燥，II型糖尿病，高胰岛素血症，早产，秃顶，癌症以及免疫抑制。

本发明化合物被认为特别适合用来降低或抑制不需要的免疫调节作用。因此在优选的实施方案中，本发明化合物可用来治疗或缓解与免疫功能失调有关的疾病、失调或症状，或者可用于在需要的个体身上获得免疫抑制作用。

另外，在更优选的实施方案中，本发明涉及联合使用本发明化合物及已知的免疫抑制剂来治疗或缓解与免疫功能失调有关的疾病、失调或症状，或者获得免疫抑制作用。优选的可与本发明化合物合用的免疫抑制剂包括钙调磷酸酶抑制剂（即蛋白质磷酸酶 2B 抑制剂），特别是环孢菌素及 FK506。

可从此治疗中受益的情况有（但不限于）以下疾病、失调或症状，例如自身免疫疾病，如 Addison's 疾病，簇状脱发，Ankylosing 脊髓炎，溶血性贫血，恶性贫血，口疮，口疮性口炎，关节炎，动脉粥样硬化失调，骨关节炎，风湿性关节炎，精子生成缺乏，哮喘性支气管，自身免疫性哮喘，自身免疫性溶血，Bechet's 疾病，Boeck's 疾病，炎症肠疾病，Burkitt's 淋巴瘤，Chron's 疾病，脉络膜炎，结肠性溃疡，Coeliac 疾病，冷球蛋白血症，疱疹样皮炎，皮肤肌炎，胰岛素依赖 I 型糖尿病，幼稚型糖尿病，自发性糖尿病，胰岛素依赖型糖尿病，自身免疫脱髓鞘疾病，Dupuytren's 挛缩，脑脊髓炎，过敏性脑脊髓炎，晶体过敏性肉眼炎，过敏性肠炎，自身免疫肠病综合症，红斑结节性麻风，自发面部麻痹，慢性疲劳综合症，风湿性发热，肾小球肾炎，Goodpasture's 综合症，Graves' 疾病，Hamman-Rich's 疾病，Hashimoto's 疾病，Hashimoto's 甲状腺炎，

突发性听力丧失, 感觉神经听力丧失, 慢性肝炎, Hodgkin's 疾病, 血红蛋白尿发作, 性腺机能减退, 区域性回肠炎, 虹膜炎, 白细胞减少症, 白血病, 红斑狼疮, 播散, 系统性红斑狼疮, 皮肤红斑狼疮, 恶性淋巴瘤芽肿, 传染性单核细胞增多症, 重症肌无力, 横切脊髓炎, 初级自发性粘液水肿, 肾病, 眼炎, 睾丸肉芽肿瘤, 胰腺炎, 天疱疮, 普通天疱疮, 结节性多动脉炎, 初级慢性多关节炎, 多肌炎, 急性多发性脊神经根炎, 牛皮癣, 紫癜, 脓皮性坏疽, Quervain's 甲状腺炎, Reiter's 综合症, 肉样瘤病, 运动失调性硬化, 进行性系统硬化, 巩膜炎, 韧带硬化, 多发性硬化, 播散硬化, 获得性 spenic 萎缩, 由于抗精子抗体的存在导致的不育症, 血小板减少症, 自发性血小板减少性紫癜, 胸腺瘤, 急性前色素层炎, 白斑, AIDS, HIV, SCID 以及与 Epstein Barr 病毒有关的疾病, 例如斯耶格伦综合症, 与 B 细胞淋巴瘤有关的病毒 (AIDS 或 EBV), 例如 Lesihmania, 以及免疫抑制疾病状态, 例如同种移植后的病毒感染, 移植物抵抗宿主综合症, 移植排斥或 AIDS, 癌, 慢性活动性肝炎糖尿病, 毒性休克综合症, 食物中毒以及移植排斥。

药物组合物

本发明的另一个方面提供了新的含治疗有效量且具 SK_{Ca} 、 IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 调节活性的化合物的药物组合物。

尽管本发明化合物在治疗中可以化合物的原料药形式给药, 但优选的还是以任意生理上可接受的盐类形式以及与一或多种辅助剂、赋形剂、载体、缓冲剂、稀释剂和或其它常规的药物辅料组成的药物组合物形式给予活性成分。

在优选的实施方案中, 本发明提供了含有本发明 $SK/IK/BK$ 通道调节剂或其制药上可接受的盐或衍生物以及一或多种制药上可接受的载体及任意其它本领域内已知的治疗和/或预防成分的药物组合物。载体必须是“可接受”的含义是指其可与配方中的其它成分配伍并对接受者无害。本发明药物组合物可采用那些适合通过以下途径给药的剂型: 口服、直肠、支气管、鼻腔、局部 (包括颊和舌下)、皮透、阴道或非肠道 (包

直肠、支气管、鼻腔、局部（包括颊和舌下）、皮透、阴道或非肠道（包括皮肤、皮下、肌内、和静脉注射），或采用那些适合通过吸入给药的剂型。

因此，可将本发明化合物与常规辅助剂、载体、稀释剂一起制成药物组合物及其单位剂量。这类剂型包括用于口服给药固体特别是片剂、填充胶囊、粉剂和丸剂，液体特别是水或非水溶液，悬浮液，乳剂，剂以及用同样物质填充的胶囊，用于直肠给药的栓剂，以及用于非肠道给药的无菌注射溶液。这类药物组合物及其单位剂型可以常规比例含有常规成分，同时可以带有或不带其它活性化合物或成分，并且这类单位剂型可以含有任意治疗有效量的活性成分，其含量应与每日欲使用的剂量相当。

本发明化合物可以各种口服或非肠道形式进行给药。对于本领域内的专家来说，显而易见下列剂型可包含本发明化合物或其制药上可接受的盐类作为活性成分。

对于从本发明化合物制备药物组合物来说，制药上可接受的载体既可以是固体也可以是液体。固体剂型包括粉剂、片剂、药丸、胶囊、扁囊剂、栓剂和分散颗粒。固体载体可以是一或多种物质，它们还可用作稀释剂、调味剂、助溶剂、润滑剂、悬浮剂、粘合剂、防腐剂、片剂崩解剂或包裹物质。

在粉剂中，载体是细分的固体，其与细分的活性成分组成混合物。

在片剂中，活性成分以合适的比例与具有必需结合容量的载体混合并压制成需要的形状和大小。

优选地，粉剂和片剂含有 5 或 10 - 约 70% 的活性化合物。合适的载体是碳酸镁、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、果胶、糊精、淀粉、明胶、黄耆胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。术语“制剂”包括活性成分与作为载体的包裹物质的配方，该配方提供了一种胶囊，其中活性成分（带有或不带载体）被载体包裹，从而使载体与之发生联系。相似地，也包括扁囊剂和锭剂。片剂、粉末、胶囊、药丸、扁囊剂和锭剂可以用作适合口服给药的固体剂型。

对于制备栓剂来说，首先将低熔点蜡（例如脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物）熔化并将活性成分均匀地（例如通过搅拌）分散于其中。然后将熔融的均匀混合物倾入合适大小的模子中，使之冷却并固化。

适合于阴道给药的组合物可以阴道环、棉塞、霜剂、凝胶、膏剂、泡沫或喷雾剂等形式来提供，其中除含有活性成分之外还含有载体，所述载体本领域内人士认为合适即可。

液体制剂包括溶液、悬浮液和乳剂。例如水或水-丙二醇溶液，非肠道注射液体制剂可以用水性聚乙二醇来配制。

因此本发明化合物可以配制成用于非肠道给药的制剂（例如通过注射，如一次性注射或持续的滴注）并且可以单位剂型的形式来提供，例如采取安瓿、预填充的注射器、小体积滴注或带有添加防腐剂的多剂量容器等。组合物可以采取油性或水性悬浮液、溶液或乳剂，并可以含有配方用制剂，例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。另外，活性成分可采取粉末形式，其可以通过无菌固体的无菌分离或由溶液进行冷冻干燥而获得。使用前，用合适的载体（例如无菌无热原质的水）进行配制。

将活性成分溶于水中并根据需要加入合适的着色剂、调味剂、稳定剂和增稠剂可以制备得到适合口服的水溶液。

将细分的活性成分分散于带有粘性物质的水中，例如天然或合成胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠或其它熟知的悬浮剂，可以制备得到适合口服的悬浮水溶液。还包括固体剂型的制剂，它们可在使用前转化为用于口服给药的液体制剂。这类液体制剂包括溶液、悬浮液和乳剂。除了活性成分之外，这些制剂还可以含有着色剂、调味剂、稳定剂、缓冲剂、人工或天然甜味剂、分散剂、增稠剂、助溶剂等。

对于表皮局部给药来说，可将本发明化合物配制成软膏剂、霜剂或洗剂，或制成皮透贴。例如可用水性或油性基质配制软膏剂或霜剂，并加入合适的增稠剂和/或凝胶剂。可用水性或油性基质配制洗剂，其通常含有一或多种乳化剂、稳定剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂或着色剂。

适合于口腔局部给药的组合物包括含有处于调味基质中的活性成分的锭剂，调味剂通常为糖和金合欢或黄蓍胶；含有处于惰性基质（例如

27

明胶和甘油或糖及金合欢) 中活性成分的锭剂; 含有处于合适液体载体中活性成分的漱口液。

溶液和悬浮液可采用常规的方法直接应用于鼻腔, 例如滴剂、滴管或喷雾。组合物可以单或多剂量形提供。在滴剂或滴管的多剂量形式中, 其可以通过患者自己给予合适的预定体积的溶液或悬浮液来实现。在喷雾情况下, 其可以通过计量雾化喷雾泵来实现

采用气溶胶配方可以实现呼吸道给药, 其中活性成分借助合适的推进剂以加压包装的形式提供, 合适的推进剂有氯代氟碳, 例如二氯代二氟甲烷、三氯代氟甲烷或二氯代四氟乙烷, 二氧化碳或其它合适的气体。气溶胶还可以方便地含有表面活性剂, 例如卵磷脂。药物剂量由计量阀来控制。

另外活性成分还可以干燥的粉末形式来提供, 例如处于合适粉末基质中的化合物的粉末混合物, 上述基质例如有乳糖、淀粉、淀粉衍生物, 例如羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。粉末载体将在鼻腔中方便地形成凝胶。粉末混合物可以单位剂型提供, 例如胶囊或药筒, 如明胶或水泡眼包装, 从中可以通过吸入的方法给予粉末。

在欲通过呼吸道给药的组合物 (包括鼻内组合物) 中, 化合物通常具有较小的颗粒粒径, 例如 5 微米或更小。如此大小的颗粒可以通过本领域内的技术来获得, 例如微粉化技术。

如有所需, 组合物可以采取活性成分的缓释剂型。

药物制剂优选的是采用含有适量活性成分的单位剂型。单位剂型可为包装制剂, 该包装中含有分散量的制剂, 例如包装的片剂、胶囊和处于小瓶和安瓿中的粉末。单位剂量也可为胶囊、片剂、扁囊剂或锭剂本身或任意这些包装形式合适的数量。

用于口服给药的片剂或胶囊以及用于静脉注射和持续滴注的液体是优选的制剂。

在最新出版的 Remington's Pharmaceutical Sciences (Maack Publishing Co., Easton, PA) 中可以找到有关配方和给药技术方面进一步的细节。

养或实验动物中，通过标准的药理学方法可以测定得到治疗效力和毒性，例如 ED_{50} 和 LD_{50} 。治疗和毒性效果的剂量比为治疗指数，可用 LD_{50}/ED_{50} 来表示。具有较大治疗指数的药物组合物是优选的。

当然，给药剂量必须根据接受治疗个体的年龄、体重和状况以及给药途径、剂型、治疗方案、所期望的结果来仔细调节，应该由医生来决定准确的给药剂量。

实际的剂量取决于疾病的性质和严重程度，并在医生的判断之内，剂量可以根据本发明特定的情况来变化，以获得所需的治疗效果。然而，在通常情况下药物组合物含有约 0.1-500mg 活性成分/剂量，优选的是 1-100mg，最优选的约 1-10mg，并适用于治疗处理。

活性成分在一天中可一次或分几次给药。在某些情况下，在 $0.1\mu\text{g}/\text{Kg}$ i.v. 和 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ p.o. 的低剂量下可以获得满意的结果。剂量范围的上限约为 $10\text{mg}/\text{Kg}$ i.v. 和 $100\text{mg}/\text{kg}$ p.o.。优选的范围为 $0.1\mu\text{g}/\text{Kg}$ – $10\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ i.v. 及 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ – $100\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ p.o.。

治疗方法

本发明的另一个方面涉及治疗或缓解有生命体动物（包括人类）的一些疾病或失调或症状的方法，所述的疾病或失调或症状对 SK_{Ca} ， IK_{Ca} 和/或 BK_{Ca} 通道的调节有反应，该方法包括给予需要治疗的有生命体动物（包括人类）治疗有效量的本发明化合物。

在优选的实施方案中，所述的疾病或失调或状况包括哮喘、囊纤维化、慢性阻塞性肺疾病和鼻溢，惊厥，血管痉挛，冠状动脉痉挛，肾功能失调，多囊性肾疾病，膀胱痉挛，尿失禁，膀胱外流阻塞，敏感性肠综合症，胃肠道功能失调，分泌性腹泻，局部缺血，大脑局部缺血，局部缺血性心脏病，心绞痛，冠心病，创伤性脑损伤，精神病，焦虑，抑郁，痴呆，记忆力和注意力减弱，老年性痴呆，痛经，发作性睡眠，雷诺疾病，间歇性跛行，斯耶格伦综合症，偏头疼，心律失常，高血压，失神发作，肌强直性肌营养不良，口腔干燥，II型糖尿病，高

胰岛素血症，早产，秃顶，癌症以及免疫抑制。

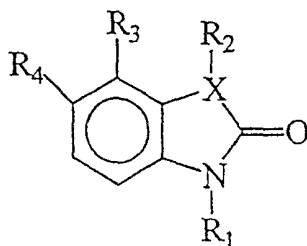
根据本发明合适的剂量范围为 0.1-1000mg/天，10-500mg/天及特别为 30-100mg/天，这通常取决于给药方式、给药剂型、所治疗疾病的状况、患者情况及体重以及主治医生和兽医个人的喜好和经验。

实施例

下列实施例将进一步说明本发明，但并不以任何方式限制本发明的范围。

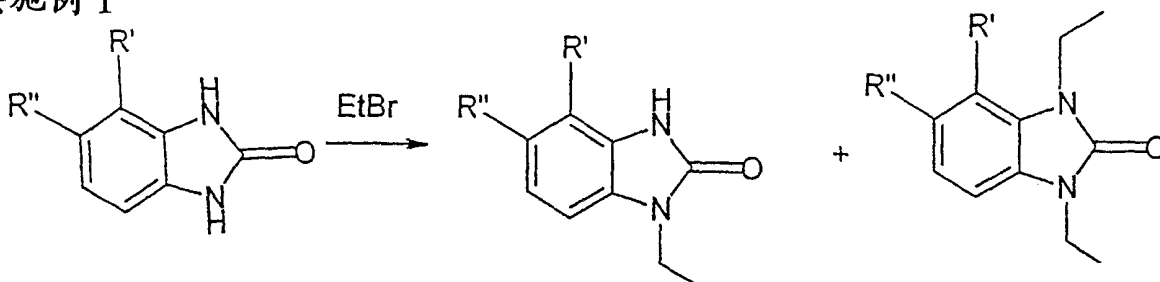
表 1

取代并稠合的咪唑啉酮和噁唑啉酮



编号	X	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Mp.	实施例
1a	N	Et	Et	-(CH ₂) ₄ -		油	1, 2, 3
1b	N	Et	H	-(CH ₂) ₄ -		171-4	1, 2, 3
1c	O	Et	-	-CH=CH-CH=CH-		137.7-138.4	1, 2, 4
1d	N	Et	H	-CH=CH-CH=CH-		240-242	1, 2a, 4
1e	N	Bz	H	=N-S-N=		245-247	2a, 5
1f	N	Et	H	-N=CH-CH=CH-		258-259	1, 2
1g	N	Et	H	Cl	Cl	186-8	1, 2a, 4
1h	N	Et	Et	Cl	Cl	油	1, 2a, 4
1i	O	H	-	H	Cl	-	-
1j	O	Et	-	H	Cl	75-78	1a

实施例 1



1-乙基-5,6,7,8-四氢萘并[1,2-d]咪唑啉酮 (1b) 和 1,3-二乙基-5,6,7,8-四氢萘并[1,2-d]咪唑啉酮 (1a)

向 5,6,7,8-四氢萘并[1,2-d]咪唑啉酮 (1.0g; 5.7mmol) 的无水 DMF 溶液 (10ml) 中加入氢化钠 (4.5mmol; 0.18g, 60%的矿物油悬浮液)。当不再有氢气发生时, 加入溴乙烷 (0.34ml; 45mmol), 混合物在室温下搅拌过夜。将混合物倾入水中, 用乙酸乙酯提取。浓缩提取物, 生成的产品混合物用硅胶柱层析分离, 以乙酸乙酯和石油醚 (1: 4 v/v) 混合物洗脱。1-乙基-5,6,7,8-四氢萘并[1,2-d]咪唑啉酮的产量: 0.12g, Mp. 171-174°C。1,3-二乙基-5,6,7,8-四氢萘并[1,2-d]咪唑啉酮的产量 (分离出来为油): 0.12g, m/z: 244 (100%), 229 (31%), 216 (33%), 215 (22%), 188 (13%)。

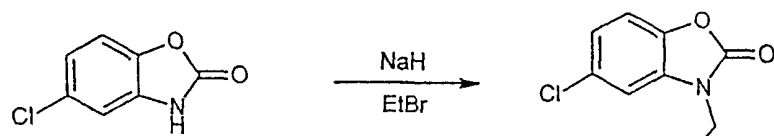
按照类似的方法, 用氢化钠 (1.1 当量) 和溴乙烷 (1.1 当量) 依次处理萘并[1,2-d]咪唑啉酮, 可以制备得到 3-乙基-萘并[1,2-d]咪唑啉酮 (1c)。柱层析后的产率: 14%。Mp. 137.7-138.4°C。

按照类似的方法, 用氢化钠 (1.1 当量) 和溴乙烷 (1.1 当量) 依次处理萘并[1,2-d]咪唑啉酮, 可以制备得到 3-乙基-萘并[1,2-d]咪唑啉酮 (1d)。柱层析后的产率: 2%。Mp. 240-242°C。

按照类似的方法, 用氢化钠 (1.1 当量) 和溴乙烷 (1.1 当) 依次处理喹啉并[5,6-d]咪唑啉酮, 可以制备得到 3-乙基-喹啉并[5,6-d]咪唑啉酮 (1f)。柱层析后的产率: 12%。Mp. 258-259°C。

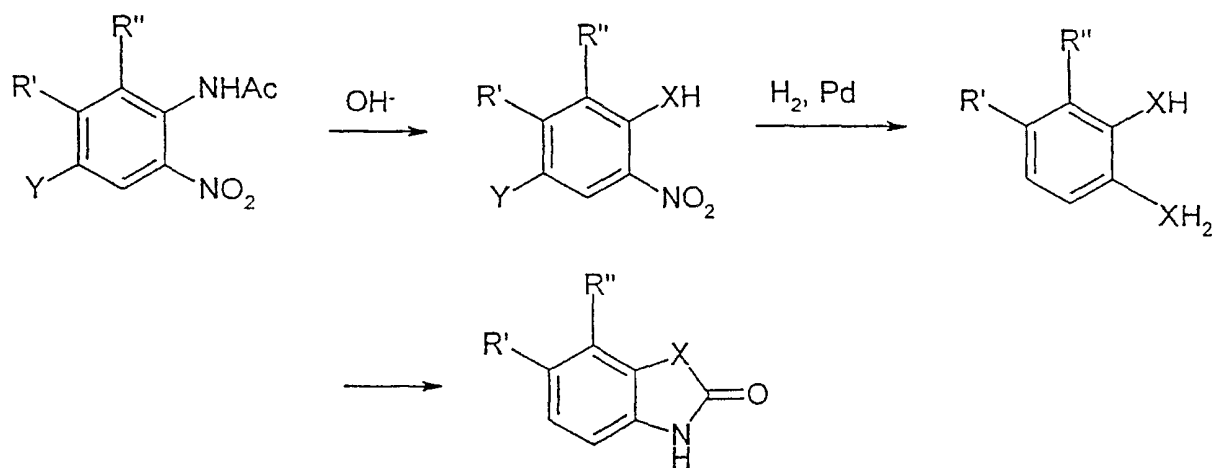
按照类似的方法, 用氢化钠 (1.1 当量) 和溴乙烷 (1.1 当量) 依次处理 4,5-二氯苯并咪唑啉酮, 可以制备得到 1-乙基-4,5-二氯苯并咪唑啉酮 (1g) 和 1,3-二乙基-4,5-二氯苯并咪唑啉酮 (1h)。用柱层析分离产品。1g 产率: 26%, Mp. 186-188°C。1h 产率: 16%, 油状。

实施例 1a



按照实施例所述的方法，用氢氧化钠（1.1 当量）和溴乙烷（1.1 当量）依次处理氯代噁嗪酮（1i），得到 3-乙基-5-氯苯并噁唑酮（1j）。产率：47%，Mp. 75-78°C。

实施例 2



X = NH 或 O; Y = H 或 Br

1,2-二氨基-5,6,7,8-四氢萘（2a）

将 1-（乙酰氨基）-2-硝基-5,6,7,8-四氢萘（25g；10.7mmol）悬浮于二甲氧乙烷（30ml）和氢氧化钠水溶液（32ml，1M）的混合物中。该混合物加热回流 2 小时。冷却后，加入两体积的冰水，将盐酸（32ml，1M）中和混合物。过滤产品，用水洗涤，空气干燥，得到 1-氨基-2-硝基-5,6,7,8-四氢萘（1.95g，95%）。将此产品（1.92g；10.0mmol）溶于乙醇中，在常压下进行氢化，以 Pd/C（5%）做催化剂。当停止吸收氢气时，经硅藻土过滤混合物，蒸发滤液至干，得到 1,2-二氨基-5,6,7,8-四氢萘（1.55g，96%）。

按照相似的方法, 从 1-(乙酰氨基)-4-溴-2-硝基苯可以制备得到 1, 2-二氨基苯 (2b) (实施例 4)。

按照相似的方法, 从 2, 3-二氯-4-溴-6-硝基 N-乙酰苯胺可以制备得到 3, 4-二氯苯二胺 (2c) (实施例 4)。

5, 6, 7, 8-四氢萘并[1, 2-d]咪唑啉酮 (2d)

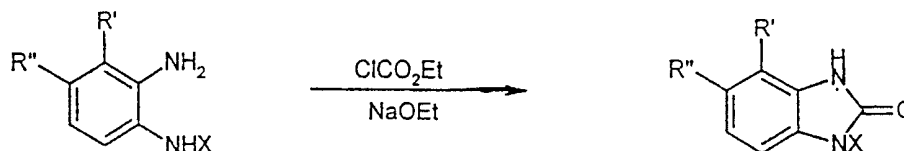
向 1, 2-二氨基-5, 6, 7, 8-四氢萘 (1.5g; 9.3mmol) 的二甘醇二甲醚溶液 (40ml) 中加入尿素 (0.73g; 12.04mmol), 混合物在 160°C 下加热 2h。冷却后, 将混合物倾入冰水中。过滤产品, 用水洗涤并干燥。定量得到产品。

萘并[1, 2-d] 咪唑啉酮 (2e)

按照相似的方法, 用氢氧化钠水溶液处理 1-(乙酰氨基)-4-溴-2-硝基苯, 得到 4-溴-2-硝基-1-萘, 即取代反应代替了水解反应。随后氢化反应和用尿素处理得到了萘并[1, 2-d] 咪唑啉 (2e), 总产率为 44%。

通过氢化反应和随后在二甘醇二甲醚中用尿素进行处理, 从 5-氨基-6-硝基喹啉可以制备得到喹啉并[5, 6-d]咪唑啉酮 (2f), 总产率为 91%。

实施例 2a



萘并[1, 2-d]咪唑啉酮 (2g)

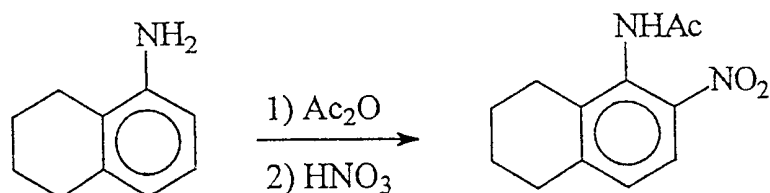
在 10 分钟内, 向 1, 2-二氨基萘 (6.3g, 39.9mmol) 和三乙胺 (18ml, 128mmol) 的无水 THF (50ml) 溶液中加入氯代甲酸乙基酯 (11.5ml, 120mmol)。使混合物加热回流 1.5 小时。蒸发溶剂, 残渣在水和乙酸乙酯之间进行分配。减压浓缩有机相, 将残渣溶于无水乙醇中 (50ml)。加入乙醇钠的乙醇溶液 (8ml, 2M), 混合物加热回流过夜。浓缩反应混合

物，可以定量地得到沉淀产品。

相似地，从 4-氨基-(苄基氨基)苯并-2,1,3-噻二唑(实施例 5)可以制备得到 3-苄基-(2,1,3-噻二唑并)[4,5-g]苯并咪唑啉酮(1e)。产品用二氯甲烷研制。产率: 21%, Mp. 245-247°C。

相似地，从 3,4-苯二胺(实施例 4)可以制备得到 4,5-二氯苯并咪唑啉酮(2h)。

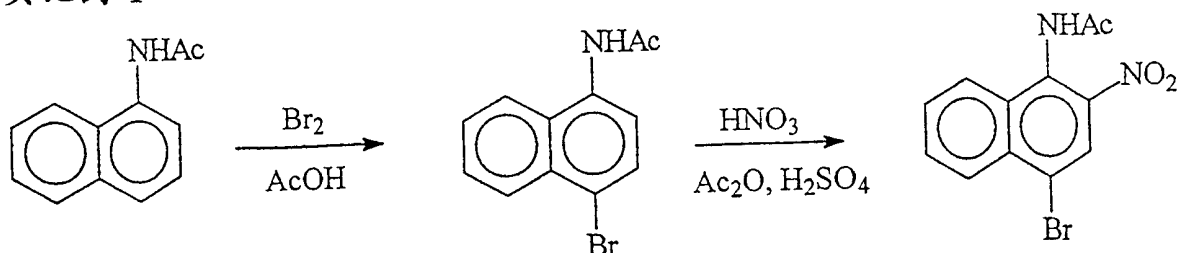
实施例 3



1-(乙酰氨基)-2-硝基-5,6,7,8-四氢萘(3a)

将 1-氨基-5,6,7,8-四氢萘(5ml; 30mmol)的乙酸酐溶液(75ml)在室温下搅拌 30 分钟。冷却至 15°C 后，加入硝酸(15ml, 65%)，再使混合物升温至室温。继续搅拌过夜。将混合物倾入冰水中，滤除油性沉淀，用水洗涤，干燥。粗品经硅胶层析纯化，以乙酸乙酯和二甘醇二甲醚(1: 1)洗脱，产量: 2.5g (30%)。

实施例 4



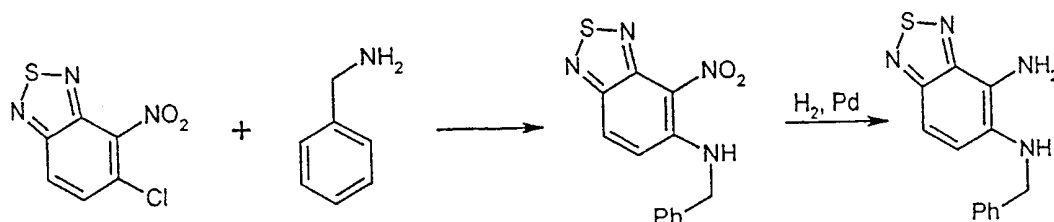
1-(乙酰氨基)-4-溴-2-硝基萘(4a)

在 30 分钟内，向 1-(乙酰氨基)萘(42g; 0.23mmol)的冰醋酸溶液(400ml)中加入溴(12.8ml; 0.25mmol)的冰醋酸溶液(50ml)。生成的混合物在室温下搅拌 3.5 小时。将混合物倾入冰水中，滤集产品，用水洗涤并干燥。得到 1-(乙酰氨基)-4-溴萘。产量: 60g (100%)。

将此产品 (60g; 0.23mmol) 悬浮于乙酸酐中 (600ml), 并用冰浴冷却。加入浓硫酸 (10ml), 接着在剧烈搅拌下, 于 10-15°C 下, 滴加冷硝酸 (9.5ml, 65%) 的乙酸酐溶液 (100ml)。加入结束后 (1.5 小时), 混合物再搅拌 1 小时。将生成的混合物倾入冰水 (1L) 中, 滤集产品, 用水洗涤, 干燥。用无水乙醇重结晶 (1.3L), 得到 1-(乙酰氨基)-4-溴-2-硝基苯 (29.1g, 41%)。

相似地, 从 2,3-二氯苯胺可以制备得到 2,3-二氯-4-溴-6-硝基 N-乙酰苯胺 (4b)。

实施例 5



4-氨基-5-(苄基氨基)苯并-2,1,3-噻二唑 (5a)

向 5-氯-4-硝基-2,1,3-噻二唑 (1.0g, 4.64mmol) 的无水 NMP (5ml) 溶液中加入三乙胺 (0.65ml, 4.64mmol) 和苄胺 (0.51ml, 4.64mmol)。混合物加热至 80°C, 保持 1 小时。将冷却的混合物倾入冰水 (50ml) 中, 滤集产品, 用水洗涤, 干燥。产率: 1g (75%)。将此产品 (0.51g, 1.75mmol) 悬浮于乙醇 (20ml), 在常压下进行氢化, 以 Pd/C (5%) 做催化剂。产率: 定量得到产品。

实施例 6

电生理实验

在此实验中, 用电生理斑贴夹 (patch-clamp) 技术证明了本发明化合物的生理学活性。

从人类胎盘中克隆了中间传导 Ca²⁺活化 K⁺-通道 (IK 通道), 并在 HEK293 细胞中稳定表达。在斑贴夹技术的全细胞方式下记录通过通道的离子流。

IK 在 HEK293 细胞中的稳定表达

采用 EcoR 1 和 Not 1 从 pT3T7 (Genbank Acc. No. N56819) 上切除人类 IK (hIK), 并将其单克隆至哺乳动物表达载体 pNS1Z (NeuroSearch) 上, 这是一种常规的 pcDNA3Zeo(Invitrogen) 设计衍生物, 得到 pNS1Z-hIK 的质粒结构。

在 37°C 及 5%CO₂ 下, 使 HEK293 组织培养细胞在补充有 10%FCS (胎儿牛血清) 的 DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) 中进行生长。在转染前一天, 将 10⁶ 细胞平铺于细胞培养基 T25 烧瓶中。接下来的一天, 用脂转染 (20μl Lipofectamin™, Life Technologies, 在 540μl 的总体积中含有 2.5μg 的质粒 pNS1Z-hIK) 对细胞进行转染。

将脂转染混合物平铺在细胞上, 并在 37°C 下培养 5 小时。用常规的介质淋洗细胞, 并在 37°C 及 5%CO₂ 下, 于 DMEM, 10%FCS 中使之生长 72 小时。

转染 72 小时后, 在补充有 0.25mg/ml Zeocin 的介质中, 选择被 pNS1Z-hIK 转染的细胞。挑出单克隆的, 并使之在选择的介质中进行繁殖, 直至获得足够用于冷冻的细胞为止。此后, 细胞在常规的不含选择试剂的介质中进行培养。

全细胞记录

在几个斑贴夹装置之中的一个上进行实验。将平铺于载玻片上的细胞置于 15μl 的灌注室中 (流速约为 1ml/分钟), 将其升至配备有 Normarski 或 Hoffmann 光学的 IMT-2 显微镜下。将显微镜置于处于落地 Faraday 骨架中可自由振动的桌面上。所有的实验均在室温 (20-22°C) 下进行。通过 ITC16 界面使 EPC-9 斑夹放大器 (HEKA-电子, Lambrect, Germany) 与 Macintosh 计算机连接。数据直接储存在硬盘上, 并用 IGOR 软件 (WaveMetrics. Lack Oswega, USA) 分析。

应用斑贴夹技术的全细胞构型。将硼硅酸移液管顶部 (电阻为 2-4MΩ) 温和地 (遥控系统) 置于细胞膜上。轻抽吸导致了大封口 (移液管的电阻增至大于 1GΩ), 然后用更强的抽吸使细胞破裂。对细胞的电容进

行电补偿，测量移液管和细胞内（系列电阻， R_s ）之间的电阻和补偿。通常细胞电容的范围为 5-20pF（取决于细胞的大小），系列电阻的范围为 3-6M Ω 。在实验期间更新 R_s 以及电容补偿（在每次刺激之前）。

取消带有漂移 R_s -值的所有实验，不进行 Leak-subtractions 实验。

溶液

表 1 中所述的所有化合物均进行此项实验。

细胞外溶液（浴）含有：144mM KCl, 2mM CaCl_2 , 1mM MgCl_2 , 1mM HEPES (pH=7.4)。将受试化合物溶于来自储备液的 DMSO 中，然后在细胞外液中稀释至终浓度约为 10 μM 。 CaCl_2 的浓度为 7.6mM, MgCl_2 的浓度为 1.2mM, 相应地给出 300nM 和 1mM 的计算游离浓度。

定量

在建立了全细胞构型后，将电压-ramps（通常为 -100 至 +100mV）每隔 5 分钟应用于细胞。在 100-300 秒内得到了一根稳定的基线电流，然后通过将细胞外液换成含有化合物的溶液加入化合物。在这些情况下，天然 HEK293 细胞中非常小的内源电流（100mV 下 <200pA，与 2-20 nA IK 电流比较）被活化。

结果

在终浓度约为 10 μM 下，所有的受试化合物均显示出活性，因此这些化合物是 SK/IK/BK 通道调节剂。