(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103214552 B
(45)授权公告日 2015.01.21

(21)申请号 201210426909.4

(22)申请日 2012.10.31

(73)专利权人 兰州大学
地址 730000 甘肃省兰州市城关区天水南路222号

(72)发明人 王锐 刘鑫 王媛 邢燕红 赵德鹏

(74)专利代理机构 甘肃省知识产权事务中心 62100
代理人 张英荷

(51)Int.Cl.
C07K 5/023(2006.01)
A61K 38/07(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 102659920 A,2012.09.12, 全文.
CN 102241737 A,2011.11.16, 全文.
CN 102558297 A,2012.07.11, 第0010-0014、0033段.
Chang-lin Wang et al..Synthesis and antinociceptive effects of endomorphin-1 analogs with C-terminal linked by oligoarginine.《Peptides》.2010, 第32卷(第2期), 第293-299页.

审查员 段珊

权利要求书4页 说明书23页 附图11页

(54)发明名称

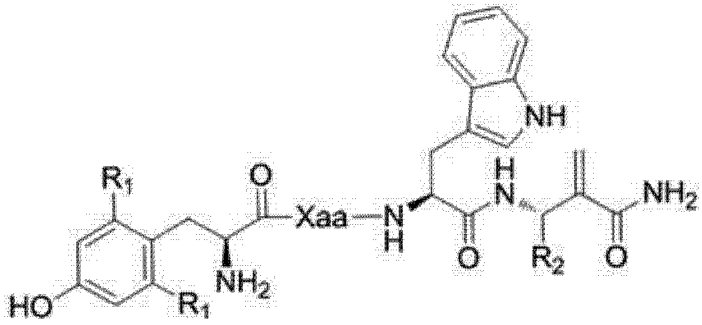
多位点修饰的内吗啡肽-1类似物的合成和应用

(57)摘要

本发明提供了多位点修饰的内吗啡肽-1类似物，属于生物医药领域。该内吗啡肽-1类似物是将内吗啡肽-1的第1位氨基酸由酪氨酸或2,6-二甲基酪氨酸替代，第二位氨基酸由脯氨酸或(*S/R*)β-脯氨酸替代，第4位氨基酸分别由苯基、2-呋喃基取代的α-烯基-β-氨基酸替换而得。通过放射配体受体结合实验，离体器官生物检测，cAMP累积实验，离体酶解稳定性和温浴甩尾镇痛实验，对本发明中多位点修饰的内吗啡肽-1类似物进行药理学活性鉴定。结果表明，这类新型类似物较内吗啡肽-1有高亲和能力、高酶解稳定性和高镇痛活性等优点，在设计合成多肽类镇痛药物中具有很高的应用价值。

CN 103214552 B

1. 一类多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物，其结构式如下：



Xaa 为脯氨酸时，R_1 为甲基；

Xaa 为(*S*/*R*) β - 脯氨酸时，R_1 为氢或者甲基；

Xaa 为脯氨酸或(*S*/*R*) β - 脯氨酸时，R_2 为苯基或 2- 呋喃基。

2. 一种如权利要求 1 所述的多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物的合成方法，包括以下工艺步骤：

(1) N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸或 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸溶于无水处理的二氯甲烷，于 0-5℃下依次加入 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸或 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸摩尔量 4-5 倍量的 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45-1.5 倍量的 1- 羟基苯并三唑，1.5-1.6 倍量的 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸或 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸摩尔量 1.2-1.5 倍的氨水，室温反应 10-12 小时；反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺；

(2) 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺合成

将化合物 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺溶于乙酸乙酯和盐酸的混合溶液中，室温反应 2-2.5 小时后，调节 pH=9-10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺；

(3)N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸溶于无水处理的二氯甲烷，于 0-5℃下依次加入 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸摩尔量 4-5 倍量的 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45-1.5 倍量的 1- 羟基苯并三唑，1.5-1.6 倍量的 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 10-12 小时，反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺；所述 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 3- 氨

基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的摩尔量为 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸的 1.2-1.5 倍；

（4）N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸或（*S/R*）β - 脯氨酸的合成

将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸溶于无水二氯甲烷，0-5℃搅拌下依次加入 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸摩尔量 4-5 倍量的 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45-1.5 倍量的 1- 羟基苯并三唑，1.5-1.6 倍量的 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入脯氨酸或（*S/R*）β - 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 10-12 小时，反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸或（*S/R*）β - 脯氨酸；所述脯氨酸或（*S/R*）β - 脯氨酸的摩尔量为 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸的 1.2-1.5 倍；

（5）色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺溶于乙酸乙酯和盐酸的混合溶液中，室温反应 2-2.5 小时后，调节 pH=9-10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺；

（6）N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸溶于无水二氯甲烷，于 0-5℃下依次加入 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸摩尔量 4-5 倍量的 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45-1.5 倍量的 1- 羟基苯并三唑，1.5-1.6 倍量的 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 12-16 小时，反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺；所述色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的摩尔量为 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸的 1.2-1.5 倍；

（7）N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸溶于无水二氯甲烷，于 0-5℃下依次加入 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸摩尔量 4-5 倍量的 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45-1.5 倍量的 1- 羟基苯并三唑，1.5-1.6 倍量的 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 12-16 小时，反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S/R）β 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色

氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺；所述色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺的摩尔量为 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸的 1.2-1.5 倍；

（8）N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(S/R)β - 脯氨酸溶于无水二氯甲烷，于 0-5℃下依次加入 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸摩尔量 4-5 倍量的 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45-1.5 倍量的 1- 羟基苯并三唑，1.5-1.6 倍量的 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 12-16 小时，反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺；所述色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的摩尔量为 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸的 1.2-1.5 倍；

（9）2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺溶于乙酸乙酯和盐酸的混合溶液中，乙酸乙酯和盐酸的体积比为 4:1-4.5:1，室温反应 2-2.5 小时后，调节 pH=9-10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体 2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺；

（10）酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺溶于乙酸乙酯和盐酸的混合溶液中，乙酸乙酯和盐酸的体积比为 4:1-4.5:1，室温反应 2-2.5 小时后，调节 pH=9-10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺；

（11）2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 2,6- 二甲基酪氨酸 -(S/R)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺溶于乙酸乙酯和盐酸的混合溶液中，乙酸乙酯

和盐酸的体积比为 4:1-4.5:1，室温反应 2-2.5 小时后，调节 pH=9-10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体 2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺或 2,6- 二甲基酪氨酸 -（S/R）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺。

3. 一种如权利要求 1 所述的多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物在制备镇痛药中的应用。

多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物的合成和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域，涉及一类内吗啡肽 -1（Endomorphin-1，EM-1）类似物及其合成方法，尤其涉及一种多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物及其合成方法；本发明同时还涉及该内吗啡肽 -1 类似物在制备镇痛药物方面的应用。

背景技术

[0002] “疼痛”是指病人身体内部的伤害性感觉，它包括伤害性刺激作用于机体所引起的痛感觉，以及机体对伤害性刺激的痛反应。长期疼痛给患者带来痛苦和不安，剧痛还可以引起失眠或其他生物功能紊乱，影响患者的生活质量。因此，疼痛药物的研发一直是全球性的热点和难点。目前临床上使用的镇痛药物主要包括非甾体抗炎类药物（解热镇痛药），阿片类镇痛药物和辅助镇痛药物。其中，阿片类镇痛药物主要通过与 μ 阿片受体结合发挥其镇痛作用，不论是创伤痛、术后痛等急性痛，还是癌痛等慢性疼痛，阿片类镇痛药物都发挥着非常重要的作用，尤其在治疗中度疼痛和重度疼痛时其作用不可替代。但是阿片类镇痛药也有一定的副作用，不同程度的耐受和成瘾，以及长期使用导致的便秘、恶心和呼吸抑制使其临床应用受到很大的局限。1997 年 μ 阿片受体的内源性配体内吗啡肽被发现后，科学家们对其进行了广泛深入的研究（*NatuRe.* 1997, *386*, 499）。

[0003] 内吗啡肽是一种内源性阿片肽物质，通过与 G 蛋白偶联的 μ 阿片受体结合，参与了包括痛觉、呼吸、心血管、胃肠、内分泌、行为等诸多功能的调节，其主要作用体现在镇痛功能上。其中内吗啡肽 -1（Ty*R*-P*R*o-T*R*p-Phe-NH_2，EM-1）具有优于内吗啡肽 -2（Ty*R*-P*R*o-Phe-Phe-NH_2，EM-2）的治疗学特性，如奖赏行为与镇痛作用的分离，耐受的形成较 EM-2 发展更慢，镇痛剂量明显低于引起呼吸抑制及心血管作用的剂量等，其在发挥镇痛作用的同时较少产生副作用，被认为是一种有很好应用潜力的镇痛候选药。

[0004] 内吗啡肽 -1 在发挥其镇痛作用的同时，也具有作用时间短、酶解稳定性差等缺点，从而限制其在临床上的应用。因此，通过化学改造修饰内吗啡肽 -1 提高其亲和能力和酶解稳定性，以获得一系列神经肽受体的高效配体成为近年来研究的方向。非天然氨基酸在研究多肽结构和功能应用方面有非常重要的作用，通过基团替换模拟原有的天然结构，能够进一步探讨天然配体的构效关系。近年来研究显示，通过多位点修饰的多肽药物能够对其结构和活性产生明显影响（*J. Med. Chem.* 2002, 45, 2571; *BiooRg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 2755）。使用非天然氨基酸修饰内吗啡肽的不同位点，对其进行有针对性的化学改造，已经成为发展内吗啡肽 -1 成为临床多肽镇痛药物的研究方向。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种多位点修饰内吗啡肽 -1 类似物的合成方法。

[0007] 本发明还有一个目的，就是提供一种多位点修饰内吗啡肽 -1 类似物在制备镇痛药物中的应用。

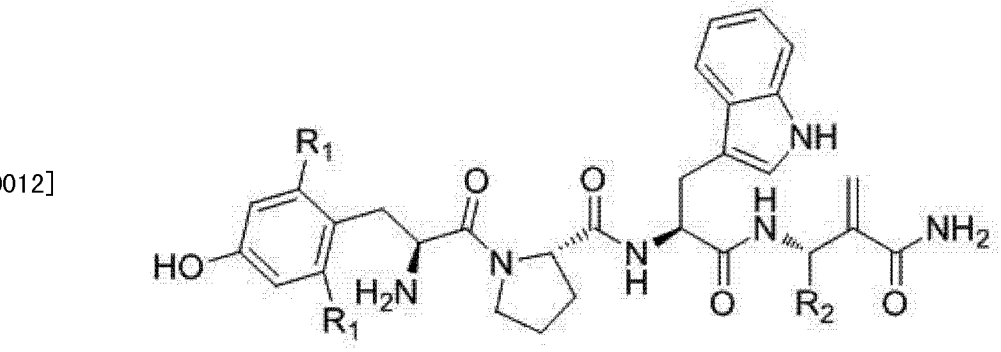
[0008] 一、多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物

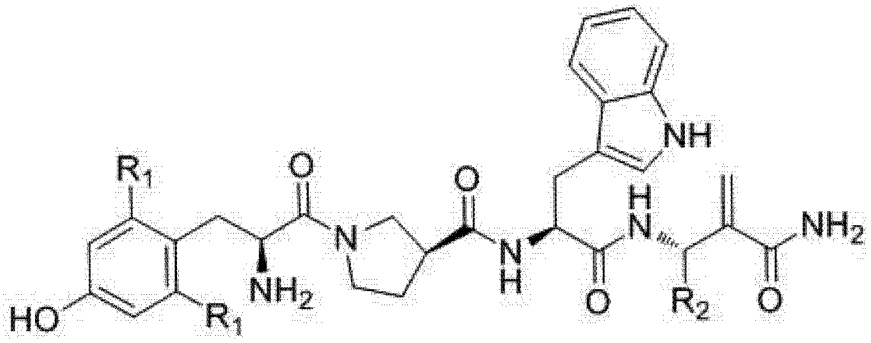
[0009] 1、多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物的结构

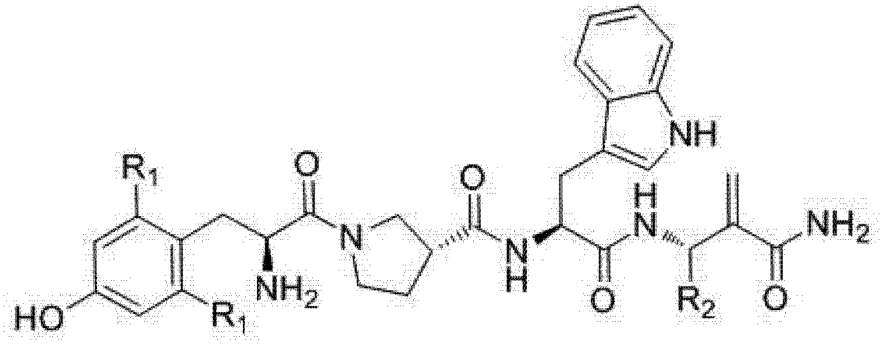
[0010] 本发明多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物，是针对内吗啡肽 -1 的第 1、2、4 位进行组合改造，即内吗啡肽 -1 的第 1 位氨基酸由酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸替代，第二位氨基酸由脯氨酸或 (*S*/*R*) β - 脯氨酸替代，第 4 位氨基酸分别由苯基、2- 呋喃基取代的 α - 烯基 - β - 氨基酸替代而得。

[0011] 其结构通式为下列之一：

[0012]







[0013] 其中，R_1 为 H 或甲基；R_2 为苯基或 2- 呋喃基。

[0014] 根据有无对第 1 位氨基酸的修饰，将类似物分为两大类：TM 系列代表第 1 位的酪氨酸未修饰，DM 系列代表第 1 位为 2,6- 二甲基酪氨酸修饰。

[0015] TM 系列有：第 1 位为酪氨酸，第 2 位为 (*S*) β - 脯氨酸，第 4 位 *R* 为苯基的内吗啡肽 -1 类似物记为 [TSPM]-EM-1；第 1 位为酪氨酸，第 2 位为 (*R*) β - 脯氨酸，第 4 位 *R* 为苯基的内吗啡肽 -1 类似物记为 [T*R*PM]-EM-1；第 1 位为酪氨酸，第 2 位为 (*S*) β - 脯氨酸，第 4 位 *R* 为 2- 呋喃基的内吗啡肽 -1 类似物记为 [TSFM]-EM-1；第 1 位为酪氨酸，第 2 位为 (*R*)

β-脯氨酸，第4位*R*为2-呋喃基的内吗啡肽-1类似物记为[T*R*FM]-EM-1。

[0016] DM系列有：第1位为2,6-二甲基酪氨酸，第2位为脯氨酸，第4位*R*为苯基的内吗啡肽-1类似物记为[DPPM]-EM-1；第1位为酪氨酸或2,6-二甲基酪氨酸，第2位为脯氨酸，第4位*R*为呋喃基的内吗啡肽-1类似物记为[DPFM]-EM-1；第一位为2,6-二甲基酪氨酸，第2位为(*S*)β-脯氨酸，第4位*R*为苯基的内吗啡肽-1类似物记为[DSPM]-EM-1；第1位为2,6-二甲基酪氨酸，第2位为(*R*)β-脯氨酸，第4位*R*为苯基的内吗啡肽-1类似物记为[D*R*PM]-EM-1；第1位为2,6-二甲基酪氨酸，第2位为(*S*)β-脯氨酸，第4位*R*为2-呋喃基的内吗啡肽-1类似物记为[DSFM]-EM-1；第1位为2,6-二甲基酪氨酸，第2位为(*R*)β-脯氨酸，第4位*R*为2-呋喃基的内吗啡肽-1类似物记为[D*R*FM]-EM-1。

[0017] 2、多位点修饰的内吗啡肽-1类似物的合成

[0018] 本发明多位点修饰的内吗啡肽-1类似物的合成方法，包括以下工艺步骤：

[0019] (1)N-叔丁氧羰基-α-烯基-β-氨基酸酰胺的合成

[0020] 将N-叔丁氧羰基-α-烯基-β-氨基酸溶于无水二氯甲烷，于0~5℃下依次加入N-叔丁氧羰基-α-烯基-β-氨基酸摩尔量4~5倍量的N,N-二异丙基乙基胺，1.45~1.5倍量的1-羟基苯并三唑，1.5~1.6倍量的1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入N-叔丁氧羰基-α-烯基-β-氨基酸摩尔量1.2~1.5倍的氨水，室温反应10~12小时；反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体N-叔丁氧羰基-α-烯基-β-氨基酸酰胺。

[0021] 所述N-叔丁氧羰基-α-烯基-β-氨基酸为N-叔丁氧羰基-3-氨基-2-甲烯基-3苯基丙酸或N-叔丁氧羰基-3-氨基-2-甲烯基-3-(2-呋喃)丙酸。

[0022] (2)α-烯基-β-氨基酸酰胺的合成

[0023] 将化合物N-叔丁氧羰基-α-烯基-β-氨基酸酰胺溶于乙酸乙酯与盐酸的混合溶液中，室温反应2~2.5小时后，调节pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体α-烯基-β-氨基酸酰胺。

[0024] (3)N-叔丁氧羰基-色氨酸-α-烯基-β-氨基酸酰胺的合成

[0025] 将N-叔丁氧羰基-色氨酸溶于无水二氯甲烷，于0~5℃下依次加入N-叔丁氧羰基-色氨酸摩尔量4~5倍量的N,N-二异丙基乙基胺，1.45~1.5倍量的1-羟基苯并三唑，1.5~1.6倍量的1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入α-烯基-β-酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应10~12小时，反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物N-叔丁氧羰基-色氨酸-α-烯基-β-氨基酸酰胺。

[0026] 所述α-烯基-β-氨基酸酰胺的摩尔量为N-叔丁氧羰基-色氨酸的1.2~1.5倍。

[0027] (4)N-叔丁氧羰基-酪氨酸或2,6-二甲基酪氨酸-脯氨酸或(*S*/*R*)β-脯氨酸的合成

[0028] 将N-叔丁氧羰基-酪氨酸或2,6-二甲基酪氨酸溶于无水二氯甲烷，0~5℃搅拌下依次加入N-叔丁氧羰基-酪氨酸或2,6-二甲基酪氨酸摩尔量4~5倍量的N,N-二异丙基乙基胺，1.45~1.5倍量的1-羟基苯并三唑，1.5~1.6倍量的1-乙基-3-(3-二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入脯氨酸或(*S*/*R*)β-脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应10~12小时，反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物N-叔丁氧羰基-酪氨酸或2,6-二甲基酪氨酸-脯氨酸或(*S*/*R*)β-脯氨酸。

[0029] 所述脯氨酸或(*S/R*) β－脯氨酸的摩尔量为 N- 叔丁氧羰基－酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸的 1.2~1.5 倍。

[0030] (5)色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺的合成

[0031] 将 N- 叔丁氧羰基－色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺溶于乙酸乙酯与盐酸的混合溶液中，室温反应 2~2.5 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺。

[0032] (6)N- 叔丁氧羰基－酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸－脯氨酸或(*S/R*)β－脯氨酸－色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺的合成

[0033] 将 N- 叔丁氧羰基－酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸－脯氨酸或(*S/R*) β－脯氨酸溶于无水二氯甲烷，于 0~5℃下依次加入 N- 叔丁氧羰基－酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸－脯氨酸或(*S/R*) β－脯氨酸摩尔量 4~5 倍量的 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45~1.5 倍量的 1- 羟基苯并三唑，1.5~1.6 倍量的 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 12~16 小时，反应结束后洗涤，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物 N- 叔丁氧羰基－酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸－脯氨酸或(*S/R*) β－脯氨酸－色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺。

[0034] 所述色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺的摩尔量为 N- 叔丁氧羰基－酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸－脯氨酸或(*S/R*) β－脯氨酸的 1.2~1.5 倍。

[0035] (7)酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸－脯氨酸或(*S/R*) β－脯氨酸－色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺的合成

[0036] 将 N- 叔丁氧羰基－酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸－脯氨酸或(*S/R*)β－脯氨酸－色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺溶于乙酸乙酯与盐酸的混合溶液中，室温反应 2~2.5 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体酪氨酸或 2,6- 二甲基酪氨酸－脯氨酸或(*S/R*) β－脯氨酸－色氨酸－α－烯基－β－氨基酸酰胺。

[0037] 上述步骤(2)、(5)、(7)所述乙酸乙酯与盐酸的混合溶液中，乙酸乙酯和盐酸的体积比为 4:1~4.5:1。

[0038] 本发明制备的多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物经 ESI-MS 测试(见 3~ 图 12)，表明内吗啡肽 -1 类似物合成成功。各类似物的理化特征见表 1。

[0039] 表 1. EM-1 及其类似物的理化特征

[0040]

化合物	ESI-MS[M+H]$^+$		*R*P-HPLC[a]	TLC[b]	$[\alpha]_D^{20}$[c]	MP(℃)
	calcd	found	(min)	R_f		
EM-1	611	611.5010	15.507	0.47	-20	160-162
[DPPM]-EM-1	651	651.3324	16.132	0.51	+31	164-166
[DPFM]-EM-1	641	641.3090	16.829	0.55	+33	162-165
[DSPM]-EM-1	651	651.3325	15.922	0.49	+66	133-135
[DSFM]-EM-1	641	641.3106	15.590	0.52	+69	141-145
[D*R*PM]-EM-1	651	651.3319	16.395	0.57	+42	151-153
[D*R*FM]-EM-1	641	641.3120	16.643	0.58	+48	156-158
[TSPM]-EM-1	623	623.3019	15.533	0.47	-18	133-135
[TSFM]-EM-1	613	613.2803	15.309	0.42	-15	137-139
[T*R*PM]-EM-1	623	623.3008	15.020	0.48	-9	140-143
[T*R*FM]-EM-1	613	613.2804	14.992	0.43	-18	129-132

[0041] a. HPLC 测定的保留时间 :分析柱 :Wate*R*s Delta-Pak C18 column (3.9 mm × 150 mm);流动相流速 1ml/min,流动相 = 乙腈 /0.05% TFA (A) + 水 /0.05% TFA (B)。流动相 A :B = 5 :95 → 95 :5 ;洗脱梯度 :0-30 min ;A :B = 95 :5 → 5 :95,洗脱梯度 :30-35 min。

[0042] b. 高效硅胶板上的 *R*f 值 :展开体系为乙酸乙酯 / 甲醇 / 氨水 = 30: 10: 1。

[0043] c. 溶液浓度 :c=0.3, 溶剂 :MeOH。

[0044] (二) 多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物的药理活性实验

[0045] 本发明合成的多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物,因为其多位点的修饰,能够能强其镇痛能力,增加其抗酶解能力,从而提高其生物利用度,具备良好的药理学活性和潜在的临床应用价值。下面通过放射配体受体结合实验,离体器官生物检定,cAMP 累积实验,离体酶解稳定性和温浴甩尾镇痛实验对本发明多位点修饰的内吗啡肽 -1 类似物的药理学活性进行鉴定。

[0046] 1 放射配体受体结合试验(*R*adioligand binding assay)

[0047] 1.1 稳定表达细胞株的筛选和培养

[0048] 本实验细胞采用 HEK293 (人胚胎肾细胞),用含有 10% 胎牛血清 DMEM 培养液培养细胞,并放于 5% CO_2 培养箱中促进其生长。设计相应引物用于构建含有目的基因的真核表达质粒 :pcDNA3.1(+)-FLAG-MO*R* 和 pcDNA3.1(+)-HA-DO*R*。将构建好的真核表达质粒用转染试剂将其转入 HEK293 (人胚肾细胞)中,48 小时后将细胞无限稀释并用抗生素 G418 进行筛选,3 周后对存活细胞进行基因组、*R*NA、蛋白、功能方面的一系列鉴定,筛选出稳定表达 μ / δ 阿片受体的细胞株。筛选出的稳定细胞株加入 800ug/ml G418 隔天培养后,将细胞用 PBS 缓冲液吹下,离心后用适量亲和缓冲液(25 mM Hepes, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 2.5 mM EDTA, 0.4% BSA, 盐酸调 pH=7.4) 重悬待用。

[0049] 1.2 受体结合实验

[0050] 实验分为总结合管、竞争结合管和非特异性结合管,每个反应管中依次加入放射配体,纳洛酮(Naloxone,Nx)/ 非放射性药物,T*R*is-HCl (pH=7.4)和细胞悬液(200ul)。其中,在总结合管中只加入 [^{3}H]DAMGO(0.5nM)和细胞悬液(200ul),在非特异性结合管和竞争结合管中,分别另加入 10μM Nx/ 不同浓度的类似物和细胞悬液,最后补充 T*R*is-HCl 缓冲液(pH=7.4)至总体积 0.4ml。振荡器混匀反应液,37℃摇床反应 1h,取出离心管,反应液经

ZT-II 型细胞收集器收集，GF/C 型玻璃纤维素膜过滤。80℃油浴下烘烤玻璃纤维素膜 30min 后取出滤膜，放入 24 孔板中，每孔加入 0.7 ml 闪烁液，封盖膜封盖。隔夜用 β 液体闪烁计数仪记录放射性强度（CPM）。计算类似物对特异性结合的抑制率，以浓度的负对数为横坐标，抑制率为纵坐标，线性回归求得 IC50 值，根据公式 Ki=IC50/(1+[L]/KD) 计算 Ki 值。每个实验数据分别平行做 3 组实验求平均值。

[0051] 1.3 实验结果

[0052] 实验结果见表 2。表 2 的实验数据显示，DM 系列类似物的 μ 阿片受体和 δ 阿片受体的亲和性都明显高于母体，TM 系列 μ 阿片受体有一定提高，δ 阿片受体的亲和性与母体基本一致。所有类似物的受体选择性都明显提高。

[0053] 表 2 . EM-1 及其类似物的 μ / δ 阿片受体亲和能力

[0054]

化合物	Ki（nM）	
	μ-*OR*	δ-*OR*
EM-1	2.60 ± 0.21	6080 ± 640
[DPPM]-EM-1	0.03225 ± 0.00525	25.64 ± 3.45
[DPFM]-EM-1	0.04051 ± 0.01801	22.23 ± 3.29
[DSPM]-EM-1	0.01370 ± 0.00020	18.94 ± 1.99
[DSFM]-EM-1	0.01485 ± 0.00198	30.38 ± 3.23
[D*R*PM]-EM-1	0.01089 ± 0.00103	27.33 ± 1.21
[D*R*FM]-EM-1	0.00372 ± 0.00062	85.78 ± 5.23
[TSPM]-EM-1	0.5740 ± 0.0720	5585 ± 353
[TSFM]-EM-1	0.7583 ± 0.0471	6947 ± 813
[T*R*PM]-EM-1	0.2960 ± 0.0281	2807 ± 135
[T*R*FM]-EM-1	0.1653 ± 0.0176	2784 ± 151

[0055] 2. cAMP 累积实验（cAMP accumulation）

[0056] 2.1 实验方法

[0057] 将 1.1 培养的细胞以 11 万 / 孔的密度接种到 24 孔板中，培养 24 小时后用预温的培养液 DMEM（含有 1mM IBMX）在 37℃预孵育 10min。加入相应浓度的药物后 37℃孵育 30min。吸去培养液，加 500ul 0.2uM 的 HCl 在室温下裂解 30min，然后用 10ul 10M 的 NaOH 中和。离心 14,000*R*pm,2min。取 20ul 中和后的上清，空白孔加 100ul TE cAMP 缓冲液，其它孔加 100ul 60ug/ml 的蛋白激酶 A（PKA）。每孔加 50ul [^{3}H]cAMP，混匀后在 4℃孵育 2h。加 100ul 在 4℃预冷的活性炭悬液，混匀后在冰上放置 1min，离心取上清 200ul。每管加闪烁液 700ul，放置至少 4h 后读数。将读数做拟合曲线求得 EC_{50}。

[0058] 2.2 实验结果

[0059] 实验结果见表 3。表 3 的实验数据显示，上述类似物对 cAMP 累积的抑制能力和对

受体亲和能力的趋势一致。DM 系列和 TM 系列类似物抑制 cAMP 累积的能力较母体有较大的提高，且 E_{max} 显示均为全效激动剂。实验结果表明类似物对药物作用效能方面有大幅度的提升。

[0060] 表 3 .EM-1 及其类似物通过刺激 μ 阿片受体抑制由 Forskolin(10uM) 引起的 cAMP 累积

[0061]

化合物	μ-OR	
	EC_{50}（nM或pM）	E_{max}
DAMGO	3.04 ± 0.32 nM	98.1 ± 6
EM-1	14.4 ± 0.62 nM	83.1 ± 4
[DPPM]-EM-1	0.107 ± 0.001 pM	97.2 ± 3
[DPFM]-EM-1	0.516 ± 0.045 pM	96.5 ± 4
[DSPM]-EM-1	0.130 ±0.003 pM	97.1 ± 6
[DSFM]-EM-1	0.109 ± 0.008 pM	98.6 ± 2
[DRPM]-EM-1	0.091 ± 0.009 pM	98.9 ± 5
[DRFM]-EM-1	0.042 ±0.006 pM	99.5 ± 3
[TSPM]-EM-1	57.7 ± 3.21 pM	95.5 ± 3
[TSFM]-EM-1	93.3 ± 5.14 pM	94.9 ± 4
[TRPM]-EM-1	39.7 ± 2.96 pM	96.8 ± 4
[TRFM]-EM-1	8.53 ± 0.91 pM	96.2 ± 6

[0062] 3. 离体生物活性功能检定（In vitRobioactivity assays）

[0063] 3.1 豚鼠离体回肠纵行肌实验（GPI 实验）

[0064] 体重 250~300g 豚鼠，雌雄不限，实验前禁食 12h，饮水不限。棒击枕部处死，剖腹取出近盲肠端的回肠 6cm 两段，浸入持续通入 95%O_2 和 5%CO_2 混合气的 KReb's 液（g\L：氯化钠 6.9，$CaCl_2$ 0.28，KCl 0.35，KH_2PO_4 0.16，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.30，碳酸氢钠 2.1，葡萄糖 1.98，苯海拉明 50×10^{-6}，氯化胆碱 2.8×10^{-3}）中，湿润后套在一根玻璃棒上，沿回肠壁的一根纵形血管将纵行肌与环形肌分离，然后用零号丝线将纵行肌的一端缚在玻璃电极的小钩上，另一端缚在 JZ-1 型肌肉张力传感器上，制备好后立即放入盛有持续通入气体（95%O_2 和 5%CO_2）的 KReb's 液、恒温 37±0.5℃的玻璃浴管中，预负荷 500mg。前 30min 每 5min 换一次营养液，以后每 10min 换液一次，平衡 2h 后开始实验。给予电刺激，刺激参数：波宽 0.3-0.1ms 单方波，频率 6 次 /min，负载电压 80V。记录基础收缩强度，再给予适量内吗啡肽 -1 鉴定其活性，然后分别给予不同剂量的待试药物，记录收缩强度，计算抑制百分率。每次药物作用后，用营养液冲洗 3 次，平衡 15min。

[0065] 抑制百分率 =（反应前收缩高度 - 反应后收缩高度）/ 反应前收缩高度 ×100%。

[0066] 用剂量 - 效应半对数作图法，以抑制百分率为纵坐标，以待测药物浓度的对数为横坐标作图，求得抑制 50% 收缩高度的药物浓度（IC_{50}）。

[0067] 3.2 小鼠输精管实验（MVD 实验）

[0068] 体重 30~35g 雄性昆明系小白鼠，颈椎脱臼处死，剖腹取出两侧输精管，浸入持续通入 95%O_2 和 5%CO_2 混合气的 KReb's 液（g\L：氯化钠 6.9，$CaCl_2$ 0.28，KCl 0.35，KH_2PO_4 0.16，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.30，碳酸氢钠 2.1，葡萄糖 1.98），剥离附着于其上的脂肪及血管。剪

去输精管的一端，用小棉花球轻轻地从末端向开口端压出管内的精液，变成一条空心管，然后用零号丝线将其一端缚在玻璃电极的小钩上，另一端缚在 JZ-1 型肌肉张力传感器上，制备好后立即放入盛有持续通入气体（95%O_2 和 5%CO_2）的 KReb's 液，恒温 36.5±0.5℃的玻璃浴管中，预负荷 100mg。前 30min 每 5min 换一次营养液，以后每 10min 换液一次，平衡 2h 后开始实验。给予电刺激，刺激参数：波宽 2ms，频率 6 次 /min，负载电压 80V。记录基础收缩强度，再给予适量内吗啡肽 -1 鉴定其活性，然后分别给予不同剂量的待试药物，记录收缩强度。每次药物作用后，用营养液冲洗 5 次，平衡 15min。IC_{50} 测定方法同 GPI 实验。

[0069] 3.3 实验结果

[0070] 实验结果见表 4。表 4 实验数据显示，GPI/MVD 实验与放射配体结合实验结果的趋势是一致的。DM 系列类似物的 GPI/MVD 的 IC_{50} 值都明显高于母体，GPI 的 IC_{50} 值分别达到母体的 17 到 84 倍，TM 系列也能达到 2 到 8 倍；使用 δ 阿片受体特异性拮抗剂 naltRindole 能部分（32%-61%）拮抗这些类似物的 MVD 激动效应，提示这些多肽的高 DOR 激动效应可能主要或部分地由共存于 MVD 上的 MOR 介导。实验结果表明这些类似物在离体生物标本中对 μ / δ 阿片受体有强的激动活性。

[0071] 表 4. EM-1 及其类似物的离体生物活性

[0072]

化合物	IC_{50}(nM)	
	GPI	MVD
EM-1	14.08 ± 0.23	30.4 ± 0.33
[DPPM]-EM-1	0.4679 ± 0.0236	0.5567 ± 0.1188
[DPFM]-EM-1	0.7672 ± 0.1006	0.5326 ± 0.0830
[DSPM]-EM-1	0.5395 ± 0.0436	1.532 ± 0.293
[DSFM]-EM-1	0.8342 ± 0.0233	0.9620 ± 0.1705
[DRPM]-EM-1	0.2264 ± 0.0892	0.4067 ± 0.0710
[DRFM]-EM-1	0.1679 ± 0.0598	0.5483 ± 0.0919
[TSPM]-EM-1	3.2137 ± 0.7771	4.898 ± 0.975
[TSFM]-EM-1	8.1295 ± 0.5093	12.91 ± 1.16
[TRPM]-EM-1	1.8273 ± 0.0711	2.287 ± 0.525
[TRFM]-EM-1	1.6781 ± 0.0672	4.903 ± 0.885

[0073] 4. 离体酶解稳定性试验（In vitRometabolic stability）

[0074] 4.1 15% 小鼠脑质膜标本制备

[0075] 体重 30~35g 成年雄性小鼠，颈椎脱臼处死，取大脑（去除小脑及脑桥）滤纸吸干，称重。用冰冷的 1mM 的 TRis-HCl 缓冲液（pH=7.4）冲洗除去溢血后，加入 50 倍体积（v/w）冰冷 1mM TRis-HCl（pH=7.4）缓冲液，0℃下用匀浆器使之成胞浆匀浆，匀浆液置于冰浴中放置 30 分钟以促进细胞溶解。然后按每 1ml 匀浆液补加 0.5ml 50mM 冰冷的 TRis-HCl，再次匀浆，吹打悬浮。49,000g 离心 45min，弃上清，将沉淀重新悬浮于 50 倍体积的冰冷 50mM TRis-HCl 中，吹打悬浮。49,000g 再次离心 45min，弃上清，沉淀悬浮于适当体积的 50mM TRis-HCl 中，使脑膜蛋白浓度约为 2mg/ml。振荡器震荡涡旋混匀，分装，-80℃冻存。

[0076] 4.2 脑质膜孵育试验

[0077] 取10μl多肽母液(10^{-2}M),加入到190μl脑质膜中,立即振荡混匀,然后迅速取出20μl混合液,加入离心管中计时为0min,余者于37℃下继续孵育,并分别在5min,10min,15min,30min,60min,120min,240min,480min取出20μl。酶解过程的终止:取出的样品中加入90μl乙腈振荡混匀,样品置于冰上放置5分钟,再用90μl 0.5%的冰冷乙酸稀释以确保酶解过程停止。4℃下13,000g离心15min,收集上清,-80℃冻存,直至*RP*-HPLC分析。

[0078] 4.3 反相-高效液相色谱分析

[0079] 运用*RP*-HPLC分析各个时间点样品的离体稳定性。*RP*-HPLC系统使用Wate*R*s Delta 600控制器、紫外监测器和Wate*R*s Delta Pak C18柱(3.9 mm × 150 mm)。脑膜样品在波长280nm下检测,流动相流速0.8ml/min,流动相=乙腈含0.05% TFA (A) +水含0.05% TFA (B)。流动相的体积比为A:B = 10:90~90:10,洗脱时间:0~30 min。实验分别测定每个时间点样品药物浓度,并根据药物代谢公式以每个时间点的药物浓度和时间绘制药物变化曲线计算求得药物得半衰期。每个实验数据平行3组求平均值。

[0080] 4.4 试验结果

[0081] 实验结果见表5。表5的实验数据显示,所有类似物的小鼠脑质膜半衰期都显著长于母体,其中DM系列和TM系列二位使用β-P*R*o取代时酶解稳定性更加显著增加。实验结果表明类似物在离体生物组织中具有好的酶解稳定性,因此可以延长其对镇痛的调节作用。

[0082] 表5. EM-1及其类似物的离体大脑半衰期

[0083]

化合物	酶解稳定性(半衰期,分钟) 15%小鼠大脑质膜
EM-1	16.86±1.6
[DPPM]-EM-1	121±33
[DPFM]-EM-1	137±42
[DSPM]-EM-1	>300
[DSFM]-EM-1	>300
[D*R*PM]-EM-1	>300
[D*R*FM]-EM-1	>300
[TSPM]-EM-1	>300
[TSFM]-EM-1	>300
[T*R*PM]-EM-1	>300
[T*R*FM]-EM-1	>300

[0084] 5 镇痛实验(Assessment of antinociception)

[0085] 5.1 实验方法

[0086] 采用小鼠温浴甩尾法。体重18~20g昆明系雄性小鼠,环境温度20℃,水浴温度50±0.5℃。给药前先测定小鼠的基础痛阈(cont*R*ol latency,CL),将小鼠鼠尾的1/3-1/2

浸入水浴，记录鼠尾从刚浸入水浴至发生收缩的时间。过于敏感(<2.5s)或迟钝的(>5s)小鼠弃去不用，截止时间10s以防小鼠烫伤。药物注射剂量：侧脑室(i.c.v.)注射20nmol/kg。每只小鼠侧脑室分别注射EM-1及类似物4μl，给药后90分钟内，前30min每5分钟测一次，后每10分钟测一次甩尾潜伏期(test latency，TL)，0.9%生理盐水作为空白对照。结果以最大可能效应百分比(maximum possible effect, % MPE)表示：%MPE=100×(TL-CL)/(10-CL)。

[0087] 5.2 实验结果

[0088] 实验结果见图1和图2。如图1所示为DM系列侧脑室注射6.7 nmol/kg的类似物产生的镇痛时效曲线。六种类似物均产生强效的镇痛作用，镇痛效力和镇痛持续时间都明显增加，其最高镇痛能力达到48~90%，且镇痛能力有明显延长。如图2所示为TM系列侧脑室注射20 nmol/kg的类似物产生的镇痛时效曲线。四种类似物产生较强的镇痛作用，镇痛效力和镇痛持续时间都明显增加。实验结果表明类似物在体内能够发挥有效的镇痛作用。

[0089] 综上所述，本发明多位点修饰的内吗啡肽-1类似物较内吗啡肽-1具有高亲和能力、高酶解稳定性和高镇痛活性等优点，因此，其在制备镇痛药物方面具有很好的临床应用价值。

[0090] 本发明相对现有技术具有以下优点和有益效果：

[0091] 1、本发明采用多位点修饰内吗啡肽-1，通过合理有效的改造方式，能够显著提高其μ阿片受体亲和能力及酶解稳定性，从而进一步提高并延长其在体镇痛效果。

[0092] 2、本发明中多位点修饰内吗啡肽-1的合成采用HOBt/EDC活化酯法，具有产率高，成本低，不易消旋，易纯化等特点；“2+2”液相合成法大大简化了合成线路，提高了反应产率，减少了工作时间，降低了合成成本。

附图说明

[0093] 图1是侧脑室注射内吗啡肽-1类似物DM系列镇痛效应-时间曲线。

[0094] 图2是侧脑室注射内吗啡肽-1类似物TM系列镇痛效应-时间曲线。

[0095] 图3是类似物[DPPM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0096] 图4是类似物[DPFM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0097] 图5是类似物[DSPM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0098] 图6是类似物[DSFM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0099] 图7是类似物[DAPM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0100] 图8是类似物[DAFM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0101] 图9是类似物[TSPM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0102] 图10是类似物[TSFM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0103] 图11是类似物[TAPM]-EM-1的ESI-MS谱图。

[0104] 图12是类似物[TAFM]-EM-1的ESI-MS谱图。

具体实施方式

[0105] 下面通过具体实施例对本发明中多位点修饰内吗啡肽-1类似物的结构、合成及理化特征作进一步说明。

[0106] 实施例一、[DPPM]-EM-1 的合成

[0107] (1)N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0108] 将 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷,0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺,1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑,1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺,搅拌充分溶解后加入 1.2 摩尔的氨水,室温反应 12 小时 ;反应结束后加入二氯甲烷稀释,5% 柠檬酸溶液洗涤三次,饱和碳酸氢钠洗涤三次,饱和氯化钠洗涤一次,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸 ;产率 90%。

[0109] (2)3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0110] 将化合物 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 0.8 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中,室温反应 2 小时后,调节 pH=9~10,二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得白色固体产物——3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺,产率 99%。

[0111] (3)N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0112] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷,0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺,1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑,1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺,搅拌充分溶解后,加入 1.2 摩尔 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的二氯甲烷溶液,室温反应 12 小时,反应结束后加入二氯甲烷稀释,5% 柠檬酸溶液洗涤三次,饱和碳酸氢钠洗涤三次,饱和氯化钠洗涤一次,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺,产率 83%。

[0113] (4)N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸的合成

[0114] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷,0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺,1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑,1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺,搅拌充分溶解后,加入 1.2 摩尔脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液,室温反应 12 小时,反应结束后加入二氯甲烷稀释,5% 柠檬酸溶液洗涤三次,饱和氯化钠洗涤一次,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸,产率 82%。

[0115] (5)色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0116] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中,室温反应 2 小时后,调节 pH=9~10,二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺,产率 99%。

[0117] (6)N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0118] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷,0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺,1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑,1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺,搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的二氯甲烷溶液,室温反应 16 小时,反应结束后加入二氯甲烷稀释,5% 柠檬酸溶液洗涤三次,饱和氯化钠洗涤一次,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基

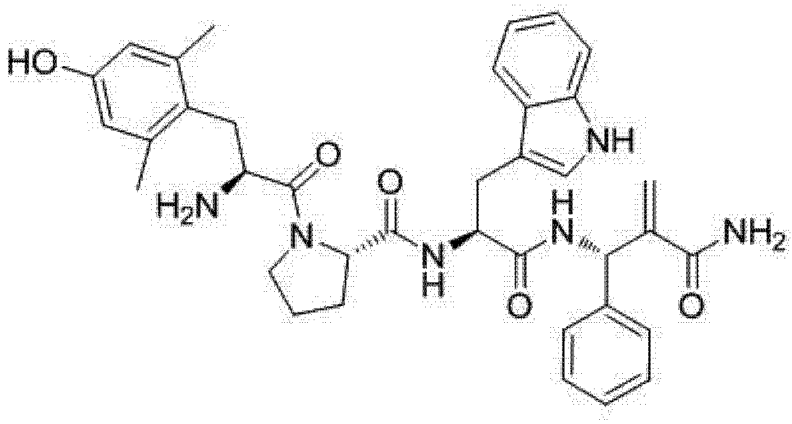
丙酸酰胺，产率 74%。

[0119] （7）2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0120] 将 N- 叔丁氧羰基 2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 [DPPM]-EM-1，产率 98%。

[0121] 其结构式为：

[0122]



[0123] [DPPM]-EM-1 的理化特征见表 1，[DPPM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 3。

[0124] 实施例二、[DPFM]-EM-1 的制备

[0125] （1）N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0126] 将 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌充分溶解后加入 1.2 摩尔的氨水，室温反应 12 小时；反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸，产率 88%。

[0127] （2）3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0128] 将化合物 N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺 0.8 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 99%。

[0129] （3）N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0130] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔 3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 85%。

[0131] （4）N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸的合成

[0132] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸，产率 82%。

[0133] （5）色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0134] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 99%。

[0135] （6）N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

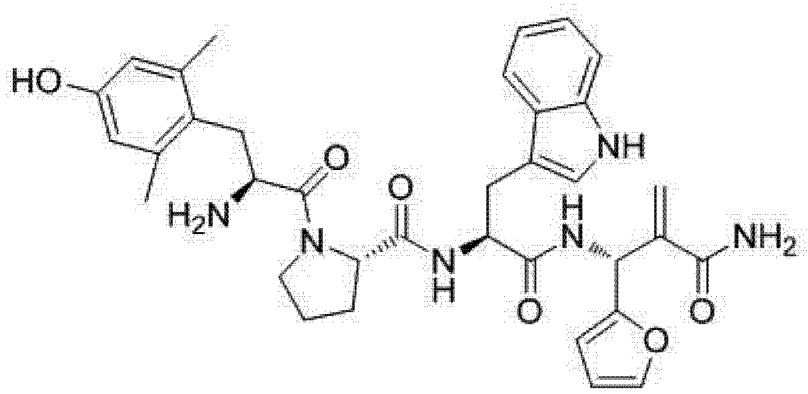
[0136] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 16 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 72%。

[0137] （7）2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0138] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——2,6- 二甲基酪氨酸 - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺 [DPFM]-EM-1，产率 98%。

[0139] [DPFM]-EM-1 结构式为 ：

[0140]



[0141] [DPFM]-EM-1 的理化特征见表 1，[DPFM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 4。

[0142] 实施例三、[DSPM]-EM-1 的合成

[0143] (1)N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0144] (2)3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0145] (3)N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0146] (4)N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸的合成

[0147] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基) 碳二亚胺，搅拌充分溶解后，加入 1.2 摩尔 (S) β - 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸，产率 83%。

[0148] (5)色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0149] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺，产率 99%。

[0150] (6)N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(S)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

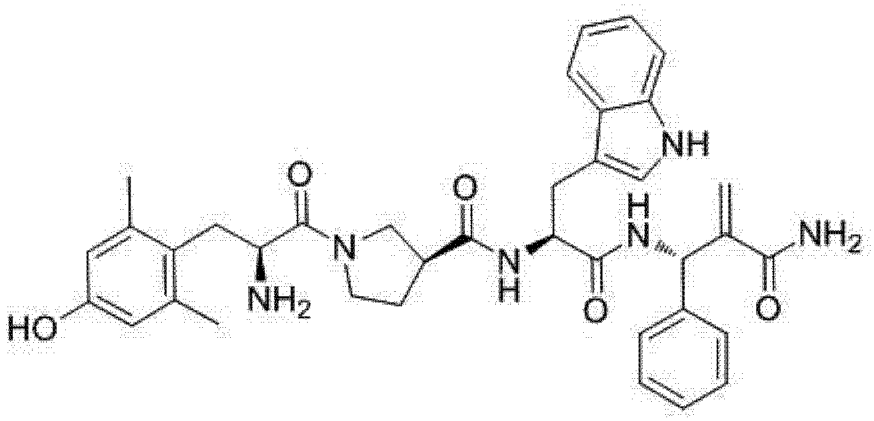
[0151] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 16 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(S)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺，产率 77%。

[0152] (7)2,6- 二甲基酪氨酸 -（S)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0153] 将 N- 叔丁氧羰基 2,6- 二甲基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(S)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——2,6- 二甲基酪氨酸 -(S)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 [DSPM]-EM-1，产率 98%。

[0154] 其结构式为：

[0155]



[0156] [DSPM]-EM-1 的理化特征见表 1，[DSPM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 5。

[0157] 实施例四、[DSFM]-EM-1 的合成

[0158] (1)N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0159] (2)3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0160] (3)N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0161] (4)N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸的合成

[0162] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔(S)β - 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸，产率 83%。

[0163] (5)色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0164] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 99%。

[0165] (6)N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(S)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0166] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 16 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(S)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 76%。

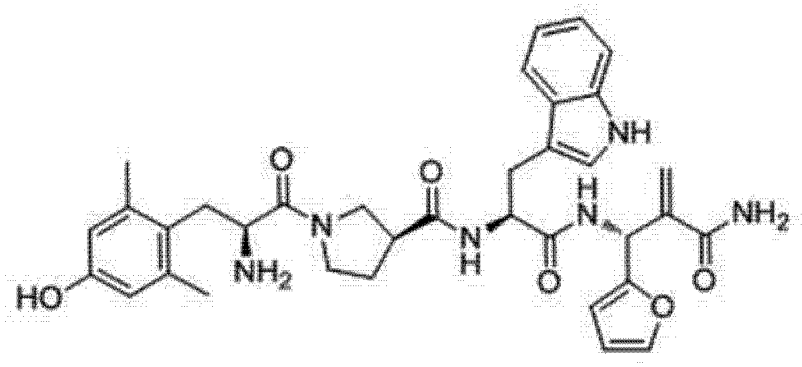
[0167] (7)2,6- 二甲基酪氨酸 -(S)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋

喃）丙酸酰胺的合成

[0168] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——2,6- 二甲基酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺 [DSFM]-EM-1，产率 99%。

[0169] [DSFM]-EM-1 结构式为：

[0170]



[0171] [DSFM]-EM-1 的理化特征见表 1，[DSFM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 6。

[0172] 实施例五、[D*R*PM]-EM-1 的合成

[0173] （1）N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0174] （2）3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0175] （3）N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0176] （4）N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸的合成

[0177] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌充分溶解后，加入 1.2 摩尔（*R*）β - 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸，产率 86%。

[0178] （5）色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0179] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺，产率 99%。

[0180] （6）N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0181] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩

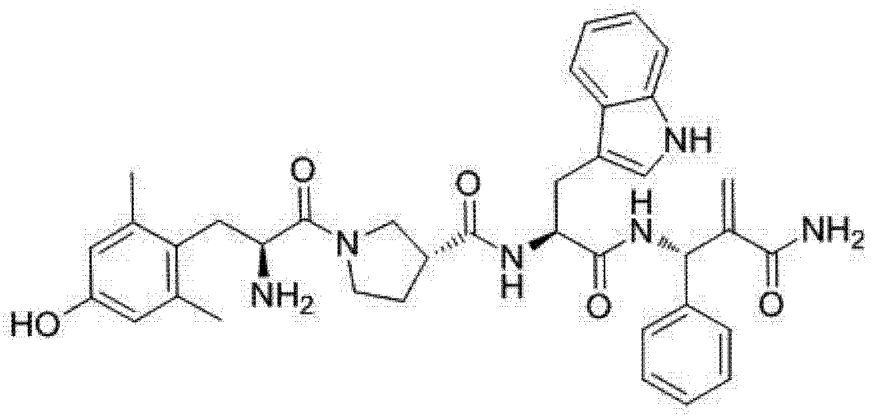
尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 16 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(*R*)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺，产率 81%。

[0182] （7）2,6- 二甲基酪氨酸 - （*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0183] 将 N- 叔丁氧羰基 2,6- 二甲基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(*R*)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体 2,6- 二甲基酪氨酸 - （*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 [D*R*PM]-EM-1，产率 98%。

[0184] 其结构式为：

[0185]



[0186] [D*R*PM]-EM-1 的理化特征见表 1，[D*R*PM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 7。

[0187] 实施例六、[D*R*FM]-EM-1 的合成

[0188] （1）N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0189] （2）3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0190] （3）N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0191] （4）N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - （*R*）β - 脯氨酸的合成

[0192] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔 (*R*)β - 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 - （*R*）β - 脯氨酸，产率 86%。

[0193] （5）色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0194] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃)丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 99%。

[0195] (6)N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(*R*)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

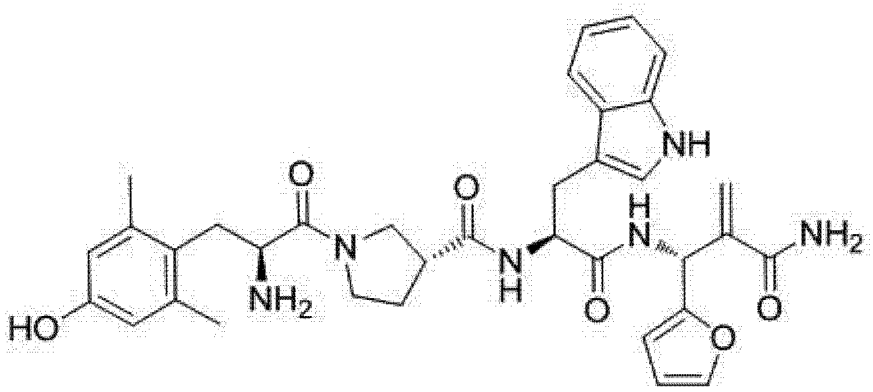
[0196] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 16 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(*R*)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 80%。

[0197] (7)2,6- 二甲基酪氨酸 -(*R*)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0198] 将 N- 叔丁氧羰基 -2,6- 二甲基酪氨酸 -(*R*)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——2,6- 二甲基酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺 [D*R*FM]-EM-1，产率 98%。

[0199] [D*R*FM]-EM-1 结构式为：

[0200]



[0201] [D*R*FM]-EM-1 的理化特征见表 1，[D*R*FM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 8。

[0202] 实施例七、[TSPM]-EM-1 的合成

[0203] (1)N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0204] (2)3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0205] (3)N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0206] (4)N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸的合成

[0207] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔

N,N- 二异丙基乙基胺,1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑,1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺,搅拌充分溶解后,加入 1.2 摩尔（S）β - 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液,室温反应 12 小时,反应结束后加入二氯甲烷稀释,5% 柠檬酸溶液洗涤三次,饱和氯化钠洗涤一次,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸,产率 88%。

[0208] （5）色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0209] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中,室温反应 2 小时后,调节 pH=9~10,二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得白色固体色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺,产率 99%。

[0210] （6）N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

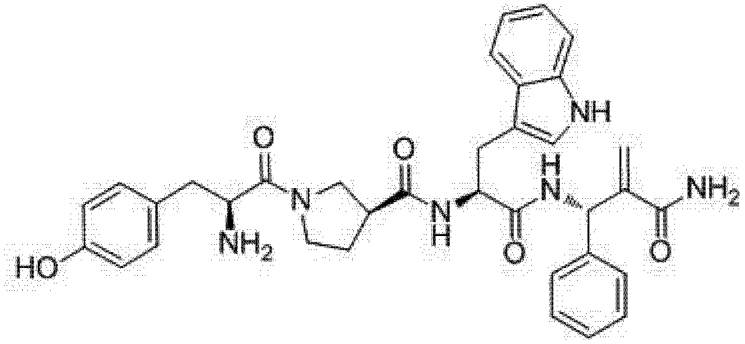
[0211] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷,0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺,1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑,1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺,搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的二氯甲烷溶液,室温反应 16 小时,反应结束后加入二氯甲烷稀释,5% 柠檬酸溶液洗涤三次,饱和氯化钠洗涤一次,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得白色固体产物 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺,产率 82%。

[0212] （7）酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0213] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中,室温反应 2 小时后,调节 pH=9~10,二氯甲烷萃取,无水硫酸钠干燥,减压蒸馏,得白色固体——酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 [TSPM]-EM-1,产率 98%。

[0214] 其结构式为：

[0215]



[0216] [TSPM]-EM-1 的理化特征见表 1,[TSPM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 9。

[0217] 实施例八、[TSFM]-EM-1 的合成

[0218] （1）N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0219] （2）3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0220] （3）N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成：

同实施例 2。

[0221] （4）N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸的合成

[0222] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔（S）β - 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸，产率 88%。

[0223] （5）色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0224] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 99%。

[0225] （6）N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

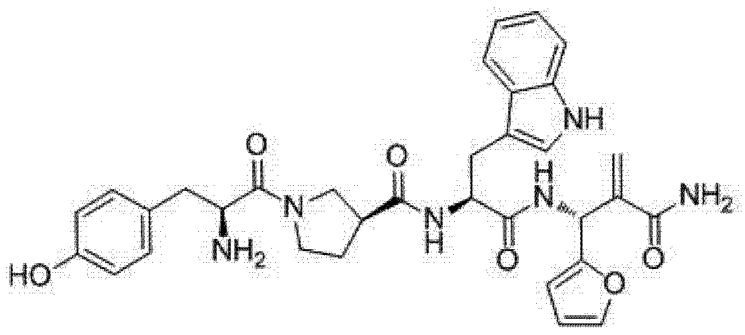
[0226] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 16 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺，产率 83%。

[0227] （7）酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺的合成

[0228] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——酪氨酸 -（S）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺 [TSFM]-EM-1，产率 98%。

[0229] [TSFM]-EM-1 结构式为 ：

[0230]



[0231] [TSFM]-EM-1 的理化特征见表 1，[TSFM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 10。

[0232] 实施例九、[TRPM]-EM-1 的合成

[0233] (1)N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0234] (2)3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0235] (3)N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成：同实施例 1。

[0236] (4)N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸的合成

[0237] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-（3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌充分溶解后，加入 1.2 摩尔（*R*）β - 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸，产率 81%。

[0238] (5)色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0239] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺，产率 99%。

[0240] (6)N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

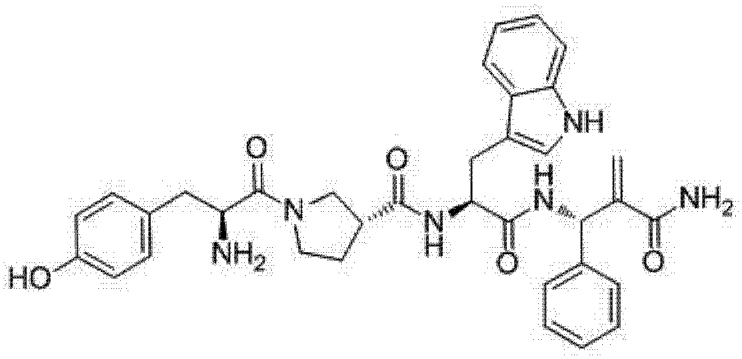
[0241] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -(*R*)β - 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基）碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 16 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺，产率 81%。

[0242] (7)酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺的合成

[0243] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——酪氨酸 -(*R*)β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3 苯基丙酸酰胺 [TRPM]-EM-1，产率 98%。

[0244] 其结构式为：

[0245]



[0246] [TRPM]-EM-1 的理化特征见表 1，[TRPM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 11。

[0247] 实施例十、[TRFM]-EM-1 的合成

[0248] (1)N- 叔丁氧羰基 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0249] (2)3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0250] (3)N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺的合成：同实施例 2。

[0251] (4)N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -(*R*)β- 脯氨酸的合成

[0252] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔(*R*)β- 脯氨酸的饱和碳酸氢钠溶液，室温反应 12 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得油状液体产物——N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -(*R*)β- 脯氨酸，产率 81%。

[0253] (5)色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺的合成

[0254] 将 N- 叔丁氧羰基 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体——色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺，产率 99%。

[0255] (6)N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -(*R*)β- 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺的合成

[0256] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -(*R*)β- 脯氨酸 1 摩尔溶于无水二氯甲烷，0℃搅拌下依次加入 4 摩尔 N,N- 二异丙基乙基胺，1.45 摩尔 1- 羟基苯并三唑，1.6 摩尔 1- 乙基 -3-(3- 二甲胺丙基)碳二亚胺，搅拌下充分溶解后加入 1.2 摩尔色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺的二氯甲烷溶液，室温反应 16 小时，反应结束后加入二氯甲烷稀释，5% 柠檬酸溶液洗涤三次，饱和碳酸氢钠洗涤三次，饱和氯化钠洗涤一次，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -(*R*)β- 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺，产率 82%。

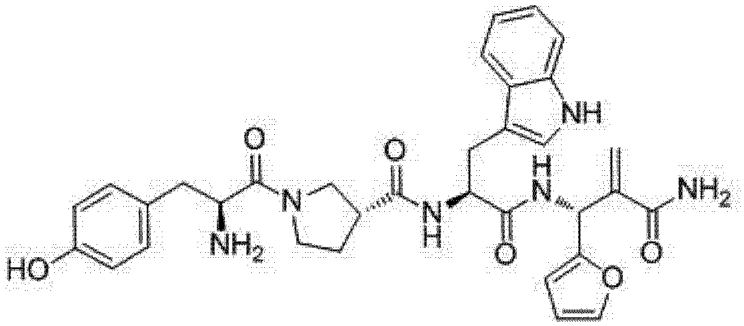
[0257] (7)酪氨酸 -(*R*)β- 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋喃)丙酸酰胺的合成

[0258] 将 N- 叔丁氧羰基 - 酪氨酸 -(*R*)β- 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-(2- 呋

喃）丙酸酰胺 1 摩尔溶于 4 升乙酸乙酯和 1 升盐酸混合溶液中，室温反应 2 小时后，调节 pH=9~10，二氯甲烷萃取，无水硫酸钠干燥，减压蒸馏，得白色固体产物——酪氨酸 -（*R*）β - 脯氨酸 - 色氨酸 -3- 氨基 -2- 甲烯基 -3-（2- 呋喃）丙酸酰胺 [T*R*FM]-EM-1，产率 98%。

[0259] [T*R*FM]-EM-1 结构式为：

[0260]



[0261] [T*R*FM]-EM-1 的理化特征见表 1，[T*R*FM]-EM-1 的 ESI-MS 谱图见图 12。

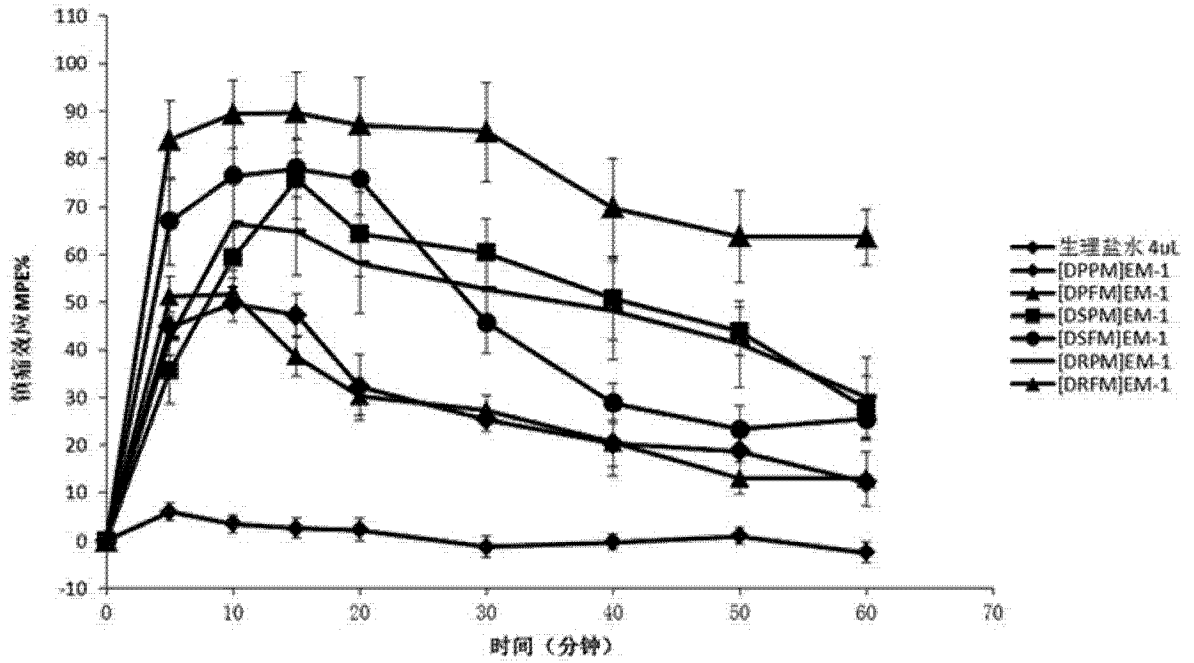

110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0
10
20
30
40
50
60
70
镇痛效应MPE%
时间（分钟）
生理盐水 4uL
[DPPM]EM-1
[DPFM]EM-1
[DSPM]EM-1
[DSFM]EM-1
[DRPM]EM-1
[DRFM]EM-1

图 1

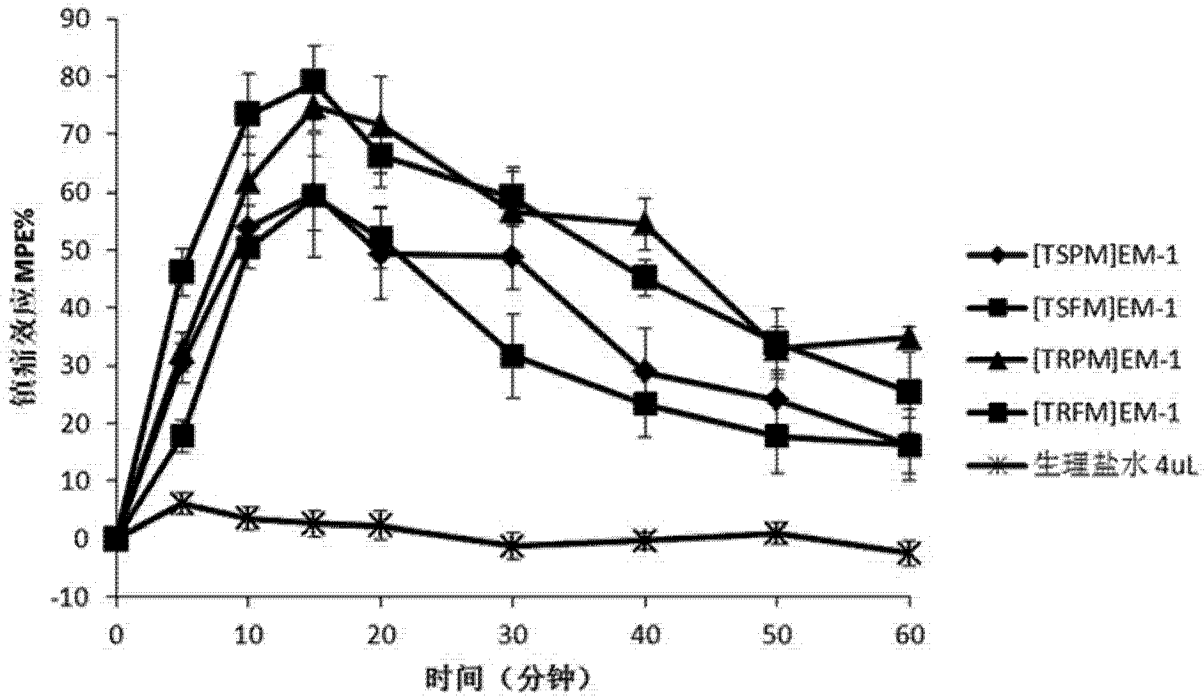

90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0
10
20
30
40
50
60
镇痛效应MPE%
时间（分钟）
[TSPM]EM-1
[TSFM]EM-1
[TRPM]EM-1
[TRFM]EM-1
生理盐水 4uL

图 2

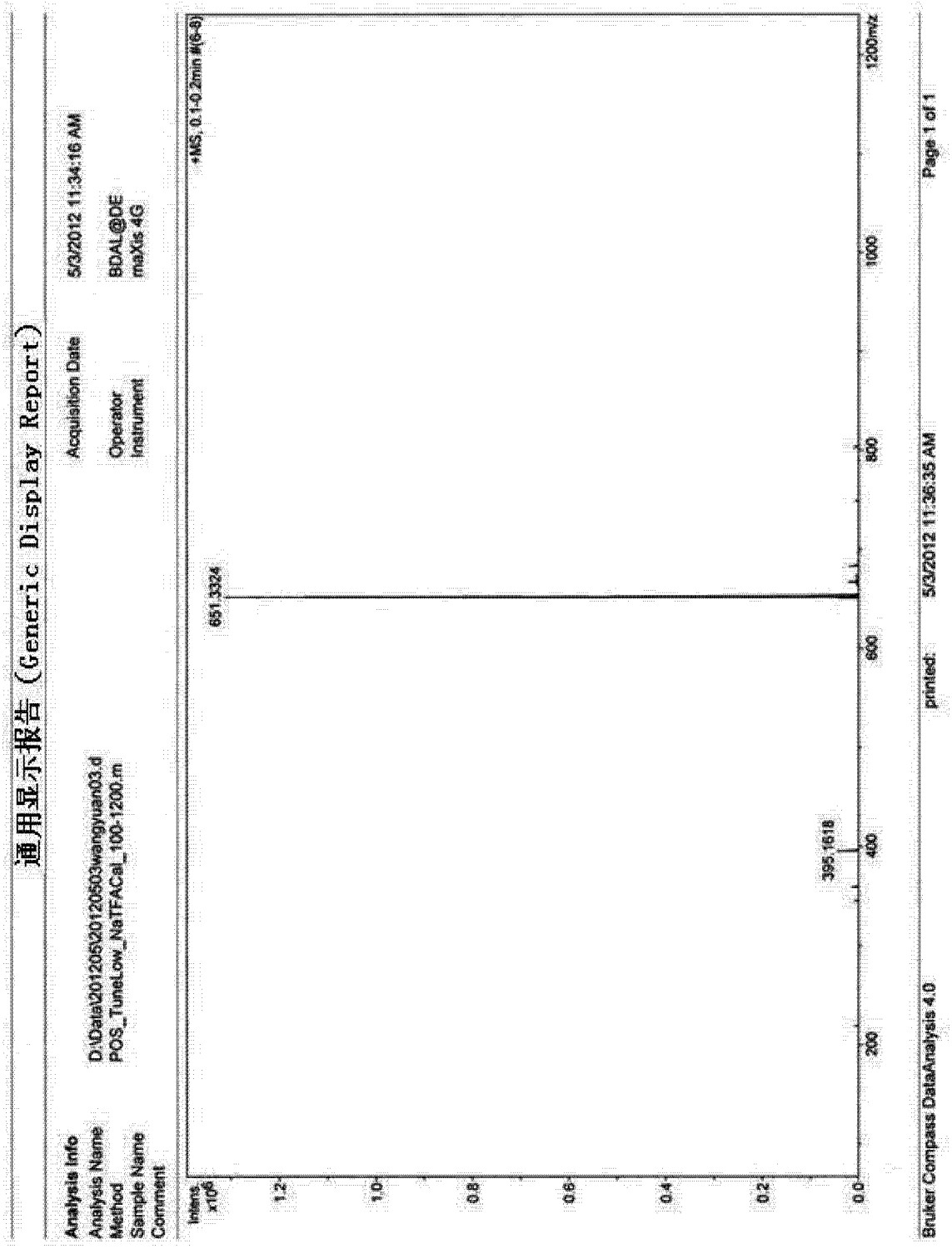

通用显示报告 (Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120503\20120503wangyuan03.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment
Acquisition Date 5/3/2012 11:34:16 AM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.2min #(6-8)
651.3324
395.1618
Intens.
x10^6
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
200
400
600
800
1000
1200m/z
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 5/3/2012 11:36:35 AM
Page 1 of 1

图 3

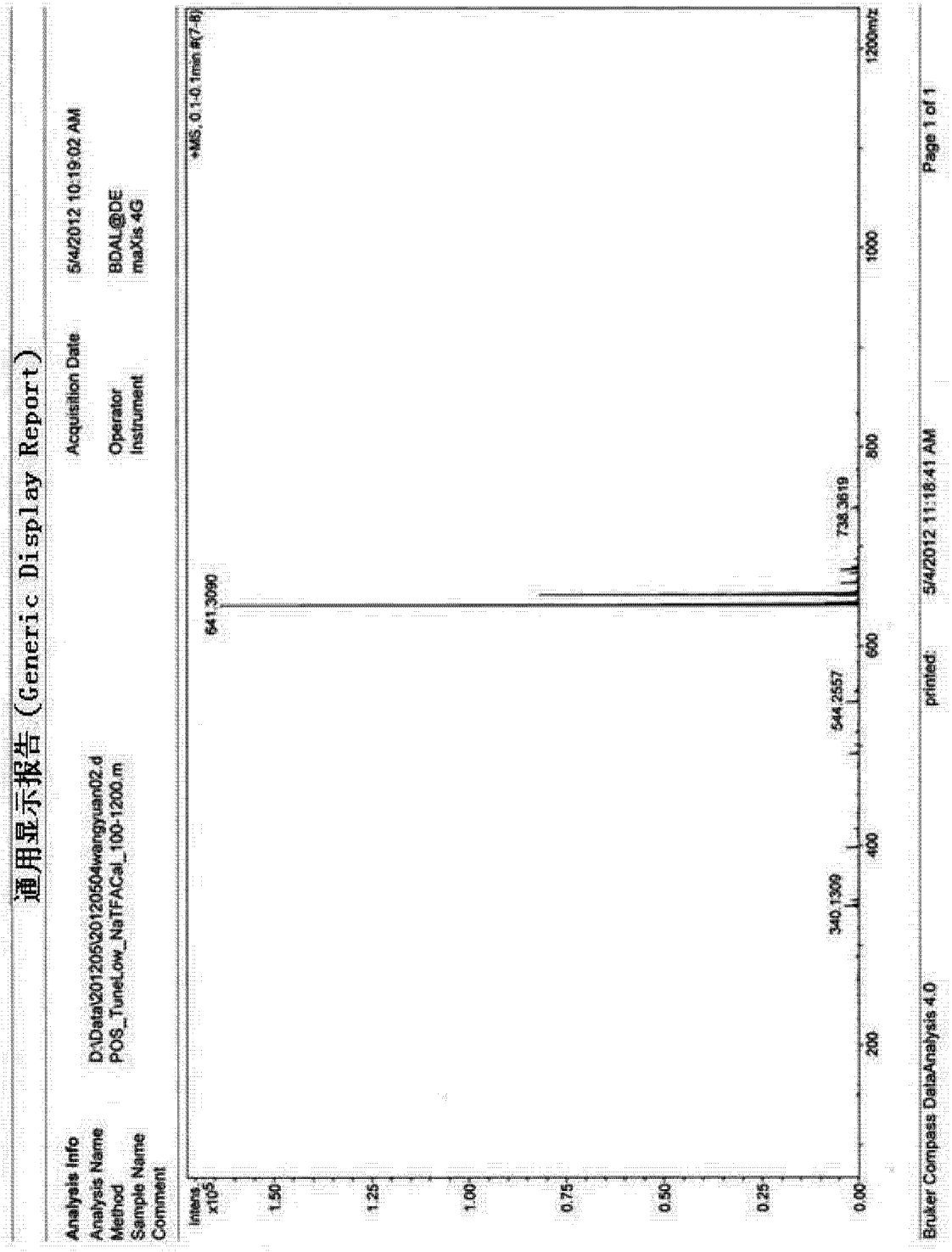

通用显示报告 (Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120505\20120504wangyuan02.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment
Acquisition Date 5/4/2012 10:19:02 AM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.1min #(7-8)
Intens.
x10^5
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
200
400
600
800
1000
1200m/z
340.1309
544.2557
641.3090
738.3619
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 5/4/2012 11:18:41 AM
Page 1 of 1

图 4

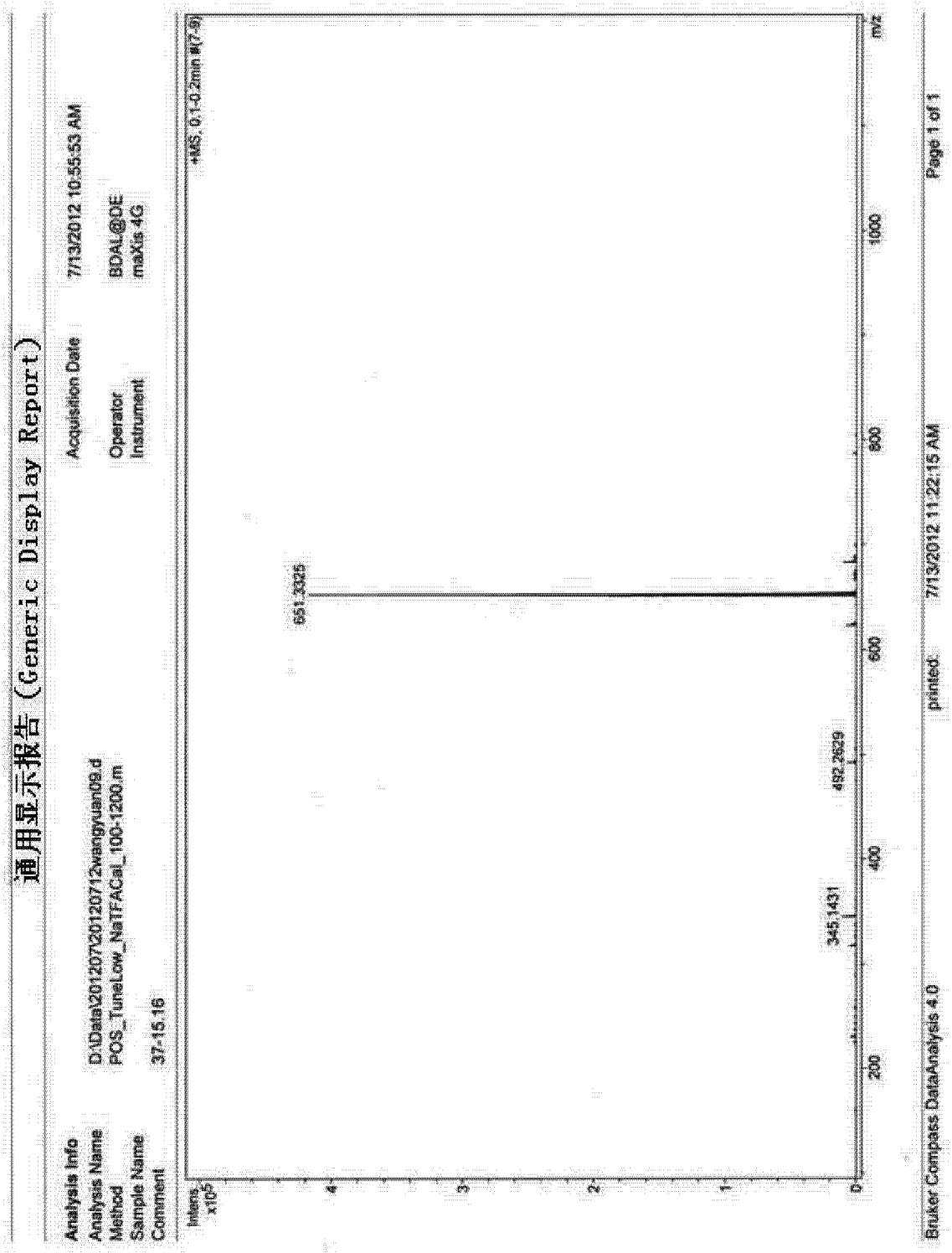

通用显示报告 (Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120712\20120712wangyuan09.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment
37-15.16
Acquisition Date 7/13/2012 10:55:53 AM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.2min #(7-9)
Intens.
x10^5
651.3325
492.2629
345.1431
m/z
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 7/13/2012 11:22:15 AM
Page 1 of 1

图 5

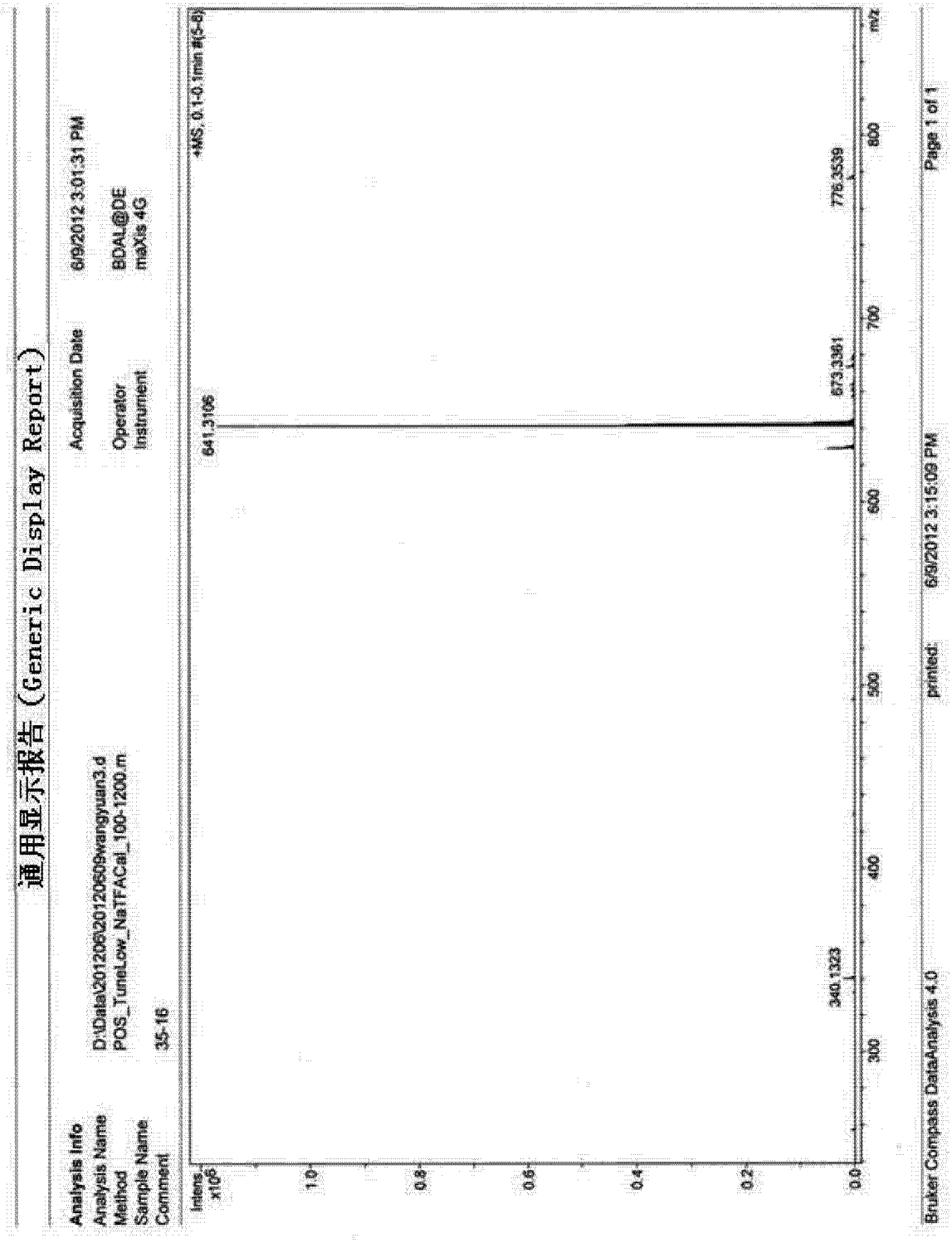

通用显示报告 (Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120606\20120606wangyuan3.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment 35-16
Acquisition Date 6/9/2012 3:01:31 PM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.1min #(5-8)
641.3105
673.3381
776.3539
340.1323
Intens.
x10^6
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
300
400
500
600
700
800
m/z
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 6/9/2012 3:15:09 PM
Page 1 of 1

图 6

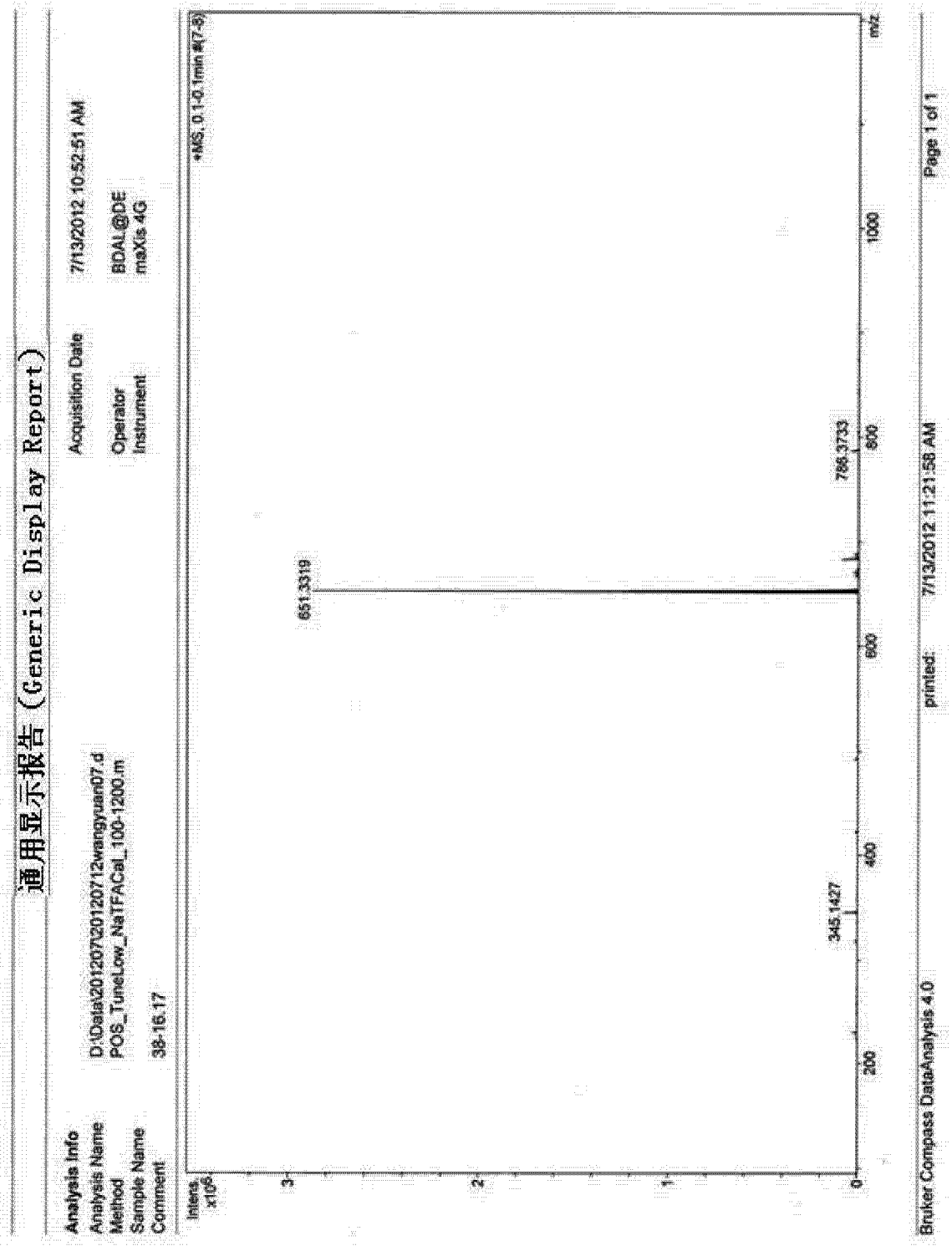

通用显示报告(Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120712\20120712wangyuan07.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment 38-16.17
Acquisition Date 7/13/2012 10:52:51 AM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.1min #(7-8)
Intens.
x10^6
3
2
1
0
651.3319
345.1427
788.3733
200
400
600
800
1000
m/z
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 7/13/2012 11:21:58 AM
Page 1 of 1

图 7

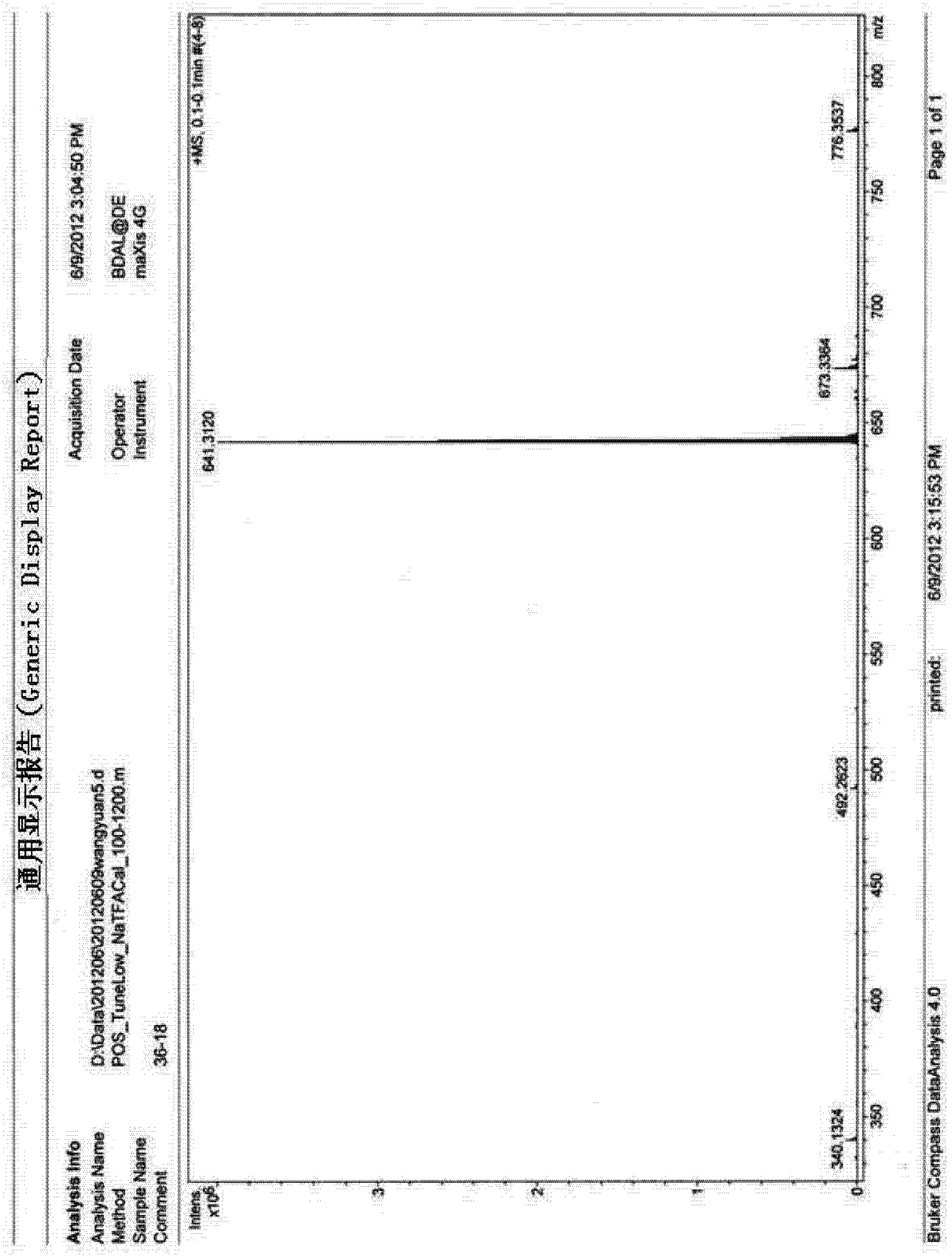

通用显示报告 (Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120620120609wangyuan5.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment 36-18
Acquisition Date 6/9/2012 3:04:50 PM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.1min #(4-8)
Intens.
x10^6
641.3120
673.3384
776.3537
492.2623
340.1324
m/z
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 6/9/2012 3:15:53 PM
Page 1 of 1

图 8

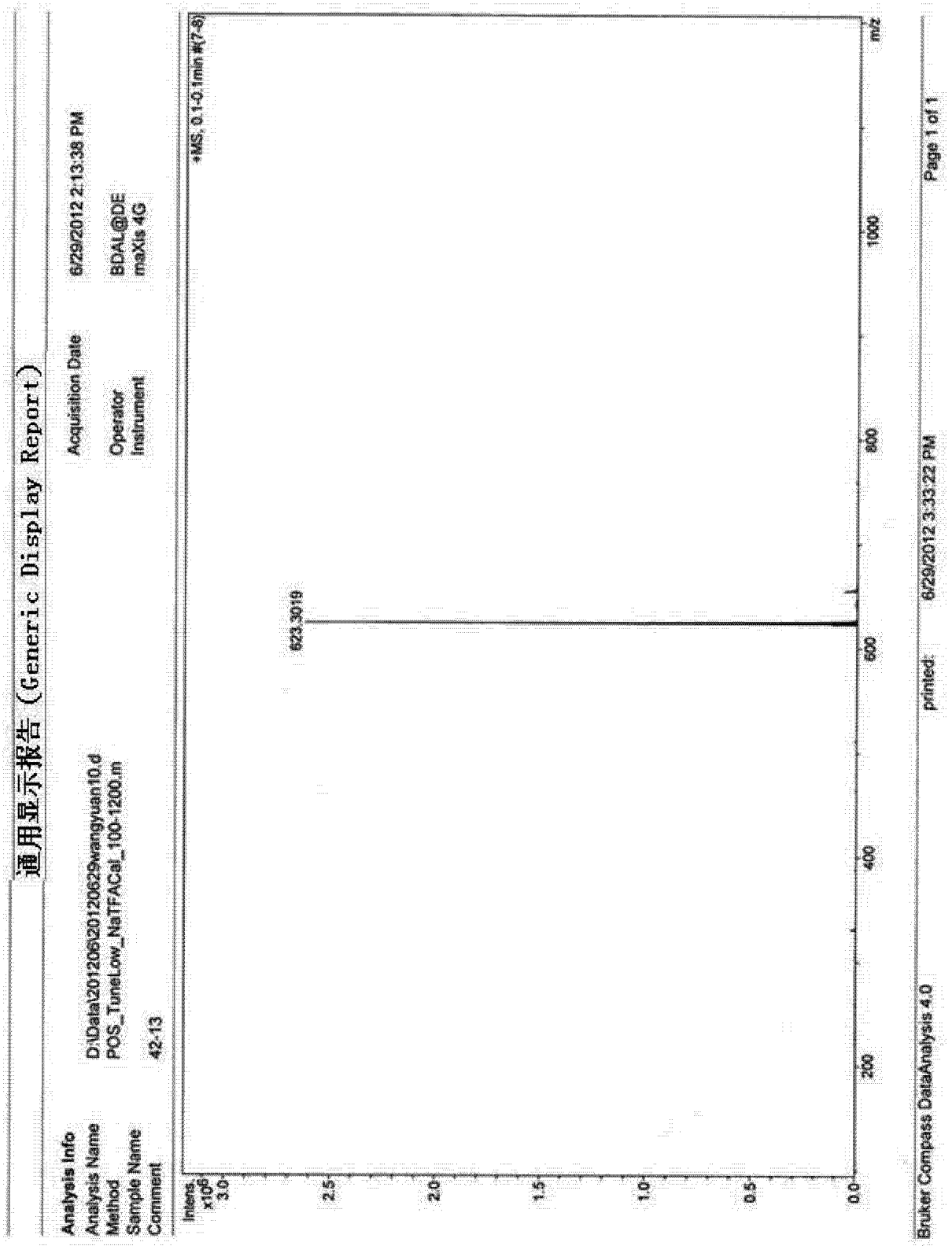

通用显示报告（Generic Display Report）
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120626\20120629wangyuan10.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment 42-13
Acquisition Date 6/29/2012 2:13:38 PM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.1min #(7-8)
623.3019
Intens.
x10^6
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
400
600
800
1000
m/z
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 6/29/2012 3:33:22 PM
Page 1 of 1

图 9

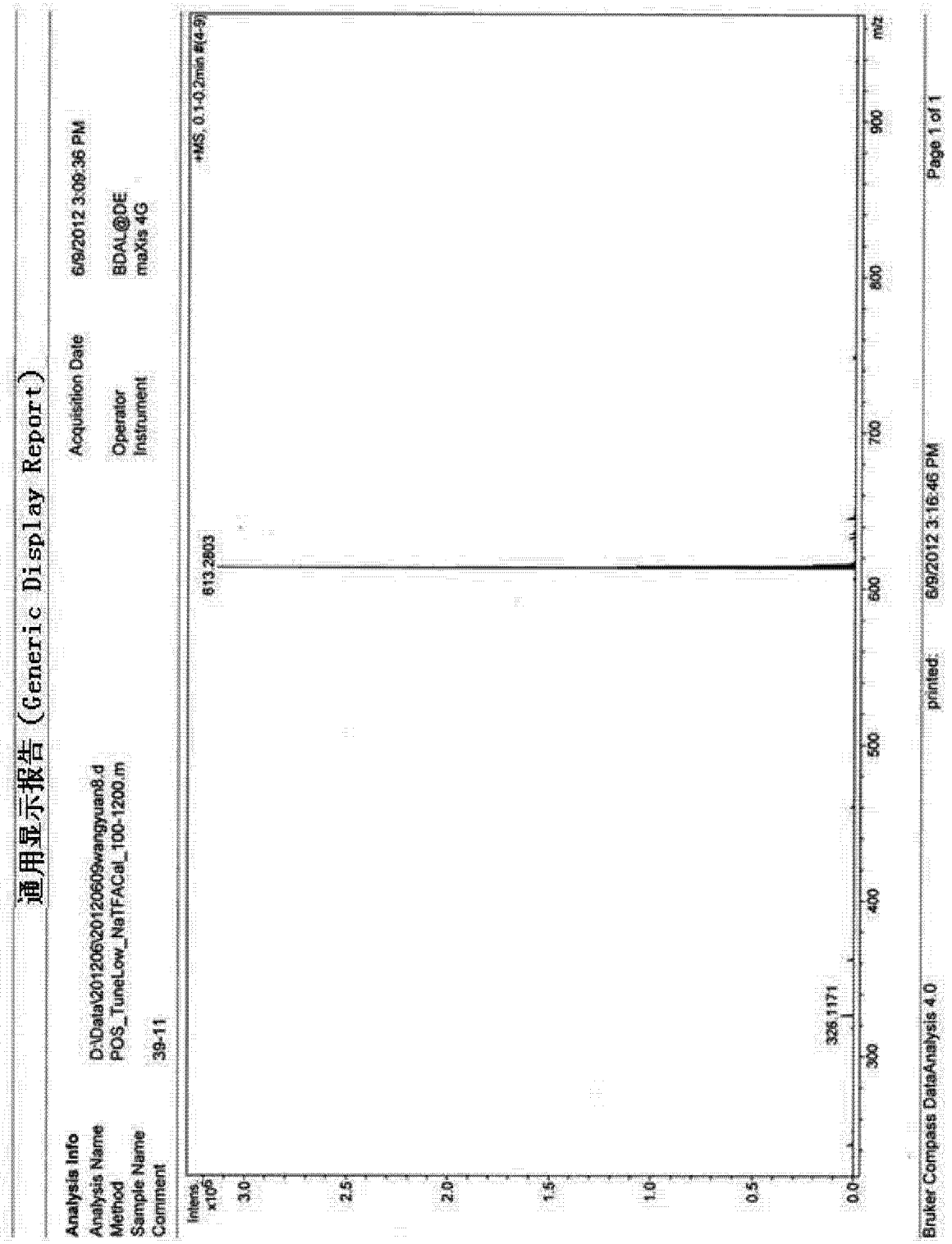

通用显示报告 (Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120620120609wangyuan8.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment 39-11
Acquisition Date 6/9/2012 3:09:36 PM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.2min #(4-9)
Intens.
x10^5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
613.2803
326.1171
300
400
500
600
700
800
900
m/z
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 6/9/2012 3:16:46 PM
Page 1 of 1

图 10

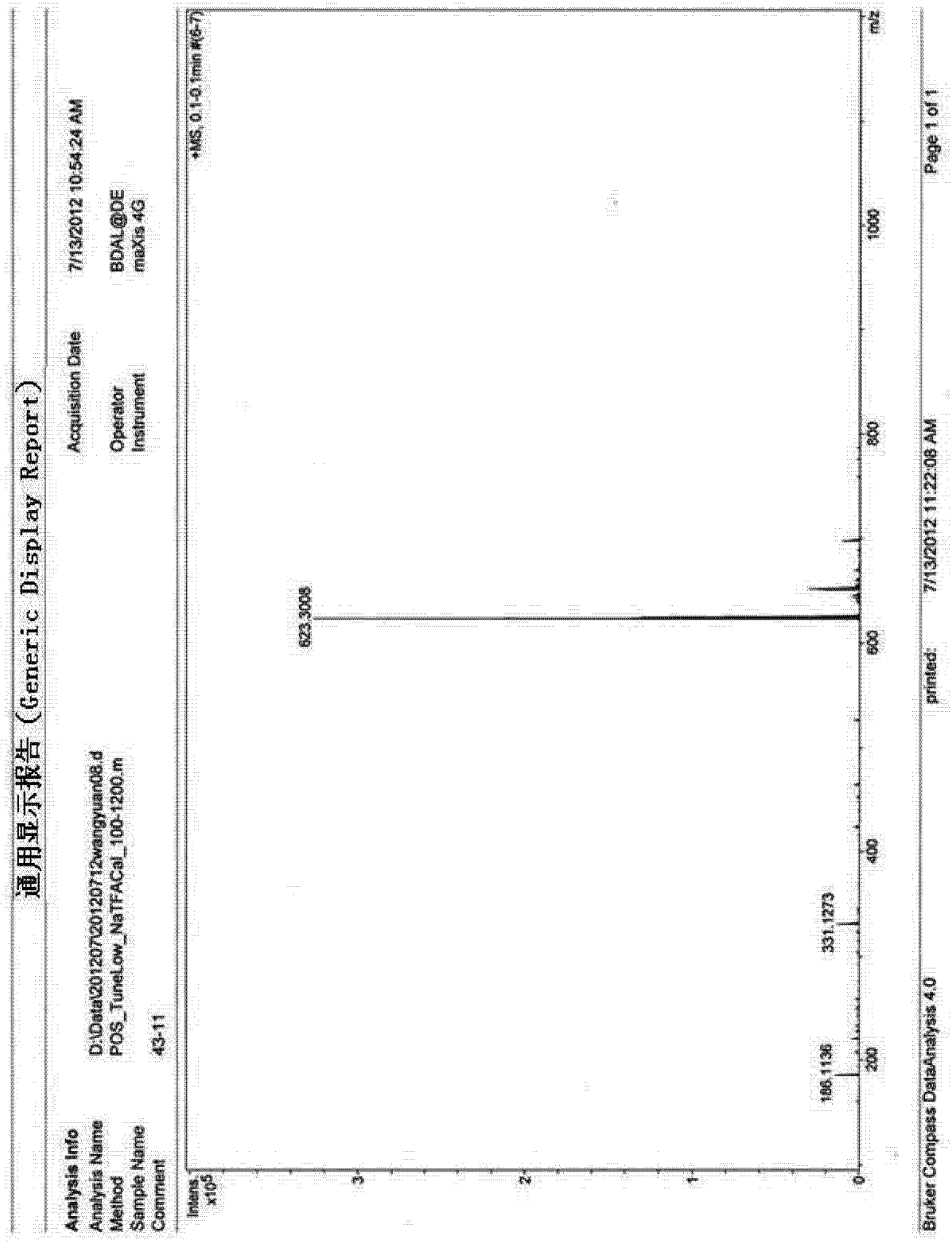

通用显示报告 (Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20120712\20120712wangyuan08.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment 43-11
Acquisition Date 7/13/2012 10:54:24 AM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.1min #(6-7)
Intens. x10^5
m/z
623.3008
331.1273
186.1136
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 7/13/2012 11:22:08 AM
Page 1 of 1

图 11

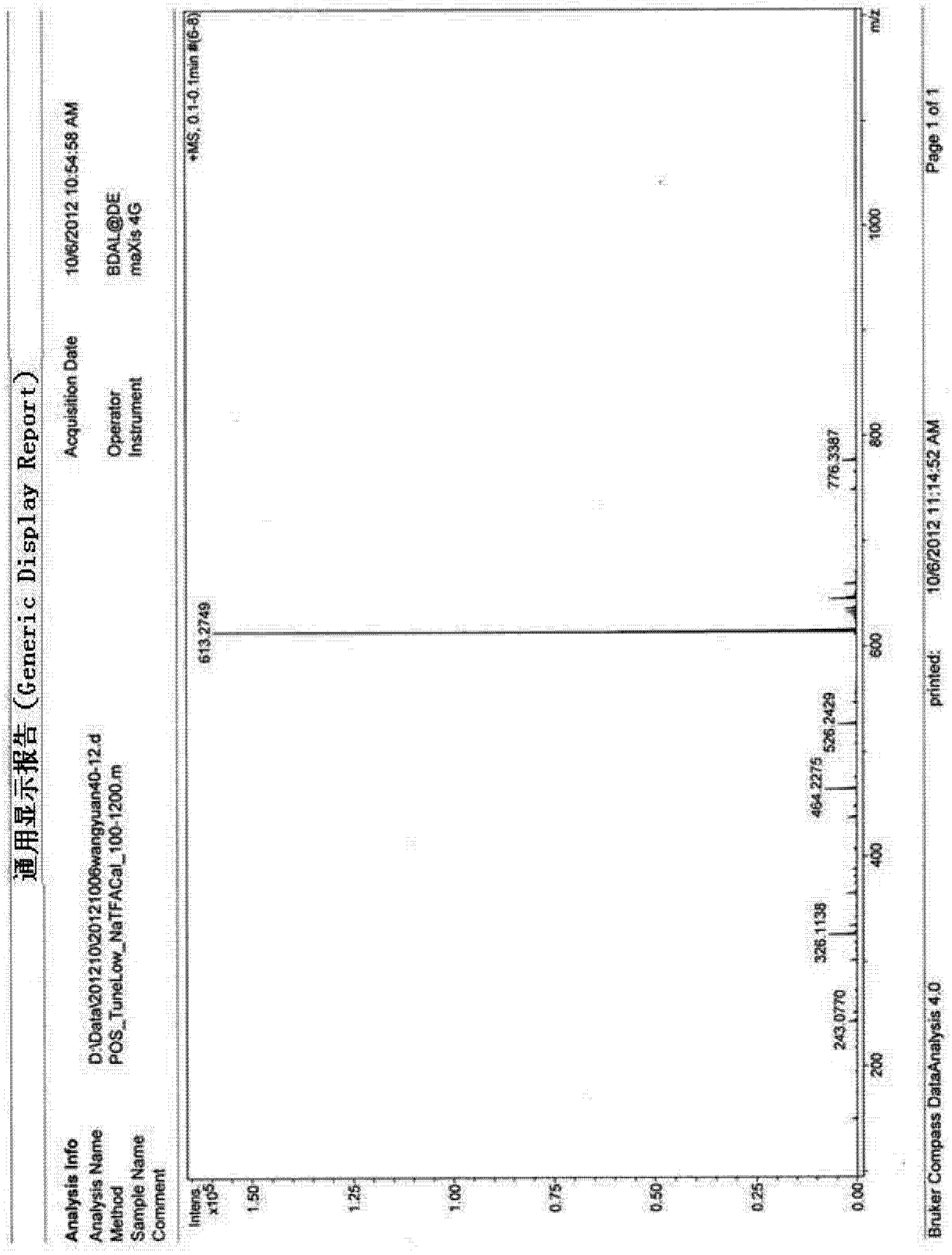

通用显示报告 (Generic Display Report)
Analysis Info
Analysis Name D:\Data\20121002\20121006wangyuan40-12.d
Method POS_TuneLow_NaTFACal_100-1200.m
Sample Name
Comment
Acquisition Date 10/6/2012 10:54:58 AM
Operator BDAL@DE
Instrument maXis 4G
+MS, 0.1-0.1min #(6-8)
Intens. x10^5
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
200
400
600
800
1000
m/z
613.2749
776.3387
526.2429
464.2275
326.1138
243.0770
Bruker Compass DataAnalysis 4.0
printed: 10/6/2012 11:14:52 AM
Page 1 of 1

图 12