[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07C235/34
C07C335/12
A61K 31/165
A61K 31/17

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00804101.6

[45] 授权公告日 2005 年 7 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1210254C

[22] 申请日 2000.2.21 [21] 申请号 00804101.6
[30] 优先权
[32] 1999. 2.22 [33] KR [31] 5751/1999
[86] 国际申请 PCT/KR2000/000137 2000.2.21
[87] 国际公布 WO2000/050387 英 2000.8.31
[85] 进入国家阶段日期 2001.8.21
[71] 专利权人 株式会社太平洋
地址 韩国汉城
共同专利权人 数字生物技术有限公司
[72] 发明人 李智雨 吴禹泽 朴永镐 徐永钜 朴亨根 金熙斗
审查员 彭 斌

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
代理人 李 悦

权利要求书 2 页 说明书 48 页

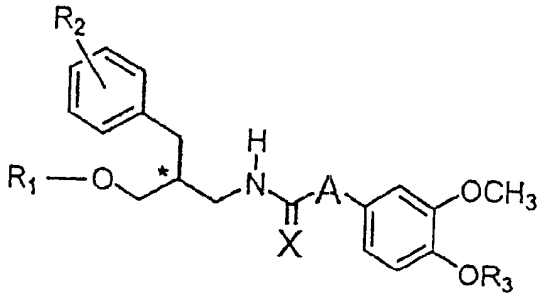
[54] 发明名称 作为有效的香草类受体激动剂和镇痛药的含有树脂毒素药效基团的香草类类似物,其组合物以及应用

[57] 摘要

本发明涉及含有树脂毒素药效基团的新型香草类类似物，含有这些类似物的药物组合物，以及它们作为香草类受体激动剂和有效镇痛药的应用。本发明提供了用于治疗急性、慢性、炎性或神经性疼痛或治疗膀胱超敏性的药物组合物。

ISSN1008-4274

1．下式(I)表示的化合物：



(I)

其中：

X为氧；

A为-CH_2-；

R_1为取代或未取代的C_{1-4}烷基芳基，或下式R_4CO-的基团，其中R_4为具有1-18个碳原子的烷基，或者具有6-10个碳原子的芳基；

R_2为具有1-6个碳原子的烷基，或卤原子；

R_3为氢原子，具有1-4个碳原子的烷基，氨基烷基，二酸单酯或α-烷基酸；

星号*表示手性碳原子，以及它们药物可接受的盐。

2．按照权利要求1的化合物，其中

R_1为苄基或式R_4CO-基团，其中R_4为具有1-18个碳原子的烷基或苯基；

R_2为具有1-4个碳原子的烷基或卤原子；以及

R_3为氢原子，具有1-4个碳原子的烷基、-$(CH_2)_nNH_2$-、 -$CO(CH_2)_nCO_2H$或-$(CH_2)_nCO_2H$ ，其中n为1或2。

3．按照权利要求1的化合物，其中R_3为氢原子、甲氧基甲基、-$CH_2CH_2NH_2$、 -$COCH_2CH_2CO_2H$或-CH_2CO_2H。

4．按照权利要求1的化合物，其中R_2选自叔丁基，3,4-(二甲基)和氯原子。

5．按照权利要求1的化合物，其中R_4选自叔丁基，异丙基，戊基，十七烷基，苯基，和3,4-(二甲基)苯基。

6．按照权利要求1的化合物，其是选自下组之一的化合物：

2,2-二甲基丙酸 2-({2-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苯基]乙酰氨基}-甲基)-3-(3,4-二甲基苯基)丙酯；

2,2-二甲基丙酸 2-({2-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苯基]乙酰氨基}-甲基)-3-(4-叔丁基苯基)丙酯。

7．一种用于缓解或减轻急性、慢性、炎性或神经性疼痛、抑制炎症或治疗失禁药物组合物，包括作为活性成分的如权利要求1所述的化合物(I)以及药物可接受的载体。

8．如权利要求1所述的化合物(I)在制备用于缓解或减轻急性、慢性、炎性或神经性疼痛、抑制炎症或治疗失禁的医药中的应用。

作为有效的香草类受体激动剂和镇痛药的含有树脂毒素药效基团的香草类类似物，其组合物以及应用

技术领域

本发明涉及含有树脂毒素(resiniferatoxin)药效基团的香草类(vanilloid)类似物，含有这些类似物的药物组合物，以及应用这些类似物作为香草类受体激动剂和有效的镇痛药的方法。

背景技术

具有下文所示结构的辣椒素(CAP)能刺激感觉传入C-纤维，然后使它脱敏。该诱导的脱敏可以用于关节炎、哮喘、过敏反应包括鼻炎、发烧、疼痛、膀胱超敏等。

此外，香草类受体(VR) (或者辣椒素受体)为CAP以及相关兴奋化合物的特异性神经元膜识别部位。它几乎都排它地由涉及伤害感受和神经性炎症的初级感觉神经元表达。该受体的功能是用作阳离子选择性离子通道优选钙通道，最近克隆了由CAP和热毒激活的其功能性亚型VR1。由特异性配体引起的脱敏已被认为是减轻神经性病痛和其它病理状态的非常有前景的治疗方法，其中从初级感觉神经元释放神经肽扮演了重要的角色。

大多数被开发或用作镇痛药的外源性VR激动剂结构上与CAP (即Zostrix™, Olvanil™, SDZ-249482™, 和DA-5018™)和树脂毒素有关。它们的结构包括通常的香草类环，其对激动剂的活性很重要。但是，最近报道没有香草类部分的化合物如倍半萜类化合物不饱和的二醛或三异戊二烯基酚，也可以激活该受体。尽管受体拮抗剂更少，但也已报道了几种化合物，如竞争CAP结合部位的capsazepine、通道阻滞剂钌红和capsazocaine。

从Euphorbia resinifera分离的三环二萜—树脂毒素(RTX)已被认为是

超强效CAP类似物。实际上，在背根神经中枢中RTX与CAP结合位点的特异性结合已用标记的[^{3}H]RTX说明。RTX被开发成为用于治疗与糖尿病神经病变有关的泌尿急促失禁和疼痛的超强效感觉神经元脱敏剂。最近，报道了RTX的完全对映受控合成和构象分析。但是，RTX的药效基团还没有被清楚地限定，尽管结构活性研究表明碳环上的C_{20}-高香草酸部分、C_3-酮基团和邻酯(ortho-ester)苯基是形成RTX的极高效能的至关重要的结构单元。另一方面，CAP相对于RTX的较低效能可能是合理的，因为缺少这些重要的药效基团中的某些基团，特别是C_3-酮基团。

美国专利USP 4,939,149公开了脱敏受验动物的方法，它是通过给药治疗有效脱敏量的RTX，用以脱敏动物神经性炎症、化学和热诱导的疼痛、和涉及对CAP敏感的感觉传入通路的反应。

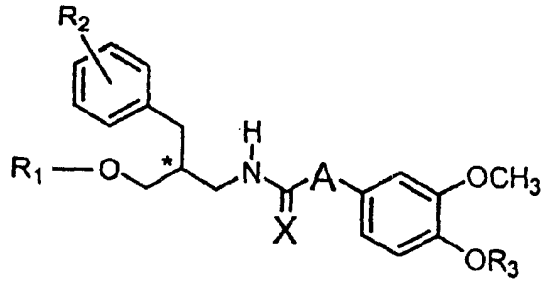
尽管已报道了基于CAP和RTX结构的多种香草类激动剂作为潜在的镇痛剂(例如美国专利USP 5,021,450公开了高香草基二萜衍生物如12-脱氧佛波醇、13-乙酸苯酯、20-高香草酯和密执毒素20-高香草酯作为RTX模拟物)，这些类CAP类似物受到其固有的低效性和窄的治疗指数的限制。另一方面，RTX受到可用的自然资源的限制，并且由于其结构的复杂性难于合成获得。

本发明者已进行了深入的研究，发现了基于香草类受体的新型镇痛剂，它具有比RTX或已知的类RTX或类CAP类似物更简单的结构。因此在其中我们发现了C_{20}-高香草部分、C_3-羰基和邻酯苯基部分作为必要识别和结合基团的修饰结构的新化合物，按照受体结合检测和CAP-激活单通道检测显示出有效的香草类激活剂活性。

发明内容

发明概述

由此，本发明提供了由下式(I)表示的新化合物：



(I)

其中：

X为氧或硫原子；

A为-NHCH$_2$-或-CH$_2$-；

R_1为取代或未取代的C_{1-4}烷基芳基，或下式R_4CO-的基团，其中R_4为具有1-18个碳原子的烷基，具有2-18个碳原子的烯基，或者具有6-10个碳原子的取代或未取代的芳基；

R_2为氢原子，具有1-6个碳原子的烷基，具有1-6个碳原子的烷氧基，具有1-6个碳原子的卤烷基，或卤原子；

R_3为氢原子，具有1-4个碳原子的烷基，氨烷基，二酸单酯或α-烷基酸；和

星号*表示手性碳原子，以及它们药物可接受的盐。

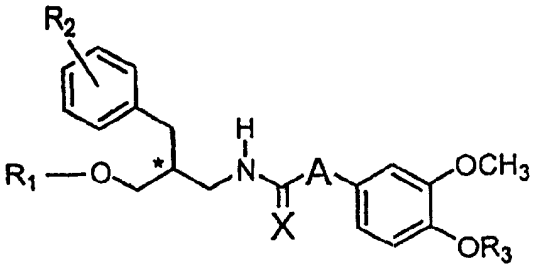
本发明还提供了含有缓解疼痛有效量的作为活性成分的式(I)化合物，以及药物可接受的载体的药物组合物。

本发明还提供了该化合物作为药物中的活性成分在用于治疗疼痛或泌尿失禁中的应用。

本发明还提供了制备式(I)化合物的方法。

发明详述

本发明的化合物为下式(I)表示的化合物：



(I)

其中：

X为氧或硫原子；

A为-NH-CH_2-或-CH_2-；

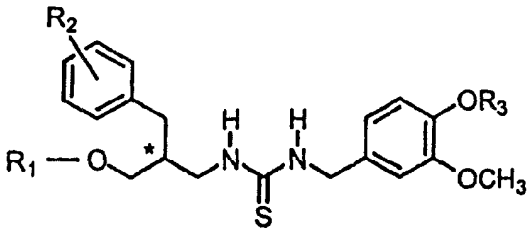
R_1为取代或未取代的C_{1-4}烷基芳基，或下式R_4CO-的基团，其中R_4为具有1-18个碳原子的烷基，具有2-18个碳原子的烯基，或者具有6-10个碳原子的取代或未取代的芳基；

R_2为氢原子，具有1-6个碳原子的烷基，具有1-6个碳原子的烷氧基，具有1-6个碳原子的卤烷基，或卤原子；

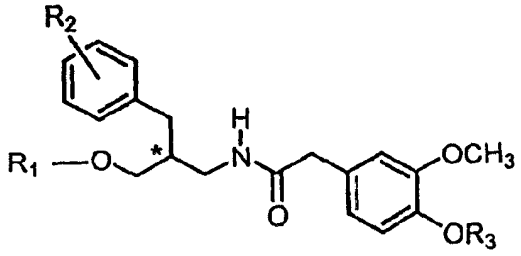
R_3为氨烷基，二酸单酯或α-烷基酸；和

星号*表示手性碳原子，以及它们药物可接受的盐。

优选的化合物可以由下式(I-a)和(I-b)表示：



(I-a)



(I-b)

其中R_1、R_2和R_3具有与上述相同的含义。

在一个优选的实施方案中，该化合物具有(I-a)或(I-b)的通式，其中R_1为式R_4CO-基团，其中R_4为具有1-18个碳原子的烷基；R_2为具有1-6个碳原子的烷基；R_3为$-(CH_2)_nNH_2$、$-CO(-CH_2)_nCOOH$或$-(CH_2)_nCOOH$，其中n为1-4的整数。当R_1或R_4为取代芳基，该取代基可以是一个或多个具有1-4个碳原子的低级烷基或卤素原子。

在一个更优选的实施方案中，该化合物具有(I-a)或(I-b)的通式，其中R_1为式R_4CO-基团，其中R_4为具有1-6个碳原子的烷基；R_2为具有1-6个碳原子的烷基；R_3为$-CH_2CH_2NH_2$、$-COCH_2CH_2COOH$或$-CH_2COOH$。

在所有这些情况下，化合物(I)可以是外消旋混合物，或R或S立体异构体。并且，本发明包括化合物(I)的药物可接受的盐的形式。

本发明的化合物可以通过下面反应路线中的方法化学合成，其仅是为了举例说明，而绝不是限制本发明。该反应路线显示了用于制备本发明有代表性化合物的步骤，其它的化合物也可以通过下列步骤制备，同时适当改变试剂和起始材料（这是本领域普通技术人员所能想到的）。

一般合成方法

在合成路线1和2中概述了3-酰氧基2-苄基丙基硫脲衍生物(7a-d)的合成。丙二酸二乙酯与各种苄基卤进行单烷基化，然后通过$LiAlH_4$-还原，制备相应的二醇(2a-d)。将2单乙酰化，将余下的醇官能团转化成叠氮化物，然后将乙酰基去保护得到中间体3-叠氮基-2-苄基-1-丙醇(5a-d)。5a-d与多种酰卤进行酰化得到相应的酯6a-d，叠氮基还原，然后与4-甲氧基甲

基氧-3-甲氧基苄基异硫氰酸酯缩合，水解得到最终所需的产物7a-d。由式3-苄氧基-2-苄基丙基硫脲衍生物9a,c表示的可选择的醚类似物从5a,c合成，如反应路线2所示。两种手性类似物7a-I从(R)- 3-乙酰氧基-2-苄基-1丙醇((R)-3a)（其从外消旋2-苄基-1,3-丙二醇(反应路线3)获得）合成，然后采用与合成7a-I相同的方法。

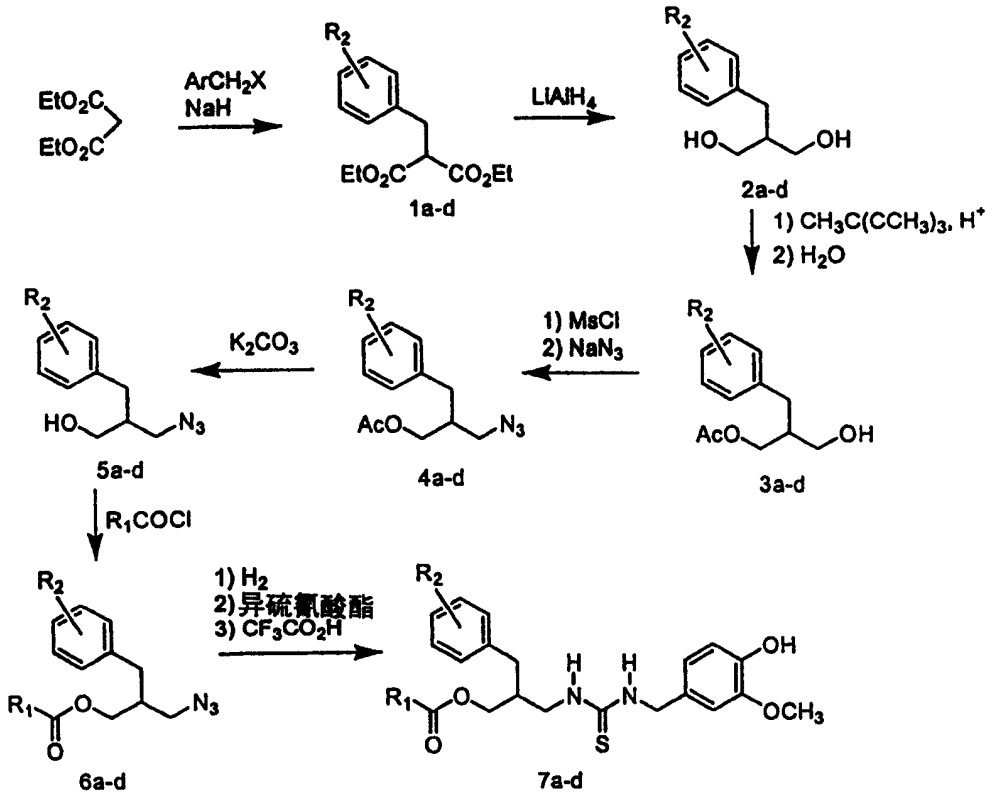
上述硫脲衍生物的O-乙酸类似物(19a,b)的合成如反应路线4所示。通过MOM (甲基甲基醚)基团保护4-羟基-3-甲氧基-苄腈(11)，得到12，12的氰基通过$LiAlH_4$还原成胺，然后通过CBZ基团(氯苄基)保护得到13，13的MOM基团去保护，然后通过溴乙酸甲酯将相应的羟基烷基化，得到15。将15的甲酯水解，CBZ基团去保护得到17。将17的胺与异硫氰酸酯18a,b缩合，分别得到最终所需的产物19a,b。

上述硫脲衍生物的O-琥珀酸酯类似物(23a,b)的合成如反应路线5所示。琥珀酸的一苄基酯20用香草类14酰化得到21，21的苄基通过氢化作用去保护，得到22。22的胺与异硫氰酸酯18a,b缩合，分别得到最终所需的产物23 a,b。

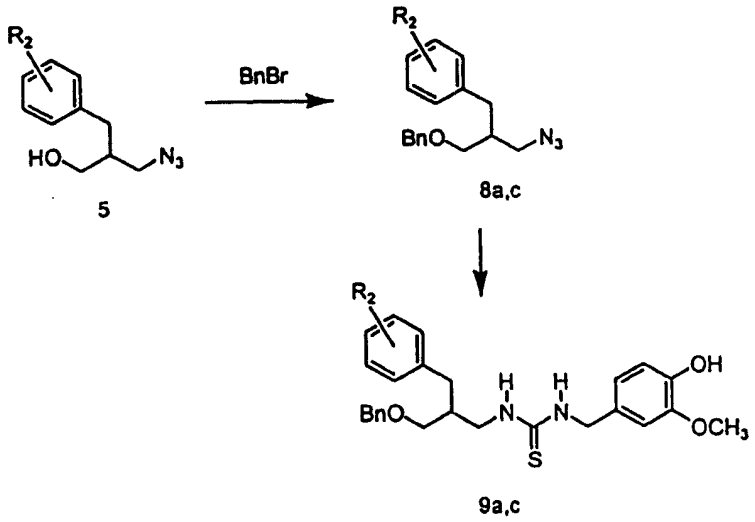
酰胺衍生物的O-氨乙基类似物(28a,b)的合成如反应路线6所示。24的叠氮基还原成胺，其在原位与五氟高香草酸酯（homovanillic pentafluoro）缩合，得到25。25的羟基通过二溴乙烷烷基化得到26，26的溴基然后被叠氮基取代得到27。27a,b还原，分别得到最终所需的产物28a,b。

上述硫脲衍生物的O-氨乙基类似物(36a,b)的合成如反应路线7所示。4-羟基-3-甲氧基苄基胺29通过Boc基团保护，然后羟基通过二溴乙烷烷基化得到31。31的溴基被叠氮基取代，然后N-Boc被去保护，得到33。33的胺转化成相应的异硫氰酸酯，异硫氰酸酯与叠氮6缩合，得到硫脲35。还原35a,b的叠氮基，分别得到最终所需的产物36a,b。

反应路线 1

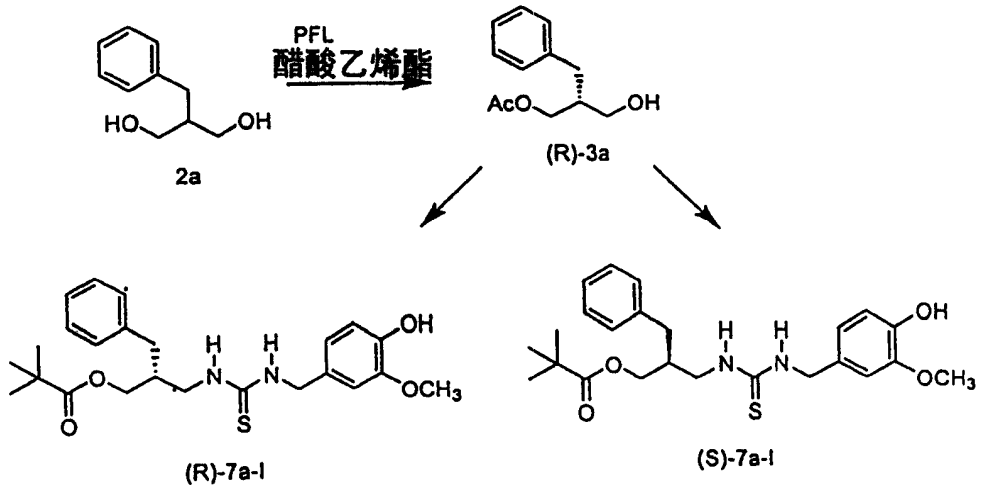

EtO2C
EtO2C
ArCH2X
NaH
R2
EtO2C
CO2Et
1a-d
LiAlH4
HO
OH
2a-d
1) CH3C(CCH3)3, H+
2) H2O
AcO
OH
3a-d
1) MsCl
2) NaN3
AcO
N3
4a-d
K2CO3
HO
N3
5a-d
R1COCl
1) H2
2) 异硫氰酸酯
3) CF3CO2H
R1
O
N3
6a-d
H
N
S
OH
OCH3
7a-d

反应路线 2



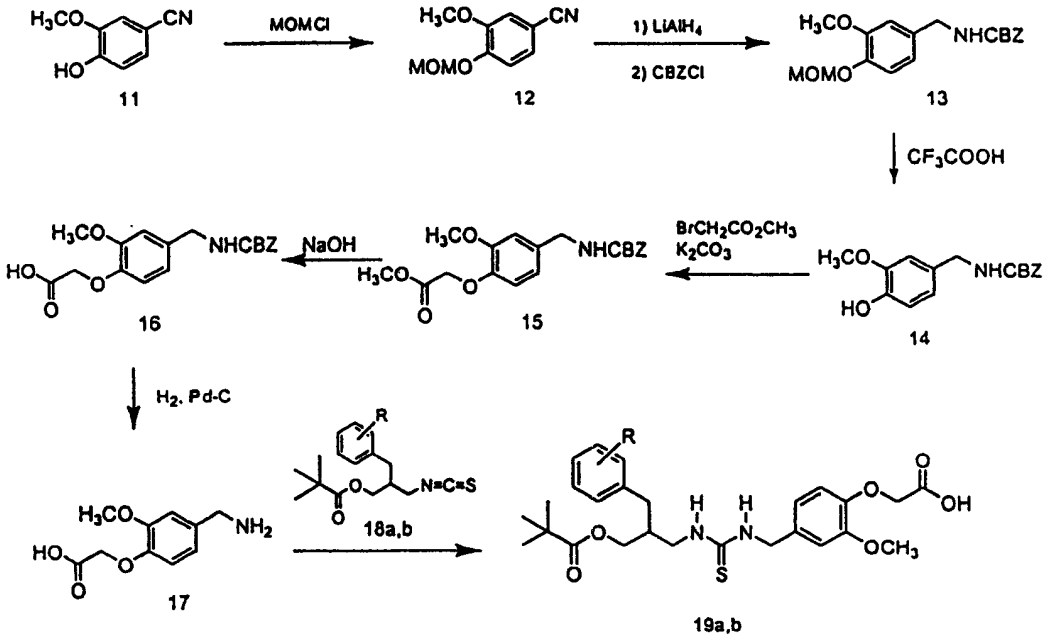
(Bn：苄基)

反应路线 3



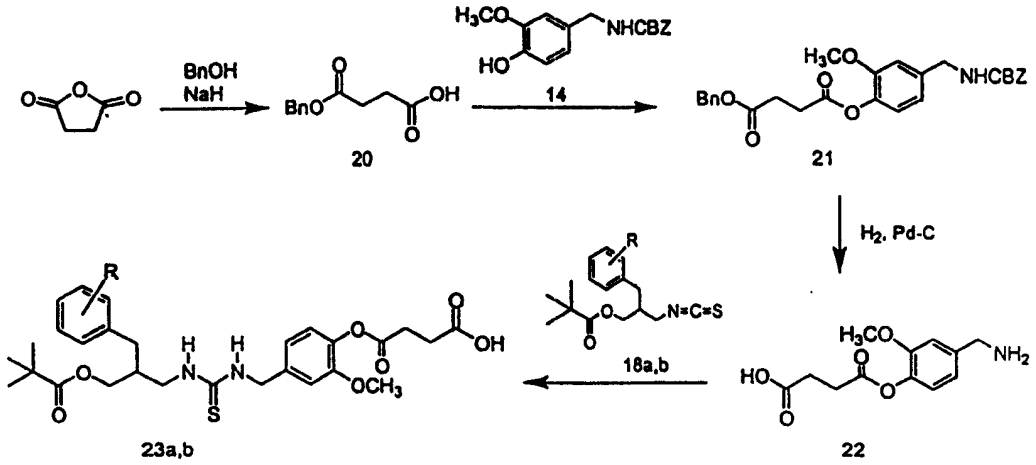
(PFL：荧光假单胞菌脂肪酸)

反应路线 4



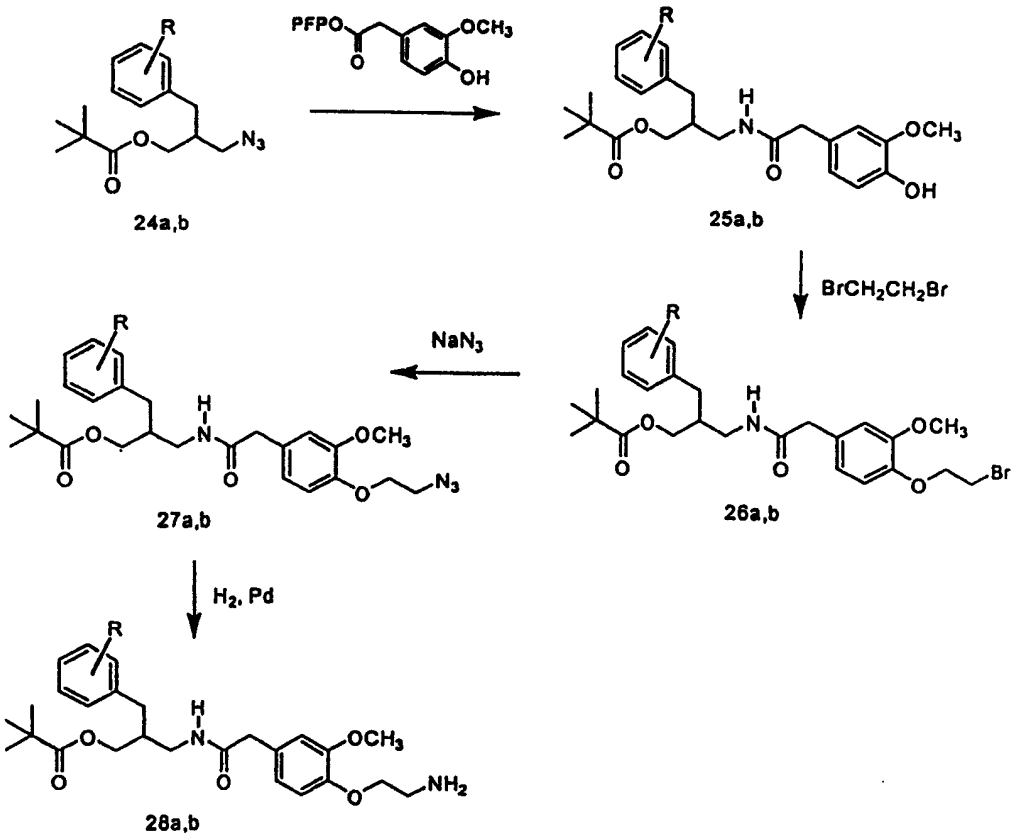
(MOMCl：**氯甲基甲基醚**
CBZCl ：**氯甲酸苄酯**)

反应路线 5



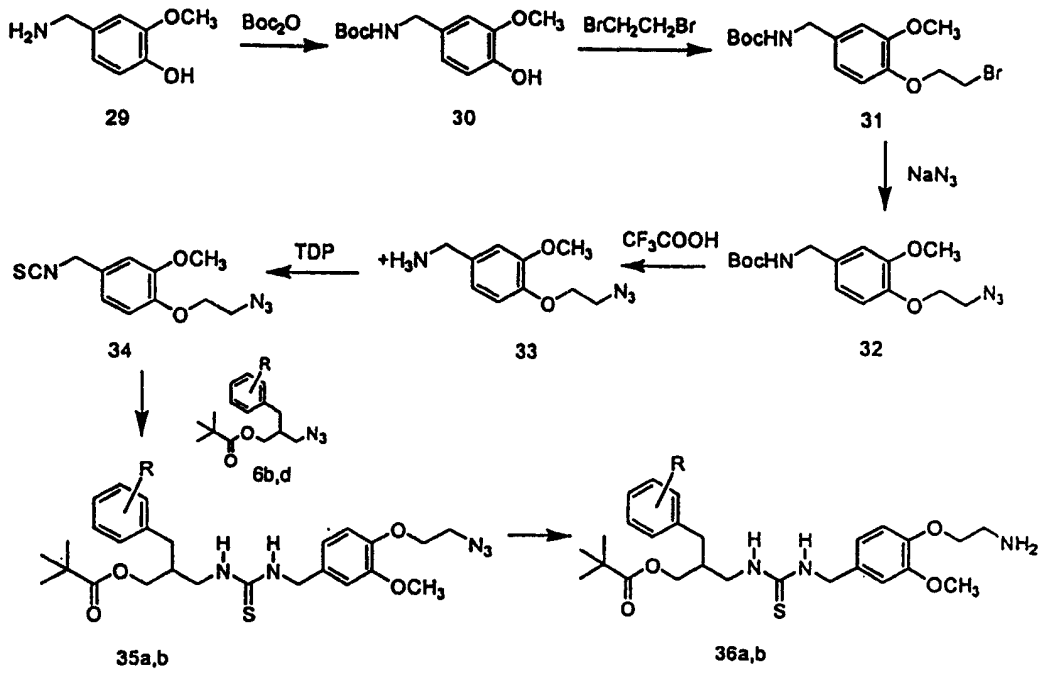
(BnOH： 苄基醇)

反应路线 6



(PFP：五氟苯基)

反应路线 7

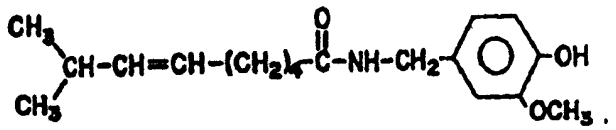


29 30 31 32 33 34

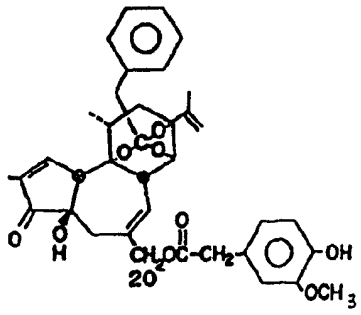
(Boc$_2$O：二叔丁基二碳酸酯

TDP ：1,1-硫羰基二-2(1H)吡啶酮

辣椒素 (CAP) 的结构



RTX的结构



本发明的化合物可以与适当的药物载体或稀释剂组合，制成药物组合物。例如，本发明的化合物可以溶解到油、丙二醇或制备注射溶液常用的其它溶剂中。适合的载体包括但不限于：生理盐水、聚乙二醇、乙醇、植物油、和肉豆蔻酸异丙酯。对于局部给药，本发明的化合物可以制成膏剂或霜剂。

含有本发明化合物的药物组合物可以用于下列场合：

- 缓解由治疗后神经痛、糖尿病性神经病变、乳房切除术后疼痛综合症、残肢疼痛、反射性交感神经营养不良症、三叉神经痛、口神经性疼痛、骨关节炎、类风湿性关节炎、纤维肌痛、急性传染性多神经炎、感觉异常性股痛、口灼烧(burning mouth)综合症引起的疼痛；
- 改善如由于两侧周围神经性病变引起的顽固性疼痛；
- 缓解由于牛皮癣、血液透析、aquagenic搔痒症、阴户前庭炎、感觉异常性背痛、brachioradial搔痒症、神经性皮炎引起的搔痒；
- 以滴鼻剂的方式治疗丛集性头痛、血管舒缩性鼻炎或常年性过敏性鼻炎；
- 以膀胱内溶液(intravtsical solution)的形式治疗膀胱超敏性或脊柱排尿肌反射亢进

本发明的化合物具有有效的镇痛和抗炎活性，因此本发明的药物组合物可以用于减轻或缓解急性、慢性或炎性疼痛，抑制炎症，治疗失禁。

下列配制方法和赋型剂只是为了举例说明，而绝不是为了限制本发明。

在药物制剂中，本发明的化合物可以使用它们药物可接受的盐的形式，可以单独使用或经适当组合使用，以及与其它药物活性化合物组合使用。

本发明的化合物通过将其溶解、悬浮或乳化在水性溶剂中，如生理盐水、5%葡萄糖，或溶解、悬浮或乳化在非水性溶剂中，如植物油、合成的脂肪酸甘油酯、更高级脂肪酸的酯或丙二醇，可以配制成注射制剂。该制剂可以包括常规的添加剂，如增溶剂、等张剂、悬浮剂、乳化剂、稳定剂和防腐剂。

本发明化合物的所需剂量可以根据患者病情和体重、严重程度、药物剂型、给药途径和周期而改变，本领域普通技术人员可以做出选择。但是，为了获得所需的效果，通常建议本发明化合物的给药量为0.0001 - 100 mg/kg体重/天，优选0.001 - 100 mg/kg体重/天。每日的剂量可以分一次或多次给药。在组合物中，以组合物的总重量计，该化合物存在量为0.0001 - 10%重量，优选0.0001 - 1%重量。

本发明的药物组合物可以通过多种途径对受验动物给药，如哺乳动物(大鼠、小鼠、家养动物或人)。可以尝试所有的给药方式，例如可以口服、直肠或通过静脉内、肌肉内、皮下、鞘内、硬膜外、脑室内注射给药。

实施例

合成1a-d的一般方法

将丙二酸二乙酯(6.4 g, 40 mmol)在0 ^{0}C的DMF (20 mL)冷溶液分步用氢化钠(60%, 1.92 g, 48 mmol)处理，在室温下搅拌40分钟。将反应混合物用相应的取代苄基氯(48 mmol)处理，室温下搅拌过夜。将反应混合物用水稀释，EtOAc萃取几次。合并有机层，用水和盐水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。残渣用硅胶快速柱色谱层析(flash column chromatography)，EtOAc/己烷 (1:10)作为洗脱剂，得到1。

实施例1: 3,4-二甲基苄基丙二酸二乙酯(lb)

70% 产率, 无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.9-7.05 (m, 3 H), 4.14 (m, 4H, 2 x CO_2CH_2), 3.61 (t, 1 H, CH), 3.25 (d, 1 H, CH_2Ar), 3.14 (d, 1 H,

CH_2Ar), 2.2-2.25 (m, 6 H, 2 x CH_3), 1.21 (m, 6 H, 2 x $CO_2CH_2CH_3$)

实施例2：4-氯苄基丙二酸二乙酯(1c)

74% 产率, 无色油; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.25 (d, 2 H), 7.16 (d, 2 H), 4.14 (m, 4 H, 2 x CO_2CH_2), 3.60 (t, 1 H, CH), 3.18 (d, 2 H, CH_2Ar), 1.21 (t, 6 H, 2 x $CO_2CH_2CH_3$)

实施例3：4-叔丁基苄基丙二酸二乙酯(1d)

74% 产率, 无色油; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.29 (d, 2 H), 7.13 (d, 2 H), 4.16 (q, 4 H, 2 x CO_2CH_2), 3.63 (t, 1 H, CH), 3.18 (d, 2 H, CH_2Ar), 1.30 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 1.20 (t, 6 H, 2 x $CO_2CH_2CH_3$)

合成2a-d的一般方法

将氢化铝锂(3.64 g, 96 mmol)的二乙醚(80 mL)在0 ^{0}C的冷溶液用**1** (24 mmol)的二乙醚(20 mL)溶液逐滴处理。在室温下搅拌3小时后，反应混合物用冰浴冷却并连续逐滴加入3.5 mL水、7 ml 15% NaOH溶液和10.5 mL水处理。将混合物用EtOAc洗涤过滤，滤液在真空下浓缩。残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (3:1)作为洗脱剂，得到2。

实施例4：2-苄基-1,3-丙二醇(2a)

98% 产率, 白色固体，mp = 67^{0}C; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.15-7.30 (m, 5 H, 苯基), 3.74 (dd, 2 H, CH_2OH), 3.62 (dd, 2 H, CH_2OH), 2.9-3.0 (bs, 2 H, OH), 2.58 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.03 (m, 1 H, CH)。

实施例5：2-(3,4-二甲基苄基) -1,3-丙二醇(2b)

92% 产率, 无色油; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 6.88-7.06 (m, 3 H, 苯基), 3.6-3.8 (m, 4 H, 2 x CH_2OH), 2.5-2.7 (bs, 2 H, OH), 2.60 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.52 (d, 1H, CH_2Ph), 2.2-2.28 (m, 6 H, 2 x CH_3), 2.02 (m, 1 H, CH)。

实施例6：2-(4-氯苄基) -1,3-丙二醇(2c)

75% 产率, 白色固体，mp = 64^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.24 (d, 2 H), 7.10 (d, 2 H), 3.75 (dd, 2 H, CH_2OH), 3.61 (dd, 2 H, CH_2OH), 2.85 (bs, 2 H, OH), 2.58 (d, 2 H, CH_2Ph), 1.97 (m, 1 H, CH)。

实施例7：2-(4-叔丁基苄基) -1,3-丙二醇(2d)

80%产率, 白色固体，mp = 67^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.31 (d, 2 H), 7.11 (d, 2 H), 3.81 (dd, 2 H, CH_2OH), 3.68 (dd, 2 H, CH_2OH), 2.58 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.23 (bs, 2 H, OH), 2.05 (m,1H, CH), 1.30 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$)。

合成3a-d的一般方法

将2（20 mmol）、原乙酸三甲酯(3.6 g, 30 mmol)和催化量的对甲苯磺酸在CH_2Cl_2 (40 mL)中的混合物在室温下搅拌2小时，然后用水(0.54 g, 30 mmol)处理。在室温下搅拌过夜后，将反应混合物在真空下浓缩。残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:2)作为洗脱剂，得到3。

实施例8：2-苄基-3-羟基丙基乙酸酯（3a）

97%产率, 无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.1-7.25 (m, 5 H, 苯基), 4.06 (AB的ddd, 2 H, CH_2OAc), 3.48 (m, 2 H, CH_2OH), 2.58 (AB的ddd, 2 H, CH_2Ph), 2.10 (m, 1 H, CH), 2.01 (s, 3 H, $COCH_3$)。

实施例9 : (R)-2-苄基-1,3-丙二醇((R)-3a)

该化合物从2a通过文献公开的方法制备(Tetrahedron Letters 30, 6189-6192 (1989))。

实施例10：2-(3,4-二甲基苄基)-3-羟基丙基乙酸酯(3b)

90%产率, 无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.88-7.06 (m, 5 H, 苯基), 4.13 (m, 2 H, CH_2OAc), 3.54 (m, 2 H, CH_2OH), 2.62 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.2-2.3 (m, 6H, 2 x CH_3), 2.10 (m, 1 H, CH), 2.07 (s, 3 H, $COCH_3$)。

实施例11: 2-(4-氯苄基)-3-羟基丙基乙酸酯(3c)

86%产率, 无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.25 (d, 2 H), 7.12 (d, 2 H), 4.12 (AB的ddd, 2H, CH_2OAc), 3.53 (AB的ddd, 2 H, CH_2OH), 2.63 (AB的ddd, 2 H, CH_2Ph), 2.10 (m, 1 H, CH), 2.06 (s, 3 H, $COCH_3$)。

实施例12：2-(4-叔丁基苄基)-3-羟基丙基乙酸酯(3d)

84%产率, 无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.30 (d, 2 H), 7.11 (d, 2 H), 4.13 (AB的ddd, 2 H, CH_2OAc), 3.56 (AB的ddd, 2 H, CH_2OH), 2.62 (AB的ddd, 2 H, CH_2Ph), 2.28 (s, 1 H, OH), 2.10 (m, 1 H, CH), 2.01 (s, 3 H, $COCH_3$), 1.30 (s, 9H, $C(CH_3)_3$)。

合成4a-d的一般方法

将**3** (12 mmol)和三乙胺(3.64 g, 36 mrnol)在CH_2Cl_2 (20 mL) 0 ^{0}C的冷溶液用甲磺酰氯(2.06 g, 18 mmol)逐滴处理。在室温下搅拌6小时后，反应混合物用CH_2Cl_2稀释。有机层用1N HCl、水和盐水洗涤，$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:3)作为洗脱剂，得到相应的油状的甲磺酸酯。将该甲磺酸酯溶解到DMF (10 mL)中，用叠氮化钠(2.2 g, 34 mmol)处理。在80 ^{0}C下搅拌8小时后，将反应混合物用水稀释，用EtOAc萃取几次。合并有机层，用水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:15)作为洗脱剂，得到**4**。

实施例13：3-叠氮基-2-苄基丙基乙酸酯(4a)

92%产率, 无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.15-7.35 (m, 5 H, 苯基), 4.05 (AB的ddd, 2 H, CH_2OAc), 3.34 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.68 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.22 (m, 1 H, CH), 2.08 (s, 3 H, $COCH_3$)。

实施例14：3-叠氮基-2-(3,4-二甲基苄基)丙基乙酸酯(4b)

85%产率, 无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.87-7.07 (m, 3 H), 4.04 (m, 2 H, CH_2OAc), 3.33 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.69 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.60 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.1-2.3 (m, 7 H, 2 x CH_3和CH), 2.07 (s, 3 H, $COCH_3$)。

实施例15：3-叠氮基-2-(4-氯苄基)丙基乙酸酯(4c)

88%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.26 (d, 2 H), 7.12 (d, 2 H), 4.03 (AB的ddd, 2 H, CH_2OAc), 3.34 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.65 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.17 (m, 1 H, CH), 2.07 (s, 3 H, $COCH_3$)。

实施例16：3-叠氮基-2-(4-叔丁基苄基)丙基乙酸酯(4d)

92%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.32 (d, 2 H), 7.08 (d, 2 H), 4.05 (AB的ddd, 2 H, CH_2OAc), 3.35 (AB的ddd, 2 H, CH_2N_3), 2.64 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.20 (m, 1 H, CH), 2.07 (s, 3 H, $COCH_3$), 1.30 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$)。

合成5a-d的一般方法

4 (8 mmol)和催化量的K_2CO_3在MeOH (10 mL)的溶液用两滴水处理。在室温下搅拌2小时后，反应混合物用几滴乙酸淬灭反应，在真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:3)作为洗脱剂，得到**5**。

实施例17：3-叠氮基-2-苄基-1-丙醇(5a)

98%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.15-7.35 (m, 5 H, 苯基), 3.65 (m, 2 H, CH_2OH), 3.40(AB的ddd, 2 H, CH_2N_3), 2.67 (AB的ddd, 2 H, CH_2Ph), 2.04 (m, 1 H, CH)。

实施例18；3-叠氮基-2-(3,4-二甲基苄基)-1-丙醇(5b)

92%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.88-7.08 (m, 5 H, 苯基), 3.65 (m, 2 H, CH_2OH), 3.42 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.68 (dd, 1 H, CH_2Ph), 2.60 (dd, 1 H, CH_2Ph), 2.2-2.3 (m, 6 H, 2 x CH_3), 2.03 (m, 1 H, CH)。

实施例19：3-叠氮基-2-(4-氯苄基)-1-丙醇(5c)

88%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.25 (d, 2 H), 7.10 (d, 2 H), 3.58 (m, 2 H, CH_2OH), 3.36 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.63 (dd, 2 H, CH_2Ph), 2.1 (bs, 1 H, OH), 1.98 (m, 1 H, CH)。

实施例20：3-叠氮基-2-(4-叔丁基苄基)-1-丙醇(5d)

98%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.32 (d, 2 H), 7.10 (d, 2 H), 3.63 (AB的ddd, 2 H, CH_2OH), 3.39 (AB的ddd, 2 H, CH_2N_3), 2.62 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.02 (m, 1 H, CH), 1.78 (bs, 1 H, OH), 1.30 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$)。

合成6a-d的一般方法

5 (1 mmol)、三乙胺(4 mmol)和催化量的4-二甲基氨基吡啶在CH_2Cl_2(5 mL)中0 ^{0}C下的冷溶液用其相应的酰基氯(2 mmol)处理。在室温下搅拌2-12小时后，反应混合物用CH_2Cl_2稀释。有机层用1 N HC1、水和盐水洗涤，用$MgSO_4$干燥，在真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:10-20)作为洗脱剂，得到**6**。

实施例21： 3-叠氮基-2-苄基丙基新戊酸酯(6a-I)

92%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.15-7.35 (m, 5 H, 苯基), 4.04 (AB的ddd, 2 H, CH_2OCO), 3.34 (AB的ddd, 2 H, CH_2N_3), 2.68 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.21 (m, 1 H, CH), 1.23 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$)。

实施例22： 3-叠氮基-2-苄基丙基-2-甲基丙酸酯(propanoate) (6a-II)

93%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.15-7.35 (m, 5 H, 苯基), 4.05 (AB的ddd, 2 H, CH_2OCO), 3.34 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.68 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.58 (m, 1 H, $CHMe_2$), 2.21 (m, 1 H, CH), 1.18 (dd, 6 H, 2 x CH_3)。

实施例23：3-叠氮基-2-苄基丙基己酸酯(6a-III)

90%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.14-7.35 (m, 5 H, 苯基), 4.05 (AB的ddd, 2 H, CH_2OCO), 3.34 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.68 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.32 (t, 2 H, $OOCCH_2$), 2.20 (m, 1 H, CH), 1.64 (m, 2 H), 1.2-1.4 (m, 4H), 0.88 (扭变t, 3 H)。

实施例24：3-叠氮基-2-苄基丙基硬脂酸酯(6a-IV)

78%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.14-7.35 (m, 5 H, 苯基), 4.05 (AB的ddd, 2 H, CH_2OCO), 3.33 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.68 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.32 (t, 2 H, $OOCCH_2$), 2.20 (m, 1 H, CH), 1.2-1.7 (m, 30 H), 0.88 (扭变 t, 3 H)。

实施例25：3-叠氮基-2-苄基丙基苯甲酸酯(6a-V)

90%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.04 (m, 2 H), 7.15-7.60 (m, 8 H), 4.35 (dd, 1 H, J=5.1和11.2 Hz, $BzOCH_2$), 4.26 (dd, 1 H, $BzOCH_2$), 3.43 (AB的ddd, 2 H, J =5.61、5.85和12.42 Hz, CH_2N_3), 2.78 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.35 (m, 1 H, CH)。

实施例26：3-叠氮基-2-(3,4-二甲基苄基)丙基新戊酸酯(6b-I)

94%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.86-7.07 (m, 3 H), 4.04 (m, 2 H, CH_2OCO), 3.36 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.70 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.61 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.1-2.3 (m, 7 H, 2 x CH_3和CH), 1.23 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$)。

实施例27：3-叠氮基-2-(3,4-二甲基苄基)丙基苯甲酸酯 (6b- V)

95%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.02 (m, 2 H), 7.57 (m, 1 H), 7.46 (m, 2 H), 6.8-7.07 (m, 3 H), 4.32 (m, 2 H, CH_2OCO), 3.45 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.80 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.71 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.2-2.4 (m, 7 H, 2 x CH_3和CH)。

实施例28：3-叠氮基-2-(3,4-二甲基苄基)丙基3,4-二甲基苯甲酸酯(6b-VI)

84%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.77 (m, 2 H), 7.21 (m, 1 H), 6.9-7.07 (m, 3 H), 4.30 (m, 2 H, CH_2OCO), 3.44 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.79 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.70 (d, 1 H, CH_2Ph), 2.2-2.4 (m, 13 H, 4 x CH_3和CH)。

实施例29：3-叠氮基-2-(4-氯苄基)丙基新戊酸酯(6c-I)

86%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.27 (d, 2 H), 7.09 (d, 2 H), 4.02 (AB的ddd, 2 H, CH_2OCO), 3.33 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.66 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.18 (m, 1 H, CH), 1.23 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$)。

实施例30：3-叠氮基-2-(4-氯苄基)丙基苯甲酸酯(6c-V)

92%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.01 (m, 2 H), 7.58 (m, 1 H), 7.46 (m, 2 H), 7.28(d, 2 H), 7.13 (d, 2 H), 4.29 (AB的ddd, 2 H, CH_2OCO), 3.43 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.75 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.33 (m, 1 H, CH)。

实施例31：3-叠氮基-2-(4-叔丁基苄基)丙基新戊酸酯(6d-I)

99%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.31 (d, 2 H), 7.08 (d, 2 H), 4.04 (AB的ddd, 2 H, CH_2OCO), 3.35 (m, 2 H, CH_2N_3), 2.65 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.20 (m, 1 H, CH), 1.30 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 1.23 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$)。

实施例32：3-叠氮基-2-(4-叔丁基苄基)丙基苯甲酸酯(6d-V)

88%产率，无色油；^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.04 (m, 2 H), 7.57 (m, 1 H), 7.45 (m, 2 H), 7.32(d, 2 H), 7.12 (d, 2 H), 4.31 (AB的ddd, 2 H, CH_2OCO), 3.44 (m, 2H, CH_2N_3), 2.75 (d, 2 H, CH_2Ph), 2.35 (m, 1 H, CH), 1.30 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$)。

合成7a-d的一般方法

6 (0.5 mmol) 和Lindler催化剂(50 mg)在EtOH (5 mL)的溶液在氢气球下氢化2小时。过滤反应混合物，然后将滤液在真空下浓缩。将残渣溶解在CH_2C1_2 (5 mL)中，用4-[(甲氧基甲基)氧]-3-甲氧基苄基异硫氰酸酯(0.5 mmol)处理。在室温下搅拌过夜后，将反应混合物浓缩，将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:1)作为洗脱剂，得到相应的硫脲。将该硫脲溶解到CH_2Cl_2 (2 mL)中，用三氟乙酸(1 mL)处理。在室温下搅拌1小时后，混合物用固体$NaHCO_3$淬灭，过滤，浓缩滤液。将残渣用EtOAc稀释，用$NaHCO_3$、水和盐水洗涤，在真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:1)作为洗脱剂，得到**7**。

实施例33：2-苄基-3- [(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基新戊酸酯(7a-I)

40%产率，无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.1-7.32 (m, 5 H, 苯基), 6.75-6.9 (m, 3 H, Ar), 6.27 (bt, 1 H, NH), 6.05 (bs, 1 H, NH), 5.63 (s, 1 H, OH), 4.40 (bd, 2 H, J = 4.38 Hz, $NHCH_2Ar$), 4.17 (dd, 1 H, J=3.9和11.46 Hz, CH_2OCO), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 3.7-3.85 (m, 2 H, CH_2OCO和$CHCH_2NHC=S$的1H), 3.24 (ddd, 1 H, J = 5.37、8.07和13.89 Hz, $CHCH_2NHC=S$), 2.61 (AB的ddd, 2 H, CH_2Ph), 2.33 (m, 1 H, CH), 1.23 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$); IR (纯净物): 3362, 1715, 1278, 1157; MS m/e 445 (M^++1). 分析结果 ($C_{24}H_{32}N_2O_4S$)C, H, N, S。

实施例34：(R)-2-苄基-3- [(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基新戊酸酯 ((R)-7a-I)

7a-I的(R)-对映体；按照与合成7a-I的一般方法相同的方法从(R)-3a制备该化合物，$[\alpha]_D$ = -714 (c, 0.22, $CHCl_3$)。

实施例35: (S)-2-苄基-3- [(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基新戊酸酯 ((S)-7a-I)

7a-I的(S)-对映体；按照与合成7a-I的一般方法相同的方法从(R)-3a制备该化合物，$[\alpha]_D$ = +695 (c, 0.08, $CHCl_3$)。

实施例36：2-苄基-3- [(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基 2-甲基丙酸酯 (7a-II)

35%产率，无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.13-7.30 (m, 5 H, 苯基), 6.75-6.87 (m, 3 H, Ar), 6.34 (bt, 1 H, NH), 6.30 (bs, 1 H, NH), 5.75 (s, 1 H, OH), 4.40 (bs, 2 H, $NHCH_2Ar$), 4.17 (dd, 1 H, J= 3.9和10.95 Hz, CH_2OCO), 3.84 (s, 3 H, OCH_3), 3.65-3.85 (m, 2 H, CH_2OCO和$CHCH_2NHC=S$), 3.28 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.60(m, 3 H, CH_2Ph和$CHMe_2$), 2.30 (m，1 H，$CHCH_2Ph$), 1.18 (dd, 6 H, 2 x CH_3); IR(纯净物): 3361, 1715, 1273, 1157; MS m/e 430 (M^+). 分析结果($C_{23}H_{30}N_2O_4S$) C, H, N, S。

实施例37：2-苄基-3- [(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基己酸酯(7a-III)

34%产率，无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.1-7.3 (m, 5 H, 苯基), 6.75-6.9 (m, 3 H, Ar), 6.23 (bt, 1 H, NH), 6.11 (bs, 1 H, NH), 5.66 (s, 1 H, OH), 4.40 (bs, 2 H, $NHCH_2Ar$), 4.15 (dd, 1 H, J=3.9 和 11.43 Hz, CH_2OCO), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 3.65-3.85 (m, 2 H, CH_2OCO和$CHCH_2NHC=S$), 3.29 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.61 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.30 (m, 3 H, CH_2COO和CH), 1.65 (m, 2 H), 1.2-1.4 (m, 4 H), 0.88 (扭变 t, 3 H); IR (纯净物): 3360, 1715, 1274, 1122; MS m/e 458 (M^+). 分析结果($C_{25}H_{34}N_2O_4S$) C, H, N, S。

实施例38：2-苄基-3- [(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基硬脂酸酯(7a-IV)

30%产率，无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.1-7.3 (m, 5 H, 苯基), 6.75-6.9 (m, 3 H, Ar), 6.28 (bt, 1 H, NH), 6.17 (bs, 1 H, NH), 5.69 (s, 1 H, OH), 4.39 (bs, 2 H, $NHCH_2Ar$), 4.14 (dd, 1 H, J= 3.9 和 11.67 Hz, CH_2OCO), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 3.65-3.85 (m, 2 H, CH_2OCO和$CHCH_2NHC=S$), 3.30 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.60 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.30 (m, 3 H, CH_2COO 和 CH), 1.2-1.7 (m, 30 H), 0.88 (扭变t, 3 H); IR (纯净物): 3363, 1731, 1274, 1031; MS m/e 626 (M^+). 分析结果($C_{37}H_{58}N_2O_4S$)。

实施例39：2-苄基-3-[(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基苯甲酸酯(7a-V)

50%产率，白色固体, mp = 90 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.98-8.02 (m, 2 H), 7.58 (m, 1 H), 7.4-7.5 (m, 2 H), 7.1-7.32 (m, 5 H, 苯基), 6.72-6.85 (m, 3 H, Ar), 6.42 (bt, 1 H, NH), 6.31 (bs, 1 H, NH), 5.73 (s, 1 H, OH), 4.34-4.42 (m, 3 H, $NHCH_2Ar$ 和CH_2OCO), 4.05 (dd, 1 H, CH_2OCO), 3.7-3.85 (m, 4 H, OCH_3 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.38 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.6-2.78 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.46 (m, 1 H, CH); IR (纯净物): 3360, 1714, 1274, 1121; MS m/e 464 (M^+). 分析结果($C_{26}H_{28}N_2O_4S$) C, H, N, S。

实施例40：2-(3,4-二甲基苄基)-3- [(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基新戊酸酯(7b-I)

40%产率，白色固体, mp = 47 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.93-7.05 (m, 3 H), 6.77-6.9 (m, 3 H, Ar), 6.22 (m, 1 H, NH), 5.98 (bs, 1 H, NH), 5.61 (s, 1 H, OH), 4.37 (bs, 2 H, $NHCH_2Ar$), 4.17 (AB的ddd, 1 H, CH_2OCO), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 3.7-3.85 (m, 2 H, CH_2OCO和$CHCH_2NHC=S$), 3.27 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.60 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.2-2.32 (m, 7 H, 2 x CH_3 和 CH), 1.22 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$); IR(纯净物): 3360, 1714, 1279, 1159; MS m/e 474 (M^++2). 分析结果($C_{26}H_{36}N_2O_4S$) C, H, N, S。

实施例41：2-(3,4-二甲基苄基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基苯甲酸酯(7b-V)

45%产率，白色固体, mp = 44 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.02 (m, 2 H), 7.59 (m, 1 H), 7.46 (m, 2 H), 6.9-7.06 (m, 3 H), 6.72-6.85 (m, 3 H, Ar), 6.33 (m, 1 H, NH), 6.13 (bs, 1 H, NH), 5.65 (s, 1 H, OH), 4.35-4.44 (m, 3 H, $NHCH_2Ar$ 和CH_2OCO), 4.05 (m, 1H, CH_2OCO), 3.7-3.85 (m, 4H, OCH_3和$CHCH_2NHC=S$), 3.40 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.6-2.78 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.44 (m, 1 H, CH), 2.2-2.3 (m, 6 H, 2 x CH_3); IR (纯净物): 3360, 1713, 1274, 1121; MS m/e 492 (M^+). 分析结果($C_{28}H_{32}N_2O_4S$) C, H, N,S。

实施例42：2-(3,4-二甲基苄基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基 3,4-二甲基苯甲酸酯(7b-VI)

55%产率，白色固体, mp = 58 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.75 (m, 2 H), 7.20 (m, 1 H), 6.9-7.06 (m, 3 H), 6.74-6.85 (m, 3 H, Ar), 6.39 (m, 1 H, NH), 6.07 (bs, 1 H, NH), 5.63(s, 1 H, OH), 4.35-4.43 (m, 3 H, $NHCH_2Ar$ 和 CH_2OCO), 4.05 (m, 1 H, CH_2OCO), 3.7-3.85 (m, 4-H, OCH_3 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.37 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.6-2.74(m, 2H, CH_2Ph), 2.41 (m, 1 H, CH), 2.2-2.35 (m, 12 H, 4 x CH_3); IR (纯净物): 3373, 1711, 1266, 1124; MS m/e 520 (M^+). 分析结果($C_{30}H_{36}N_2O_4S$) C, H, N, S。

实施例43：2-(4-氯苄基)-3- [(4-羟基-3-甲氧基苄基) 硫脲基]丙基新戊酸酯(7c-I)

40%产率，白色固体, mp = 62 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.25 (d, 2 H), 7.10 (d, 2 H), 6.77-6.90 (m, 3 H, Ar), 6.38 (t, 1 H, NH), 6.25 (bs, 1 H, NH), 5.72 (s, 1 H, OH), 4.42 (bs, 2 H, $NHCH_2Ar$), 4.16 (AB的dd, 1 H, CH_2OCO), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 3.7-3.85(m, 2 H, CH_2OCO和$CHCH_2NHC=S$), 3.19 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.59 (AB的ddd, 2 H, CH_2Ph), 2.32 (m, 1 H, CH), 1.22 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$); IR (纯净物): 3360, 1714, 1279, 1159; MS m/e 479 (M^+). 分析结果($C_{24}H_{31}ClN_2O_4S$) C, H, N, S。

实施例44：2-(4-氯苄基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲基]丙基苯甲酸酯(7c-V)

55%产率，白色固体, mp = 57 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.00 (m, 2 H), 7.60 (m, 1 H), 7.47(m, 2 H), 7.27 (d, 2 H), 7.15 (d, 2 H), 6.76-6.90 (m, 3 H, Ar), 6.36 (t, 1 H, NH), 6.15 (bs, 1 H, NH), 5.61 (s, 1 H, OH), 4.40 (m, 3 H, $NHCH_2Ar$和CH_2OCO), 4.00(AB的dd, 1 H, CH_2OCO), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 3.85 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 3.31(m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.67 (AB的ddd, 2 H, CH_2Ph), 2.46 (m, 1 H, CH); IR (纯净物): 3373, 1711, 1266, 1124; MS m/e 499 (M^+). 分析结果($C_{26}H_{27}ClN_2O_4S$) C, H, N, S。

实施例45：2-(4-叔丁基苄基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲基]丙基新戊酸酯(7d-I)

40%产率，黄色固体, mp = 52 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.30 (d, 2 H), 7.09 (d, 2 H), 6.75-6.90 (m, 3 H, Ar), 6.27 (t, 1 H, NH), 6.10 (bs, 1 H, NH), 5.66 (s, 1 H, OH), 4.40(bs, 2 H, $NHCH_2Ar$), 4.15 (AB的dd, 1 H, CH_2OCO), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 3.7-3.85 (m, 2 H, CH_2OCO 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.27 (m, 1 H，$CHCH_2NHC=S$), 2.58 (AB的ddd, 2 H, CH_2Ph), 2.30 (m, 1 H, CH), 1.29 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$), 1.22 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$); IR (纯净物): 3360, 1714, 1277, 1158; MS m/e 500 (M^+). 分析结果($C_{28}H_{40}N_2O_4S$), C, H, N, S。

实施例46：2-(4-叔丁基苄基)-3-[(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲基]丙基苯甲酸酯(7d-V)

50%产率，白色固体, mp = 54 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 8.02 (m, 2 H), 7.60 (m, 1 H), 7.46 (m, 2 H), 7.32 (d, 2 H), 7.14 (d, 2 H), 6.75-6.90 (m, 3 H, Ar), 6.28 (t, 1 H, NH), 6.06 (bs, 1 H, NH), 5.61 (s, 1 H, OH), 4.40 (m, 3 H, $NHCH_2Ar$ 和 CH_2OCO), 4.08 (AB的dd, 1 H, CH_2OCO), 3.86 (s, 3 H, OCH_3), 3.80 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 3.40 (m, 1 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.68 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.46 (m, 1 H, CH), 1.29 (s, 9 H, $C(CH_3)_3$); IR (纯净物): 3360, 1714, 1272, 1124; MS m/e 520 (M^+)。 分析结果($C_{30}H_{36}N_2O_4S$) C, H, N, S。

实施例47：N-[2-苄基-3-(苄氧基)丙基-N'-(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲(9a)

60%产率，无色油; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.10-7.30 (m, 10 H, 2 x Ph), 6.81 (d, 1 H, Ar), 6.60 (bs, 1 H, Ar), 6.56 (d, 1 H, Ar), 6.54 (bs, 1 H, NH), 5.64 (s, 1H, OH), 4.35 (m, 4 H, $NHCH_2Ar$和$PhCH_2O$), 3.82 (s, 3 H, OCH_3), 3.50 (m, 2H, $BnOCH_2$), 3.37 (bt, 2 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.64 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.20 (m, 1 H, CH); IR (纯净物): 3288, 1274, 1123; MS m/e 450 (M^+). 分析结果($C_{26}H_{30}N_2O_3S$) C, H, N, S。

实施例48 ：N-[3-苄氧基-2-(4-氯苄基)丙基-N'-(4-羟基-3-甲氧基苄基)硫脲(9c)

白色固体, mp = 37.5 ^{0}C; ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.0-7.3 (m, 9 H), 6.5-6.84 (m, 3 H, Ar), 6.54 (bs, 1 H, NH), 6.30 (bs, 1 H, NH), 5.68 (s, 1 H, OH), 4.32 (m, 4 H, $NHCH_2Ar$和$PhCH_2O$), 3.82 (s, 3 H, OCH_3), 3.48 (m, 2 H, $BnOCH_2$), 3.34 (m, 2 H, $CHCH_2NHC=S$), 2.58 (m, 2 H, CH_2Ph), 2.16 (m, 1 H, CH); IR (纯净物): 3340, 1273, 1153; MS m/e 484 (M^+)。分析结果($C_{26}H_{29}ClN_2O_3S$) C, H, N, S。

实施例49 : 3-甲氧基-4-甲氧甲氧基苄腈(12)

将4-羟基-3-甲氧基-苄腈(11, 1.5 g, 10 mmol)和二异丙基乙胺(2.7 mL, 15 mmol)在CH_2Cl_2 (50 mL)的溶液用氯甲基甲基醚(0.92 mL, 12 mmol)处

理，搅拌3小时。用CH_2Cl_2稀释后，将混合物用水洗涤，$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:2)作为洗脱剂，得到白色固体**12** (1.54 g, 80%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.27 (s, 1H, Ar), 7.24 (s, 1H, Ar), 7.11(s, 1H, Ar), 5.29 (s, 2H, $ArOCH_2$), 3.99 (s, 3H, $ArOCH_3$), 3.51 (s, 3H, CH_2 OCH_3)。

实施例50 : (3-甲氧基-4-甲氧甲氧基苄基)氨基甲酸苄基酯(13)

将**12** (1.54 g, 8 mmol)在THF (20 mL)的溶液逐滴加入到氢化铝锂(1.2 g, 32 mmol)在THF (30 mL)的搅拌悬浮液中。回流4小时后，将反应混合物冷却至0 ^{0}C，用5 N NaOH淬灭以破坏过量的$LiAlH_4$。通过过滤除去沉淀的铝盐，蒸发掉THF。将残渣在乙醚和水中分配。将醚层用盐水洗涤，用K_2CO_3干燥，过滤，真空下浓缩得到胺。将该胺溶解到CH_2Cl_2 (15 mL)中，用NEt_3 (1.16 mL, 8.3 mrnol)和苄基氯甲酸酯(1.18 mL, 8.3 mmol)处理。在室温下搅拌2小时后，将反应混合物用CH_2C1_2稀释。将有机层用水、盐水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (1:2)作为洗脱剂，得到白色固体**13**(0.795 g, 30%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.34 (m, 5H, 苯基), 7.08 (d, 1H, Ar), 6.81(m, 2H, Ar), 5.21 (s, 2H, $ArOCH_2$), 5.14 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.32 (d, 2H, NH_2COO), 3.85 (s, 3H, $ArOCH_3$), 3.50 (s, 3H, $ArOCH_2OCH_3$)

实施例51: (4-羟基-3-甲氧基苄基)氨基甲酸苄基酯(14)

将**13** (0.795 g, 2.4 mmol)在CH_2C1_2 (5 mL)的溶液缓缓地用三氟乙酸(2.5 mL)处理，在室温下搅拌5分钟。冷却至0 ^{0}C后，将反应混合物用饱和$NaHCO_3$溶液中和，用水稀释，用CH_2C1_2提取几次。合并有机层，用水、盐水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc/己烷 (2:1)作为洗脱剂，得到白色固体**14**(680 mg, 99%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.34 (m, 5H, 苯基), 6.83 (m, 3H, Ar), 5.14 (s, 2H, OCH_2Ph), 4.30(d, 2H, NH_2COO), 3.86 (s, 3H, $ArOCH_3$)

实施例52 : [4-(苄氧基羰基氨基甲基)-2-甲氧基-苯氧基]-乙酸甲基酯(15)

将**14** (0.287 g, 1 mmnol)在丙酮（20mL）中的溶液用K_2CO_3 (0.552 g, 4 mmol) 和溴乙酸甲酯(0.14 mL, 1.5 rnmol)处理，回流3小时。冷却后，过滤反应混合物，滤液在真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc：己烷 (3:2)作为洗脱剂，得到白色固体**15** (0.323 g, 90%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.28-7.33 (m, 5H, 苯基), 6.78 (m, 3H, Ar), 5.11 (s, 2H, $COCH_2Ph$), 4.76 (s, 2H, CH_2Ph), 4.28 (d, 2H, CH_2NHCO), 3.81 (s, 3H, $ArOCH_3$), 3.76 (s, 3H, $COOCH_3$)

实施例53：[4-(苄氧基羰基氨基甲基)-2-甲氧基-苯氧基]-乙酸(16)

将**5** (0.323 g, 0.9 mrnol)在THF (1 mL)中的溶液用15% NaOH溶液(1 mL)处理，在室温下搅拌30分钟。将反应混合物用乙酸中和，用水稀释，用CH_2C1_2提取几次。合并有机层，用水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩，得到白色固体**16** (0.276 g, 89%)。

^{1}H NMR (DMSO) δ 7.72 (s, 1H, COOH),7.17-7.33 (m, 5 H, 苯基), 6.81(s, 1H, Ar), 6.67(s, 2H, Ar), 5.02 (s, 2H, $COCH_2Ph$), 4.16 (s, 2 H, CH_2Ph), 4.09 (d, 2H, CH_2NHCO), 3.70 (s, 3H, $ArOCH_3$)

实施例54 : (4-氨基甲基-2-甲氧基苯氧基)乙酸(17)

将**16** (0.276 g, 0.8 mmol)在MeOH (5 mL)中的溶液用10%钯碳(30 mg)处理，在氢气球下氢化30分钟。过滤反应混合物，浓缩滤液得到白色固体**17**，其不经过纯化直接用于下一步。

合成19的一般方法

将**17** (0.5 mmol)在DMF (1 mL)中的溶液用NEt_3 (1.0 mmol)处理，用异硫氰酸盐**18** (0.5 mmol)在DMF中的溶液处理。在室温下搅拌24小时后，将反应混合物用水稀释，用EtOAc提取几次。合并有机层，用水、盐水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，CH_2C1_2: MeOH: AcOH (100:10:0.5)作为洗脱剂，得到**19**。

实施例55 ：2,2-二甲基-丙酸2-[3-(4-羧基甲氧基-3-甲氧基-苄基)硫脲基甲基]-3-(3,4-二甲基-苯基)-丙酯（19a）

产率27%，白色固体;

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.15-7.26 (m, 4H, Ar), 6.76 (m, 3H, Ar), 6.54 (m, 1H, NH), 4.53 (s, 2H, CH_2COOH), 4.45 (bs, 2H, $NHCH_2Ar$), 4.15 (AB的ddd, 1H, CH_2OC=O), 3.82 (s, 3H, OCH_3), 3.6-3.85 (m, 2H, CH_2OC=O 和 $CHCH_2NHC$=S), 3.26 (m, 1H, $CHCH_2NHC$=S), 2.60 (m, 2H, CH_2Ph), 2.20-2.28 (m, 7H, 2 x CH_3 & $CHCH_2Ph$), 1.23 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例56：2,2-二甲基丙酸 3-(4-叔丁基苯基) -2- [3-(4-羧基甲氧基-3-甲氧基苄基)硫脲基甲基]-丙酯（19b）

产率52%，白色固体;

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.09-7.28 (m, 4H, Ar), 6.85 (m, 3H, Ar), 6.54 (m, 1H, NH), 4.58 (s, 2H, CH_2COOH), 4.46 (bs, 2H, $NHCH_2Ar$), 4.12 (AB的ddd, 1H, CH_2OC=O), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.7-3.85 (m, 2H, CH_2OC=O 和 $CHCH_2NHC$=S), 3.26 (m, 1H, $CHCH_2NHC$=S), 2.58 (m, 2H, CH_2Ph), 2.32 (m, 1H, $CHCH_2Ph$), 1.28 (s, 9H, $ArC(CH_3)_3$), 1.22 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例57: 琥珀酸单苄基酯(20)

苄醇(0.52 mL, 5 mmol)在THF (20 mL)中的溶液用NaH(60%, 0.2 g, 5 mmol)和琥珀酸酐(0.502 g, 5 mmol)处理，回流4小时。冷却至室温后，将反应混合物用水稀释，EtOAc提取几次。合并有机层，用水、盐水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc: Hex (1:1)作为洗脱剂，得到白色固体**20**(0.866 g, 57%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.38 (s, 5H, 苯基), 5.15 (s, 2H, $PhCH_2$), 2.71 (m, 4H, $COCH_2CH_2CO$)

实施例58：琥珀酸苄基酯 4-(苄氧基羰基氨基甲基)-2-甲氧基苯基酯(21)

10 (0.866 g, 2.85 mmol)在CH_2Cl_2 (10 mL)的溶液用**14** (2.85 mmol)、二环己基碳二亚胺(4.2 mmol)、4-二甲基氨基吡啶(0.42 mmol)连续处理，在

室温下搅拌24小时。将反应混合物用二乙醚稀释，过滤沉淀的固体，在真空下浓缩滤液，将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc: Hex (2:1)作为洗脱剂，得到白色固体**21**(1.15 g, 85%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.30-7.36 (m, 10H, 2 x 苯基), 6.86 (m, 3H, Ar), 5.14 (d, 4H, $PhCH_2$), 4.34 (d, 2H, CH_2NH), 3.75 (s, 3H, $ArOCH_3$), 2.93 (t, 2H, $COCH_2CH_2CO$), 2.79 (t, 2H, $COCH_2CH_2CO$)

实施例59：琥珀酸单-(4-氨基甲基-2-甲氧基苯基)酯(22)

该化合物按照合成**17**的方法从**11**制备。

产率99%，黄色固体。

^{1}H NMR (DMSO) δ 8.24 (t, 1H, COOH), 6.75 (m, 3H, Ar), 4.17 (d, 2H, CH_2NH), 3.73(s, 3H, $ArOCH_3$), 2.44 (t, 2H, $COCH_2CH_2CO$), 2.34 (t, 2H, $COCH_2CH_2CO$)

合成**23**的一般方法

该化合物按照合成**19**的方法从**18**和**22**制备。

实施例60：琥珀酸单-(4- {3-[3-(3,4-二甲基苯基)-2-(2,2-二甲基丙酰基氧基甲基)-丙基]-硫脲基甲基}-2-甲氧基苯基)酯(23a)

产率17%，白色固体

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.9-7.2 (m, 4H, Ar), 6.8 (m, 3H, Ar), 6.34 (m, 1H, NH),4.56 (d, 2H, $NHCH_2Ar$), 4.04 (m, 1H, $CH_2OC=O$), 3.84 (s, 3H, OCH_3), 3.6-3.85 (m, 2H, $CH_2OC=O$ 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.27 (m, 1H, $CHCH_2NHCS$), 2.65 (m, 2H, CH_2Ph), 2.50 (s, 4H, $COCH_2CH_2CO$) 2.18-2.29 (m, 7H, 2 x CH_3 和 $CHCH_2Ph$), 1.24 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例61: 琥珀酸单-(4- {3-[3-(4-叔丁基苯基)-2-(2,2-二甲基丙酰基氧基甲基)-丙基]-硫脲基甲基}-2-甲氧基苯基)酯(23 b)

产率9%，白色固体

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.07-7.32 (m, 4H, Ar), 6.82 (m, 3H, Ar), 6.59 (m,

1H, NH), 4.87 (m, 3H, $NHCH_2Ar$ 和 $CH_2OC=O$), 4.12 (AB的ddd, 1H, $CH_2OC=O$), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.7-3.89 (m, 2H, $CH_2OC=O$ 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.41 (m, 1H, $CHCH_2NHC=S$), 2.58(m, 2H, CH_2Ph), 2.39 (t, 4H, $COCH_2CH_2CO$) 2.32 (m, 1H, $CHCH_2Ph$), 1.28 (s, 9H, $ArC(CH_3)_3$), 1.21 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

合成**25**的一般方法

24 (1.15 mmol)和高香草酸五氟苯基酯(0.4 g, 1.15 mmol)在EtOAc (5mL)的混合物用Lindlar催化剂处理，在氢气球下氢化7小时。过滤反应混合物，在真空下浓缩滤液，将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc: Hex (1:2)作为洗脱剂，得到白色固体**25**。

实施例62：2,2-二甲基丙酸3-(3,4-二甲基苯基)-2-{ [2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)乙酰氨基]-甲基}丙酯(25a)

产率37%，油状物

^1H NMR ($CDCl_3$) δ 6.68-7.02 (m, 6H), 5.96 (bs, 1H, NH), 4.00 (m, 1H, CH_2OCO), 3.87 (s, 3H, OCH_3), 3.80 (m, 1H, CH_2OCO), 3.46 (s, 2H, $COCH_2Ar$), 3.32 (m, 1H, CH_2NH), 3.13 (m, 1H, CH_2NH), 2.50 (d, 2H, CH_2Ph), 2.20 (m, 7H, 2 x CH_3 和 CH), 1.20 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例63：2,2-二甲基丙酸3-(4-叔丁基苯基)-2-{ [2-(4-羟基-3-甲氧基苯基)乙酰氨基]-甲基}丙酯(25b)

产率70%，油状物

^1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.28-7.31 (d, 2H), 7.03-7.05 (d, 2H), 6.89 (d, 1H, Ar), 6.80 (d, 1H, Ar), 6.72 (d, 1H, Ar), 5.8 (bs, 1H, NH), 4.02 (m, 1H, CH_2OCO), 3.89 (s, 3H, OCH_3), 3.83 (m, 1H, CH_2OCO), 3.49 (s, 2H, $COCH_2Ar$), 3.34 (m, 1H, CH_2NH), 3.12 (m, 1H, CH_2NH), 2.56 (d, 2H, CH_2Ph), 2.13 (m, 1H, CH), 1.31 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.22 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

合成**26**的一般方法

25 (0.33 mmol)、40% KOH (0.24 mL)、40%四丁基氢氧化铵(0.02 mL, 0.03 mmol) 和 1,2-二溴乙烷（0.96mL）在50 ^{0}C加热12小时。将反应混合物用CH_2Cl_2稀释，用水、盐水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc: Hex (1:2)作为洗脱剂，得到**26**。

实施例64：2,2-二甲基丙酸 2-({2-[4-(2-溴乙氧基)-3-甲氧基苯基]乙酰氨基}-甲基)-3-(3,4二甲基苯基)丙酯(26a)

产率68%

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.74-7.03 (m, 6H), 5.75 (bs, 1H, NH), 4.32 (t, 2H, OCH_2), 4.01 (m, 1H, CH_2OCO), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (m, 1H, CH_2OCO), 3.64 (t, 2H, CH_2Br), 3.47 (s, 2H, $COCH_2Ar$), 3.31 (m, 1H, CH_2NH), 3.10 (m, 1H, CH_2NH), 2.50 (d, 2H, CH_2Ph), 2.20 (m, 7H, 2 x CH_3 和 CH), 1.21 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例65：2,2-二甲基丙酸 2-({2-[4-(2-溴乙氧基)-3-甲氧基苯基]乙酰氨基}-甲基)-3-(4-叔丁基苯基)丙酯(26b)

产率92%

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.26-7.30 (d, 2H), 7.0 1-7.04 (d, 2H), 6.74-6.89 (m, 3H, Ar), 5.8 (bs, 1H, NH), 4.3 (t, 2H, OCH_2), 4.01(m, 1H, CH_2OCO), 3.86 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (m, 1H, CH_2OCO), 3.64 (t, 2H, CH_2Br), 3.47 (s, 2H, $COCH_2Ar$), 3.31 (m, 1H, CH_2NH), 3.10 (m, 1H, CH_2NH), 2.5 (d, 2H, CH_2Ph), 2.12 (m, 1H, CH), 1.30 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.22 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

合成**27**的一般方法

26 (0.22 mmol)在DMF (2 mL)的溶液用叠氮化钠(0.044 g, 0.67 mmol)处理，在100 ^{0}C下加热8小时。将反应混合物用水稀释，EtOAc提取。合并有机层，用水、盐水洗涤，$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc: Hex (1:1)作为洗脱剂，得到**27**。

实施例66：2,2-二甲基丙酸 2-({2-[4-(2-叠氮基乙氧基)-3-甲氧基苯基]乙酰氨基}-甲基)-3-(3,4-二甲基苯基)丙酯(27a)

产率98%

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.74-7.03 (m, 6H), 5.74 (bs, 1H, NH), 4.19 (t, 2H, OCH_2), 4.01(m, 1H, CH_2OCO), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (m, 1H, CH_2OCO), 3.62 (t, 2H, CH_2N_3), 3.48 (s, 2H, $COCH_2Ar$), 3.29 (m, 1H, CH_2NH), 3.10 (m, 1H, CH_2NH), 2.50 (d, 2H, CH_2Ph), 2.04-2.26 (m, 7H, 2 x CH_3 和 CH), 1.21 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例67：2,2-二甲基丙酸 2-({2-[4-(2-叠氮基乙氧基)-3-甲氧基苯基]乙酰氨基}-甲基)-3-(4-叔丁基苯基)丙酯(27b)

产率81%

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.26-7.30 (d, 2H), 7.01-7.04 (d, 2H), 6.75-6.91 (m, 3H, Ar), 5.76(bs, 1H, NH), 4.17 (t, 2H, OCH_2), 4.00 (m, 1H, CH_2OCO), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (m, 1H, CH_2OCO), 3.63 (t, 2H, CH_2N_3), 3.48 (s, 2H, $COCH_2Ar$), 3.31 (m, 1H, CH_2NH), 3.06 (m, 1H, CH_2NH), 2.54 (d, 2H, CH_2Ph), 2.12 (m, 1H, CH), 1.29 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.20 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

合成**28**的一般方法

27 (0.05 mmol)在MeOH (5 mL)中的溶液10%钯碳(0.02 g)处理，氢气球下氢化3小时。将反应混合物过滤，真空下浓缩滤液。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，$CHCl_3$:MeOH:NH_4OH (9:1:0.1)作为洗脱剂，得到**28**。

实施例68：2,2-二甲基丙酸 2-({2-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苯基]乙酰氨基}-甲基)-3-(3,4-二甲基苯基)丙酯(28a)

产率83%，白色固体

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.73-7.23 (m, 6H), 5.73 (bs, 1H, NH), 4.13 (m, 3H, OCH_2和CH_2OCO), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (m, 1H, CH_2OCO), 3.5 (m, 2H, $COCH_2Ar$), 3.23 (m, 2H, CH_2NH和CH_2NH_2), 3.09 (m, 2H, CH_2NH和CH_2NH_2), 2.50 (d, 2H, CH_2Ph), 2.04-2.26 (m, 7H, 2 x CH_3 和 CH), 1.20 (s,

9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例69：2,2-二甲基丙酸 2-({2-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苯基]乙酰氨基}-甲基)-3-(4-叔丁基苯基)丙酯(28b)

产率99%，白色固体

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.26-7.29 (m, 2H), 7.01-7.04(d, 2H), 6.76-6.89 (m, 3H, Ar), 5.84 (bs, 1H, NH), 4.05 (m, 1H, CH_2OCO), 3.85 (m, 3H, OCH_3), 3.72 (m, 3H, CH_2OCO和OCH_2), 3.47 (s, 2H, $COCH_2Ar$), 3.30 (m, 1H, CH_2NH), 3.10 (m, 1H, CH_2NH), 2.75 (bs, 2H, CH_2NH_2) 2.52 (d, 2H, CH_2Ph), 2.12 (m, 1H, CH), 1.29 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.20(s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例70：(4-羟基-3-甲氧苄基)氨基甲酸叔丁酯(30)

4-羟基-3-甲氧基苄基胺(**29**, 0.5 g, 2.64 mmol)和NEt_3(0.054 g, 5.29 mmol)在水(10mL)中的混合物逐滴用二叔丁基二碳酸酯(1.15 g, 5.29 mrnol)在二氧杂环己烷(1.5 mL)的溶液处理20分钟。在室温下搅拌24小时后，反应混合物用CH_2Cl_2提取几次。合并有机层，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc: Hex (1:1)作为洗脱剂，得到油状物**30**(0.663 g, 99%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.74-7.00 (m, 3H, Ar), 5.65 (s, 1H, OH), 4.79 (bs, 1H, NH), 4.23 (d, 2H, $NHCH_2$) 3.87 (s, 3H, OCH_3), 1.43 (s, 9H, $O(CH_3)_3$)

实施例71: [4-(2-溴-乙氧基)-3-甲氧基-苄基]氨基甲酸叔丁酯(31)

该化合物按照与合成**26**相同的方法从**30**制备。(EtOAc:Hex=l:3) 产率84%

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.78-6.89 (m, 3H, Ar), 4.81 (bs, 1H, NH), 4.29-4.33 (t, 2H, OCH_2), 4.24 (d, 2H, $NHCH_2$), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.65 (t, 2H, CH_2Br), 1.46 (s, 9H, $O(CH_3)_3$)

实施例72: (4-(2-叠氮基-乙氧基)-3-甲氧基-苄基]氨基甲酸叔丁酯(32)

该化合物按照与合成**27**相同的方法从**21**制备。(EtOAc:Hex=1:3) 产率

98%，黄色固体

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.78-6.87 (m, 3H, Ar), 4.83 (bs, 1H, NH), 4.24 (d, 2H, OCH_2), 4.15 (t, 2H, $NHCH_2$), 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.62 (t, 2H, CH_2N_3), 1.46 (s, 9H, $(CH_3)_3$)

实施例73：(4-(2-叠氮基乙氧基)-3-甲氧基-苄胺三氟乙酸酯(33)

32 (0.103 g, 0.32 mmol)在CH_2Cl_2 (1 mL)中的溶液用三氟乙酸处理，在100 ^{0}C下加热1小时。将反应混合物在真空下浓缩。残渣用甲苯稀释，在真空下浓缩几次，得到棕色固体**33**(0.115 g, 100%)

^{1}H NMR(DMSO-d_6) δ 6.99-7.10 (m, 3H, Ar), 4.12 (t, 2H, OCH_2), 3.93 (s, 2H, $ArCH_2$), 3.76 (s, 3H, OCH_3), 3.62 (m, 2H, CH_2N_3)

实施例74 : 1-(2-叠氮基乙氧基)-4-异硫氰酸根合甲基-2-甲氧基苯(34)

33 (0.115 g, 0.33 mmol)在DMF (1.5 mL)中的溶液用NEt_3 (0.037 g, 0.36 mmol)处理，搅拌1小时。将混合物用1,1-硫代羰基二-2(1H)-吡啶酮(0.084 g, 0.33 mmol)处理，在室温下搅拌2.5小时。将混合物用水稀释，二乙醚提取几次。合并有机层，用水和盐水洗涤，用$MgSO_4$干燥，真空下浓缩。将残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc: Hex (1:2)作为洗脱剂，得到油状物**34** (0.065g, 74%)。

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.75-6.91 (m, 3H, Ar), 4.65 (s, 2H, $CH_2N{=}C{=}S$), 4.20 (t, 2H, OCH_2), 3.90 (s, 3H, OCH_3), 3.62 (t, 2H, CH_2N_3)

合成**35**的一般方法

6 (0.27 mmol)在EtOH (5 mL)中的溶液用Lindler催化剂(0.042 mg)处理，在氢气球下氢化2小时。过滤反应混合物，浓缩滤液。将残渣溶解在CH_2Cl_2 (5 mL)中，用**34** (0.27 mmol)处理。在室温下搅拌15小时后，将反应混合物在真空下浓缩。残渣用硅胶快速柱色谱层析，EtOAc: Hex (1:10)作为洗脱剂，得到**35**。

实施例75: 2,2--二甲基丙酸 2-{3-[4-(2-叠氮基乙氧基)-3-甲氧基苄基]硫脲基甲基}-3-(3,4-二甲基苯基)丙酯(35a)

产率39%

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.81-7.04 (m, 6H), 6.25 (m, 1H, NH), 6.02 (bs, 1H, NH), 4.41 (bs, 2H, $NHCH_2Ar$), 4.14-4.17 (m, 3H, CH_2OCO 和 OCH_2), 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.76-3.85(m, 2H, CH_2OCO 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.60-3.63 (t, 2H, CH_2N_3), 3.21-3.28 (m, 1H, $CHCH_2NC=S$), 2.47-2.66 (m, 2H, CH_2Ph), 2.20-2.26 (m, 7H, 2 x CH_3 和CH), 1.22 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例76: 2,2--二甲基丙酸 2-{3-[4-(2-叠氮基乙氧基)-3-甲氧基苄基]硫脲基甲基}-3-(4-叔丁基苯基)丙酯(35b)

产率60%

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 7.3 (d, 2H), 7.08 (d, 2H), 6.9 (m, 3H, Ar), 6.28 (m, 1H, NH), 6.10(bs, 1H, NH), 4.43 (bs, 2H, $NHCH_2Ar$), 4.2 (m, 3H, CH_2OCO 和 OCH_2) 3.85 (s, 3H, OCH_3), 3.74-3.95 (m, 2H, CH_2OCO 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.60-3.63 (t, 2H, CH_2N_3), 3.26 (m, 1H，$CHCH_2NHC=S$), 2.6 (m, 2H, CH_2Ph), 2.30 (m, 1H, CH), 1.29 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

合成**36**的一般方法

35 (0.068 g, 0.13 mmol)在THF (2 mL)中的溶液用三苯膦(0.067 g, 0.25 mmol)和水(4.5 mg, 0.25 mmol)处理，在室温下搅拌24小时。将反应混合物在真空下浓缩，残渣用硅胶快速柱色谱层析，$CHCl_3$:MeOH:NH_4OH (9:1:0.1)作为洗脱剂，得到**36**。

实施例77: 2,2--二甲基丙酸 2-{3-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苄基]硫脲基甲基}-3-(3,4-二甲基苯基)丙酯(36a)

产率49%

^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 6.77-7.04 (m, 6H), 6.47 (bs, 2H, NH), 4.43 (bs, 2H, $NHCH_2Ar$), 4.18 (AB的ddd, 1H, CH_2OCO), 3.98 (t, 2H, OCH_2), 3.81 (s, 3H, OCH_3), 3.71-3.77 (m, 2H, CH_2OCO 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.06 (t, 2H,

CH_2NH_2), 2.48-2.68 (m, 2H, CH_2Ph), 2.20 (m, 7H, 2 x CH_3 和 CH), 1.23 (s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实施例78: 2,2--二甲基丙酸 2-{3-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苄基]硫脲基甲基}-3-(4-叔丁基苯基)丙酯(36b)

产率99%

^1H NMR ($CDCl_3$) δ 7.28-7.47 (m, 2H), 7.2 (d, 2H), 6.8-7.0 (m, 3H, Ar), 6.4 (bs, 1H, NH), 4.44 (bs, 2H, $NHCH_2Ar$), 4.18 (m, 1H, CH_2OCO), 3.82 (t, 2H, OCH_2), 3.78 (s, 3H, OCH_3), 3.66-3.82 (m, 2H, CH_2OCO 和 $CHCH_2NHC=S$), 3.09 (t, 2H, CH_2NH_2), 2.48-2.68 (m, 2H, CH_2Ph), 2.20 (m, 1H, CH), 1.28 (s, 9H, $C(CH_3)_3$), 1.22(s, 9H, $CO(CH_3)_3$)

实验实施例1：受体结合亲和性以及CAP-激活的通道检测

通过体外受体结合检测和CAP-激活的单通道激活检测，测定了靶化合物的CAP-类活性。在受体结合检测中，评价了该化合物从受体转移结合的[^{3}H]RTX的能力。该结果以K_i值表示(平均值±SEM，3次实验)，K_i值表示转移一半结合标记的RTX的非放射性配体的浓度。在CAP-激活的单通道激活检测中，在将该化合物细胞外应用到培养的新生大鼠背根神经节(DRG)神经元后，测定了非选择性阳离子流入导致的内向流的增加。该化合物的活性表示为与作为对照的CAP相比的离子电导的相对差值。

方法

1．[^{3}H] 树脂毒素结合检测

由化学合成和分析实验室（Chemical Systhesis and Analysis Laboratory, NCI-FCRDC）合成[^{3}H]RTX (37Ci/mmol)。非放射性RTX 和capsazepine从LC实验室(Woburn, MA)商购。

来自大鼠脊髓的膜标本上测定了在竞争性配体存在下[^{3}H]RTX结合的抑制作用。如下所述制备膜标本(Methods in Neurosciences Vol 8, pp 368-380)。简要地说，在普通麻醉下，安乐处死动物，无菌取出完整的脊髓。借助于Omni 2000组织均化器将样品在pH 7.4、冰冻的10 mM HEPES溶液中破碎，所述溶液含有5 mM KCl、5.8 mM NaCl、2 mM $MgCl_2$、0.75 mM

$CaCl_2$、12 mM D-葡萄糖，和 137 mM 蔗糖（“缓冲液A”）。将匀浆在4 ^{0}C、1,000转下离心10分钟；将得到的小球再次混悬在缓冲液A中，4 ^{0}C、35,000转下再离心40分钟。从第二次离心得到的小球再次混悬在蛋白质浓度大约2 mg/ml的相同的缓冲液中。在冰上快速冷冻成小部分，在-70^{0}C下保存，直到检测。

设计实验，通过非放射性化合物评价了[^{3}H]RTX与膜特异性结合的抑制。在用0.25 mg/ml牛血清清蛋白(V型, Sigma)补充的缓冲液A中，在总体积300 :1的竞争性配体存在下，[^{3}H]RTX (100 pM)与100 g膜蛋白在37 ^{0}C下温育60分钟。

加入牛血清清蛋白是为了减少RTX与表面的非特异性吸附。在温育结束时，在冰上冷冻试管，向每个试管加入100μg 体积50: 1的“ α_1-酸糖蛋白” (Sigma)，以减少非特异性结合。然后通过在4 ^{0}C、10,000转下离心15分钟将膜造粒，分离结合和游离的[^{3}H]RTX。含有小球的试管端部被切下，通过闪烁计数测定结合的放射性。在1 mM非放射性RTX存在下测定非特异性结合。每个实验一式三份测定结合，每个实验至少重复两次。在每个实验中，通常应用竞争性配体的5-6个浓度测定竞争曲线。

结合表示为fmol/mg蛋白。按照厂商的方案(Bio-Rad Laboratories, CA)应用Bio-Rad蛋白检测测定蛋白浓度。在闪烁计数前在闪烁流体中平衡样品10小时，每个样品计数5分钟。按下列公式分析结合数据：

$$B = ((L_H + L_C * K_d / K_l)^{(n-1)} / (K_d^n + (L_H + L_C * K_d/K_l)^n)) / (L_H^{n-1} / (K_d^n + L_H^n))$$

其中L_c为非放射性配体的浓度，K_1为占据一半结合位点的游离非放射性配体的浓度，B表示特异性结合的[^{3}H]RTX，Bmax为受体密度，L_H为游离[^{3}H]RTX的浓度，K_d为一半受体被占用的[^{3}H]RTX浓度，n为被称为Hill系数的协同指数。

2．辣椒素激活的单一通道检测

细胞制备：培养的DRG神经元应用以前的方法制备(J. Neuroscience 16, 1659-1667, (1996))。简要地说，从1或2天的新生大鼠颈下部、胸和腰各部位的脊髓解剖出DRG。在含有DMEM/F-12混合物(Gibco, Grand Island,

NY)、胎牛血清(10%, Gibco)、1 mM丙酮酸钠、25 ng/ml神经生长因子(Sigma, St. Louis, MO)、和 100 单位/mL青霉素/链霉素(Sigma)的冷的(4 ^{0}C)培养介质中收集DRG。用DMEM/F-12介质洗涤神经节3次，在含有1 mg/ml胶原酶(II型, Worthington Biomedical, Freehold, NJ)的DMEM/F-12介质中温育30分钟。然后将神经节用不含Mg^{2+}-和Ca^{2+}-的Hank溶液洗涤3次，在轻微振荡下在含有2.5 mg/ml胰蛋白酶(Gibco)的温和(37^{0}C)Hank溶液中温育。将该溶液在1,000 rpm下离心10分钟，用培养介质洗涤小球2或3次，以抑制酶。将小球悬浮在培养介质中，用Pasteur移液管轻轻研制。将该悬浮液涂覆于放置在小培养皿上的圆形玻璃盖玻片上（Fischer,Pittsburgh,PA）。将玻璃盖玻片用聚-L-赖氨酸(Sigma)处理过夜，使用前干燥。将细胞在37^{0}C、95%空气/ 5% CO_2气体混合物中温育。涂覆后2-4天使用细胞。

电流记录：取出硼硅酸盐玻璃吸液管(Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo)，用Sylgard (Dow Coming Co., Midland, MI)涂覆。整个细胞和单通道电流记录的末端电阻分别为大约2和5 兆欧（Mohm）。与玻璃吸液管形成吉咖封口后，细胞附着的和内翻外（inside-out）膜片结构用于研究单通道电流，如Hamill等所描述。将盐桥(1%琼脂，在300 mM KC1中)浸入到槽中，吸取溶液中的Ag/AgCl参照电极用于减少接点电位的变化。在形成吉咖封口前，取消接点电位。对于整个细胞的记录，通过轻微吸取使玻璃吸液管中的细胞膜破碎。在形成整个细胞后，取消获能瞬变(capacitative transient)。应用片-夹(patch-clamp)放大器(Axopatch 200A, Axon Instruments, Foster City, CA)记录单通道电流，应用8孔低通透贝塞尔（Bessel）过滤器在5 KHz下过滤。应用数字数据记录器(VR-10B, Instrutech, Great Neck, NY)在37 KHz下将数据数字化，储存到录像磁带上，用于以后分析。对于图表记录，在500 Hz下过滤放大器的输出量(Frequency Device, Havenhill, MA)，使其进入热红外探测器阵列图表记录器(TA-240, Gould Instrument System, Valley View, OH)。将储存在录像磁带上的数字化数据输入到个人电脑(IBM奔腾兼容机（pentium-compatible）)，用于单通道电流的计算机分析。

应用pCLAMP软件(6.02版, Axon Instruments)获得单通道电流的通道

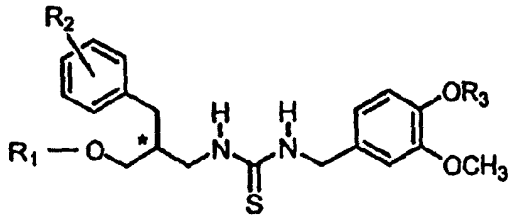
打开概率(P_0)、振幅和平均打开时间。从表示打开事件曲线下的面积占表示打开和关闭事件曲线下的总面积的比例获得单通道的P_0。FETCHAN (Axon Instruments)中的半幅算法用于测定打开事件的阈振幅。应用小片通道(N)数量和P_0的乘积计算作为通道活性(NP_0)。仅从含有小于5个功能性CAP-激活的通道的小片收集NP_0或P_0。

溶液：用于单通道记录的槽和吸液管中的溶液含有(以mM计) 140 Na^+、2 Mg^{2+}、144 Cl^-、5 EGTA、和10 HEPES，pH为7.2。对于整个细胞，吸液管中的溶液含有(以mM计) 140 K^+、2 Mg^{2+}、144 Cl^-、5 EGTA、10 HEPES和4 ATP，pH为7.2。对于整个细胞记录的对照灌注液含有(以mM计) 140 Na^+、5 K^+、2 Mg^{2+}、1 Ca^{2+}、151 Cl^-、和10 HEPES。将合成的化合物溶解，储存在100%乙醇中，制成10 mM储备液。用于细胞培养或电生理学实验的所有其它试剂从Sigma购买。所有的值表示为平均值±S.E.。

结果

结果如表1所示，可以概括如下：(1) 所有测试化合物，除7b-Ia外，都比CAP表现出更强的兴奋活性和受体结合亲和性；(2) 硫脲类似物7a-I (K_i=65.6 nM)比我们早期研究中报道的CAP-相关酰胺类似物(K_i = 404 nM)表现出更强的兴奋活性；(3) 被设计模拟RTX的C_3-羰基的R_1中的酯基，比R_1中的苄基醚类似物对于有效兴奋活性更重要[将7a-V (K_i= 31.2 nM)和 7c-V (K_i= 148.7 nM)与9a (= 148 nM) 和 9c (K_i= 659 nM)相比]，表明了与受体氢键结合的羰基部分的重要性；(4) 对于比CAP更有效约280和490倍的化合物7b-I 和 7d-I (K_i分别为19 nM和10.8 nM)，R_1的新戊酰基和R_2的4-叔丁苄基被证明是产生最佳兴奋活性的有效疏水基团；以及(5) 硫脲与受体结合表现出很强的立体定向性，因为7a-I的两个光学活性异构体的受体结合亲和性显示出与外消旋物有显著差别[将7a-I (K_i= 65.6 nM)与(R)-7a-I (K_i= 18.43 nM)和(S)-7a-I（K_i= 74 nM)相比]。

表1 结合亲和性和通道激活



	R_1	R_2	R_3	亲和性(nM)	激活[a]
CAP				5,310 (±370)	
RTX				0.023	
酰胺	$(CH_3)_3CCO$	H	H	404 (±37)	++
7a-I	$(CH_3)_3CCO$	H	H	65.6 (±30.5)	+++
(R)-7a-I	$(CH_3)_3CCO$	H	H	18.43 (±5.1)	+++
10	$(CH_3)_3CCO$	H	CH_2OCH_3	146.2 (±48)	++
(S)-7a-I	$(CH_3)_3CCO$	H	H	74 (±16)	++
7a-II	$(CH_3)_2CHCO$	H	H	132.9 (±75)	+++
7a-III	$CH_3(CH_2)_4CO$	H	H	632.3 (±48)	++
7a-IV	$CH_3(CH_2)_{16}CO$	H	H	1,873 (±351)	+
7a-V	PhCO	H	H	31.2 (±9)	++
9a	$PhCH_2$	H	H	148 (±11)	++
7b-I	$(CH_3)_3CCO$	3,4-diMe	H	19 (±4.3)	++
7b-Ia	$(CH_3)_3CCO$	3,4-diMe	CH_2OCH_3	876 (±65)	W
7b-V	PhCO	3,4-diMe	H	409 (±178)	++
7b-VI	(3,4-Me)PhCO	3,4-diMe	H	183.5 (±69)	+++
7c-I	$(CH_3)_3CCO$	4-Cl	H	54.4 (±16)	++
7c-V	PhCO	4-Cl	H	148.7 (±11)	++
9c	$PhCH_2$	4-Cl	H	659 (±286)	++
7d-I	$(CH_3)_3CCO$	4-t-Bu	H	10.8 (±4)	++
7d-V	PhCO	4-t-Bu	H	60.2 (±10)	++

[a] + = CAP, ++ = 10 CAP, +++ = 100 CAP

实验实施例2：镇痛和抗炎活性

应用PBQ-诱导的扭曲(writhing)检测，评价了通过受体结合和单通道检测选择的一些最有效的辣椒素兴奋剂的镇痛活性，结果如表2所式。如所期望的那样，根据体外检测两个最有效的化合物7d-I和7b-I表现出良好的镇痛活性，ED_{50}分别为0.5和1μg/kg。该值表明这些化合物比CAP有效300-600倍。这两种化合物同样都比olvanil或DA-5018更有效，olvanil或DA-5018任何一个都是目前市场可以买到的或正进行局部镇痛临床实验的药物。

在TPA-诱导的耳水肿检测中，与具有强抗水肿活性的CAP相比，甚至使用本发明化合物中最有效的兴奋剂都表现出弱的抗炎活性，如表2所示。我们最初推测其具有更高内在效果的硫脲类似物可能会明显降低TPA-诱导的耳水肿。在这方面，它们的活性类似于olvanil或DA-5018，olvanil或DA-5018两种药在TPA-诱导的耳水肿检测中显示出弱的局部活性。经皮渗透弱的生物利用率部分解释了观察到的这些化合物的弱局部抗炎活性。

通过钙流入检测和乙酸诱导的扭曲测试，分别评价了本发明化合物的体外和镇痛活性，如表3所示。与辣椒素相比，它们都表现出受体兴奋活性。在它们当中，氨乙基类似物相对表现出更强的镇痛活性。特别是化合物28a被证明是最有效的一个，比在韩国正进行临床实验的DA-5018更有效。

方法

1. 小鼠PBQ-诱导的扭曲抗伤害感受检测

将雄性ICR小鼠(体重25 g)持续置于控制的光环境下(12小时亮/12小时暗)。给动物腹膜内注射0.3 mL化学刺激物苯-对-醌(4.5 mg/kg溶解于含有5%乙醇的盐水中)，6分钟后，在6分钟内连续计数腹部收缩数。在注射苯-对-醌前，给动物(10个动物/组)腹膜内注射0.2mL乙醇/吐温-80/盐水(10/ 10/ 80)介质中的合成的化合物。对苯-对-醌的扭曲反应次数相对于对盐水对照组的扭曲反应次数的减少被认为是抗伤害感受作用的指标。该数据表示为指示扭曲次数减少50%的ED_{50}值。

2. 乙酸诱导的扭曲测试

将ICR小鼠(体重20 g)持续置于控制的光环境下(12小时亮/12小时暗)，并且在测试前禁食过夜。给动物腹膜内注射0.2 ml乙酸溶液(1.2 %)，6分钟后，在6分钟内连续计数腹部收缩次数。给小鼠(10个/组)用药物或载体(10 ml/kg, i.p.)预处理，1小时后，注射乙酸。将测试化合物溶于乙醇/吐温-80/盐水(10/ 10/ 80)介质中。抗伤害感受活性表示为腹部收缩次数的减少，即对照动物(载体预处理的小鼠)和用测试化合物预处理的动物的腹部收缩次数之差。

3. TPA-诱导的小鼠耳水肿检测

雄性ICR小鼠(体重25-30 g)，10个/组，用25μL丙酮或在丙酮中的合成化合物局部处理右耳。大约17小时后，进行同样处理。1小时后，将在丙酮中的25μL 0.5 nmol的TPA应用到同一耳上。应用5小时后，将动物处死，在电子天平上称重耳穿孔(6 mm直径)，精确到0.1 mg。耳穿孔的增加重量是炎症(耳水肿)的衡量标准。抗炎效果表示为化合物处理的与对照组膨胀抑制百分比。抑制百分比通过下列公式定义：

%抑制 = (C-T)/C x 100

其中C和T分别指TPA-处理的组和TPA +药物处理的组的耳重量的增加。

4. ^{45}Ca摄取实验

1) DRG神经元的培养物

通过以前描述的方法(Wood等, 1988)并作改进，从新生Sprague-Dawley大鼠制备DRG神经元。简要地说，麻醉下解剖并收集所有水平脊髓的DRG。在37^{0}C下200 U/ml胶原酶和2.5 mg/ml胰蛋白酶中连续温育神经节30分钟。通过加入等体积补充有10%马血清的DME/F12介质，停止消化。通过火磨光的Pasteur吸液管磨碎神经节，通过尼龙膜过滤，旋转下来。将分离的细胞以1500-1700神经节/孔的密度涂覆在事先用10μg/ml聚-D-鸟氨酸涂布的Terasaki培养板上。然后在37 ^{0}C、含有5% CO_2的潮湿

空气中，将该细胞在含有1.2 g/l 碳酸氢钠、15 mM HEPES、50 mg/l庆大霉素和 10%马血清的DME/F12介质(用C6神经胶质瘤细胞调节(在成片的单层细胞上2天)的相同介质1:1稀释)中培养3-4天。介质用200 ng/ml神经生长因子补充。在开始的2天，加入阿糖胞苷(100μM)，以杀死分裂的非神经元细胞。

2) 摄取实验

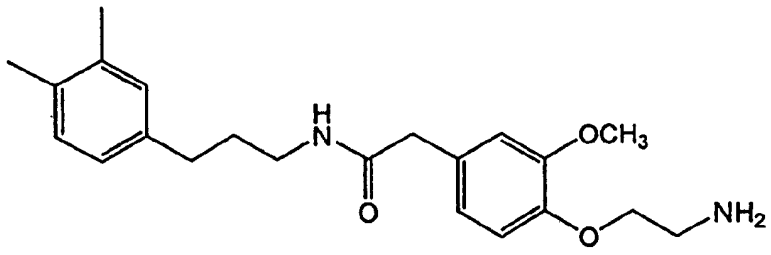
含有生长3-4天DRG神经元的 Terasaki培养板应用HEPES (10 mM, pH 7.4)缓冲的不含钙和镁的Hank平衡盐溶液洗涤4次，进行平衡。从每个孔中取出该溶液。向每个孔中加入含有测试浓度的化合物加10μCi/ml $^{45}Ca^{2+}$的介质(10μ1)。在室温下温育神经元10分钟，然后将Terasaki培养板用HEPES (10 mM, pH 7.4)缓冲的不含钙和镁的Hank平衡盐溶液洗涤6次，烘箱中干燥。然后加入0.3%十二烷基硫酸钠(10 μ1)，以溶解细胞和提取$^{45}Ca^{2+}$。将每孔中的内容物转移至闪烁管中，在3 ml Aquasol-2闪烁剂中计数。测试化合物的兴奋活性被计算作为在浓度3μM下辣椒素的最大反应百分比，结果表示为EC_{50} ±SEM。

结果

表2 PBQ-诱导的扭曲测试和耳水肿检测

	扭曲测试 ED_{50} (μg/kg)	相对强度	检测 ID_{50} (μg/耳)	相对强度
辣椒素	300	1	3	1
RTX	0.01	30,000	0.002	1,500
Olvanil	30	10	30	0.1
DA-5018*	3	100	200	0.015
吲哚美辛	400	0.75		
阿司匹林	3,500	0.086		
吗啡	1,000	0.3		
7a-1	2	150	25	0.12
(R)-7a-I	8	38		
(S)-7a-I	9	33		
7a-II	15	20		
7a-III	5	60		
7a-IV	20	15		
7a-V	20	15	20	0.15
7b-I	0.5	600	18	0.17
7b-V	7	43	50	0.06
7b-VI	2	150	50	0.06
7c-I	5	60	22	0.14
7c-V	12	25	17	0.18
7d-I	1	300	5	0.6
7d-V	1.5	200	30	0.1

* DA-5018

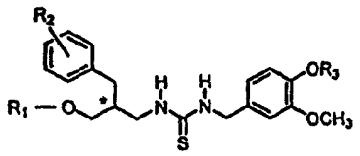


DA-5018

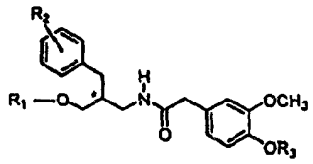
C22H30N2O3

2-[4-(2-氨基乙氧基)-3-甲氧基苯基]-N-[3-(3,4-二甲基苯基)丙基]乙酰胺

表3 钙流入量检测和乙酸诱导的扭曲测试



(I-a)



(I-b)

	R1	R2	R3	^{45}Ca流量 (EC_{50}=μM)	扭曲测试 (ED_{50}=μG/KG)
I-a					
19a	$COC(CH_3)_3$	3,4-$(CH_3)_2$	CH_2CO_2H	7.77±0.80	431
19b	$COC(CH_3)_3$	4-$C(CH_3)_3$	CH_2CO_2H	12.3±1.58	365
23a	$COC(CH_3)_3$	3,4-$(CH_3)_2$	$COCH_2CH_2CO_2H$	7.04±1.3	53.1
23b	$COC(CH_3)_3$	4-$C(CH_3)_3$	$COCH_2CH_2CO_2H$	7.00±1.2	60
36a	$COC(CH_3)_3$	3,4-$(CH_3)_2$	$CH_2CH_2NH_2$	0.083±0.012	14.0
36b	$COC(CH_3)_3$	4-$C(CH_3)_3$	$CH_2CH_2NH_2$	0.377±0.067	48.2
I-b					
28a	$COC(CH_3)_3$	3,4-$(CH_3)_2$	$CH_2CH_2NH_2$	1.57±0.23	0.960
28b	$COC(CH_3)_3$	4-$C(CH_3)_3$	$CH_2CH_2NH_2$	0.878±0.17	8.12
Olvanil					17.4
DA-5018				0.234	2.27
辣椒素				0.435	

实验实施例3：刺激和快速脱敏

开发香草类衍生的治疗的药物化学的焦点已集中于生物利用率的提高和刺激性质的减少。与这些目标有关，使用大鼠眼部擦拭测试作为体

内刺激测试，以评价该化合物的产生疼痛作用。如表4所示，选择的有效兴奋剂7a-V、7b-I 和7d-I的刺激曲线不符合通过2种体外检测的测定的内在兴奋活性的趋势。在该检测中，RTX，一种超强效辣椒素类似物，仅比CAP效果强3倍，从我们这个系列中选择的化合物在引起急性疼痛方面效果更差。这些合成的化合物(7b-I 和 7d-I)刺激性质减小的解释可能在于其刺激感觉神经元的速率。

为了检测快速脱敏和交叉快速脱敏，一组用选择的合成化合物处理的大鼠用0.001% CAP后处理激发6小时。在用等量0.001% CAP激发测试中，CAP、RTX和合成类似物均显示出削弱的眼擦拭反应，该结果指示在这些类化合物间存在交叉快速脱敏。但是，应注意到CAP类似物先前的眼擦拭反应是进行脱敏后研究的先决条件。换句话说，非刺激剂量的CAP类似物对用0.001% CAP测试处理保护眼擦拭运动没有影响。

方法

大鼠眼擦拭测试的刺激和快速脱敏

如前所述在眼擦拭测试中测定了该化合物的疼痛诱导效力，定量表示如下。含有最多5%乙醇的生理盐水浓度增加10倍的溶液滴加到体重150-180 g的大鼠眼部，计数保护运动(用前腿擦眼)的次数。每个浓度应用到6个大鼠，从平均值得到剂量反应曲线。根据剂量反应曲线，计算出每个化合物的中等产生疼痛效果的浓度(MPP)，即诱导10次划痕的等反应。根据这些浓度，与辣椒素的产生疼痛效力(其作为100)相比，测定相对的产生疼痛效力(RPP)。为了测定快速脱敏和交叉快速脱敏，应用该测试化合物6小时后，将 0.001%辣椒素的测试激发应用到同一只眼上。与应用介质处理的大鼠相比，应用测试化合物处理的大鼠0.001%辣椒素的浓度反应减少百分比用作脱敏指数。

结果

表4 眼擦拭测试

	MPP(%)[a]	RPP[b]	% 减少
辣椒素	0.0003	100	55 (0.1) 35 (0.01)
RTX	0.0001	300	85 (0.01) 20 (0.001)
Olvanil	WP[c]	-	0.1
DA-5018	0.003	10	90 (0.1) 35 (0.01)
7a-V	WP	-	0 (0.1)
7b-I	0.002	15	90 (0.1) 30 (0.01) 5 (0.001)
7d-I	0.003	10	0 (0.1)

a：MPP：中等产生疼痛效力

b：RPP：相对产生疼痛效力

c：WP：弱的刺激性(在0.01%浓度下刺激小于0.001%辣椒素)

由此描述的本发明，可以显而易见地得出的多种方式的改变是相同的。这些改变不认为偏离了本发明的精神和范围，所有这些改变对本领域普通技术人员是显而易见的，它们都包括在后面的权利要求的范围内。