

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07D401/06



[12] 发明专利说明书

C07D405/06 C07D409/06

A61K 31/4468 A61K 31/4525

A61K 31/4535 A61K 31/454

A61P 25/04

[21] ZL 专利号 00819064. X

[45] 授权公告日 2005 年 1 月 19 日

[11] 授权公告号 CN 1185227C

[22] 申请日 2000.12.15 [21] 申请号 00819064. X

[30] 优先权

[32] 1999.12.20 [33] SE [31] 9904675 - 7

[86] 国际申请 PCT/SE2000/002560 2000.12.15

[87] 国际公布 WO2001/046263 英 2001.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2002.8.16

[71] 专利权人 阿斯特拉曾尼卡有限公司

地址 瑞典南泰利耶

[72] 发明人 W·布朗 C·瓦尔波勒

审查员 谢 蓉

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

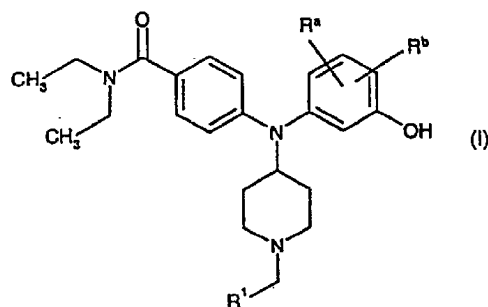
代理人 马崇德

权利要求书 5 页 说明书 51 页

[54] 发明名称 新化合物

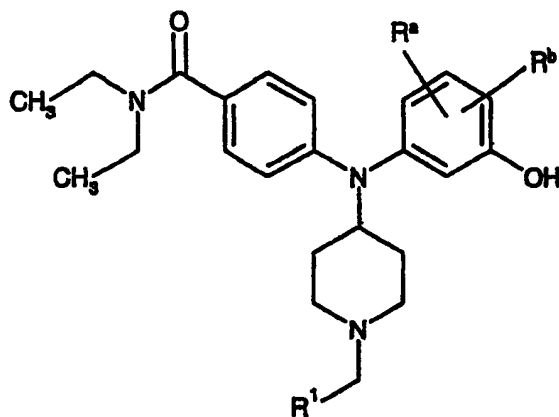
[57] 摘要

本发明公开并要求保护通式(I)的化合物, R¹选自苯基、吡啶基、噻吩基、呋喃基、咪唑基和三唑基中的任何一个; 其中各 R¹ 苯环和 R¹ 杂芳环可任选并独立地被选自以下的 1、2 或 3 个取代基进一步取代: 直链和支链 C₁ - C₆ 烷基、NO₂、CF₃、C₁ - C₆ 烷氧基、氯、氟、溴和碘。 苯环和杂芳环上的取代可发生在所述环系的任何位置; R^a 和 R^b 各自并独立地选自氢、直链和支链 C₁ - C₆ 烷基、NO₂、CF₃、C₁ - C₆ 烷氧基、氯、氟、溴和碘中的任一个; 及其药学上可接受的盐、包含所述新化合物的药用组合物及其在治疗尤其是治疗疼痛方面的应用。



ISSN 1008-4274

1. 式 I 的化合物及其药学上可接受的盐,

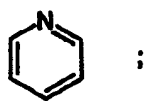


5 其中

R^1 选自下列基团之一:

(i) 苯基;

(ii) 吡啶基



;

10 (iii) 噻吩基



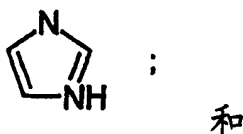
;

(iv) 呋喃基

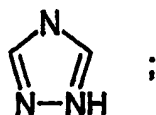


;

(v)咪唑基



5 (vi)三唑基



- 其中所述各 R^1 苯环和 R^1 杂芳环是未取代的或被独立地选自以下的 1、2 或 3 个取代基取代：直链和支链 C_1 - C_6 烷基、 NO_2 、 CF_3 、 C_1 - C_6 烷氧基、氯、氟、溴和碘；所述苯环和杂芳环上的取代发生在所述环系的任何位置；
- 10 R^a 和 R^b 各自独立地选自氢、直链和支链 C_1 - C_6 烷基、 NO_2 、 CF_3 、 C_1 - C_6 烷氧基、氯、氟、溴和碘中的任一个。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 R^a 和 R^b 都为氢。

3. 权利要求 2 的化合物，其中所述各 R^1 苯环和 R^1 杂芳环独立地被选自直链和支链 C_1 - C_6 烷基、 NO_2 、 CF_3 、 C_1 - C_6 烷氧基、氯、氟、溴和碘的 1、2 或 3 个取代基取代。
- 15

4. 权利要求 1 的化合物，它选自下列化合物或其可药用盐：

- N,N-二乙基-4-[[[(3-羟基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]苯甲酰胺]；
- 20 • N,N-二乙基-4-[(2-溴代-5-羟基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺；
- N,N-二乙基-4-[(5-羟基-2-碘代苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺；
- 4-[(2-氯-5-羟基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-N,N-二乙基-苯
- 25 甲酰胺；
- N,N-二乙基-4-[(2-氟代-5-羟基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-

苯甲酰胺;

- N,N-二乙基-4-[[1-(3-呋喃基甲基)-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺;
- N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-(3-噻吩基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺;
- 5 甲酰胺;
- N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-[[4-(三氟甲基)苯基]甲基]-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺;
- N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-[(4-碘代苯基)甲基]-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺;
- 10 • N,N-二乙基-4-[[1-[(4-溴代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺;
- N,N-二乙基-4-[[1-[(4-氟代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺;
- N,N-二乙基-4-[[1-[(4-氟代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-
- 15 苯甲酰胺;
- 4-[[1-(2,4-二氟代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-N,N-二乙基-苯甲酰胺;
- N,N-二乙基-4-[[1-(3-氟代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]苯甲酰胺;
- 20 • N,N-二乙基-4-[[1-[(2-氟代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺; 和
- N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-[(4-甲基苯基)甲基]-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺。

5. 权利要求 1-4 中任一项的化合物, 它为其盐酸盐、硫酸盐、酒石酸盐或柠檬酸盐形式。

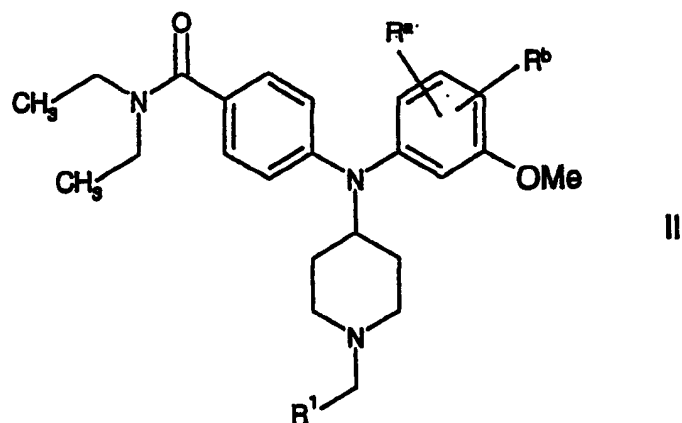
6. 权利要求 1 的化合物在制备治疗疼痛的药物中的用途。

7. 权利要求 1 的化合物在制备治疗胃肠道疾病的药物中的用途。

8. 权利要求 1 的化合物在制备治疗脊柱损伤的药物中的用途。

9. 一种药物组合物，它包括作为活性成分的权利要求 1 的化合物及药理学和药学上可接受的载体。

10. 式 II 的化合物：

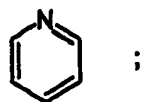


5 其中

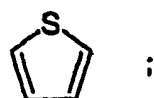
R¹ 选自下列基团之一：

(i) 苯基；

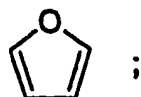
(ii) 吡啶基



10 (iii) 噻吩基

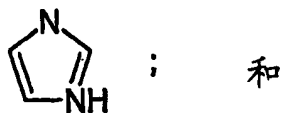


(iv) 呋喃基

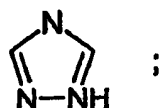


(v) 咪唑基

15



(vi)三唑基



其中所述各 R^1 苯环和 R^1 杂芳环是未取代的或被独立地选自以下的 1、
2 或 3 个取代基取代：直链和支链 C_1 - C_6 烷基、 NO_2 、 CF_3 、 C_1 - C_6 烷氧
5 基、氯、氟、溴和碘；所述苯环和杂芳环上的取代发生在所述环系的
任何位置； R^a 和 R^b 各自并独立地选自氢、直链和支链 C_1 - C_6 烷基、 NO_2 、
 CF_3 、 C_1 - C_6 烷氧基、氯、氟、溴和碘中的任一个。

新化合物

5 发明领域

本发明涉及新化合物及其制备方法、应用以及包含所述新化合物的药用组合物。所述新化合物用于治疗、尤其是用于治疗疼痛。

背景和现有技术

10 已确认 δ 受体在许多机体机能如循环系统和疼痛系统方面具有作用。因而 δ 受体配体具有用作止痛药物和/或抗高血压药物的潜在用途。还证实 δ 受体配体具有免疫调节活性。

目前充分鉴定了至少三种不同阿片样物质受体(μ 、 δ 和 κ)，三种阿片样物质受体都主要存在于包括人类在内的许多物种的中枢神
15 经系统和外周神经系统。当在各种动物模型中激活一种或多种这些受体时，可观察到痛觉缺失。

目前可应用的选择性阿片样物质 δ 配体几乎无一例外地为天然肽，不适于经全身途径给药。一个非肽类 δ -激动剂实例为 SNC80 (Bilsky E.J. 等, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*,
20 273(1), 第 359-366 页(1995))。但是仍然需要选择性提高而副作用减少的选择性 δ -激动剂。

因此，本发明要解决的问题是寻找与目前的 μ 激动剂相比，不仅止痛效果增强而且副作用减少以及提高全身性作用的新止痛药物。

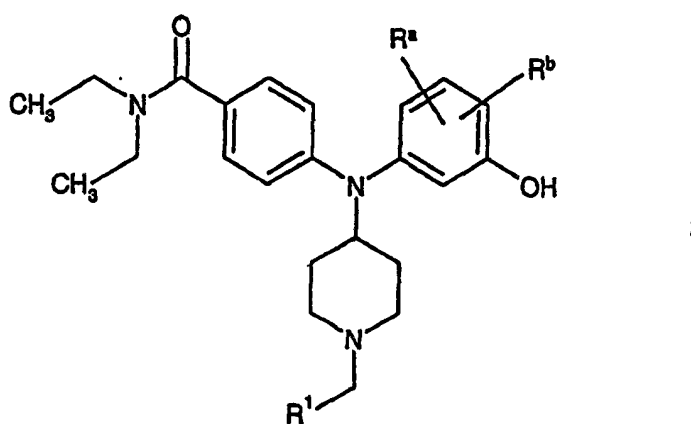
25 已经鉴定和现有技术领域已有的止痛药物存在许多缺点，它们的药代动力学差，当全身途径给药时没有止痛作用。同时，有资料证明，现有技术中所述的优选 δ 激动剂化合物表现出明显的惊厥作用。

现已发现, 未专门公开但包括在 WO 98/28270 范围内的某些化合物, 当全身给药时, 表现出惊人的 δ -激动剂性质而且体内效力增强。与 WO 98/28270 公开的化合物相比, 本发明化合物表现出明显未曾预料到的 δ 受体兴奋作用增强和代谢稳定性水平提高。

5

本发明概述

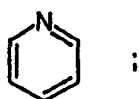
本发明的新化合物用以下结构式 I 定义:



10 其中 R^1 选自

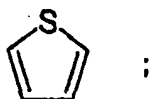
(i) 苯基;

(ii) 吡啶基



(iii) 噻吩基

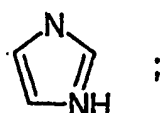
15



(iv)呋喃基

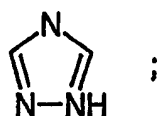


(v)咪唑基



5

(vi)三唑基



10 中的任一个, 其中各个 R^1 苯环和 R^1 杂芳环可任选并独立地被选自以下的 1、2 或 3 个取代基进一步取代: 直链和支链 C_1 - C_6 烷基、 NO_2 、 CF_3 、 C_1 - C_6 烷氧基、氯、氟、溴和碘。苯环和杂芳环上的取代可发生在所述环系的任何位置。

15 R^a 和 R^b 各自并独立地选自氢、直链和支链 C_1 - C_6 烷基、 NO_2 、 CF_3 、 C_1 - C_6 烷氧基、氯、氟、溴和碘中的任一个。 R^a 和 R^b 取代基可位于酚环的邻位、间位和对位。优选 R^a 和 R^b 都为氢。

式 I 化合物的药学上可接受的盐也属于本发明的范围。

当苯环和杂芳环被取代时, 优选的取代基选自 CF_3 、甲基、碘、溴、氟和氯中的任一个。

20 本发明的新化合物用于治疗、尤其是用于治疗各种痛症, 例如慢性疼痛、神经病性疼痛、急性疼痛、癌痛、类风湿性关节炎性疼痛、偏头痛、内脏痛等。但所列未能尽述。

本发明化合物可用作免疫调节剂, 尤其可用于自身免疫疾病(如

关节炎); 皮肤移植、器官移植及类似的外科需要; 胶原性疾病; 各种变态反应; 用作抗肿瘤药和抗病毒药。

5 本发明化合物可用于所述范例中存在或涉及阿片样物质受体退变或功能障碍的疾病。包括在诊断技术和成象如正电子成象术(PET)中应用同位素标记形式的本发明化合物。

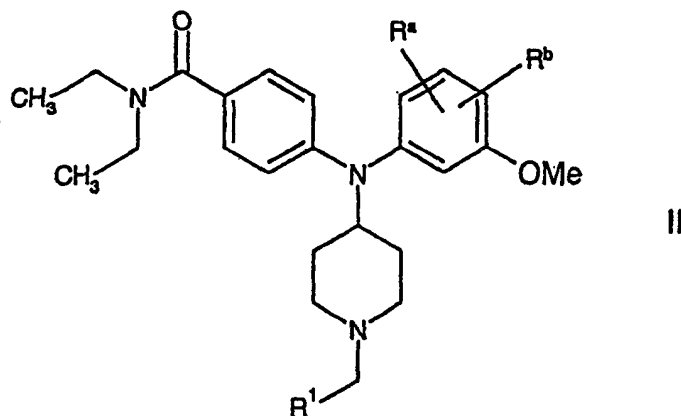
本发明化合物可用于治疗腹泻、抑郁症、焦虑症、尿失禁、各种精神疾病、咳嗽、肺水肿、各种胃肠道疾病、脊柱损伤和药物成瘾(包括治疗酒精、尼古丁、阿片样物质和其它药物成瘾)以及交感神经系统疾病如高血压。

10 本发明化合物可用作在全身麻醉和监控麻醉护理时使用的止痛药物。常常联合使用不同性质的药物, 以达到维持麻醉状态(例如记忆缺失、痛觉缺失、肌肉松弛和镇静)所需的平衡作用。联合用药包括吸入麻醉剂、安眠药、抗焦虑药、神经肌肉阻滞剂和阿片样物质。

15 应用任何上式 I 化合物生产治疗上述任何疾病的药物也属于本发明的范围。

本发明再一方面是治疗患有任何上述疾病的患者的治疗方法, 其中对需要这种治疗的患者给予有效量的上式 I 的化合物。

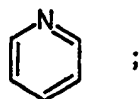
用于上式 I 化合物合成的下式 II



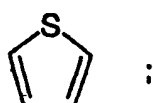
20 其中
R¹选自

(i) 苯基;

(ii) 吡啶基



5 (iii) 噻吩基

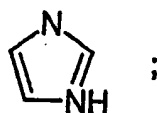


(iv) 呋喃基



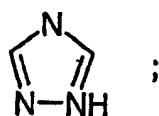
10

(v) 咪唑基



(vi) 三唑基

15



20

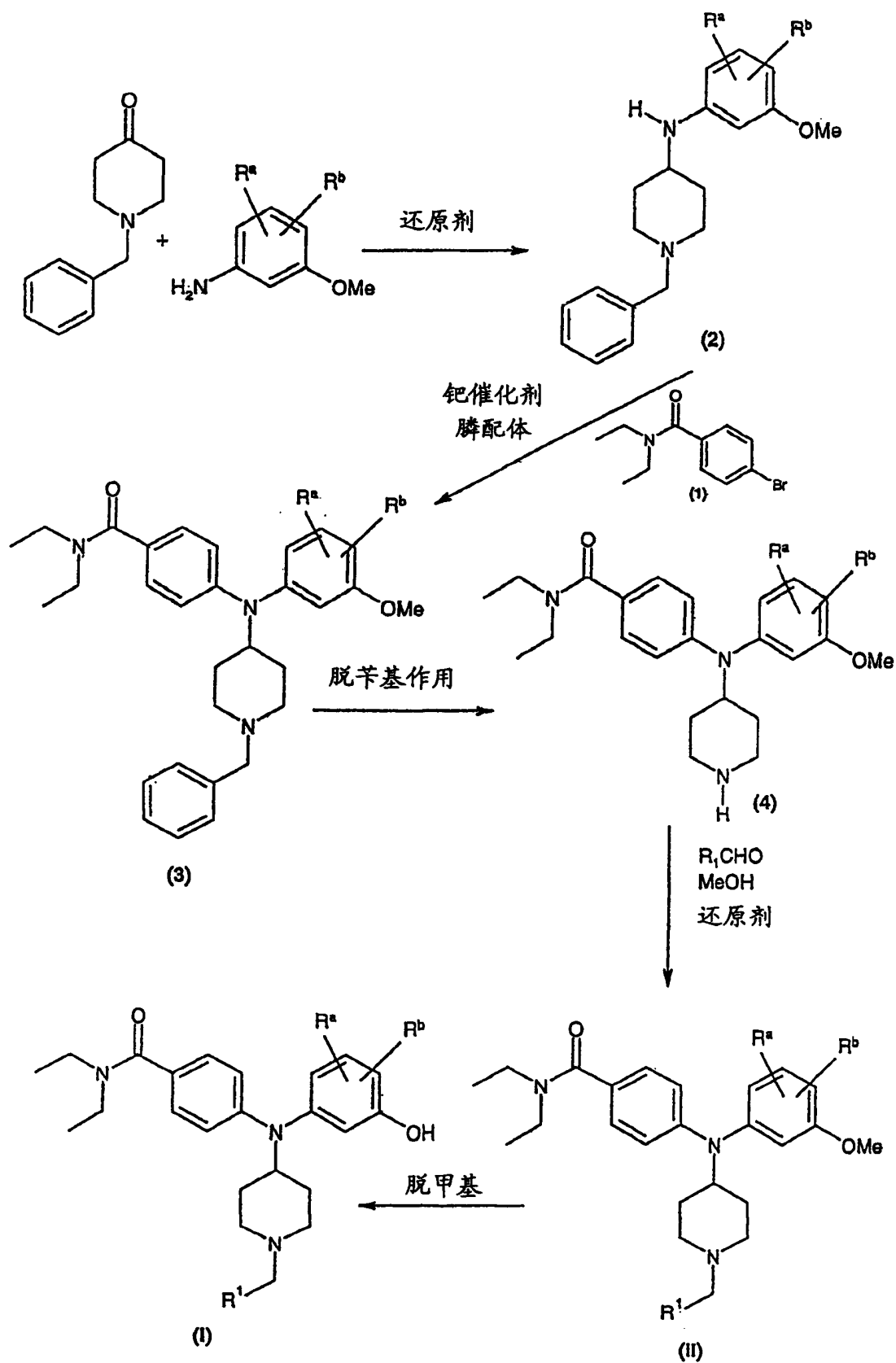
中的任一个, 其中各 R^1 苯环和 R^1 杂芳环可任选并独自地被选自直链和支链的 C_1 - C_6 烷基、 NO_2 、 CF_3 、 C_1 - C_6 烷氧基、氯、氟、溴和碘的 1、2 或 3 个取代基所进一步取代。苯环上和杂芳环上的取代可发生在所述环系统的任何位置; R^a 和 R^b 各自并独立地选自氢、直链和支

链的 C_1-C_6 烷基、 NO_2 、 CF_3 、 C_1-C_6 烷氧基、氯、氟、溴和碘中的任一个的中间化合物也属于本发明的范围。

制备方法

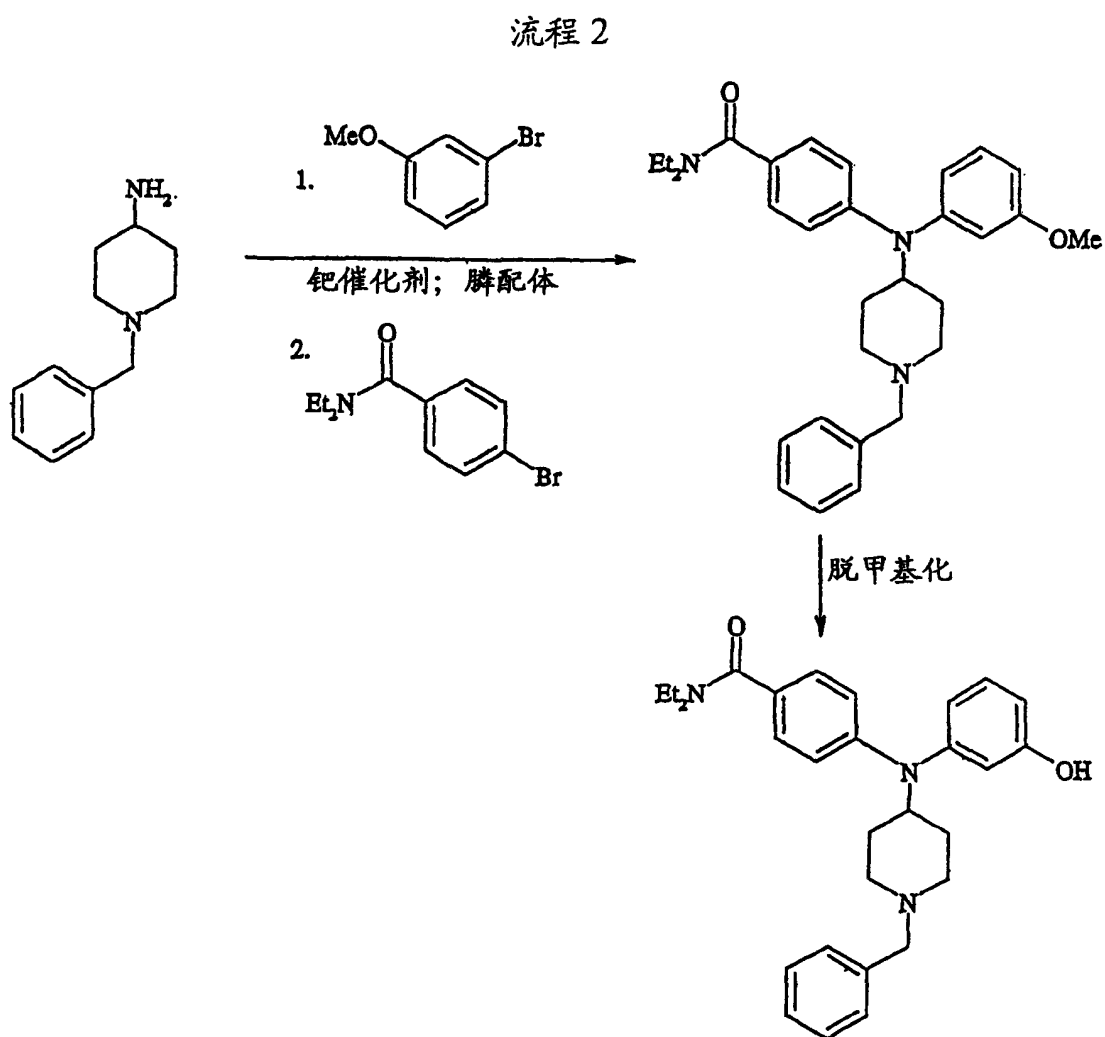
- 5 I. 可按照下列流程 I 中所述的方法制备本发明的化合物。这些已知的方法描述于 *C.G.Frost and P.Mendonca; Perkin 1 (1998), 2615*; 及 *J.F.W.McOmie, M.L.Watts, D.E.West, Tetrahedron, 1969, 24, 2289*; 其通过引用结合到本文中。

流程 1



上列流程 I 中, R^1 、 R^a 和 R^b 如上式 I 化合物般定义。

- II. 或者, 可如下列流程 2 进行合成, 经市售的 4-氨基-1-苄基哌啶的单罐双芳基化(描述于 *C.G.Frost and P. Mendonca; Perkin 1(1998), 2615*)
 5 得到流程 1 的中间产物 3。因 R^1 = 苄基, 可如下列流程 2 般通过选择性的醚裂解制备最终产物。



10 实施例

通过下列实施例将更详细地描述本发明, 这不是对本发明的限制。

I.**(i) 4-溴-N,N-二乙基苯甲酰胺(化合物 1)的制备**

将二乙胺(13.5 ml, 130 mmol)逐滴加入到冰冷却的 4-溴苄基氯(19.5 g, 86.8 mmol)的 CH_2Cl_2 (150 ml)溶液中。将该反应物搅拌过夜再浓缩。将该混合物放入醚和 1 HCl 中, 分离含水相。用醚再萃取两次有机层, 再用盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥。将生成的油放入乙酸乙酯中使其结晶。对母液再进行两次结晶得到 18.6 g, 83.6%。

(ii) N-(3-甲氧基苯基)-1-(苯基甲基)-4-哌啶胺(化合物 2)的制备

将 $\text{Ti}(\text{i-OPr})_4$ (33.3, 112.06 mmol)加入 1-苄基哌啶酮(10 ml, 0.56 mmol)和 3-甲氧基苯胺(7.5 ml, 67.2 mmol)中。将反应物搅拌至气相色谱确认的彻底状态。再加入 EtOH(200 ml), 之后加入 NaBH_4 (3.18 g, 84 mmol)。室温下搅拌反应物。用气相色谱监测反应过程。反应一结束, 就将 NH_4OH 加入白色混合物中, 并再持续搅拌 30 分钟。再用 CH_2Cl_2 稀释, 之后加入硅藻土。过滤所生成的糊状物, 用 CH_2Cl_2 萃取滤液几次。浓缩合并的有机相, 经快速层析(己烷:丙酮为 1:1)纯化产物。产量为 13.6 g, 82%。也可在 2×10^{-3} mbar 的高真空、约 225 °C 下用 Kugelrohr 蒸馏纯化。25.6 g 的苄基哌啶酮生成 28.4 g, 71.6%。

(iii) N,N-二乙基-4-[(3-甲氧基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-3 苯甲酰胺(化合物 3)的制备

充氮条件下, 向干燥箱中的 250 ml 圆底烧瓶中加入 10 g (0.34 mmol, 1 当量)化合物 2、13 g(50.7 mmol, 1.5 当量)化合物 1、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (783 mg, 0.85 mmol)、BINAP(784 mg, 1.26 mmol)和 $\text{Na}^+\text{t-BuO}^-$ (6.53 g, 68 mmol, 2 当量)。向其中用套管输入甲苯至烧瓶体积的四分之三。再于 110 °C 下加热该混合物约 6 小时, 至化合物 2 由 HPLC 确认消失。冷却反应物。加入乙醚然后将悬浮液经硅藻土过滤并浓缩。将该油置于乙醚中 15 分钟后再经硅藻土过滤。将该滤液用 2N HCl 萃取五

次。再用 4N NaOH 使该水相呈碱性，并用乙醚萃取。合并的醚层经 Na_2SO_4 干燥，过滤并浓缩。将所生成的油置于乙酸乙酯/己烷中经过周末。经过滤回收 8g 固体(50%)，用乙酸乙酯/己烷(8/2)洗涤。分离浓缩母液中的残留产物。

5

(iv) N,N-二乙基-4-[(3-甲氧基苯基)-4-吡啶基氨基]-苯甲酰胺(化合物 4) 的制备

0°C下，将氯甲酸 α -氯乙基酯(0.93 ml, 8.6 mmol)加入到化合物 3(2.5 g, 5.3 mmol)的 1,2-二氯乙烷溶液中。再将反应物回流 3 小时并于室温下搅拌过夜，除去溶剂，再将生成的油置于甲醇中并回流 3 小时。再浓缩置于 CH_2Cl_2 中，用 1N HCl 萃取五次。用 5 N NaOH 使合并的含水层呈碱性，并用 CH_2Cl_2 萃取几次。浓缩有机层，通过硅胶快速层析(用极性增加的 CH_2Cl_2 /2% MeOH 至 20%)纯化所生成的油。得到：1.68 g, 83%。

15

II. 式 II 化合物的一般合成

向化合物 4(1.05 mmol, 1 当量)的甲醇(10 ml)溶液中加入杂环或芳族醛(1.58 mmol, 1.5 当量)，再加入 NaBH_3CN (1.05 mmol, 3 当量)。再用冰醋酸将该反应物的 pH 调节到约 6。将该反应物搅拌过夜。加入 2N HCl 并继续搅拌 1 小时。浓缩以除去甲醇，用 NaOH 使呈碱性，并用 CH_2Cl_2 萃取，再经 Na_2SO_4 干燥。以采用渐变梯度的 CH_2Cl_2 /MeOH 的硅胶快速层析纯化，从 0.025%到 4%MeOH 极性增加，得到纯产物。

20

III. 式 I 的酚化合物的一般合成

-78°C下，将 3 当量 BBr_3 (CH_2Cl_2 中的 1M 溶液)加入到化合物 5(1 当量)的 CH_2Cl_2 溶液中。搅拌约 45 分钟，再于室温下搅拌约 2 小时。加入 MeOH 再加入饱和 NaHCO_3 。分离各相，用 CH_2Cl_2 萃取含水层几次。合并的有机层经 MgSO_4 干燥并浓缩。以采用 CH_2Cl_2 /MeOH(100/0.25, 其中 MeOH 的量缓慢增加)的硅胶快速层析纯化，

25

在大多数情况下通过从乙酸乙酯中结晶可进一步提纯。也可用反相 HPLC(梯度为在水中的 0.1% T-FA/在 CH₃CN 中的 0.1%TFA)纯化。

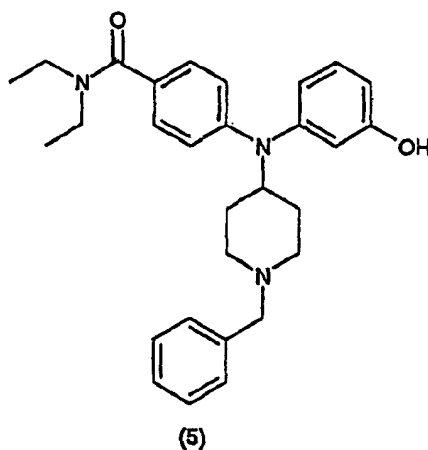
HCl 盐的形成: 将 40 ml 无水乙醚加入到搅拌中的 1.1 g 游离胺的无水 CH₂Cl₂ (10 ml)溶液中, 再加入 20 ml 在乙醚中的 1N HCl。再加入 40 ml 无水乙醚, 搅拌白色悬浮液 30 分钟。在 N₂ 流下通过过滤收集该固体并用乙醚洗涤。所得产物具吸湿性。在该固体干燥前, 室内真空下立即将瓷漏斗放在干燥器中过夜。收集到 1.14g 白色固体。或者, 所述酚可溶于乙酸乙酯中, 再加入过量的醚中的 1N HCl 再加入醚。真空除去过量的醚和 HCl。

用反相制备 HPLC 回收三氟乙酸盐。

实施例 1

N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]苯甲酰胺 (化合物 5)的制备

按上述流程 I 的合成方法制备标题化合物 5。



MS: (M+1)计算值: 458.62(MH⁺); (M+1)实测值: 458.24(MH⁺).

IR: 薄膜, HCl 盐: 3047, 2974, 2531, 1600, 1471, 1455, 1283, 1186, 1093, 735, 701cm⁻¹.

^1H NMR: (400 MHz, CDCl_3 , TMS, 游离胺): 7.39-7.10(9H, m, Ar), 6.58-6.45(3H, m, Ar), 6.23-6.22(1H, m, Ar), 3.83-3.77(1H, m, CH), 3.52(3H, s, CH_3O), 3.43(4H, s 宽峰, CH_2N), 2.98(2H, d, CH_2), 2.17-2.11(2H, t, CH_2), 1.85(2H, d, CH_2), 1.59-1.51(2H, m, CH_2), 1.20-1.16(6H, m, CH_3).

5 HPLC: >95% (215 nm)

>98% (254 nm)

>99% (280 nm)

分析:

$\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_2$, X 2.4 HCl, X 0.2 $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$, X 0.1 CH_2Cl_2

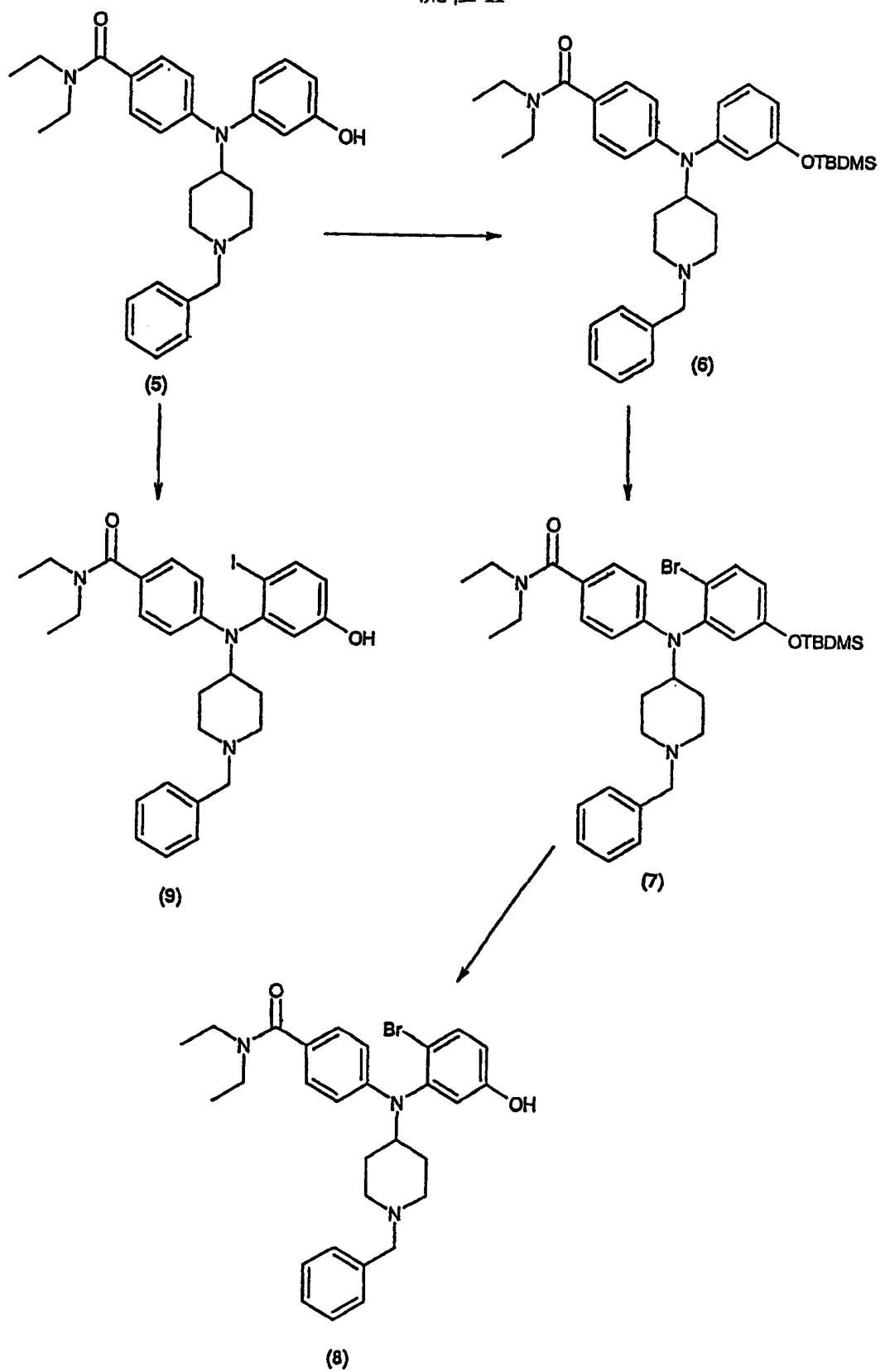
10 实测值: C 63.20%, H 7.07%, N 7.36%,

计算值: C 63.18%, H 7.02%, N 7.39%, O 6.19%, Cl 16.22%.

IV. 对-卤代酚衍生物的合成

按下列合成流程 II 制备式(8)和(9)的对-卤代酚衍生物。

流程 II



(i) N,N-二乙基-4-[[3-[[[(1,1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]苯基][1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 6)的制备

5 将 15 ml DMF 中的化合物 5(200 mg, 0.4 mmol)、TBDMSCl (302 mg, 2.0 mmol)和咪唑(138 mg, 2.0 mmol)在 100℃下加热 3 小时。除去溶剂, 所生成的油经硅胶快速层析(用 100% CH₂Cl₂再用 1%和 2%的 MeOH)纯化。得到 200 mg, 87%。

(ii) N,N-二乙基-4-[[2-溴-5-[[[(1,1-二甲基乙基)二甲基甲硅烷基]氧基]苯基][1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 7)的制备

10 0℃下, 将 NBS(27.7 mg, 0.155 mmol)的 DMF(2 ml)溶液加入到化合物 6(82.9 mg, 0.145 mmol)的 DMF(6 ml)溶液中。搅拌反应物 2 小时, 浓缩再用 10%丙酮/己烷、20%丙酮快速层析(flashd)。得到 61.25 mg, 65%。

15 实施例 2

N,N-二乙基-4-[(2-溴-5-羟基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 8)的制备

用 4N HCl 的二噁烷溶液处理在二噁烷中的化合物 6。彻底搅拌该反应物。用反相制备 HPCL(CH₃CN/H₂O)纯化。

20 分析:

C₂₉H₃₄N₃O₂Br x 1.4 CF₃CO₂H X 0.3 H₂O

计算值: C, 54.44; H, 5.17; N, 5.99;

实测值: C, 54.43; H, 5.06; N, 6.05。

M.S(计算值): 537.15(MH⁺),

25 M.S(实测值): 536.16(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50% B, 流速: 1 ml/分钟, 40℃, A-0.1% TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 7.94。纯度: >97% (215 nm), >97% (254 nm)

实施例 3

N,N-二乙基-4-[(5-羟基-2-碘代苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 9)的制备

5 0℃下, 向苄基类似物化合物 5 的 TFA 盐(25 mg, 0.044 mmol)和 triflate 银(11.3 mg, 0.044 mmol)在 5 ml CH₂Cl₂ 中的悬浮液中逐滴加入 23 mg I₂ 的 CH₂Cl₂ (2 ml)溶液。完成后, 浓缩反应物, 用制备 HPLC 纯化。得到 7.9 mg。

分析:

C₂₉H₃₄N₃O₂I x 1.6 C₂H₂O₂F₃ x 0.5 H₂O

10 计算值: C, 49.91; H, 4.76; N, 5.42;

实测值: C, 49.84; H, 4.75; N, 5.60。

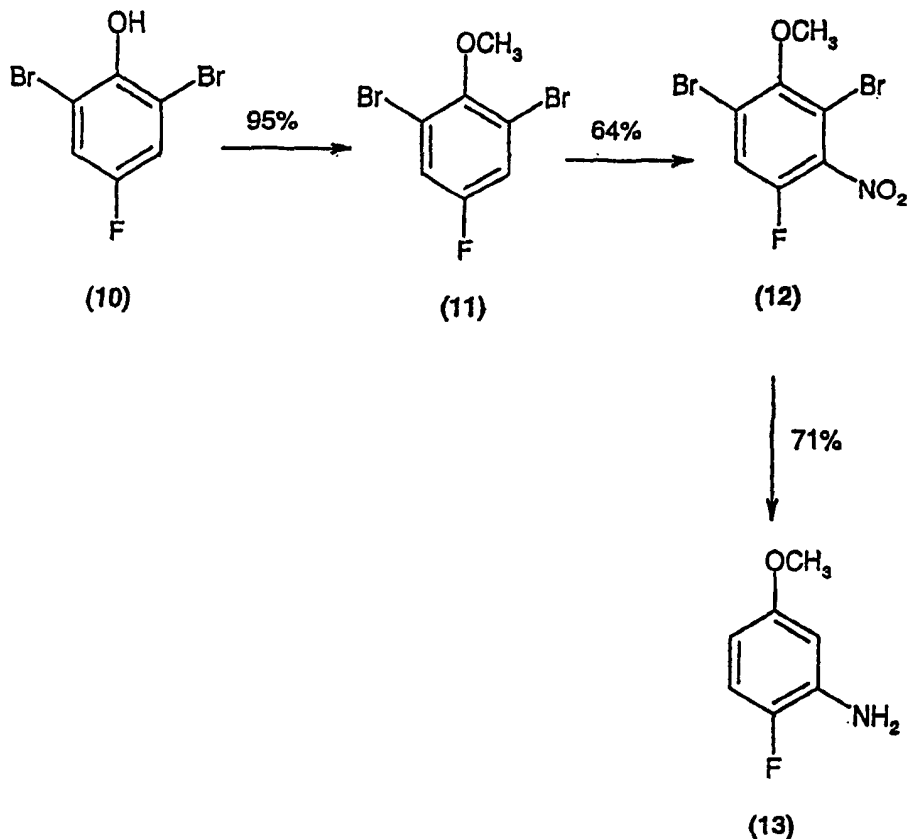
M.S(计算值): 584.51(MH⁺),

M.S(实测值): 584.16(MH⁺)

15 HPLC 条件: 柱: Zorbax SB-C18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 8.56。纯度: > 96% (215 nm), > 96% (254 nm)。

V. 2-氟-5-甲氧基苯胺的合成

流程 III



5 (i) 1,3-二溴-5-氟-2-甲氧基苯(化合物 11)的制备

向化合物 10 2,6-二溴-4-氟代酚(1 g, 3.7 mmol)的丙酮(50 ml)溶液中加入 K_2CO_3 (0.56 g, 4.1 mmol), 再加入 CH_3I (0.58 g, 255 μ l, 4.1 mmol)。将该反应物回流 2 小时, 冷却, 过滤并用 $CHCl_3$ 反复漂洗。将滤液浓缩得到 1g 膏状有色固体。95.2%。

10

(ii) 1,3-二溴-5-氟-2-甲氧基-4-硝基-苯(化合物 12)的制备

向冷却于冰中的化合物 11(920 mg, 3.24 mmol)的 H_2SO_4 (3 ml)混浊液中逐滴加入 H_2SO_4/HNO_3 (3 ml/163 μ l, 3.9 mmol)溶液。搅拌反应物 2 小时再于室温下搅拌 30 分钟。再加入冰, 用 CH_2Cl_2 萃取几次。用 Na_2CO_3 (饱和)洗涤合并的有机层, 经 Na_2SO_4 干燥, 过滤和浓缩。

15

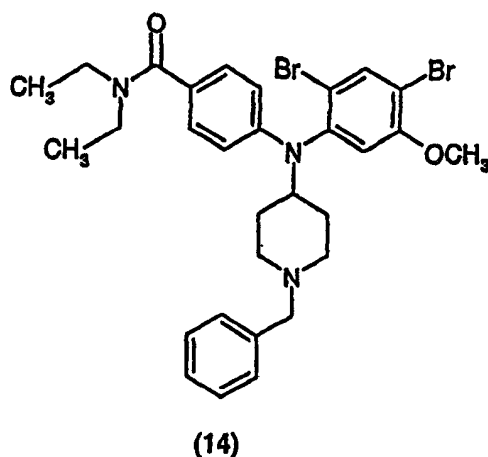
经硅胶(用 100%己烷再用 10%乙酸乙酯/己烷)纯化得到 685 mg, 64%。

(iii) 2-氟-5-甲氧基苯胺(化合物 13)的制备

在 Parr 装置中 40psi 下振荡 66 mg Pd/C 10%、化合物 12(670 mg, 0.2 mmol)在 40 ml 乙醇中的悬浮液 36 小时。过滤反应物, 用硅胶快速层析(用极性增加的 10、20 然后 30 乙酸乙酯/己烷)纯化浓缩过的滤液。得到 200 mg, 70.8%。

实施例 4

4-[(2,4-二溴-5-甲氧基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-N,N-二乙基-苯甲酰胺(化合物 14)的制备



0℃下, 将 510 mg 化合物 3 溶于冰醋酸/CH₂Cl₂。在搅拌的同时用 15 分钟将 90 μl 溴逐滴加入。浓缩反应物并置于 CH₂Cl₂ 和 H₂O 中。用 2N NaOH 使混合物呈碱性, 并用 CH₂Cl₂ 萃取三次, 再用盐水洗涤。用制备 HPLC 纯化化合物。经 1N NaOH 和 CH₂Cl₂ 萃取将 TFA 盐转化为游离胺(347 mg)。由醚中的 1N HCl 制备 HCl。

分析:

C₃₀H₃₅N₃O₂Br₂ x 1.5 HCl X 0.7 H₂O

计算值: C, 51.72; H, 5.48; N, 6.03;

实测值: C, 51.67; H, 5.50; N, 5.88.

M.S(计算值): 630.44(MH+),

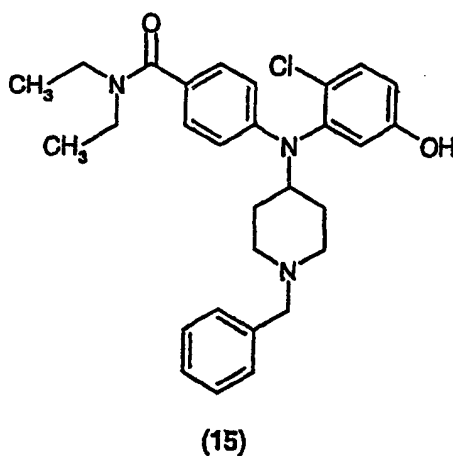
M.S(实测值): 630.15(MH+)

5 HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 30-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 3.25. 纯度: > 95%(215 nm), > 99%(254 nm)

实施例 5

10 4-[(2-氯-5-羟基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-N,N-二乙基苯甲酰胺(化合物 15)的制备

采用步骤 1 中的 2-氯-3-甲氧基苯胺, 按照上述流程 I 的合成方法制备标题化合物 15.



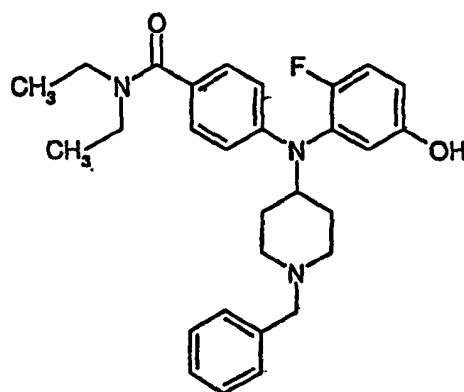
15 M.S(计算值): 492.24(MH+),

M.S(实测值): 491.92(MH+)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 30-80%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 2.60. 纯度: > 90%(215 nm), > 92%(254 nm)

实施例 6**N,N-二乙基-4-[(2-氟-5-羟基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 16)的制备**

采用步骤 1 中的 2-氟-3-甲氧基苯胺，按照上述流程 I 制备标题化合物 16。

**(16)**

¹H NMR: CDCl₃ δ 1.15-1.19(m, 6H), 1.49-1.57(m, 2H), 1.87-1.90(m, 2H), 2.12-2.19(m, 2H), 2.97-3.01(m, 2H), 3.42(br s, 4H), 3.53(s, 2H), 3.80-3.55(m, 2H), 6.27-6.29(m, 1H), 6.45(d, J=8.7Hz, 2H), 6.51-6.55(m, 1H), 6.89(t, 1H), 7.20(d, J=8.7Hz, 2H), 7.24-7.27(m, 5H).

IR: 3160.1, 2936.0, 1602.6, 1502.1, 1472.0, 1456.3, 1283.3

M.S(计算值): 476.61(MH⁺),

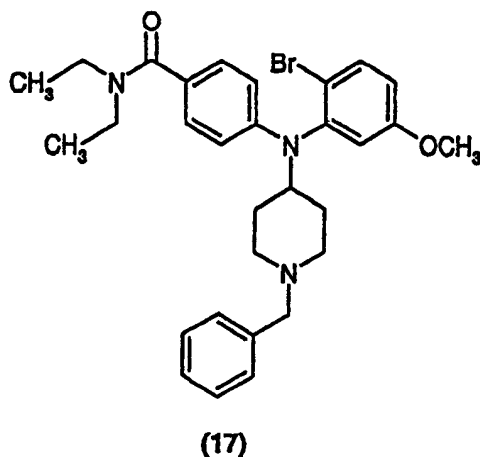
M.S(实测值): 476.16(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB-C18, 梯度: 25 分钟内 30-80%B, 流速: 1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 6.61. 纯度: >99% (215 nm), >99% (254 nm)

实施例 7**4-[(4-溴-3-甲氧基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-N,N-二乙基-苯甲酰胺(化合物 17)的制备**

采用步骤 1 中的 2-溴-3-甲氧基苯胺，按照上述流程 I 制备标题

化合物 17.



¹H NMR: CDCl₃ d 1.16(br t, 6H), 1.43-1.53(m, 2H), 1.86-1.89(m, 2H),
2.06-2.11(m, 2H), 2.91-2.94(m, 2H), 3.38(br s, 4H), 3.37(s, 2H), 3.46(s,
5 2H), 3.75(s, 3H), 3.77-3.83(m, 1H), 6.44-6.46(m, 2H), 6.63(d, J=8.8Hz,
2H), 7.19-7.27(m, 7H), 7.44(d, 1H)

分析:

C₃₀H₃₆N₃O₂Br x 1.9 HCl X 0.2 H₂O

计算值: C, 57.80; H, 6.19; N, 6.74;

10 实测值: C, 57.83; H, 6.17; N, 7.16。

M.S(计算值): 551.54(MH⁺),

M.S(实测值): 550.39, 552.38(MH⁺, 溴化化合物)

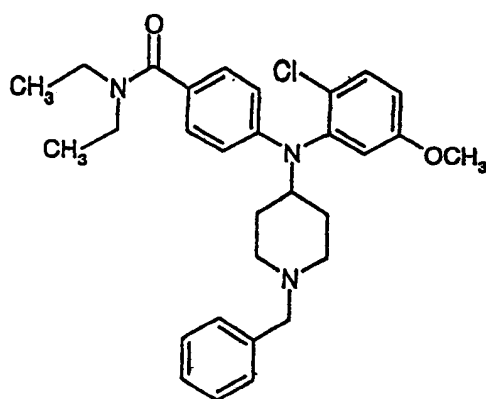
HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/
分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 5.05。

15 纯度: >99% (215 nm), >99% (254 nm)

实施例 8

(1R)-N-[4-[(1-亚氨基乙基)氨基]-(1R)-[[1,2,3,4-四氢-1-萘基氨基]羰基]
丁基]-1-(苯基)-环己基酰胺(化合物 18)的制备

20 采用步骤 1 中的 2-氯-3-甲氧基苯胺, 按照上述流程 I 制备标题
化合物 18。



(18)

M.S(计算值): 507

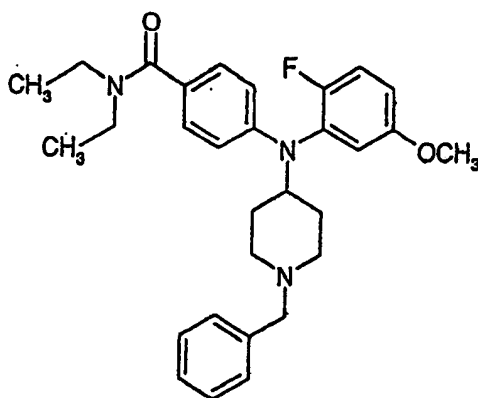
M.S(实测值): 505.91, 507.85 (MH⁺, 氯化化合物)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 30-80%B, 流速: 1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 4.06。
 纯度: > 88%(215 nm), > 90%(254 nm)

实施例 9

N,N-二乙基-4-[(2-氟-5-甲氧基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 19)的制备

采用步骤 1 中的 2-氟-3-甲氧基苯胺, 按照上述流程 I 制备标题化合物 19。



(19)

¹H NMR: CDCl₃ d 1.15-1.18(m, 6H), 1.50-1.59(m, 2H), 1.96-1.99(m, 2H), 2.09-2.15(m, 2H), 2.95-2.98(m, 2H), 3.42(br s, 4H), 3.50(s, 2H), 3.77(s, 3H), 3.84-3.90(m, 2H), 6.27-6.29(m, 1H), 6.51(d, J=8.9Hz, 2H), 6.6(dd, J=3.3Hz, 6.3Hz, 1H), 7.08(dt, J=3.4Hz, 8.9Hz, 1H), 7.08(t, J=9.0Hz, 2H), 7.22(d, J=8.9Hz, 2H), 7.24-7.32(m, 5H).

M.S(计算值): 490.63(MH⁺),

M.S(实测值): 490.08(MH⁺)

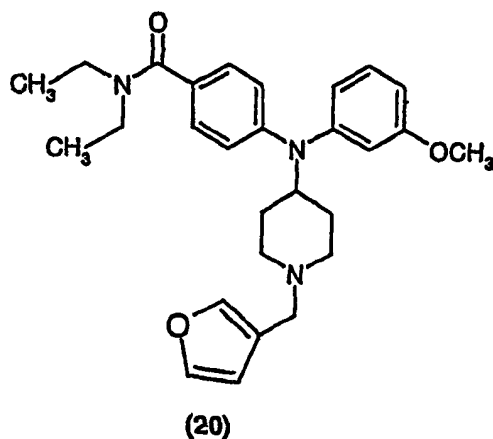
HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 30-80%B, 流速: 1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 4.61.

纯度: >99% (215 nm), >99% (254 nm)

实施例 10

N,N-二乙基-4-[[1-(3-呋喃基甲基)-4-哌啶基](3-甲氧基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 20)的制备

采用呋喃-3-甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 20。



¹H NMR: CDCl₃ d 1.18(t, 6H), 1.48-1.58(m, 2H), 1.92-1.96(m, 2H), 2.06-2.12(m, 2H), 2.96-2.99(m, 2H), 3.37(s, 2H), 3.42(br s, 4H), 3.50(s, 2H), 3.77(s, 3H), 3.79-3.86(m, 1H), 6.34(s, 1H), 6.51-6.52(m, 1H), 6.55-6.57(m, 1H), 6.64-6.66(m, 2H), 6.73(dd, J=2.4, 8.1Hz, 1H), 7.23-7.26(m, 3H), 7.31(s, 1H), 7.36-7.37(m, 1H).

IR: 2935.4, 1611.0, 1595.4, 1469.4, 1425.6, 1280.7

M.S(计算值): 462.60(MH⁺),

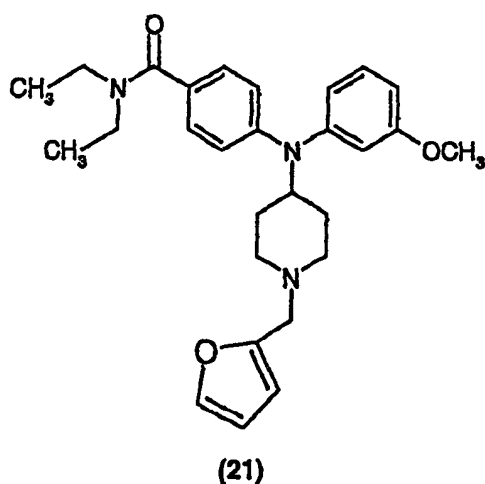
M.S(实测值): 462.21(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/
5 分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 7.5.
纯度: >99% (215 nm), >99% (254 nm)

实施例 11

N,N-二乙基-4-[[1-(2-呋喃基甲基)-4-哌啶基](3-甲氧基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 21)的制备

采用呋喃-2-甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 21。



¹H NMR: CDCl₃ d 1.19(t, 6H), 1.54-1.64(m, 2H), 1.92-1.96(m, 2H),
2.13-2.19(m, 2H), 2.96-2.99(m, 2H), 3.42(br s, 4H), 3.53(s, 2H), 3.76(s,
15 3H), 3.80-3.86(m, 1H), 6.18(d, J=Hz, 1H), 6.31(dd, J=2.1Hz, 3.3Hz, 1H),
6.49-6.51(m, 1H), 6.53-6.56(m, 1H), 6.71(d, 8.4Hz, 2H), 6.73(dd, J=2.5,
8.2Hz, 1H), 7.23-7.26(m, 3H), 7.36-7.37(m, 1H)

IR: 2935.5, 1611.3, 1595.2, 1469.0, 1424.6, 1280.6

M.S(计算值): 462.60(MH⁺),

20 M.S(实测值): 462.21(MH⁺)

分析:

$C_{28}H_{36}N_3O_3 \times 1.7 HCl \times 0.3 H_2O$

计算值: C, 63.58; H, 7.11; N, 7.94;

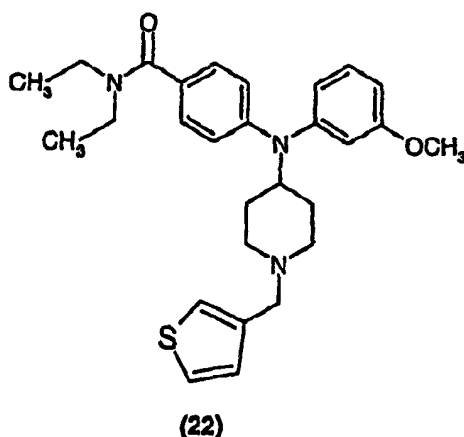
实测值: C, 63.70; H, 7.04; N, 7.84.

- 5 HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25°C, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH_3CN 中), k' : 7.19.
纯度: >95% (215 nm), >99% (254 nm)

实施例 12

- 10 N,N-二乙基-4-[(3-甲氧基苯基)[1-(3-噻吩基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 22)的制备

采用噻吩-3-甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 22。



- 15 1H NMR: $CDCl_3$ δ 1.18(t, 6H), 1.52-1.58(m, 2H), 1.92-1.95(m, 2H), 2.08-2.13(m, 2H), 2.95-2.98(m, 2H), 3.42(br s, 4H), 3.53(s, 2H), 3.77(s, 3H), 3.79-3.86(m, 1H), 6.51-6.52(m, 1H), 6.55-6.57(m, 1H), 6.65(d, $J=8.5Hz$, 2H), 6.72-6.74(m, 1H), 7.00-7.01(m, 1H), 7.08-7.09(m, 1H), 7.24-7.26(m, 4H).
- 20 IR: 2936.1, 1611.1, 1595.6, 1469.4, 1425.1, 1280.6
M.S(计算值): 478.67(MH⁺),

M.S(实测值): 478.07(MH⁺)

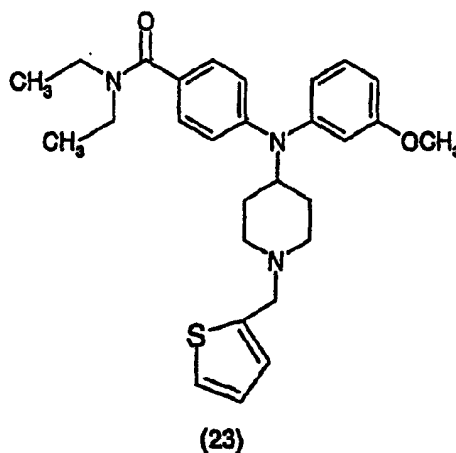
HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 7.0.
纯度: > 99% (215 nm), > 99% (254 nm)

5

实施例 13

N,N-二乙基-4-[(3-甲氧基苯基)[1-(2-噻吩基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 23)的制备

采用噻吩-2-甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 23。



10

M.S(计算值): 477.67(MH⁺),

M.S(实测值): 478.09(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 7.64;
纯度: > 99%(215 nm), > 99%(254 nm)

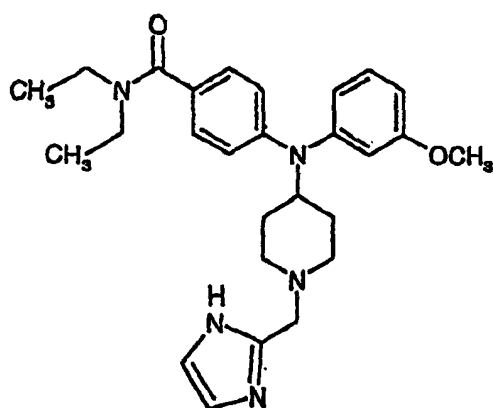
15

实施例 14

N,N-二乙基-4-[[1-(1H-咪唑-2-基甲基)-4-哌啶基](3-甲氧基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 24)的制备

20

采用咪唑-2-甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 24。



(24)

¹H NMR: CDCl₃ d 1.18(t, 6H), 1.46-1.55(m, 2H), 1.95-1.97(m, 2H), 2.24-2.30(m, 2H), 2.88-2.91(m, 2H), 3.43(br s, 4H), 3.63(s, 2H), 3.50(s, 2H), 3.78(s, 3H), 3.88-3.92(m, 2H), 6.50(t, 1H), 6.54-6.57(m, 1H), 6.71(d, J=Hz, 2H), 6.74(dd, 2.3Hz, 8.3Hz, 1H), 6.96(s, 2H), 7.24-7.29(m, 3H).

IR: 2935.6, 1615.0, 1601.8, 1503.4, 1469.8, 1454.2, 1425.2, 1281.4

M.S(计算值): 462.61(MH⁺),

M.S(实测值): 462.10(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 4.9.
纯度: >99% (215 nm), >99% (254 nm)

实施例 15

N,N-二乙基-4-[[1-(3-咪唑基甲基)-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 25)的制备

采用咪唑-3-甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 25。

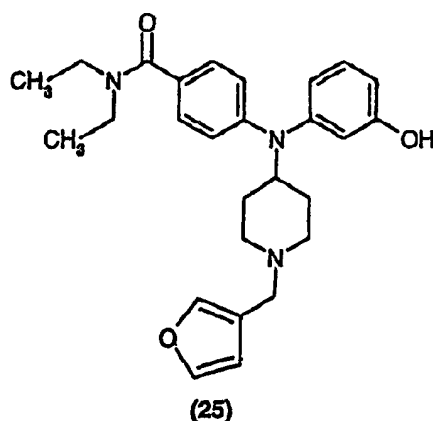
¹H NMR: CDCl₃ d 1.17-1.20(m, 6H), 1.54-1.63(m, 2H), 1.90-1.93(m, 2H), 2.12-2.17(m, 2H), 3.02-3.05(m, 2H), 3.42(br s, 6H), 3.42(br s, 4H), 3.80-3.86(m, 1H), 6.29-6.30(m, 1H), 6.35-6.37(m, 1H), 6.47-6.50(m, 1H), 6.53-6.56(m, 1H), 6.60-6.63(m, 2H), 7.12-7.22(m, 1H), 7.23-7.28(s, 4H), 7.28-7.34(m, 1H).

M.S(计算值): 448.58(MH⁺),

M.S(实测值): 448.21(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25 °C, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 5.53.

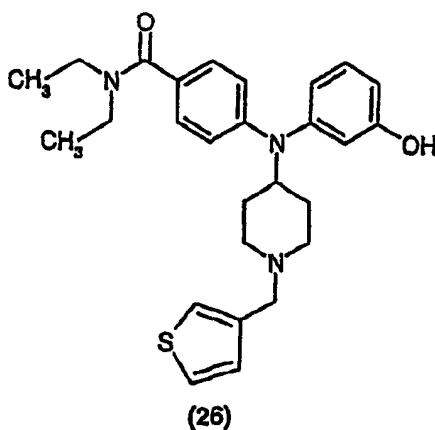
5 纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)



实施例 16

N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-(3-噻吩基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 26)的制备

10 采用噻吩-3-甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 26。



M.S(计算值): 464.64(MH⁺),

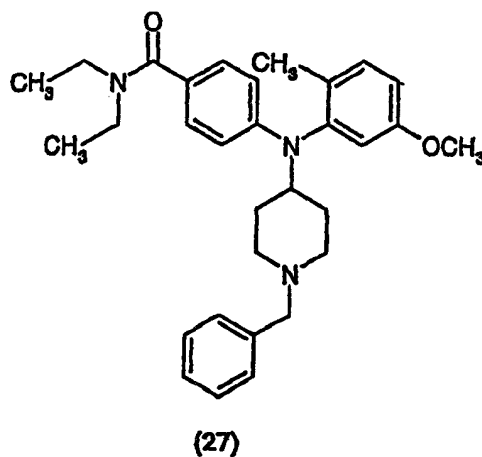
M.S(实测值): 464.15(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 7.64.
纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)

5 实施例 17

N,N-二乙基-4-[(5-甲氧基-2-甲基苯基)[1-(苯基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 27)的制备

采用步骤 1 中的 2-甲基-5-甲氧基苯胺, 按照上述流程 I 制备标题化合物 27。



10

M.S(计算值): 486.67(MH⁺),

M.S(实测值): 486.19(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 8.46.

15

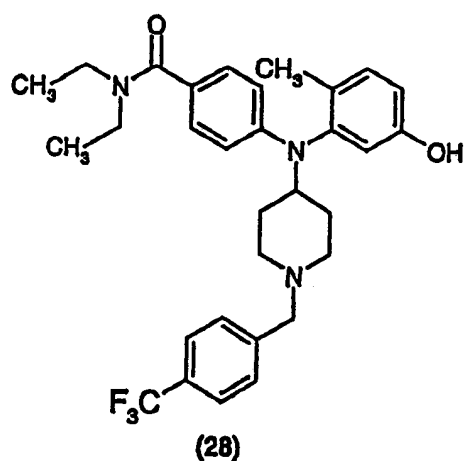
纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)

实施例 18

N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-[[4-(三氟甲基)苯基]甲基]-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 28)的制备

20

采用 4-三氟甲基苯甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 28。



分析:

C₃₀H₃₄N₃O₂F₃ x 1.4 CF₃CO₂H

计算值: C, 57.34; H, 5.22; N, 6.12;

5 实测值: C, 57.31; H, 5.18; N, 6.23。

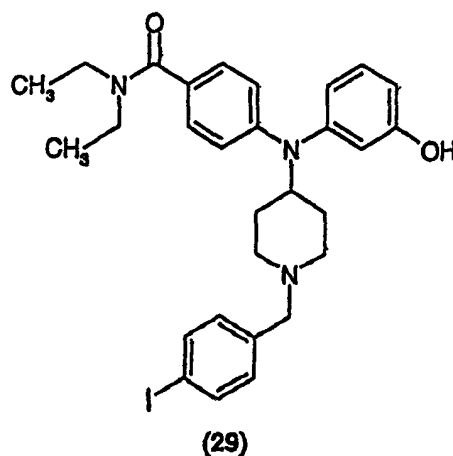
M.S(计算值): 526.61(MH⁺),

M.S(实测值): 526.29(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 30-80%B, 流速:
1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' :
10 3.29。纯度: >96% (215 nm), >98% (254 nm)

实施例 19**N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-[(4-碘代苯基)甲基]-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 29)的制备**

采用 4-碘代苯甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 29。



5

^1H NMR: CDCl_3 d 1.16(br s, 6H), 1.88-2.06(br m, 6H), 2.78-2.84(m, 2H), 3.40-3.43(m, 4H), 3.39-3.49(br m, 4H), 3.92(m, 1H), 4.12(s, 2H), 4.32(s, 2H), 6.54(d, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 6.61(s, 1H), 6.71(d, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 7.44(d, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 7.13(t, 1H), 7.36-7.45(m, 5H)

10

分析:

$\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_2\text{I} \times 1.5 \text{ C}_2\text{HO}_2\text{F}_3 \times 0.1 \text{ H}_2\text{O}$

计算值: C, 50.82; H, 4.76; N, 5.56;

实测值: C, 50.79; H, 4.77; N, 5.62。

M.S(计算值): 584.51(MH⁺),

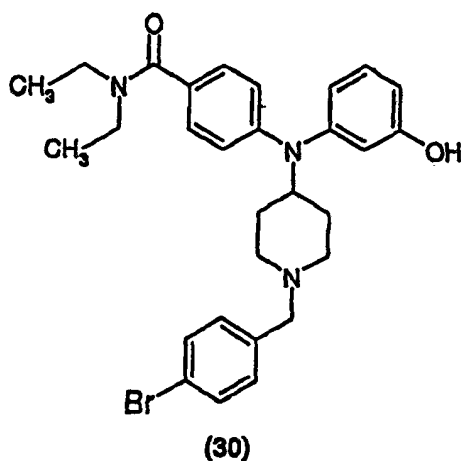
15

M.S(实测值): 584.14(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 40°C, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH_3CN 中), k' : 7.96。纯度: >98% (215 nm), >98% (254 nm)

实施例 20**N,N-二乙基-4-[[1-[(4-溴代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 30)的制备**

采用 4-溴代苯甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 30。



5

分析:

C₂₉H₃₄BrN₃O₂ x 1.30 TFA

计算值: C, 55.43%; H, 5.20%; N, 6.14%;

实测值: C, 55.43%; H, 5.25%; N, 5.94%。

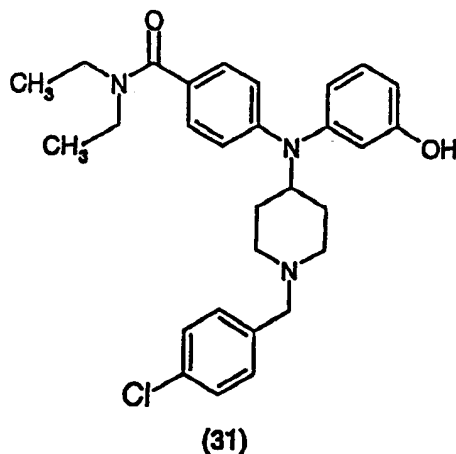
10 M.S(计算值): 537.51(MH⁺),

M.S(实测值): 536.54(MH⁺), 538.04(溴化合物)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 7.58。纯度: > 99% (215 nm), > 99% (254 nm)

实施例 21**N,N-二乙基-4-[[1-[(4-氯代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 31)的制备**

采用 4-氯代苯甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 31。



5

分析:

$C_{29}H_{34}N_3O_2Cl \times 1.4 CF_3CO_2H \times 0.3H_2O$

计算值: C, 57.64; H, 5.43; N, 6.34;

实测值: C, 57.49; H, 5.36; N, 6.41。

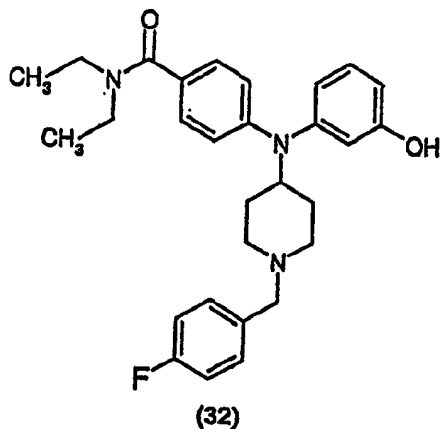
10 M.S(计算值): 496.06(MH⁺),

M.S(实测值): 496.68(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速:
1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' :
7.36。纯度: >99% (215 nm), >98% (254 nm)

实施例 22**N,N-二乙基-4-[[1-[(4-氟代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 32)的制备**

采用 4-氟代苯甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 32。



5

分析:

C₂₉H₃₄FN₃O₂ × 1.90 TFA

计算值: C, 56.91%; H, 5.23%; N, 6.07%;

实测值: C, 56.77%; H, 5.39%; N, 5.95%,

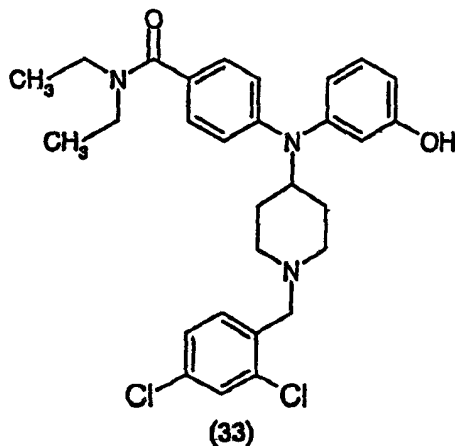
10 M.S(计算值): 476.61(MH⁺),

M.S(实测值): 476.18(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速:
1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' :
2.45. 纯度: > 91%(215 nm), > 96%(254 nm)

实施例 23**4-[[1-[(2,4-二氯代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-N,N-二乙基-苯甲酰胺(化合物 33)的制备**

采用 2,4-二氯代苯甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 33。



5

分析:

C₂₉H₃₃Cl₂N₃O₂, X 0.10 H₂O, X 1.60 TFA

计算值: C, 54.42%; H, 4.94%; N, 5.91%

实测值: C 54.46%, H 4.94%, N 5.83%,

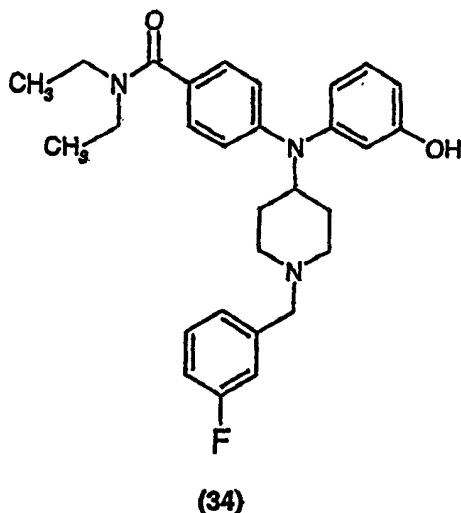
10 M.S(计算值): 527.51(MH⁺),

M.S(实测值): 527.84(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速:
1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' :
8.14. 纯度: > 99%(215 nm), > 99%(254 nm)

实施例 24**N,N-二乙基-4-[[1-[(3-氟代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 34)的制备**

采用 3-氟代苯甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 34。



5

分析:

$C_{29}H_{34}N_3O_2F \times 1.2 C_2H_2O_2F_3 \times 1.1 H_2O$

计算值: C, 59.56; H, 6.11; N, 6.64;

实测值: C, 59.43; H, 5.48; N, 6.54.

10 M.S(计算值): 476.61(MH⁺),

M.S(实测值): 476.18(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速:

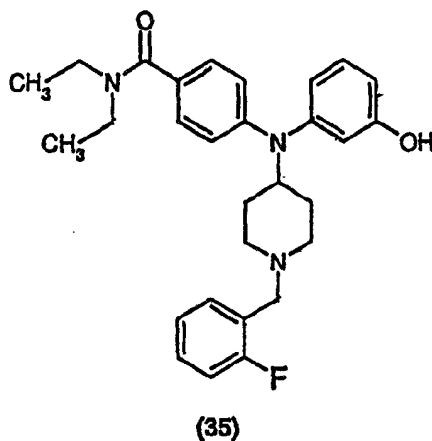
1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' :

6.53. 纯度: > 99%(215 nm), > 99%(254 nm)

15

实施例 25**N,N-二乙基-4-[[1-[(2-氟代苯基)甲基]-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 35)的制备**

采用 2-氟代苯甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 35。



5

分析:

$C_{29}H_{34}N_3O_2F \times 1.4 C_2H_2O_2F_3$

计算值: C, 60.09; H, 5.62; N, 6.61;

实测值: C, 60.09; H, 5.59; N, 6.62.

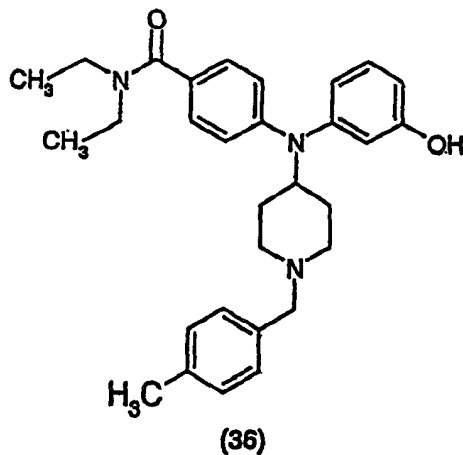
10 M.S(计算值): 476.61(MH⁺),

M.S(实测值): 476.18(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速:
1 ml/分钟, 40℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' :
5.63。纯度: > 99%(215 nm), > 99%(254 nm)

实施例 26**N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-[(4-甲基苯基)甲基]-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 36)的制备**

采用 4-甲基苯甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 36。



5

分析:

$C_{30}H_{37}N_3O_2 \times 1.4 C_2HO_2F_3 \times 0.4 H_2O$

计算值: C, 61.70; H, 6.19; N, 6.58;

实测值: C, 61.78; H, 6.25; N, 6.55。

10 M.S(计算值): 472.64(MH+),

M.S(实测值): 472.18(MH+)

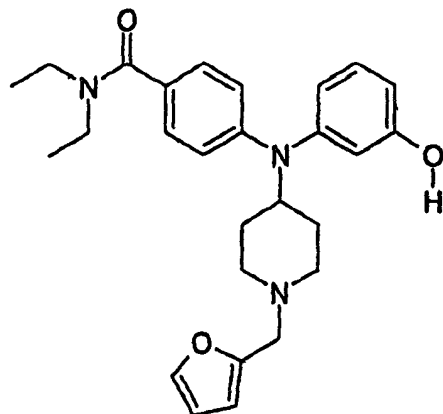
HPLC 条件: 柱: Zorbax SB C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速:

1 ml/分钟, 40°C, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' :

7.12。纯度: >98% (215 nm), >98% (254 nm)

实施例 27**N,N-二乙基-4-[[1-(2-呋喃基甲基)-4-哌啶基](3-羟基苯基)氨基]-苯甲酰胺(化合物 37)的制备**

采用 2-糠醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 37。

**(37)**

5

^1H NMR: (400 MHz, DMSO) d 1.07(t, $J=7.4\text{Hz}$, 6H, 2 x CH_3), 1.53-1.63(m, 2H, 2 x CH), 2.04-2.08(m, 2H, 2 x CH), 3.11-3.18(m, 2 x CH), 3.37-3.41(m, 2 x CH), 3.48(Br, 2 x CH_2), 4.17-4.24(m, 1H, NCH), 4.33(s, 2H, NCH_2), 6.36-6.38(m, 1H), 6.44-6.46(m, 1H), 6.55-6.56(m, 1H), 6.62-6.68(m, 4H), 7.16-7.23(m, 3H), 7.81(m, 1H), 9.53(br, 1H)

10

分析:

$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_3 \times 1.3 \text{ C}_2\text{HF}_3\text{O}_2 \times 1.0\text{H}_2\text{O}$

计算值: C, 58.09; H, 5.95; N, 6.87;

实测值: C, 58.03; H, 5.90; N, 6.94.

15

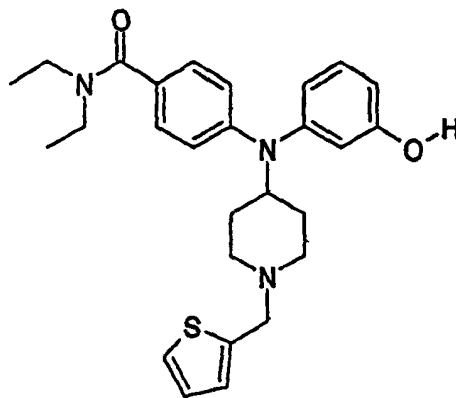
M.S(计算值): 448.58(MH⁺),

M.S(实测值): 448.21(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH_3CN 中), k' : 2.83; 纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)

实施例 28**N,N-二乙基-4-[(3-羟基苯基)[1-(2-噻吩基甲基)-4-哌啶基]氨基]-苯甲酰胺(化合物 38)的制备**

采用 2-噻吩甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 38。

**(38)**

5

^1H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 1.18(t, $J=7.4\text{Hz}$, 6H, 2 x CH_3), 1.52-1.62(m, 2H, 2 x CH), 1.89-1.93(m, 2H, 2 x CH), 2.14-2.21(m, 2 x CH), 3.00-3.03(m, 2 x CH), 3.42(Br, 2 x CH_2), 3.74(s, 2H, NCH_2), 3.80-3.83(m, 1H, NCH), 6.33-6.35(m, 1H), 6.47-6.49(m, 1H), 6.56-6.59(m, 1H), 6.62-6.65(m, 2H), 6.89-6.94(m, 2H), 7.13-7.17(m, 1H), 7.20-7.22(m, 1H), 7.22-7.26(m, 2H)

10

分析:

$\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_2\text{S} \times 1.3 \text{ C}_2\text{HF}_3\text{O}_2 \times 0.5 \text{ H}_2\text{O}$

计算值: C, 57.26; H, 5.73; N, 6.77;

15

实测值: C, 57.32; H, 5.79; N, 6.73.

M.S(计算值): 464.64(MH⁺),

M.S(实测值): 464.15(MH⁺)

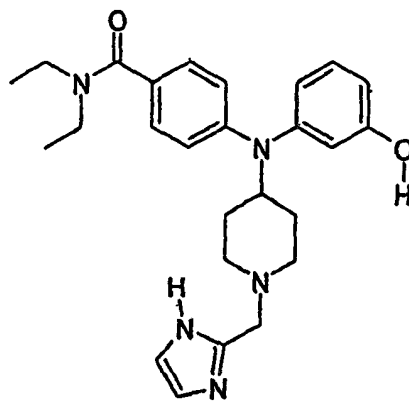
HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH_3CN 中), k' : 5.99;

20

纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)

实施例 29**N,N-二乙基-4-[3-羟基[1-(1H-咪唑-2-基甲基)-4-哌啶基]苯胺基]苯甲酰胺(化合物 39)的制备**

采用 2-咪唑甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 39。

**(39)**

5

^1H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 1.08(t, 6H, 2 x CH₃), 1.54-1.63(m, 2H, 2 x CH), 2.04-2.08(m, 2H, 2 x CH), 3.09-3.17(m, 2 x CH), 3.27-3.33(m, 2 X CH₂), 3.40-3.45(2 X CH), 4.16-4.22(m, 3H, NCH, NCH₂), 6.38(s, 1H), 6.45-6.48(m, 1H), 6.64(d, J=8.4Hz, 2H), 6.66-6.69(m, 1H), 7.18(d, J=8.4Hz, 2H), 7.20-7.22(m, 1H), 7.48(s, 1H), 8.28

10

分析:

C₂₆H₃₃N₅O₂ x 2.0 C₂HF₃O₂ X 1.1 H₂O

计算值: C, 51.81; H, 5.39; N, 10.07;

实测值: C, 51.87; H, 5.40; N, 10.01.

15

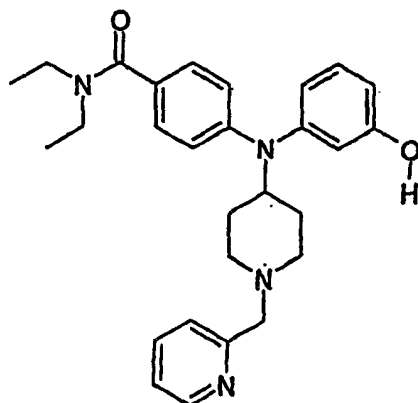
M.S(计算值): 448.58(MH⁺),

M.S(实测值): 448.22(MH⁺)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 2.92; 纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)

实施例 30**N,N-二乙基-4-{3-羟基[1-(2-吡啶基甲基)-4-哌啶基]苯胺基}苯甲酰胺**
(化合物 40)的制备

采用 2-吡啶甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 40。

**(40)**

5

¹H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 1.07(t, 6H, 2 x CH₃), 1.66-1.75(m, 2H, 2 x CH), 2.01-2.05(m, 2H, 2 x CH), 3.21-3.46(m, 8H, 2 x CH, 2 x CH₂, 2 x CH), 4.20-4.23(m, 1H, NCH), 4.39(s, 2H, NCH₂), 6.37-39(m, 1H), 6.45-6.48(m, 1H), 6.64(d, J=8.4Hz, 2H), 6.66-6.68(m, 1H), 7.18 Hz(d, J=8.4Hz, 2H), 7.21-7.24(m, 1H), 7.43-7.51(m, 2H), 7.88-7.92(s, 1H), 8.62-8.63(m, 1H), 9.53(br s, 1H), 9.69(br s, 1H)

10

分析:

C₂₈H₃₄N₄O₂ x 1.5 C₂HF₃O₂ X 0.2 H₂O

计算值: C, 58.80; H, 5.71; N, 8.85;

15

实测值: C, 58.78; H, 5.77; N, 8.74。

M.S(计算值): 459.60(MH⁺),

M.S(实测值): 459.23(MH⁺)

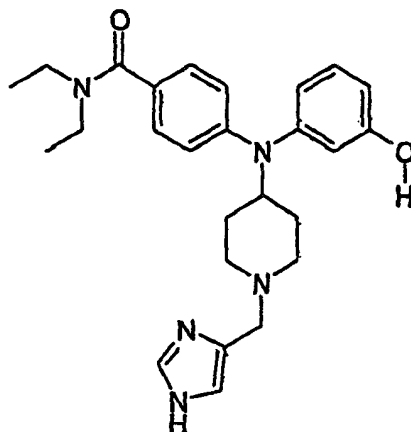
HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 4.89;

20

纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)

实施例 31**N,N-二乙基-4-[3-羟基[1-(1H-咪唑-5-基甲基)-4-哌啶基]苯胺基]苯甲酰胺(化合物 41)的制备**

采用 4-咪唑甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 41。

**(41)**

5

^1H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 1.08(t, 6H, 2 x CH₃), 1.54-1.63(m, 2H, 2 x CH), 2.04-2.08(m, 2H, 2 x CH), 3.09-3.17(m, 2 x CH), 3.27-3.33(m, 2 X CH₂), 3.40-3.45(2 X CH), 4.16-4.22(m, 3H, NCH, NCH₂), 6.38(s, 1H), 6.45-6.48(m, 1H), 6.64(d, J=8.4Hz, 2H), 6.66-6.69(m, 1H), 7.18(d, J=8.4Hz, 2H), 7.20-7.22(m, 1H), 7.48(s, 1H), 8.28(br s, 1H), 9.53(br s, 1H)

10

分析:

C₂₆H₃₃N₅O₂ x 2.3 C₂HF₃O₂ X 0.8 H₂O

计算值: C, 50.75; H, 5.14; N, 9.67;

15

实测值: C, 50.80; H, 5.15; N, 9.56。

M.S(计算值): 448.58(MH⁺),

M.S(实测值): 448.23(MH⁺)

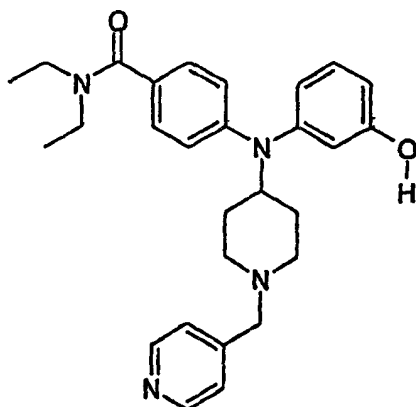
HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 2.92;

20

纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)

实施例 32**N,N-二乙基-4-{3-羟基[1-(4-吡啶基甲基)-4-哌啶基]苯胺基}苯甲酰胺
(化合物 42)的制备**

采用 4-吡啶甲醛，按照上述流程 I 制备标题化合物 42。

**(42)**

5

^1H NMR: (400 MHz, DMSO) δ 1.06(t, 6H, 2 x CH₃), 1.53-1.62(m, 2H, 2 x CH), 2.04-2.08(m, 2H, 2 x CH), 3.15-3.21(m, 2H, 2 x CH), 3.26-3.31(m, 4H, 2 X CH₂), 3.39-3.42(m, 2H, 2 x CH), 4.18-4.24(m, 1H, NCH), 4.30(s, 2H, NCH₂), 6.36-6.39(m, 1H), 6.44-6.47(m, 1H), 6.62(d, J=8.4Hz, 2H), 6.66-6.689(m, 1H), 7.18Hz(d, J=8.4Hz, 2H), 7.21-7.24(m, 1H), 7.51(d, J=5.6Hz, 2H), 8.68(d, J=5.6Hz, 1H), 9.45(br s, 1H)

10

分析:

C₂₈H₃₄N₄O₂ x 2.4 C₂HF₃O₂ X 1.1H₂O

计算值: C, 52.38; H, 5.17; N, 7.45;

15

实测值: C, 52.42; H, 5.27; N, 7.35。

M.S(计算值): 459.60(MH⁺),

M.S(实测值): 459.23(MH⁺)

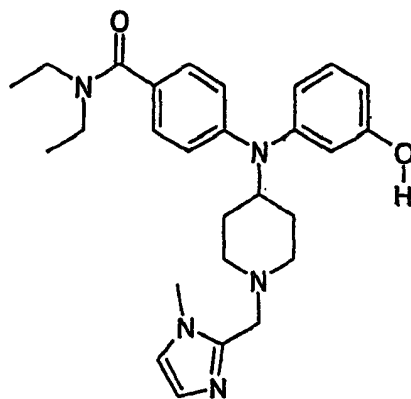
HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25℃, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH₃CN 中), k' : 3.07;

20

纯度: >99%(215 nm), >99%(254 nm)

实施例 33**N,N-二乙基-4-(3-羟基{1-[(1-甲基-1H-咪唑-2-基)甲基]-4-哌啶基}苯胺基)苯甲酰胺(化合物 43)的制备**

采用 1-甲基-2-咪唑甲醛, 按照上述流程 I 制备标题化合物 43。



(43)

5

^1H NMR: (400 MHz, CD_3OD) δ 1.15-1.20(m, 6H, 2 x CH_3), 1.57-1.67(m, 2H, 2 x CH), 2.02-2.08(m, 2H, 2 x CH), 2.59-2.66(m, 2 x CH), 3.03-3.09(m, 2 x CH), 3.44(br s, 2 x CH_2), 3.83(s, 3H, NCH_3), 3.99(Br s, NCH_2), 4.01-4.09(m, 1H, CH), 6.48-6.50(m, 1H), 6.53-6.56(m, 1H), 6.64-6.67(m, 2H), 6.72-6.75(m, 1H), 7.19-7.25(m, 3H), 7.37(m, 1H), 7.44(m, 1H)

10

分析:

$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_2 \times 2.0 \text{ C}_2\text{HF}_3\text{O}_2 \times 0.2 \text{ H}_2\text{O}$

计算值: C, 53.71; H, 5.44; N, 10.10;

15

实测值: C, 53.67; H, 5.80; N, 10.20。

M.S(计算值): 462.61(MH $^+$),

M.S(实测值): 462.23(MH $^+$)

HPLC 条件: 柱: Luna C-18, 梯度: 25 分钟内 20-50%B, 流速: 1 ml/分钟, 25 $^\circ\text{C}$, A-0.1%TFA(水中), B-0.1%TFA(CH_3CN 中), k' : 3.07;

20

纯度: >99% (215 nm), >99% (254 nm)

药用组合物

本发明的新化合物可口服、肌内、皮下、局部、鼻内、腹膜内、胸腔内、静脉内、硬膜外、鞘内、脑室内给药及注射入关节给药。

优选给药途径为口服、静脉内或肌内给药。

- 5 当为具体患者确定最佳个体给药方案和剂量水平时，其剂量取决于给药途径、疾病严重性、患者的年龄和体重以及主治医师通常考虑的其它因素。

10 为了用本发明化合物制备药用组合物，药学上可接受的惰性载体既可为固体也可为液体。固体制剂包括粉剂、片剂、分散颗粒剂、胶囊剂、扁囊剂和栓剂。

固体载体可以为能起稀释剂、调味剂、增溶剂、润滑剂、悬浮剂、粘合剂或片剂崩解剂作用的一种或多种物质；也可为包囊材料。

15 如果为粉剂，载体为磨成细粉的固体，它可与磨成细粉的活性成分混合。如果为片剂，活性成分与具有必要粘合性的载体按适当比例混合，并压制成需要的形状和规格。

为了制备栓剂组合物，首先熔解低熔点蜡如脂肪酸甘油酯和可可油的混合物，例如通过搅拌将活性成分分散于其中。然后将熔融的均匀混合物倾入常用规格模型中，使其冷却固化。

20 合适的载体有碳酸镁、硬脂酸镁、滑石粉、乳糖、糖、果胶、糊精、淀粉、西黄蓍胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、低熔点蜡、可可脂等。

25 药学上可接受的盐有乙酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、碳酸氢盐、酒石酸氢盐、溴化物、乙酸钙、樟脑磺酸盐、碳酸盐、氯化物、柠檬酸盐、二盐酸盐、乙二胺四乙酸盐、乙二磺酸盐、丙酸酯十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、glucaptate、葡萄糖酸盐、谷氨酸盐、乙醇酰阿散酸盐、己基间苯二酚盐、hydrabamine、氢溴酸盐、盐酸盐、羟基苯甲酸盐、碘化物、羟乙磺酸盐、乳酸盐、乳糖酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、扁桃酸盐、甲磺酸盐、溴代甲烷、甲基硝酸

盐、甲基硫酸盐、粘酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、双羟萘酸盐、泛酸盐、磷酸盐/二磷酸盐、聚半乳糖醛酸盐、水杨酸盐、硬脂酸盐、碱式乙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、鞣酸盐、酒石酸盐、8-氯茶碱、triethiodide、苯乍生、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、1,2-乙二胺、
5 葡甲胺、普鲁卡因、铝、钙、锂、镁、钾、钠和锌。药学上可接受的盐优选为盐酸盐和酒石酸氢盐。特别优选盐酸盐和硫酸盐。

术语组合物包括所述活性成分与作为载体的包囊材料的制剂，在包囊材料产生的包囊中活性成分(与或不与其它载体一起)被所述载体所包围，因此载体与活性成分缔合。同样，扁囊剂也包括在内。

10 片剂、粉剂、扁囊剂和胶囊剂可用作适于口服给药的固体剂型。

液体组合物包括溶液、悬浮液和乳液。适于不经胃肠给药的液体制剂实例有所述活性化合物的无菌水溶液或水-丙二醇溶液。也可将液体组合物制成聚乙二醇水溶液。

15 通过将活性组分溶解于水中并按要求加入适当的着色剂、调味剂、稳定剂和增稠剂，可制备口服给药的水溶液剂。通过将磨成细粉的活性组分和粘性原料如天然合成树胶、树脂、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和其它药用制剂领域已知的悬浮剂分散于水中，可制备口服用药的水性悬浮液。

20 优选的药用组合物是单位剂型。单位剂型时，所述组合物分成含适量活性组分的单位剂量。所述单位剂型可为包装制剂，包装制剂包含个别数量的所述制剂，例如片剂、胶囊剂和用管形瓶或安瓿包装的粉剂。单位剂型也可为一粒胶囊剂、一粒扁囊剂或一片药物本身，或者它可为适当数量的任何这类包装形式。

25 生物评估

体外模型

细胞培养

37℃、5%CO₂ 下，在含有无钙 DMEM、10%FBS、5%BCS、

0.1%Pluronic F-68 和 600 μ g/ml 遗传霉素的摇瓶中，悬浮培养表达克隆的人 μ 、 δ 和 κ 受体和新霉素抗性的人 293S 细胞。

膜制备

5 沉淀细胞，将其重悬浮于裂解缓冲液中(50 mM Tris, pH7.0, 2.5mM EDTA, 临用前用 0.1 M PMSF 的乙醇母液加入至 0.1mM), 在冰上温育 15 分钟, 然后用 polytron 匀化 30 秒。在 4℃ 下以 1000g(最大)旋转该悬浮液 10 分钟。将其上清液收集于冰上, 重悬浮沉淀后如上旋转。将两次旋转所得的上清液混合, 以 46,000g(最大)旋转 30 分钟。将沉淀物重悬浮于冷 Tris 缓冲液(50 mM Tris/Cl, pH7.0)中, 再旋转。将最终的沉淀物重悬浮于膜缓冲液(50 mM Tris、0.32 M 蔗糖、pH7.0)中。聚丙烯管中的等份物(1 ml)冰冻于干冰/乙醇中并在使用前贮存于-70℃。用 SDS 通过改良 Lowry 测定法测定蛋白浓度。

15 结合测定

 于 37℃ 解冻膜, 并冷却于冰上, 通过 25-号针头三次, 稀释入结合缓冲液(50 mM Tris、3mM $MgCl_2$ 、1 mg/ml BSA(Sigma A-7888), pH7.4, 稀释液经 0.22m 滤纸过滤后贮存于 4℃, 并向其中加入 5 μ g/ml 抑肽酶、10 μ M 苯丁抑制素、10 μ M diprotinA, 无 DTT)。将 100 μ l(μ g 蛋白质, 见表 1)的等份液加入冰冻的装有 100 μ l 适当放射性配体(见表 1)和 100 μ l 各种浓度的试验肽的 12 $\times$ 75mm 聚丙烯管中。分别测定包含和不含 10 μ M 纳洛酮的总的(TB)和非特异性(NS)结合。将所述试管涡旋并于 25℃ 温育 60-75 分钟, 之后, 通过 GF/B 滤纸(Whatman)(在 0.1%聚环乙亚胺中预浸渍至少 2 小时)快速真空-过滤内容物, 以约 12 ml/管的冰冷洗涤缓冲液(50 mM Tris、pH7.0、3 mM $MgCl_2$)洗涤。将滤纸在包含 6-7 ml 闪烁液的微管中浸渍至少 12 小时后, 用 β 计数器测量保留在滤纸上的放射性(dpm)。如果所述测定在 96-位深孔板中进行, 过滤物过滤在 96 位 PEI-浸渍的单滤纸(96-place PEI-soaked

unifilters)上, 用 3×1 ml 洗涤缓冲液洗后, 并于 55°C 烤箱中干燥 2 小时)。加入 $50\mu\text{l}$ MS-20 闪烁液体/孔后, 用 TopCount(Packard)计数滤板。所有生物数据列于表 1 中。

实施例 编号	HDELTA			大鼠脑干			小鼠脑			MEM		REM	
	EC50	% EMAX		EC50	% EMAX		EC50	% EMAX		100000 %REM	100000 %REM	10000 %REM	100000 %REM
1	0.436	0.61	105.4	9.61	99.49		14.97	112.07		10.4	85.2	4.333	66.125
6	0.466	0.21	107.1	3.41	133.06		3.54	134.25		2	69	5.333	81.333
15	0.221	0.22	104.82	4.29	140.11		7.5	131.28		3.5	83.5	8	73
16	0.271	0.22	96.86	5.53	123.99		7.92	140.7		5	83	1.5	66.5
19	1.296	1.26	103.63	50.48	88.32					30.667	61.667	0	35.667
20	1.324	0.98	99.86	36.88	86.02		20.72	74.02		30.5	81.5	4.5	51.5
21	0.987	1.52	98.72	81.24	101.79					16.333	85	2.333	45
22	2.127	1.23	109.06	19.03	102.46		23.98	96.36		8.5	85	17	63
23	1.436	0.4	98.85	6.83	102.98		4.74	91.08		30.5	93	20.5	75
24	0.704	2.63	92.31	45.93	92.88		43.21	91.26		3.5	71.5	3.5	87.5
25	0.763	1.13	111.21	14.4	113.59		16.14	112.12		0	71	4	71
26	0.641	1.14	104.65	11.72	78.42		9.3	88.34		31.5	86	3.5	63.5
27	0.416	1.29	101.34	19.64	129.03		44.19	130.03		2	65	3.5	54.5
28	0.651	0.7	106.46	23.45	141.23		40.24	144.02		1.5	80	1.5	52
29	0.3	1.17	118.27	18.68	107.04		31.03	130.01		6	92.5	36.5	74.5
30	0.24	0.26	95.88	4.12	158.09		6.55	159.09		26	82	31	74
31	1.61	14.05	105.52	130.53	41.3		152.57	50.26					
32	1.023	3.92	114.6	85	122.51		119.46	115.43					
33	1.707	13.3	87.74	125.51	100.37		217.34	100.53					

表 1. 说明书中所举实施例的生物数据。

5

数据分析

以 TB-NS 计算出特异性结合(SB), 存在各种测试肽时的 SB 表示为对照 SB 的百分比。根据 logit 图或曲线拟合程序例如 Ligand、GraphPad Prism、SigmaPlot 或 ReceptorFit 计算置换特异性结合放射性配体的配体 IC_{50} 值和 Hill 系数(n_H)。用 Cheng-Prussoff 方程计算 K_i 值。用至少三次置换曲线, 反映测试配体的 IC_{50} 、 K_i 和 n_H 值的均值 $\pm$

10

S.E.M.

受体饱和实验

5 用适当放射性配体(浓度为 0.2-5 倍于估计 K_d (如果所需放射配体量适宜的话, 可高达 10 倍)对细胞膜进行结合试验, 从而测定放射性配体 K_d 值。特异性放射性配体结合表示为 pmole/mg 膜蛋白。根据单点模式(one-site model)由各个试验的特异性结合(B)放射性配体与 nM 游离(F)放射性配体的非线性拟合曲线获得具体实验的 K_d 和 B_{max} 值。

10

用 Von Frey 试验测定机械-异常性疼痛

用 Chaplan 等(1994)所述的方法在 08:00 至 16:00 之间进行试验。将大鼠置于金属丝网底(可接触到其爪)之上的 Plexiglas 笼中, 让其适应 10-15 分钟。试验区域为左后爪的足底中部, 避开较不敏感的足垫部分。用一系列呈对数递增硬度(0.41、0.69、1.20、2.04、3.63、5.50、8.51 和 15.14 克; Stoelting, III, USA)的 8 Von Frey 毛发接触其爪。从网状底板的下面, 垂直于足底表面使用 Von Frey 毛发, 其用力足以使 Von Frey 毛发对爪产生轻微弯曲并保持约 6-8 秒。如爪急剧缩回则为阳性反应。毛发一移开立即退缩也认为是阳性反应。走动是不明确的反应, 需要重复刺激。

20

试验方案

FCA 处理组在手术后第一天对动物进行试验。用 Dixon(1980)的上-下方法确定 50%缩回阈值。用 2.04g(处于毛发系列刺激中间)毛发开始试验。无论刺激强度是上升或下降, 一直连续刺激。爪对最初选定的毛发刺激无回缩反应时, 就逐渐增强刺激; 若爪回缩, 则选择更弱的刺激。应用这种方法计算最优阈值需要 6 个极为接近 50%阈值的反应, 当反应发生第一个变化时, 例如阈值首次交叉, 才开始计数这 6 个反应。如果阈值落在刺激范围之外, 各指定 15.14(正常

25

敏感度)或 0.41(最大异常性疼痛)。用常规(X = 未缩回; O = 缩回)对所得的阳性和阴性反应模式制表, 用以下公式:

$$50\% \text{ 阈值}(g) = 10^{(X_f + k) / \delta} / 10,000$$

5 内推出 50%缩回阈值, 其中 X_f = 最后使用的 Von Frey 毛发值(对数单位); k = 阳性/阴性反应模式的表格数值(Chaplan 等(1994)); 而 δ = 刺激的平均差值(对数单位)。此处 $\delta = 0.224$ 。

根据 Chaplan 等(1994), 将 Von Frey 阈值转化为最大可能作用的百分比(%MPE)。下列方程用于计算%MPE:

$$10 \quad \%MPE = \frac{\text{药物处理阈值}(g) - \text{异常性疼痛阈值}(g)}{\text{对照阈值}(g) - \text{异常性疼痛阈值}(g)} \times 100$$

试验物的给药

15 在 Von Frey 试验前将试验物注射(皮下、腹膜内、静脉内或口服)给予大鼠, 试验化合物给药与 Von Frey 试验时间间隔取决于所试验的化合物的性质。

扭体试验

20 对小鼠腹膜内给药时, 乙酸会引起腹部收缩。然后呈现典型的机体伸展。用了止痛药后, 则较少观察到所述运动, 则该药选作潜在的良好候选物。

只有出现下列情况才认为是完全典型的扭体反射: 所述动物未运动; 后背略微降低; 双爪足底表面可观察到。

25

(i) 溶液制备

乙酸(AcOH): 将 120 μ l 乙酸加入 19.88 ml 的蒸馏水中以得到最终体积为 20 ml、最终浓度为 0.6%的 AcOH。再将该溶液混合(涡旋)以备注射用。

化合物(药物): 根据标准方法制备各化合物并溶解于最适当的载体中。

(ii) 溶液的给药

5 在试验前 20、30 或 40 分钟(根据化合物的种类及其特性), 以 10 ml/kg(考虑平均小鼠体重)将所述化合物(药物)经口、腹膜内(i.p.)、皮下(s.c.)或静脉内(i.v.)给药。当所述化合物中枢性: 脑室内(i.c.v.)或鞘内(i.t.)给药时, 给药量为 5 μ l。

10 临试验前以 10 ml/kg(考虑平均小鼠体重)AcOH 在两侧腹膜内(i.p.)给药。

(iii) 试验

15 观察所述动物(小鼠)20 分钟, 记录(扭体反射)发生次数, 实验结束时进行数据汇编。将小鼠放置在带接触衬垫(bedding)的单个“鞋盒”状笼中。通常同时观察 4 只小鼠: 一只对照, 三只给予药物。