



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111484435 B

(45) 授权公告日 2021.04.02

(21) 申请号 202010490065.4  
 (22) 申请日 2020.06.02  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 111484435 A  
 (43) 申请公布日 2020.08.04  
 (66) 本国优先权数据  
 201910504392.8 2019.06.12 CN  
 (73) 专利权人 山东省医学科学院药物研究所  
 (山东省抗衰老研究中心、山东省  
 新技术制药研究所)  
 地址 250062 山东省济南市经十路18877号  
 (72) 发明人 刘波 姚庆强 杨皓然 矢倉隆之  
 李莹 喻琨 陈海蛟  
 (74) 专利代理机构 济南誉丰专利代理事务所  
 (普通合伙企业) 37240  
 代理人 吴乃美  
 (51) Int. Cl.  
 C07D 207/14 (2006.01) (续)  
 (56) 对比文件  
 CN 110330452 A, 2019.10.15  
 CN 103304549 A, 2013.09.18  
 CN 102458429 A, 2012.05.16  
 US 2007032531 A1, 2007.02.08  
 杨皓然. 新型无水鞘氨醇类SphK1拮抗剂的设计、合成及生物活性研究.《济南大学硕士学位论文》.2019, 43-53.

刘佳丽等.鞘氨醇激酶信号通路.《中华临床医师杂志(电子版)》.2016,第10卷(第6期),886-890.

Inuki, Shinsuke等.Introduction of a Polar Functional Group to the Lipid Tail of 4-epi-Jaspine B Affects Sphingosine Kinase Isoform Selectivity.《Chemical & Pharmaceutical Bulletin》.2018,第66卷(第9期),866-872.

Yuji Yoshimitsu等.Synthesis of pachastrissamine (jaspine B) and its derivatives by the late-stage introduction of the C-2 alkyl side-chains using olefin cross metathesis.《Tetrahedron》.2013,第69卷(第21期),4211-4220.

Hiroaki Ohno等.Identification of selective inhibitors of sphingosine kinases 1 and 2 through a structure-activity relationship study of 4-epi-jaspine B.《Bioorganic & Medicinal Chemistry》.2017,第25卷3046-3052. (续)

审查员 解晓妮

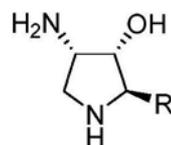
权利要求书2页 说明书10页

(54) 发明名称  
四氢吡咯烷类化合物或其药学上可接受的盐及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了四氢吡咯烷类化合物、其制备方法及应用,具体公开了一类四氢吡咯烷类化合物(I),药理试验证明,本发明的四氢吡咯烷类化合物对鞘氨醇激酶1(SphK1)有较强的抑制活性,化合物对肿瘤具有抑制作用。该类化合物与其药

用制剂可以用于制备治疗一系列癌症、炎症性疾病的药物,例如结肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、肺腺癌、黑色素瘤、食管癌;所述的炎症性疾病包括炎症性肠病、肝炎、哮喘、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎或多发性硬化症。式(I)



CN 111484435 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

*C07D 405/12* (2006.01)

*A61K 31/40* (2006.01)

*A61K 31/4025* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

*A61P 29/00* (2006.01)

*A61P 19/02* (2006.01)

*A61P 11/00* (2006.01)

*A61P 11/06* (2006.01)

*A61P 1/16* (2006.01)

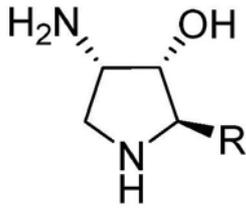
*A61P 1/00* (2006.01)

*A61P 9/10* (2006.01)

(56) 对比文件

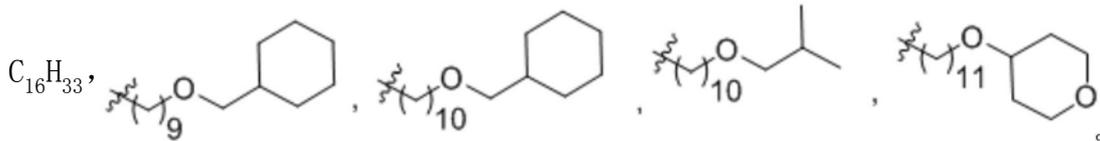
Tomoya Fujiwara等. Practical Synthesis of Pachastrissamine (Jaspine B), 2-epi-Pachastrissamine, and the 2-epi-Pyrrolidine Analogue.《Chemical & Pharmaceutical Bulletin》.2016,第64卷(第2期),179-188.

1. 通式 (I) 所示化合物或其药学上可接受的盐,

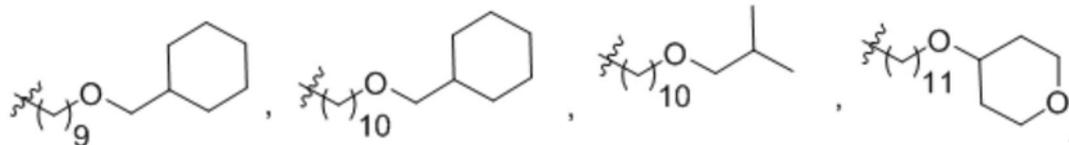


式 (I)

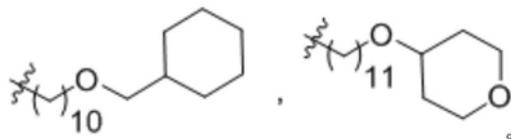
R为:



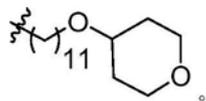
2. 如权利要求1所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述R为



3. 如权利要求2所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述R为



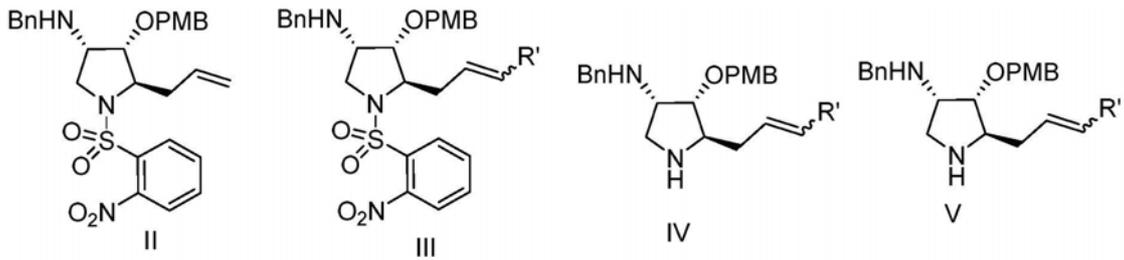
4. 如权利要求3所述的化合物或其药学上可接受的盐,其特征在于,所述R为



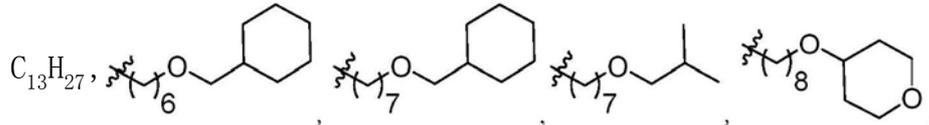
5. 权利要求1-4任一权利要求所述的化合物或其药学上可接受的盐的制备方法,包括如下步骤:

将化合物II溶解于二氯甲烷中,于氮气保护下,加入烯烃,Grubbs<sup>2nd</sup>,加热回流反应7h,以TLC检测反应原料消失;反应液冷却至室温并通过短硅胶柱过滤,用EtOAc洗脱,得化合物粗品(III);将化合物粗品(III)溶解于乙腈中,于氮气保护下加入碳酸铯,苯硫酚,50℃反应3h,以TLC检测反应原料消失;反应液冷却至室温并通过短硅胶柱过滤,用二氯甲烷洗脱,得化合物粗品(IV);将化合物粗品(IV)溶解于甲醇中,加入20%氢氧化钡碳,10%钡碳,于氢气条件下反应24h,反应液用硅藻土过滤,旋干溶剂,得化合物粗品(V);将化合物粗品(V)溶解于乙腈-水中,所述乙腈-水体积比为1:4;加入硝酸铯铵,室温反应3h,反应液直接用硅胶柱层析分离,得目标化合物;

所述化合物II,III,IV,V为:



所述R' 为



6. 一种药物组合物,其特征在于,含有权利要求1-4任一项的化合物或其药学上可接受的盐和药学上可接受的载体或赋形剂。

7. 权利要求1-4任一项的化合物或其药学上可接受的盐或权利要求6的药物组合物在制备预防和/或治疗与SphK1功能异常相关的疾病的药物中的应用。

8. 根据权利要求7的应用,其特征在于,所述的与SphK1功能异常相关的疾病为癌症、炎症性疾病。

9. 根据权利要求8 的应用,其特征在于,所述癌症为结肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、黑色素瘤、食管癌;所述炎症性疾病为炎症性肠病、肝炎、哮喘、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎或多发性硬化症。

## 四氢吡咯烷类化合物或其药学上可接受的盐及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及药物化学领域,具体涉及一类四氢吡咯烷类化合物、其制备方法、并包含其药物制剂及其医药用途。

### 背景技术

[0002] 鞘磷脂是细胞膜的成分之一,其代谢产物神经酰胺(ceramide, Cer)、鞘氨醇(sphingosine, Sp)和鞘氨醇-1-磷酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)在调控细胞增殖、迁移及凋亡中发挥着重要作用。Cer和Sp能抑制细胞生长、促进细胞凋亡,S1P则促进细胞生长、抑制细胞凋亡。鞘氨醇激酶(sphingosinekinase, SphK)是调控上述物质在细胞内动态平衡的重要限速酶,也是细胞增殖及存活的重要信号分子。

[0003] 目前在哺乳动物组织中发现有SphK1和SphK2两种异构体。SphK1主要存在于细胞质中,主要功能是磷酸化Sp生成S1P,进而调控细胞增殖、迁移、侵染、分化及细胞的程序性凋亡等多种生物学功能,是SphK1-S1P-S1P受体(SphK1-S1P-S1PRs)信号通路中重要的激酶。SphK1高表达不仅能刺激细胞生长,而且可以导致细胞恶性转化,故SphK1基因也具有癌基因的特性。SphK1在胶质瘤、结肠癌、直肠癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、胃癌、宫颈癌、肾癌等多种癌细胞中高表达,其活性高低直接决定着癌细胞的命运。SphK1的活性受抑制会使细胞内Cer和Sp水平升高,S1P水平降低,进而抑制细胞生长或促进细胞凋亡,因此,SphK1是癌症治疗的理想靶标。近几年,SphK1-S1P-S1PRs信号通路及其在肿瘤、自身免疫系统疾病、炎症、动脉粥样硬化、神经系统疾病等多种疾病中的作用已逐步被阐明,靶向SphK1的药物设计、开发研究也成为药物研究的热点之一。

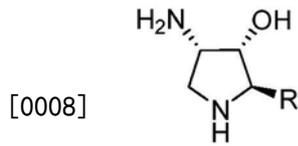
[0004] 由于癌症和炎症性疾病的发病率呈逐年升高的趋势,其病理机制非常复杂,因此,发现结构多样性的SphK1抑制剂来缓解癌症和炎症性肠病迫在眉睫。研究人员基于此研究思路发现了含四氢吡咯烷的化合物,其对SphK1具有较好的选择性及抗细胞增殖活性。

### 发明内容

[0005] 本发明解决的技术问题是提供一类四氢吡咯烷类化合物及其药学上可接受的盐、其制备方法、药物组合物以及其在制备预防和/或治疗与Sphk1功能异常相关的疾病中的应用。

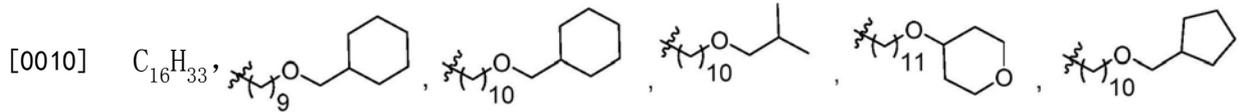
[0006] 为解决本发明的技术问题,本发明提供如下技术方案:

[0007] 本发明技术方案的第一方面是提供如通式(I)所示的化合物或其药学上可接受的盐:



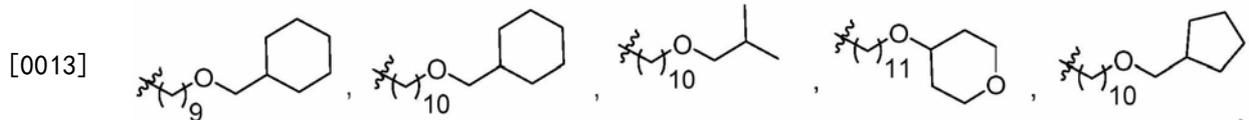
式 (I)

[0009] 其中, R为

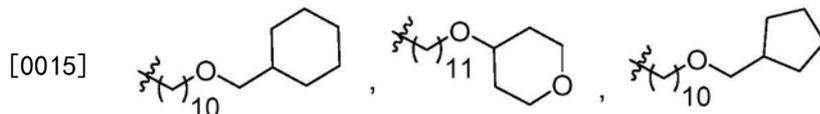


[0011] 优选的, 上述化合物或其药学上可接受的盐, 所述R为 $C_{16}H_{33}$ 。

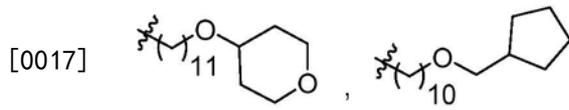
[0012] 或者优选的, 上述化合物或其药学上可接受的盐, 所述R为



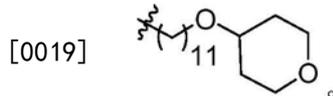
[0014] 进一步优选的, 上述化合物或其药学上可接受的盐, 所述R为



[0016] 更进一步优选的, 上述化合物或其药学上可接受的盐, 所述R为

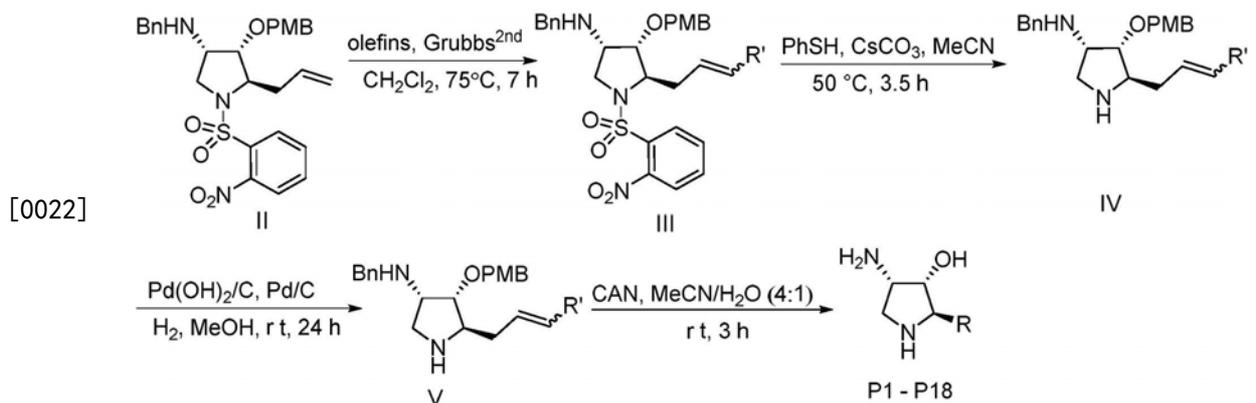


[0018] 更进一步优选的, 上述化合物或其药学上可接受的盐, 所述R为

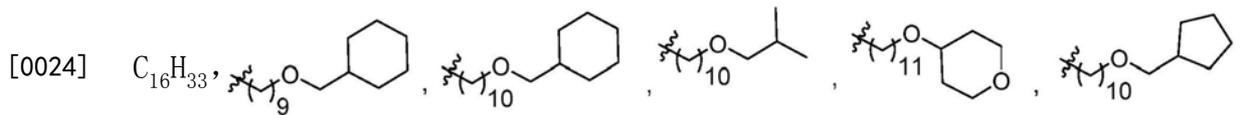


[0020] 本发明上述任一化合物药学上可接受的盐为有机酸盐或无机酸盐, 其中有机酸包括乙酸、三氟乙酸、甲磺酸、甲苯磺酸、马来酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、富马酸; 无机酸包括盐酸、氢溴酸、硝酸、硫酸、磷酸。

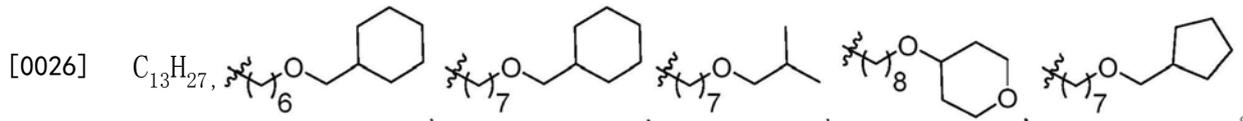
[0021] 本发明技术方案的第二方面是提供第一方面所述化合物的制备方法, 本发明的通式 (I) 化合物可用下述方法制备:



[0023] 所述R为



[0025] R' 为



[0027] 将化合物II溶解于二氯甲烷中,于氮气保护下,加入相应烯烃,Grubbs<sup>2nd</sup>,加热回流反应7h,以TLC检测反应原料消失;反应液冷却至室温并通过短硅胶柱过滤,用EtOAc洗脱,得化合物粗品(III);将化合物粗品(III)溶解于乙腈中,于氮气保护下加入碳酸铯,苯硫酚,50℃反应3h,以TLC检测反应原料消失;反应液冷却至室温并通过短硅胶柱过滤,用二氯甲烷洗脱,得化合物粗品(IV);将化合物粗品(IV)溶解于甲醇中,加入20%氢氧化钡碳(30wt%),10%钡碳(10wt%),于氢气条件下反应24h,反应液用硅藻土过滤,旋干溶剂,得化合物粗品(V);将化合物粗品(V)溶解于乙腈/水(体积比1:4)中,加入硝酸铯铵,室温反应3h,反应液直接用硅胶柱层析分离(洗脱剂为甲醇-乙醇-二氯甲烷-氨水-6:12:77:5),得目标化合物。

[0028] 本发明技术方案的第三方面是提供包含第一方面所述化合物的药物组合物其药理学上可接受的盐与一种或多种药用载体和/或稀释剂的药物组合物,为临床上或药理学上可接受的任一剂型,优选为口服制剂或注射剂。其中含有生理有效量的通式(I)所示的化合物0.01g~10g,可以为0.01g、0.015g、0.02g、0.025g、0.03g、0.04g、0.05g、0.1g、0.125g、0.2g、0.25g、0.3g、0.4g、0.5g、0.6g、0.75g、1g、1.25g、1.5g、1.75g、2g、2.5g、3g、4g、5g、6g、7g、8g、9g、10g等。

[0029] 本发明任一化合物、其药理学上可接受的盐,可以口服或肠胃外给药等方式施用于需要这种治疗的患者。

[0030] 用于肠胃外给药时,可制成注射剂。制成注射剂时,可采用现有制药领域中的常规方法生产,可选用水性溶剂或非水性溶剂。最常用的水性溶剂为注射用水,也可用0.9%氯化钠溶液或其他适宜的水溶液;常用的非水性溶剂为植物油,主要为供注射用大豆油,其他还有乙醇、丙二醇、聚乙二醇等的水溶液。配制注射剂时,可以不加入附加剂,也可根据药物的性质加入适宜的附加剂,如渗透压调节剂、pH值调节剂、增溶剂、填充剂、抗氧化剂、抑菌剂、乳化剂、助悬剂等。用于口服时,可制成常规的固体制剂,如片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂等;也可制成口服液体制剂,如口服溶液剂、口服混悬剂、糖浆剂等。制成口服制剂时,可以加入适宜的填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂等。

[0031] 本发明所述的化合物可以添加药理学上可接受的载体制成常见的药用制剂,如片剂、胶囊、粉剂、糖浆、液剂、悬浮剂、针剂,可以加入香料、甜味剂、液体或固体填料或稀释剂等常用药用辅料。

[0032] 本发明所述的化合物在临床上的给药方式可以采用口服、注射等方式。

[0033] 本发明的化合物临床所用剂量为0.01-1000mg/天,也可根据病情的轻重或剂型的不同偏离此范围。

[0034] 本发明技术方案的第四方面是提供包含第一方面所述化合物以及第三方面所述药物组合物在制备预防或治疗SphK1功能异常相关的疾病的药物中的应用。其中,所述的与SphK1功能异常相关的疾病包括癌症、炎症性疾病。所述的癌症包括结肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、肺腺癌、黑色素瘤、食管癌;所述的炎症性疾病包括炎症性肠病、肝炎、哮喘、慢性阻塞性肺病、类风湿性关节炎或多发性硬化症。

[0035] 有益技术效果:

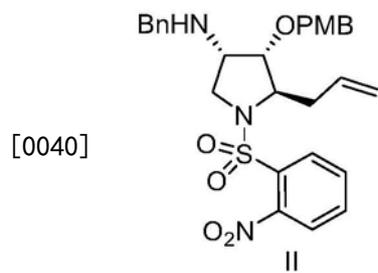
[0036] 本发明的优点在于,所述的化合物对SphK1有较强的选择性及抑制作用,该类化合物与其药用制剂可以用于治疗SphK1功能异常导致的一系列疾病,例如结肠癌、肝癌、炎症性肠病、肝炎、哮喘、发性硬化症等。此外,本发明提供的制备方法具有不需要中间体分离,反应条件温和、操作简单等特点。

### 具体实施方式

[0037] 下面结合具体实施方式来对本发明作更进一步的说明,以便本领域的技术人员更了解本发明,但并不以此限制本发明。

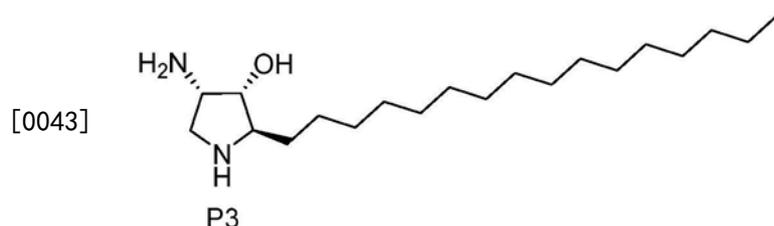
[0038] 将化合物II (0.186mmol) 溶解于二氯甲烷 (6mL) 中,于氮气保护下,加入烯烃 (0.744mmol), Grubbs<sup>2nd</sup> (0.037mmol), 加热回流反应7h, 以TLC检测原料消失。反应液冷却至室温并通过短硅胶柱过滤, 用EtOAc洗脱, 得化合物粗品 (III)。将所得粗品 (III) 溶解于乙腈 (6mL) 中, 于氮气保护下加入碳酸铯 (0.372mmol), 苯硫酚 (0.28mmol), 50°C 反应3h, 以TLC检测原料消失。反应液冷却至室温并通过短的短硅胶柱过滤, 用二氯甲烷洗脱, 得化合物粗品 (IV)。将所得粗品 (IV) 溶解于甲醇 (6mL) 中, 加入20%氢氧化钡碳 (30wt%), 10%钡碳 (10wt%), 于氢气条件下反应24h, 反应液经硅藻土过滤, 旋干溶剂, 得化合物粗品 (V)。将所得粗品 (V) 溶解于乙腈/水 (1:4) 中, 加入硝酸铯铵 (0.372mmol), 室温反应3h。反应液直接用硅胶柱层析分离 (洗脱剂为甲醇-乙醇-二氯甲烷-氨水-6:12:77:5), 得P系列四氢吡咯烷类目标化合物,

[0039] 化合物II结构式如下:



[0041] 实施例1

[0042] (2R, 3S, 4S) -4-氨基-2-十六烷基吡咯烷-3-醇的制备 (P3)



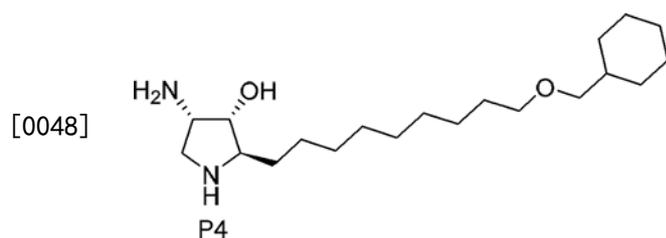
[0044] 将化合物II (0.186mmol) 溶解于二氯甲烷 (6mL) 中, 于氮气保护下, 加入1-十五烯

(0.744mmol), Grubbs<sup>2nd</sup> (0.037mmol), 加热回流反应7h, 以TLC检测原料消失(乙酸乙酯-二氯甲烷-石油醚3:2:5)。反应液冷却至室温并通过短硅胶柱过滤, 用EtOAc洗脱, 得粗品。将所得粗品溶解于乙腈(6mL)中, 于氮气保护下加入碳酸铯(0.372mmol), 苯硫酚(0.28mmol), 50°C反应3h, 以TLC检测原料消失(甲醇-二氯甲烷7:93)。反应液冷却至室温并通过短的短硅胶柱过滤, 用二氯甲烷洗脱, 得粗品。将所得粗品溶解于甲醇(6mL)中, 加入20%氢氧化钡碳(30wt%), 10%钡碳(10wt%), 于氢气条件下反应24h, 反应液经硅藻土过滤, 旋干溶剂, 得粗品。将所得粗品溶解于乙腈/水(1:4)中, 加入硝酸铈铵(0.372mmol), 室温反应3h。反应液直接用硅胶柱层析分离(洗脱剂为甲醇-乙醇-二氯甲烷-氨水-6:12:77:5)得化合物P3。白色固体, 产率: 30%。[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> +12.1 (c = 0.12, MeOH), <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600MHz)  $\delta$  (ppm): 3.55-3.58 (m, 1H), 3.15 (q, J=6.7Hz, 1H), 3.09 (dd, J=11.2, 6.7Hz, 1H), 2.84 (q, J=6.3Hz, 1H), 2.56 (dd, J=11.2, 7.5Hz, 1H), 1.48-1.55 (m, 1H), 1.11-1.40 (m, 29H), 0.80 (t, J=7.0Hz, 3H)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150MHz)  $\delta$  (ppm): 75.66, 65.09, 53.01, 51.91, 33.98, 31.90, 29.59, 29.63 (2C), 29.67 (6C), 29.52, 29.33, 26.79, 22.66, 14.07。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3350, 3240, 2956, 2918, 2850, 1558, 1469, 1458, 1261, 1101, 1083, 1028, 954, 914, 883, 852, 804, 765, 719。HRMS (ESI) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O m/z: 327.3375 [M+H]<sup>+</sup>. found: 327.3231。

[0045] 实施例2-6中化合物, P4, P5, P7, P17, P18的制备方法同实施例1, 区别在于使用不同的烯烃试剂, 具体每个实施例中使用的烯烃原料在相应实施例中有记载:

[0046] 实施例2

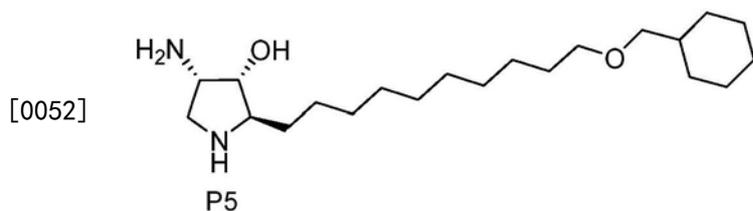
[0047] (2R, 3S, 4S) -4-氨基-2-[9-(环己基)壬基]吡咯烷-3-醇的制备 (P4)



[0049] 所用烯烃试剂为((辛-7-烯-1-氧基)甲基)环己烷。产物为粘稠油状, 产率: 29%, [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> +15.3 (c = 0.1, MeOH), <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)  $\delta$  (ppm): 3.52 (t, J=5.3Hz, 1H), 3.36 (h, J=7.3Hz, 4H), 3.19 (d, J=6.6Hz, 2H), 2.82-2.90 (m, 1H), 2.63 (dd, J=9.7, 6.2Hz, 1H), 2.41 (brs, 4H), 1.12-1.79 (m, 25H), 0.90 (q, J=10.9, 10.1Hz, 2H)。<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100MHz)  $\delta$  (ppm): 76.83, 75.81, 71.13, 65.53, 53.29, 53.00, 38.04, 34.42, 30.18 (2C), 29.74 (2C), 29.55, 29.51, 29.48, 26.90, 26.69, 26.17, 25.90 (2C)。IR (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3427 (br), 3248, 2924, 2850, 2792, 2665, 1463, 1448, 1409, 1375, 1122, 927, 910, 891, 844, 815, 723。HRMS (ESI) calcd for C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> m/z: 341.3168 [M+H]<sup>+</sup>. found: 341.3419。

[0050] 实施例3

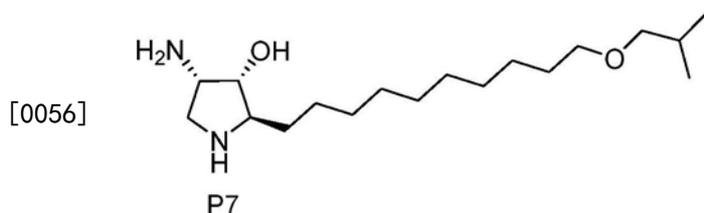
[0051] (2R, 3S, 4S) -4-氨基-2-[10-(环己基)癸基]吡咯烷-3-醇的制备 (P5)



[0053] 所用烯烃试剂为((壬-8-烯-1-氧基)甲基)环己烷。产物为粘稠油状,产率:17%,  
 $[\alpha]_D^{25} +9.4$  ( $c = 0.06$ , MeOH),  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz)  $\delta$  (ppm) : 3.63 (t,  $J=5.4\text{Hz}$ , 1H) , 3.39 (t,  $J=6.5\text{Hz}$ , 2H) , 3.12-3.24 (m, 4H) , 2.89 (q,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H) , 2.61 (dd,  $J=10.7, 7.2\text{Hz}$ , 1H) , 1.50-1.79 (m, 10H) , 1.19-1.45 (m, 21H) , 0.94 (q,  $J=10.5, 9.0\text{Hz}$ , 2H) .  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz)  $\delta$  (ppm) : 76.48, 75.83, 70.75, 64.60, 53.31, 50.58, 37.93, 33.51, 29.83 (2C) , 29.42, 29.34 (2C) , 29.29, 29.27, 29.17, 26.64, 26.37, 26.89, 25.62 (2C) . IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3338, 3253, 2924, 2850, 2792, 1558, 1541, 1454, 1373, 1124, 964, 916, 887, 815, 721. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_2$   $m/z$ : 355.3325  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . found: 355.3316.

[0054] 实施例4

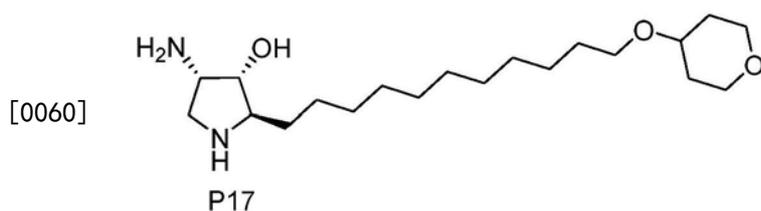
[0055] (2R,3S,4S)-4-氨基-2-(10-异丁基癸烷)吡咯烷-3-醇的制备(P7)



[0057] 所用烯烃试剂为9-异丁氧基-1-烯。产物为粘稠油状,产率:26%,  
 $[\alpha]_D^{25} +7.8$  ( $c = 0.06$ , MeOH),  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600MHz)  $\delta$  (ppm) : 3.87 (t,  $J=5.3\text{Hz}$ , 1H) , 3.52 (q,  $J=6.6\text{Hz}$ , 1H) , 3.39 (dt,  $J=18.7, 6.7\text{Hz}$ , 3H) , 3.20 (dd,  $J=12.6, 6.9\text{Hz}$ , 3H) , 2.93 (dd,  $J=11.8, 7.1\text{Hz}$ , 1H) , 1.77-1.89 (m, 1H) , 1.69 (dt,  $J=15.3, 7.8\text{Hz}$ , 1H) , 1.54 (dt,  $J=14.4, 7.2\text{Hz}$ , 3H) , 1.16-1.49 (m, 18H) , 0.90 (d,  $J=6.7\text{Hz}$ , 6H) .  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150MHz)  $\delta$  (ppm) : 77.51, 74.02, 70.07, 64.72, 51.99, 48.29, 31.43, 29.36, 29.32, 29.23, 29.18, 29.15, 29.13, 28.19, 26.32, 25.91, 18.37 (2C) . IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3246, 3070, 2927, 2852, 1635, 1558, 1521, 1419, 1114, 1041, 1008, 968, 945, 873, 831, 819, 721. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_2$   $m/z$ : 315.3012  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . found: 315.3000.

[0058] 实施例5

[0059] (2R,3S,4S)-4-氨基-2-(10-((四氢-2H-吡喃-4-基)氧基)癸基)吡咯烷-3-醇的制备(P17)

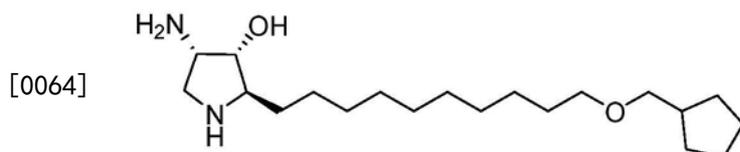


[0061] 所用烯烃试剂为4-(癸-9-烯-1-氧基)四氢-2H-吡喃。产物为白色固体,产率:

37%,  $[\alpha]_D^{25} +13$  ( $c = 0.1, \text{MeOH}$ ),  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}, 600\text{MHz}$ )  $\delta$  (ppm) : 3.89 (dt,  $J=11.5, 4.3\text{Hz}$ , 2H), 3.58 (t,  $J=5.4\text{Hz}$ , 1H), 3.53-3.41 (m, 5H), 3.18-3.09 (m, 2H), 2.84 (q,  $J=5.9\text{Hz}$ , 1H), 2.55 (dd,  $J=10.6, 7.2\text{Hz}$ , 1H), 1.92-1.86 (m, 2H), 1.62-1.24 (m, 24H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}, 150\text{MHz}$ )  $\delta$  (ppm) : 76.15, 73.63, 67.43, 65.31 (2C), 64.58, 53.54, 50.98, 33.90, 32.23 (2C), 29.72, 29.45, 29.34, 29.31 (2C), 29.29, 29.18, 26.68, 25.94. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3350, 3244, 2922, 2661, 2536, 1641, 1585, 1469, 1361, 1166, 1136, 1114, 1087, 1006, 954, 893, 867, 821, 719, 626, 567. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_3$   $m/z$ : 357.3117  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . found: 357.3124.

[0062] 实施例6

[0063] (2R,3S,4S)-4-氨基-2-(10-(环戊基甲氧基)癸基)吡咯烷-3-醇 (P18)



[0065] 所用烯烃试剂为((壬-8-烯-1-基氧基)甲基)环戊烷。产物为白色固体,产率: 37%,  $[\alpha]_D^{25} +16.4$  ( $c = 0.1, \text{MeOH}$ ),  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}, 600\text{MHz}$ )  $\delta$  (ppm) : 3.50-3.54 (m, 1H), 3.32 (t,  $J=6.6\text{Hz}$ , 2H), 3.19 (d,  $J=7.1\text{Hz}$ , 2H), 3.03-3.13 (m, 2H), 2.78 (q,  $J=5.8\text{Hz}$ , 1H), 2.50 (dd,  $J=11.0, 7.5\text{Hz}$ , 1H), 2.03 (dq,  $J=14.9, 7.5\text{Hz}$ , 1H), 1.60-1.67 (m, 2H), 1.49 (dddd,  $J=27.3, 20.0, 10.1, 4.9\text{Hz}$ , 7H), 1.18-1.39 (m, 15H), 1.15 (dq,  $J=14.2, 7.2\text{Hz}$ , 2H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}, 150\text{MHz}$ )  $\delta$  (ppm) : 75.93, 75.20, 70.69, 64.58, 53.39, 50.70, 39.31, 33.66, 29.44, 29.35, 29.34, 29.29, 29.28, 29.24, 29.18 (2C), 26.66, 25.90, 25.00 (2C). IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) : 3336, 3255, 2920, 2850, 2796, 2546, 1558, 1469, 1373, 1116, 1078, 1008, 964, 914, 875, 813, 759, 719, 665, 634. HRMS (ESI) calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_2$   $m/z$ : 341.3168  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . found: 341.3176.

[0066] 注:本申请实施例的化合物结构进行NMR测定时,使用的是 $\text{CD}_3\text{OD}$ ,P3中的4个活泼氢与 $\text{CD}_3\text{OD}$ 之间发生了交换,因此没有检测到4个活泼氢的化学位移信号;P17中的2个活泼氢与 $\text{CD}_3\text{OD}$ 之间发生了交换,因此没有检测到2个活泼氢的化学位移信号。

[0067] 本发明化合物的药理学试验及结果如下:

[0068] 实验例1:本发明化合物对SphK1和SphK2的抑制作用检测

[0069] 实验方法:首先将化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18用DMSO配制成10mM的母液,超声加速溶解,后用DMSO及激酶缓冲液进行梯度稀释,保证DMSO的终浓度小于1%。在白色的酶标板上,每孔加1uL的药物,然后加入10uLAKT1酶(100ng/孔)混匀,再加5uL的Crosstide底物,后加入34uL的分析缓冲液(pH7.4,40mMTris,10mM  $\text{MgCl}_2$ ,0.1mg/mL BSA,1mM DTT,10uM ATP),混匀,在30℃下孵育40分钟,然后加入ATP检测液50uL,室温反应5分钟,立即在在酶标仪上检测化学发光信号,将数值代入如下公式,计算活性百分率:

[0070]  $\% \text{activity} = [(\text{Lu药物}-\text{Lu本底}) / (\text{Lu酶}-\text{Lu本底})] \times 100\%$

[0071] 用GraphpadPrism5软件处理,计算出化合物的 $\text{IC}_{50}$ 值。

[0072] 实验结果

[0073] 1、初步筛选结果

[0074] 表1化合物P1-P18 (10uM) 对SphK1和SphK2抑制率

编号	SphK1 (%inhibition)	SphK2 (%inhibition)
P3	55	0
P4	58	0
P5	69	1
P7	61	2
P17	95	9
P18	78	0
PF-543	99	56

[0076] 初步的筛选结果表明,化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18在浓度为10 $\mu$ M时对SphK1均具有一定的抑制效果,其中化合物P17的抑制率高达95%。初筛的所有化合物对SphK2几乎不具有抑制作用,初步测试结果说明,部分化合物对SphK1具有较好的选择性。继续将化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18进行SphK1和SphK2的IC<sub>50</sub>值测试。

[0077] 2、化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18对SphK1和SphK2的IC<sub>50</sub>值

[0078] 表2化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18对SphK1和SphK2的IC<sub>50</sub>值

编号	SphK1 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	SphK2 IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
P3	13.8 $\pm$ 0.7	>100
P4	9.7 $\pm$ 0.3	>100
P5	4.9 $\pm$ 0.3	>100
P7	6.9 $\pm$ 0.7	>100
P17	0.8 $\pm$ 0.1	>100
P18	5.9 $\pm$ 0.5	>100
PF-543	50 nM $\pm$ 0.1	4.7 $\mu$ M $\pm$ 0.6

[0080] 化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18对SphK1和SphK2的IC<sub>50</sub>值表明,化合物P3的IC<sub>50</sub>值大于10 $\mu$ M,P4,P5,P7,P17,P18的IC<sub>50</sub>值均小于10 $\mu$ M,是进行深入药理研究的理想化合物。特别的,P17的IC<sub>50</sub>值为0.8 $\mu$ M,其SphK2/SphK1高于125,是目前发现的已知选择性最好的SphK1拮抗剂之一。

[0081] 实验例2:本发明化合物抗肿瘤活性研究

[0082] 2.1.实验材料

[0083] 化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18分别用二甲基亚砜(DMSO,终浓度0.4%)溶解,用含15%胎牛血清RPMI-1640培养基配制成1mg/mL备用,用时稀释成所需浓度。人肺腺癌(A549)、人结肠癌(LOVO)、人黑色素瘤细胞(A375)、人肝癌(HepG2)和人食管癌(TE-1)细胞系,均购买于中国科学院细胞库,使用含15%胎牛血清的DMEM(HighGlucose)培养基,置于37 $^{\circ}$ C,5%的CO<sub>2</sub>培养箱内培养。

[0084] 2.2抗肿瘤活性实验

[0085] 2.2.1MTT配制方法

[0086] 5mg/mL的MTT溶液配制:称取MTT粉末500.0mg,溶于温的100mLPBS中,用0.22 $\mu$ m孔径的微孔滤膜过滤得滤液,小剂量分装于高压灭菌后的EP管中,置于-20 $^{\circ}$ C下冷冻避光保存。

## [0087] 2.2.2细胞培养及实验方法

[0088] 将保存有肿瘤细胞的冻存管从液氮中取出,迅速放入37℃恒温箱中,不停摇动,直到融化。用75%酒精擦拭冻存管盖边缘后,吸取细胞悬液转入10mL离心管中,补加5mL培养基。低速离心(25℃,3000r/min,5min),弃上清,加培养基再重复离心清洗一次。加适量培养基稀释后,用吸管将细胞吹散制成悬液,转入培养瓶中,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养。次日更换培养液,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中继续培养。

[0089] 人肺腺癌(A549)、人结肠癌(LOVO)、人黑色素瘤细胞(A375)、人肝癌(HepG2)和人食管癌(TE-1)细胞均为贴壁细胞,根据肿瘤细胞生长速率,将处于对数生长期的贴壁肿瘤细胞洗涤,经0.25%的EDTA胰酶消化,调整细胞数为1×10<sup>5</sup>/mL接种于96孔板内,每孔100μL,37℃下于CO<sub>2</sub>孵箱内培养,24h后给药。给药组加入不同浓度药物(化合物P1-P17),每个药物设置5个剂量组,分别为100.00、10.00、1.00、0.10、0.01μM/L,每个浓度设三个复孔。设置空白对照、DMSO(0.8%)溶剂对照和顺铂阳性对照。在37℃ CO<sub>2</sub>培养箱内培养48h后,用MTT法测定OD值,计算细胞抑制率。

[0090] 2.2.3细胞IC<sub>50</sub>值的计算

[0091] 人肺腺癌(A549)、人结肠癌(LOVO)、人黑色素瘤细胞(A375)、人肝癌(HepG2)和人食管癌(TE-1)细胞培养48h后,终止,然后每个孔中加入10μL0.5%MTT溶液放置于CO<sub>2</sub>培养箱中,4h后,除去每个孔中的液体,然后再分别加入0.2mL的DMSO溶液,在摇床上低频充分振荡,使蓝紫色结晶的甲瓖充分溶解,置于酶标仪中,于490nm波长处记录OD值,计算不同浓度的三个平行孔的平均值OD值,根据平均值计算不同浓度下的每一种受试药物的细胞抑制率以及IC<sub>50</sub>值(见表3)。

[0092] 抑制率(%) = [1 - 供试品OD值/阴性对照组OD值] × 100%

## [0093] 2.2.4结果判断

[0094] 中药新药临床前研究指导原则表明,天然产物IC<sub>50</sub> ≤ 30μmol/mL时认为有一定抑制作用;合成药物IC<sub>50</sub> ≤ 10μmol/mL时认为有一定抑制作用。

[0095] 表3化合物抗癌细胞增殖的IC<sub>50</sub>值

compound	IC <sub>50</sub> (μM)				
	A549	LOVO	A375	HepG2	TE-1
<b>P3</b>	3.02±0.18	4.42±0.29	3.7±0.25	0.3±0.02	4.37±0.62
<b>P4</b>	7.68±0.66	>10	2.1±0.11	>10	>10
[0096] <b>P5</b>	0.77±0.07	1.96±0.16	3.2±0.81	1.52±0.12	>10
<b>P7</b>	1.68±0.12	1.4±0.11	2.6±0.42	6.44±0.53	>10
<b>P17</b>	5.68±0.55	0.83±0.05	0.70±0.09	1.46±0.12	>10
<b>P18</b>	5.71±0.55	0.73±0.05	0.75±0.07	1.51±0.05	>10
<b>Cisplatin</b>	0.49±0.05	0.72±0.06	1.3±0.11	1.21±0.16	>10

## [0097] 2.3结果

[0098] 抗肿瘤细胞增殖活性表明,化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18对人肺腺癌(A549)、人黑色素瘤细胞(A375)的IC<sub>50</sub>值均小于10μM,表明化合物P3,P4,P5,P7,P17,P18对人肺腺癌(A549)、人黑色素瘤细胞(A375)的抑制效果较好;化合物P3,P5,P7,P17,P18对人结肠癌(LOVO)、人肝癌(HepG2)的IC<sub>50</sub>值均小于10μM,表明化合物P3,P5,P7,P17,P18对人结肠癌(LOVO)、人肝癌(HepG2)的抑制效果较好;化合物P3对人食管癌(TE-1)的IC<sub>50</sub>值小于10μM,表

明化合物P3对人食管癌 (TE-1) 的抑制效果较好。