

芬戈莫德类似物的设计合成及抗肿瘤活性研究

陈 锴, 马 宣, 严 宁, 解晓霞, 姚 雷*

烟台大学 分子药理和药物评价教育部重点实验室, 新型制剂与生物技术药物研究山东省高校协同创新中心, 山东 烟台 264005

摘要: 目的 对基于由冬虫夏草提取物多球壳菌素 ISP-1 结构改造而得到的药物芬戈莫德进行结构修饰, 并初步考察其类似物的抗肿瘤活性。方法 以不同的取代苯为原料, 按照本课题组开发的芬戈莫德合成路线, 经过傅克酰基化、亚硝基 S_N2 取代反应、羰基还原、双亨利反应和硝基还原反应制得目标化合物。通过 MTT 方法, 检测化合物对 3 种人类肿瘤细胞 Siha、PC-3 和 MKN-45 的抗肿瘤活性。结果 制得芬戈莫德 (1) 及其 18 个类似物 (2~19), 化合物 10、11、12 具有与芬戈莫德相当的抗肿瘤活性。结论 化合物 2~10 及 12~19 为未见文献报道的新化合物, 为基于 1-磷酸鞘氨醇 (S1P) 受体拮抗作用的抗肿瘤药物的发现提供依据。

关键词: 冬虫夏草; 多球壳菌素; 芬戈莫德; 结构修饰; 抗肿瘤; 1-磷酸鞘氨醇受体

中图分类号: R284.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2016)08-1282-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.006

Design and synthesis of fingolimod analogues as well as evaluation on their antitumor activity

CHEN Kai, MA Xuan, YAN Ning, XIE Xiao-xia, YAO Lei

Key Laboratory of Molecular Pharmacology and Drug Evaluation, Ministry of Education, and Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs in Universities of Shandong, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: Objective To modify the structure of fingolimod which was derived from the extract of medicinal plant *Cordyceps* ISP-1 and evaluate the antitumor activity of the derivatives. **Methods** According to the synthesis way developed before, target compounds were synthesized by using suitable substituted benzenes, through chemical reactions such as Friedel-Crafts reaction, Nitros-substitution reaction, Carbonyl reduction, Henry reaction, and Nitro-reduction. The cytotoxicities to three cell lines, Siha, PC-3, and MKN-45, were evaluated through MTT method. **Results** Fingolimod and 18 fingolimod analogues were synthesized, and compounds 10—12 had the equal antitumor activities like fingolimod. **Conclusion** The compounds 2—10, 12—19 are new compounds not reported before. This study provides the foundation for finding antitumor compounds with S1PRs inhibiting effect.

Key words: *Cordyceps*; ISP-1; fingolimod; structural modification; antitumor; sphingosine 1-phosphate receptors (S1PRs)

冬虫夏草 *Cordyceps* 是中国特产名贵中药, 它是冬虫夏草菌 *Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc. 寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上形成的子座及幼虫尸体的干燥复合体, 为真菌门 (Eumycota) 核菌纲 (Pyrenometes) 麦角菌目 (Claricipiales) 麦角菌科 (Clavicipitaceae) 虫草属 *Cordyceps* (Fr.) Link 的虫生真菌。它的主要产地是我国青海、西藏、云南、四川。自古以来便被视为名贵的强壮滋补药材, 具有益精气、补虚损、止咳化痰的功效, 可用于治疗

肺结核、盗汗、腰酸背痛、遗精等病症, 具有免疫调节、抗肿瘤、降血糖等作用^[1]。20 世纪 80 年代, 日本科学家从冬虫夏草分离出多球壳菌素 (ISP-1, 图 1)。ISP-1 具有较强的免疫抑制作用, 但存在毒性大、溶解性差、成药性差的缺点。因此, 藤田小组以 ISP-1 为先导化合物, 经过进一步的结构优化, 获得了成药性更好、更安全的化合物芬戈莫德 (1, 图 1), 并于 2010 年被 FDA 批准成为首个口服的用于治疗复发-缓解型多发性硬化症 [MS (EI)] 的药

收稿日期: 2016-01-20

基金项目: 烟台大学研究生科技创新基金资助 (01082)

作者简介: 陈 锴, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为活性天然产物结构修饰。E-mail: 15053532243@163.com

*通信作者 姚 雷, 博士, 教授, 研究方向为活性天然产物全合成及结构修饰。E-mail: yaoleiytu@163.com

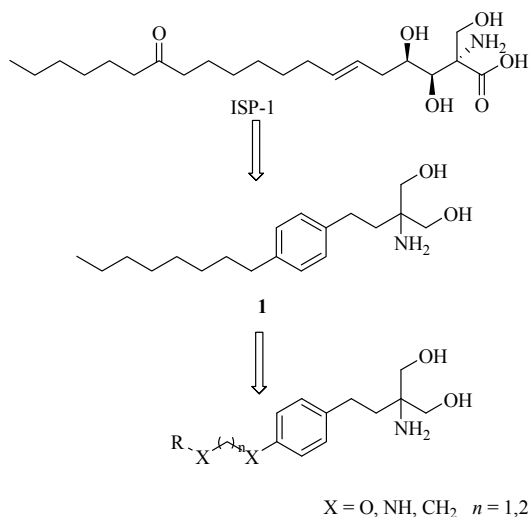


图 1 芬戈莫德 (1) 和多球壳菌素 (ISP-1) 结构

Fig. 1 Structures of fingolimod (1) and ISP-1

物^[2-3]。作为免疫抑制剂, 芬戈莫德可以在体内经过鞘氨醇激酶 2 (SK2) 磷酸化生成 (S)-FTY720-P, 后者作用于 G 偶联蛋白鞘氨醇磷酸酯受体 S1P_{1,3,4,5}^[4], 从而诱导淋巴细胞归巢或凋亡, 最终起到免疫抑制作用^[5]。最近研究表明, 芬戈莫德在体外可以抑制各种肿瘤细胞的生长转移, 比如结肠癌细胞、前列腺癌细胞、乳腺癌细胞等^[6-8]。芬戈莫德的抗癌机制并不十分明确, 其可能的作用机制是阻断 1-磷酸鞘氨醇 (S1P) 信号转导通路。芬戈莫德对 S1P 信号转导通路的作用表现在两方面: 一方面芬戈莫德对 S1P 受体的拮抗作用, 引起 S1P 受体的内化从而使细胞膜表面上 S1P 受体水平下降^[4]; 另一方面芬戈莫德可以抑制鞘氨醇激酶的活性^[9-10], 从而抑制 S1P 的生成。S1P 信号转导通路与细胞增殖、转移密切相关, 因此芬戈莫德可通过阻断 S1P 信号转导通路抑制癌细胞的生长转移。

研究发现, 当药物浓度在 5~20 μmol/L 时, 芬戈莫德才表现出抗肿瘤作用。因此, 本实验研

究目的为通过结构改造的方法, 以期得到抗肿瘤效果更好的芬戈莫德类似物。基于 S1P 受体晶体结构^[11], 芬戈莫德与 S1P 受体的结合方式: 配体的氨基部分作为头, 与受体口袋的一部分氨基酸残基形成氢键产生氢键作用; 配体的苯环部分和烷基侧链与受体口袋的一部分氨基酸残基产生较弱的疏水键作用。因此通过改造烷基侧链部分结构, 如引入适当的杂原子, 可以增加药物与受体之间的氢键作用, 从而提高化合物对受体的作用强度以及选择性。

以不同的取代基苯为原料, 通过傅克酰基化反应、S_N2 取代反应、羰基还原、双亨利反应, 最终经过催化氢化制得芬戈莫德类似物。本研究制得芬戈莫德 (1) 及其 18 个类似物 (2~19), 其中化合物 2~10 及 12~19 为未见文献报道的新化合物。根据侧链不同化合物分为 3 类, A 类 (2~8): 此类化合物在烷基疏水侧链引入了酯/酰胺键以增加极性杂原子; B 类 (9~12): 此类化合物以烷氧基或苯氧基侧链代替正辛基疏水侧链。化合物 10~12 具有与芬戈莫德相当的抗肿瘤活性, 化合物 9 没有达到预期的活性效果; C 类 (13~19): 此类化合物在烷基疏水侧链引入了酯键的同时在苯位引入了氧原子以增加侧链极性。A 和 C 类化合物均没有达到预期的活性效果。

1 仪器与材料

XT4A 型显微熔点仪, 天津市天光光学仪器有限公司; Bruker ACF-400 型核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; 柱色谱和薄层色谱所用硅胶由青岛海洋化工有限公司生产; 其他溶剂和试剂均为市售工业纯或化学纯。实验所用的肿瘤细胞全部购买于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

2 目标化合物合成

课题组前期开发芬戈莫德合成路线^[12] (图 2),

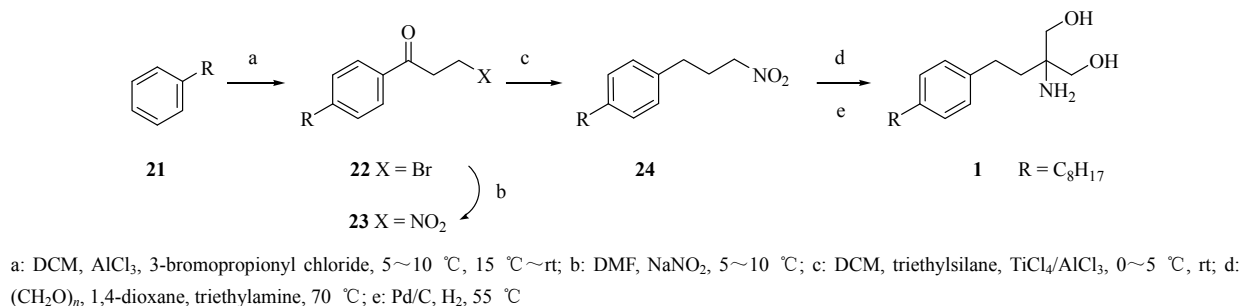


图 2 目标化合物的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of target compound

以正辛基苯为原料,通过傅克酰基化反应、 S_N2 取代反应、羰基还原、双亨利反应,最终经过催化氢化制得芬戈莫德(1)。

参考此合成路线,合成 A、B、C 3 类芬戈莫德类似物。

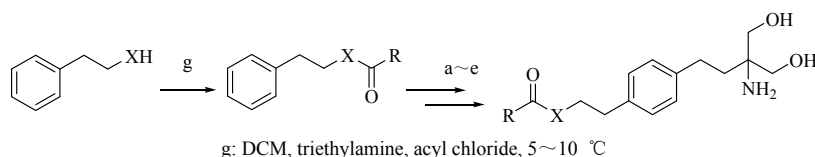
2.1 苯乙醇酯或苯乙胺酰胺类(A类)芬戈莫德类似物的合成

以苯乙醇或苯乙胺为原料,通过酰化反应、傅

克酰基化反应、 S_N2 取代反应、羰基还原、双亨利反应,最后经过催化氢化制得苯乙醇酯或苯乙胺酰胺类芬戈莫德类似物 2~8。合成路线见图 3。

2.2 苯醚类(B类)芬戈莫德类似物的合成

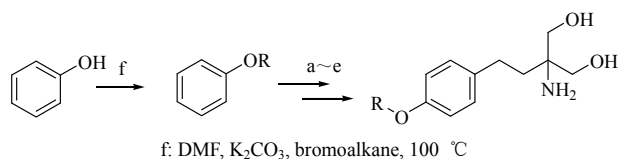
以苯酚为原料,通过威廉姆森成醚反应、傅克酰基化反应、 S_N2 取代反应、羰基还原、双亨利反应,最后经过催化氢化制得苯醚类芬戈莫德类似物 9~12。合成路线如图 4 所示。



化合物	X	R	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		
			PC-3	MKN-45	Siha
1	—	—	13.22 ± 0.29	13.26 ± 0.86	10.58 ± 1.28
2	O	CH ₃	>30	>30	>30
3	O	C ₂ H ₅	>30	>30	>30
4	NH	CH ₃	>30	>30	>30
5	NH	C ₂ H ₅	>30	>30	>30
6	NH	C ₃ H ₇	>30	>30	>30
7	NH	C ₆ H ₁₃	>30	>30	>30
8	NH	C ₇ H ₁₅	>30	>30	>30

图 3 苯乙醇酯或苯乙胺酰胺类芬戈莫德类似物的合成

Fig. 3 Synthesis of fingolimod analogues of phenylethyl ether and phenylethylamine amide



化合物	R	$IC_{50}/(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$		
		PC-3	MKN-45	Siha
9	C ₆ H ₅	>30	>30	>30
10	C ₆ H ₁₃	17.01 ± 0.98	20.11 ± 1.00	17.71 ± 1.19
11	C ₇ H ₁₅	13.51 ± 0.77	13.07 ± 1.61	10.57 ± 0.91
12	C ₈ H ₁₇	18.33 ± 0.30	17.66 ± 1.59	14.98 ± 0.47

图 4 苯醚类芬戈莫德类似物的合成

Fig. 4 Synthesis of fingolimod analogues of phenyl ether

2.3 2-苯氧基乙醇类(C类)芬戈莫德类似物的合成

以 2-苯氧基乙醇为原料,通过傅克酰基化反应、 S_N2 取代反应、羰基还原、双亨利反应,最后经过催化氢化制得化合物 13。

以 2-苯氧基乙醇为原料,通过傅克酰基化反应、 S_N2 取代反应、羰基还原得到关键中间体 20,继而经过与烷基酸的酯化反应、双亨利反应,最后经过催化氢化制得 2-苯氧基乙醇类芬戈莫德类似物

13~19。合成路线见图 5。

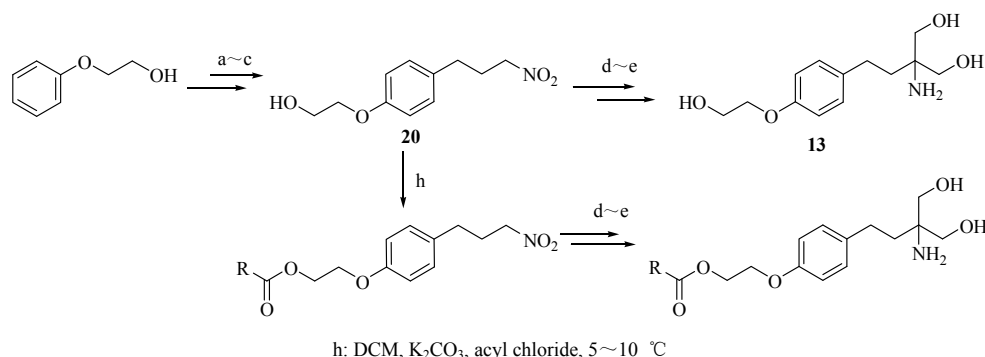
3 目标化合物的活性评价

采用 MTT 法,将对数生长期的 Siha、PC-3 和 MKN-45 细胞用培养基稀释至 $4 \times 10^4/\text{mL}$,分别接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL ,孵育过夜后除去培养液,每孔加入样品 100 μL ,每组均设 3 个复孔。同时设空白组,空白组设 3 个复孔,且每孔加入含 0.1% DMSO 的 RPMI 1640 100 μL 。所有组在 37 °C、5% 的二氧化碳培养箱中培养 72 h 后,每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 100 μL ,继续置于培养箱中培养 4 h 后,小心吸弃每孔中液体,再加入 DMSO 150 μL ,将培养板置于水平摇床上振摇 10 min,于酶标仪上检测吸光度(A)值,检测波长为 570 nm。计算得出细胞抑制率后经软件计算 IC_{50} 值,结果见图 3~5。

4 结构鉴定与讨论

4.1 结构鉴定

化合物 1 (芬戈莫德): 白色粉末,产率 9.2%, EI-MS m/z : 308.27 $[M+H]^+$ 。¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ : 7.08 (4H, s, Ar-H), 3.62 (2H, s, -CH₂OH), 3.54 (2H, s, -CH₂OH), 2.52~2.60 (4H, m, 2 ×



化合物	R	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)		
		PC-3	MKN-45	Siha
13	H	>30	>30	>30
14	CH ₃	>30	>30	>30
15	C ₂ H ₅	>30	>30	>30
16	C ₃ H ₇	>30	>30	>30
17	C ₄ H ₉	>30	>30	>30
18	C ₅ H ₁₁	>30	>30	>30
19	C ₇ H ₁₅	>30	>30	>30

图5 2-苯氧基乙醇类芬戈莫德类似物的合成

Fig. 5 Synthesis of fingolimod analogues of 2-phenoxylethanol

Ar-CH₂-), 1.69~1.70 (2H, m, Ar-CH₂CH₂-C-NH₂), 1.57 (2H, m, ArCH₂CH₂C₅H₁₀), 1.20~1.25 (10H, m, -C₅H₁₀CH₃), 0.87 (3H, t, *J* = 6.0 Hz, -CH₂CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 139.6, 131.1, 71.5, 54.8, 36.9, 35.8, 32.5, 32.4, 30.3, 30.0, 29.8, 28.5, 23.1, 14.0.

化合物 2: 微黄色固体, 产率 8.9%, EI-MS *m/z*: 281.39 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.24~7.02 (4H, m, Ar-H), 4.24 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, ArCH₂CH₂-O-), 3.70~3.44 (4H, m, 2 × NH₂-C-CH₂OH), 2.89 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, ArCH₂CH₂-O-), 2.63 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.1 (3H, s, O=C-CH₃), 1.80~1.65 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 171.6, 140.2, 136.3, 130.5, 129.2, 69.7, 64.9, 56.5, 36.1, 29.3, 28.8, 20.6.

化合物 3: 白色固体, 产率 8.6%, EI-MS *m/z*: 296.29 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.20~7.03 (4H, m, Ar-H), 4.25 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, ArCH₂CH₂-O-), 3.65~3.44 (4H, m, NH₂-C-CH₂OH), 2.90 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, ArCH₂CH₂-O-), 2.63 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.41 (2H, s, O=C-CH₂CH₃), 1.89 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.25 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, O=C-CH₂CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 171.5, 140.2, 136.3, 130.5, 129.2, 69.7, 64.9, 56.5,

36.1, 29.3, 28.8, 27.2, 8.9.

化合物 4: 白色油状物, 产率 6.4%, EI-MS *m/z*: 281.26 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.17 (4H, m, Ar-H), 3.70 (4H, s, 2 × NH₂-C-CH₂OH), 3.37 (2H, m, ArCH₂CH₂-NH-), 2.79 (2H, t, *J* = 6.9 Hz, ArCH₂CH₂-NH-), 2.69~2.60 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.99~1.88 (5H, m, O=C-CH₃, ArCH₂CH₂-C-NH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 172.2, 141.3, 138.4, 130.7, 128.7, 69.7, 55.6, 41.8, 35.8, 29.4, 28.8, 22.4.

化合物 5: 白色油状物, 产率 7.9%, EI-MS *m/z*: 295.26 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.19 (4H, m, Ar-H), 3.70 (4H, s, 2 × NH₂-C-CH₂OH), 3.38 (2H, m, ArCH₂CH₂-NH-), 2.79 (2H, m, ArCH₂CH₂-NH-), 2.70~2.60 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.25 (2H, m, O=CCH₂), 2.00~1.89 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.04 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, O=CCH₂CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 172.2, 141.3, 138.4, 130.7, 128.8, 69.7, 55.6, 41.9, 35.8, 29.7, 29.3, 28.8, 10.1.

化合物 6: 白色油状物, 产率 10.9%, EI-MS *m/z*: 310.46 [M+H]⁺. ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.19 (4H, m, Ar-H), 3.70 (4H, s, 2 × NH₂-C-CH₂OH), 3.38 (2H, m, ArCH₂CH₂-NH-), 2.79 (2H, m, ArCH₂CH₂-

NH-), 2.70~2.60 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.15 (2H, m, O=CCH₂), 2.00~1.89 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.34 (2H, m, O=CCH₂CH₂CH₃), 0.91 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, O=CCH₂CH₂CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ : 172.2, 141.3, 138.4, 130.7, 128.7, 69.7, 55.6, 41.8, 38.7, 35.8, 29.7, 29.3, 28.8, 19.1, 13.1。

化合物 7: 白色油状物, 产率 8.9%, EI-MS m/z : 351.44 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.23~7.11 (4H, m, Ar-H), 3.77~3.64 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 3.39 (2H, m, ArCH₂CH₂-NH), 2.79 (2H, m, ArCH₂CH₂-NH-), 2.70~2.60 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.15 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, O=C-CH₂), 2.00~1.89 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.67~1.49 (2H, m, O=CCH₂CH₂), 1.41~1.22 (6H, m, O=CCH₂CH₂C₃H₆CH₃), 0.91 (3H, t, $J = 6.7$ Hz, O=CCH₂CH₂C₃H₆CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ : 172.2, 141.2, 138.4, 130.7, 128.8, 69.7, 55.6, 41.8, 38.7, 36.3, 35.8, 31.1, 29.7, 28.5, 28.3, 25.6, 22.7, 14.1。

化合物 8: 白色油状物, 产率 13.9%, EI-MS m/z : 365.38 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.16 (4H, m, Ar-H), 3.77~3.54 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 3.39~3.35 (2H, m, ArCH₂CH₂-NH), 2.77 (2H, m, ArCH₂CH₂-NH-), 2.65 (2H, s, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.15 (2H, m, O=C-CH₂), 1.92 (2H, s, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.59 (2H, m, O=CCH₂CH₂), 1.31 (8H, m, O=CCH₂CH₂C₄H₈CH₃), 0.90 (3H, t, $J = 6.1$ Hz, O=CCH₂CH₂C₄H₈CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ : 172.2, 141.2, 138.4, 130.7, 128.8, 69.7, 55.6, 41.9, 38.7, 36.3, 35.8, 31.18, 29.7, 28.6, 28.4, 25.6, 22.7, 14.2。

化合物 9: 白色油状物, 产率 9.6%, EI-MS m/z : 288.34 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.36~7.29 (2H, m, H-ArCH₂CH₂-C-NH₂), 7.26 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, Ar-H), 7.09 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, Ar-H), 6.98~6.86 (4H, m, O-Ar-H), 3.81~3.65 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.76~2.59 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.05~1.88 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ : 156.9, 154.7, 136.0, 128.9, 128.4, 123.4, 120.8, 119.1, 66.6, 55.6, 29.7, 28.8。

化合物 10: 白色固体, 产率 9.1%, EI-MS m/z : 296.41 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.08

(2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.86 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, O-Ar-H), 3.89 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, OCH₂), 3.54 (4H, s, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.53 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.16 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.76 (2H, m, OCH₂CH₂), 1.42 (2H, m, OCH₂CH₂CH₂), 1.30 (4H, m, OCH₂CH₂CH₂C₂H₄CH₃), 0.89 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, OCH₂CH₂CH₂C₂H₄CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 157.6, 134.2, 129.9, 116.1, 69.6, 66.7, 55.5, 31.7, 29.7, 28.8, 26.9, 23.1, 14.0。

化合物 11: 白色固体, 产率 9.4%, EI-MS m/z : 310.43 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.08 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.86 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, O-Ar-H), 3.89 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, OCH₂), 3.54 (4H, s, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.53 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.16 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.76 (2H, m, OCH₂CH₂), 1.42 (2H, m, OCH₂CH₂CH₂), 1.30 (6H, m, OCH₂CH₂CH₂C₃H₆CH₃), 0.89 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, OCH₂CH₂CH₂C₃H₆CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ : 157.6, 134.1, 130.1, 116.1, 69.5, 66.7, 55.6, 31.7, 29.7, 29.1, 28.8, 23.1, 14.0。

化合物 12: 白色固体, 产率 9.8%, EI-MS m/z : 324.45 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.08 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, Ar-H), 6.86 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, O-Ar-H), 3.89 (2H, t, $J = 6.6$ Hz, OCH₂), 3.54 (4H, s, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.53 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.16 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.76 (2H, m, OCH₂CH₂), 1.42 (2H, m, OCH₂CH₂CH₂), 1.30 (8H, m, OCH₂CH₂CH₂C₄H₈CH₃), 0.89 (3H, t, $J = 6.4$ Hz, OCH₂CH₂CH₂C₄H₈CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ : 157.6, 134.1, 130.2, 116.2, 69.5, 66.7, 55.6, 31.7, 29.7, 29.1, 28.8, 26.5, 23.1, 14.1。

化合物 13: 微黄色固体, 产率 9.1%, EI-MS m/z : 256.25 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.17 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 6.88 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, O-Ar-H), 4.06~3.98 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂OH), 3.89~3.83 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂OH), 3.77~3.69 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.66~2.56 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.98~1.88 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ : 157.6, 134.0, 130.2, 116.2, 69.8, 66.7, 60.8, 55.5, 29.7, 28.8。

化合物 14: 微黄色固体, 产率 9.1%, EI-MS m/z : 298.27 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ : 7.17 (2H, d, $J = 8.6$ Hz, Ar-H), 6.88 (2H, d, $J = 8.6$ Hz,

O-Ar-H), 4.41 (2H, m, Ar-O-CH₂CH₂O), 4.21 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 3.74~3.64 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.66~2.56 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.15 (3H, s, O=C-CH₃) 1.98~1.88 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 171.7, 157.6, 134.2, 130.2, 116.1, 67.4, 66.7, 60.2, 55.5, 29.7, 28.8, 20.6。

化合物 15: 微黄色固体, 产率 9.4%, EI-MS *m/z*: 312.27 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.23~7.07 (2H, m, Ar-H), 6.89~6.79 (2H, m, O-Ar-H), 4.39 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 4.16 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 3.81~3.59 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.68~2.55 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.37 (2H, q, *J* = 7.6 Hz, O=C-CH₂CH₃), 2.00~1.87 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.11 (3H, t, *J* = 7.6 Hz, O=C-CH₂CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 175.9, 157.6, 134.0, 130.2, 116.1, 67.3, 66.7, 60.8, 55.6, 29.7, 28.8, 27.1, 8.9。

化合物 16: 微黄色固体, 产率 9.1%, EI-MS *m/z*: 326.21 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.22~7.10 (2H, m, Ar-H), 6.95~6.69 (2H, m, O-Ar-H), 4.46~4.23 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 4.22~4.02 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 3.80~3.57 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.61 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.34 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, O=C-CH₂CH₂), 1.96~1.80 (4H, m, O=C-CH₂CH₂, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 0.99 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, O=C-CH₂CH₂CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 174.0, 157.6, 134.1, 130.2, 116.1, 67.3, 66.7, 60.8, 55.5, 34.92, 29.7, 28.8, 18.7, 13.5。

化合物 17: 微黄色固体, 产率 8.9%, EI-MS *m/z*: 340.27 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.22~7.10 (2H, m, Ar-H), 6.95~6.69 (2H, m, O-Ar-H), 4.46~4.23 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 4.22~4.02 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 3.80~3.57 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.61 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.34 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, COCH₂), 1.96~1.80 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.60 (2H, m, O=CCH₂CH₂), 1.30 (2H, m, O=CCH₂CH₂CH₂CH₃) 0.89 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, O=CCH₂CH₂CH₂CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 174.2, 157.6, 134.1, 130.2, 116.1, 67.3, 66.7, 60.8, 55.5, 34.1, 29.7, 28.8, 26.4, 22.4, 14.0。

化合物 18: 微黄色固体, 产率 8.4%, EI-MS *m/z*: 355.27 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ:

7.22~7.10 (2H, m, Ar-H), 6.95~6.69 (2H, m, O-Ar-H), 4.46~4.23 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 4.22~4.02 (2H, m, Ar-OCH₂CH₂O), 3.80~3.57 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.61 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.34 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, O=C-CH₂CH₂), 1.96~1.80 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.60 (2H, m, O=CCH₂CH₂), 1.43~1.18 (4H, m, O=CCH₂CH₂C₂H₄CH₃), 0.89 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, O=CCH₂CH₂C₂H₄CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 174.2, 157.6, 134.1, 130.2, 116.1, 67.3, 66.7, 60.8, 55.5, 33.9, 30.9, 29.7, 28.8, 26.2, 23.1, 14.0。

化合物 19: 微黄色固体, 产率 8.7%, EI-MS *m/z*: 382.37 [M+H]⁺。 ¹H-NMR (400 MHz, MeOD) δ: 7.22~7.10 (2H, m, Ar-H), 6.95~6.69 (2H, m, O-Ar-H), 4.46~4.23 (2H, m, ArOCH₂CH₂O), 4.22~4.02 (2H, m, ArOCH₂CH₂O), 3.80~3.57 (4H, m, 2×NH₂-C-CH₂OH), 2.61 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 2.34 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, O=C-CH₂CH₂), 1.96~1.80 (2H, m, ArCH₂CH₂-C-NH₂), 1.60 (2H, m, COCH₂-CH₂), 1.46~1.17 (8H, m, O=CCH₂CH₂C₄H₈CH₃), 0.88 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, O=CCH₂CH₂C₄H₈CH₃); ¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ: 174.1, 157.6, 134.1, 130.2, 116.1, 67.3, 66.7, 60.8, 55.5, 33.9, 31.7, 29.3, 29.0, 28.8, 25.4, 23.1, 14.1。

4.2 抗肿瘤活性评价及构效关系

设计合成的 3 类芬戈莫德类似物中, B 类化合物中, 化合物 10、11、12 具有与芬戈莫德相当的抗肿瘤活性, 化合物 9 没有达到预期的活性效果。说明侧链中引入苯环这样的刚性结构, 不利于提高活性。侧链为体积较小的、长度为 6~8 原子的柔性基团时, 可以使化合物保持活性。A 类化合物没有达到预期的活性效果, 可能是由于 A 类化合物疏水烷基侧链上引入的酰胺或酯键, 增大了侧链的体积, 化合物难以进入 SIP 受体口袋的长腔, 使化合物与受体亲和力下降, 继而导致活性下降。C 类化合物与 A 类相比, 主要差别是 C 类化合物在烷氧基侧链中引入了酯键, 没有达到预期的活性效果。表明侧链的体积较大时, 使化合物与受体亲和力下降, 活性下降, 这与 B 类化合物结果类似。综上所述, 体积较小的柔性侧链是芬戈莫德类似物具有抗肿瘤作用的必须基团。在进一步芬戈莫德类似物侧链合成研究中, 应该选择体积较小的柔性侧链、长度为 6~8 原子

并可以在此基础上,把侧链上的碳原子以适当的杂原子代替,以提高化合物与受体的亲和力,从而提高目标化合物的抗肿瘤活性。

参考文献

- [1] 胡敏,皮惠敏,郑元梅. 冬虫夏草的化学成分及药理作用 [J]. 时珍国医国药, 2008, 9(11): 2804-2806.
- [2] Chibak A. FTY-720, immunosuppressant [J]. *Drugs Fut*, 1997, 1(22): 18-22.
- [3] Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, *et al.* Part II. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite [J]. *J Antibiot*, 1994, 47(2): 208-215.
- [4] Pitman M R, Woodcock J M, Lopez A F, *et al.* Molecular targets of FTY720 (fingolimod) [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(10): 1207-1219.
- [5] Chiba K, Matsuyuki H, Maeda Y, *et al.* Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus [J]. *Cell Mol Immunol*, 2006, 3(1): 11-19.
- [6] Lee J W, Ryu J Y, Yoon G, *et al.* Sphingosine kinase 1 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer [J]. *Cancer*, 2015, 137(1): 221-229.
- [7] Pchejetski D, Bohler T, Brizuela L, *et al.* FTY720 (fingolimod) sensitizes prostate cancer cells to radiotherapy by inhibition of sphingosine kinase-1 [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21): 8651-8661.
- [8] Pereira F V, Arruda D C, Figueiredo C R, *et al.* Figueiredo, FTY720 induces apoptosis in B16F10-NEX2 murine melanoma cells, limits metastatic development *in vivo*, and modulates the immune system [J]. *Clinics*, 2013, 68(7): 1018-1027.
- [9] Pyne S, Bittman R, Pyne N J, *et al.* Sphingosine kinase inhibitors and cancer: seeking the golden sword of Hercules [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(21): 6576-6582.
- [10] Gao Y, Gao F, Chen K, *et al.* Sphingosine kinase 1 as an anticancer therapeutic target [J]. *Drug Des Develop Ther*, 2015, 9: 3239-3245.
- [11] Hanson M A, Roth C B, Jo E, *et al.* Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor [J]. *Science*, 2012, 335(6070): 851-855.
- [12] Yan N, Chen K, Bai X, *et al.* A concise synthesis of Fingolimod: an orally available drug for treating multiple sclerosis [J]. *Chem Cent J*, 2015, 9(1): 1-4.