公告本

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：97108119

※ 申請日期：97.3.7

※IPC 分類：C07D 213/22 (2006.01)
C07C 233/16 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/64 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

神經鞘胺醇化合物、其製造方法及神經鞘磷脂酶抑制劑

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

大塚化學股份有限公司 / OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.

代表人：（中文/英文）

森明平 / MORI, AKIHEI

住居所或營業所地址：（中文/英文）

日本國大阪府大阪市中央區大手通 3 丁目 2 番 27 號

2-27, OTEDORI 3-CHOME, CHUO-KU, OSAKA-SHI, OSAKA 5400021, JAPAN

國　籍：（中文/英文）

日本 / JAPAN

三、發明人：（共 4 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 西澤麥夫 / NISHIZAWA, MUGIO
2. 今川洋 / IMAGAWA, HIROSHI
3. 櫻井純 / SAKURAI, JUN
4. 小田真隆 / ODA, MASATAKA

國　籍：（中文/英文）

1. 日本 / JAPAN
2. 日本 / JAPAN
3. 日本 / JAPAN
4. 日本 / JAPAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本、　2007/03/09、　2007-60950

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

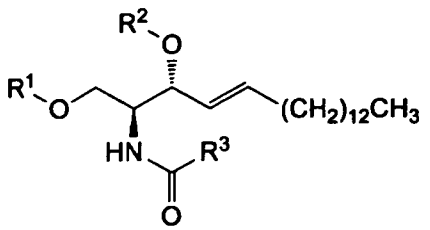
國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

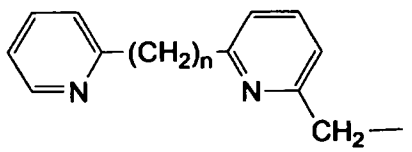
五、中文發明摘要：

本發明之目的在於提供一種具有神經鞘磷脂酶抑制活性之新穎神經鞘胺醇化合物及其製造方法。本發明之新穎神經鞘胺醇化合物係以通式(1)表示：



(1)

式中，R^1及R^2中一者為氫原子，另一者為基(G)；且



(G)

n為0或1，R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基。

六、英文發明摘要：

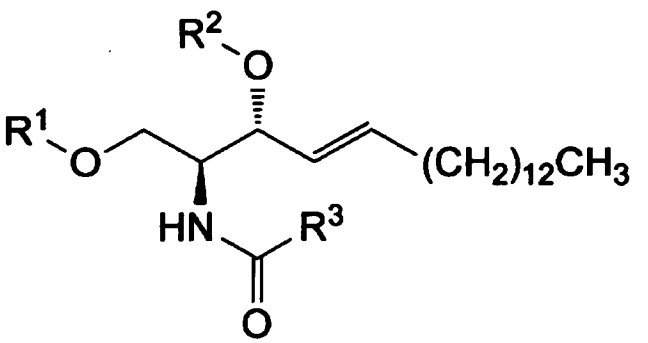
七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 無 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



(1)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

技術領域

本發明係關於一種神經鞘胺醇化合物、其製造方法以及神經鞘磷脂酶抑制劑。

【先前技術】

背景技術

神經鞘磷脂酶亦稱為神經鞘磷脂磷酸二酯酶(Sphingomyelin-phosphodiesterase)，其係以神經鞘磷脂(膜脂質(membrane lipid)的一種)作為基質的一種磷脂酶，可分解為神經醯胺與鞘膽鹼。神經鞘磷脂酶被認為在活體內之神經鞘磷脂代謝系統的控制上扮演著重要的角色。

神經鞘磷脂酶會因來自細胞外之細胞介素及激素等而活性化。此時所產生之神經醯胺於細胞凋亡、細胞增殖與分化等各種細胞機能中，被認為係作為脂質第二信使(second messenger)來完成重要的工作。此種資訊傳達通路被稱為神經鞘磷脂通路，已知透過該通路之生理活性物質有腫瘤壞死因子(TNF-α)、介白素-1β(IL-1β)等細胞介素、Fas、CD28、CD40-配位體等細胞黏著分子等。該等活體內生理活性物質被認為與炎症、細胞凋亡、免疫系統控制等各種疾病之發病及生命現象之表現關連至深，而顯示出資訊傳達通路之神經鞘磷脂通路在活體內的重要性。

對神經鞘磷脂酶具專一性之抑制劑被期待可作為對抗腦出血及腦梗塞等腦血管異常、頭部外傷、以帕金森氏症、

老人痴呆及阿茲海默症等為代表之老年期失智症等腦神經退化性疾病、糖尿病、肥胖、動脈硬化、炎症性疾病、免疫性疾病、癌症、腎病及心臟病的預防藥物及治療藥物，因而已有許多神經鞘磷脂酶抑制劑被提出(專利文獻1~4)。

然而，對於料想今後會增加之老年期失智症患者等有效之神經鞘磷脂酶抑制劑至目前仍未被開發出。

【專利文獻1】日本特開2000-86601號公報

【專利文獻2】日本特開2001-213858號公報

【專利文獻3】日本特開2004-175735號公報

【專利文獻4】日本特開2005-281209號公報

【發明內容】

發明之揭示

發明欲解決之課題

本發明之課題即是提供一種具神經鞘磷脂酶抑制活性之新穎神經鞘胺醇化合物及其製造方法。

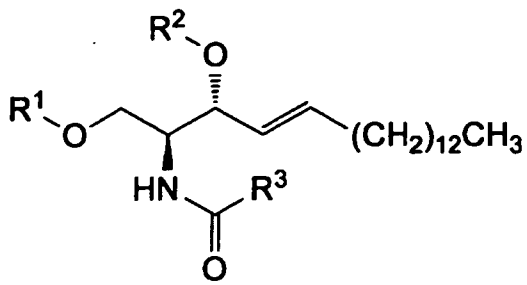
解決課題之手段

本案發明人為解決前述課題而反覆精心研討，結果發現，本案發明人首次合成出之神經鞘胺醇化合物具有優異之神經鞘磷脂酶抑制活性。本發明即是基於此種見解而終至完成者。

本發明可提供下述第1~5項之神經鞘胺醇化合物、其製造方法及含有該化合物之神經鞘磷脂酶抑制劑。

第1項　一種神經鞘胺醇化合物或其鹽，該神經鞘胺醇化合物係以通式(1)表示者：

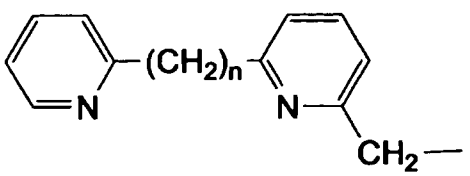
【化1】



(1)

式中，R^1及R^2中一者為氫原子，另一者為基(G)；且

【化2】



(G)

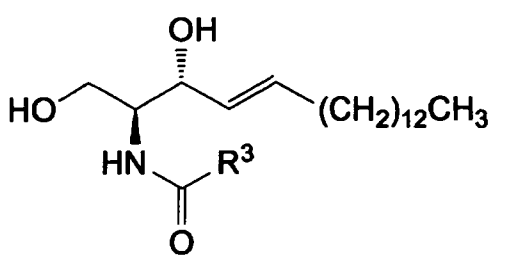
n為0或1；R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基。

第2項　如第1項之神經鞘胺醇化合物或其鹽，其中R^1表示(G)，R^2為氫原子。

第3項　如第1項之神經鞘胺醇化合物或其鹽，其中R^1為氫原子，R^2為基(G)。

第4項　一種神經鞘胺醇化合物或其鹽之製造方法，係使通式(2)所示化合物與錫氧化物化合物反應，接著使所產生之化合物與通式(3)所示雙吡啶基化合物反應，以製造通式(1)所示之神經鞘胺醇化合物；

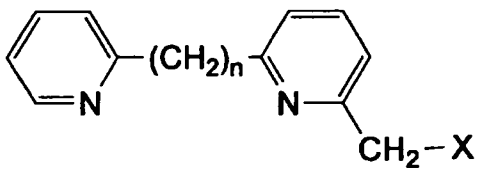
【化3】



(2)

式中，R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基；

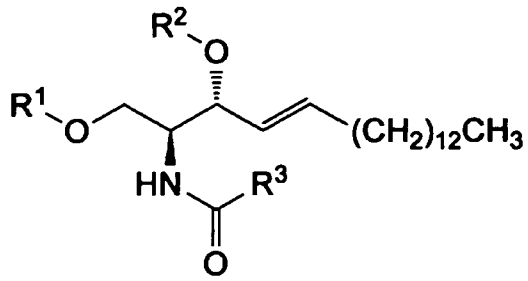
【化4】



(3)

式中，n為0或1；X為鹵素原子；

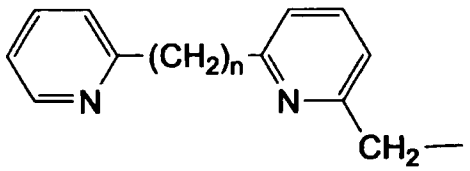
【化5】



(1)

式中，R^1及R^2中一者為氫原子，另一者為基(G)；且

【化6】

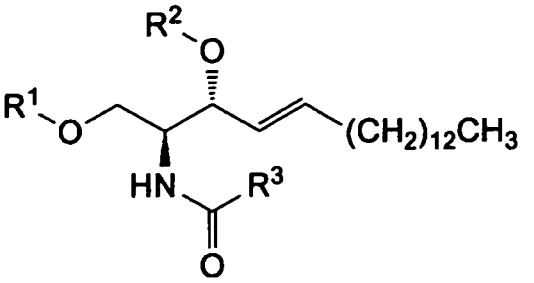


(G)

n為0或1，R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基。

第5項　一種神經鞘磷脂酶抑制劑，含有通式(1)所示神經鞘胺醇化合物或其鹽：

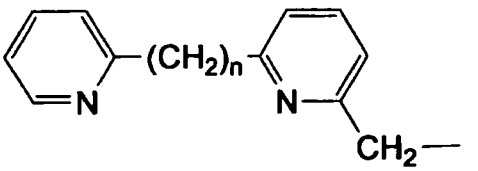
【化7】



(1)

式中，R^1及R^2中一者為氫原子，另一者為基(G)；且

【化8】

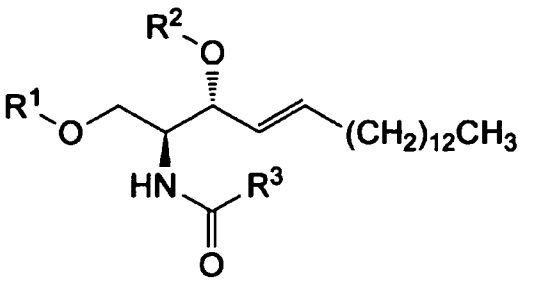


(G)

n為0或1；R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基。

本發明之神經鞘胺醇化合物係以通式(1)表示：

【化9】

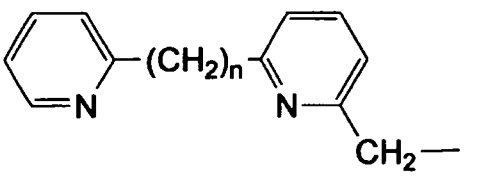


(1)

式中，R^1、R^2及R^3與前述者相同。

於通式(1)中，R^1及R^2中一者為氫原子，另一者為取代基(G)；

【化10】

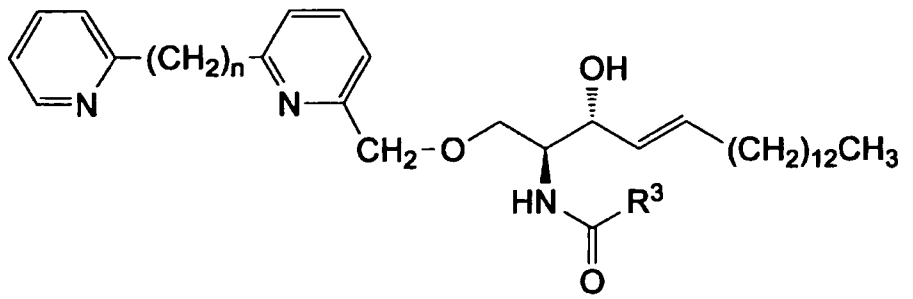


(G)

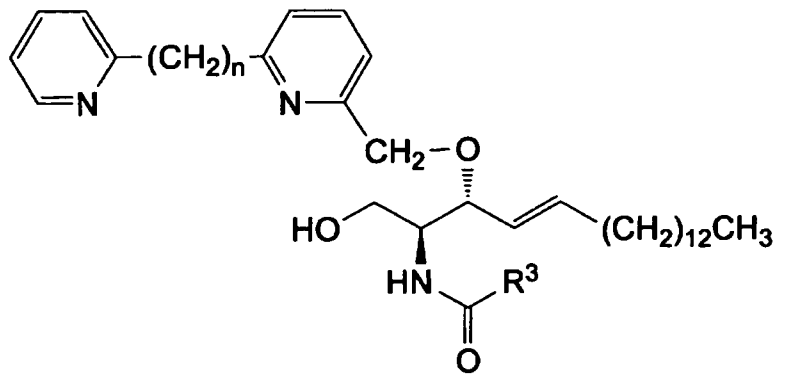
n為0或1。

通式(1)所示神經鞘胺醇化合物包含下述通式(1A)及(1B)所示之神經鞘胺醇化合物。

【化 11】



(1A)



(1B)

式中，n及R^3與前述者相同。

通式(1A)及(1B)中，以n為0之化合物較佳。

此外，以通式(1A)所示之神經鞘胺醇化合物為佳。

於通式(1)中，R^3所示C_{1-23}烷基可列舉如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、異戊基、新戊基、第三戊基、正己基、異己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基及二十三烷基等碳原子數1~23之直鏈狀或分枝狀烷基。

通式(1)中，R^3所示C_{3-8}環烷基可列舉如環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基及環辛基等碳原子數3~8之環烷基。

通式(1)中，R^3所示之C_{2-6}烯基可列舉如乙烯基、烯丙基、異丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、2-甲基-2-丙烯基、1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-己烯基、2-己烯基、3-己烯基、4-己烯基及5-己烯基等碳原子數2~6之直鏈狀或分枝狀烯基。

通式(1)中，R^3所示C_{1-6}烷氧基可列舉如甲氧基、乙氧基、正丙氧基、異丙氧基、正丁氧基、第二丁氧基、第三丁氧基、正戊氧基、異戊氧基、新戊氧基、第三戊氧基、正己氧基及異己氧基等碳原子數1~6之直鏈狀或分枝狀烷氧基。

通式(1)中，R^3所示C_{3-8}環烷氧基可列舉如環丙氧基、環丁氧基、環戊氧基、環己氧基、環庚氧基及環辛氧基等碳原子數3~8之環烷氧基。

R^3之中以C_{1-23}烷基較佳。C_{1-23}烷基宜為碳原子數1~11之直鏈狀或分枝狀烷基(C_{1-11}烷基)，且以乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、異戊基、新戊基及第三戊基等碳原子數2~5之直鏈狀或分枝狀烷基(C_{2-5}烷基)更佳，特別是以碳原子數5之烷基(C_5烷基)尤佳。

本發明之神經鞘胺醇化合物(1)亦可與酸形成鹽類。

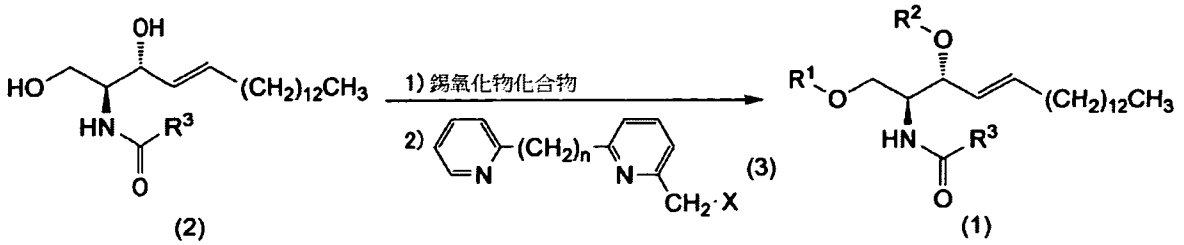
鹽類僅需為藥理學上可接受者即可，並未特別受限，

可列舉如與鹽酸、硫酸及硝酸等無機酸或與乙酸及苯磺酸等有機酸形成之鹽類。

舉例來說，本發明之神經鞘胺醇化合物(1)可藉下述反應式-1所示步驟而製得。

【化12】

反應式－1



式中，R^1、R^2、R^3、n及X與前述者相同。

如反應式-1所示，可於適當溶劑中使通式(2)所示化合物與錫氧化物化合物反應，接著使所得化合物與通式(3)所示雙吡啶基化合物反應，而製得本發明之化合物(1)。

即，本反應係由令化合物(2)與錫氧化物化合物反應之第1步驟及第1步驟後令化合物(3)反應之第2步驟所構成。

本反應之第1步驟及第2步驟所使用之溶劑只要不會對反應造成不良影響即可廣泛使用習知溶劑，可列舉如：苯、甲苯及二甲苯等芳香族烴；氯苯及二氯苯等鹵化芳香族烴；正己烷、環己烷及石油醚等脂肪族烴；二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、氯仿、四氯化碳等脂肪族鹵化烴；甲醇、乙醇及異丙醇等醇類；二乙醚、二丙醚、二噁烷、四氫呋喃(THF)、乙二醇二甲醚及乙二醇二乙醚等醚類；丙酮、2-丁酮及甲基異丁基酮等酮類；乙腈、丙腈、苯腈等腈類；N,N-二甲基甲醯胺、六甲基磷酸三胺(HMPA)等醯胺類；二甲基

亞碸等亞碸類；或是該等之混合溶劑。

該等之中，較宜使用甲醇等醇類作為本反應第1步驟所使用之溶劑，使用N,N-二甲基甲醯胺等醯胺類作為第2步驟所使用之溶劑。

第1步驟所使用之錫氧化物化合物可列舉如通式(4)所示之錫氧化物化合物及通式(5)所示之錫氧化物化合物等：

$(R^4)_2SnO$ (4)

式中，R^4為烷基、環烷基或苯基；

$(R^4)_2Sn(OR^5)_2$ (5)

式中，R^5為烷基、環烷基或苯基，R^4與前述者相同。

R^4及R^5所示烷基可列舉如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、正戊基、異戊基、正己基、正辛基、2-乙基己基、月桂基及硬脂醯基等。

R^4及R^5所示環烷基可列舉如環丙基、環丁基、環戊基、環己基、環庚基、環辛基等碳原子數3~8之環烷基。

通式(4)所示錫氧化物化合物若表示具體例，舉例來說，可列舉如二甲基錫氧化物($(CH_3)_2SnO$)、二乙基錫氧化物($(C_2H_5)_2SnO$)、二丁基錫氧化物($(C_4H_9)_2SnO$)、二辛基錫氧化物($(C_8H_{17})_2SnO$)及二苯基錫氧化物($(C_6H_5)_2SnO$)等，且該等之中以二甲基錫氧化物、二丁基錫氧化物及二辛基錫氧化物為佳。

此外，通式(5)所示錫氧化物化合物之具體例可列舉如二丁基錫二甲氧基化物($(C_4H_9)_2Sn(OCH_3)_2$)等。

該等錫氧化物化合物不是可容易地以商業手段取得，

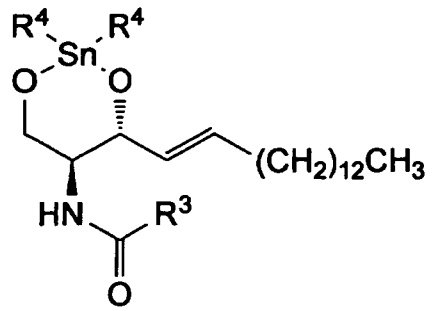
就是可依照習知方法製得者。

錫氧化物化合物之使用量只要是化學理論量即不受特別限制，但相對於化合物(2)1莫耳通常是1~3莫耳程度，且宜為1.1~2莫耳程度。

反應溫度並未受特別限制，通常僅需在-10℃至所用溶劑之沸點溫度以下的範圍內即可，且宜為20~100℃程度，更宜為40~80℃程度。此外，反應時間雖依原料化合物種類及其使用量以及反應溫度等條件而異，但通常為0.5~3小時程度，且較宜為1~2小時程度。

於第1步驟中，一旦使化合物(2)與錫氧化物化合物反應，將產生下述通式(6)所示黝錫(stannine)化合物：

【化13】



(6)

式中，R^3及R^4與前述者相同。

所得黝錫化合物(6)可離析純化後供後續步驟使用，亦可不經離析純化而直接使用在後續步驟中。

此外，亦可濃縮或餾除第1步驟所製得反應液之溶劑，再重新加入業經適當選擇之溶劑供予後續步驟。

於第2步驟中，宜使反應系統內存有鹵素離子。為此，僅需將鹵化物供至反應系統內即可。

舉例來說，鹵化物可列舉如氟化四丁銨、氯化四丁銨、溴化四丁銨、碘化四丁銨等四烷基銨鹵化物及氟化銫等。該等之中以氟化四丁銨及氟化銫為佳。

鹵化物之使用量並未特別受限，可從廣泛範圍中適當選出。相對於化合物(2)1莫耳，鹵化物通常使用1~5莫耳，且較佳為1.1~2莫耳。

化合物(3)之使用量並未特別受限，可從廣泛範圍中適當選出。相對於化合物(2)1莫耳，化合物(3)通常使用0.8~3莫耳，且宜為1.0~2.5莫耳，更宜為1.1~1.5莫耳。

反應溫度雖未特別受限，但通常僅需在-10℃至所用溶劑之沸點溫度以下的範圍內即可，且宜為10~40℃程度，更宜為20~30℃程度。此外，反應時間雖依原料化合物之種類及其使用量以及反應溫度等條件而異，通常為24小時以內，且較宜為6~12小時之程度。

如此製得之化合物(1)可藉一般之離析及純化手段，如管柱層析法及再結晶等，而從反應混合物容易地離析出並純化。

於本反應中，化合物(1)係以化合物(1A)及化合物(1B)之混合物的形式產生，該等可透過HPLC等之一般分離手法而容易地離析產生出。結果，在本反應中，相對於化合物(1B)，產生4倍程度之化合物(1A)。

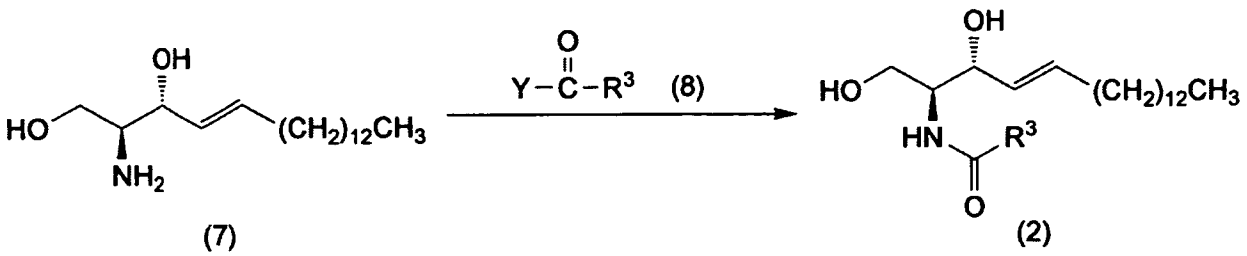
反應式-1中所用原料化合物(2)可依習知方法而容易地製得。

舉例來說，依照下述反應式-2所示步驟可製得原料化

合物(2)。

【化14】

反應式－2



(7) (2)

式中，R^3與前述者相同。Y為鹵素原子。

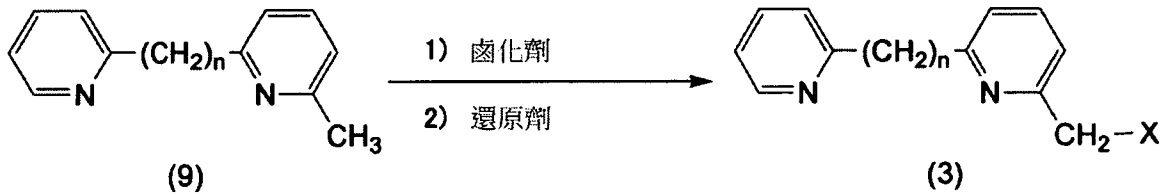
如反應式-2所示，使習知之通式(8)所示與習知之通式(7)所示神經鞘胺醇反應即可製得化合物(2)。反應條件僅需依照一般鹵化羰化合物與胺基化合物反應來獲得醯胺化合物的方法即可。本反應所使用之試劑、溶劑、反應溫度及反應時間等反應條件之具體例係顯示於後述之實施例。

此外，於反應式-1中使用之原料化合物(3)可依照習知方法而容易地製得。

舉例來說，依照下述反應式-3所示步驟即可製造原料化合物(3)。

【化15】

反應式－3



(9) (3)

式中，n及X與前述者相同。

如反應式-3所示，使N-溴琥珀醯亞胺等鹵化劑與習知化合物(9)反應後，為了達到令過剩取代之鹵素脫離之目的

而使還原劑反應，藉此可製得化合物(3)。反應條件依照一般使芳香族取代甲基鹵化的方法即可。本反應所使用之試劑、溶劑、反應溫度及反應時間等反應條件之具體例係顯示於後述之參考例。

從後述試驗例可明顯看出，本發明之化合物(1)具有優異之神經鞘磷脂酶抑制活性。因此，化合物(1)可作為神經鞘磷脂酶抑制劑而甚為有用，且作為對抗腦出血及腦梗塞等腦血管異常、頭部外傷、以帕金森氏症、老人痴呆及阿茲海默症等為代表之老年期失智症等腦神經退化性疾病、糖尿病、肥胖、動脈硬化、炎症性疾病、免疫性疾病、癌症、腎病及心臟病的預防藥物及治療藥物，亦甚為有用。

本發明提供一種以通式(1)所示神經鞘胺醇化合物作為有效成分之神經鞘磷脂酶抑制劑(以下亦稱為「製劑」)。

本發明之製劑可僅由化合物(1)構成，亦可為與任意載體或添加劑組合，而以習用公知之方法調製成適合所需用途之形態的組成物。此外，可為通式(1A)及(1B)所示化合物中的1種所構成者，亦可為化合物(1A)及(1B)之混合物。此外，本發明之製劑可為與任意載體或添加劑組合而以習用公知方法調製成適合所需用途之形態的組成物。

本發明製劑之形態並未特別受限，舉例來說，可製為：錠劑、粉劑、顆粒劑、丸劑、粉末糖漿劑及膠囊劑(硬膠囊及軟膠囊)等固態製劑；乳霜、軟膏及凝膠等糊狀或凝膠狀製劑；液劑、懸濁劑、乳液劑、糖漿及酏劑等液態製劑等。

就本發明製劑中之神經鞘胺醇化合物(1)配合量而言，

僅需含有可發揮神經鞘磷脂酶抑制效果之比例即可，並未特別受限，可在製劑100重量%中佔0.001~99重量%(宜為0.01~50重量%，更宜為0.1~30重量%)之範圍內加以適當設定。

該製劑僅需以可發揮神經鞘磷脂酶抑制效果之比例含有化合物(1)即可，在不妨礙該效果之範圍內亦可配合其他成分。前述其他成分僅需為藥理學上及製劑學上可接受者即可，並未特別受限，但舉例來說，除了如賦形劑、結合劑、分散劑、增黏劑、滑澤劑、pH調整劑及可溶化劑等一般製劑製造上所使用之載體外，亦可列舉如抗生物質、抗菌劑、殺菌劑、防腐劑、填充劑、漂白劑、酵素、螯合劑、消泡劑、著色劑(染料、顏料等)、柔軟劑、保濕劑、界面活性劑、抗氧化劑、香料、矯味劑、矯臭劑及溶劑等。

本製劑之使用方法包含將本製劑藉由經口投藥、點滴及注射等攝取至體內及局部施用至患部等的方法。

本發明製劑之使用量將依劑形及投藥(使用)方法等而異，因此無法一概而定，但舉例來說，將適當之1日投藥量換算成神經鞘胺醇化合物(1)之投藥量，通常可設定在成人每1Kg為1ng/ml~100mg/ml程度，且宜在10ng/ml~50mg/ml程度的範圍內，且可依照患者之年齡及症狀而加以適當設定，該等製劑可1日1次或分為數次投藥。

發明之效果

本發明之神經鞘胺醇化合物對神經鞘磷脂酶具有抑制活性，因此適合用來作為對抗腦出血及腦梗塞等腦血管異

常、頭部外傷、以帕金森氏症、老人痴呆及阿茲海默症等為代表之老年期失智症等腦神經退化性疾病、糖尿病、肥胖、動脈硬化、炎症性疾病、免疫性疾病、癌症、腎病及心臟病的預防藥物及治療藥物。

依據本發明之製造方法，可提供一種新穎之神經鞘胺醇化合物，其對神經鞘磷脂酶具有前述之優異抑制活性效果。

【實施方式】

本發明之最佳實施形態

實施例

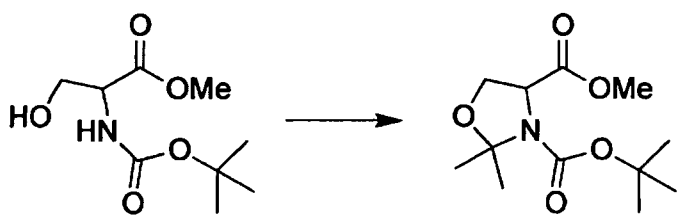
以下列舉參考例、本發明神經鞘胺醇化合物(1)之製造例及試驗例，俾利本發明更為明確，但本發明並不僅局限於此。於下述反應式中，Me意指甲基。

參考例1(合成原料化合物(7))

原料化合物(7)亦可購入市售品，但舉例來說，可藉以下習知方法合成出。

(1)參考例1-1

【化16】



將市售之N-第三丁氧基羰-絲胺酸甲酯(2.0g, 9.122mmol)、2, 2-二甲氧基丙烷(1.9g，18.24mmol)及吡啶鎓-對甲苯磺酸酯(26mg, 137μmol)溶解於苯(29ml)中，加熱

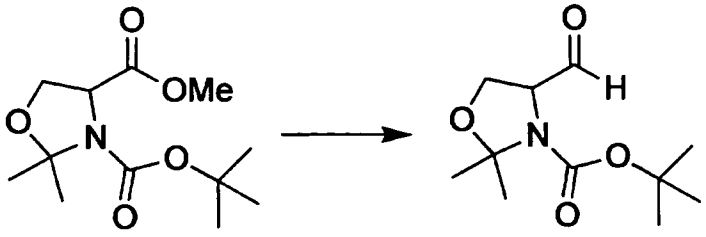
回流15小時。於該反應液中，加入飽和碳酸氫鈉水溶液，再以二乙醚抽提後，以飽和食鹽水洗淨有機層。接著以無水硫酸鎂乾燥、過濾後，濃縮濾液。使所得濃縮液以二氧化矽凝膠管柱層析法純化，而製得3-第三丁基4-甲基2, 2-二甲基噁唑啶-3, 4-二羧酸酯(3-tert-butyl 4-methyl 2, 2-dimethyloxazolidine-3,4-dicarboxylate) (2.78g, 收率91%)。

FTIR(擴散反射法(diffuse reflectance))2979, 1760, 1737, 1713, 1390 cm^{-1}

HRMS (CI) $C_{12}H_{22}NO_5$ $(M+H^+)$之計算值260.1498, 實測值260.1495。

(2)參考例1-2

【化17】



將前述反應製得之3-第三丁基4-甲基2, 2-二甲基二噁唑啶-3, 4-二羧酸酯(6.42g, 24.97mmol)溶解於甲苯(50ml)中，冷卻至-78℃後，徐徐滴定氫化二異丁基鋁之甲苯溶液(0.93M)。30分鐘後，於混合物中加入甲醇使反應停止，更加入10%酒石酸鈉鉀水溶液(150ml)，以乙酸乙酯進行抽提。使有機層以無水硫酸鎂乾燥後，進行過濾、濃縮，再使所得濃縮液以二氧化矽凝膠管柱層析法純化，而製得第三丁基4-甲醯基-2，2-二甲基噁唑啶-3-羧酸酯(tert-butyl

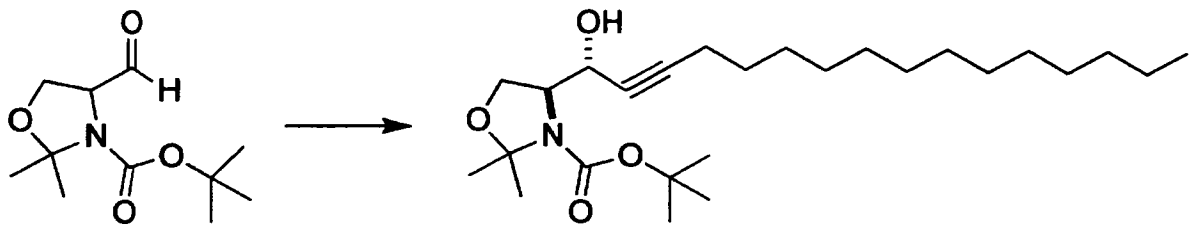
4-formyl-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate) (4.22g, 收率74%)。

FTIR(擴散反射法(diffuse reflectance))3449, 2978, 1737, 1694, 1366, 1258, 1172 cm^{-1}

HRMS (CI) $C_{11}H_{20}NO_4$ ($M+H^+$)之計算值230.1392, 實測值230.1390。

(3)參考例1-3

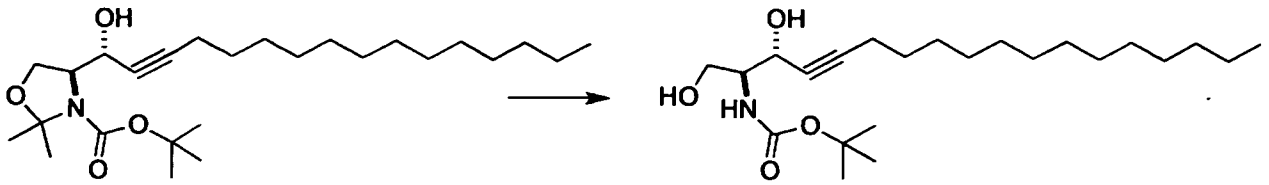
【化18】



將1-十五炔(1.7g, 8.17mmol)溶解於四氫呋喃(THF)(7.5ml)，冷卻至0℃。於該溶液中徐徐滴定正丁基鋰之正己烷溶液(7.6ml, 7.85mmol)。攪拌90分鐘後，以-40℃以下的溫度加入前述反應所製得之第三丁基4-甲醯基-2, 2-二甲基噁唑啶-3-羧酸酯(tert-butyl 4-formyl-2, 2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate)(1.0g, 4.36mmol)的THF溶液(75ml)，更攪拌20分鐘。於所得混合液中加入飽和氯化銨水溶液使反應停止後，使用二乙醚抽提，再以出飽和食鹽水洗淨有機層，乾燥後濃縮之。以二氧化矽凝膠管柱層析法純化濃縮液，而製得(S)-第三丁基4-((R)-1-羥基-2-十六炔基)-2, 2-二甲基噁唑啶-3-羧酸酯((S)-tert-butyl 4-((R)-1-hydroxy-2-hexadecynyl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-carboxylate) (1.2g, 收率49%)。

(4)參考例1-4

【化19】



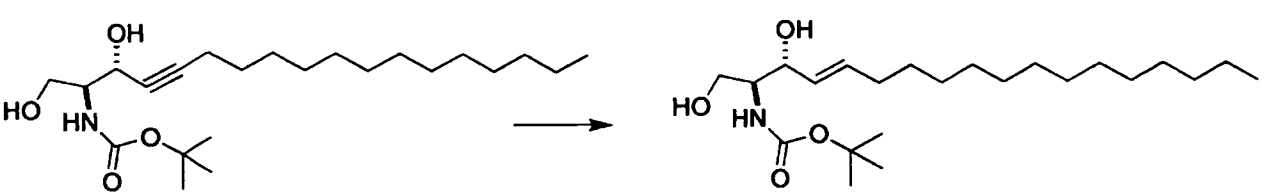
將前述反應所製得之(S)-第三丁基4-((R)-1-羥基-2-十六炔基)-2，2-二甲基噁唑啶-3-羧酸酯(100mg, 0.23mmol)溶解於甲醇(4.4ml))中，加入對甲苯磺酸(0.8mg, 4.6μmol)，再以室溫攪拌12小時。於該反應液中加入對甲苯磺酸(0.8mg, 4.6μmol)並攪拌6小時後，升溫至60℃，更攪拌2小時。於該反應液中加入飽和碳酸氫鈉使反應停止後，以乙酸乙酯抽提，並乾燥過濾有機層。以管柱層析法純化所得濾液，藉此製得第三丁基(2S, 3R)-1, 3-二羥基十八-4-炔-2-基胺甲酸酯 (tert-butyl(2S,3R)-1,3-dihydroxyoctadec-4-yn-2-ylcarbamate) (85mg, 收率93%)。

FTIR(擴散反射法(diffuse reflectance)) 3449, 2926, 2854, 1703, 1458, 1394, 1366 cm^{-1}

HRMS (FAB) $C_{23}H_{43}NO_4Na$ $(M+Na^+)$ 之計算值 420.3089, 實測值 420.3058。

(5)參考例1-5

【化20】



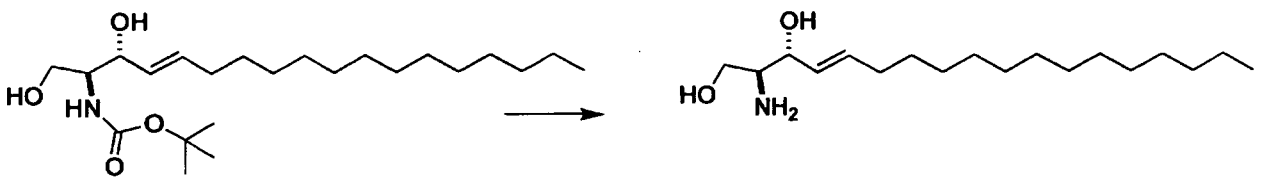
將前述反應所得第三丁基(2S, 3R)-1, 3-二羥基十八-4-炔-2-基胺甲酸酯(85mg, 0.21mmol)溶解於THF(21ml)，冷卻至0℃後，滴定氫化雙(2-甲氧基乙氧基)鋁鈉(Red-Al)之65%甲苯溶液(258μl, 0.850mmol)。使所得混合液升溫至室溫，攪拌2.5小時。接著加入1M鹽酸使反應停止後，以二乙基醚進行抽提，並以無水硫酸鈉乾燥有機層，並過濾、濃縮之。以二氧化矽凝膠管柱層析法純化濃縮液後，製得N-第三丁氧羰基神經鞘胺醇(52mg, 64%)。

FTIR(擴散反射法(diffuse reflectance)) 3370, 2924, 2853, 1689, 1508, 1170 cm^{-1}

HRMS (CI) $C_{23}H_{46}NO_4$ $(M+H^+)$之計算值400.3427, 實測值400.3433。

(6)參考例1-6

【化21】



將N-第三丁氧羰基神經鞘胺醇(100mg, 0.25mmol)溶解於6M鹽酸/THF(1：5)中，以室溫攪拌2小時。使所得混合液升溫至50℃，攪拌16小時。再以10%氫氧化鈉水溶液中和後，以二氯甲烷抽提後，以無水硫酸鈉乾燥，過濾濃縮之。使用正己烷使所得粗結晶再結晶，製得原料化合物(7)(74 mg, 收率98%)。

原料化合物(7)之物性：

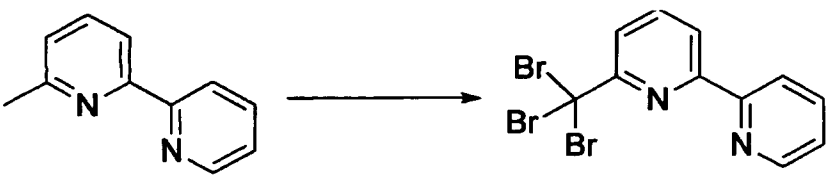
FTIR（擴散反射法(diffuse reflectance)) 3352, 2921, 2951, 1614, 1472, 1383 cm^{-1}

HRMS (CI) $C_{18}H_{38}NO_2$ $(M+H^+)$之計算值300.2902，實測值300.2903。

參考例2

化合物(3)之合成例

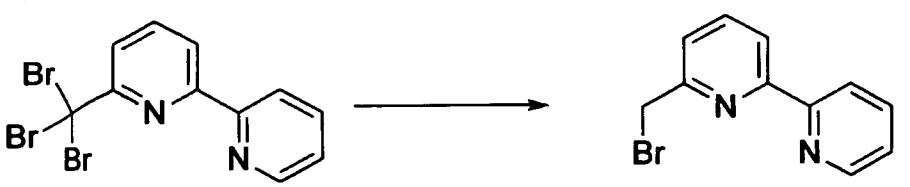
(1)參考例2-1



將市售之6-甲基-2, 2'-聯吡啶(200mg, 1.17mmol)溶解於四氯化碳中，加入N-溴琥珀醯亞胺(1.4g, 5.85mmol)及2, 2'-偶氮異丁腈(13.5mg, 82.32μmol)，加熱回流12小時。冷卻至室溫後，加入飽和食鹽水，以二氯甲烷抽提所得混合液，再以無水硫酸鈉乾燥有機層，並過濾、濃縮之。使濃縮液以二氧化矽凝膠管柱層析法純化，而定量地製得呈無色結晶之6-三溴甲基-2，2'-聯吡啶。使用該6-三溴甲基-2，2'-聯吡啶進行以下之還原反應。

(2)參考例2-2

【化23】



將6-三溴甲基-2, 2'-聯吡啶(205mg，503.8μmol)溶解於

二氯甲烷(5ml)中，冷卻至-78℃後，滴定氫化二異丁基鋁(DIBAL)之二氯甲烷溶液(0.97 M, 1.5 ml)。以TLC確認原料消失後，加入甲醇使反應停止。使反應液升溫至0℃後，添加10%酒石酸鈉鉀水溶液。以二乙醚抽提所得混合液，再以飽和食鹽水洗淨，以無水硫酸鈉乾燥後，過濾、濃縮之。使濃縮液以二氧化矽凝膠管柱層析法純化，而獲得化合物(3-1)(6-溴甲基-2, 2'-聯吡啶)(54mg，收率54%)。

化合物(3-1)之物性：

^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 4.63(s, 2H), 7.27-7.33 (ddd, J = 7.8, 4.6, 1.0 Hz, 1H), 7.45(dt, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 7.80 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 8.31 (dd, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 8.45 (dt, J = 7.8, 1.0 Hz, 1H), 8.67 (m, 1H)

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 34.14, 120.22, 121.32, 123.35, 123.85, 136.89, 137.89, 149.13, 155.66, 155.88, 156.20 cm^{-1}

FTIR (擴散反射法(diffuse reflectance)) 3024, 2924, 2853, 1581, 1492, 1454,1429 cm^{-1}

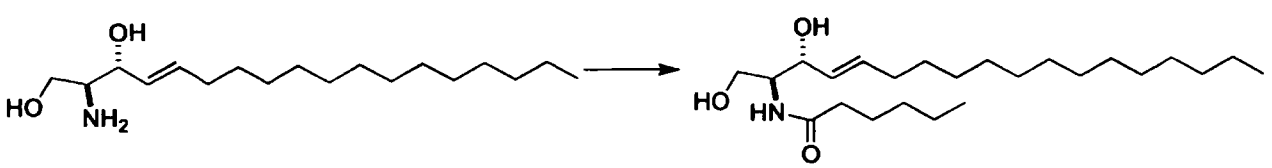
HRMS (CI) $C_{11}H_9N_2Br$ (M^+)之計算值 247.9949, 實測值 247.9967。

製造例1

神經鞘胺醇化合物(1)之製造例

(1)製造例1-1

【化24】



將原料化合物(7)(97 mg, 326μmol)、4-二甲基胺基吡啶(1mg)及三乙胺(10μl)溶解於二氯甲烷(3ml)，冷卻至0℃後，加入己醯氯之二氯甲烷溶液(40mg, 297μmol, CH_2Cl_2 3ml)。10分鐘後，加入飽和碳酸氫鈉水溶液，以二氯甲抽提。使所得有機層以無水硫酸鎂乾燥後，過濾、濃縮之。使濃縮液以二氧化矽凝膠管柱層析法純化，而製得神經醯胺。(67 mg, 57%)。

神經醯胺之物性：

^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 0.88 (t, J = 6.2 Hz, 3H), 0.90 (t, J = 6.2 Hz, 3H),1.22-1.40 (m, 28H), 1.63 (m, 2H), 2.22 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 3.60-3.73 (m, 2H), 3.88-3.92 (m, 2H), 4.27 (m, 1H), 5.50 (dd, J = 6.4, 15.4 Hz, 1H), 5.76 (t, J = 6.6, 15.4 Hz, 1H), 6.47 (br d, J = 7.4 Hz, 1H)

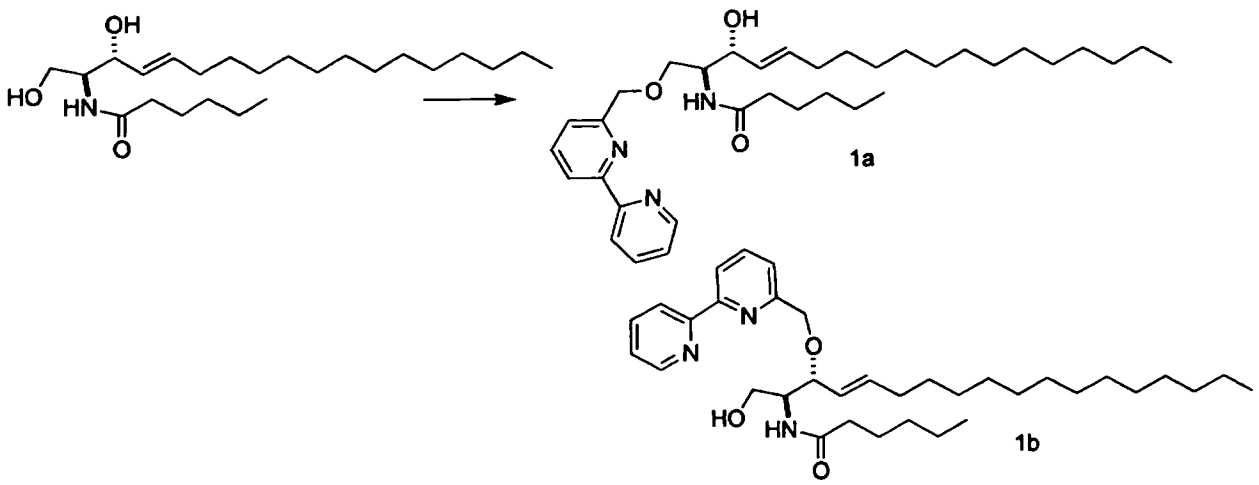
^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$)δ 13.86q, 14.10q, 22.33t, 22.61t, 25.39t, 29.14t, 29.22t, 29.29t, 29.46t, 29.59t(2C), 29.64t (3C), 31.37t, 31.86t, 32.27t, 36.68t, 54.63d, 62.21t, 74.07d, 128.85d, 133.87d, 174.08s

FTIR (擴散反射法(diffuse reflectance)) 3297, 2920, 3251, 1645, 1542 cm^{-1}

HRMS (FAB) $C_{24}H_{47}N_1O_3Na$ ($M+Na^+$)之計算值 420.3454, 實測值 420.3437。

(2)製造例1-2

【化25】



將神經醯胺(67mg, 168.5μmol)溶解於甲醇(1.7ml)中，加入二丁基錫氧化物(42.4mg, 170.2μmol)，加熱回流1小時。冷卻至室溫後，於減壓下餾除甲醇，加入無水N, N-二甲基甲醯胺(DMF)(1.9ml)，再加入化合物(3-1)(46mg, 185μmol)及四-正丁基銨鹵化物(1M THF, 185μl)，於室溫下攪拌24小時。於該反應液中加入水，再以乙酸乙酯抽提後，以無水硫酸鈉乾燥有機層，過濾並濃縮之。使濃縮液以二氧化矽凝膠管柱層析法純化，而以化合物(1a)及化合物(1b)之混合物的形態製得目的化合物(27.5 mg, 收率29%)。將該混合物以高速液體管柱層析法(HPLC)(ODS, 甲醇：水＝10：1)純化，而以4：1之比率製得化合物(1a)及化合物(1b)。

化合物(1a)之物性：

^{1}H NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ 0.87 (t, J = 6.2 Hz, 6H), 1.25-1.32 (m, 24H), 1.58 (m, 2H), 1.99 (m, 2H), 2.18 (t, J= 7.6 Hz, 2H), 3.73 (m, 1H), 3.78 (dd, J= 9.6, 3.8 Hz, 1H), 3.94 (dd, J = 9.6, 3.8 Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 4.14 (m, 1H), 4.65 (d, J = 12.8 Hz, 1H), 4.74 (d, J= 12.8 Hz, 1H), 5.49 (dd, J = 15.4,

5.2 Hz, 1H), 5.73 (dt, J = 15.4, 6.8 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.31 (m, 2H), 7.83 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 8.33 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.42 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.67 (br d, J = 4.6 Hz, 1H)

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 13.94, 14.13, 22.40, 22.70, 25.44, 29.22(C2), 29.22, 29.37, 29.51-29.70 (5C), 31.43, 31.94, 32.29, 36.80, 52.93, 70.67, 74.27, 74.37, 120.24, 121.26, 121.48, 123.85, 129.19, 133.41, 136.97, 137.61, 149.24, 155.90，156.04, 156,93, 173.36

FTIR (擴散反射法(diffuse reflectance)) 3279, 2954, 2919, 2851, 1635, 1546 , 1430 cm^{-1}

HRMS (CI) $C_{35}H_{56}N_3O_3(M+H^+)$之計算值 566.4321, 實測值 566.4321。

化合物(1b)の物性:

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 0.85(t, J = 6.6 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 6.6 Hz, 3H), 1.24-1.36(m, 24H), 1.55 (m, 2H), 2.07(m, 4H), 3.61(m, 2H), 4.01(m, 1H), 4.09(m, 2H), 4.54(d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.80(d, J = 13.2 Hz, 1H), 5.47(dd, J = 7.8, 15.6 Hz, 1H), 5.80(dt, J = 6.6, 15.6 Hz, 1H), 6.31(d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.27-7.34(m, 2H), 7.82(m, 2H), 8.27(d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.36 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.67(br d, J = 5.1 Hz, 1H)

^{13}C NMR (50 MHz, $CDCl_3$) δ 13.90, 14.13, 22.38, 22.70, 25.36, 29.11, 29.23, 29.37, 29.49, 29.70(5C), 31.39, 31.93, 32.35, 36.75, 53.80, 62.20, 71.18, 82.43, 120.29, 121.32,

121.66, 123.88, 126.22, 137.02, 137.37, 137.63, 149.30, 155.92, 156.15, 157.51, 173.67

HRMS (FAB) $C_{35}H_{55}N_3O_3Na$ ($M+Na^+$) 之計算值 588.4141, 實測值 588.4160。

試驗例1(測定抑制效果)

調製0.2M之 Tris緩衝液(pH7.5)(TB)

將Tris [nacalai Code:35434-34] 24.2g溶解於蒸餾水(DW)1000 ml中，再以鹽酸調製成pH7.5。

調整Tris緩衝液-生理食鹽水(TBS)

於TB 100ml中加入氯化鈉(NaCl)9g，以DW製成全量1000ml。

調製明膠-Tris緩衝液-生理食鹽水(GTBS)

於0.2M TB(pH7.5) 50ml中加入NaCl 4.5g及明膠[Merck Code:1.04078.0500]1.25g，並以DW製成全量500ml。

洗淨雉雞紅血球

雉雞保存血：[日本生化試驗社製, Code: 0101-1]

將雉雞保存血 1.0ml懸濁於TBS後，以2500rpm離心3分鐘，除去上清液。進行同樣之離心操作共3次後，使沉澱殘渣懸濁於TBS1.5ml，製成紅血球溶液。

調製神經鞘磷脂-脂質體(SM-脂質體)

神經鞘磷脂(SM)、膽固醇及CF溶液係使用下述者。

SM：Sphingomyelin from Bovin Brain Code: 32156-74

膽固醇(Cholesterol)：nakarai Code: 08721-75

CF溶液：5(6)-carbosyfluorescein、SIGMA C8166、

FW=460.4

於CF(27mg/3ml, DW)中加入1N氫化鈉(NaOH)約100μl，調製CF溶液。此時，加入NaOH至以pH試紙呈pH7~8。

脂質體製作法

將神經鞘磷脂(SM)2 mg溶解於氯仿($CHCl_3$)及甲醇(MeOH)之混合溶劑($CHCl_3$：MeOH＝2：1)160μl，再將其59 μl與令膽固醇19.3mg溶解於$CHCl_3$ 1ml而成者20μl作混合，一邊以氮餾除$CHCl_3$及MeOH，一邊使其均勻擴散於玻璃試管底部，以乾燥器乾燥30分鐘。以55℃溫熱CF溶液，再將CF溶液80μl一邊攪拌一邊加入業已餾除溶劑之SM(Cholesterol與CF溶液之莫耳比為1：1)，間隔30秒再以55℃之水浴反覆攪拌3次。加入適量TBS，以15,000rpm、4℃離心20分鐘，去除上清液，再將藉TBS300μl而懸濁者作為脂質體使用。

實驗1：化合物(1a)及化合物(1b)對Bacillus cereus-SMase之溶血活性的影響

(i)化合物(1a)之溶解液

以MeOH溶解化合物(1a)，調整為1.7mM及17mM濃度。

(ii)化合物(1b)之溶解液

以MeOH溶解化合物(1b)，調整為1.7mM及17mM濃度。

[方法]加入30 ng/ml Bacillus cereus-SMase與前述各濃度之化合物(1a)溶解液或化合物(1b)懸濁液，以GTBS(pH5.5)製成全量240μl，於37℃下作10分鐘預處理後，於該反應液中添加經洗淨之雉雞紅血球(6×10^{11}個/ml)60μl，於37℃下保

溫30分鐘。接著，以4℃冰冷10分鐘後加入TBS，以2500rpm離心3分鐘，再將其上清液分取至96井微盤，測定吸光度($O.D._{550}$)(可樂那電氣社製：MTP32 Microplate-leader)。

表1. 化合物(1a)及化合物(1b)對Bacillus cereus-SMase之雉雞紅血球溶血作用的影響

表1

抑制劑(Inhibitor)	濃度(μM)	神經鞘磷脂酶活性(%)
對照組		100
化合物(1a)	1	98.2±1.4
	5	76.4±4.3
	10	54.4±3.1
	100	32.7±2.5
化合物(1b)	1	96.2±2.7
	5	86.5±3.3
	10	82.7±4.2
	100	78.8±2.3

如表1所示，若使化合物(1a)之溶解液濃度各增大到1、5、10及100μM，神經鞘磷脂酶活性隨著濃度受到抑制，於添加100μM之條件下，抑制到約30%。另一方面，化合物(1b)則未顯示出如同化合物(1a)程度的抑制效果。

實驗2：化合物(1a)及化合物(1b)對Bacillus cereus-SMase之SM-脂質體分解活性的影響

(i)化合物(1a)之溶解液

以MeOH溶解化合物(1a)，調整為1.7mM及17mM濃度。

(ii)化合物(1b)之溶解液

以MeOH溶解化合物(1b)，調整為1.7mM及17mM濃度。

[方法]加入50ng/ml Bc-SMase與前述各濃度之化合物(1a)溶解液或化合物(1b)溶解液，以GTBS(pH5.5)製成全量180μl，於37℃下作10分鐘預處理後，於該反應液中添加SM-

脂質體20 μl，於37℃下保溫30分鐘。接著，以螢光測定裝置(可樂那電氣社製：MTP32 Microplate-leader) (Ex_{490},Em_{530})測定該反應液。

表2. 化合物(1a)及化合物(1b)對Bacillus cereus-SMase之SM-脂質體分解活性的影響

表2

抑制劑(Inhibitor)	濃度(μM)	神經鞘磷脂酶活性(%)
對照組		100
化合物(1a)	1	99.0±0.2
	5	49.4±0.2
	10	N.D.
	100	N.D.
化合物(1b)	1	99.1±0.3
	5	97.2±1.1
	10	96.4±1.7
	100	72.9±3.2

N.D.: 未測出(not detected)

如表2所示，若使化合物(1a)之溶解液濃度各增大到1、5、10及100μM，神經鞘磷脂酶活性隨著濃度受到抑制，於添加100μM之條件下，大致上已完全被抑制。另一方面，化合物(1b)則未顯示出如同化合物(1a)程度的抑制效果。

實驗3：化合物(1a)及化合物(1b)對Bacillus cereus-SMase之^{14}C-神經鞘磷脂(^{14}C-sphingomyelin)分解活性的影響

(i)化合物(1a)之溶解液

以MeOH溶解化合物(1a)，調整為1.7mM及17mM濃度。

(ii)化合物(1b)之溶解液

以MeOH溶解化合物(1b)，調整為1.7mM及17mM濃度。

(iii)TX-緩衝液之調製

以100 ml之0.02M TB溶解0.5g之Triton X-100。

[方法] 添加Bacillus cereus-SMase 30ng/ml與前述各濃度之化合物(1a)溶解液或化合物(1b)溶解液，以TX-緩衝液(pH5.5)製成全量200μl，於37℃下進行10分鐘前處理後，於該反應液中添加^{14}C-sphingomyelin 10μl，於37℃下保溫30分鐘。於該反應液中加入反應停止溶劑(stop solution ($CHCl_3$：MeOH＝1：2)) 600μl，進行30秒之繳拌2次，再以2000 rpm離心20分鐘後，以閃爍計數器測定上層。

表3.化合物(1a)及化合物(1b)對Bacillus cereus-SMase之^{14}C-神經鞘磷脂(^{14}C-sphingomyelin)分解活性的影響

表3

抑制劑(Inhibitor)	濃度(μM)	神經鞘磷脂酶活性(%)
對照組		100
化合物(1a)	1	98.6±1.3
	5	56.6±1.6
	10	50.1±2.5
	100	25.6±1.5
化合物(1b)	1	98.2±2.3
	5	88.7±1.3
	10	84.8±4.0
	100	76.8±2.5

如表3所示，若使化合物(1a)之溶解液濃度各增大到1、5、10及100μM，神經鞘磷脂酶活性隨著濃度受到抑制，於添加100μM之條件下，抑制到約25%。另一方面，化合物(1b)則未顯示出如同化合物(1a)程度的抑制效果。

【圖式簡單說明】

(無)

【主要元件符號說明】

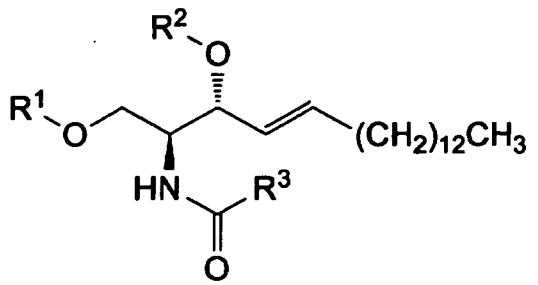
(無)

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種神經鞘胺醇化合物或其鹽，該神經鞘胺醇化合物係以通式(1)表示者：

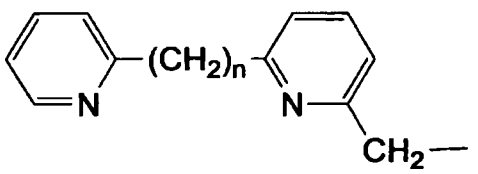
【化1】



(1)

式中，R^1及R^2中一者為氫原子，另一者為基(G)；且

【化2】



(G)

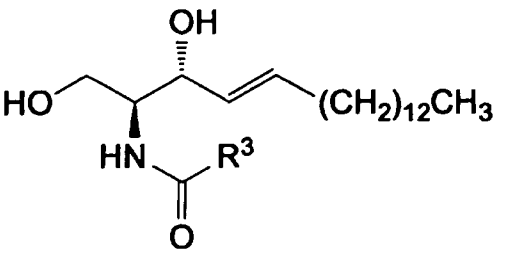
n為0或1；R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基。

2. 如申請專利範圍第1項之神經鞘胺醇化合物或其鹽，其中R^1為基(G)，R^2為氫原子。

3. 如申請專利範圍第1項之神經鞘胺醇化合物或其鹽，其中R^1為氫原子，R^2為基(G)。

4. 一種神經鞘胺醇化合物或其鹽之製造方法，係使通式(2)所示化合物與錫氧化物化合物反應，接著使所產生之化合物與通式(3)所示雙吡啶基化合物反應，以製造通式(1)所示之神經鞘胺醇化合物；

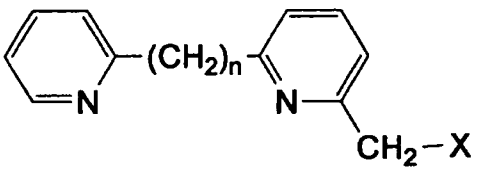
【化3】



(2)

式中，R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基；

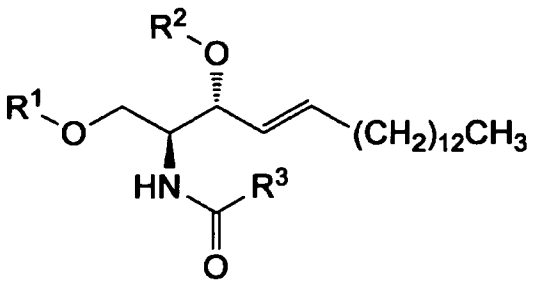
【化4】



(3)

式中，n為0或1；X為鹵素原子；

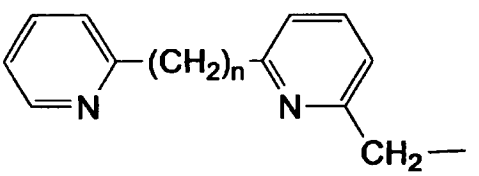
【化5】



(1)

式中，R^1及R^2中一者為氫原子，另一者為基(G)；且

【化6】



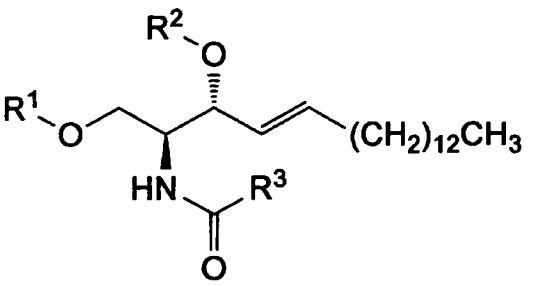
(G)

n為0或1；R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、

C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基。

5. 一種神經鞘磷脂酶抑制劑，含有通式(1)所示神經鞘胺醇化合物或其鹽：

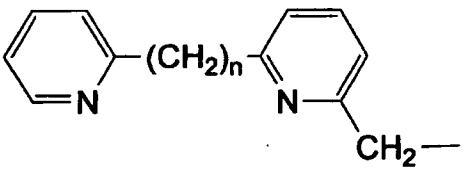
【化7】



(1)

式中，R^1及R^2中一者為氫原子，另一者為基(G)；且

【化8】



(G)

n為0或1；R^3為氫原子、C_{1-23}烷基、C_{3-8}環烷基、C_{2-6}烯基、C_{1-6}烷氧基、C_{3-8}環烷氧基、苯基或呋喃基。