

说明书

发明名称: 用于肌病治疗的S1PR4调节剂化合物及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及药学领域。具体地说, 本发明涉及S1PR4调节剂用于预防和治疗肌病的新型化合物及其应用。

背景技术

[0002] 肌营养不良是一种由遗传变异引起的进行性肌肉疾病, 以慢性氧化应激和炎症为特征。它在临床上表现为进行性肌无力, 在不同程度上影响四肢、咽喉和面部肌肉, 根据发病时间可分为先天性肌营养不良症和晚期肌营养不良症。一般来说, 先天性肌营养不良在出生时或出生后的头几个月就有明显的肌无力症状。而晚发性肌营养不良在患者实现独立行走后才表现出肌无力症状。目前在肌营养不良患者中发现多种参与骨骼肌的发育和维持的蛋白变异可导致肌营养不良。包括Laminin α 2, Fukutin, Selenoprotein N1等, 这些蛋白质在产前骨骼肌发育和功能中起着重要作用, 突变后可导致先天性肌营养不良。Dystrophin, Emerin, Lamin A/C等蛋白质参与骨骼肌的维持, 突变后可导致晚发性的肌营养不良。

[0003] 目前肌肉营养不良的治疗策略主要是基因治疗和抗炎治疗。基因治疗是利用小分子或反义寡核苷酸, 抑制导致转录异常终止的无义突变或诱导指定外显子发生跳跃, 导致阅读框架的恢复和肌营养不良蛋白的产生。或者利用腺相关病毒做为载体导入一个正常的野生型基因表达肌营养不良蛋白。然而, 基因治疗的局限性是对载体的免疫反应和有限的载体包装大小。此外, 基因治疗只对具有特定致病基因变体的患者有效, 不能适用于所有肌肉萎缩症患者。炎症是由基因变体引发的次要结果, 抑制炎症的优点是它可以适用于所有亚型的肌肉萎缩症, 不受变异基因的影响。糖皮质激素已被用于改善炎症水平, 以治疗肌肉萎缩症, 但糖皮质激素的效果有限, 而且有很大的副作用, 所以我们需要找到新的炎症靶点。

[0004] 鞘氨醇1-磷酸受体(Sphingosine-1-phosphate receptors, S1PRs)属于GPCR家族成员,有5种亚型S1PR1-5,介导其内源性配体鞘氨醇1-磷酸(Sphingosine 1-phosphate, S1P)调节的多种生理过程。其中S1PR1调节淋巴细胞从次级淋巴器官向血液和淋巴流的运输,是治疗各种自身免疫性疾病重要和新兴的药物靶点。S1PR4与免疫细胞的迁移分化、骨骼肌前体细胞的迁移、血小板再生和TGF β 1介导的抑制骨骼肌细胞凋亡相关,靶向S1PR4能够有效治疗自身免疫性疾病、癌症、动脉粥样硬化和血小板加速聚集引起的疾病,具有良好的应用前景。除此之外,靶向调控S1PR4对由S1PR4及其突变体导致的肌肉疾病也具有潜在的应用价值。

[0005] 目前肌病的研究还不充分,不同类型的肌病的根本原因与相关基因突变有关。因此,要找到治疗肌病的药物,首先要了解并确证导致该类肌病的靶点,进而根据突变蛋白发现其治疗药物。

[0006] 因此,研究肌病靶点进而开发其治疗药物对治疗肌肉疾病和自身免疫性疾病具有重大的临床意义和应用前景。

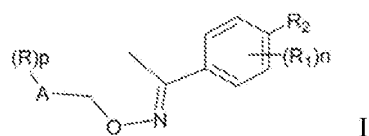
[0007] 发明内容

[0008] 本发明的目的是提供相关化合物作为S1PR调节剂,特别是S1PR4激动剂。

[0009] 本发明的另一目的是提供包含上述化合物的药物组合物。

[0010] 本发明还有一目的是提供上述化合物或药物组合物在制备治疗S1PR4相关疾病或调节S1P受体的药物中的用途。

[0011] 在第一方面,本发明提供式I所示的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐:



[0012] A选自取代或未取代的C₅-C₈芳环(例如苯基)或C₈-C₁₄稠芳环(例如萘基)、取代或未取代的含有1-3个选自N或O的杂原子的五元或六元杂环基;

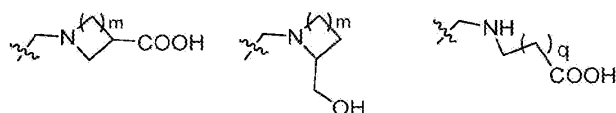
[0013] R独立选自下组:氢、卤素、氰基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(例如,甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基或环烯基、取代或未取代

的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₅-C₈芳基(例如苯基)、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基或杂芳基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基甲酰基, p为1-3的整数;

[0014] R¹选自下组: 氢、卤素、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、取代或未取代的C₂-C₆链烯基、取代或未取代的C₃-C₆环烯基、取代或未取代的C₃-C₈内酯基、取代或未取代的C₁-C₁₀酰胺基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基、取代或未取代的C₅-C₈芳杂环基;

[0015] n选自1-3整数;

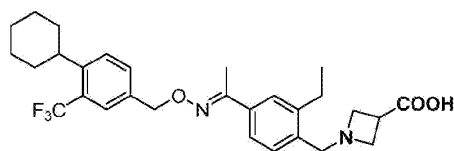
[0016] R²选自下组:



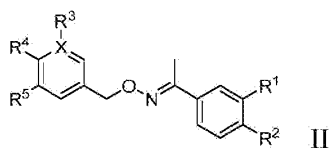
[0017] m选自1-4整数;

[0018] q选自1-2整数。

[0019] 在优选的实施方式中, 所述化合物不是以下化合物:



[0020] 在具体的实施方式中, 所述化合物如下式II所示,

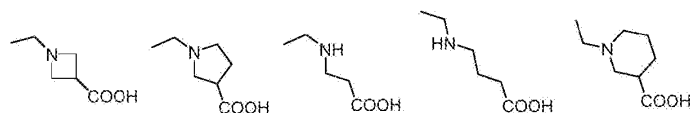


[0021] 式中,

[0022] R¹选自下组: 氢、卤素(优选F、Cl或Br)、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基(优选甲氧基)、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(优选取代或未取代的C₁-C₆烷基, 例如, 甲基、乙基、三氟甲基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、取代或未取代的C₂-C₆链烯基、取代或未取代的C₃-C₆环烯基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代

或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基、取代或未取代的C₅-C₈芳杂环基；

[0023] R²选自下组：



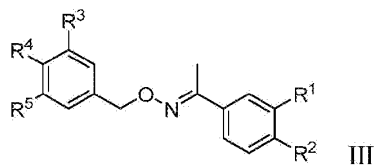
[0024] X选自：C或N；

[0025] R³不存在或是选自下组的取代基：氢、氰基、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(例如，甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基；

[0026] R⁵选自下组：氢、氰基、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(例如，甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基；

[0027] R⁴选自下组：氢、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基、取代或未取代的C₃-C₈环烷基或环烯基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基或杂芳基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的芳基甲酰基。

[0028] 在具体的实施方式中，所述化合物如下式Ⅲ所示，

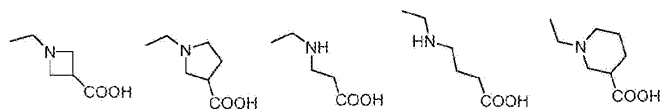


[0029] 式中，

[0030] R¹选自下组：氢、卤素(优选F、Cl或Br)、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基(优选甲氧基)、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(优选取代或未取代的C₁-C₆烷基，例

如, 甲基、乙基、三氟甲基)、取代或未取代的 C_3-C_8 环烷基、取代或未取代的 C_2-C_6 链烯基、取代或未取代的 C_3-C_6 环烯基、取代或未取代的 C_5-C_8 芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基、取代或未取代的 C_5-C_8 芳杂环基;

[0031] R^2 选自下组:



[0032] R^3 选自下组的取代基: 氢、氰基、卤素、取代或未取代的 C_1-C_{10} 烷基(例如, 甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的 C_3-C_8 环烷基、氰基、取代或未取代的 C_1-C_5 烷氧基、取代或未取代的 C_1-C_{10} 烷基甲酰基、取代或未取代的 C_5-C_8 芳基甲酰基、取代或未取代的 C_5-C_8 芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基;

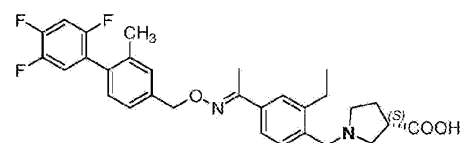
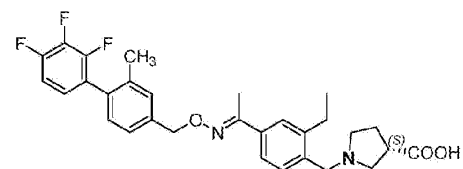
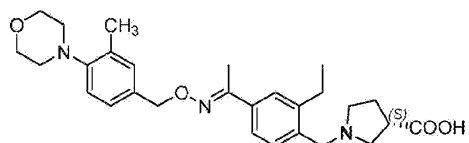
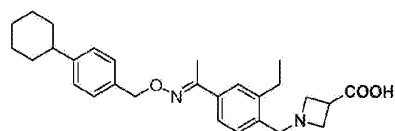
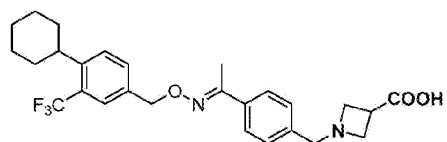
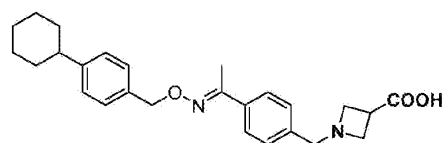
[0033] R^5 选自下组: 氢、氰基、卤素、取代或未取代的 C_1-C_{10} 烷基(例如, 甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的 C_3-C_8 环烷基、氰基、取代或未取代的 C_1-C_5 烷氧基、取代或未取代的 C_1-C_{10} 烷基甲酰基、取代或未取代的 C_5-C_8 芳基甲酰基、取代或未取代的 C_5-C_8 芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基;

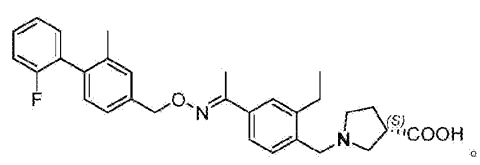
[0034] R^4 选自下组: 氢、卤素、取代或未取代的 C_1-C_{10} 烷基、取代或未取代的 C_3-C_8 环烷基或环烯基、取代或未取代的 C_5-C_8 芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基或杂芳基、取代或未取代的 C_1-C_{10} 烷基甲酰基、取代或未取代的芳基甲酰基。

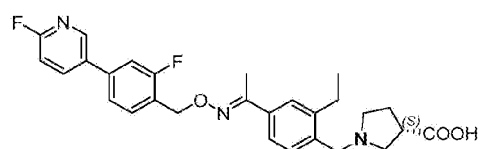
[0035] 在具体的实施方式中, 本发明提供选自下组的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐:

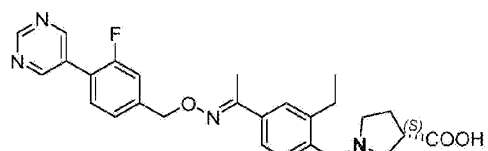
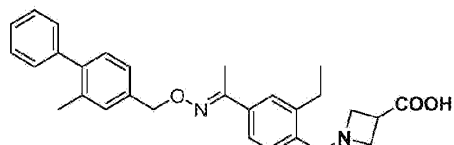
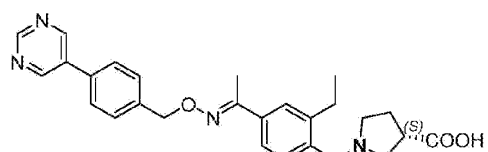
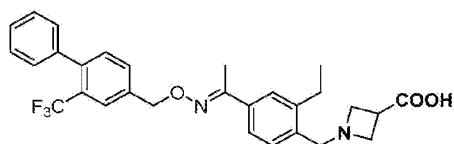
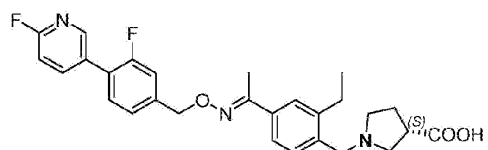
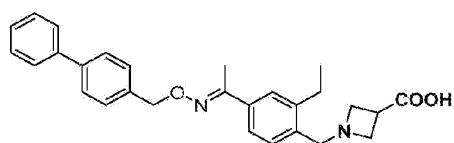
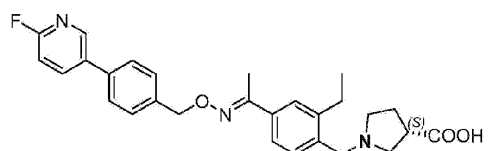
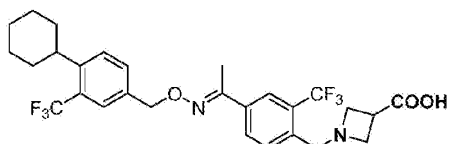
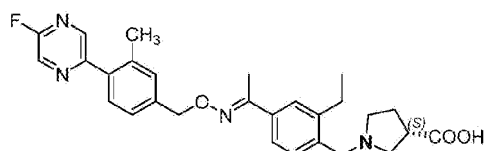
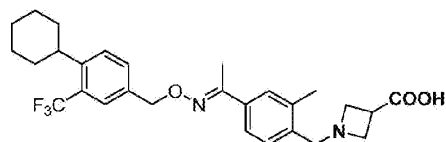
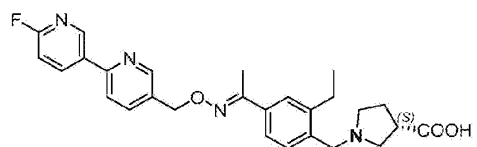
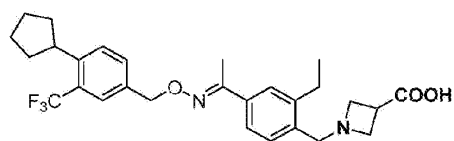
WO 2025/077706

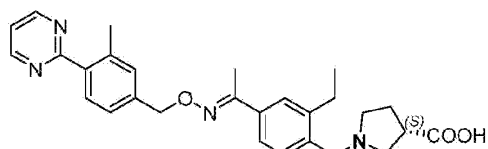
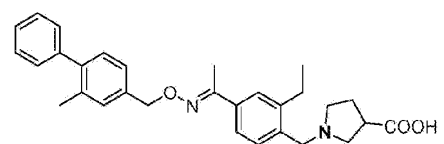
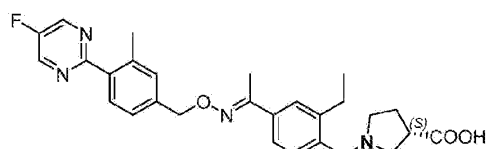
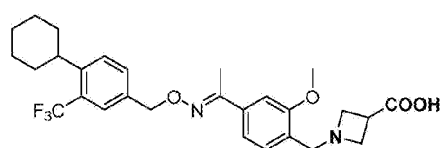
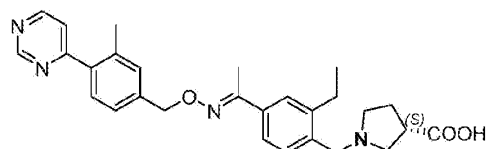
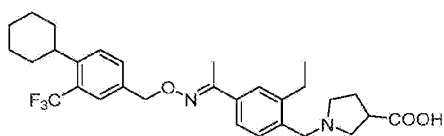
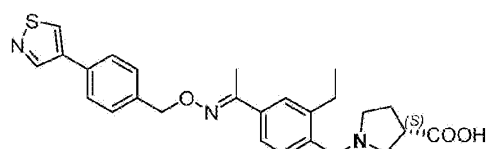
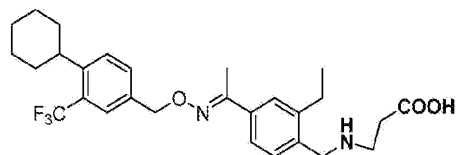
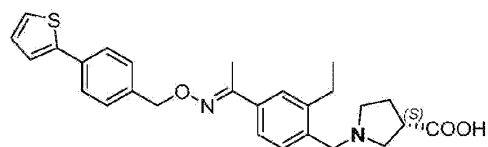
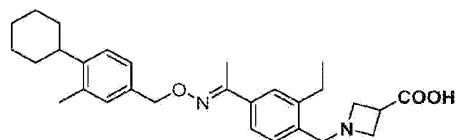
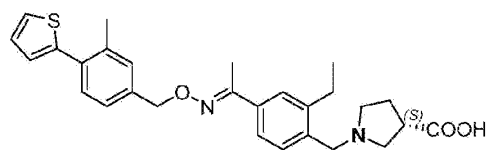
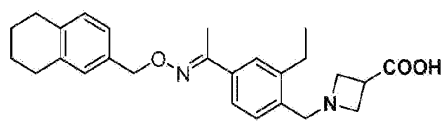
PCT/CN2024/123498

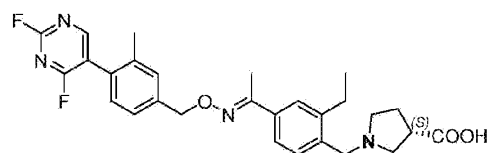


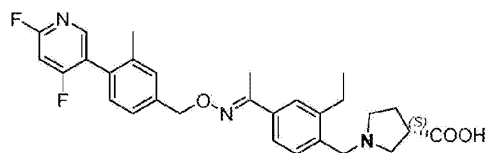
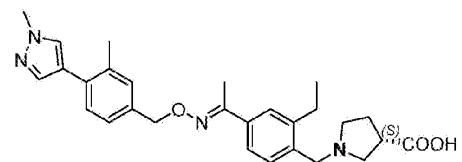
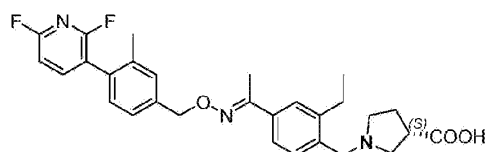
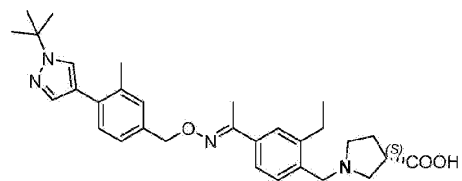
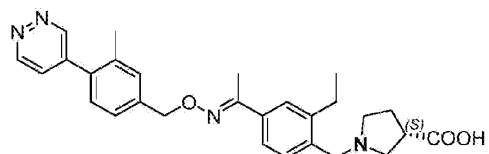
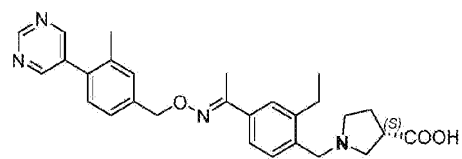
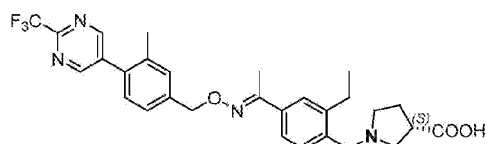
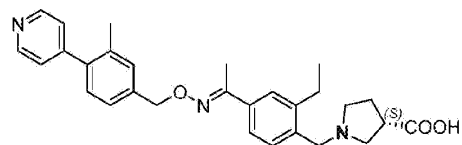
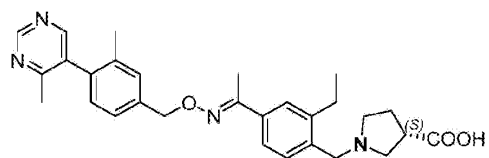
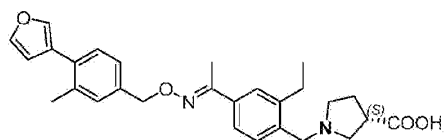
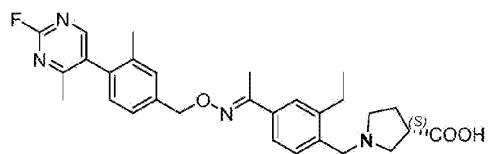
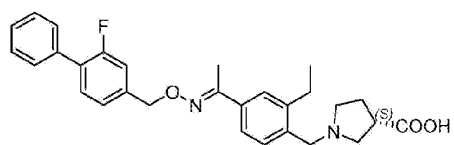


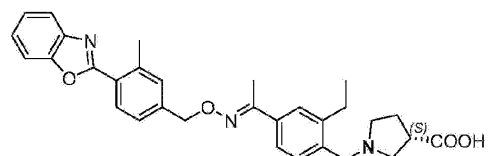
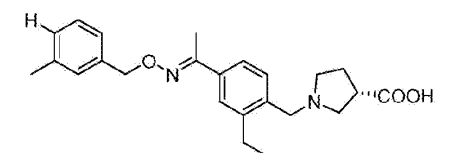
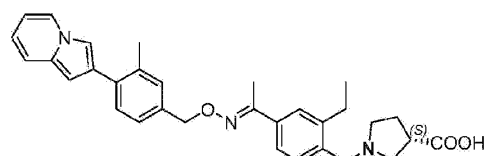
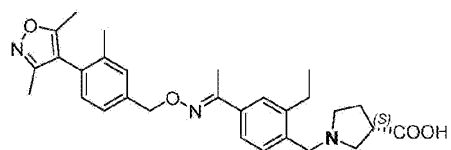
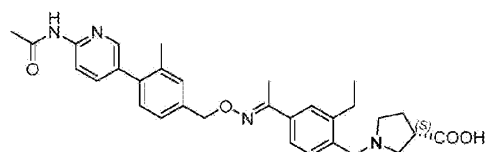
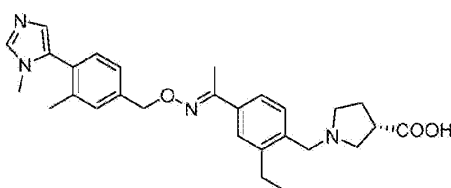
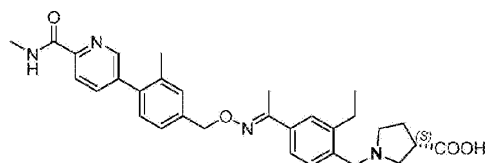
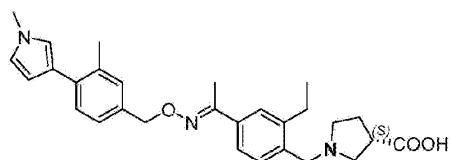
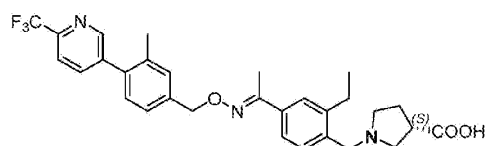
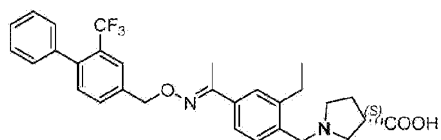
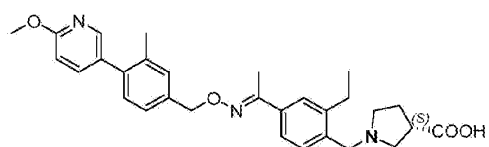
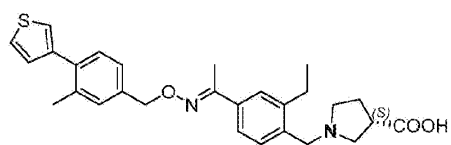


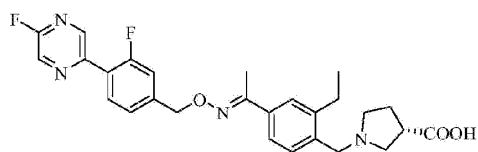
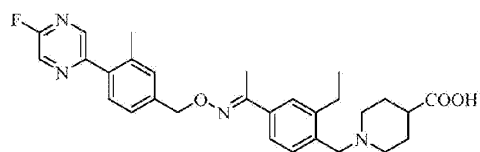
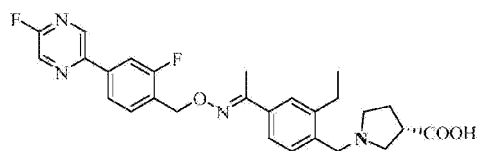
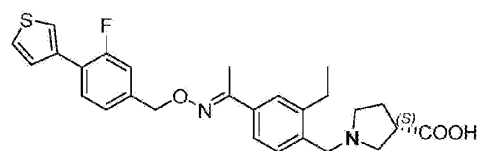
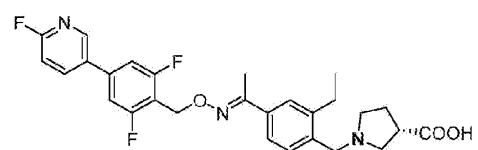
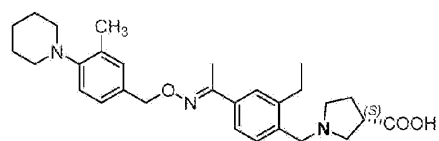
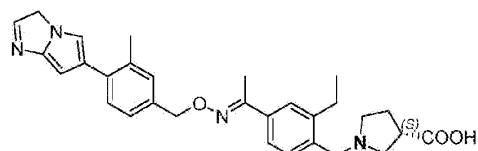
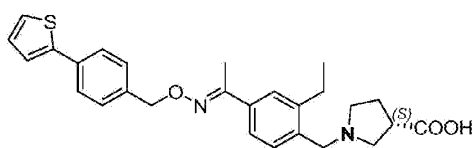
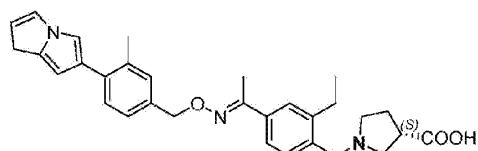
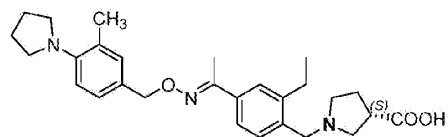
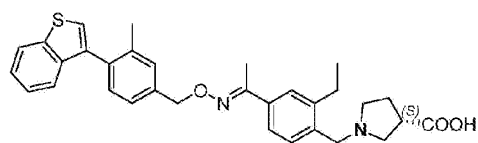
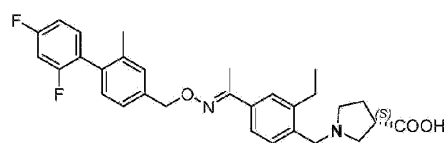


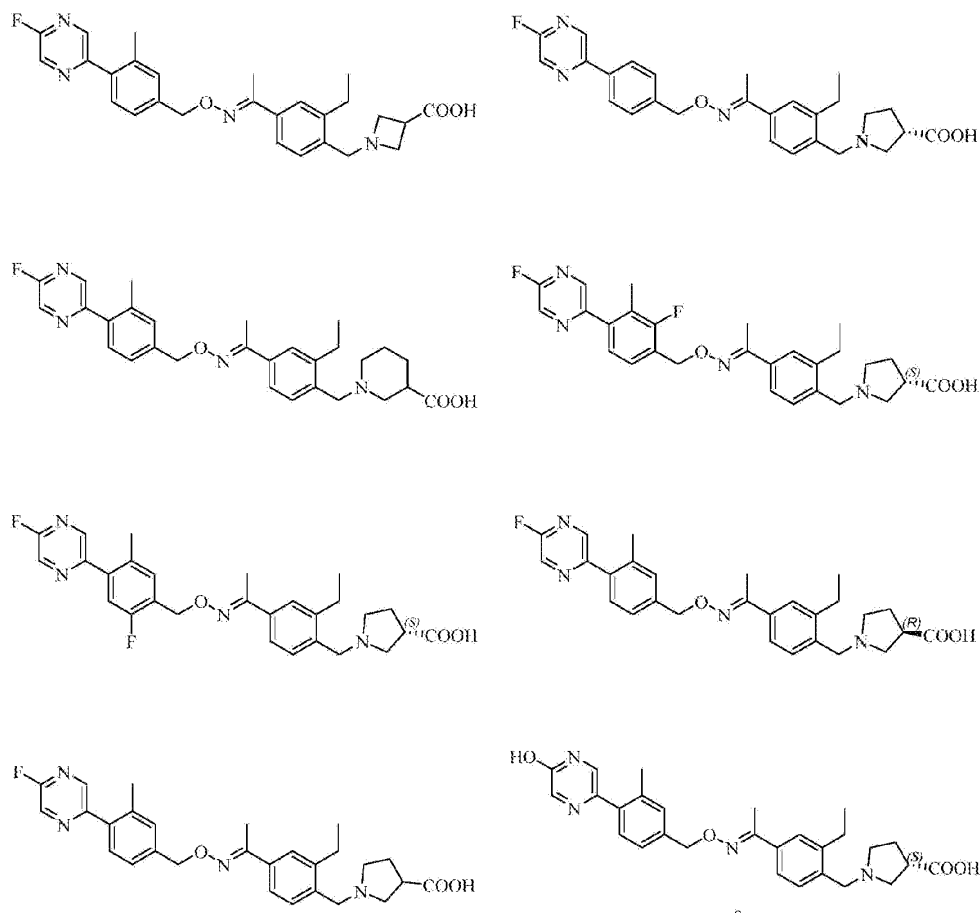








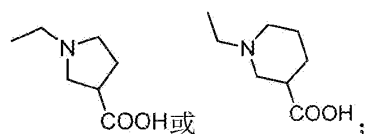




[0036] 在具体的实施方式中，式Ⅲ中，

[0037] R^1 选自下组：氢、卤素(优选F、Cl或Br)、氰基、取代或未取代的 C_1-C_5 烷氧基(优选甲氧基)、取代或未取代的 C_1-C_6 烷基(优选甲基、乙基、丙基)；

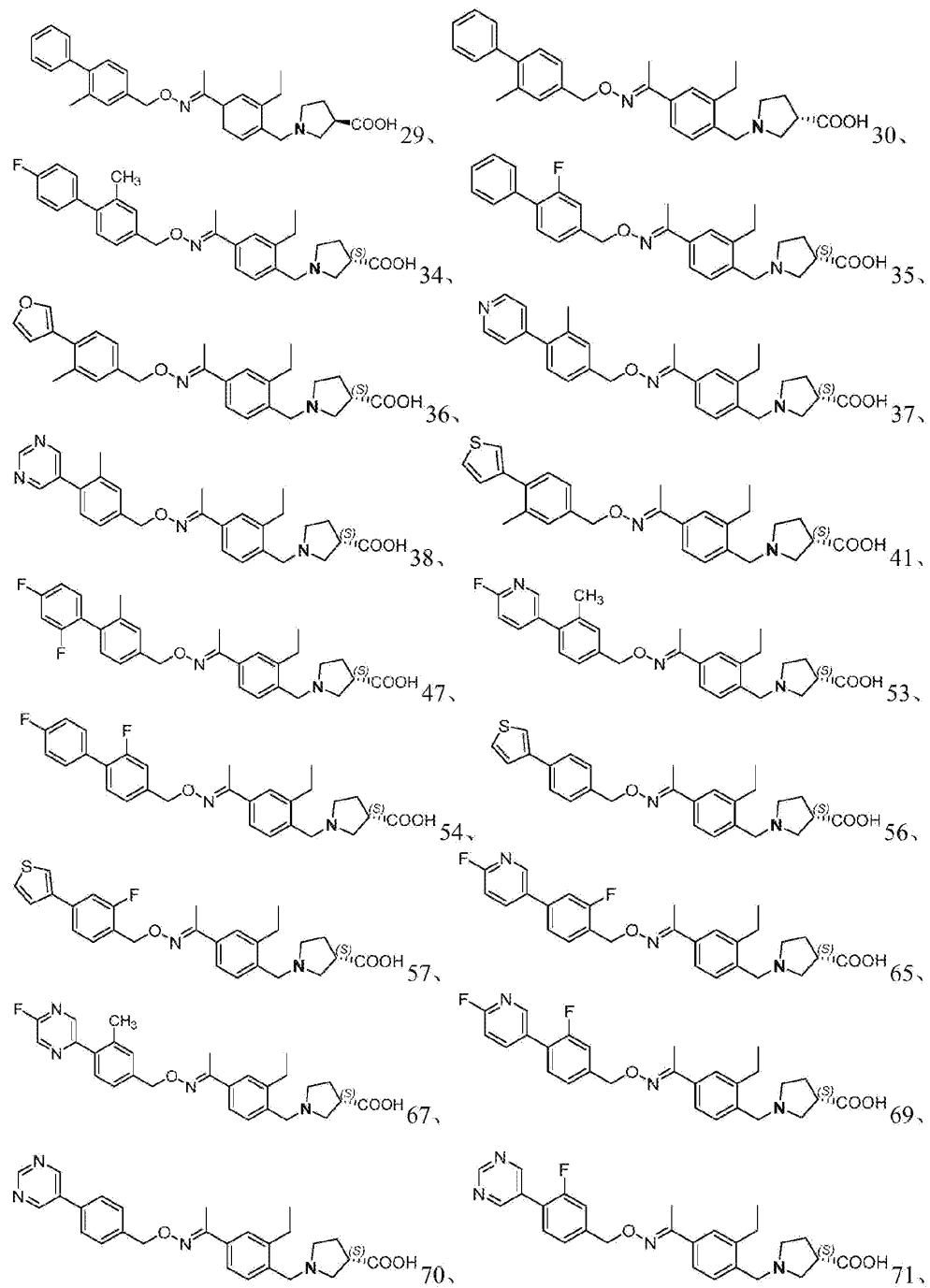
[0038] R^2 为：

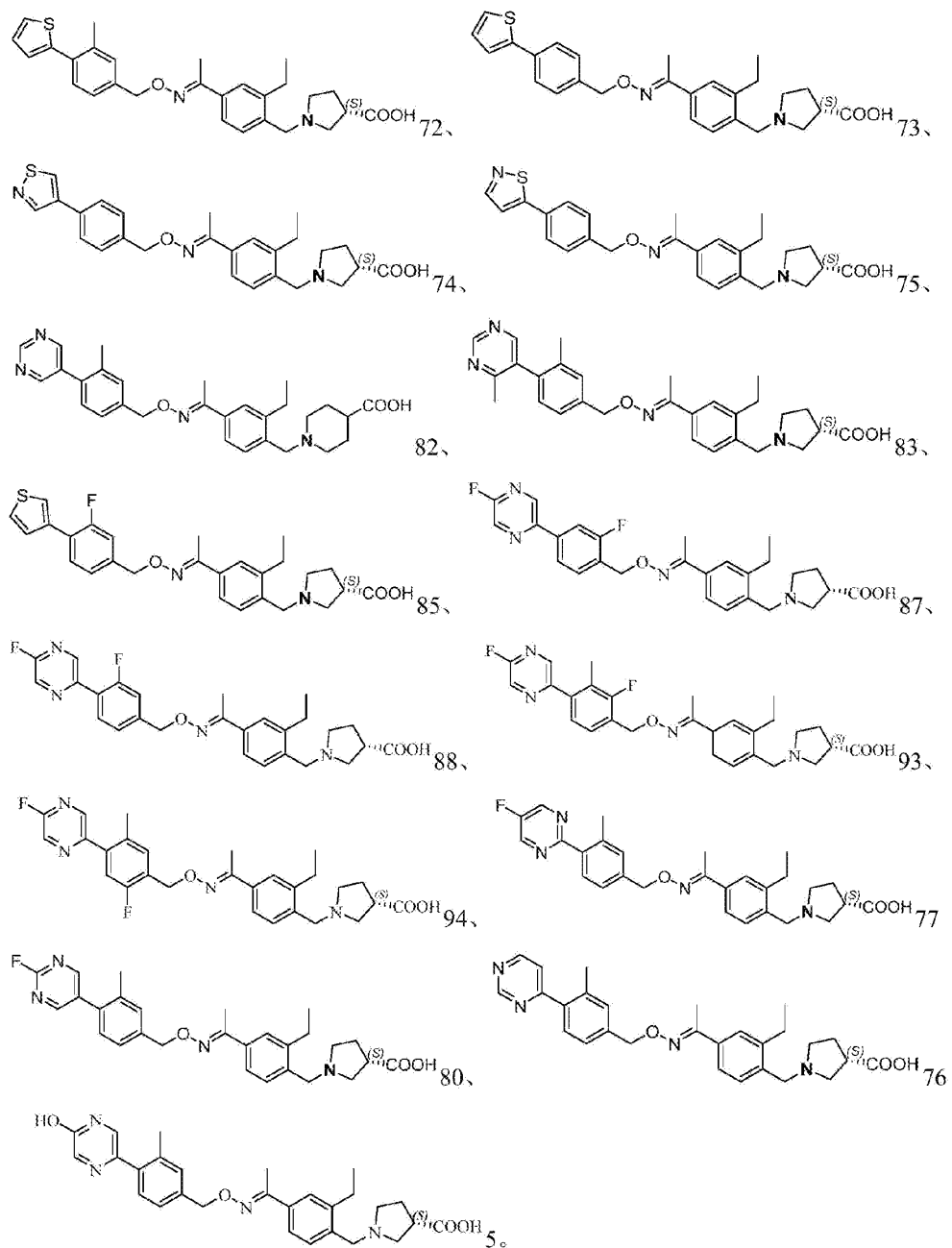


[0039] R^3 和 R^5 独立选自下组：氢、取代或未取代的 C_1-C_6 烷基(优选甲基、乙基或丙基)、卤素(优选F)；

[0040] R^4 选自下组：取代或未取代的 C_5-C_8 芳基(优选苯基或F取代的苯基)、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基或杂芳基。

[0041] 在具体的实施方式中，本发明提供选自下组的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐：

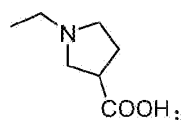




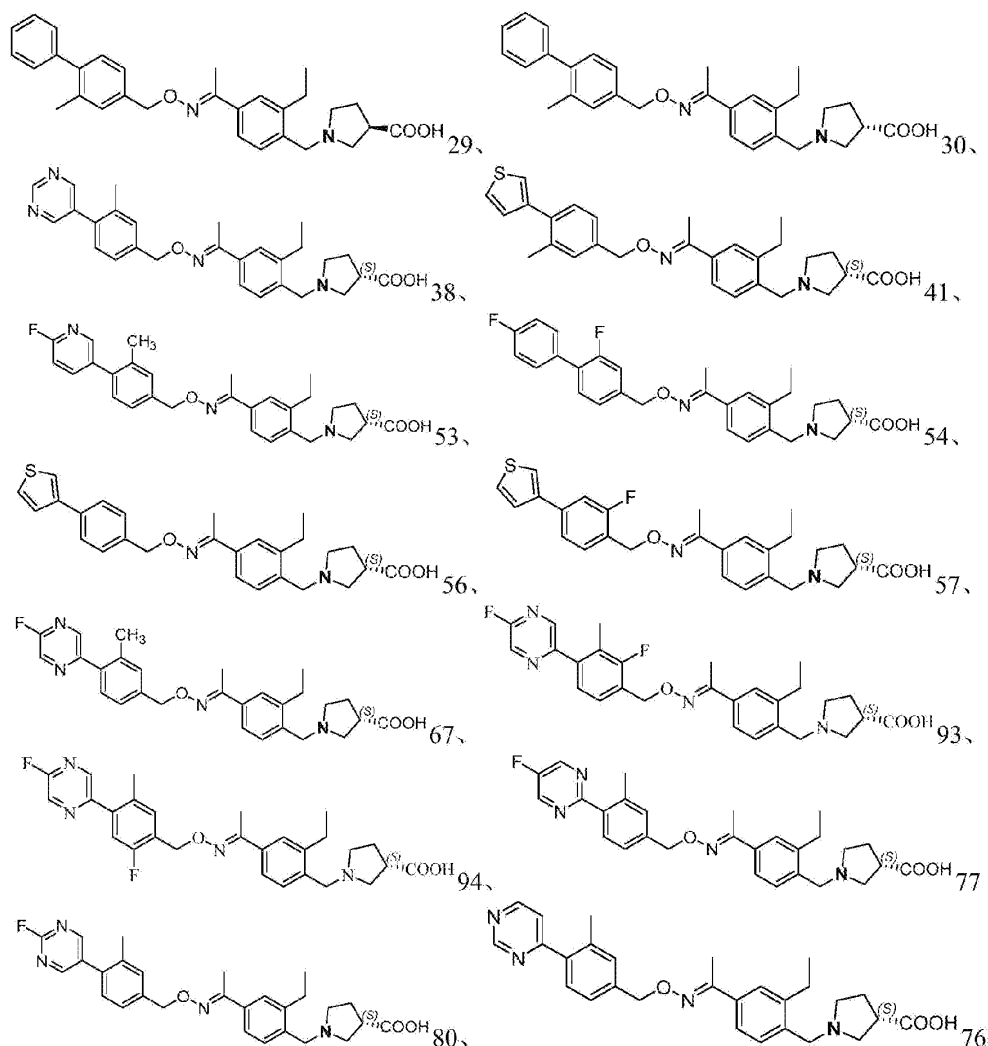
[0042] 在具体的实施方式中，式Ⅲ中，

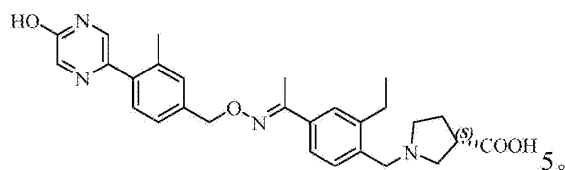
[0043] R^1 选自下组：氰基、取代或未取代的 C_1-C_5 烷氧基(优选甲氧基)、取代或未取代的 C_1-C_6 烷基(优选甲基、乙基、丙基)；

[0044] R^2 为：



- [0045] R^3 和 R^5 独立选自下组：氢、取代或未取代的 C_1 - C_3 烷基(优选甲基、乙基或丙基)、卤素(优选F)；
- [0046] R^4 选自下组：取代或未取代的 C_5 - C_8 芳基(优选苯基或F取代的苯基)、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂芳基。
- [0047] 在具体的实施方式中，本发明提供选自下组的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐：





- [0048] 在优选的实施方式中，所述化合物是S1PR调节剂；优选地，所述化合物是S1PR4激动剂；更优选地，所述化合物对S1PR4具有激动作用，而对S1PR1不具有激动作用。
- [0049] 在第二方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物含有第一方面所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体或赋形剂。
- [0050] 在优选的实施方式中，所述药物组合物是适于口服的剂型，包括但不限于片剂、溶液剂、混悬液、胶囊剂、颗粒剂、粉剂。
- [0051] 在优选的实施方式中，所述药物组合物用作S1PR4激动剂、S1PR4突变体激动剂。
- [0052] 在优选的实施方式中，所述药物组合物用于治疗或预防S1PR4介导的疾病。
- [0053] 在优选的实施方式中，所述S1PR4介导的疾病包括肌病。
- [0054] 在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：特发性炎症性肌病、感染性肌病、药物性肌病、中毒性肌病、遗传性肌病等。
- [0055] 在优选的实施方式中，在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：杜氏肌营养不良、假肥大型肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩胛肱型肌营养不良症、远端型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、先天型肌营养不良症、埃默里氏肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、肌萎缩侧索硬化等。
- [0056] 在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：脓毒症诱发的肌病、或者脓毒症获得性肌无力，尤其对腓肠肌和胫骨前肌萎缩等症状。
- [0057] 在第三方面，本发明提供第一方面所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐在制备S1PR调节剂中的用途，在优选的实施方式中，所述S1PR调节剂是S1PR4选择性激动剂、S1PR4突变体选择性激动剂。
- [0058] 在优选的实施方式中，所述S1PR调节剂是S1PR4激动剂、S1PR4突变体激动剂。

- [0059] 在优选的实施方式中，所述S1PR4激动剂、S1PR4突变体激动剂是治疗或预防S1PR4介导的疾病的药物。
- [0060] 在优选的实施方式中，所述S1PR4介导的疾病包括肌病。
- [0061] 在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：特发性炎症性肌病、感染性肌病、药物性肌病、中毒性肌病、遗传性肌病等。
- [0062] 在优选的实施方式中，在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：杜氏肌营养不良、假肥大型肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩胛肱型肌营养不良症、远端型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、先天型肌营养不良症、埃默里氏肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、肌萎缩侧索硬化等。
- [0063] 在第四方面，本发明提供一种在受试者体内调节S1PR的方法，所述方法包括将有效量的第一方面所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐或第二方面所述的药物组合物给予有此需要的受试者的步骤。
- [0064] 在优选的实施方式中，所述方法是在受试者体内激动S1PR4的方法；更优选地，所述方法是在受试者体内激动S1PR4，而不激动S1PR1的方法。
- [0065] 在优选的实施方式中，所述方法用于治疗或预防S1PR4介导的疾病。
- [0066] 在优选的实施方式中，所述S1PR4介导的疾病包括肌病。
- [0067] 在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：特发性炎症性肌病、感染性肌病、药物性肌病、中毒性肌病、遗传性肌病等。
- [0068] 在优选的实施方式中，在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：杜氏肌营养不良、假肥大型肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩胛肱型肌营养不良症、远端型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、先天型肌营养不良症、埃默里氏肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、肌萎缩侧索硬化等。
- [0069] 在第五方面，本发明提供第一方面所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐或第二方面所述的药物组合物，用于治疗或预防S1PR4介导的疾病。
- [0070] 在优选的实施方式中，所述S1PR4介导的疾病包括肌病。
- [0071] 在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：特发性炎症性肌病、感染性肌病、药物性肌病、中毒性肌病、遗传性肌病等。

- [0072] 在优选的实施方式中，在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：杜氏肌营养不良、假肥大型肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩胛肱型肌营养不良症、远端型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、先天型肌营养不良症、埃默里氏肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、肌萎缩侧索硬化等。
- [0073] 在第六方面，本发明提供一种包含第一方面所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐或第二方面所述的药物组合物，用于治疗或预防S1PR4介导的疾病药物。
- [0074] 在优选的实施方式中，所述S1PR4介导的疾病包括肌病。
- [0075] 在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：特发性炎症性肌病、感染性肌病、药物性肌病、中毒性肌病、遗传性肌病等。
- [0076] 在优选的实施方式中，在优选的实施方式中，所述肌病包括但不限于：杜氏肌营养不良、假肥大型肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩胛肱型肌营养不良症、远端型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、先天型肌营养不良症、埃默里氏肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症、肌萎缩侧索硬化等。
- [0077] 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

- [0078] 图1显示了迟发性肌营养不良谱系中S1PR4 R79C和NDUFA10 R217W的突变鉴定；其中，(a)一个包含四代的中国家系谱图。患者用黑色填充标记，症状轻微的个体用黑色方块标记，男性用方块女性圆圈表示，其中第一代和第二代已经患病。每个成员下面的符号分别表示S1PR4 R79C(绿色)和NDUFA10 R217W(紫色)的突变携带情况；(b)S1PR4 R79C位于ICL1(胞内环1)内；(c)S1PR4 R79C的Sanger测序验证；(d)NDUFA10 R217W位于脱氧核苷激酶结构域(dNK)内；和(e)NDUFA10 R217W的Sanger测序验证；
- [0079] 图2显示了S1PR4突变小鼠的爪子握力、血清中肌酸激酶水平以及肌肉纤维化的检测结果；其中，S1PR4突变鼠的爪子握力与正常小鼠无差别(图a)，S1PR4突

变鼠血清中肌酸激酶水平与WT无差别(图b)，S1PR4突变鼠肌肉未出现肌肉纤维化(HE染色和天狼猩红染色)；表明S1PR4突变不会导致肌营养不良。

- [0080] 图3显示了NDUFA10突变小鼠的爪子握力、血清中肌酸激酶水平以及肌肉纤维化的检测结果；其中，NDUFA10突变鼠的爪子握力与正常小鼠无差别(图a)，NDUFA10突变鼠血清中肌酸激酶水平与WT无差别(图b)，NDUFA10突变鼠肌肉未出现肌肉纤维化(HE染色和天狼猩红染色)；表明NDUFA10突变不会导致肌营养不良。
- [0081] 图4显示了S1PR4/NDUFA10突变小鼠的爪子握力、血清中肌酸激酶水平以及肌肉中核纤维和胶原沉积的检测结果；其中，S1PR4/NDUFA10突变鼠从5月龄开始爪子握力与正常小鼠比显著降低(图a)，S1PR4/NDUFA10突变鼠血清中肌酸激酶水平显著升高(图b)，S1PR4/NDUFA10突变鼠肌肉出现有核纤维和胶原沉积，表明肌肉出现纤维化(HE染色和天狼猩红染色)，可诊断为肌营养不良；
- [0082] 图5显示了本发明的化合物30诱导S1PR4内化后的恢复效果；
- [0083] 图6显示了双突变小鼠在给药后的体重变化；
- [0084] 图7显示了双突变小鼠在给药后的握力变化；
- [0085] 图8显示了双突变小鼠血清中肌酸激酶含量与健康小鼠相比显著升高；给药后，肌酸激酶的含量显著降低，泼尼松龙给药组无降低作用；
- [0086] 图9是给药后肌肉中间有核纤维的代表图；
- [0087] 图10显示了给药后肌肉中间有核纤维数量的检测结果；
- [0088] 图11是给药后胶原面积的代表图；
- [0089] 图12是给药后胶原面积的统计图；
- [0090] 图13是给药后巨噬细胞的免疫荧光代表图；
- [0091] 图14是给药后巨噬细胞的免疫荧光统计图；
- [0092] 图15显示了杜氏肌营养不良模型小鼠在给药后的体重变化；
- [0093] 图16显示了杜氏肌营养不良模型小鼠在给药后的握力变化；
- [0094] 图17显示了杜氏肌营养不良模型小鼠中肌酸激酶变化；
- [0095] 图18是给药后肌肉中间有核纤维的代表图；
- [0096] 图19显示了给药后肌肉中间有核纤维数量的检测结果；

- [0097] 图20是给药后胶原面积的代表图；
- [0098] 图21是给药后胶原面积的统计图；
- [0099] 图22是给药后巨噬细胞的免疫荧光代表图；
- [0100] 图23是给药后巨噬细胞的免疫荧光统计图；
- [0101] 图24显示了本发明的化合物30对LPS造模脓毒症模型中胫骨前肌(tibialis)和腓肠肌(gastrocnemius)的影响；
- [0102] 图25显示了杜氏肌营养不良模型小鼠经过给药治疗后，与模型组相比，各给药组体重变化无明显差别；
- [0103] 图26显示了经过化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg的42天治疗后，与模型组相比，各给药组小鼠的握力都有显著上升，显示出较好的治疗效果；
- [0104] 图27显示了化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg给药第42天，与模型组相比各给药组转棒时间有所上升，显示出较好的治疗效果，且化合物67 3mg/kg比Vamorolone 20mg/kg握力上升更为显著；
- [0105] 图28是给药后中间有核纤维代表图；
- [0106] 图29显示了给药后的有核纤维统计；
- [0107] 图30是给药后的胶原面积代表图；
- [0108] 图31显示了给药后的胶原面积统计；
- [0109] 图32是给药后的F4/80巨噬细胞标志物数量(肌肉炎症)代表图；
- [0110] 图33显示了给药后的F4/80巨噬细胞标志物数量(肌肉炎症)统计；
- [0111] 图34显示了给药后的血清肌酸激酶统计。

具体实施方式

- [0112] 发明人经过广泛而深入的研究，发现S1PR4激动剂在动物水平对某些肌病有治疗效果。进一步地，本发明人合成了具有S1PR4受体调节活性的候选化合物。对得到的候选化合物进行结构优化，设计并合成了一系列未见文献报道的选择性S1PR4化合物，并进行了结构表征。对此系列化合物进行了细胞水平的活性测试，得到一批具备S1PR4激动活性的化合物。这些化合物能够调节S1P受体活性，其中对S1PR4激动活性的EC₅₀值达到nM级别，对S1PR4具有很好的靶向作用。在此基础上完成了本发明。

[0113] 术语定义

[0114] 本文中涉及到的一些基团定义如下：

[0115] 本文中，“烷基”指碳链长度为1-10个碳原子的饱和的支链或直链或环烷基，优选的烷基包括长1-5个、1-2个、1-6个、1-4个、3-8个碳原子不等的烷基。烷基的例子包括但不限于：甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、庚基等。烷基可以被1个或多个取代基取代，例如被卤素或卤代烷基取代。例如，烷基可以是被1-4个氟原子取代的烷基，或者烷基可以是被氟代烷基取代的烷基。

[0116] 本文中，“链烯基”通常表示具有至少一个双键的单价烃基，通常含有2-8个碳原子，优选含有2-6个碳原子，可以是直链或支链。链烯基的例子包括但不限于乙烯基、丙烯基、异丙烯基、丁烯基、异丁烯基、己烯基等等。

[0117] 本文中，“酯基”通常表示具有至少一个酯基的羧酸衍生物，通常含有3-8个碳原子，优选含有3-6个碳原子，可以是直链或支链。酯基的例子包括但不限于甲酸甲酯、甲酸乙酯、乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙酸丙酯等等。

[0118] 本文中，“羟基”指碳链长度为1-10个碳原子的支链或直链醇，通常含有1-10个碳原子，优选含有1-6个碳原子，可以是直链或支链。酯羟基的例子包括但不限于1-羟基正丁基、1-羟基异丁基等等。

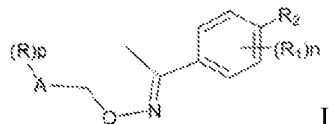
[0119] 本文中，“酰氨基”指结构式为“-R'-NH-C(O)-R”的基团，其中，R'可选自氢或烷基，R可选自烷基、链烯基、炔基、被NR_cR_d取代的烷基、被NR_cR_d取代的链烯基和NR_cR_d取代的炔基、被卤素取代的烷基、被氰基取代的链烯基，其中，R_c和R_d可选自烷基和链烯基。

[0120] 本文中，“芳基”指含有6到14个碳原子的单环、双环或三环芳族基团，包括苯基、萘基、菲基、蒽基、茚基、茱基、茱基、四氢化萘基、二氢化茱基等。芳基可任选地被1-5个(例如，1、2、3、4或5个)选自以下的取代基取代：卤素、C₁₋₄醛基、C₁₋₆烷基、氰基、硝基、氨基、酰胺基、羟基、羟甲基、卤素取代的烷基(例如三氟甲基)、卤素取代的烷氧基(例如三氟甲氧基)、羧基、C₁₋₄烷氧基、乙氧甲酰基、N(CH₃)和C₁₋₄酰基等、杂环基或杂芳基等。

- [0121] 本文中，“杂环基”包括但不限于含有1-3个选自O、S或N的杂原子的5元或6元杂环基团，包括但不限于呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡咯烷基、吡唑基、咪唑基、三唑基、噁唑基、吡喃基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、哌啶基、吗啉基等。
- [0122] 本文中，“芳杂环基”是指含有5-14个环原子，并且有6个、10个或14个电子在环体系上共用。而且所含环原子是碳原子和从氧、氮、硫中任选的1-3个杂原子。有用的芳杂环基包括哌嗪基、吗啉基、哌啶基、吡咯烷基、噻吩基、呋喃基、吡喃基、吡咯基、咪唑基、吡唑基、吡啶基、包括但不限于嘧啶基等。芳杂环基可任选地被1-5个(例如，1、2、3、4或5个)选自以下的取代基取代：卤素、C₁₋₄醛基、C₁₋₆直链或支链烷基、氰基、硝基、氨基、羟基、羟甲基、卤素取代的烷基(例如三氟甲基)、卤素取代的烷氧基(例如三氟甲氧基)、羧基、C₁₋₄烷氧基、乙氧甲酰基、N(CH₃)和C₁₋₄酰基。
- [0123] 本文中，“烷氧基”指被烷基取代的氧基。优选的烷氧基是长1-6个碳原子的烷氧基，更优选为长1-3个碳原子的烷氧基。烷氧基的例子包括但不限于：甲氧基、乙氧基、丙氧基等。烷氧基可以被1个或多个取代基取代，例如被卤素或卤代烷基取代。例如，烷氧基可以是被1-4个氟原子取代的烷基，或者烷基可以是被氟代烷基取代的烷基。
- [0124] 本文中，“卤素”指氟、氯、溴或碘。
- [0125] 本文中，“任选取代的”指其所修饰的取代基可任选地被1-5个(例如，1、2、3、4或5个)选自以下的取代基取代：卤素、C₁₋₄醛基、C₁₋₆直链或支链烷基、氰基、硝基、氨基、羟基、羟甲基、卤素取代的烷基(例如三氟甲基)、卤素取代的烷氧基(例如三氟甲氧基)、羧基、C₁₋₄烷氧基、乙氧甲酰基、N(CH₃)和C₁₋₄酰基。
- [0126] 本发明的化合物
- [0127] 本发明人发现一个家系中的男性和女性从50岁开始表现出肌营养不良表型，并且随着年龄的增加而加重，表现出很强的家族遗传性疾病特征。通过对这个家系进行全基因测序等研究，发现NDUFA10和S1PR4突变是肌营养不良疾病的潜在致病基因突变。

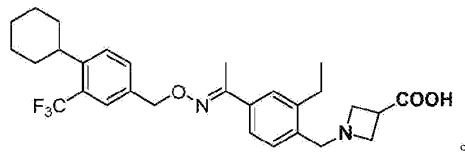
[0128] 鉴于目前临床上还没有靶向S1PR₄的药物，上市和在研的S1P受体调节剂主要集中在S1PR₁和S1PR₅相关靶点。本发明人设计并合成了一系列结构全新的在S1PR的不同亚型之间具有选择性的化合物。因此，本发明的化合物对S1PR的不同亚型具有不同的调节作用；换言之，本发明的化合物是S1PR的调节剂。在具体的实施方式中，本发明的化合物是S1PR₄激动剂。在优选的实施方式中，本发明的化合物在S1PR₄和S1PR₁之间具有选择性；即，本发明的化合物对S1PR₄具有激动作用，但对S1PR₁不具有激动作用。

[0129] 在具体的实施方式中，本发明的化合物是下式I所示的化合物，或其光学异构体或药学上可接受的盐，

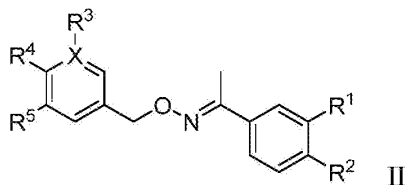


[0130] 式中，A、R、R¹、n、R²、m、q如上所述。

[0131] 在优选的实施方式中，本发明的化合物不包括以下化合物：

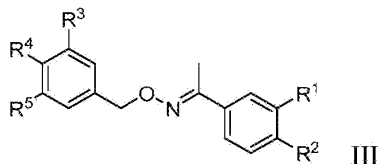


[0132] 在优选的实施方式中，本发明的化合物如下式II所示，



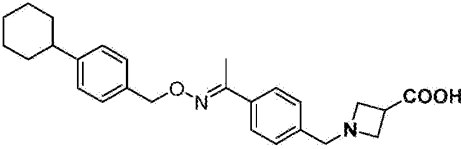
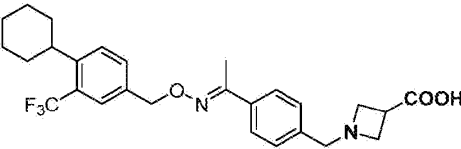
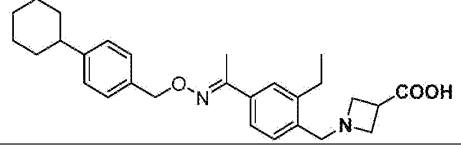
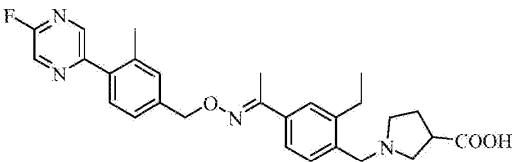
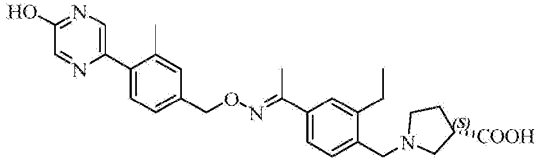
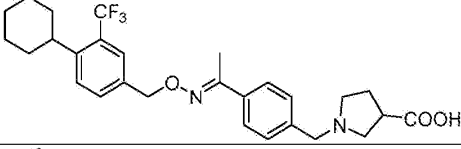
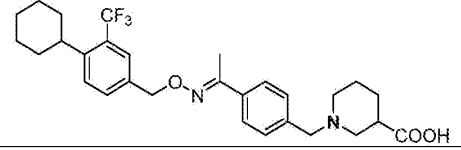
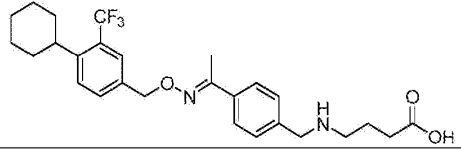
[0133] 式中，R¹、R²、X、R³、R⁴、R⁵如上所述。

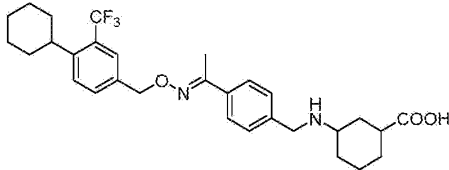
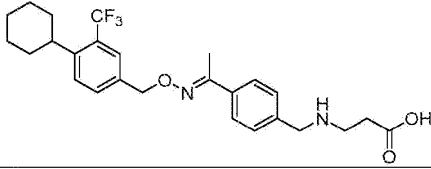
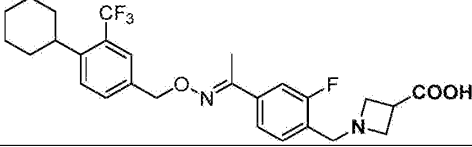
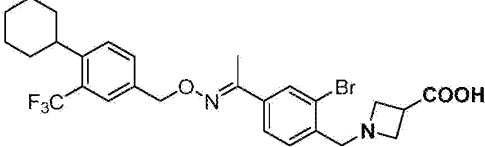
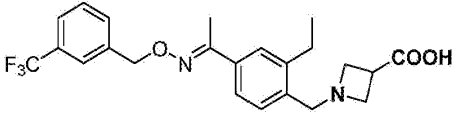
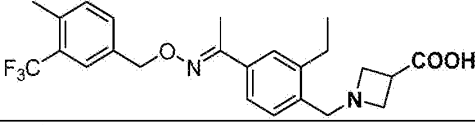
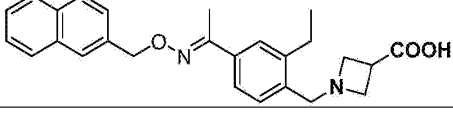
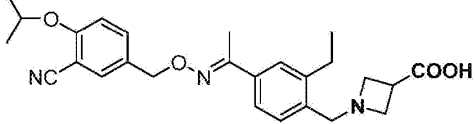
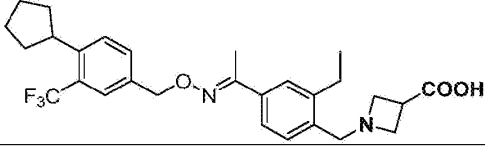
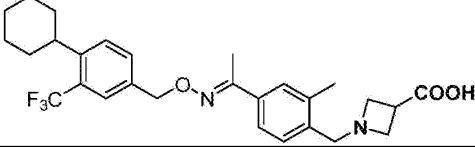
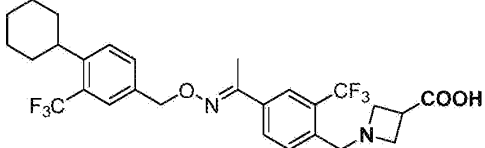
[0134] 在优选的实施方式中，本发明的化合物如下式III所示，

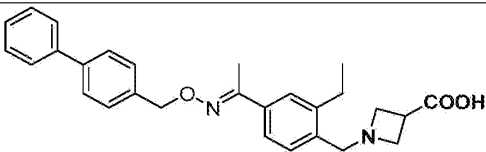
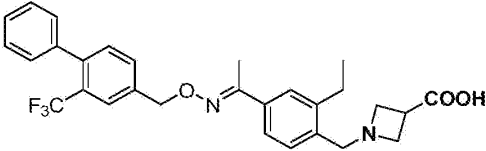
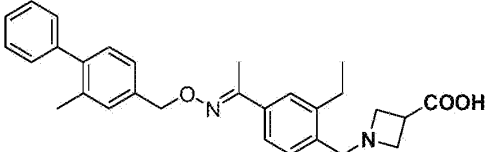
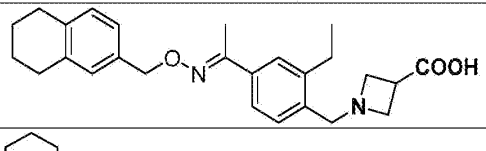
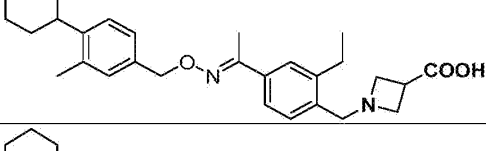
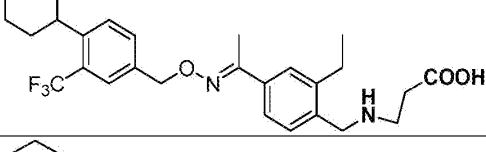
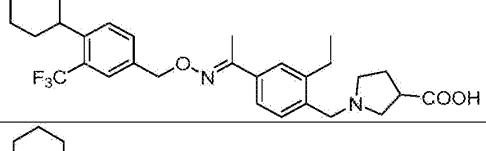
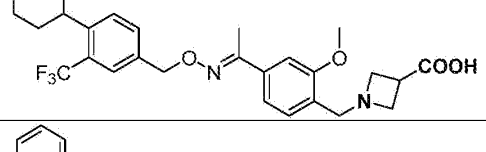
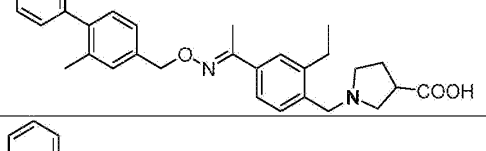
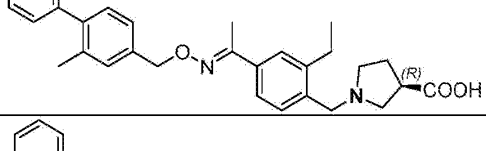
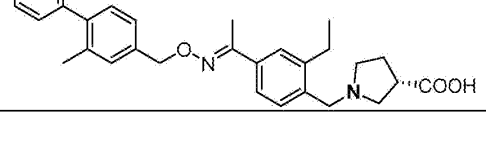


[0135] 式中， R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 如上所述。

[0136] 具体地说，本发明提供选自下组的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐：

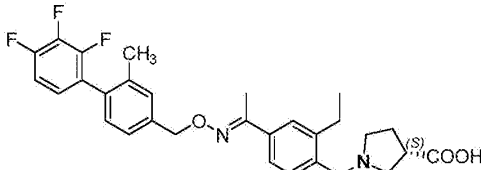
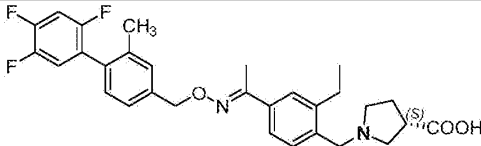
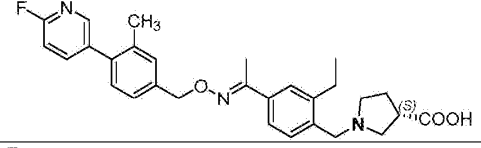
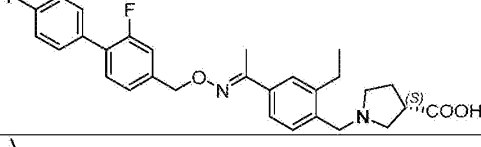
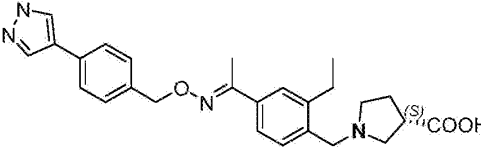
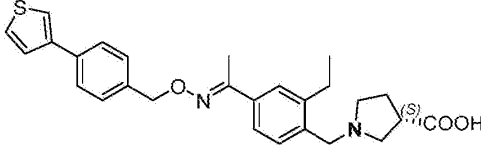
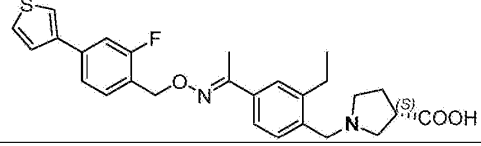
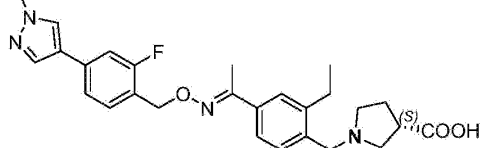
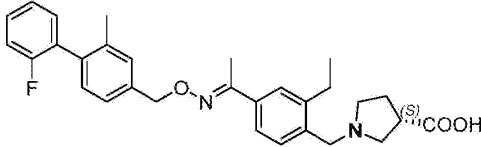
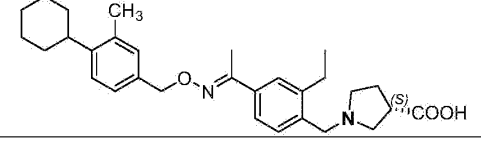
化合物编号	结构式
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	

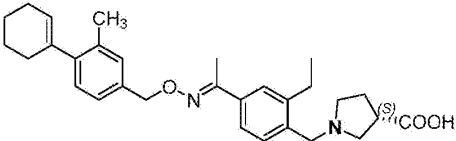
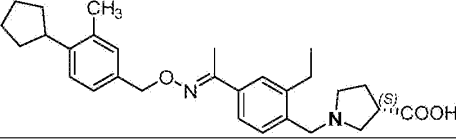
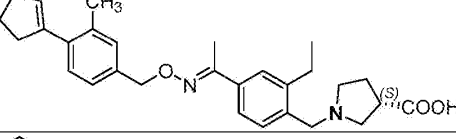
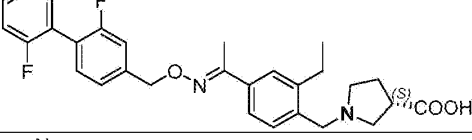
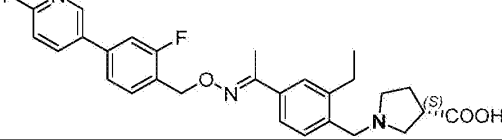
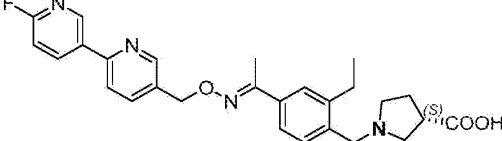
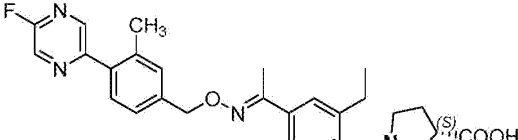
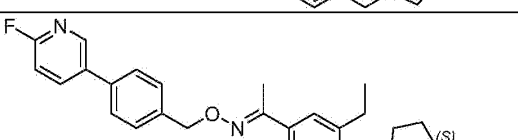
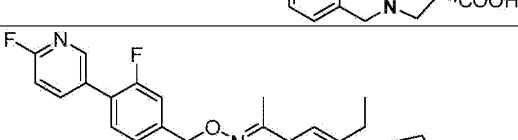
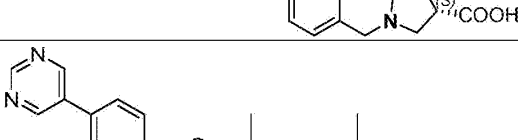
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	

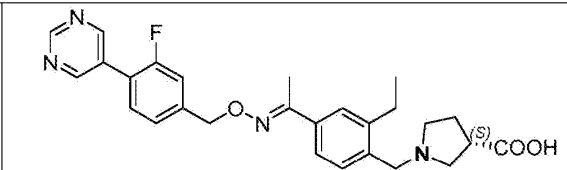
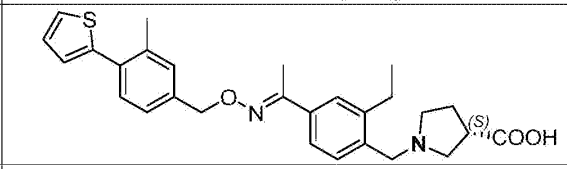
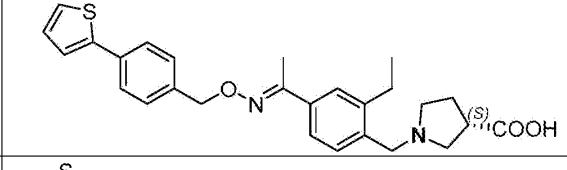
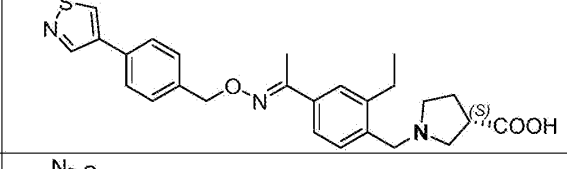
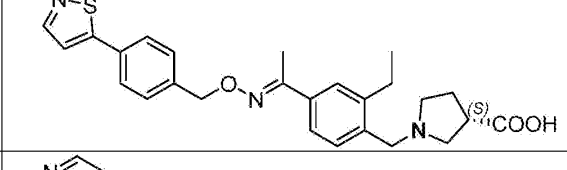
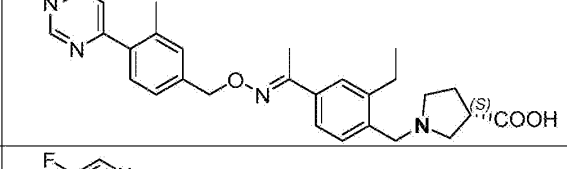
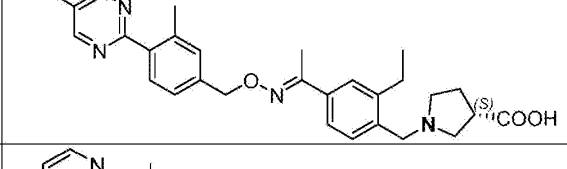
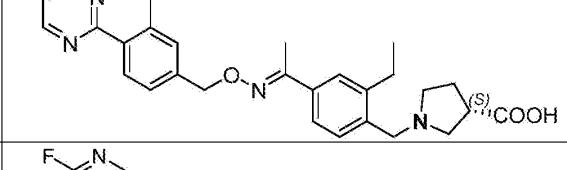
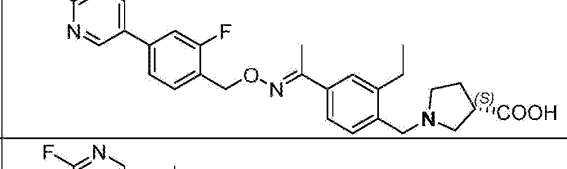
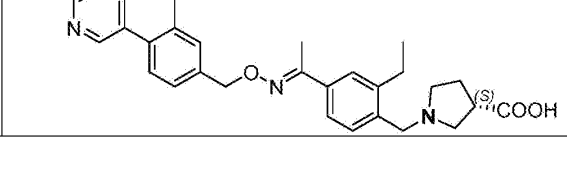
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	

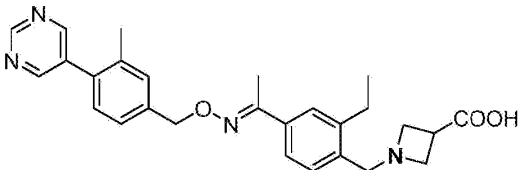
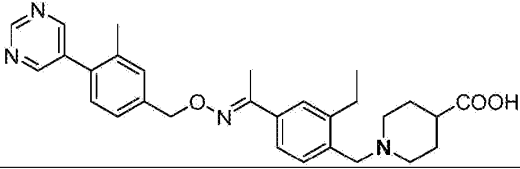
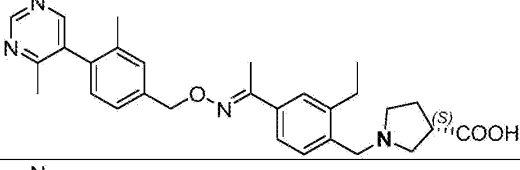
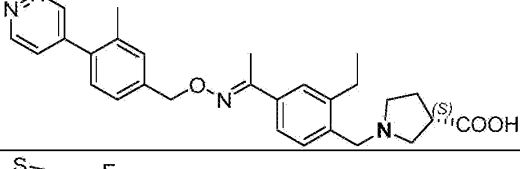
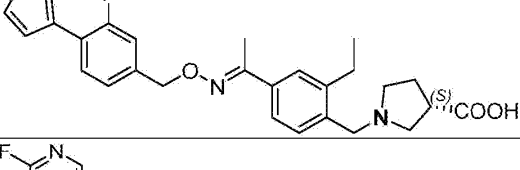
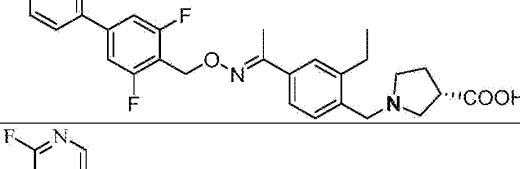
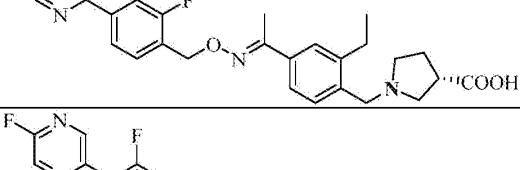
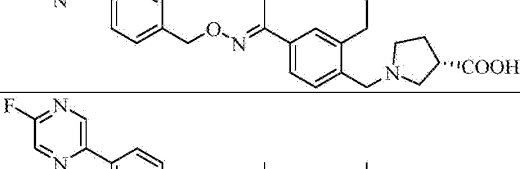
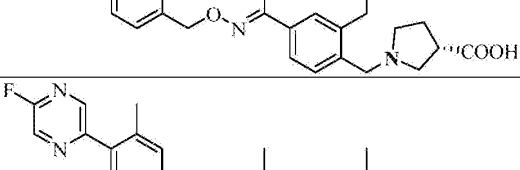
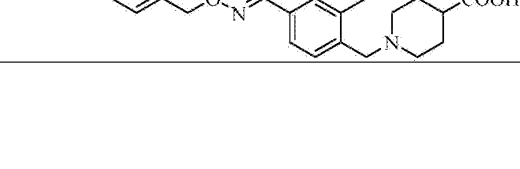
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	

41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	
48	
49	
50	

51	
52	
53	
54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	

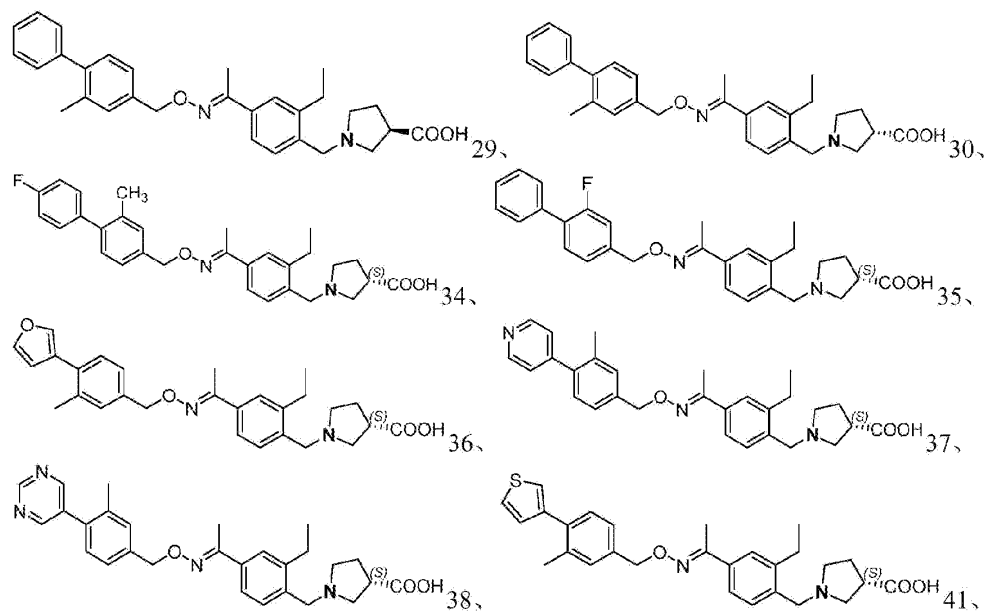
61	
62	
63	
64	
65	
66	
67	
68	
69	
70	

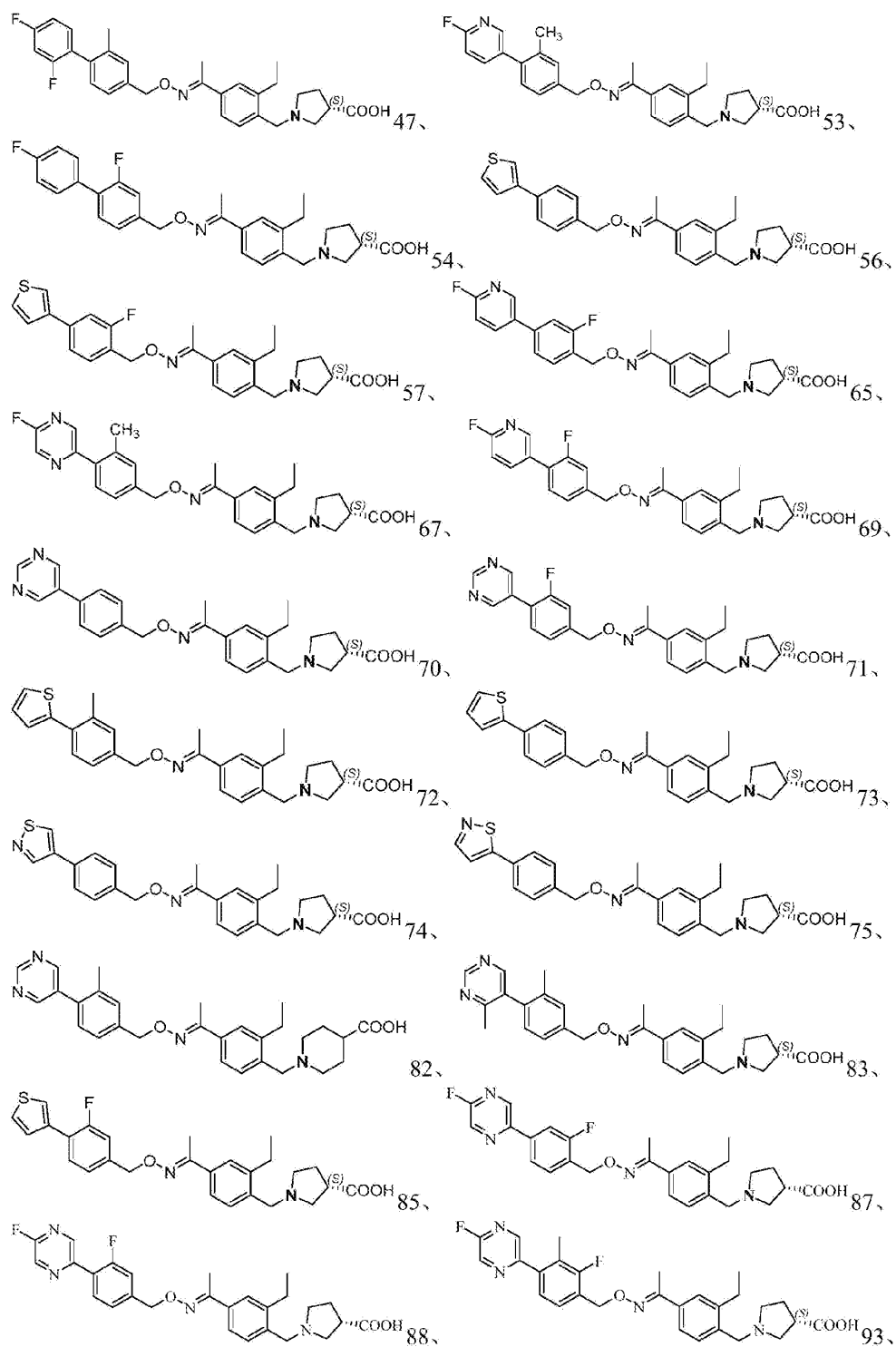
71	
72	
73	
74	
75	
76	
77	
78	
79	
80	

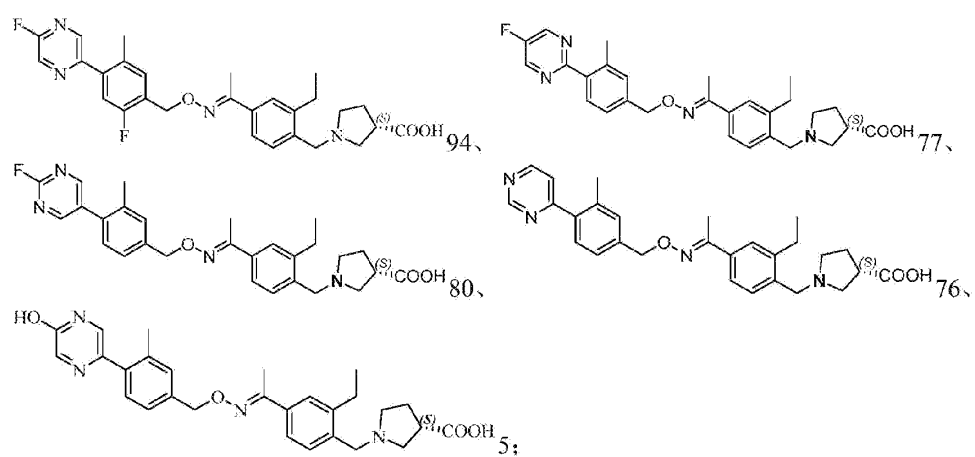
81	
82	
83	
84	
85	
86	
87	
88	
89	
90	

91	
92	
93	
94	
95	

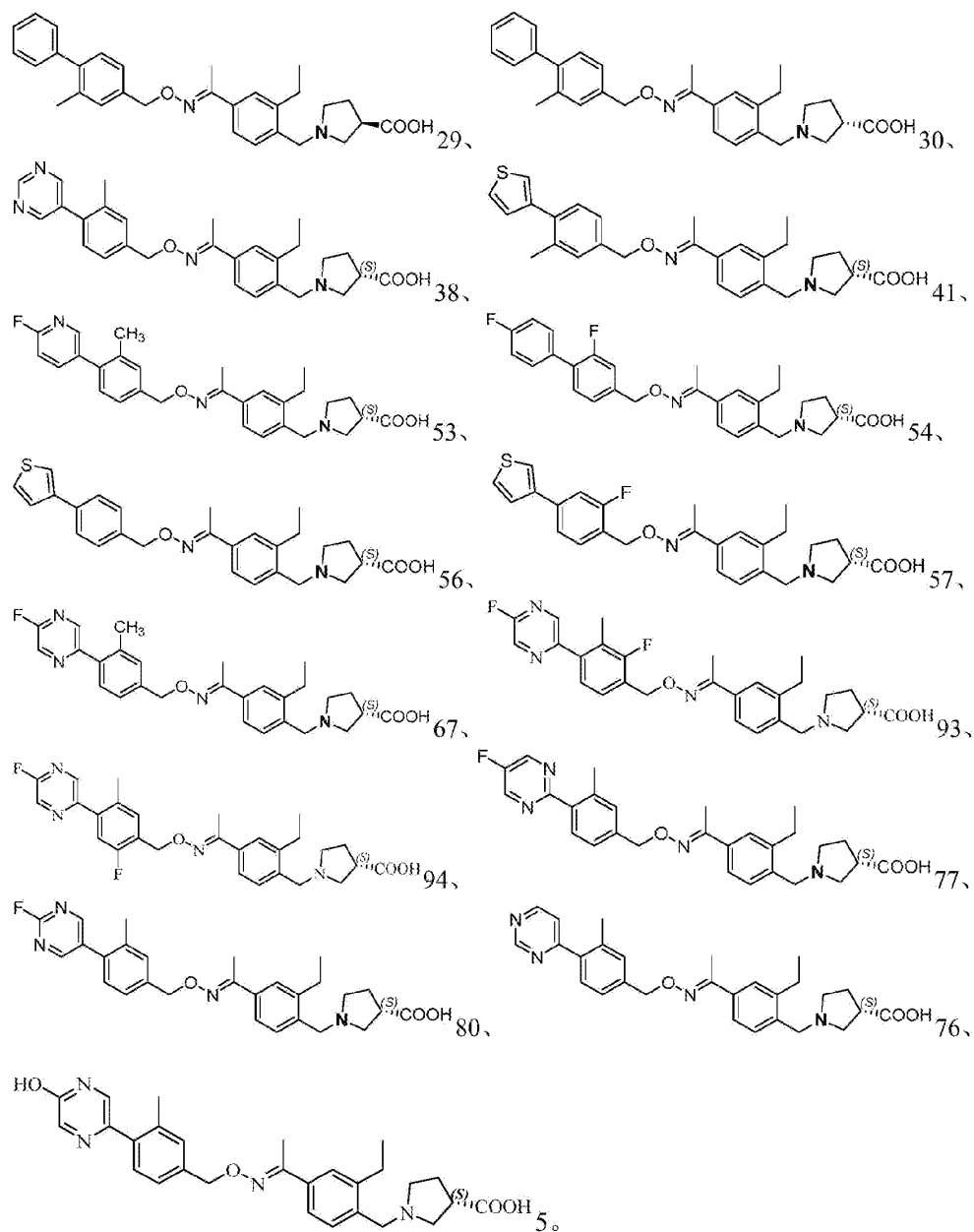
[0137] 优选以下化合物：







[0138] 更优选以下化合物：



[0139] 在本发明的化合物的基础上，本发明提供一种药物组合物，该组合物含有治疗有效量的本发明的化合物或其药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[0140] 本发明化合物的药学上可接受的盐的例子包括但不限于无机和有机酸盐，例如盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马

酸盐、扁桃酸盐和草酸盐；以及与如钠羟基、三(羟基甲基)胺基甲烷(TRIS, 胺丁三醇)和N-甲基葡萄糖胺等碱形成的无机和有机碱盐。

- [0141] 本发明的药物组合物可被配制成适合各种给药途径的制剂形式，包括但不限于被配制成用于肠外，皮下，静脉，肌肉，腹腔内，透皮，口腔，鞘内，颅内，鼻腔或外用途给药的形式，用于治疗肿瘤和其他疾病。给药量是有效地改善或消除一个或多个病症的药量。对于特定疾病的治疗，有效量是足以改善或以某些方式减轻与疾病有关的症状的药量。这样的药量可作为单一剂量施用，或者可依据有效的治疗方案给药。给药量也许可治愈疾病，但是给药通常是为了改善疾病的症状。一般需要反复给药来实现所需的症状改善。药的剂量将根据病人的年龄，健康与体重，并行治疗的种类，治疗的频率，以及所需治疗效益来决定。
- [0142] 本发明的药物制剂可以给予任何哺乳动物，只要他们能获得本发明化合物的治疗效果。在这些哺乳动物中最为重要的是人类。
- [0143] 本发明的化合物或其药物组合物可用于制备S1PR调节剂。在具体的实施方式中，所述S1PR调节剂是S1PR4激动剂、S1PR4突变体激动剂。由此，本发明的化合物或其药物组合物可用于治疗各种由S1PR4(包括其突变体)介导的疾病，包括肌病或自身免疫疾病。在具体的实施方式中，所述S1PR4(包括其突变体)介导的肌肉疾病为特发性炎症性肌病、感染性肌病、药物性肌病、中毒性肌病、遗传性肌病等，具体包括(但不限于)杜氏肌营养不良、假肥大型肌营养不良症、肢带型肌营养不良症、面肩胛肱型肌营养不良症、远端型肌营养不良症、强直性肌营养不良症、先天型肌营养不良症、埃默里氏肌营养不良症、眼咽型肌营养不良症。
- [0144] 本发明的药物制剂可用已知的方式制造。例如，由传统的混合，制粒，制锭，溶解，或冷冻干燥过程制造。制造口服制剂时，可结合固体辅料和活性化合物，选择性研磨混合物。如果需要或必要时加入适量助剂后，加工颗粒混合物，获得片剂或锭剂芯。
- [0145] 合适的辅料特别是填料，例如糖类如乳糖或蔗糖，甘露醇或山梨醇；纤维素制剂或钙磷酸盐，例如磷酸三钙或磷酸氢钙；以及粘结剂，例如淀粉糊，包括玉

米淀粉，小麦淀粉，大米淀粉，马铃薯淀粉，明胶，黄芪胶，甲基纤维素，羟丙基甲基纤维素，羧甲基纤维素钠，或聚乙烯吡咯烷酮。如果需要，可增加崩解剂，比如上面提到的淀粉，以及羧甲基淀粉，交联聚乙烯吡咯烷酮，琼脂，或褐藻酸或其盐，如海藻酸钠。辅助剂特别是流动调节剂和润滑剂，例如，硅石，滑石，硬脂酸盐类，如镁硬脂酸钙，硬脂酸或聚乙二醇。如果需要，可以给錠剂核芯提供可以抵抗胃液的合适包衣。为此，可以应用浓缩糖类溶液。这个溶液可以含有阿拉伯树胶，滑石，聚乙烯吡咯烷酮，聚乙二醇和/或二氧化钛，漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。为了制备耐胃液的包衣，可使用适当的纤维素溶液，例如醋酸纤维素邻苯二甲酸或羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸。可向药片或錠剂核芯的包衣加入染料或色素。例如，用于识别或为了表征活性成分剂量的组合。

[0146] 基于上述化合物和药物组合物，本发明进一步提供一种治疗S1PR4介导的疾病的方法，该方法包括给予需要的对象以本发明的化合物或药物组合物。

[0147] 给药方法包括但不限于本领域周知的各种给药方法，可根据患者的实际情况加以确定。这些方法包括但不限于肠外、皮下、静脉、肌肉、腹腔内、透皮、口腔、鞘内、颅内、鼻腔或外用途给药。

[0148] 鉴于本发明的化合物或其药物组合物可用于制备S1PR调节剂，本发明还提供了在受试者体内调节S1PR的方法，包括将有效量的本发明化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐或药物组合物给予有此需要的受试者。在具体的实施方式中，所述方法是在受试者体内激动S1PR4的方法；更优选地，所述方法在受试者体内激动S1PR4，而不激动S1PR1。

[0149] 本发明的优点：

[0150] 1.本发明提供的化合物是一种结构全新的S1PR调节剂，特别是S1PR4选择性受体调节剂；

[0151] 2.本发明提供的化合物对S1PR4及S1PR4突变蛋白具有优异的生物活性；

[0152] 3.本发明提供的化合物为开发能靶向S1PR4靶标的药物奠定了基础，具备极大的产业化和商品化前景以及市场价值，经济效益显著。

[0153] 以下结合具体实施案例对本发明的技术方案进一步描述，但以下实施案例不构成对本发明的限制，所有依据本发明的原理和技术手段采用的各种施用方法，均属于本发明范围。下列实施案例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

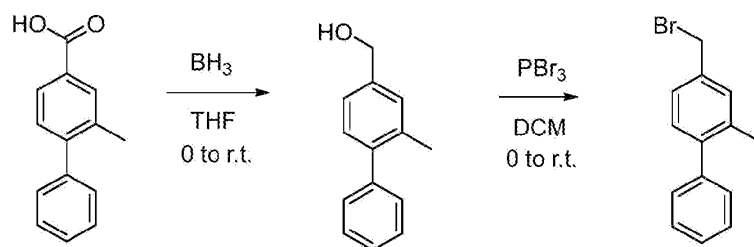
[0154] 材料与方法

[0155] 本发明的化合物的合成如下所示：

[0156] 实施例1

[0157] 化合物的合成

[0158] 4-(溴甲基)-2-甲基-1,1'-联苯的合成

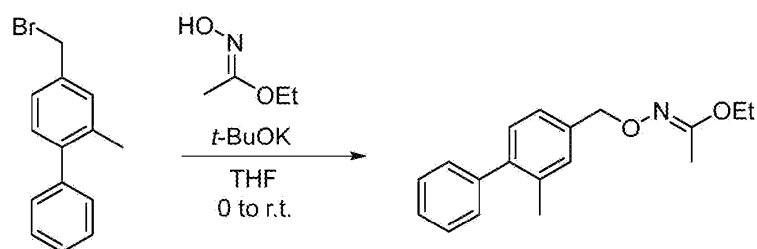


[0159] 将3-甲基-4-苯基苯甲酸(2.00g, 9.40mmol)溶解于10mL无水四氢呋喃中，置于冰浴下搅拌。将1.0M的硼烷四氢呋喃溶液(14mL, 14.20mmol)逐滴加入。滴完恢复室温搅拌。2小时后反应完全，逐滴加水进行淬灭，然后二氯甲烷进行萃取。饱和食盐水洗涤。合并有机相，用无水硫酸钠干燥，减压浓缩得无色油状物1.50g，收率80.6%，产物不需进一步纯化直接用于下一步。LC-MS(ESI):m/z:199.1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

[0160] 将(2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲醇(1.50g, 7.60mmol)溶解于10mL二氯甲烷中，冰浴下滴加三溴化磷(820mg, 3.10mmol)，滴加完毕恢复室温搅拌，0.5小时后反应完全。加水淬灭后用二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥，减压浓缩得无色油状物1.80g，收率91.0%。

[0161] ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 7.45(dd,J=14.9,7.9Hz,2H),7.39-7.30(m,5H),7.18(d,J=7.8Hz,1H),4.72(s,2H),2.21(s,3H).LC-MS(ESI):m/z:261.3($\text{M}+\text{H}$)⁺.

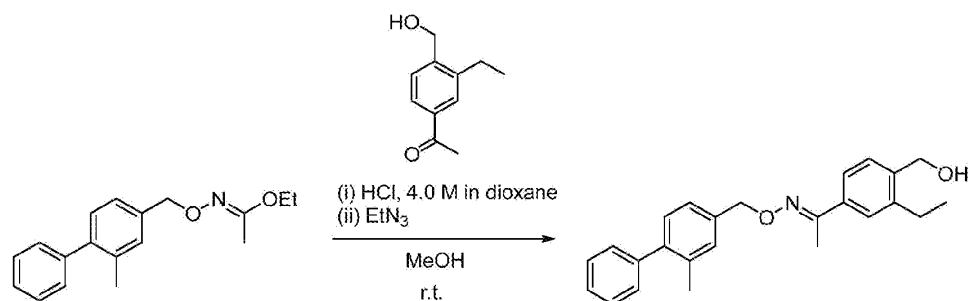
[0162] (E)-N-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)乙酰氨基甲酸乙酯的合成



[0163] 将乙酰羟肟酸乙酯(400mg, 3.90mmol)溶解于10mL四氢呋喃溶液中, 然后置于冰浴下。向反应体系中滴加1.0M的叔丁醇钾四氢呋喃溶液(15.2mL, 15.20mmol)。滴加完毕继续在冰浴下搅拌0.5小时。将4-(溴甲基)-2-甲基-1,1'-联苯(1.01g, 3.90mmol)溶解于5mL四氢呋喃中, 然后滴加到反应体系中。滴加完毕恢复到室温搅拌, TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应, 用二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩, 过硅胶柱得油状无色液体821mg, 收率74.4%。

[0164] ^1H NMR(400MHz,DMSO- d_6) δ 7.43(t,J=7.3Hz,2H),7.38–7.30(m,3H),7.27–7.16(m,3H),4.89(s,2H),3.95(q,J=7.5Hz,2H),2.22(s,3H),1.90(s,3H),1.20(t,J=7.5Hz,3H).

[0165] (E)-1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙烷-1-酮O-((2-甲基-1,1'-联苯)-4-基)甲氧基肟的合成

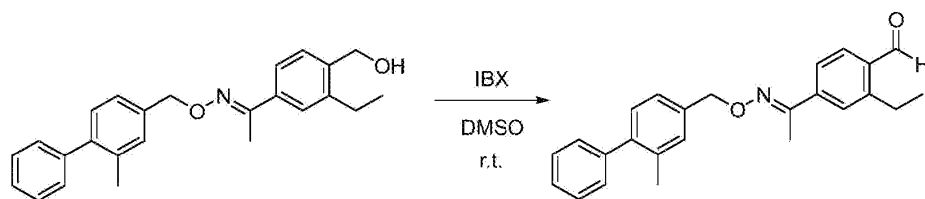


[0166] 将(E)-N-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)乙酰氨基甲酸乙酯(200mg, 0.70mmol)溶解于5mL甲醇中。滴加4.0M的氯化氢二氧六环溶液(0.4mL, 0.30mmol)到反应液中。搅拌0.5小时后滴加三乙胺调节pH=4–6之间。然后将1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙酮(125mg, 0.70mmol)溶解于2mL甲醇中滴加到反应体系中。TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应, 用二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗

涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱，得油状无色液体140mg，收率53.6%。

[0167] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.46(s, 1H), 7.42(dd, $J=8.0, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.36–7.27(m, 4H), 7.29–7.18(m, 3H), 7.18–7.06(m, 2H), 5.18(s, 2H), 4.66(s, 2H), 2.65(q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.21(s, 3H), 1.50(s, 3H), 1.18(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

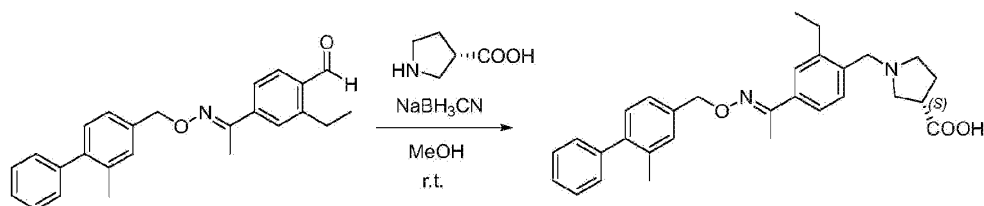
[0168] (E)-2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基乙基)苯甲醛的合成



[0169] 将(E)-1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙烷-1-酮O-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲基)肟(112mg, 0.30mmol)溶解在3mL的DMSO溶剂中。加入2-碘酰苯甲酸(IBX)氧化剂(84mg, 0.30mmol)。然后室温搅拌大约2小时。TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应，用二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩得油状无色液体99mg，收率89.1%。

[0170] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.29(s, 1H), 7.82(d, $J=6.4\text{Hz}$, 1H), 7.64(dd, $J=12.9, 5.5\text{Hz}$, 1H), 7.60(d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H), 7.40(dd, $J=18.7, 11.4\text{Hz}$, 2H), 7.36–7.30(m, 5H), 7.25–7.19(m, 1H), 5.29(s, 2H), 3.09(q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.31(s, 3H), 2.30(s, 3H), 1.33(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

[0171] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸的合成(化合物30)



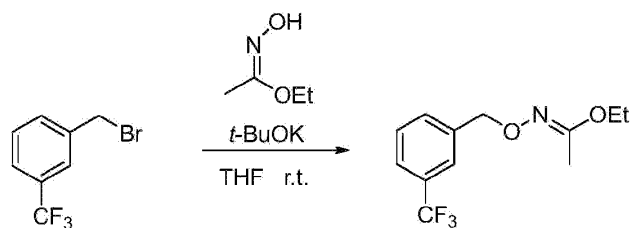
[0172] 将(E)-2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基乙基)苯甲醛(74mg, 0.20mmol)溶解于5mL的甲醇中加入1滴乙酸，然后加入S-吡咯烷3-甲酸(35mg, 0.30mmol)。室温搅拌3分钟后加入氰基硼氢化钠(19mg, 0.30mmol)。T

LC监测反应进度。反应完全后将反应体系减压蒸馏，加入水和二氯甲烷进行萃取。饱和食盐水洗涤，合并有机相并用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱，得白色固体29mg，收率30.8%。

[0173] ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 7.57(s,1H),7.51(dJ=8.0Hz,1H),7.44–7.35(m,3H),7.33–7.26(m,5H),7.17(dJ=7.7Hz,1H),5.20(s,2H),4.02(s,2H),3.19(tJ=8.6Hz,1H),3.11–3.00(m,3H),2.90(ddJ=17.2,7.9Hz,1H),2.79(qJ=7.5Hz,2H),2.26(s,3H),2.24(s,3H),2.15(ddJ=14.6,7.3Hz,2H),1.23(tJ=7.5Hz,3H). ^{13}C NMR(151MHz, CD_3OD) δ 179.95,154.70,143.25,141.79,141.48,137.08,136.62,134.91,130.01,129.84,129.31,128.79,127.77,126.49,126.28,125.37,123.57,75.60,57.40,55.54,53.76,44.56,28.06,25.20,19.22,14.48,11.50.HRMS(ESI)(m/z):[M+H] $^+$ calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3$,471.2648; found:471.2650.HPLC Purity:98.16%,retention time:1.52min.

[0174] 代表性化合物13的合成路线如下：

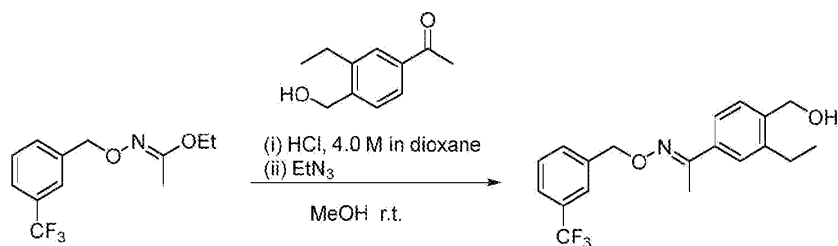
[0175] (E)-N-((3-(三氟甲基)苄基)氧基)乙酰氨基甲酸乙酯的合成



[0176] 将乙酰羟肟酸乙酯(865mg, 8.40mmol)溶解于10mL四氢呋喃溶液中，然后置于冰浴下。向反应体系中滴加1.0M的叔丁醇钾四氢呋喃溶液(17mL, 16.70mmol)。滴加完毕继续在冰浴下搅拌0.5小时。将3-(三氟甲基)溴苄(1.99g, 8.40mmol)溶解于5mL四氢呋喃中，然后滴加到反应体系中。滴加完毕恢复到室温搅拌，TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应，用二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱，得油状无色液体1.81g，收率82.6%。

[0177] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.63(s,1H),7.54(dJ=7.1Hz,2H),7.45(tJ=7.7Hz,1H),4.97(s,2H),3.98(qJ=7.1Hz,2H),1.95(s,3H),1.24(tJ=7.1Hz,3H).

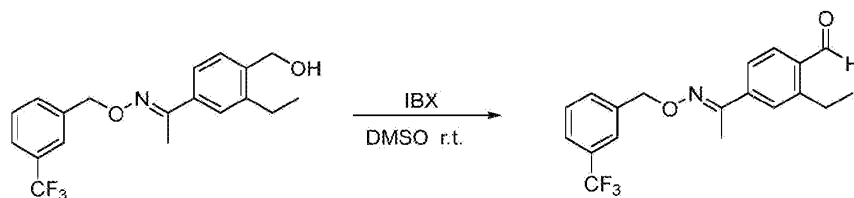
[0178] (E)-1-(3-乙基-4-羟甲基)苯基)乙烷-1-酮O-(3-(三氟甲基)苄基)肟的合成



[0179] 将(E)-N-((3-(三氟甲基)苄基)氧基)乙酰氨基甲酸乙酯(157mg, 0.60mmol)溶解于5mL甲醇中。滴加4.0M的氯化氢二氧六环溶液0.4mL到反应液中。搅拌0.5小时后滴加三乙胺调节pH=4-6之间。然后将1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙酮(107mg, 0.60mmol)溶解于2mL甲醇中滴加到反应体系中。TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应, 用二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱, 得油状无色液体150mg, 收率71.1%。

[0180] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.69(s, 1H), 7.59(dd, $J=12.7, 7.9\text{Hz}$, 3H), 7.51-7.46(m, 2H), 7.37(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 5.28(s, 2H), 4.74(s, 1H), 4.72(s, 2H), 2.71(q, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.28(s, 3H), 1.24(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

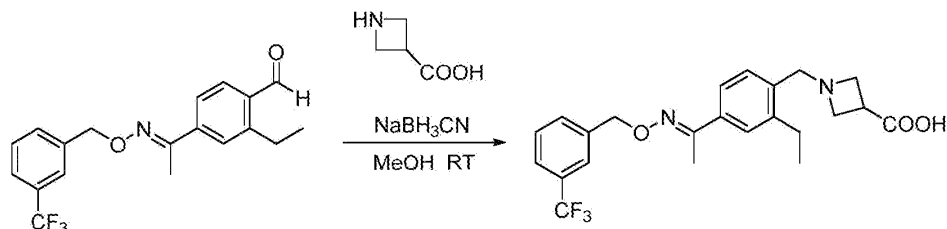
[0181] (E)-2-乙基-4-(1-(((3-(三氟甲基)苯基)氧)亚氨基)乙基)苯甲醛的合成



[0182] 将(E)-1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙烷-1-酮O-(3-(三氟甲基)苄基)肟(211mg, 0.60mmol)溶解在3mL的DMSO溶剂中。加入IBX氧化剂(308mg, 1.10mmol)。然后室温搅拌大约2小时。TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应, 用二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱, 得油状无色液体126mg, 收率60.0%。

[0183] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 10.29(s, 1H), 7.82(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.69(s, 1H), 7.64-7.53(m, 4H), 7.50(d, $J=7.7\text{Hz}$, 1H), 5.31(s, 2H), 3.08(d, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.30(s, 3H), 1.28(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

[0184] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((3-(三氟甲基)苯基)氧)亚氨基)乙基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物13)的合成

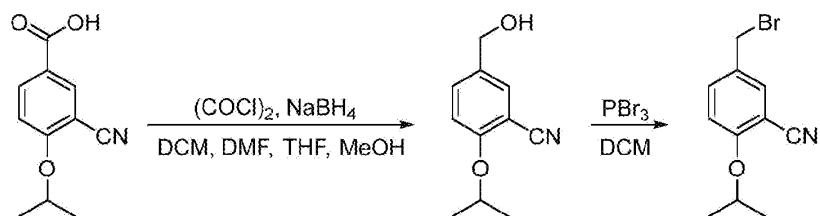


[0185] 将(E)-2-乙基-4-(1-(((3-(三氟甲基)苯基)氧)亚氨基)乙基)苯甲醛(105mg, 0.30 mmol)溶解于5mL的甲醇中加入1滴乙酸, 然后加入3-吡啶羧酸(61mg, 0.60 mmol)。室温搅拌3分钟后加入氰基硼氢化钠(38mg, 0.60 mmol)。TLC监测反应进度。反应完全后将反应体系减压蒸馏, 加入适量的水, 用二氯甲烷进行萃取, 饱和食盐水洗涤, 合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱, 得油状物78mg, 收率60.0%。

[0186] ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 7.71(s, 1H), 7.67(d, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 7.62–7.51(m, 3H), 7.47(dd, $J=8.0, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.31(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 5.28(s, 2H), 3.98(s, 2H), 3.83(t, $J=8.8\text{Hz}$, 2H), 3.67(t, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 3.28(dd, $J=15.2, 6.9\text{Hz}$, 1H), 2.73(q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.26(s, 3H), 1.21(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR(151MHz, CD_3OD) δ 178.20, 155.32, 142.88, 139.73, 136.16, 133.52, 131.41, 130.23(q, $J=32.0\text{Hz}$), 128.87, 128.82, 126.17, 124.32, 124.31(q, $J=272.0\text{Hz}$), 124.06, 123.61, 74.70, 57.68, 35.94, 25.11, 14.28, 11.47. HRMS(ESI)(m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$, 435.1896; found: 435.1897. HPLC Purity: 99.79%, retention time: 1.17min.

[0187] 代表性化合物16的合成路线如下所示:

[0188] 5-(溴甲基)-2-异丙氧基苯甲腈的合成



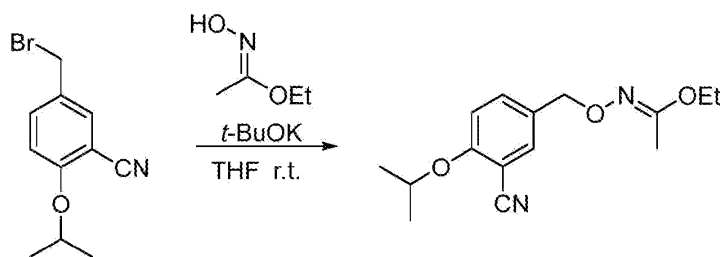
[0189] 将2.0M的草酰氯二氯甲烷溶液(14.6mL, 29.20mmol)加到3-氰基-4-(异丙氧基)苯甲酸(2.01g, 9.80mmol)中并加入一滴DMF。将反应混合物在室温搅拌0.5小时, 然后减压浓缩。将3-氰基-4-(异丙氧基)苯甲酰氯(923mg, 4.50mmol)在10mL四氢呋喃中溶解并冷却至0℃, 加入硼氢化钠(414mg, 11.20mmol), 接着加入2mL甲醇并将反应混合物在0℃下搅拌20分钟, 然后升温至室温。2小时后, 用1.0M盐酸将反应混合物酸化至pH=3。水层用乙酸乙酯萃取, 合并有机层并用无水硫酸钠干燥, 浓缩得无色油状物1.12g, 收率59.9%。

[0190] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.48(s, 1H), 7.47(d, $J=12\text{Hz}$, 1H), 7.45(s, 1H), 6.92(d, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 4.61(dt, $J=12.2, 6.2\text{Hz}$, 1H), 4.57(s, 2H), 1.36(d, $J=6.1\text{Hz}$, 6H).

[0191] 将5-(羟基甲基)-2-异丙氧基苯甲腈(993mg, 5.20mmol)溶解于10mL二氯甲烷中, 冰浴下滴加三溴化磷(0.2mL, 2.10mmol), 滴加完毕恢复室温搅拌, 0.5小时后反应完全。加水淬灭后用二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥, 浓缩得无色油状物1.19g, 收率90.5%。

[0192] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.56(d, $J=2.1\text{Hz}$, 1H), 7.51(dd, $J=8.7, 2.2\text{Hz}$, 1H), 6.92(d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 4.65(dt, $J=12.0, 6.0\text{Hz}$, 1H), 4.42(s, 2H), 1.39(d, $J=6.1\text{Hz}$, 6H).

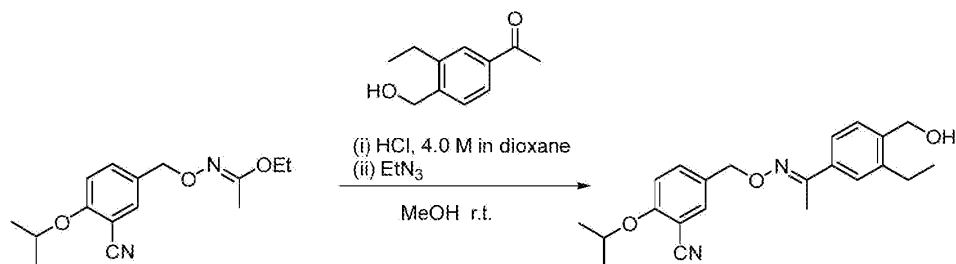
[0193] 乙基-N-((3-氰基-4-(异丙氧基)苄基)氧)乙酰氨基甲酸酯的合成



[0194] 将乙酰羟肟酸乙酯(402mg, 3.90mmol)溶解于10mL四氢呋喃溶液中, 然后置于冰浴下。向反应体系中滴加1.0M的叔丁醇钾四氢呋喃溶液(8.0mL, 8.00mmol), 滴加完毕继续在冰浴下搅拌0.5小时。将3-氰基-4-异丙氧基溴苄(987mg, 3.90mmol)溶解于5mL四氢呋喃中, 然后滴加到反应体系中。滴加完毕恢复到室温搅拌, TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应, 用二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱, 得油状无色液体619mg, 收率57.5%。

[0195] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.54(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 7.48(dd, $J=8.7, 2.1\text{Hz}$, 1H), 6.92(d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 4.82(s, 2H), 4.64(dt, $J=12.1, 6.1\text{Hz}$, 1H), 3.97(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 1.92(s, 3H), 1.39(d, $J=6.1\text{Hz}$, 6H), 1.24(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H).

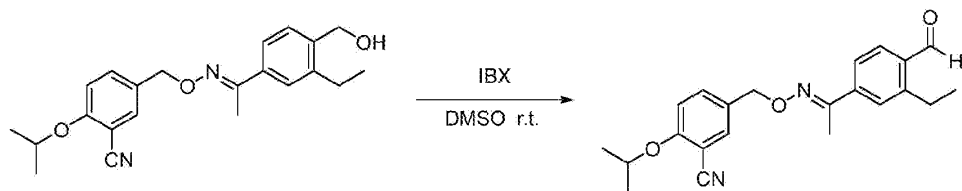
[0196] (E)-1-(3-乙基-4-(羟甲基)苄基)乙烷-1-酮-O-(3-氰基-4-(异丙氧基)苄基)肟的合成



[0197] 将乙基-N-((3-氰基-4-(异丙氧基)苄基)氧)乙酰氨基甲酸酯(138mg, 0.50mmol)溶解于5mL甲醇中。滴加4.0M的氯化氢二氧六环溶液(0.4mL, 0.30mmol)到反应液中。搅拌0.5小时后滴加三乙胺调节pH=4-6之间。然后将1-(3-乙基-4-(羟甲基)苄基)乙酮(90mg, 0.50mmol)溶解于2mL甲醇中滴加到反应体系中。TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应, 用二氯甲烷进行萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱, 得油状无色液体127mg, 收率69.3%。

[0198] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.61(d, $J=2.0\text{Hz}$, 1H), 7.54(dd, $J=8.7, 2.1\text{Hz}$, 1H), 7.45(d, $J=12.1, 4.1\text{Hz}$, 2H), 7.38(d, $J=7.9\text{Hz}$, 1H), 6.94(d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 5.13(s, 2H), 4.73(s, 2H), 4.64(dt, $J=12.1, 6.0\text{Hz}$, 1H), 2.72(q, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.24(s, 3H), 1.40(d, $J=6.1\text{Hz}$, 6H), 1.24(t, $J=7.6\text{Hz}$, 3H).

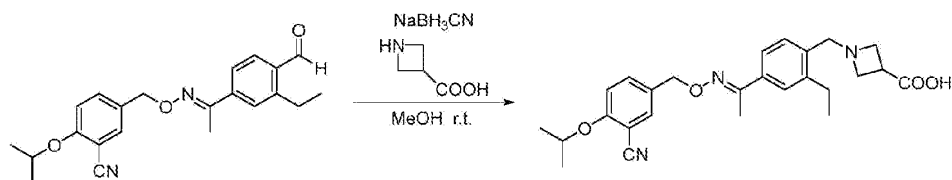
[0199] (E)-5-(((1-(3-乙基-4-甲酰苄基)亚乙基)氨基)氧)甲基)-2-异丙氧基苯肟的合成



[0200] 将(E)-1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙烷-1-酮-O-(3-氰基-4-(异丙氧基)苄基)肼(147mg, 0.40mmol)溶解在4mL的DMSO溶剂中, 加入IBX氧化剂(225mg, 0.80mmol)。室温搅拌大约2小时, TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应, 用二氯甲烷萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱, 得油状无色液体119mg, 收率81.2%。

[0201] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 10.28(s, 1H), 7.82(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.65–7.58(m, 2H), 7.58–7.50(m, 2H), 6.95(d, $J=8.7\text{Hz}$, 1H), 5.16(s, 2H), 4.65(dt, $J=12.1, 6.1\text{Hz}$, 1H), 3.08(q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.26(s, 3H), 1.40(d, $J=6.1\text{Hz}$, 6H), 1.28(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H).

[0202] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((3-氰基-4-(异丙氧基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物16)的合成

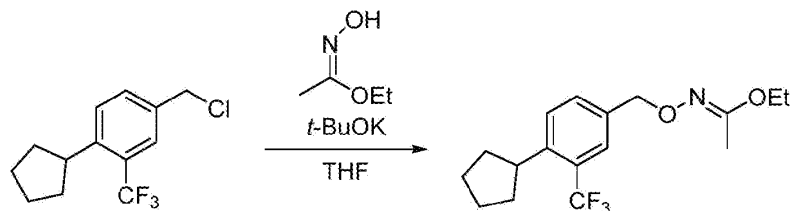


[0203] 将(E)-5-((((1-(3-乙基-4-甲酰苯基)亚乙基)氨基)氧)甲基)-2-异丙氧基苯腈(109mg, 0.30mmol)溶解于5mL的甲醇中加入1滴乙酸, 然后加入3-吡啶羧酸(61mg, 0.60mmol)。室温搅拌3分钟后加入氰基硼氢化钠(19mg, 0.30mmol)。TLC监测反应进度。反应完全后将反应体系减压蒸馏, 加入水和二氯甲烷进行萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱, 得浅色固体70mg, 收率52.3%。

[0204] ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 7.64(d, $J=6.7\text{Hz}$, 2H), 7.56(s, 1H), 7.50(dd, $J=8.0, 1.6\text{Hz}$, 1H), 7.33(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.16(d, $J=9.4\text{Hz}$, 1H), 5.14(s, 2H), 4.78–4.73(m, 1H), 4.18(s, 2H), 3.99(t, $J=9.3\text{Hz}$, 2H), 3.90(t, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 3.40–3.33(m, 1H), 2.76(q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.23(s, 3H), 1.38(s, 3H), 1.37(s, 3H), 1.23(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR(151MHz, CD_3OD) δ 177.23, 159.53, 154.92, 143.23, 136.96, 134.67, 133.44, 131.00, 129.23, 126.42, 123.80, 116.06, 113.66, 101.88, 74.22, 71.68, 57.49, 56.20, 35.40, 25.12, 20.71, 14.38, 11.39. HRMS(ESI)(m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$, 450.2396; found: 450.2395. HPLC Purity: 96.46%, retention time: 1.02min.

[0205] 化合物17的合成路线如下所示：

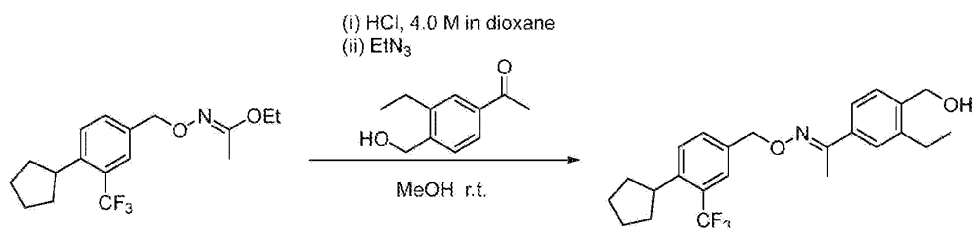
[0206] (E)-N-((4-环戊基-3-(三氟甲基)苄基)氧)乙酰氨基甲酸乙酯的合成



[0207] 将乙酰羟肟酸乙酯(196mg, 1.90mmol)溶解于5mL四氢呋喃溶液中，然后置于冰浴下。向反应体系中滴加1.0M的叔丁醇钾四氢呋喃溶液(4mL, 3.90mmol)，滴加完毕继续在冰浴下搅拌0.5小时。将4-氯甲基-1-环戊基-2-三氟甲基苯(498mg, 1.90mmol)溶解于3mL四氢呋喃中，然后滴加到反应体系中。滴加完毕恢复到室温搅拌，TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应，用二氯甲烷进行萃取，饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱，得油状无色液体532mg，收率85.1%。

[0208] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.59(s, 1H), 7.48(d, $J=8.4\text{Hz}$, 1H), 7.43(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 4.91(s, 2H), 3.99(q, $J=7.1\text{Hz}$, 2H), 3.41–3.28(m, 1H), 2.07(m, 2H), 1.94(s, 3H), 1.89–1.80(m, 2H), 1.73–1.68(m, 2H), 1.63–1.56(m, 2H), 1.25(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H).

[0209] (E)-1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙烷-1-酮-O-(4-环戊基-3-(三氟甲基)苄基)肟的合成

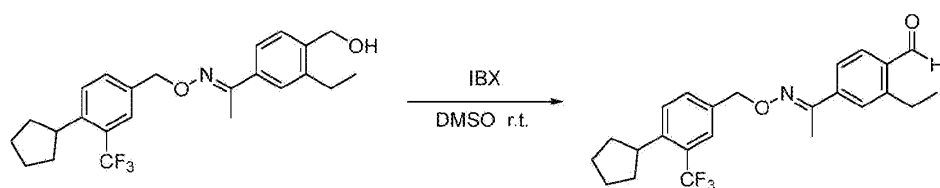


[0210] 将(E)-N-((4-环戊基-3-(三氟甲基)苄基)氧)乙酰氨基甲酸乙酯(461mg, 1.40mmol)溶解于5mL甲醇中。滴加4.0M的氯化氢二氧六环溶液(1.0mL, 0.70mmol)到反应液中。搅拌0.5小时后滴加三乙胺调节pH=4–6之间。然后将1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙酮(267mg, 1.50mmol)溶解于2mL甲醇中滴加到反应体系中。TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应，用二氯甲烷进行萃取，饱和食盐水

洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱，得油状无色液体489mg，收率83.4%。

[0211] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.66(s, 1H), 7.54(d, $J=8.0\text{Hz}$, 1H), 7.49(d, $J=6.2\text{Hz}$, 1H), 7.45(d, $J=8.6\text{Hz}$, 2H), 7.38(t, $J=8.6\text{Hz}$, 1H), 5.22(s, 2H), 4.72(s, 2H), 3.36(p, $J=8.5\text{Hz}$, 1H), 2.71(q, $J=7.6\text{Hz}$, 2H), 2.22(s, 3H), 2.14–2.04(m, 2H), 1.92–1.81(m, 2H), 1.77–1.69(m, 2H), 1.61–1.56(m, 2H), 1.25(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H).

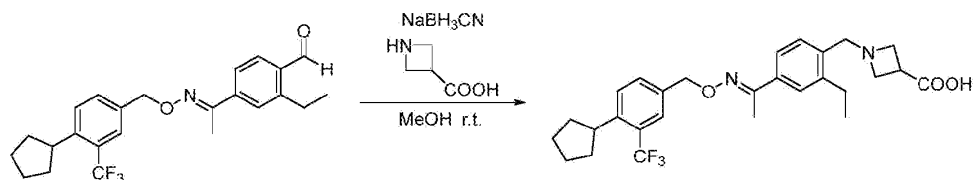
[0212] (E)-4-(1-((4-环戊基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)-2-乙基苯甲醛的合成



[0213] 将(E)-1-(3-乙基-4-(羟甲基)苯基)乙烷-1-酮-O-(4-环戊基-3-(三氟甲基)苄基)肟(503mg, 1.20mmol)溶解在3mL的DMSO溶剂中。加入IBX氧化剂(952mg, 2.40mmol)，然后室温搅拌大约2小时。TLC监测反应进度。反应完成后加水淬灭反应，用二氯甲烷萃取，饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后过硅胶柱，得油状无色液体302mg, 60.3%。

[0214] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 10.29(s, 1H), 7.82(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.69–7.59(m, 2H), 7.59–7.52(m, 2H), 7.47(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 5.25(s, 2H), 3.45–3.30(m, 1H), 3.08(q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.28(s, 3H), 2.07(d, $J=12.3\text{Hz}$, 2H), 1.88–1.80(m, 2H), 1.73–1.70(m, 2H), 1.64–1.54(m, 2H), 1.28(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H).

[0215] (E)-1-(4-(1-((4-环戊基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)-2-乙基苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物17)的合成

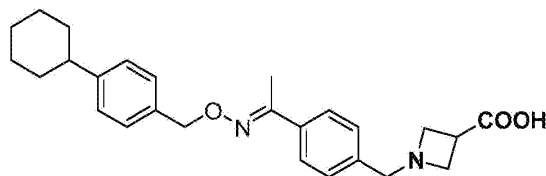


[0216] 将(E)-4-(1-((4-环戊基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)-2-乙基苯甲醛(500mg, 1.20mmol)溶解于5mL的甲醇中加入1滴乙酸, 然后加入3-吡啶羧酸(242mg, 2.40mmol)。室温搅拌3分钟后加入氰基硼氢化钠(113mg, 1.80mmol)。TLC监测反应进度。反应完全后将反应体系减压蒸馏, 加入适量水, 用二氯甲烷进行萃取, 饱和食盐水洗涤。合并有机相用无水硫酸钠干燥后浓缩过硅胶柱, 得浅色固体182mg, 收率30.2%。

[0217] ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 7.64(s, 1H), 7.53(dt, $J=9.8, 5.1\text{Hz}$, 4H), 7.38(t, $J=11.5\text{Hz}$, 1H), 5.22(s, 2H), 4.25(s, 2H), 4.02(d, $J=8.3\text{Hz}$, 4H), 3.43-3.33(m, 1H), 2.75(dd, $J=15.0, 7.5\text{Hz}$, 2H), 2.29-2.14(s, 3H), 2.03(m, 2H), 1.93-1.81(m, 2H), 1.78-1.57(m, 4H), 1.20(t, $J=7.1\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR(151MHz, CD_3OD) δ 177.79, 154.79, 145.36, 143.28, 137.08, 136.13, 131.80, 130.92, 129.27, 127.96, 127.80($qJ=28.7\text{Hz}$), 126.46, 124.78($qJ=273.5\text{Hz}$), 124.76, 123.84, 74.79, 57.14, 40.91, 35.57, 25.62, 25.20, 14.36, 11.42. HRMS(ESI)(m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_3$, 503.2522; found: 503.2523. HPLC Purity: 96.46%, retention time: 2.28min.

[0218] 其他化合物的反应条件和以上化合物类似。

[0219] (E)-1-(4-(1-((4-环己基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)氮杂环丁-3-羧酸(化合物1)



[0220] ^1H NMR(400MHz, Methanol-d_4) δ 7.60(d, $J=8.3\text{Hz}$, 2H), 7.30(dd, $J=8.2, 2.7\text{Hz}$, 4H), 7.19(d, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 5.14(s, 2H), 3.64(d, $J=2.4\text{Hz}$, 2H), 3.53(t, $J=8.1\text{Hz}$, 2H), 3.38 - 3.32(m, 2H), 3.20(dd, $J=16.6, 8.2\text{Hz}$, 1H), 2.57 - 2.45(m, 1H), 2.22(s, 3H), 1.84(d, $J=9.2\text{Hz}$, 4H), 1.75(d, $J=12.2\text{Hz}$, 1H), 1.43(d, $J=4.4\text{Hz}$, 6H). ^{13}C NMR(151MHz, Methanol-d_4) δ 154.60, 147.52, 138.04, 135.64, 135.45, 128.59, 128.01, 126.36, 125.82, 75.68, 62.35, 57.58, 44.40, 36.48, 34.30, 29.46, 26.62, 25.86, 11.45. LC-MS(ESI): m/z : 421.1($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

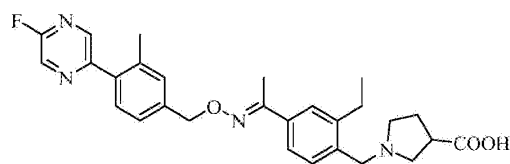
[0221] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物2)

[0222] ^1H NMR (400MHz, Methanol- d_4) δ 7.56(d, $J=17.6\text{Hz}$, 1H), 7.53(d, $J=7.4\text{Hz}$, 1H), 7.39(t, $J=12.5\text{Hz}$, 1H), 7.30(d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 7.19(d, $J=7.9\text{Hz}$, 2H), 5.11(s, 2H), 4.31(s, 2H), 4.10(dd, $J=21.9, 12.7\text{Hz}$, 2H), 4.02(t, $J=8.4\text{Hz}$, 2H), 3.35(s, 3H), 2.78-2.70(m, 2H), 1.49-1.36(m, 9H). LC-MS(ESI): m/z : 431.1(M+H) $^+$.

[0223] (E)-1-(4-(1-((4-环己基苄基)氧基)亚氨基)乙基)-2-乙基苄基)氮杂环丁-3-羧酸(化合物3)

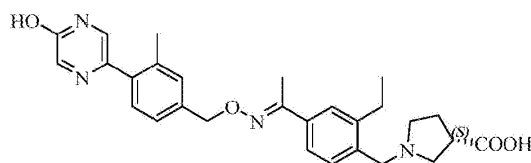
[0224] ^1H NMR (400MHz, DMSO) δ 8.36(s, 1H), 8.04(dt, $J=28.8, 6.4\text{Hz}$, 4H), 7.71 - 7.46(m, 4H), 4.38-4.33(m, 2H), 4.10-4.01(m, 2H), 3.59-3.55(m, 2H), 2.85 - 2.76(m, 2H), 2.79(q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.57 - 2.45(m, 1H), 1.24-1.21(m, 3H), 1.20(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H). LC-MS(ESI): m/z : 449.1(M+H) $^+$.

[0225] (E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(5-氟吡嗪-2-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物4)的结构



[0226] 淡黄色固体, 产率18.4% ^1H NMR (500MHz, Methanol- d_4) δ 8.58(dd, $J=8.3, 1.3\text{Hz}$, 1H), 8.37(d, $J=1.5\text{Hz}$, 1H), 7.64(d, $J=1.9\text{Hz}$, 1H), 7.58(dd, $J=8.1, 1.9\text{Hz}$, 1H), 7.49(d, $J=8.1\text{Hz}$, 1H), 7.42(d, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 7.40 - 7.35(m, 2H), 5.26(s, 2H), 4.40(s, 2H), 3.53(dd, $J=11.2, 5.8\text{Hz}$, 1H), 3.39 - 3.35(m, 2H), 3.28(dd, $J=11.0, 7.4\text{Hz}$, 1H), 3.15 - 3.06(m, 1H), 2.82(q, $J=7.5\text{Hz}$, 2H), 2.37(s, 3H), 2.34 - 2.22(m, 5H), 1.26(t, $J=7.5\text{Hz}$, 3H). ^{13}C NMR (126MHz, Methanol- d_4) δ 177.85, 160.27, 158.28, 154.49, 152.90, 143.73, 141.29, 141.22, 139.46, 137.74, 136.37, 135.08, 131.94, 131.64, 130.48, 130.33, 130.21, 129.58, 126.66, 125.50, 123.97, 75.34, 56.55, 54.38, 53.52, 43.60, 27.72, 25.23, 19.04, 14.55, 11.40. MS(ESI)(m/z): [M+H] $^+$ 491.25.

[0227] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(5-羟基吡嗪-2-基)-苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸的合成(化合物5)的结构



- [0228] 黄色固体, 产率72.5%。¹H NMR(500MHz,Methanol-d₄) δ 8.17(d,J=1.4Hz,1H), 7.67(d,J=1.8Hz,1H),7.61(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.57(d,J=8.1Hz,1H),7.51(d,J=1.4Hz,1H),7.35(d,J=8.1Hz,2H),7.33 - 7.29(m,1H),5.24(s,2H),4.53(s,2H),3.70 - 3.57(m,2H),3.51 - 3.43(m,2H),3.38(q,J=8.6,8.2Hz,1H),2.85(q,J=7.5Hz,2H),2.49 - 2.41(m,1H),2.38(s,3H),2.36 - 2.30(m,1H),2.29(s,3H),1.27(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄) δ 154.34,143.95,138.49,138.17,136.24,135.20,130.78,130.24,129.10,129.01,126.79,125.48,124.11,75.49,55.17,54.38,53.64,27.07,25.36,19.14,14.60,11.39.MS (m/z):[M+H]⁺489.20
- [0229] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物6)
- [0230] ¹H NMR(400MHz,Methanol-d₄) δ 7.70 - 7.63(m,3H),7.57(d,J=16.3Hz,2H),7.44(d,J=8.2Hz,2H),5.22(s,2H),3.96(d,J=5.7Hz,2H),3.35(s,2H),3.16-3.12(m,1H),3.05-2.98(m,2H),2.95 - 2.82(m,2H),2.26(s,3H),2.16(d,J=8.0Hz,2H),1.82-1.80(m,,2H),1.78-1.75(m,3H),1.58-1.45(m,6H).LC-MS(ESI):m/z:503.1(M+H)⁺.
- [0231] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)哌啶-3-羧酸(化合物7)
- [0232] ¹H NMR(400MHz,Methanol-d₄) δ 7.70 - 7.63(m,3H),7.57(d,J=16.3Hz,2H),7.44(d,J=8.2Hz,2H),5.22(s,2H),3.96(d,J=5.7Hz,2H),3.35(s,2H),3.16-3.12(m,1H),3.05-2.98(m,2H),2.95 - 2.82(m,2H),2.26(s,3H),2.16(d,J=8.0Hz,2H),1.82-1.80(m,,2H),1.78-1.75(m,3H),1.58-1.45(m,8H).LC-MS(ESI):m/z:517.2(M+H)⁺.
- [0233] (E)-4-((4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)氨基)丁酸(化合物8)
- [0234] ¹H NMR(400MHz,Methanol-d₄) δ 7.65(d,J=8.1Hz,3H),7.58(t,J=10.4Hz,1H),7.53(d,J=8.1Hz,1H),7.41(t,J=10.5Hz,2H),5.21(s,2H),3.88(s,2H),2.91(t,J=11.2Hz,1H),2.7

6(tJ=7.1Hz,2H),2.30-2.17(m,5H),1.85-1.75(m,6H),1.61-1.29(m,6H).LC-MS(ESI):m/z:491.2(M+H)⁺.

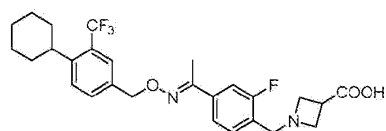
[0235] (E)-3-((4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)氨基)环己烷-1-羧酸(化合物9)

[0236] ¹H NMR(400MHz,Methanol-d₄) δ 7.77-7.32(m,7H),5.21(s,2H),3.91(s,2H),2.91(s,1H),2.68(s,1H),2.25(s,3H),2.18-2.15(m,2H),1.88-1.70(m,9H),1.65-1.33(m,8H).¹³C NMR(151MHz,MeOD) δ 182.91,155.03,146.14,136.31,135.59,131.60,128.55,128.47,128.10,125.97,124.84,124.79,74.73,55.54,49.13,45.59,40.06,34.19,31.24,29.43,26.60,25.70,11.40.LC-MS(ESI):m/z:531.2(M+H)⁺.

[0237] (E)-3-((4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)氨基)丙酸(化合物10)

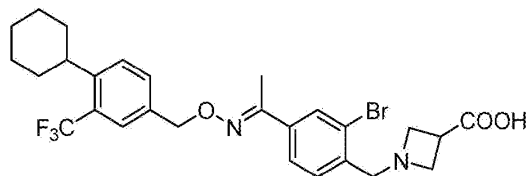
[0238] ¹H NMR(400MHz,Methanol-d₄) δ 7.65(dJ=7.4Hz,3H),7.56(ddJ=24.3,8.1Hz,2H),7.39(dJ=8.0Hz,2H),5.21(s,2H),3.90(s,2H),2.95-2.90(m,3H),2.44(tJ=6.6Hz,2H),2.25(s,3H),1.87(dJ=16.6Hz,2H),1.78(dJ=11.1Hz,3H),1.48(dddJ=33.8,22.3,10.1Hz,5H).¹³C NMR(151MHz,Methanol-d₄) δ 178.44,154.94,146.14,137.98,136.30,135.86,131.60,128.53,128.10,126.03,124.84,124.79,74.74,51.72,45.19,40.06,35.04,34.18,26.59,25.70,11.38.LC-MS(ESI):m/z:478.2(M+H)⁺.

[0239] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧)亚氨基)乙基)-2-氟苄基)氮杂环丁-3-羧酸(化合物11)的结构



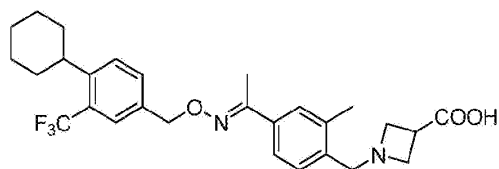
[0240] 白色固体,产率40.6%,熔点:144.6-144.9℃。¹H NMR(400MHz,CDCl₃) δ 7.74-7.27(m,6H),5.26(s,2H),3.97(s,2H),3.80(dJ=8.2Hz,2H),3.72-3.67(m,3H),2.94-2.90(m,1H),2.27(s,3H),1.94-1.82(m,2H),1.80-1.75(m,2H),1.56-1.50(m,2H),1.45-1.40(m,4H).HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₇H₃₀F₄N₂O₃,507.2271; found:507.2270.HPLC Purity:91.98%,retention time:2.26min.

- [0241] (E)-1-(2-溴-4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物12)的结构



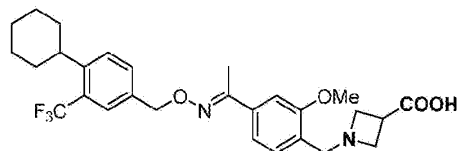
- [0242] 白色固体, 产率40.6%, 熔点: 131.6–131.9°C。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.91(d,J=1.6Hz,1H),7.69–7.63(m,2H),7.63–7.49(m,2H),7.45(d,J=8.1Hz,1H),5.23(s,2H),4.08(s,2H),3.87(t,J=8.6Hz,2H),3.75(t,J=8.2Hz,2H),2.93–2.86(m,2H),2.30(s,3H),1.84–1.80(m,2H),1.77–1.70(m,3H),1.60–1.34(m,5H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.85,154.09,147.89,146.25,138.90,131.73,129.72,129.46,128.84,128.53,128.16,127.33,124.97,121.07,112.36,90.94,74.97,61.53,58.01,40.07,34.17,26.69,25.70,12.97.HRMS (ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₇H₃₀BrF₃N₂O₃,567.1470; found:567.1473.HPLC Purity:90.25%,retention time:2.87min.

- [0243] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)-2-甲基苄基氮杂环丁-3-羧酸(化合物18)的结构



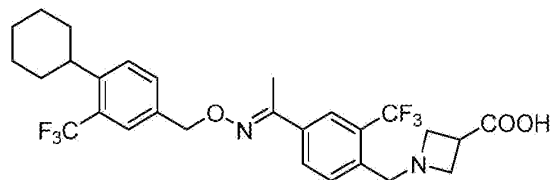
- [0244] 白色固体, 产率40.6%, 熔点: 155.1–155.6°C。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.64(d,J=5.9Hz,1H),7.59–7.42(m,4H),7.37–7.29(m,1H),5.20(s,2H),4.05(s,2H),3.91(t,J=8.9Hz,2H),3.77(dd,J=17.0,8.5Hz,2H),3.60(dd,J=14.1,7.1Hz,1H),2.91(t,J=11.3Hz,1H),2.39(s,3H),2.23(s,3H),1.88–1.80(m,2H),1.79–1.70(m,3H),1.46–1.39(m,5H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.49,154.91,146.15,138.90,136.99,136.37,131.61,128.89,128.52,128.11,127.91,127.31,124.88,124.80(q,J=273.5Hz),123.68,74.75,57.59,40.05,35.70,34.18,34.13,26.59,25.70,17.99,16.97,11.38.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₈H₃₃F₃N₂O₃,503.2522; found:503.2523.HPLC Purity:94.29%,retention time:2.57min.

- [0245] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧)亚氨基)乙基)-2-甲氧基苄基)氮杂环丁-3-羧酸(化合物27)的结构



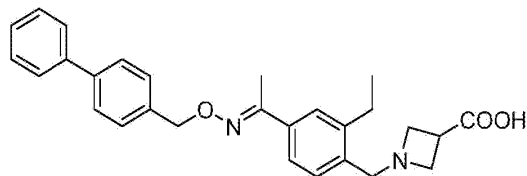
- [0246] 白色固体, 产率40.6%, 熔点: 145.2–145.6°C。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.66(s,1H),7.64–7.49(m,3H),7.25(tJ=8.7Hz,2H),5.21(s,2H),3.84(s,3H),3.70(s,2H),3.59(dJ=8.2Hz,2H),3.52(tJ=8.0Hz,1H),3.42(tJ=8.2Hz,2H),2.91(dJ=10.6Hz,1H),2.23(s,3H),1.92–1.83(m,2H),1.79–1.87(m,3H),1.63–1.48(m,5H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 175.87,157.76,154.59,146.26,139.82,138.93,136.16,131.75,128.55,127.30,127.01,124.98,124.80(qJ=273.5Hz),119.36,118.66,107.91,74.92,60.20,57.19,54.77,40.06,34.72,34.18,26.58,25.69,11.39.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₈H₃₃F₃N₂O₄,519.2471; found:519.2473.HPLC Purity:96.28%,retention time:1.27min.

- [0247] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)-2-(三氟甲基)苄基)氮杂环丁-3-羧酸(化合物19)的结构



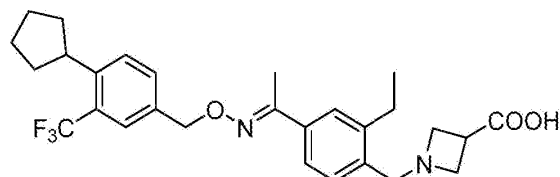
- [0248] 白色固体, 产率40.6%, 熔点: 135.6–138.9°C。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.98(s,1H),7.88(dJ=8.1Hz,1H),7.69–7.51(m,4H),5.24(s,2H),3.96(s,2H),3.73(tJ=8.3Hz,2H),3.53(tJ=8.0Hz,2H),3.29–3.19(m,1H),2.92(tJ=11.3Hz,1H),1.86–1.80(m,2H),1.78–1.70(m,3H),1.62–1.35(m,5H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.45,153.61,146.30,138.92,135.99,135.83,131.79,129.85,129.41,128.52,128.15,127.29,125.06,124.77(qJ=273.5Hz),124.22(qJ=273.6Hz),123.02,75.08,58.10,57.75,40.06,36.07,34.17,26.59,25.70,11.05.LC-MS(ESI):m/z:557.2(M+H)⁺.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₈H₃₀F₆N₂O₃,557.2239; found:557.2237.HPLC Purity:97.16%,retention time:2.56min.

- [0249] (E)-1-(4-(1-((1,1'-联苯)-4-基甲氧基)亚氨基)乙基)-2-乙基苄基氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物20)的结构



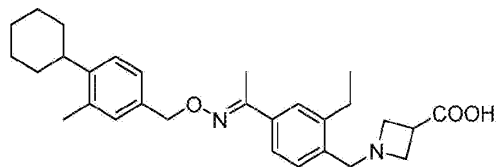
- [0250] 白色固体, 产率40.6%, 熔点: 120.3–121.9°C。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.64–7.53(m,4H),7.49–7.39(m,6H),7.36–7.23(m,2H),5.24(s,2H),3.76(s,2H),3.67–3.58(m,2H),3.42(t,J=8.1Hz,2H),3.29–3.15(m,1H),2.72(q,J=7.5Hz,2H),2.23(s,3H),1.22(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 179.26,155.07,142.50,140.80,140.59,137.27,135.67,135.39,129.45,128.52,128.44,128.33,126.93,126.58,126.55,126.52,126.50,125.94,123.39,75.38,58.84,57.94,36.49,25.11,14.23,11.55.LC-MS(ESI):m/z:443.2(M+H)⁺.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₈H₃₀N₂O₃,443.2335; found:443.2337.HPLC Purity:98.03%,retention time:1.30min.

- [0251] (E)-1-(4-(1-((4-环戊基-3-(三氟甲基)苄基)氧)亚氨基)乙基)-2-乙基苄基氮杂环丁-3-羧酸(化合物17)的结构



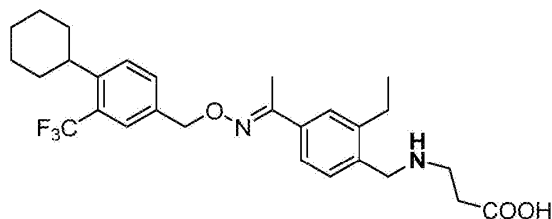
- [0252] 浅色固体, 产率30.2%, 熔点: 131.7–133.2°C。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.64(s,1H),7.53(dt,J=9.8,5.1Hz,4H),7.38(t,J=11.5Hz,1H),5.22(s,2H),4.25(s,2H),4.02(d,J=8.3Hz,4H),3.43–3.33(m,1H),2.75(dd,J=15.0,7.5Hz,2H),2.29–2.14(s,3H),2.03(m,2H),1.93–1.81(m,2H),1.78–1.57(m,4H),1.20(t,J=7.1Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.79,154.79,145.36,143.28,137.08,136.13,131.80,130.92,129.27,127.96,127.80(q,J=28.7Hz),126.46,124.78(q,J=273.5Hz),124.76,123.84,74.79,57.14,40.91,35.57,25.62,25.20,14.36,11.42.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₈H₃₃F₃N₂O₃,503.2522; found:503.2523.HPLC Purity:96.46%,retention time:2.28min.

- [0253] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-甲基苄基)氧)亚氨基)乙基)-2-乙基苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物24)的结构



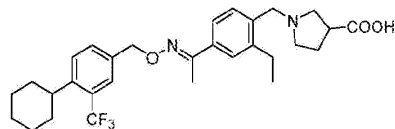
- [0254] 黄色固体, 产率33.3%, 熔点: 135.8–136.3℃。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.53(s,1H),7.47(dd,J=8.0,1.5Hz,1H),7.30(d,J=8.1Hz,1H),7.15(d,J=8.5Hz,3H),5.11(s,2H),4.00(s,2H),3.84(t,J=8.8Hz,2H),3.69(t,J=8.4Hz,2H),3.30–3.22(m,1H),2.82–2.60(m,3H),2.29(s,3H),2.20(s,3H),1.83–1.80(m,2H),1.76–1.72(m,3H),1.48–1.29(m,5H),1.21(t,J=7.8Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.12,154.47,145.22,142.85,136.54,134.88,134.61,133.03,129.89,128.89,126.20,125.88,124.96,123.61,75.80,57.62,57.34,39.83,35.88,33.49,26.85,26.03,25.14,18.10,14.33,11.49.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺ calculated for C₂₉H₃₈N₂O₃,463.2961; found:463.2962.HPLC Purity:98.19%,retention time:2.39min.

- [0255] (E)-3-((4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)-2-乙基苄基)氨基)丙酸(化合物25)



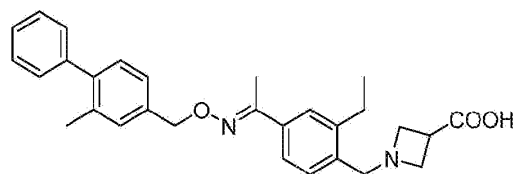
- [0256] ¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.65(s,1H),7.58(dd,J=11.7,7.9Hz,2H),7.51(t,J=9.5Hz,2H),7.46–7.35(m,1H),5.21(s,2H),4.19(s,2H),3.18(t,J=6.3Hz,2H),3.07(t,J=6.4Hz,1H),2.91(t,J=11.3Hz,1H),2.78(q,J=7.5Hz,2H),2.51(t,J=6.3Hz,2H),2.24(s,3H),1.83–1.80(m,2H),1.77–1.70(m,3H),1.59–1.33(m,5H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.24,154.83,146.18,143.23,137.30,136.22,131.68,131.45,129.89,128.13,127.19,127.00,126.43,124.96,124.91,123.96,74.81,44.84,40.06,34.19,33.03,32.12,26.59,25.70,25.07,14.37,11.42.LC-MS(ESI):m/z:505.2(M+H)⁺.

- [0257] (E)-1-(4-(1-((4-环己基-3-(三氟甲基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)-2-乙基苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物26)



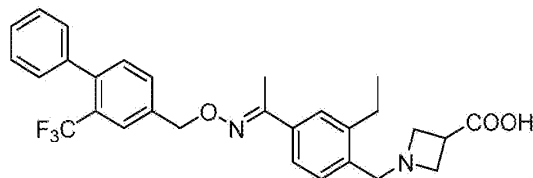
- [0258] ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 7.65(s,1H),7.59(dJ=7.2Hz,2H),7.53(dJ=7.5Hz,2H),7.45(dJ=8.1Hz,1H),5.22(s,2H),4.33(s,2H),3.40-3.42(m,1H),3.38 - 3.32(m,1H),3.25(tJ=6.9Hz,2H),3.11 - 3.00(m,1H),2.91(tJ=11.3Hz,1H),2.80(qJ=7.5Hz,2H),2.24(s,3H),1.85(dJ=11.7Hz,2H),1.77(dJ=11.9Hz,3H),1.59 - 1.50(m,2H),1.46 - 1.31(m,3H),1.27(tJ=7.1Hz,3H). ^{13}C NMR(151MHz, CD_3OD) δ 178.42,154.79,146.19,143.65,137.44,136.23,131.68,130.98,130.40,128.13,127.20,127.01,126.59,125.71,124.95,124.91,123.91,74.82,56.80,54.66,53.60,43.92,40.06,34.18,26.59,25.69,25.21,14.51,11.39.LC-MS(ESI):m/z:531.3(M+H) $^+$.

- [0259] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物22)的结构



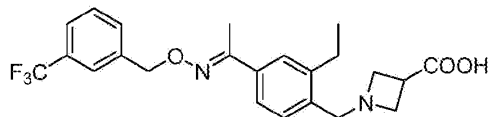
- [0260] 白色固体, 产率40.6%, 熔点: 154.2-154.8℃。 ^1H NMR(400MHz, CD_3OD) δ 7.55(s,1H),7.49(dJ=8.0Hz,1H),7.38(tJ=7.3Hz,2H),7.34-7.23(m,6H),7.15(dJ=7.7Hz,1H),5.17(s,2H),4.00(s,2H),3.84(tJ=8.7Hz,2H),3.69(tJ=8.3Hz,2H),3.27-3.20(m,1H),2.74(qJ=7.5Hz,2H),2.24(s,3H),2.23(s,3H),1.21(qJ=7.5Hz,3H). ^{13}C NMR(151MHz, CD_3OD) δ 178.15,154.69,142.88,141.76,141.46,137.05,136.48,134.91,133.09,129.85,129.32,128.92,128.79,127.78,126.51,126.21,125.39,123.63,75.61,57.61,57.33,35.89,25.15,19.26,14.34,11.52.HRMS(ESI)(m/z):[M+H] $^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$,457.2492; found:457.2493.HPLC Purity:91.98%,retention time:2.30min.

- [0261] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-(三氟甲基)-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物21)的结构



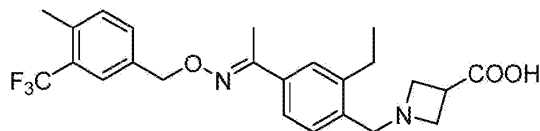
- [0262] 白色固体, 产率40.6%, 熔点: 155.5–155.9°C。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.69(d,J=12.3Hz,1H),7.56(t,J=8.1Hz,1H),7.49(s,1H),7.42(d,J=8.0Hz,1H),7.26(dd,J=5.3,2.9Hz,4H),7.22(d,J=7.8Hz,1H),7.19–7.13(m,2H),5.21(s,2H),4.11(s,2H),3.93(t,J=9.1Hz,2H),3.83(t,J=8.4Hz,2H),3.29–3.22(m,1H),2.66(q,J=7.5Hz,2H),2.16(s,3H),1.12(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.22,155.11,143.30,140.77,139.59,138.22,136.91,132.05,131.31,130.97,129.29,128.64,127.87(q,J=29.8Hz),127.46,127.37,126.45,125.32,124.23(q,J=273.8Hz),123.86,74.64,57.34,55.98,35.39,25.18,14.40,11.50.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺ calcd for C₂₉H₂₉F₃N₂O₃,511.2209; found:511.2211.HPLC Purity:97.71%,retention time:1.56min.

- [0263] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((3-(三氟甲基)苯基)氧)亚氨基)乙基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物13)的结构



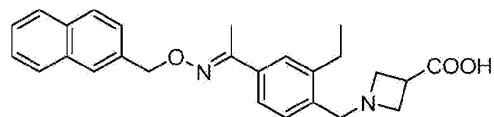
- [0264] 淡黄色油状, 产率60.0%。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.71(s,1H),7.67(d,J=7.4Hz,1H),7.62–7.51(m,3H),7.47(dd,J=8.0,1.6Hz,1H),7.31(d,J=8.0Hz,1H),5.28(s,2H),3.98(s,2H),3.83(t,J=8.8Hz,2H),3.67(t,J=8.4Hz,2H),3.28(dd,J=15.2,6.9Hz,1H),2.73(q,J=7.5Hz,2H),2.26(s,3H),1.21(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.20,155.32,142.88,139.73,136.16,133.52,131.41,130.23(q,J=32.0Hz),128.87,128.82,126.17,124.32,124.31(q,J=272.0Hz),124.06,123.61,74.70,57.68,35.94,25.11,14.28,11.47.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺ calcd for C₂₃H₂₅F₃N₂O₃,435.1896; found:435.1897.HPLC Purity:99.79%,retention time:1.17min.

- [0265] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((4-甲基-3-(三氟甲基)苄基)氧)亚氨基)乙基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物14)的结构



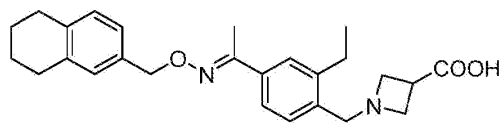
- [0266] 淡黄色油状, 产率21.3%。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.67(s,1H),7.57(s,1H),7.52(t,J=7.9Hz,2H),7.35(dd,J=12.5,8.1Hz,2H),5.22(s,2H),4.22(s,2H),3.97(dd,J=22.5,8.5Hz,4H),3.40-3.33(m,1H),2.76(q,J=7.5Hz,2H),2.47(s,3H),2.25(s,3H),1.22(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.72,155.00,143.07,136.62,136.50,135.81,132.36,131.84,131.45,129.07,128.29(q,J=30.2Hz),126.30,125.10,124.70(q,J=273.3Hz),123.70,74.70,57.55,56.78,35.67,25.12,17.72,14.32,11.40.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺ calcd for C₂₄H₂₇F₃N₂O₃,449.2052; found:449.2050.HPLC Purity:99.32%,retention time:1.35min.

- [0267] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((萘-2-基甲氧基)亚氨基)乙基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物15)的结构



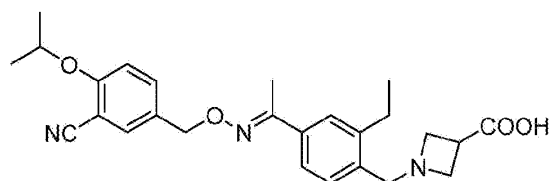
- [0268] 白色固体, 产率25.9%, 熔点: 131.5-131.7℃。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.89-7.79(m,4H),7.61-7.51(m,2H),7.52-7.41(m,3H),7.35-7.18(m,1H),5.40(s,2H),3.95(s,2H),3.80(t,J=8.6Hz,2H),3.61(dt,J=10.7,5.9Hz,2H),3.29-3.22(m,1H),2.77-2.59(m,2H),2.27(s,3H),1.25-1.14(m,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.73,154.96,142.81,136.31,135.65,133.40,133.14,128.83,127.62,127.55,127.29,126.58,126.18,125.78,125.74,125.59,123.60,75.84,57.73,36.00,25.11,14.28,11.53.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺ calcd for C₂₆H₂₈N₂O₃,417.2179; found:417.2179.HPLC Purity:98.77%,retention time:1.24min.

- [0269] (E)-1-(2-乙基-4-(1-(((5,6,7,8-四氢萘-2-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物23)的结构



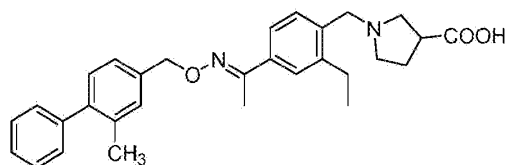
[0270] 白色固体，产率10.2%，熔点：135.3–138.9℃。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.50(s,1H),7.44(dd,J=8.0,1.5Hz,1H),7.28(d,J=8.0Hz,1H),7.13–7.05(m,2H),7.00(d,J=7.7Hz,1H),5.09(s,2H),3.83(s,2H),3.70(t,J=8.3Hz,2H),3.51(t,J=8.2Hz,2H),3.24(dd,J=16.6,8.3Hz,1H),2.78–2.71(m,6H),2.20(s,3H),1.80–1.70(m,4H),1.23(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.90,154.68,142.58,136.56,136.32,136.01,134.99,134.56,128.69,128.62,128.61,126.00,125.26,123.45,75.81,58.35,57.83,36.29,29.01,28.78,25.11,23.06,14.25,11.51.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺ calcd for C₂₆H₃₂N₂O₃,421.2492; found:421.2492.HPLC Purity:98.54%,retention time:1.48min.

[0271] (E)-1-(4-(1-(((3-氰基-4-异丙氧基苄基)氧)亚氨基)乙基)-2-乙基苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物16)的结构



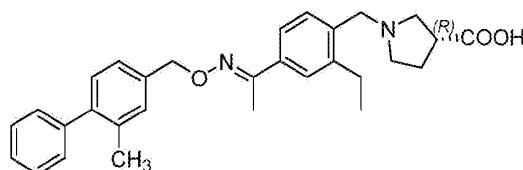
[0272] 淡黄色固体，产率52.3%，熔点：112.6–112.9℃。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.64(d,J=6.7Hz,2H),7.56(s,1H),7.50(dd,J=8.0,1.6Hz,1H),7.33(d,J=8.1Hz,1H),7.16(d,J=9.4Hz,1H),5.14(s,2H),4.78–4.73(m,1H),4.18(s,2H),3.99(t,J=9.3Hz,2H),3.90(t,J=8.6Hz,2H),3.40–3.33(m,1H),2.76(q,J=7.5Hz,2H),2.23(s,3H),1.38(s,3H),1.37(s,3H),1.23(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.23,159.53,154.92,143.23,136.96,134.67,133.44,131.00,129.23,126.42,123.80,116.06,113.66,101.88,74.22,71.68,57.49,56.20,35.40,25.12,20.71,14.38,11.39.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺ calcd for C₂₆H₃₁N₃O₄,450.2396; found:450.2395.HPLC Purity:96.46%,retention time:1.02min.

[0273] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物28)的结构



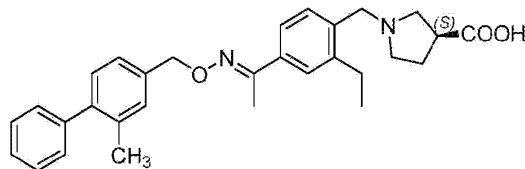
[0274] 灰褐色固体, 产率30.1%, 熔点: 144.3–146.4℃。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.62(s,1H),7.55(dd,J=8.0,1.6Hz,1H),7.47(dd,J=14.4,6.3Hz,1H),7.41–7.35(m,2H),7.33–7.28(m,2H),7.26(dd,J=5.0,3.2Hz,3H),7.14(d,J=7.7Hz,1H),5.20(s,2H),4.29(s,2H),3.47–3.35(m,1H),3.34–3.30(m,2H),3.24(t,J=7.1Hz,2H),3.03–3.09(m,1H),2.80(q,J=7.5Hz,2H),2.31–2.27(m,1H),2.25(s,3H),2.22(s,3H),1.20(t,J=7.1Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.58,154.38,143.61,141.73,141.47,137.53,137.03,134.92,130.99,130.41,129.86,129.34,128.79,127.79,126.57,126.52,125.40,123.90,75.69,56.76,54.66,53.58,43.99,27.89,25.26,19.27,14.57,11.48.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₃₀H₃₄N₂O₃,471.2648; found:471.2647.HPLC Purity:96.16%,retention time:1.66min.

[0275] (R,E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基吡咯烷-3-羧酸(化合物29)的结构



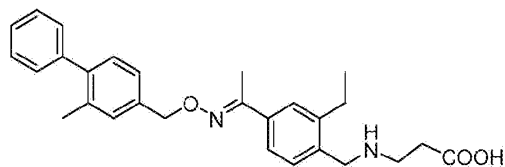
[0276] 白色固体, 产率14.9%, 熔点: 149.6–150.6℃。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.60(s,1H),7.54(d,J=8.0Hz,1H),7.45(d,J=8.0Hz,1H),7.38(t,J=7.3Hz,2H),7.34–7.18(m,5H),7.14(d,J=7.7Hz,1H),5.20(s,2H),4.26(s,2H),3.42–3.29(m,3H),3.20(t,J=7.1Hz,2H),3.09–2.97(m,1H),2.79(q,J=7.5Hz,2H),2.30–2.27(m,1H),2.24(s,3H),2.22(s,3H),1.22(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.63,154.39,143.55,141.74,141.47,137.42,137.04,134.92,131.32,130.35,129.85,129.33,128.79,127.78,126.53,126.51,125.39,123.85,75.68,56.79,54.73,53.59,44.01,27.89,25.24,19.26,14.55,11.47.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₃₀H₃₄N₂O₃,471.2648; found:471.2650.HPLC Purity:97.51%,retention time:1.45min.

- [0277] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物30)的结构



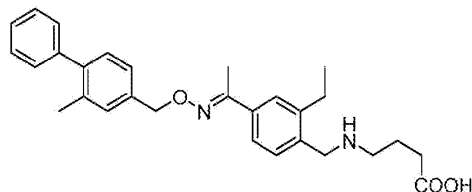
- [0278] 白色固体, 产率31.8%, 熔点: 145.6–148.9℃。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.57(s,1H),7.51(d,J=8.0Hz,1H),7.44–7.35(m,3H),7.33–7.26(m,5H),7.17(d,J=7.7Hz,1H),5.20(s,2H),4.02(s,2H),3.19(t,J=8.6Hz,1H),3.11–3.00(m,3H),2.90(dd,J=17.2,7.9Hz,1H),2.79(q,J=7.5Hz,2H),2.26(s,3H),2.24(s,3H),2.15(dd,J=14.6,7.3Hz,2H),1.23(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 179.95,154.70,143.25,141.79,141.48,137.08,136.62,134.91,130.01,129.84,129.31,128.79,127.77,126.49,126.28,125.37,123.57,75.60,57.40,55.54,53.76,44.56,28.06,25.20,19.22,14.48,11.50.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₃₀H₃₄N₂O₃,471.2648; found:471.2650.HPLC Purity:98.16%,retention time:1.52min.

- [0279] (E)-3-((2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)胺)丙烷酸(化合物31)的结构



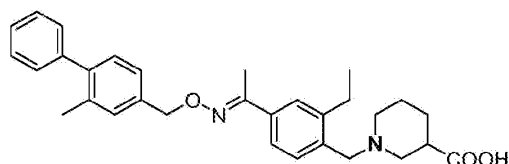
- [0280] 白色固体, 产率22.4%, 熔点: 149.6–149.8℃。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.66(s,1H),7.60(d,J=8.1Hz,1H),7.43(dd,J=17.6,7.9Hz,3H),7.36–7.28(m,5H),7.19(d,J=7.7Hz,1H),5.24(s,2H),4.28(s,2H),3.25(t,J=6.2Hz,2H),2.83(q,J=7.5Hz,2H),2.60–2.47(m,2H),2.28(s,3H),2.25(s,3H),1.29(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 176.80,154.30,143.38,141.76,141.51,137.84,137.02,134.93,130.29,130.06,129.85,129.31,128.78,127.78,126.55,126.52,125.39,124.05,75.71,44.64,31.36,25.08,21.94,19.22,14.38,11.40.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₈H₃₂N₂O₃,445.2491; found:445.2490.HPLC Purity:99.29%,retention time:1.24min.

- [0281] (E)-4-((2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)氨基丁酸(化合物32)的结构



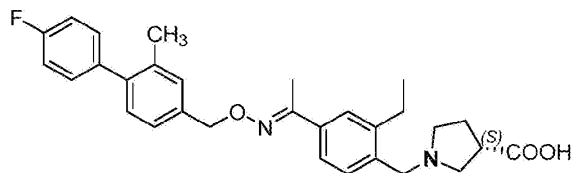
- [0282] 白色固体, 产率13.2%, 熔点: 133.3–136.3°C。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.63(s,1H),7.58(d,J=8.1Hz,1H),7.49–7.36(m,3H),7.36–7.28(m,5H),7.17(d,J=7.7Hz,1H),5.21(s,2H),4.21(s,2H),3.15(t,J=6.2Hz,2H),2.79(q,J=7.5Hz,2H),2.45–2.37(m,2H),2.26(s,3H),2.24(s,3H),1.90–1.85(m,2H),1.26(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 176.86,154.32,143.24,141.77,141.51,137.67,137.04,134.93,130.46,129.84,129.80,129.31,128.78,127.78,126.52,126.48,125.38,124.04,75.70,35.68,25.21,21.93,21.44,19.22,14.36,11.40.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₂₉H₃₄N₂O₃,459.2648; found:459.2647.HPLC Purity:98.69%,retention time:1.34min.

- [0283] (E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)哌啶-3-羧酸(化合物33)的结构



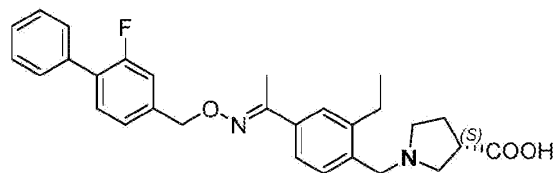
- [0284] 淡黄色油状, 产率15.3%。¹H NMR(400MHz,CD₃OD) δ 7.61(s,1H),7.56(d,J=8.0Hz,1H),7.50–7.37(m,3H),7.36–7.28(m,5H),7.22–7.09(m,1H),5.23(s,2H),4.12(s,2H),3.22–2.88(m,4H),2.83(q,J=7.5Hz,2H),2.61(s,1H),2.27(s,3H),2.25(s,3H),1.79–1.70(m,4H),1.31–1.19(m,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.19,154.48,143.99,141.75,141.48,137.42,137.05,134.92,130.86,129.85,129.32,128.81,128.79,128.77,127.79,126.51,125.39,123.77,75.67,57.43,55.07,52.96,25.22,22.28,19.25,14.48,11.48.HRMS(ESI)(m/z):[M+H]⁺calcd for C₃₁H₃₆N₂O₃,485.2804; found:485.2802.HPLC Purity:97.56%,retention time:1.42min.

- [0285] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4'-氟-2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物34)的结构



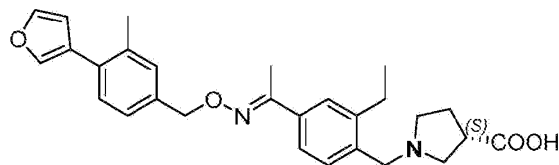
- [0286] 淡黄色固体，产率11.3%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.64(d,J=1.9Hz,1H),7.58(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.47(d,J=8.1Hz,1H),7.33-7.25(m,4H),7.19-7.10(m,3H),5.22(s,2H),4.42-4.34(m,2H),3.53-3.47(m,1H),3.38-3.32(m,2H),3.29-3.24(m,1H),3.12-3.04(m,1H),2.82(q,J=7.5Hz,2H),2.32(dt,J=14.2,7.9Hz,1H),2.27(s,3H),2.24(s,3H),2.23-2.18(m,1H),1.26(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.91,162.81,161.19,154.29,143.70,140.39,137.84,137.27,135.04,130.62,130.56,130.44,129.88,129.37,114.54,114.40,75.64,56.64,54.50,53.58,43.83,27.74,25.22,19.19,14.54,11.38.MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺489.25.

- [0287] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2-氟-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物35)的结构



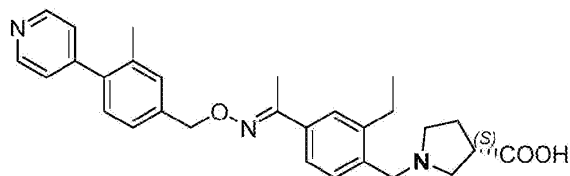
- [0288] 淡黄色固体，产率18.7%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.63(s,1H),7.57(d,J=6.1Hz,1H),7.52(d,J=8.0Hz,2H),7.48-7.40(m,4H),7.35(t,J=7.4Hz,1H),7.28(d,J=9.4Hz,1H),7.22(d,J=11.5Hz,1H),5.26(s,2H),4.33(d,J=4.1Hz,2H),3.46(dd,J=11.1,5.8Hz,1H),3.34(d,J=11.2Hz,2H),3.25(t,J=9.0Hz,1H),3.07(ddd,J=14.5,8.6,5.8Hz,1H),2.81(q,J=7.5Hz,2H),2.29(s,4H),2.22(dq,J=13.0,6.4Hz,1H),1.24(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.47,159.53,154.78,143.69,135.54,130.42,130.38,128.61,128.58,128.09,127.35,126.66,123.95,123.69,123.66,115.10,114.94,74.70,56.65,54.60,53.63,43.70,27.76,25.22,14.52,11.42.MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺475.30.

[0289] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(呋喃-3-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物36)的结构



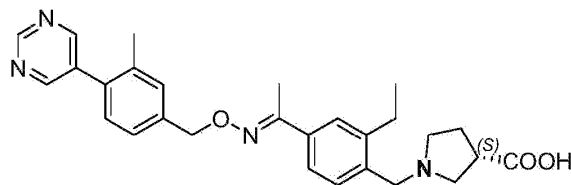
[0290] 淡黄色固体，产率21.2%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.61(dd,J=13.5,1.8Hz,2H),7.56 - 7.53(m,2H),7.47(d,J=8.1Hz,1H),7.30(d,J=7.8Hz,1H),7.27(s,1H),7.23(dd,J=7.8,1.8Hz,1H),6.62(d,J=1.9Hz,1H),5.18(s,2H),4.44 - 4.28(m,2H),3.52(dd,J=11.3,5.7Hz,1H),3.40 - 3.36(m,1H),3.35 - 3.32(m,1H),3.27(dt,J=11.1,7.4Hz,1H),3.08(ddd,J=14.4,8.8,5.7Hz,1H),2.80(q,J=7.5Hz,2H),2.36(s,3H),2.30(dt,J=15.6,7.0Hz,1H),2.24(s,3H),2.22(dd,J=13.5,6.2Hz,1H),1.23(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.76,154.25,143.72,142.57,139.97,137.86,136.85,135.34,131.69,130.51,130.15,128.74,126.66,125.53,123.98,110.90,75.65,56.45,54.32,53.53,43.55,27.70,25.24,20.03,14.56,11.41.

[0291] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(吡啶-4-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物37)的结构

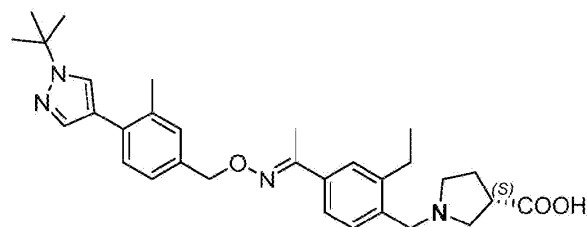


[0292] 淡黄色固体，产率19.2%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 8.56(d,J=6.2Hz,2H),7.63(s,1H),7.56(d,J=8.1Hz,1H),7.47(d,J=8.1Hz,1H),7.40(d,J=6.2Hz,2H),7.37(s,1H),7.34(d,J=7.8Hz,1H),7.22(d,J=7.8Hz,1H),5.24(s,2H),4.42 - 4.33(m,2H),3.50(dd,J=11.2,5.7Hz,1H),3.38(d,J=7.8Hz,1H),3.34(s,1H),3.30 - 3.24(m,1H),3.11 - 3.04(m,1H),2.81(q,J=7.5Hz,2H),2.32(dd,J=15.2,7.1Hz,1H),2.28(s,3H),2.27(s,3H),2.22(dt,J=13.6,6.7Hz,1H),1.24(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.89,154.44,150.81,148.56,143.72,138.78,138.11,137.73,134.81,130.48,130.13,128.98,126.66,125.69,124.62,123.97,75.40,56.56,54.41,53.57,43.62,27.73,25.20,19.02,14.56,11.38.

- [0293] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(嘧啶-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物38)的结构



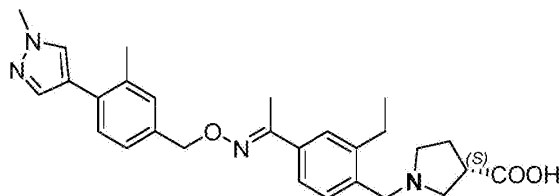
- [0294] 淡黄色固体，产率19.7%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 9.14(s,1H),8.78(s,2H),7.62(dJ=1.9Hz,1H),7.56(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.47(dJ=8.1Hz,1H),7.40(dJ=1.7Hz,1H),7.37(ddJ=7.8,1.8Hz,1H),7.26(dJ=7.8Hz,1H),5.24(s,2H),4.42-4.32(m,2H),3.49(ddJ=11.2,5.8Hz,1H),3.38-3.32(m,2H),3.27(dtJ=10.8,7.3Hz,1H),3.08(dddJ=14.4,8.7,5.8Hz,1H),2.81(qJ=7.5Hz,2H),2.35-2.31(m,1H),2.29(s,3H),2.27(s,3H),2.25-2.19(m,1H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.06,156.57,156.36,154.49,143.72,139.33,137.69,135.64,135.61,133.41,130.46,130.18,129.63,126.65,125.90,123.96,75.31,56.55,54.46,53.59,43.61,27.73,25.24,18.95,14.55,11.39.
- [0295] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((4-(叔丁基)-1H-吡唑-4-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物39)的结构



- [0296] 淡黄色固体，产率31.1%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.85(dJ=0.8Hz,1H),7.65-7.61(m,2H),7.56(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.45(dJ=8.1Hz,1H),7.33(dJ=7.8Hz,1H),7.29-7.26(m,1H),7.23(ddJ=7.8,1.8Hz,1H),5.18(s,2H),4.39-4.31(m,2H),3.47(ddJ=11.1,5.8Hz,1H),3.33(ddJ=10.8,6.1Hz,2H),3.25(dJ=10.3Hz,1H),3.07(dddJ=14.7,8.8,5.9Hz,1H),2.80(qJ=7.5Hz,2H),2.39(s,3H),2.33-2.26(m,1H),2.25(s,3H),2.24-2.19(m,1H),1.62(s,9H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.15,154.25,143.67,137.80,137.77,136.36,134.87,131.84,130.41,130.20,128.69,126.65,125.63,125.

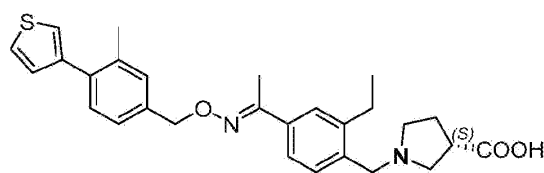
41,123.95,121.12,75.70,58.41,56.64,54.55,53.60,43.65,28.66,27.75,25.19,20.06,14.54,11.39. MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺517.30.

[0297] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((3-甲基-4-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物40)的结构



[0298] 淡黄色固体，产率29.5%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.74(s,1H),7.62(dJ=1.9Hz,1H),7.61-7.60(m,1H),7.56(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.45(dJ=8.1Hz,1H),7.32(dJ=7.8Hz,1H),7.28(dJ=1.8Hz,1H),7.22(ddJ=7.9,1.8Hz,1H),5.18(s,2H),4.41-4.32(m,2H),3.93(s,3H),3.49(ddJ=11.2,5.8Hz,1H),3.35(ddJ=11.2,7.0Hz,2H),3.26(dtJ=10.8,7.3Hz,1H),3.12-3.02(m,1H),2.80(qJ=7.5Hz,2H),2.38(s,3H),2.30(dddJ=15.7,8.4,6.2Hz,1H),2.25(s,3H),2.24-2.18(m,1H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.95,154.26,143.69,138.10,137.85,136.50,134.86,131.45,130.44,130.23,129.63,128.60,126.66,125.64,123.96,121.92,75.66,56.60,54.49,53.58,43.61,37.44,27.73,25.22,20.08,14.53,11.38. MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺475.30.

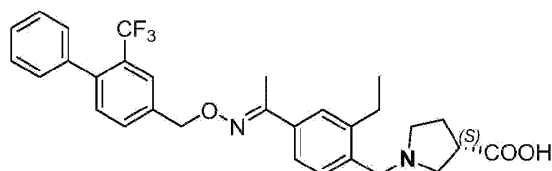
[0299] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(噻吩-3-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物41)的结构



[0300] 淡黄色固体，产率9.5%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.63(dJ=1.9Hz,1H),7.56(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.48-7.46(m,1H),7.43(ddJ=4.9,3.0Hz,1H),7.29-7.27(m,1H),7.27(ddJ=3.0,1.3Hz,1H),7.26-7.22(m,2H),7.13(ddJ=5.0,1.3Hz,1H),5.19(s,2H),4.38(ddJ=6.1,3.1Hz,2H),3.53-3.49(m,1H),3.36(ddJ=10.8,4.3Hz,2H),3.28(ddJ=10.9,7.2Hz,1H),3.09(tdJ=8.6,4.2Hz,1H),2.81-2.78(m,2H),2.31(s,4H),2.25(s,3H),2.24-2.2

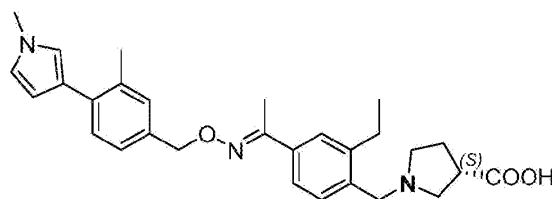
0(m,1H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.04,154.24,143.72,141.88,137.88,137.04,136.10,135.31,130.50,129.99,129.30,128.45,126.68,125.40,124.71,123.99,122.26,75.67,56.42,54.43,53.60,43.54,27.71,25.26,19.58,14.56,11.41.

[0301] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2-(三氟甲基)-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物42)的结构



[0302] 淡黄色固体, 产率31.8%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.81(s,1H),7.66(dJ=7.8 Hz,1H),7.63(dJ=1.9Hz,1H),7.56(ddJ=8.0,1.9Hz,1H),7.48(dJ=8.1Hz,1H),7.38(ddJ=5.1,1.9Hz,3H),7.34(dJ=7.8Hz,1H),7.28(ddJ=6.7,2.9Hz,2H),5.32(s,2H),4.41 - 4.32(m,2H),3.49(ddJ=11.2,5.8Hz,1H),3.34(tJ=8.1Hz,2H),3.29 - 3.23(m,1H),3.08(ddd, J=14.4,8.7,5.9Hz,1H),2.81(qJ=7.5Hz,2H),2.34 - 2.29(m,1H),2.29(s,3H),2.23(ttJ=13.5,6.2Hz,1H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 179.63,154.93,143.74,140.81,139.60,138.23,137.55,132.04,130.96,130.48,128.64,128.62,127.45,127.36,126.66,125.35,125.31,123.97,74.69,56.58,54.49,53.60,43.68,27.75,25.23,14.52,11.41. MS (ESI)(m/z):[M+H]⁺525.25.

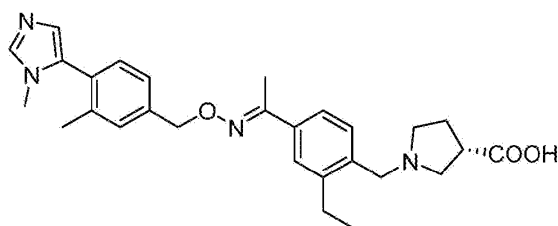
[0303] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((3-甲基-4-(1-甲基-1H-吡咯-3-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物43)的结构



[0304] 淡黄色固体, 产率21.5%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.61(s,1H),7.54(dJ=7.8 Hz,1H),7.44(dJ=8.1Hz,1H),7.29(dJ=8.0Hz,1H),7.20(s,1H),7.15(dJ=7.8Hz,1H),6.74(s,1H),6.64(s,1H),6.21(s,1H),5.15(s,2H),4.35(tJ=10.7Hz,2H),3.66(s,3H),3.48(ddJ=11.3,5.7Hz,1H),3.34(s,2H),3.24(dJ=9.9Hz,1H),3.07(dJ=8.1Hz,1H),2.79(qJ=7.5Hz,2

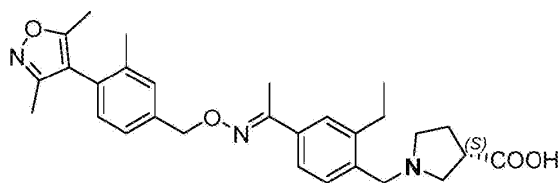
H), 2.39(s, 3H), 2.30 - 2.24(m, 1H), 2.23(s, 3H), 2.21(s, 1H), 1.23(t, J = 7.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) δ 178.09, 154.09, 143.65, 137.89, 135.78, 134.80, 134.36, 130.45, 130.22, 130.11, 128.42, 126.64, 125.44, 123.94, 123.77, 121.28, 120.43, 108.50, 75.92, 56.53, 54.45, 53.57, 43.63, 34.81, 27.73, 25.22, 20.45, 14.53, 11.40. MS(ESI)(m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+ 474.25$.

[0305] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((3-甲基-4-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物44)的结构



[0306] 淡黄色固体, 产率27.1%。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 7.72(s, 1H), 7.62(s, 1H), 7.56(d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.46(d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.38(s, 1H), 7.32(d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.21(d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.88(s, 1H), 5.24(s, 2H), 4.34(d, J = 4.2 Hz, 2H), 3.45(s, 4H), 3.34(s, 2H), 3.26(s, 1H), 3.07(q, J = 6.0 Hz, 1H), 2.81(q, J = 7.6 Hz, 2H), 2.27(s, 3H), 2.23(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.18(s, 3H), 1.24(t, J = 7.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, CD_3OD) δ 178.17, 154.52, 143.68, 139.34, 138.14, 137.90, 137.62, 132.16, 130.91, 130.41, 129.62, 128.07, 126.63, 126.33, 125.24, 123.94, 75.41, 56.69, 54.56, 53.60, 43.72, 30.75, 27.78, 25.23, 18.73, 14.54, 11.42. MS(ESI)(m/z): $[\text{M} + \text{H}]^+ 475.25$.

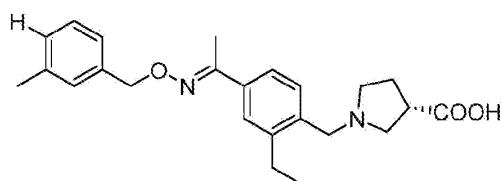
[0307] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3,5-二甲基异恶唑-4-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物45)的结构



[0308] 淡黄色固体, 产率20.7%。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 7.64(s, 1H), 7.57(d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.48(d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.39(s, 1H), 7.31(d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.12(dd, J = 7.8, 4.1 Hz, 1H), 5.23(s, 2H), 4.40(d, J = 13.6 Hz, 2H), 3.50(dd, J = 11.3, 5.8 Hz, 1H), 3.36(q, J = 10.0, 9.1 Hz, 2H), 3.30 - 3.25(m, 1H), 3.12 - 3.05(m, 1H), 2.82(q, J = 7.5 Hz, 2H), 2.31(dd, J = 14.6, 6.8 Hz, 2H), 2.27(s, 3H), 2.23(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.18(s, 3H), 1.24(t, J = 7.5 Hz, 3H).

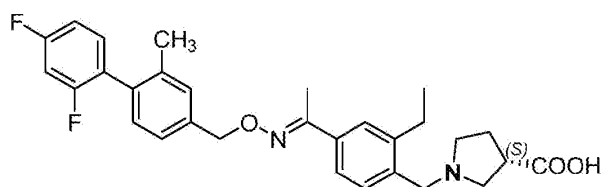
z, 1H), 2.27(s, 3H), 2.26 - 2.23(m, 1H), 2.21(s, 3H), 2.14(s, 3H), 2.05(s, 3H), 1.25(t, J=7.5Hz, 3H). ¹³C NMR(151MHz, CD₃OD) δ 178.08, 165.70, 159.25, 154.41, 143.72, 138.64, 137.45, 130.52, 130.46, 129.72, 128.36, 126.66, 125.58, 123.98, 115.90, 75.51, 56.54, 54.47, 53.59, 43.60, 27.73, 25.24, 18.47, 14.55, 11.43, 9.83, 8.99. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 490.30.

[0309] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物46)的结构



[0310] 淡黄色固体, 产率50.1%。¹H NMR(600MHz, CD₃OD) δ 7.62(d, J=1.9Hz, 1H), 7.55(dd, J=8.1, 1.9Hz, 1H), 7.47(d, J=8.1Hz, 1H), 7.25 - 7.19(m, 2H), 7.17(d, J=7.5Hz, 1H), 7.10(d, J=7.5Hz, 1H), 5.16(s, 2H), 4.42 - 4.32(m, 2H), 3.50(dd, J=11.3, 5.9Hz, 1H), 3.38 - 3.33(m, 2H), 3.28(dd, J=10.9, 7.5Hz, 1H), 3.09(ddd, J=14.6, 8.5, 5.8Hz, 1H), 2.81(q, J=7.5Hz, 2H), 2.33(s, 3H), 2.32 - 2.28(m, 1H), 2.24(s, 4H), 1.24(t, J=7.5Hz, 3H). ¹³C NMR(151MHz, CD₃OD) δ 178.42, 154.23, 143.69, 137.94, 137.83, 137.66, 130.47, 128.47, 128.09, 127.88, 126.65, 124.91, 123.96, 75.94, 56.52, 54.52, 53.64, 43.66, 27.75, 25.25, 20.06, 14.55, 11.40. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 395.25.

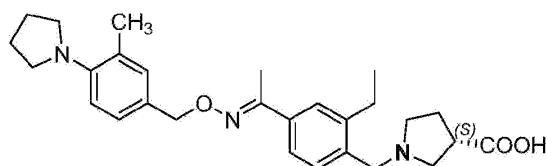
[0311] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2', 4'-二氟-2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物47)的结构



[0312] 淡黄色固体, 产率19.0%。¹H NMR(600MHz, CD₃OD) δ 7.63(s, 1H), 7.56(d, J=7.9Hz, 1H), 7.47(d, J=8.1Hz, 1H), 7.33(s, 1H), 7.28(d, J=8.0Hz, 1H), 7.25(d, J=7.5Hz, 1H), 7.14(d, J=7.9Hz, 1H), 7.01(t, J=8.8Hz, 2H), 5.22(s, 2H), 4.41 - 4.28(m, 2H), 3.48(dd, J=11.1, 5.7Hz, 1H), 3.37 - 3.32(m, 2H), 3.25(q, J=8.0Hz, 1H), 3.07(t, J=7.8Hz, 1H), 2.80(q, J=7.5

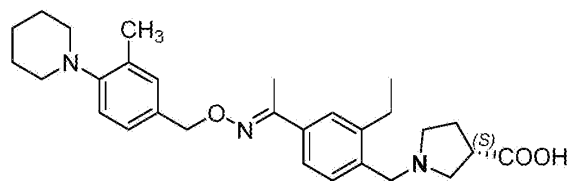
Hz,2H),2.34 - 2.28(m,1H),2.26(s,3H),2.22(dJ=14.8Hz,1H),2.15(s,3H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 177.31,162.53,160.90,159.67,158.03,153.59,142.87,137.32,136.91,135.57,133.46,131.48,131.44,129.64,129.00,128.62,125.84,124.47,123.14,110.15,109.98,102.59,102.42,102.24,74.75,55.85,53.67,52.76,42.92,26.96,24.42,17.83,13.73,10.62.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺507.25.

[0313] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(吡咯烷-1-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物48)的结构



[0314] 淡黄色固体, 产率17.5%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.61(dJ=1.9Hz,1H),7.54(ddJ=8.0,1.9Hz,1H),7.46(dJ=8.1Hz,1H),7.14(dJ=2.1Hz,1H),7.11(ddJ=8.2,2.2Hz,1H),6.87(dJ=8.2Hz,1H),5.08(s,2H),4.36(dJ=8.0Hz,2H),3.50(ddJ=11.2,5.7Hz,1H),3.38 - 3.32(m,2H),3.26(dtJ=10.9,7.3Hz,1H),3.15 - 3.10(m,4H),3.07(tdJ=8.8,4.4Hz,1H),2.80(qJ=7.5Hz,2H),2.33 - 2.30(m,1H),2.29(s,3H),2.26 - 2.22(m,1H),2.20(s,3H),1.94 - 1.88(m,4H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 178.01,153.87,149.09,143.66,137.93,131.74,130.47,129.79,128.56,126.61,126.49,123.93,115.53,75.99,56.52,54.41,53.55,50.82,43.67,27.75,25.24,24.30,19.25,14.57,11.40.MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺464.30.

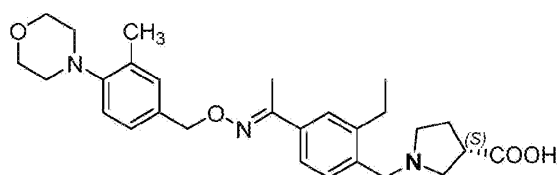
[0315] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(哌啶-1-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物49)的结构



[0316] 淡黄色固体, 产率19.4%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.62(dJ=1.9Hz,1H),7.55(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.47(dJ=8.1Hz,1H),7.20(dJ=2.1Hz,1H),7.17(ddJ=8.1,2.1Hz,1H),6.99(dJ=8.1Hz,1H),5.11(s,2H),4.39 - 4.29(m,2H),3.48(ddJ=11.1,5.8Hz,1H),

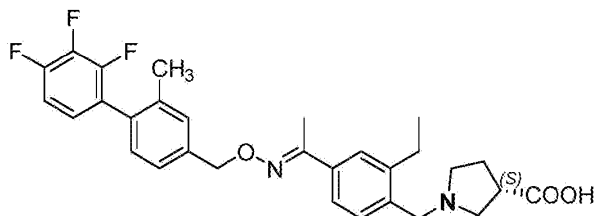
3.37(s,1H),3.35 - 3.31(m,1H),3.29 - 3.22(m,1H),3.12 - 3.04(m,1H),2.86 - 2.77(m,6H),
2.32(dd,J=13.2,7.4Hz,1H),2.29(s,3H),2.25(d,J=12.9Hz,1H),2.23(s,3H),1.72(p,J=5.7
Hz,4H),1.59(q,J=5.8,5.4Hz,2H),1.25(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ
178.42,154.03,152.53,143.62,137.78,132.13,132.04,130.84,130.42,126.59,126.44,123.9
1,118.45,75.89,56.59,54.54,53.60,53.20,43.76,27.78,26.29,25.24,24.08,16.69,14.55,11.
42.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺478.30.

[0317] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-吗啉基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物50)的结构



[0318] 淡黄色固体, 产率20.7%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.64(d,J=1.8Hz,1H),7.5
7(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.48(d,J=8.1Hz,1H),7.26 - 7.18(m,2H),7.04(dt,J=8.1,1.9Hz,1
H),5.13(s,2H),4.43 - 4.33(m,2H),3.88 - 3.77(m,4H),3.55 - 3.47(m,1H),3.37(dd,J=9.5,
6.3Hz,2H),3.32 - 3.26(m,1H),3.12(tt,J=8.7,6.0Hz,1H),2.88(dq,J=4.8,2.6Hz,4H),2.82
(q,J=7.6Hz,2H),2.39 - 2.29(m,4H),2.28 - 2.20(m,4H),1.29 - 1.23(m,3H).¹³C NMR(1
26MHz,CD₃OD) δ 178.88,154.10,151.00,143.69,137.88,132.82,132.22,130.99,130.47,
130.17,126.64,126.57,123.96,118.46,75.76,67.06,56.48,54.55,53.67,52.11,43.64,27.74,
25.25,16.72,14.56,11.41.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺480.30.

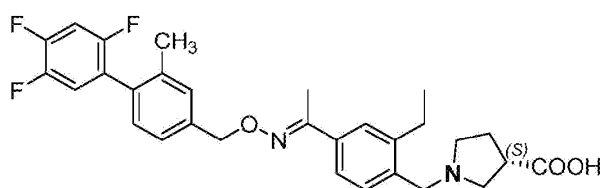
[0319] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2', 3', 4'-三氟-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物51)的结构



[0320] 淡黄色固体, 产率20.1%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.63(s,1H),7.56(d,J=8.0
Hz,1H),7.48(d,J=8.2Hz,1H),7.34(s,1H),7.30(d,J=7.9Hz,1H),7.16(d,J=7.5Hz,2H),7.0

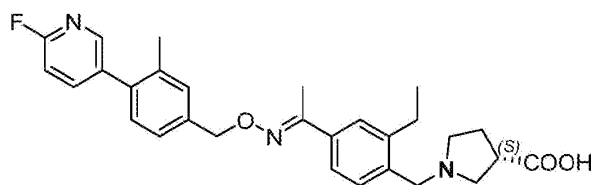
3(qJ=6.3Hz,1H),5.22(s,2H),4.38(tJ=10.0Hz,2H),3.50(s,1H),3.36(dJ=8.6Hz,2H),3.28(dJ=10.5Hz,1H),3.09(s,1H),2.80(qJ=7.5Hz,2H),2.26(s,5H),2.16(s,3H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 154.43,143.70,138.70,137.73,136.31,133.12,133.11,130.48,130.25,129.75,129.50,126.65,125.36,125.14,125.12,125.06,123.96,111.81,111.76,111.76,75.44,56.57,56.51,56.48,54.74,54.43,53.59,53.01,43.63,43.61,43.56,43.45,43.30,43.11,27.74,25.24,18.57,18.55,14.53,11.42.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺525.20.

[0321] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2', 4', 5'-三氟-2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物52)的结构



[0322] 淡黄色固体, 产率17.9%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.62(s,1H),7.55(dJ=8.0Hz,1H),7.51(dJ=8.3Hz,1H),7.33(s,1H),7.28(dJ=7.6Hz,1H),7.22(dJ=6.7Hz,1H),7.14(dJ=7.3Hz,2H),5.21(s,2H),4.38(tJ=8.9Hz,2H),3.49(s,1H),3.35(s,2H),3.29(s,1H),3.10(s,1H),2.81(dJ=7.5Hz,2H),2.30(dJ=7.4Hz,1H),2.25(s,3H),2.23(s,1H),2.16(s,3H),1.23(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃OD) δ 155.58,154.43,153.96,150.21,148.51,147.31,145.70,143.71,138.63,137.70,136.34,133.18,130.53,130.33,129.70,129.49,126.64,125.34,123.95,118.93,118.76,105.40,105.26,105.20,105.06,75.46,56.40,54.49,53.66,43.71,27.79,25.30,18.59,18.57,14.56,11.43.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺525.25.

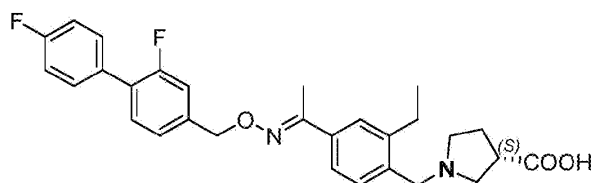
[0323] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(6-氟吡啶-3-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物53)的结构



[0324] 淡黄色固体, 产率25.7%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.12 - 8.08(m,1H),7.88(dddJ=8.5,7.8,2.6Hz,1H),7.62(dJ=1.9Hz,1H),7.55(ddJ=8.0,1.9Hz,1H),7.47(dJ=8.

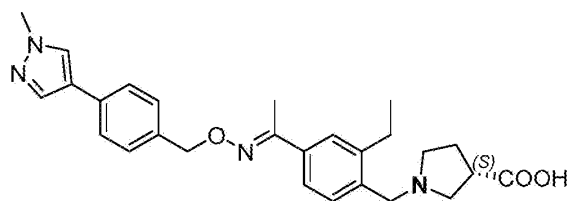
1H,1H),7.35(d,J=1.7Hz,1H),7.31(dd,J=7.8,1.8Hz,1H),7.19(d,J=7.8Hz,1H),7.11(dd
d,J=8.5,2.6,0.7Hz,1H),5.22(s,2H),4.39 - 4.31(m,2H),3.48(dd,J=11.2,5.7Hz,1H),3.36
(s,1H),3.33(d,J=2.6Hz,1H),3.29 - 3.21(m,1H),3.08(tt,J=8.5,5.8Hz,1H),2.80(q,J=7.5
Hz,2H),2.34 - 2.27(m,1H),2.25(s,3H),2.24(s,3H),2.21(dd,J=13.5,6.4Hz,1H),1.23(t,J=
7.6Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 179.54,165.00,163.11,155.80,148.23,148.1
2,145.08,143.92,143.86,139.83,139.04,137.56,136.94,136.90,136.84,131.85,131.43,130.
95,128.01,127.07,125.32,110.23,109.93,76.82,57.91,55.84,54.97,45.08,29.14,26.63,20.
46,15.94,12.80.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺490.25.

[0325] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2,4'-二氟-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物54)的结构



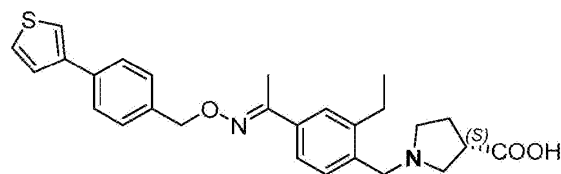
[0326] 淡黄色固体, 产率28.1%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 7.62(s,1H),7.56(s,2H),7.
52(dd,J=7.3,5.3Hz,2H),7.42(t,J=8.0Hz,1H),7.27(d,J=7.9Hz,1H),7.21(d,J=11.6Hz,1
H),7.15(t,J=8.8Hz,2H),5.24(s,2H),4.46 - 4.38(m,2H),3.54(dd,J=11.3,6.2Hz,1H),3.44
- 3.37(m,2H),3.36(s,1H),3.16 - 3.10(m,1H),2.82(q,J=7.5Hz,2H),2.34(dd,J=14.3,7.3
Hz,1H),2.28(s,3H),2.27 - 2.23(m,1H),1.23(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(151MHz,CD₃O
D) δ 179.36,163.26,161.63,160.25,158.62,154.74,143.80,140.37,137.67,131.67,130.67,
130.55,130.53,130.49,130.47,130.32,130.29,130.06 127.05,126.67,123.98,123.75,123.7
2,115.11,114.95,114.81,74.67,56.19,54.41,53.74,43.59,27.72,25.37,14.56,11.43.MS(ES
I)(m/z):[M+H]⁺493.25.

[0327] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((4-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物55)的结构



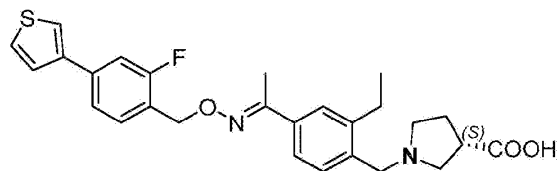
[0328] 淡黄色固体，产率34.3%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.94 - 7.88(m,1H),7.79 (ddJ=2.7,1.2Hz,1H),7.62(qJ=1.8Hz,1H),7.56(dtJ=8.1,2.2Hz,1H),7.52(dtJ=8.3,2.0 Hz,2H),7.45(dJ=8.1Hz,1H),7.39(ddJ=8.2,1.9Hz,2H),5.20(s,2H),4.43 - 4.33(m,2H), 3.92 - 3.87(m,3H),3.52(ddJ=11.3,5.7Hz,1H),3.37(dtJ=10.6,7.1Hz,2H),3.28(dJ=9.4 Hz,1H),3.14 - 3.05(m,1H),2.79(dttJ=7.6,3.9,2.0Hz,2H),2.31(dtJ=15.7,7.4Hz,1H),2. 26 - 2.24(m,3H),2.22(ddJ=13.7,6.9Hz,1H),1.25 - 1.22(m,3H).¹³C NMR(126MHz,C D₃OD) δ 177.66,154.30,143.73,137.91,136.13,135.97,132.02,130.48,129.94,128.49,12 7.75,126.69,124.90,123.99,122.83,75.65,56.45,54.38,53.56,43.44,37.53,27.67,25.22,14. 54,11.39.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺461.30.

[0329] (S,E)-1-(2-ethyl-4-((4-(噻吩-3-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物56)的结构



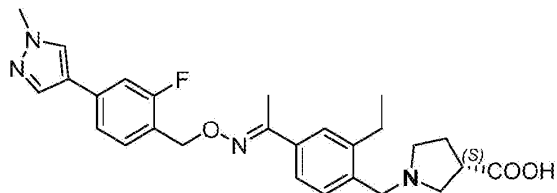
[0330] 淡黄色固体，产率19.7%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.64(ddJ=8.5,2.0Hz,3 H),7.61(ddJ=2.8,1.5Hz,1H),7.58(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.48 - 7.40(m,5H),5.23(s,2H), 4.40(dJ=2.5Hz,2H),3.53(ddJ=11.3,5.8Hz,1H),3.37(ddJ=12.5,5.6Hz,2H),3.27(dJ= 10.5Hz,1H),3.10(dddJ=11.8,8.6,5.7Hz,1H),2.81(qJ=7.5Hz,2H),2.32(dqJ=15.8,7.9 Hz,1H),2.27(s,3H),2.22(ddJ=13.4,6.7Hz,1H),1.25(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MH z,CD₃OD) δ 154.35,143.75,141.83,137.95,136.87,135.39,130.47,128.38,126.72,125.90, 125.85,125.71,124.02,119.91,75.59,56.53,54.43,53.55,43.44,27.68,25.21,14.53,11.39.M S(ESI)(m/z):[M+H]⁺463.20

- [0331] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-氟-4-(噻吩-3-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物57)的结构



- [0332] 淡黄色固体，产率27.7%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.67(dd,J=2.9,1.4Hz,1H),7.63(d,J=2.0Hz,1H),7.56(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.51 - 7.45(m,4H),7.44(dd,J=5.1,1.4Hz,1H),7.40(dd,J=11.4,1.6Hz,1H),5.28(d,J=1.1Hz,2H),4.43 - 4.34(m,2H),3.53(d,d,J=11.3,5.6Hz,1H),3.43 - 3.34(m,2H),3.28(dt,J=11.0,7.4Hz,1H),3.15 - 3.05(m,1H),2.80(q,J=7.5Hz,2H),2.37 - 2.29(m,1H),2.28 - 2.19(m,4H),1.24(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 177.72,162.31,160.35,154.57,143.71,140.56,137.91,137.84,137.72,131.06,130.50,130.02,126.66,126.26,125.60,123.97,123.49,123.37,121.53,121.51,121.01,112.54,112.35,69.22,69.19,56.44,54.29,53.52,43.54,27.69,25.22,14.51,11.30.MS (ESI)(m/z):[M+H]⁺481.20.

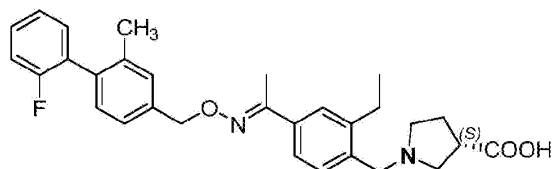
- [0333] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-氟-4-(1-甲基-1H-吡唑-4-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物58)的结构



- [0334] 淡黄色固体，产率31.6%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.00 - 7.93(m,1H),7.82(d,J=0.8Hz,1H),7.63(d,J=2.0Hz,1H),7.56(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.50 - 7.41(m,2H),7.34(dd,J=7.8,1.7Hz,1H),7.30(dd,J=11.3,1.7Hz,1H),5.26(s,2H),4.44 - 4.34(m,2H),3.91(s,3H),3.53(dd,J=11.2,5.7Hz,1H),3.43 - 3.34(m,2H),3.28(dt,J=11.0,7.4Hz,1H),3.10(t,t,J=8.7,5.7Hz,1H),2.81(q,J=7.6Hz,2H),2.37 - 2.29(m,1H),2.25(s,4H),1.25(t,J=7.6Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 177.73,162.41,160.45,154.51,143.71,137.73,136.16,134.81,134.74,131.22,131.18,130.49,130.06,128.17,126.65,123.95,122.64,122.52,12

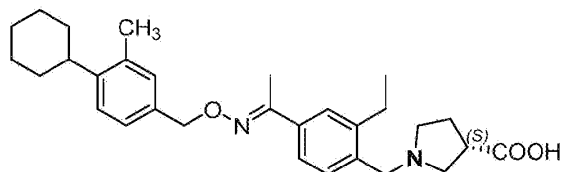
1.79, 121.77, 120.55, 120.52, 111.53, 111.35, 69.24, 69.22, 56.48, 54.31, 53.53, 43.56, 37.61, 27.69, 25.21, 14.50, 11.28 MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 479.30.

[0335] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2'-氟-2-甲基-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物59)的结构



[0336] 淡黄色固体，产率33.5%。¹H NMR(500MHz, CD₃OD) δ 7.63(s, 1H), 7.56(d, J=8.0Hz, 1H), 7.49(d, J=8.1Hz, 1H), 7.38(td, J=8.9, 8.2, 3.6Hz, 1H), 7.32(s, 1H), 7.28(d, J=7.7Hz, 1H), 7.22(d, J=4.6Hz, 2H), 7.15(t, J=8.0Hz, 2H), 5.22(s, 2H), 4.38 - 4.31(m, 2H), 3.48(dd, J=11.3, 6.1Hz, 1H), 3.35(s, 2H), 3.29 - 3.24(m, 1H), 3.09(ddd, J=14.7, 8.6, 6.1Hz, 1H), 2.81(q, J=7.5Hz, 2H), 2.31(dd, J=14.5, 7.0Hz, 1H), 2.27(s, 3H), 2.23(dd, J=13.4, 6.8Hz, 1H), 2.16(s, 3H), 1.24(t, J=7.5Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 179.07, 160.43, 158.81, 154.38, 143.68, 137.85, 137.75, 136.26, 135.28, 131.31, 131.28, 130.47, 129.67, 129.35, 129.09, 129.04, 128.96, 126.66, 125.19, 123.95, 123.92, 123.89, 115.08, 114.93, 75.63, 56.46, 54.60, 53.70, 43.65, 27.75, 25.28, 18.68, 14.54, 11.44. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 489.25.

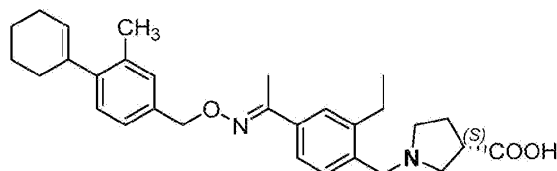
[0337] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-环己基-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物60)的结构



[0338] 淡黄色固体，产率34.5%。¹H NMR(500MHz, CD₃OD) δ 7.62(d, J=2.0Hz, 1H), 7.55(dd, J=8.1, 1.9Hz, 1H), 7.48(d, J=8.1Hz, 1H), 7.20 - 7.13(m, 3H), 5.13(s, 2H), 4.42 - 4.30(m, 2H), 3.50(dd, J=11.2, 5.8Hz, 1H), 3.36(dd, J=11.7, 7.9Hz, 2H), 3.27(dt, J=10.9, 7.3Hz, 1H), 3.09(ddd, J=14.6, 8.9, 5.8Hz, 1H), 2.81(q, J=7.5Hz, 2H), 2.74(ddd, J=11.5, 9.7, 3.2Hz, 1H), 2.32(s, 4H), 2.23(s, 4H), 1.91 - 1.82(m, 2H), 1.81 - 1.73(m, 3H), 1.52 - 1.39(m, 4H), 1.33 - 1.28(m, 1H), 1.25(t, J=7.6Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 178.14, 154.05, 145.

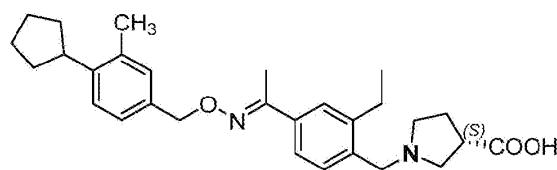
25,143.65,137.82,134.85,134.63,130.45,130.24,129.88,126.62,125.87,124.97,123.93,75.90,56.52,54.43,53.57,43.69,39.82,33.49,27.76,26.83,26.02,25.24,18.11,14.56,11.42. MS (ESI)(m/z):[M+H]⁺477.30.

[0339] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-甲基-2',3',4',5'-四氢-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物61)的结构



[0340] 淡黄色固体，产率31.2%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.60(dJ=2.0Hz,1H),7.52(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.46(dJ=8.1Hz,1H),7.15(dJ=1.7Hz,1H),7.11(ddJ=7.8,1.8Hz,1H),6.97(dJ=7.7Hz,1H),5.47(tdJ=3.8,2.0Hz,1H),5.11(s,2H),4.39 - 4.28(m,2H),3.47(ddJ=11.1,5.7Hz,1H),3.37 - 3.31(m,2H),3.24(dtJ=10.9,7.3Hz,1H),3.06(ttJ=8.9,5.8Hz,1H),2.78(qJ=7.5Hz,2H),2.33 - 2.21(m,5H),2.20(s,3H),2.16 - 2.10(m,4H),1.73(tddJ=8.2,4.9,2.6Hz,2H),1.67(qqJ=5.8,2.6Hz,2H),1.22(tJ=7.5Hz,3H).¹³CNMR(126MHz,CD₃OD) δ 178.11,154.10,144.02,143.65,138.75,137.74,135.99,134.52,130.49,130.29,129.59,127.88,126.60,125.31,125.22,123.93,75.85,56.47,54.35,53.53,43.72,29.82,27.78,25.26,24.97,22.81,21.92,18.61,14.59,11.45. MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺475.30

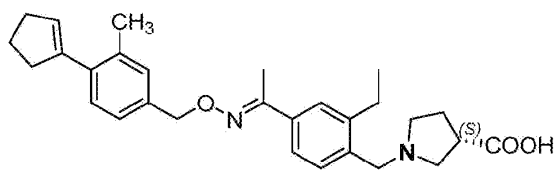
[0341] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-环戊基-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物62)的结构



[0342] 淡黄色固体，产率33.5%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.61(dJ=1.9Hz,1H),7.54(ddJ=8.0,1.9Hz,1H),7.47(dJ=8.1Hz,1H),7.19(dJ=7.8Hz,1H),7.16(dJ=1.9Hz,1H),7.13(dJ=1.8Hz,1H),5.11(s,2H),4.45 - 4.30(m,2H),3.52(ddJ=11.3,5.8Hz,1H),3.41 - 3.32(m,2H),3.28(ddJ=11.0,7.4Hz,1H),3.19(ttJ=9.2,7.5Hz,1H),3.09(dddJ=14.6,8.8,5.8Hz,1H),2.79(qJ=7.6Hz,2H),2.31(s,4H),2.21(s,4H),1.99(dddddJ=12.2,10.9,6.

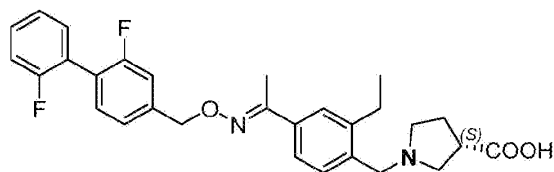
7,2.8,1.4Hz,2H),1.85 - 1.76(m,2H),1.72 - 1.64(m,2H),1.58 - 1.47(m,2H),1.23(t,J=7.5 Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 178.02,154.03,143.86,143.70,137.92,135.45,134.86,130.52,129.89,129.76,126.65,125.83,124.80,123.98,75.90,56.35,54.35,53.58,43.56,41.31,33.26,27.72,25.27,25.10,18.61,14.59,11.43.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺463.30

[0343] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((4-(环戊-1-烯-1-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物63)的结构



[0344] 淡黄色固体, 产率30.4%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.60(d,J=1.9Hz,1H),7.53(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.46(d,J=8.1Hz,1H),7.18(d,J=1.7Hz,1H),7.16 - 7.10(m,2H),5.73(p,J=2.2Hz,1H),5.13(s,2H),4.39 - 4.26(m,2H),3.48(dd,J=11.2,5.7Hz,1H),3.37 - 3.32(m,1H),3.29(s,1H),3.26 - 3.20(m,1H),3.06(ddd,J=14.6,8.8,5.8Hz,1H),2.78(q,J=7.5Hz,2H),2.67 - 2.58(m,2H),2.51(tq,J=7.2,2.4Hz,2H),2.31(s,3H),2.30 - 2.19(m,5H),1.97(p,J=7.5Hz,2H),1.22(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 178.11,154.18,143.66,143.14,137.75,137.50,136.20,135.06,130.47,130.29,130.01,128.84,127.61,126.61,125.17,123.93,75.74,56.50,54.38,53.54,43.71,36.25,33.04,27.76,25.24,23.30,20.04,14.57,11.43.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺461.30.

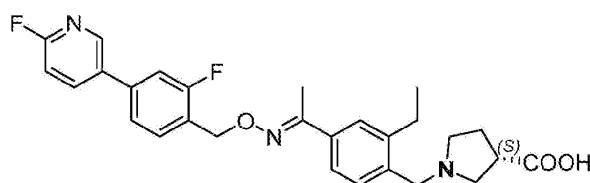
[0345] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((2,2'-二氟-[1,1'-联苯]-4-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物64)的结构



[0346] 淡黄色固体, 产率28.9%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.63(d,J=1.9Hz,1H),7.57(dd,J=8.1,2.0Hz,1H),7.47(d,J=8.1Hz,1H),7.44 - 7.40(m,1H),7.39(d,J=2.5Hz,1H),7.38(d,J=2.6Hz,1H),7.31(dd,J=7.9,1.6Hz,1H),7.28 - 7.25(m,1H),7.24(d,J=1.7Hz,1H),7.19(ddd,J=9.6,8.2,1.2Hz,1H),5.28(s,2H),4.31(d,J=3.9Hz,2H),3.44(dd,J=10.6,5.7Hz,

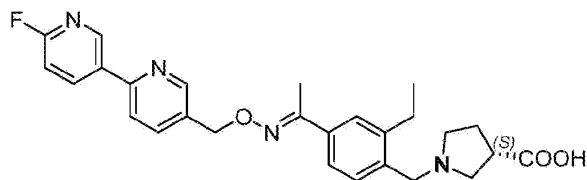
1H), 3.29(dJ=9.8Hz, 2H), 3.23(s, 1H), 3.07(dddJ=14.5, 8.6, 6.0Hz, 1H), 2.81(qJ=7.5Hz, 2H), 2.31(dJ=0.8Hz, 3H), 2.29 - 2.25(m, 1H), 2.23(ddJ=13.6, 7.0Hz, 1H), 1.27 - 1.23(m, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 160.79, 160.67, 158.83, 154.90, 143.63, 141.17, 141.11, 137.38, 131.32, 131.22, 130.37, 129.77, 129.71, 126.62, 123.99, 123.96, 123.90, 123.32, 123.30, 123.15, 122.70, 122.57, 115.27, 115.10, 114.64, 114.46, 74.66, 56.68, 54.68, 53.65, 43.80, 27.79, 25.22, 14.50, 11.45. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 493.20.

[0347] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((2-氟-4-(6-氟吡啶-3-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物65)的结构



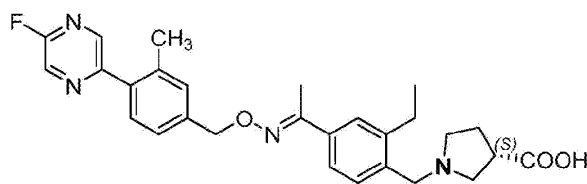
[0348] 淡黄色固体, 产率20.3%。 ¹H NMR(500MHz, CD₃OD) δ 8.49 - 8.43(m, 1H), 8.23 - 8.16(m, 1H), 7.64(qJ=1.8Hz, 1H), 7.61(dtJ=7.8, 1.8Hz, 1H), 7.58(dqJ=9.9, 1.9Hz, 1H), 7.49(s, 1H), 7.47(dJ=4.2Hz, 1H), 7.44(dddJ=10.5, 3.9, 2.0Hz, 1H), 7.16(dqJ=8.5, 2.4Hz, 1H), 5.34(dJ=2.2Hz, 2H), 4.43 - 4.34(m, 2H), 3.52(ddJ=11.2, 5.8Hz, 1H), 3.41 - 3.37(m, 1H), 3.36 - 3.34(m, 1H), 3.28(ddJ=10.9, 7.3Hz, 1H), 3.10(ttJ=8.9, 5.8Hz, 1H), 2.85 - 2.78(m, 2H), 2.37 - 2.29(m, 1H), 2.27(qJ=2.6, 2.2Hz, 3H), 2.23(ddJ=13.5, 6.7Hz, 1H), 1.25(ttJ=7.6, 1.9Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 162.39, 154.77, 145.28, 145.16, 143.72, 140.36, 140.29, 138.32, 137.59, 131.37, 131.33, 130.46, 130.34, 126.66, 125.13, 125.01, 123.96, 122.37, 113.51, 113.32, 109.52, 109.22, 69.01, 56.52, 54.43, 53.58, 43.59, 27.71, 25.21, 14.50, 11.28. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 494.20

[0349] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((6'-氟-[2,3'-联吡啶]-5-基)甲氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物66)的结构



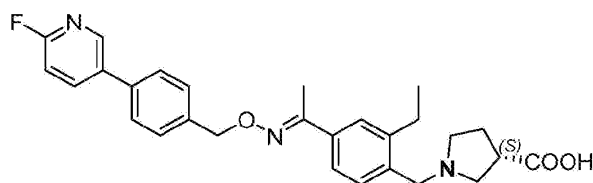
[0350] 淡黄色固体，产率17.2%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.84 - 8.80(m,1H),8.72(dd,J=2.3,0.9Hz,1H),8.54(ddd,J=8.6,7.6,2.6Hz,1H),7.98(dd,J=8.1,2.2Hz,1H),7.92(d,dJ=8.1,0.9Hz,1H),7.64(dJ=2.0Hz,1H),7.58(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.49(dJ=8.1Hz,1H),7.19(ddd,J=8.6,2.6,0.6Hz,1H),5.33(s,2H),4.45 - 4.35(m,2H),3.53(dd,J=11.2,5.7Hz,1H),3.42 - 3.37(m,1H),3.37 - 3.34(m,1H),3.29(dd,J=11.0,7.3Hz,1H),3.11(ddt,J=11.2,8.4,5.9Hz,1H),2.82(qJ=7.5Hz,2H),2.34(dt,J=15.1,7.7Hz,1H),2.29(s,3H),2.28 - 2.21(m,1H),1.25(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 177.73,164.91,162.99,155.08,152.89,149.35,145.86,145.74,143.78,140.31,140.25,137.56,137.50,133.65,132.98,132.94,130.50,130.31,126.69,123.99,120.45,109.42,109.12,72.79,56.49,54.38,53.57,43.52,27.69,25.22,14.53,11.38.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺477.20.

[0351] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(5-氟吡嗪-2-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物67)的结构



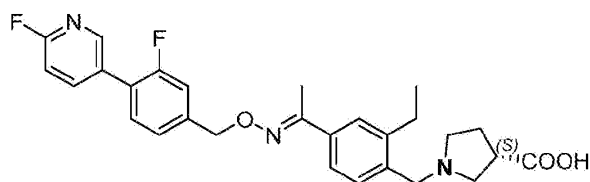
[0352] 淡黄色固体，产率16.3%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.59(dd,J=8.3,1.4Hz,1H),8.38(dJ=1.6Hz,1H),7.66(dJ=1.9Hz,1H),7.60(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.51(dJ=8.1Hz,1H),7.43(dJ=7.7Hz,1H),7.40(s,1H),7.38 - 7.35(m,1H),5.27(s,2H),4.49 - 4.41(m,2H),3.58(dd,J=11.4,6.0Hz,1H),3.45(dJ=8.2Hz,1H),3.41(dJ=7.7Hz,1H),3.39 - 3.34(m,1H),3.20 - 3.12(m,1H),2.83(qJ=7.5Hz,2H),2.38(s,3H),2.35(dd,J=9.1,6.9Hz,1H),2.30(s,3H),2.28 - 2.24(m,1H),1.29 - 1.25(m,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 179.74,154.46,152.91,143.82,141.30,141.23,139.46,137.93,136.38,135.09,131.95,131.65,130.58,130.32,129.70,129.58,126.73,125.50,124.04,75.35,56.22,54.40,53.64,43.26,27.61,25.28,19.04,14.57,11.40.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺491.25.

[0353] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(6-氟吡啶-3-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物68)的结构



[0354] 淡黄色固体，产率27.6%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.41(dtJ=2.7,0.8Hz,1H),8.16(dddJ=8.5,7.6,2.6Hz,1H),7.63(dJ=1.9Hz,1H),7.62(dJ=1.8Hz,1H),7.61(dJ=2.0Hz,1H),7.57(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.54(dJ=1.8Hz,1H),7.52(dJ=1.8Hz,1H),7.48(dJ=8.1Hz,1H),7.13(dddJ=8.5,2.6,0.7Hz,1H),5.28(s,2H),4.43 - 4.34(m,2H),3.52(d,dJ=11.2,5.7Hz,1H),3.37(dddJ=11.0,8.0,3.1Hz,2H),3.29(dtJ=11.0,7.3Hz,1H),3.10(t,tJ=8.5,5.7Hz,1H),2.81(qJ=7.5Hz,2H),2.38 - 2.30(m,1H),2.28(s,3H),2.24(dtJ=13.6,6.8Hz,1H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 177.94,163.99,162.09,154.52,145.03,144.92,143.73,140.27,140.21,138.46,137.72,135.77,134.78,134.74,130.48,130.19,128.57,126.66,126.64,123.97,109.39,109.09,75.30,56.45,54.36,53.56,43.56,27.71,25.24,14.55,11.42.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺476.20.

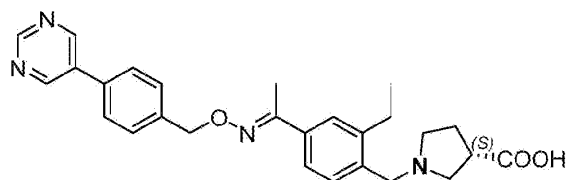
[0355] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-氟-4-(6-氟吡啶-3-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物69)的结构



[0356] 淡黄色固体，产率29.2%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.39(s,1H),8.14(dJ=8.5Hz,1H),7.64(dJ=4.0Hz,1H),7.60 - 7.55(m,1H),7.53(ddJ=8.0,2.3Hz,1H),7.47(ddJ=8.2,2.1Hz,1H),7.38 - 7.33(m,1H),7.32(dJ=11.2Hz,1H),7.19(ddJ=8.9,2.9Hz,1H),5.29(dJ=4.3Hz,2H),4.41 - 4.30(m,2H),3.48(ddJ=10.8,5.4Hz,1H),3.37(s,1H),3.26(qJ=9.3,8.4Hz,2H),3.09(ttJ=8.5,5.9Hz,1H),2.83(qJ=5.8,4.4Hz,2H),2.34 - 2.22(m,5H),1.27 - 1.22(m,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 178.47,163.95,162.05,160.52,158.55,154.93,146.85,146.82,146.74,146.70,143.71,142.17,142.11,141.75,141.69,137.46,130.72,130.44,130.22,130.19,129.71,126.64,123.99,123.97,123.94,123.35,123.24,115.19,115.

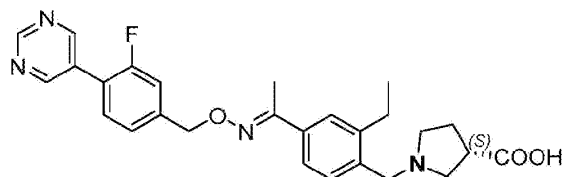
01,109.24,108.94,74.50,56.56,54.53,53.63,43.69,27.74,25.23,14.52,11.43..MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺494.20

[0357] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(嘧啶-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸的(化合物70)结构



[0358] 淡黄色固体，产率19.8%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 9.17 - 9.12(m,1H),9.11 - 9.05(m,2H),7.75(dd,J=9.5,3.5Hz,2H),7.65 - 7.55(m,4H),7.47(d,J=8.1Hz,1H),5.32 (d,J=4.0Hz,2H),4.33(s,2H),3.43(dd,J=10.8,6.1Hz,1H),3.31 - 3.20(m,3H),3.08(q,J=7.5,7.0Hz,1H),2.88 - 2.74(m,2H),2.31 - 2.29(m,3H),2.28 - 2.19(m,2H),1.25(ddd,J=9.6,4.3,2.7Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 178.39,156.47,154.70,154.64,143.64,139.57,137.42,134.33,133.16,130.98,130.38,128.74,126.71,126.58,123.88,75.16,56.68,54.58,53.59,43.81,27.79,25.22,14.53,11.43.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺459.20

[0359] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-氟-4-(嘧啶-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物71)的结构

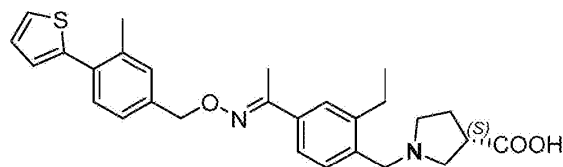


[0360] 淡黄色固体，产率30.0%。¹H NMR(600MHz,CD₃OD) δ 9.39 - 9.24(m,1H),9.14 (d,J=8.3Hz,2H),7.84 - 7.46(m,6H),5.45(d,J=7.7Hz,2H),4.58 - 4.42(m,2H),3.67 - 3.57(m,1H),3.53(s,1H),3.45(s,1H),3.39(d,J=9.6Hz,1H),3.28 - 3.19(m,1H),2.96(q,J=7.5Hz,2H),2.49 - 2.44(m,2H),2.42(d,J=2.3Hz,1H),2.37(q,J=6.8Hz,1H),1.40 - 1.37(m,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 178.30,160.69,158.72,156.78,156.20,156.16,155.06,143.69,142.91,142.85,137.34,130.42,130.09,130.07,129.97,129.95,126.61,124.22,124.20,1

23.92, 120.82, 120.71, 115.26, 115.07, 74.40, 56.66, 54.53, 53.59, 43.77, 27.77, 25.22, 14.52, 1

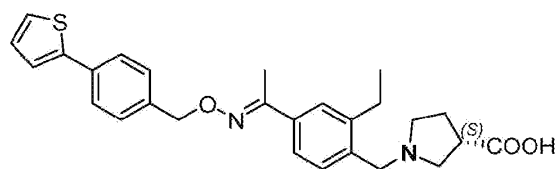
1.43. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 477.20

- [0361] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(噻吩-2-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物72)的结构



- [0362] 淡黄色固体, 产率18.3%。¹H NMR(500MHz, CD₃OD) δ 7.62(s, 1H), 7.54(d, J=7.8 Hz, 1H), 7.47(d, J=8.0Hz, 1H), 7.39(d, J=4.6Hz, 1H), 7.38 - 7.28(m, 2H), 7.23(d, J=7.8Hz, 1H), 7.14 - 7.01(m, 2H), 5.19(s, 2H), 4.34(d, J=6.8Hz, 2H), 3.48(dd, J=11.2, 5.8Hz, 1H), 3.35(s, 1H), 3.31(s, 1H), 3.25(q, J=10.5, 8.7Hz, 1H), 3.13 - 3.02(m, 1H), 2.79(q, J=7.3Hz, 2H), 2.37(s, 3H), 2.24(q, J=6.5Hz, 5H), 1.23(t, J=7.5Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 178.28, 154.41, 143.66, 142.51, 137.70, 135.65, 133.55, 130.47, 130.21, 129.96, 126.81, 126.62, 126.22, 125.44, 124.87, 123.95, 75.48, 56.50, 54.42, 53.56, 43.76, 27.79, 25.25, 20.01, 14.58, 1.49. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 477.20

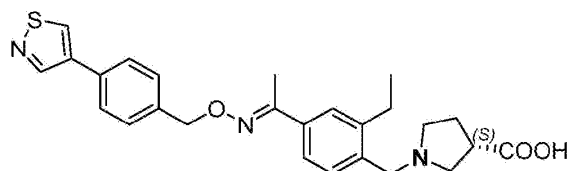
- [0363] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((4-(噻吩-2-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸的(化合物73)结构



- [0364] 淡黄色固体, 产率21.2%。¹H NMR(500MHz, CD₃OD) δ 7.64 - 7.59(m, 3H), 7.56 (dd, J=8.1, 2.0Hz, 1H), 7.47(d, J=8.1Hz, 1H), 7.43 - 7.39(m, 2H), 7.36(ddd, J=8.2, 4.4, 1.2 Hz, 2H), 7.08(dd, J=5.1, 3.6Hz, 1H), 5.22(s, 2H), 4.40 - 4.30(m, 2H), 3.49(dd, J=11.2, 5.8Hz, 1H), 3.35(d, J=7.7Hz, 1H), 3.32(s, 1H), 3.26(dt, J=10.9, 7.3Hz, 1H), 3.12 - 3.04(m, 1H), 2.80(q, J=7.5Hz, 2H), 2.34 - 2.18(m, 5H), 1.24(t, J=7.5Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 178.13, 154.46, 143.72, 143.69, 137.71, 137.42, 133.91, 130.48, 130.27, 128.47, 127.75,

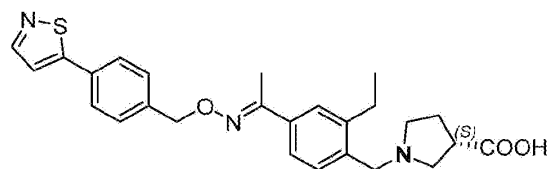
126.64,125.28,124.49,123.95,122.92,75.43,56.49,54.41,53.56,43.70,27.76,25.25,14.55,
11.46.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺463.20

[0365] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((4-(异噻唑-4-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸的(化合物74)结构



[0366] 淡黄色固体，产率11.6%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 9.07(s,1H),8.86(s,1H),7.72 - 7.68(m,2H),7.63(dJ=1.9Hz,1H),7.57(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.52(dJ=8.1Hz,1H),7.50 - 7.46(m,2H),5.26(s,2H),4.46 - 4.37(m,2H),3.52(ddJ=11.3,6.0Hz,1H),3.44 - 3.39(m,1H),3.39(dJ=4.0Hz,1H),3.35(dJ=6.9Hz,1H),3.12(dddJ=14.4,8.7,5.9Hz,1H),2.82(qJ=7.5Hz,2H),2.37 - 2.22(m,5H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 178.11,155.89,154.49,143.75,143.06,139.51,138.10,137.76,131.87,130.56,130.04,128.57,126.66,126.46,123.98,75.38,56.36,54.37,53.59,43.65,27.77,25.29,14.57,11.44.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺464.20

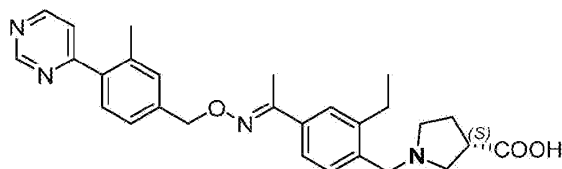
[0367] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((4-(异噻唑-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物75)的结构



[0368] 淡黄色固体，产率14.9%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.48(dJ=1.8Hz,1H),7.72 - 7.66(m,2H),7.63(dJ=1.9Hz,1H),7.60(dJ=1.8Hz,1H),7.57(ddJ=8.0,1.9Hz,1H),7.52(s,2H),7.51(s,1H),5.27(s,2H),4.46 - 4.36(m,2H),3.52(ddJ=11.3,5.9Hz,1H),3.43 - 3.38(m,1H),3.36(ddJ=12.2,5.6Hz,2H),3.12(dqJ=11.3,4.4,2.9Hz,1H),2.82(qJ=7.5Hz,2H),2.38 - 2.23(m,5H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 177.97,167.11,158.52,154.68,143.76,140.25,137.69,130.55,130.11,129.81,128.63,126.67,126.35,1

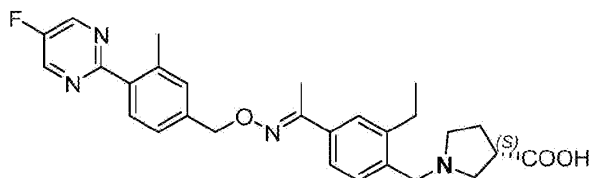
23.99,119.97,75.14,56.38,54.37,53.58,43.64,27.77,25.28,14.56,11.44.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺464.20

- [0369] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(嘧啶-4-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物76)的结构



- [0370] 淡黄色固体，产率19.9%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 9.21(d,J=1.4Hz,1H),8.83(d,J=5.3Hz,1H),7.65(dt,J=3.4,1.5Hz,2H),7.59(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.49(dd,J=7.8,6.3Hz,2H),7.39(d,J=8.6Hz,2H),5.28(s,2H),4.49 - 4.39(m,2H),3.56(dd,J=11.3,5.6Hz,1H),3.45 - 3.34(m,2H),3.30(t,J=5.6Hz,1H),3.13(p,J=7.2Hz,1H),2.83(q,J=7.5Hz,2H),2.43(s,3H),2.41 - 2.32(m,1H),2.30(s,3H),2.29 - 2.23(m,1H),1.26(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 167.30,157.63,156.90,154.54,143.78,140.16,137.83,136.66,136.11,130.53,130.43,129.94,129.44,126.71,125.53,124.02,121.62,75.26,56.40,54.34,53.54,29.38,27.65,25.24,19.11,14.57,11.41.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺473.20

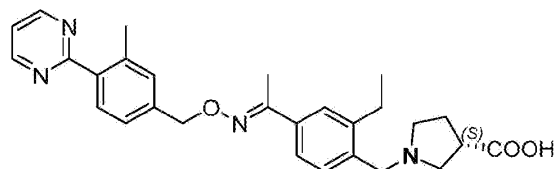
- [0371] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(5-氟嘧啶-2-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物77)的结构



- [0372] 淡黄色固体，产率15.4%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.82(d,J=1.9Hz,2H),7.76(d,J=7.7Hz,1H),7.64(d,J=2.0Hz,1H),7.57(dd,J=8.1,2.0Hz,1H),7.48(d,J=8.1Hz,1H),7.35(d,J=8.9Hz,2H),5.26(s,2H),4.44 - 4.34(m,2H),3.52(dd,J=11.3,5.4Hz,1H),3.41 - 3.33(m,2H),3.32 - 3.25(m,1H),3.10(s,1H),2.82(q,J=7.6Hz,2H),2.51(s,3H),2.29(d,J=1.4Hz,5H),1.25(td,J=7.5,1.7Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 163.34,157.57,155.48,154.51,144.66,144.50,143.73,139.67,137.77,137.07,136.48,130.50,130.46,130.2

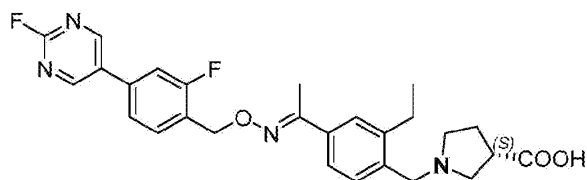
0,130.14,126.67,125.12,123.98,75.35,56.58,54.40,53.55,29.35,27.76,25.23,19.92,14.55,
11.43. MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺491.20

- [0373] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(嘧啶-2-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物78)的结构



- [0374] 淡黄色固体，产率21.4%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.89(d,J=4.9Hz,2H),7.69(d,J=7.9Hz,1H),7.65(d,J=1.9Hz,1H),7.59(dd,J=8.0,1.9Hz,1H),7.52(d,J=8.1Hz,1H),7.44(t,J=5.0Hz,1H),7.37(d,J=7.2Hz,2H),5.27(s,2H),4.47 - 4.39(m,2H),3.56(dd,J=11.3,5.9Hz,1H),3.42(dt,J=11.2,7.4Hz,2H),3.35(d,J=7.0Hz,1H),3.15(td,J=8.6,4.1Hz,1H),2.83(q,J=7.5Hz,2H),2.48(s,3H),2.35(dd,J=14.4,7.4Hz,1H),2.30(s,4H),1.26(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 167.16,157.00,154.46,143.78,139.72,137.86,137.42,136.88,130.58,130.37,129.95,129.87,126.70,125.17,124.01,119.06,75.37,56.32,54.38,53.60,43.49,27.71,25.29,19.54,14.57,11.41. MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺473.20

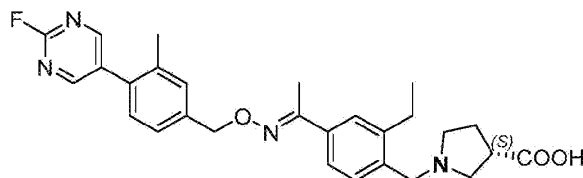
- [0375] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2-氟-4-(2-氟嘧啶-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物79)的结构



- [0376] 淡黄色固体，产率14.3%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 8.98(d,J=1.4Hz,2H),7.67 - 7.62(m,2H),7.57(dd,J=8.0,1.9Hz,1H),7.52(t,J=8.6Hz,3H),5.34(s,2H),4.47 - 4.37(m,2H),3.54(dd,J=11.4,5.8Hz,1H),3.43 - 3.36(m,2H),3.35(s,1H),3.18 - 3.09(m,1H),2.83(q,J=7.5Hz,2H),2.39 - 2.29(m,1H),2.27(s,4H),1.25(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 163.34,162.29,161.60,160.32,159.08,158.99,154.85,143.77,137.60,13

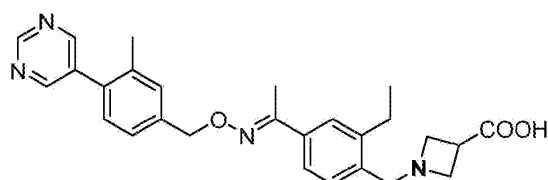
1.55, 131.52, 130.54, 130.13, 126.66, 126.05, 125.93, 123.98, 122.45, 113.63, 113.45, 68.93, 5
6.36, 54.37, 53.60, 43.53, 27.71, 25.25, 14.52, 11.28. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 495.20

[0377] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(2-氟嘧啶-5-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物80)的结构



[0378] 淡黄色固体, 产率22.2%。¹H NMR(500MHz, CD₃OD) δ 8.69(d, J=1.6Hz, 2H), 7.64(d, J=1.9Hz, 1H), 7.57(dd, J=8.1, 1.9Hz, 1H), 7.49(d, J=8.1Hz, 1H), 7.41(s, 1H), 7.38(dd, J=7.8, 1.8Hz, 1H), 7.27(d, J=7.8Hz, 1H), 5.25(s, 2H), 4.42 - 4.34(m, 2H), 3.51(dd, J=11.1, 5.7Hz, 1H), 3.35(t, J=3.5Hz, 2H), 3.31 - 3.24(m, 1H), 3.10(td, J=8.7, 8.0, 4.3Hz, 1H), 2.82(q, J=7.5Hz, 2H), 2.30(s, 4H), 2.28(s, 4H), 1.25(t, J=7.5Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 177.99, 162.77, 161.05, 160.69, 160.59, 157.18, 154.51, 143.71, 139.35, 137.62, 135.80, 133.62, 133.58, 132.50, 130.47, 130.44, 130.16, 129.72, 126.62, 125.87, 123.94, 75.29, 56.58, 54.39, 53.55, 43.69, 27.75, 25.24, 18.95, 14.56, 11.40. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 491.20

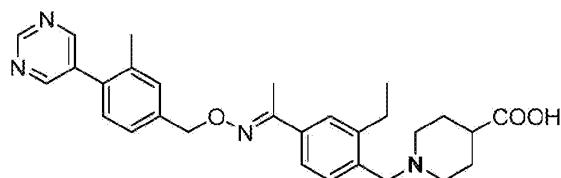
[0379] (E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(嘧啶-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物81)的结构



[0380] 淡黄色固体, 产率35.6%。¹H NMR(500MHz, CD₃OD) δ 9.15(s, 1H), 8.85 - 8.75(m, 2H), 7.63(s, 1H), 7.56(d, J=8.1Hz, 1H), 7.45 - 7.35(m, 3H), 7.26(t, J=6.5Hz, 1H), 5.25(d, J=3.0Hz, 2H), 4.40(s, 2H), 4.16(p, J=9.5Hz, 4H), 3.41(p, J=8.3Hz, 1H), 2.80(q, J=7.5Hz, 2H), 2.30(s, 3H), 2.27(s, 3H), 1.27 - 1.22(m, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 176.27, 156.56, 156.36, 154.50, 143.54, 139.32, 137.57, 135.63, 133.39, 130.18, 129.64, 129.54, 126.

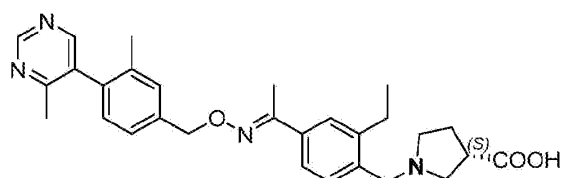
62,125.90,123.97,75.30,57.16,54.94,34.92,25.19,18.97,14.46,11.41. MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺459.20

- [0381] (E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(嘧啶-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)哌啶-4-羧酸(化合物82)的结构



- [0382] 淡黄色固体, 产率30.3%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 9.15(s,1H),8.80(s,2H),7.63(d,J=1.9Hz,1H),7.56(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.47(d,J=8.1Hz,1H),7.42(s,1H),7.39(dd,J=7.8,1.7Hz,1H),7.27(d,J=7.8Hz,1H),5.26(s,2H),4.13(s,2H),3.30 - 3.27(m,1H),2.90 - 2.78(m,4H),2.46 - 2.32(m,2H),2.31(s,3H),2.29(s,3H),2.05(dd,J=14.6,4.0Hz,2H),1.90(q,J=12.8,12.2Hz,2H),1.25(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,CD₃OD) δ 179.59(d,J=2.2Hz),156.57,156.35,154.63,144.37,139.34,137.46,135.63,135.60,133.38,131.20,130.18,129.63,126.58,125.90,123.73,75.28,57.31,52.14,40.79,26.66,25.39,18.97,14.65,11.45. MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺487.30

- [0383] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(4-甲基嘧啶-5-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物83)的结构



- [0384] 淡黄色固体, 产率42.5%。¹H NMR(500MHz,Methanol-d₄) δ 9.03(s,1H),8.48(s,1H),7.66(d,J=1.9Hz,1H),7.59(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.51(d,J=8.1Hz,1H),7.43(d,J=1.7Hz,1H),7.38(dd,J=7.8,1.7Hz,1H),7.17(d,J=7.8Hz,1H),5.28(s,2H),4.48 - 4.36(m,2H),3.53(d,J=7.7Hz,1H),3.43 - 3.37(m,2H),3.31(s,1H),3.13(s,1H),2.84(q,J=7.5Hz,2H),2.33(s,4H),2.30(s,4H),2.11(s,3H),1.27(t,J=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄) δ 165.58,156.48,156.26,154.49,143.76,139.12,137.77,135.87,134.85,134.16,130.53,13

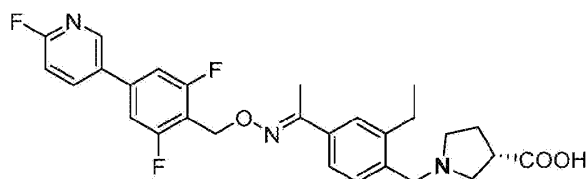
0.95, 18.56, 14.57, 11.43. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 487.30

CC1(C)C(C)C(C)C(C1)C2=CC=C(C=C2)C(=O)NOC3=CC=C(C=C3)C4=CC=CC=C4N5C(C)CC(C5)C(=O)OCC1=CC=C(C=C1C2=CC=CC=C2C(=C3C=CC(=C3)S)C(F)=C3)C(=N\OCC4=CC=CC=C4C5=CC=CC=C5C6=CC=CC=C6S)C7=CC=CC=C7C(=C8C=CC(=C8)S)C(F)=C8

[0388] 淡黄色固体，产率26.5%。¹H NMR(500MHz,CD₃OD) δ 7.66(dt,J=2.8,1.4Hz,1H),7.64 - 7.59(m,2H),7.55(dd,J=8.1,1.9Hz,1H),7.49 - 7.45(m,2H),7.44(dt,J=5.1,1.4Hz,1H),7.26 - 7.18(m,2H),5.23(s,2H),4.39 - 4.30(m,2H),3.49(dd,J=11.1,5.8Hz,1H),3.35(d,J=9.5Hz,1H),3.32 - 3.30(m,1H),3.25(ddd,J=14.6,7.7,3.8Hz,1H),3.08(ddd,J=14.6,8.7,5.8Hz,1H),2.79(q,J=7.6Hz,2H),2.33 - 2.20(m,5H),1.23(t,J=7.6Hz,3H).¹³C NM

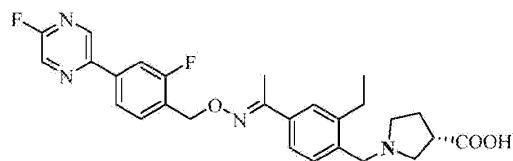
R (126MHz, CD₃OD) δ 178.15, 160.47, 158.51, 154.74, 143.70, 139.64, 139.58, 137.55, 135.32, 135.31, 130.48, 130.44, 129.15, 129.11, 127.08, 127.05, 126.63, 125.21, 123.94, 123.69, 123.67, 123.14, 123.08, 122.77, 122.67, 115.25, 115.06, 74.68, 56.49, 54.38, 53.55, 43.69, 27.75, 25.23, 14.53, 11.45. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 481.20

[0389] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2,6-二氟-4-(6-氟吡啶-3-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物86)的结构



[0390] 淡黄色固体, 产率26.9%。¹H NMR(500MHz, CD₃OD) δ 8.49(d, J=2.6Hz, 1H), 8.22(ddd, J=8.5, 7.5, 2.7Hz, 1H), 7.64(d, J=1.9Hz, 1H), 7.56(dd, J=8.1, 1.9Hz, 1H), 7.47(d, J=8.1Hz, 1H), 7.35(d, J=8.3Hz, 2H), 7.19 - 7.15(m, 1H), 5.33(s, 2H), 4.42 - 4.34(m, 2H), 3.51(ddd, J=11.2, 5.8Hz, 1H), 3.39 - 3.34(m, 2H), 3.32 - 3.25(m, 1H), 3.10(ddd, J=14.4, 8.5, 5.8Hz, 1H), 2.81(q, J=7.6Hz, 2H), 2.36 - 2.24(m, 2H), 2.20(s, 3H), 1.26(t, J=7.3Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, CD₃OD) δ 172.97, 165.98, 164.82, 164.08, 162.83, 156.01, 146.90, 146.78, 145.01, 141.80, 141.73, 140.95, 138.87, 131.81, 127.93, 125.25, 114.64, 111.05, 111.03, 110.84, 110.74, 64.06, 57.88, 55.90, 55.04, 45.00, 29.11, 26.57, 20.85, 15.78, 12.33. MS(ESI)(m/z): [M+H]⁺ 512.20

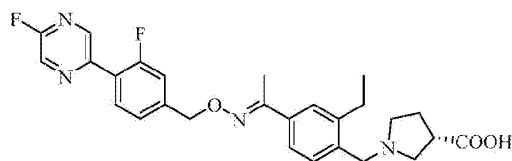
[0391] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2-氟-4-(5-氟吡嗪-2-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物87)的结构



[0392] 白色固体, 产率78.9%。¹H NMR(500MHz, Methanol-d₄) δ 8.77(s, 1H), 8.56(s, 1H), 7.90 - 7.79(m, 2H), 7.65 - 7.59(m, 2H), 7.56(s, 1H), 7.48(d, J=8.1Hz, 1H), 5.34(s, 2H), 4.44 - 4.34(m, 2H), 3.55 - 3.46(m, 1H), 3.36(d, J=7.7Hz, 1H), 3.28(dd, J=10.9, 7.3Hz, 1H), 3.13 - 3.05(m, 1H), 2.81(q, J=8.6Hz, 2H), 2.33(dt, J=15.2, 7.9Hz, 1H), 2.28(s, 3H), 2.23(dd, J=1

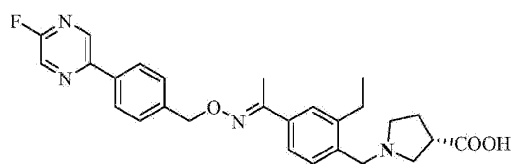
3.5,6.8Hz,1H),2.03(s,1H),1.28 - 1.21(m,3H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄) δ 154.84,143.72,138.45,138.38,137.57,132.58,132.27,131.05,130.46,130.30,126.64,123.95,121.93,113.21,113.02,69.00,56.53,54.37,53.56,43.58,27.71,25.21,11.29.MS(m/z):[M+H]⁺495.20

[0393] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-氟-4-(5-氟吡嗪-2-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物88)的结构



[0394] 黄色固体, 产率75.0%。¹H NMR(500MHz,Methanol-d₄) δ 8.67(s,1H),8.62(dJ=8.3Hz,1H),7.63(s,1H),7.56(dJ=7.4Hz,1H),7.49(dJ=8.1Hz,1H),7.38(dJ=8.0Hz,1H),7.32(dJ=12.1Hz,1H),5.30(s,2H),4.37(dJ=11.1Hz,2H),3.29(tJ=6.7Hz,1H),3.09(tJ=7.6Hz,1H),2.82(qJ=7.5Hz,2H),2.31(s,3H),2.26 - 2.17(m,1H),2.03(s,1H),1.95(s,1H),1.24(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄) δ 155.04,143.70,143.17,141.41,141.34,141.24,137.37,132.95,132.65,130.83,130.54,130.52,130.46,126.61,123.93,123.82,115.16,114.98,74.39,56.65,54.53,53.57,43.85,25.24,14.52,11.44.MS(m/z):[M+H]⁺495.20

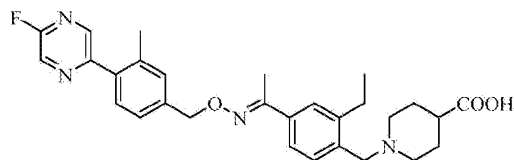
[0395] (S,E)-1-(2-乙基-4-(1-((4-(5-氟吡嗪-2-基)苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物89)的结构



[0396] 白色固体, 产率76.6%。¹H NMR(500MHz,Methanol-d₄) δ 8.79 - 8.69(m,1H),8.58 - 8.51(m,1H),8.03(ddJ=16.8,5.3Hz,2H),7.63(dJ=7.0Hz,1H),7.58 - 7.54(m,3H),7.47(dJ=8.1Hz,1H),5.30(s,2H),4.41 - 4.30(m,2H),3.50(ddJ=10.7,5.5Hz,1H),3.37(s,1H),3.28 - 3.20(m,1H),3.09(ddJ=10.2,4.2Hz,1H),2.85 - 2.78(m,2H),2.36 - 2.31(m,1H),2.30(s,3H),2.24(qJ=6.9,6.4Hz,1H),1.28 - 1.20(m,3H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄)

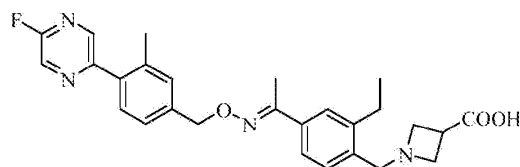
) δ 154.62, 143.69, 140.08, 138.24, 138.17, 132.34, 132.04, 130.43, 128.28, 126.65, 126.44, 123.94, 75.24, 56.57, 54.45, 53.58, 43.66, 27.73, 25.22, 14.53, 11.42. MS(m/z): [M+H]⁺ 477.20

[0397] (E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(5-氟吡嗪-2-基)-苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)哌啶-4-羧酸(化合物90)的结构



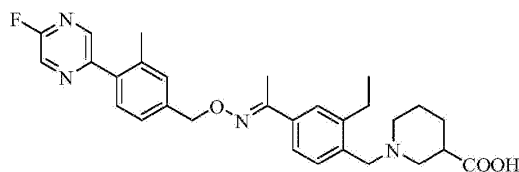
[0398] 白色固体, 产率28.8%。¹H NMR(500MHz, Methanol-d₄) δ 8.58(d, J=8.2Hz, 1H), 8.37(s, 1H), 7.60(s, 1H), 7.52(d, J=10.0Hz, 1H), 7.41(dd, J=18.7, 7.9Hz, 4H), 5.26(s, 2H), 3.96(s, 2H), 3.18(d, J=11.6Hz, 2H), 2.80(q, J=7.6Hz, 2H), 2.66(d, J=11.5Hz, 2H), 2.38(s, 3H), 2.33(d, J=15.1Hz, 1H), 2.28(s, 3H), 2.02 - 1.93(m, 2H), 1.84(d, J=12.0Hz, 2H), 1.24(t, J=7.6Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, Methanol-d₄) δ 158.27, 154.80, 144.11, 141.30, 139.50, 136.91, 136.35, 131.93, 131.63, 130.86, 130.33, 129.57, 126.42, 125.50, 123.52, 75.26, 57.89, 52.46, 27.35, 25.33, 19.05, 14.60, 11.48. MS(m/z): [M+H]⁺ 505.20

[0399] (E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(5-氟吡嗪-2-基)-苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)氮杂环丁烷-3-羧酸(化合物91)的结构



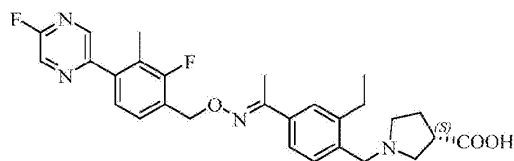
[0400] 白色固体, 产率62.5%。¹H NMR(500MHz, Methanol-d₄) δ 8.58(d, J=8.3Hz, 1H), 8.37(s, 1H), 7.63(s, 1H), 7.56(d, J=8.0Hz, 1H), 7.40(dd, J=19.3, 7.9Hz, 4H), 5.26(s, 2H), 4.40(s, 2H), 4.16(d, J=8.3Hz, 4H), 2.79(q, J=7.5Hz, 3H), 2.37(s, 7H), 2.28(s, 3H), 1.25(t, J=7.5Hz, 3H). ¹³C NMR(126MHz, Methanol-d₄) δ 176.26, 160.27, 158.28, 154.47, 152.86, 143.53, 141.29, 141.22, 139.45, 137.66, 136.37, 131.94, 131.64, 130.32, 129.57, 129.51, 126.66, 125.50, 123.98, 75.33, 57.18, 54.93, 34.86, 25.16, 19.04, 14.45, 11.39. MS(m/z): [M+H]⁺ 477.20

[0401] (E)-1-(2-乙基-4-(1-(((3-甲基-4-(5-氟吡嗪-2-基)-苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)哌啶-3-羧酸(化合物92)的结构



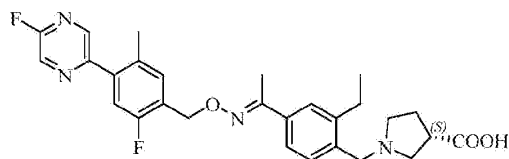
[0402] 白色固体，产率83.5%。¹H NMR(500MHz,Methanol-d₄) δ 8.58(dJ=7.0Hz,1H), 8.37(s,1H),7.65(s,1H),7.57(dJ=8.0Hz,1H),7.48(dJ=8.1Hz,2H),7.45 - 7.35(m,6H),5.26(s,5H),4.23(dJ=3.6Hz,5H),3.37(s,4H),3.12(dJ=10.1Hz,5H),2.82(dqJ=14.9,7.3Hz,3H),2.65(s,2H),2.38(s,7H),2.29(s,6H),1.85(dJ=48.6Hz,11H),1.27(tJ=7.5Hz,6H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄) δ 160.27,158.28,154.54,152.92,144.11,141.30,141.22,139.48,137.76,136.37,135.06,131.94,131.64,130.98,130.33,129.58,126.60,125.51,123.93,75.33,54.53,52.79,48.46,25.20,19.04,14.45,11.41.MS(m/z):[M+H]⁺505.20

[0403] (S, E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2-氟-4-(5-氟吡啶-2-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物93)的结构



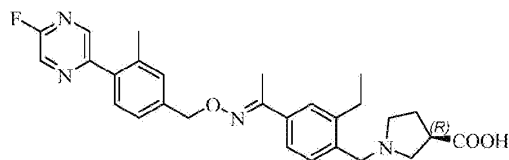
[0404] 白色固体，产率70.1%。¹H NMR(500MHz,Methanol-d₄) δ 8.59(dJ=8.2Hz,1H), 8.37(s,1H),7.63(s,1H),7.56(dJ=8.0Hz,1H),7.49(dJ=8.1Hz,1H),7.42(tJ=7.5Hz,1H), 7.25(dJ=7.9Hz,1H),5.33(s,2H),4.44 - 4.33(m,2H),3.52(ddJ=11.2,5.6Hz,1H),3.41 - 3.35(m,2H),3.28(dtJ=10.8,7.3Hz,1H),3.10(dqJ=8.7,4.3,2.9Hz,1H),2.81(qJ=7.5Hz,2H),2.27(s,8H),1.24(tJ=7.4Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄) δ 177.94,160.40,160.38,158.43,158.40,154.73,151.66,143.71,141.43,141.35,137.54,132.19,131.88,130.49,130.34,127.45,127.41,126.63,125.98,125.85,124.93,124.90,123.94,123.68,123.54,69.41,69.38,56.46,54.32,53.54,43.62,27.73,25.23,14.53,11.32,10.54,10.49.MS(m/z):[M+H]⁺509.19

[0405] (S, E)-1-(2-乙基-4-(1-(((2-氟-4-(5-氟吡啶-2-基)-5-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物94)的结构



[0406] 白色固体，产率71.5%。¹H NMR(500MHz,Methanol-d₄) δ 8.60(ddJ=8.2,1.4Hz, 1H),8.41(tJ=1.5Hz,1H),7.65(dJ=1.9Hz,1H),7.58(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.48(dJ=8.1 Hz,1H),7.45(dJ=7.2Hz,1H),7.25(dJ=10.3Hz,1H),5.31(s,2H),4.43 - 4.35(m,2H),3.52 (ddJ=11.2,5.8Hz,1H),3.39 - 3.35(m,2H),3.29(ddJ=12.9,5.5Hz,1H),3.11(dddJ=14. 4,8.7,5.8Hz,1H),2.82(qJ=7.5Hz,2H),2.35(s,3H),2.33 - 2.30(m,1H),2.27(s,3H),2.24(d dJ=13.7,6.5Hz,1H),1.25(dJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄) δ 178.22, 160.41,160.09,158.41,158.14,154.72,151.50,143.70,141.35,141.27,137.60,136.95,133.0 9,133.05,132.26,132.08,131.96,130.46,130.37,126.65,125.86,125.74,123.96,116.17,115. 99,69.06,56.50,54.48,53.62,43.57,27.71,25.21,18.32,14.50,11.27.MS(m/z):[M+H]⁺509. 20

[0407] (R,E)-1-(2-乙基-4-(1-(((4-(5-氟吡啶-2-基)-3-甲基苄基)氧基)亚氨基)乙基)苄基)吡咯烷-3-羧酸(化合物95)的结构



[0408] 淡黄色固体，产率21.4%。¹H NMR(500MHz,Methanol-d₄) δ 8.57(ddJ=8.3,1.3 Hz,1H),8.36(tJ=1.5Hz,1H),7.64(dJ=1.9Hz,1H),7.57(ddJ=8.1,1.9Hz,1H),7.49(dJ =8.1Hz,1H),7.41(dJ=7.8Hz,1H),7.39 - 7.34(m,2H),5.26(s,2H),4.44 - 4.34(m,2H),3. 52(ddJ=11.2,5.7Hz,1H),3.37(tdJ=9.1,8.2,3.3Hz,2H),3.28(dtJ=11.0,7.4Hz,1H),3.10 (dddJ=14.5,8.8,5.7Hz,1H),2.82(qJ=7.5Hz,2H),2.37(s,3H),2.32(tdJ=7.9,3.6Hz,1H), 2.28(s,3H),2.27 - 2.22(m,1H),1.25(tJ=7.5Hz,3H).¹³C NMR(126MHz,Methanol-d₄) δ 177.86,160.26,158.26,154.49,152.89,152.85,143.73,141.28,141.21,139.46,137.71,13 6.37,135.07,135.06,131.94,131.64,130.50,130.33,130.21,129.58,126.65,125.50,123.96,

75.34,56.48,54.34,53.54,43.60,27.72,25.24,19.06,14.55,11.42.MS(ESI)(m/z):[M+H]⁺491.25.

[0409] 实施例2.S1PR4和NDUFA10突变与肌营养不良疾病的关系

[0410] 肌营养不良是一种由遗传变异引起的进行性肌肉疾病，以慢性氧化应激和炎症为特征。它在临床上表现为进行性肌无力，在不同程度上影响四肢、咽喉和面部肌肉，根据发病时间可分为先天性肌营养不良症和晚期肌营养不良症。一般来说，先天性肌营养不良在出生时或出生后的头几个月就有明显的肌无力症状。而晚发性肌营养不良在患者实现独立行走后才表现出肌无力症状。

[0411] 目前肌肉营养不良的治疗策略主要是基因治疗和抗炎治疗。基因治疗是利用小分子或反义寡核苷酸，抑制导致转录异常终止的无义突变或诱导指定外显子发生跳跃，导致阅读框架的恢复和肌营养不良蛋白的产生。或者利用腺相关病毒做为载体导入一个正常的野生型基因表达肌营养不良蛋白。然而，基因治疗的局限性是对载体的免疫反应和有限的载体包装大小。此外，基因治疗只对具有特定致病基因变体的患者有效，不能适用于所有肌肉萎缩症患者。炎症是由基因变体引发的次要结果，抑制炎症的优点是它可以适用于所有亚型的肌肉萎缩症，不受变异基因的影响。糖皮质激素已被用于改善炎症水平，以治疗肌肉萎缩症，但糖皮质激素的效果有限，而且有很大的副作用，所以我们需要找到新的炎症靶点。

[0412] 在本实施例中，本发明人通过对肌营养不良患者进行全基因组测序发现所有患者的NDUFA10和S1PR4都发生了突变，通过NDUFA10突变和S1PR4突变小鼠模型发现，NDUFA10突变导致线粒体功能障碍，S1PR4突变导致炎症水平升高，并且S1PR4突变鼠与NDUFA10突变鼠杂交后获得的双突变鼠出现了肌营养不良表型。给药S1PR4激动剂可以改善肌营养不良的表型，同时减少肌肉炎症和纤维化。从而说明S1PR4和NDUFA10在肌营养不良的发病过程中发挥着重要作用，并为肌营养不良的治疗提供了炎症相关的新靶点。

[0413] 本发明人发现一个家系中的男性从50岁开始，开始表现出肌营养不良表型，并且随着年龄的增加而加重。通过全基因组测序发现所有肌营养不良患者NDUFA10和S1PR4都发生了突变。研究发现NDUFA10和S1PR4在营养不良中可将氧化

应激和慢性炎症反应联系起来。在NDUFA10突变小鼠模型中发现NDUFA10可导致线粒体功能障碍，无性别选择性，雌雄都有这个表型。S1PR4突变小鼠模型中发现S1PR4突变可导致炎症水平升高，无性别选择性，雌雄都有这个表型。当小鼠中同时存在NDUFA10和S1PR4突变时，雄性小鼠会出现肌营养不良表型，与正常小鼠相比会出现四肢握力减弱，血清肌酸激酶升高，肌肉出现纤维化和炎症等。结果显示两个单基因突变鼠都没有产生肌营养不良，双突变鼠产生了肌营养不良。利用S1PR4激动剂可改善小鼠的肌肉性能和肌营养不良表型。

[0414] 一、实验背景

[0415] 肌肉营养不良(muscular dystrophy, MD)是一组以慢性氧化应激和炎症相关的进行性肌肉耗损为特征的遗传疾病。特点是进行性肌无力和萎缩，可以通过常染色体隐性、常染色体显性或性联的方式遗传。

[0416] 本发明人通过对肌营养不良家族患者进行基因筛查发现患者S1PR4基因和NDUFA10基因发生了突变，设想S1PR4和NDUFA10突变可能会导致肌营养不良。因此，本发明人构建了S1PR4突变小鼠模型、NDUFA10突变小鼠模型，并利用两种小鼠进行杂交获得S1PR4/NDUFA10双突变小鼠，并验证这两种突变是否会导致肌营养不良。

[0417] 二、NDUFA10和S1PR4突变与肌病之关联研究

[0418] 本发明人发现一个家系中的男性和女性从50岁开始表现出肌营养不良表型，并且随着年龄的增加而加重，表现出很强的家族遗传性疾病特征。于是对这个家系进行了全基因测序，对测序结果进行生信分析后，筛选出所有患者共有而健康配偶没有的23个基因突变(如下部分表格)。从表格里面看W、X两列即可，W列是突变的基因名，X列是对应的突变位点，然后，后面接着的是每个样本的检测结果，每个样本4列数据，第一列数据(标绿)里0|1表示杂合突变，1|1表示纯合突变，0|0表示没有突变。

[0419] 通过对肌营养不良疾病和对23个突变基因功能的广泛调研,NDUFA10和S1PR4两种基因引起了关注,其中,前者是线粒体呼吸链复合物I的一个亚基,可能与线粒体的产能有关,而肌肉细胞对于能量的需求较大,突变可能通过降低线粒体产能效率而影响到肌肉细胞的功能;而后者则与免疫功能相关,可能是导致肌营养不良患者肌肉组织性状改变的主要原因。因此,本发明人首先将NDUFA10和S1PR4突变作为肌营养不良疾病的潜在致病基因突变进行研究。

[0420] 图1为靶点与疾病关联研究结果:图1显示迟发性肌营养不良谱系中S1PR4 R79C和NDUFA10 R217W的突变鉴定。(a)一个包含四代的中国家系谱图。患者用黑色填充标记,症状轻微的个体用黑色方块标记,男性用方块女性圆圈表示,其中第一代和第二代已经患病。每个成员下面的符号分别表示S1PR4 R79C(绿色)和NDUFA10 R217W(紫色)的突变携带情况。(b)S1PR4 R79C位于ICL1(胞内环1)内。(c)S1PR4 R79C的Sanger测序验证。(d)NDUFA10 R217W位于脱氧核苷激酶结构域(dNK)内。(e)NDUFA10 R217W的Sanger测序验证。

[0421] 图中,全黑的就是患者,已经确诊,这些患者都同时拥有S1PR4杂合突变和NDUFA10杂合突变。其他下代,有的遗传到了一个突变,有的遗传到两个突变,有的没有遗传到任何一个突变,这些都符合孟德尔遗传规律。因为这个病是到

一定年龄才会发病，所以下一代是否发病，目前还看不出来，也还无法确诊，但是根据他们自己感觉，有的已经有了轻微的肌肉症状，对于这些人本发明人标了1/4黑，供参考。

[0422] 通过对肌营养不良患者家系进行全基因组测序发现所有患者的NDUFA10和S1PR4都发生了突变。在NDUFA10突变小鼠模型中发现NDUFA10可导致线粒体功能障碍，无性别选择性，雌雄都有这个表型。S1PR4突变小鼠模型中发现S1PR4突变可导致炎症水平升高，无性别选择性，雌雄都有这个表型。结果显示两个单基因突变鼠都没有产生肌营养不良。S1PR4突变鼠与NDUFA10突变鼠杂交后获得的双突变鼠出现了肌营养不良表型，与正常小鼠相比会出现四肢握力减弱，血清肌酸激酶升高，肌肉出现纤维化和炎症等。因此，双突变鼠产生了肌营养不良。

[0423] 三、实验过程

[0424] 3.1四肢握力检测

[0425] 小鼠被水平放置在抓握试验板上，抓住小鼠尾部向反方向拉拽，动作轻缓，切勿暴力操，逐渐拉鼠尾，直至小鼠松开握力感受器，握力感受器记录的最大值，即为握力数值，重复3次取平均值。

[0426] 3.2血清肌酸激酶含量检测

[0427] 给药结束后，经眼眶取血，静置30min，经3000rpm/min，4℃离心15min，提取血清，-20℃冷冻保存，按照试剂盒说明检测。

[0428] 3.3肌肉组织切片病理检测

[0429] 实验结束后，取小鼠胫骨前肌、趾长伸肌和膈肌固定后切片进行HE染色、天狼猩红染色观察肌肉纤维化程度。

[0430] 四、实验结果

[0431] 4.1 S1PR4突变不会导致肌营养不良

[0432] S1PR4突变鼠的爪子握力与正常小鼠无差别(图2a)，S1PR4突变鼠血清中肌酸激酶水平与WT无差别(图2b)，S1PR4突变鼠肌肉未出现肌肉纤维化(HE染色和天狼猩红染色)。这些结果表明S1PR4突变不会导致肌营养不良。

[0433] 4.2 NDUFA10突变不会导致肌营养不良

- [0434] NDUF A10突变鼠的爪子握力与正常小鼠无差别(图3a)，NDUF A10突变鼠血清中肌酸激酶水平与WT无差别(图3b)，NDUF A10突变鼠肌肉未出现肌肉纤维化(HE染色和天狼猩红染色)。这些结果表明NDUF A10突变不会导致肌营养不良。
- [0435] 4.3 S1PR4/NDUF A10突变导致肌营养不良
- [0436] S1PR4/NDUF A10突变鼠从5月龄开始爪子握力与正常小鼠比显著降低(图4a)，S1PR4/NDUF A10突变鼠血清中肌酸激酶水平显著升高(图4b)，S1PR4/NDUF A10突变鼠肌肉出现有核纤维和胶原沉积，表明肌肉出现纤维化(HE染色和天狼猩红染色)，可诊断为肌营养不良。
- [0437] 综合以上所有实验结果可知，双突变小鼠在长到5月龄后会发肌营养不良，握力显著降低，肌酸激酶水平显著升高，肌肉出现纤维化。由于单独突变S1PR4或者NDUF A10均不能导致肌营养不良发生，而两种基因同时突变会导致肌营养不良疾病发生，因此认为对其中一个靶点进行治疗会阻滞疾病的发生，针对S1PR4和NDUF A10进行靶向药物研发治疗肌营养不良疾病具有研究价值。
- [0438] 实施例3.选择性S1PR4激动剂的发现
- [0439] 基于上述突变鼠的研究结果，即任一单基因突变都不会导致肌营养不良表型，但双突变会诱导出肌营养不良表型，本发明人提出靶向并调控其中一个突变蛋白以逆转肌营养不良表型的治疗思路，S1PR4相较于NDUF A10具有更成熟的研究背景，结合口袋明确、容易被靶向等，因此首先被选为治疗靶点。针对该靶点，本发明人研发出一系列S1PR4选择性激动剂。
- [0440] S1PR4激动剂生物活性测试
- [0441] 一、实验原理
- [0442] Tango检测技术通过 β -arrestin和GPCR的相互作用来检测配体依赖的GPCR活性。TEV分离技术是利用TEV蛋白酶的两个非活性片段(NTEV，1-118和CTEV，119-221)的互补来重建功能蛋白酶，将NTEV片段和人工转录因子四环素反式激活因子(tTA)融合到GPCR的C端，CTEV片段融合到人的 β -arrestin 2。为了提高GPCR与 β -arrestin相互作用的稳定性，在GPCR和NTEV之间引入了人精氨酸加压素受体2的C末端的一个短序列(V2 tail)。V2 tail含有多个GRK磷酸化位点，这些位点在磷酸化后能增强 β -arrestin的结合。CTEV片段携带稳定点突变

S219P, 在221氨基酸处被截短, 以去除自抑制的C端尾, 同时将 β -arrestin 2截短, 使缺失整个C端尾(缺少氨基酸383-410), 截短具有较强的刺激依赖性受体脱敏作用, 因此与野生型 β -arrestin 2相比, 提高了检测的敏感性。UAS报告结构由上游激活序列元件(Upstream activesequence, UAS)、CMV最小启动子和tTA依赖性荧光素酶报告基因组成。因此构建Tango细胞需将上述三个质粒同时转染至细胞。GPCR在被激活招募 β -arrestin后, β -arrestin末端的TEV酶将tTA从GPCR末端切除, 游离的tTA将启动tTA依赖的荧光素酶转录, 最终通过检测荧光强度来判断化合物的活性。

[0443] 二、实验过程

[0444] 1)将Tango细胞株分别从培养皿上消化下来, 通过细胞计数, 以每孔10000个细胞的密度, 700 μ L/well铺板至白色不透明96孔板上(四周加60 μ L D' hanks), 37 $^{\circ}$ C的5%的CO₂培养箱中培养过夜(20h), 第二天细胞密度90%左右;

[0445] 2)20h后, 每孔加入30 μ L梯度稀释的化合物溶液, 对照组添加30 μ L F12K完全培养基, 每组三个复孔;

[0446] 3)药物作用20h收样, 培养箱中取出细胞, 用Bright GloTM Luciferase Assay进行荧光素酶分析: 每孔加入5 μ L试剂, 室温下避光轻轻摇晃10min后检测;

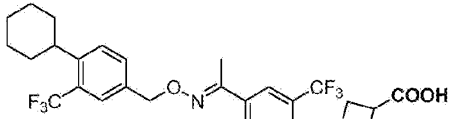
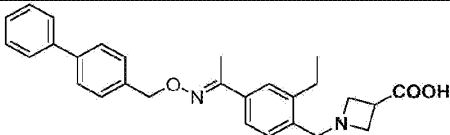
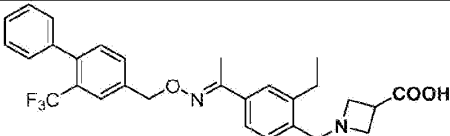
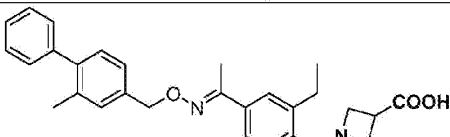
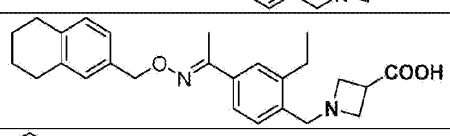
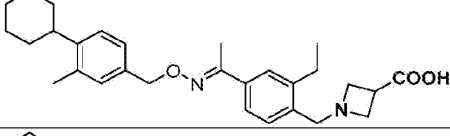
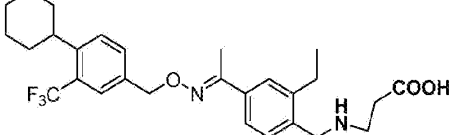
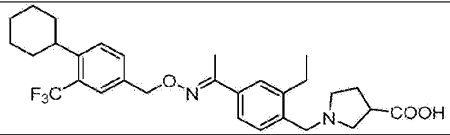
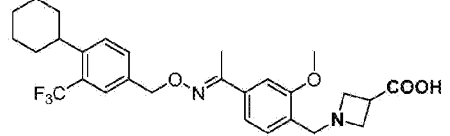
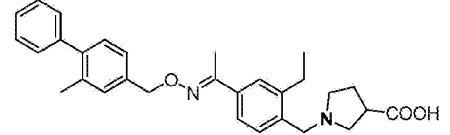
[0447] 4)置于酶标仪读数, 测定Relative light unit(RLU), 记录荧光(Luminescence)数值, 通过Graphpad prism软件进行数据处理, 计算出化合物的EC₅₀。

[0448] 三、测试结果:

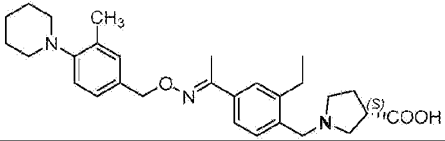
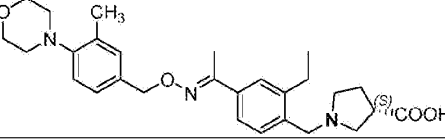
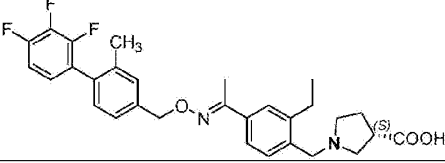
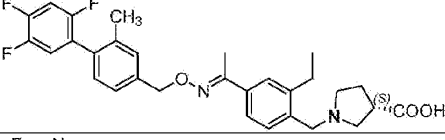
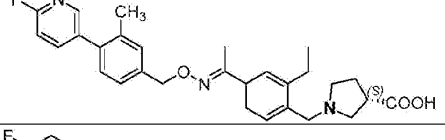
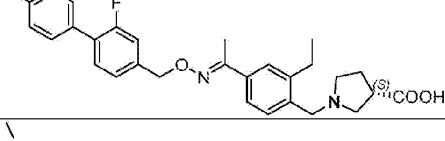
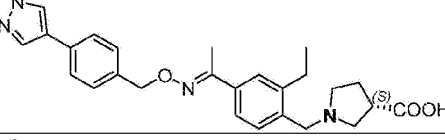
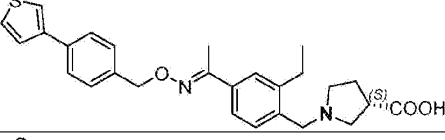
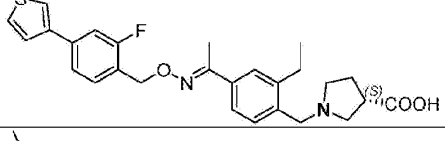
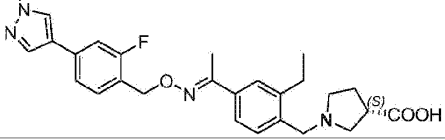
[0449] (化合物均为45 μ M终浓度测试, 9个梯度, 5倍稀释。S1PR1以1 μ M BAF-312为阳性对照, S1PR4以25 μ M BAF-312为阳性对照)

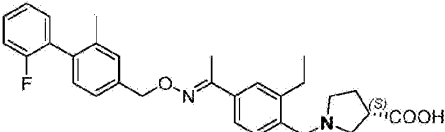
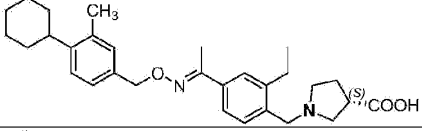
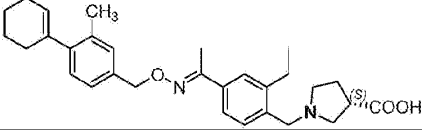
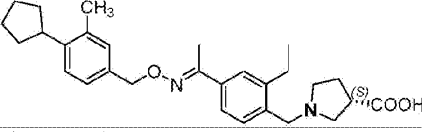
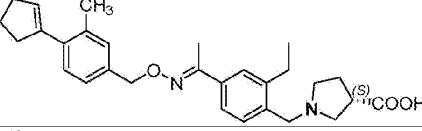
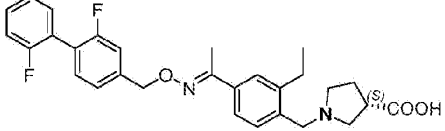
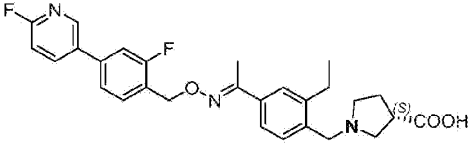
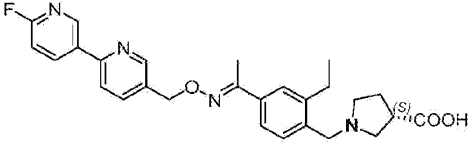
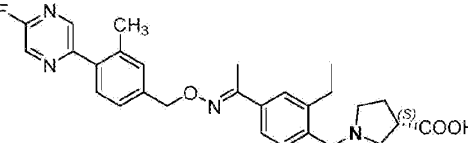
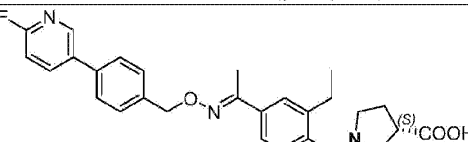
化合物编号	结构式	Tango-hSIP1-CHO EC ₅₀ (nM)	Tango-hSIP4-CHO EC ₅₀ (nM)	Tango-hSIP4-R-79C-CHO EC ₅₀ (nM)
BA F31 2		1.04±0.10	155.44±21.75	157.15±7.90
1		698.90±157.79	2969.00±471.63	1908.00±798.15
2		4.48±0.26	324.45±24.55	236.94±54.45
3		578.00±102.33	2157.00±771.50	1338.00±278.75
4		162.2±23.44	10.59±1.19	
5		133.2±23.44	4.22±1.19	
6		21.77±3.02	318.40±81.40	291.50±95.50
7		508.40±86.94	2504.00±518.88	3822.00±1320.00

8		51.64±0.38	2399.00±157.50	728.70±64.50
9		455.50±36.20	2352.00±239.04	1426.00±373.84
10		10.30±0.38	261.60±37.30	159.60±4.90
11		5.63±0.15	573.50±106.45	254.80±10.90
12		17.73±3.25	2251.00±701.50	1678.00±455.00
13		5099.00±1511.48	3238.00±1129.35	3111.00±258.91
14		5991.00±830.82	3665.00±387.61	7543.00±901.31
15		806.60±241.09	560.10±184.62	560.50±134.72
16		23.17±10.86	3315.00±863.14	1270.00±456.82
17		2.21±0.58	389.50±195.42	95.57±42.08
18		2.95±0.69	266.40±62.77	63.06±21.76

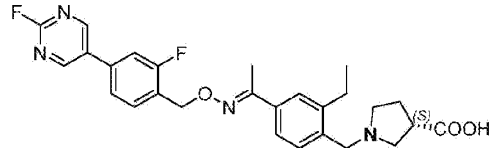
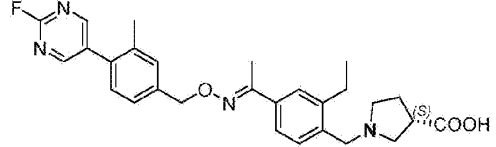
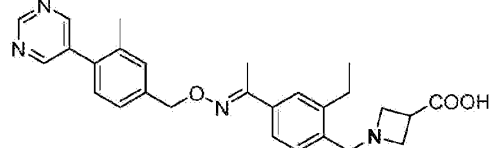
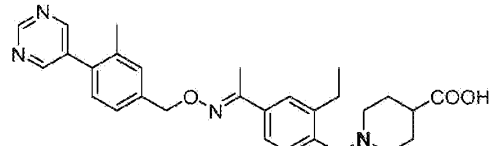
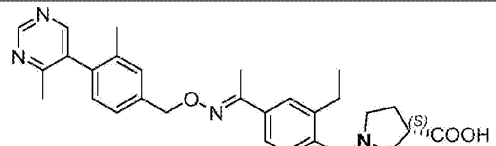
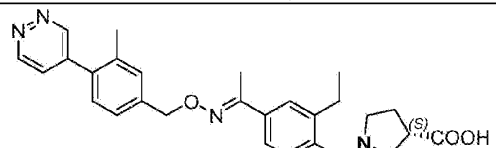
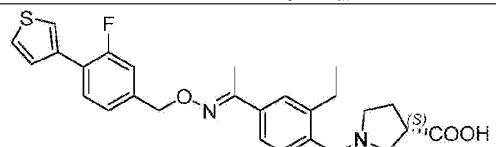
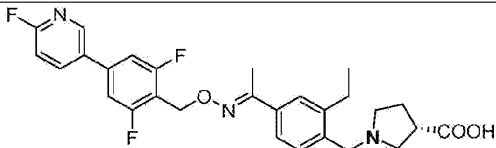
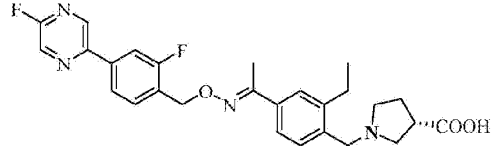
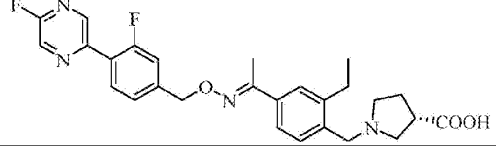
19		8.63±0.3 9	563.90±1 84.36	121.40±30. 39
20		781.80± 24.90	234.60±5 4.29	273.10±54. 21
21		11.96±0. 03	192.20±6 4.93	70.78±27.0 7
22		55.47±7. 82	114.50±83 .50	27.03±6.93
23		560.50± 24.80	569.50±1 57.62	585.90±80. 57
24		11.64±2. 84	257.10±5 7.40	219.20±80. 40
25		1.06±0.2 8	269.60±9 9.60	157.10±55. 19
26		0.31±0.0 2	146.90±3 0.79	57.40±17.4 2
27		55.50±3. 43	1697.00± 588.45	1130.00±74 .84
28		99.07±1 6.20	23.56±7.4 3	57.19±16.7 8

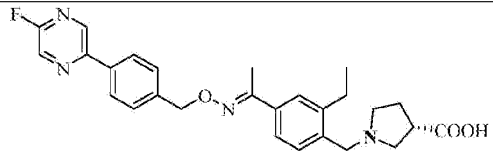
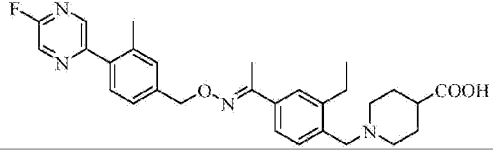
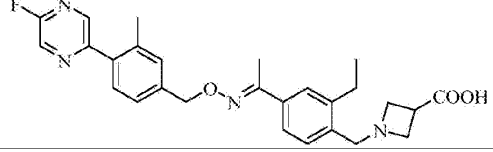
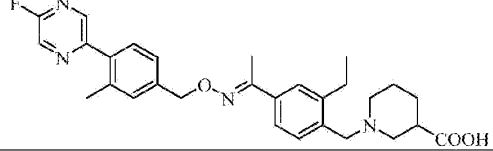
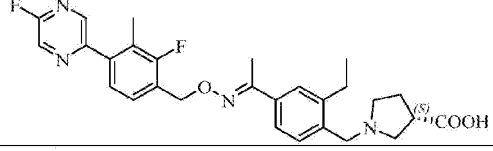
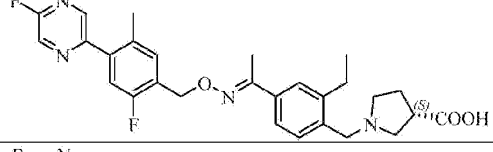
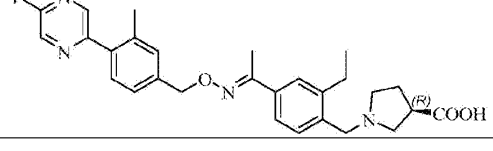
39		> 10000	311.40±4 9.28	
40		> 10000	73.63±12. 88	
41		51.55±1. 82	2.91±0.01	
42		3.825±0. 24	20.53±0.9 8	
43		2092±22 3.54	55.33±8.3 2	
44		> 10000	878.5±45. 87	
45		> 10000	407.40±7 4.54	
46		5606±42 0.18	487.50±1 8.97	
47		131.7±4. 40	4.67±0.71	
48		276.4±2 6.98	210.8±10 0.8	

49		66.07±8.58	181.3±10.8	
50		3365±397.2	101.9±97.13	
51		195±27.65	118±46.21	
52		218.8±66.2	26.31±3.26	
53		238.9±97.56	7.02±0.59	HYY20
54		765.3±81.76	13.53±8.58	
55		>10000	268.7	
56		686.1±49.07	5.05±1.84	
57		664.1±119	6.52±0.073	
58		510.1±250.2	>10000	.1

59		86.08 ± 2.07	44.25 ± 23.21	
60		3.50 ± 1.64	71.69	
61		4.75 ± 1.88	3.33 ± 2.5	
62		1.13 ± 0.3818	3.31 ± 0.24	
63		21.89 ± 1.03	5.86 ± 0.27	
64		239.1 ± 1.63	7.77 ± 1.02	
65		>10000	10.51 ± 0.28	
66		>10000	421.9 ± 10.61	
67		194.8 ± 16.05	1.80 ± 0.43	
68		7536 ± 941.2	33.69 ± 12.04	

69		4981±52 5.4	8.28±0.38	
70		>10000	36.17±6.5 8	
71		>10000	34.06±6.0 8	
72		112.1±0. 85	1.51±0.64	
73		1113±55 .86	10.68±0.1 1	
74		>10000	13.13±0.0 2	
75		>10000	34.17±0.2 2	
76		549.1±7 7.78	4.39±0.91	
77		270.9±8. 77	5.93±4.12	
78		1888±12 7.3	215.8±64. 91	

79		>10000	444.7±88.81	
80		2082±40.31	18.05±0.52	
81		2254±236.9	102.7±9.1	
82		>10000	42.7±2.28	
83		>10000	40.95±0.22	
84		>10000	254.1±72.34	
85		173.1±9.69	8.52±0.21	
86		>10000	42.22±10.71	
87		>10000	17.4±0.39	
88		3207±111.7	27.38±1.12	

89		5250±23 4.8	135.2±17. 75	
90		5950±72 .83	>10000	
91		54.45±0. 20	>10000	
92		>10000	>10000	
93		347.9±4 0.44	12.03±1.0 0	
94		613.9±5 0.25	13.94±1.4 8	
95		125.0±1 4.50	75.38±5.7 2	

[0450] 虽然现在有部分S1PR4调节剂报道，但这些化合物大多机制不明，没有详细的构效关系分析，缺乏体内药代动力学参数，无法评估这些化合物的体内有效性。本发明人以S1PR1/5激动剂BAF312为先导化合物，基于S1PR1和S1PR4的 β -arrestin招募活性评价体系，针对BAF312的极性头部，疏水端进行了改造，合成并评价了一系列化合物。通过对化合物BAF312进行充分地S1PR1/4构效关系讨论，本发明人发现将BAF312的环己基更换为苯环，将其三氟甲基更换为甲基合成化合物22后，可以显著降低S1PR1的活性，但可以保持S1PR4的活性。随后，本发明人修饰了化合物22的极性头部区域，发现手性吡咯烷羧酸的引入进一步

提高了化合物对S1PR4的活性，因此发现了选择性S1PR4激动剂30。测试结果表明化合物30对S1PR4的 β -arrestin招募活性达到 $EC_{50}=9.09\text{nM}$ ，接下来对优势化合物30进行了S1PR1-5选择性分析，测试结果表明：与内源性配体S1P相比，化合物30对S1PR2/3/5靶点没有体现激动活性，对S1PR1的选择性达到将近10倍，进一步证明了化合物30是选择性S1PR4激动剂，并且对S1PR4的激动活性明显高于内源性配体S1P。同时化合物67相比化合物30，体现出更优异的S1PR4选择性及活性。化合物67针对S1PR4的活性达到 1.80nM ，对S1PR1的选择性大于100倍。

[0451] 化合物30、67在S1PRs的选择性

Receptor	EC_{50}/nM ($E_{\text{max}}/\%$) 30	EC_{50}/nM ($E_{\text{max}}/\%$) 67	EC_{50}/nM S1P
S1PR1	87.64 ± 3.35 (101.66) ^a	194.8 ± 16.05 nM ^a	8.52 ± 1.06 ^a
S1PR2	>10000 (-6.90) ^b	>10000 nM ^a	2.95 ± 1.37 ^b
S1PR3	>10000 (2.25) ^c	>10000 nM ^a	20.60 ± 3.37 ^c
S1PR4	9.09 ± 0.67 (103.51) ^a	1.80 ± 0.43 nM ^a	100.00 ± 21.85 ^a
S1PR5	>10000 (19.51) ^b	3740 ± 221.3 nM ^a	2.00 ± 1.90 ^b

[0452] ^a基于Tango-S1PR1-CHO-K1和Tango-S1PR4-CHO-K1细胞的 β -restin募集活性，表示为 EC_{50} 值的平均值 $\pm$ SD。^bFLIPR分析基于S1PR2-CHO和S1PR5-CHO细胞系进行，表示为 EC_{50} 值的平均值 $\pm$ SD。^c基于PathHunter CHO-K1-S1PR3细胞的 β -restin募集活性，表示为 EC_{50} 值的平均值 $\pm$ SD。数据为至少两次独立测定的平均值，报告为平均值 $\pm$ SD(标准偏差)的形式。

[0453] 实施例4.系列化合物药代动力学性质测试

[0454] 在构效关系讨论中，本发明人得到了关键化合物22，然后在22的基础上，对化合物的极性头部修饰为手性吡咯烷羧酸，得到了选择性S1PR4激动剂30及67。我们对化合物22、30和67分别进行了药代动力学性质分析，发现化合物22保留和B AF312相似的环丁酸极性头部，但是体现出S1PR1和S1PR4双重活性，并且生物利用度仅达到23.5%，成药性不佳。而新发现的化合物30及67，不仅体现出优异的S1PR4激动活性，并且其口服吸收性质优异，体内暴露量大大提高，口服生物利用度分别达到119.7%和76.21%，更加具备成药潜力。

[0455] 化合物22的药代动力学参数^a

Parameter	Compound 22	
	IV (1 mg/kg)	PO (10 mg/kg)
Tmax (h)	0.08±0	0.83±0.29
T _{1/2} (h)	0.42±0.03	2.16±0.96
Cmax (ng/mL)	995.32±53.20	544.44±221.09
AUC _{0-t} (h*ng/mL)	475.87±43.64	1118.59±399.59
CL _{obs} (L/h/kg)	2.08±0.19	8.90±3.86
Vss _{obs} (L/kg)	0.88±0.07	27.73±16.85
F (%)	--	23.5

[0456] 化合物30的药代动力学参数^a

Parameter	Compound 30	
	IV (1 mg/kg)	PO (10 mg/kg)
Tmax (h)	0.08±0	2.00±0
T _{1/2} (h)	2.15±0.06	2.78±0.12

Parameter	Compound 30	
	IV (1 mg/kg)	PO (10 mg/kg)
Cmax (ng/mL)	437.70±82.58	1031.52±91.90
AUC _{0-t} (h*ng/mL)	823.51±284.02	9860.13±794.15
CL _{obs} (L/h/kg)	1.21±0.44	1.02±0.08
Vss _{obs} (L/kg)	3.59±1.16	4.08±0.32
F (%)	--	119.7

[0457] ^a利用体重为200–220g的SD大鼠(雄性，每组3只)以供研究。

[0458] 化合物67的药代动力学参数^a

Parameter	Compound 67	
	IV (1 mg/kg)	PO (10 mg/kg)
Tmax (h)	0.08±0.00	1.83±1.89
T _{1/2} (h)	1.18±0.01	2.17±0.11
Cmax (ng/mL)	958.08±45.87	986.13±277.10
AUC _{0-t} (h*ng/mL)	836.22±26.98	6372.51±1509.83
CL _{obs} (L/h/kg)	1.19±0.04	1.55±0.27
Vss _{obs} (L/kg)	1.52±0.02	4.88±1.17
F (%)	--	76.21

[0459] ^a利用体重为200–220g的SD大鼠(雄性，每组3只)以供研究。

[0460] 实施例5.内化功能测试

[0461] S1P可以引起受体内化，抑制淋巴细胞从次级淋巴组织流出，从而降低机体组织中的炎症反应，这也是S1P靶点药物可以治疗疾病的关键生物作用。因此进行化合物30对S1PR4内化后受体的恢复程度评价，在S1PR4高表达的细胞中评价了化合物30引起受体内化后的恢复作用。用1 μ M浓度的S1P、BAF312和化合物30处理S1PR4-293T细胞，在37℃下持续1.5小时，随后立即或间隔5小时或20小时检测细胞表面的S1PR4受体表达情况。如图5所示，BAF312作为S1PR1和S1PR5激动剂，由于不具备S1PR4的激动活性，所以不能引起S1PR4受体内化。S1P可以引起S1PR4内化，并且在20小时后受体表达恢复，选择性S1PR4激动剂30对S1PR4有长达20小时的持续内化能力，证明化合物30是较强的选择性S1PR4激动剂。化合物30诱导S1PR4内化后的恢复效果如图5所示。

[0462] 实施例6.利用S1PR4激动剂改善S1PR4-R82C/NDUFA10-R217W双突变小鼠小鼠的肌肉性能和肌营养不良表型(化合物30)

[0463] 基于上述靶标与肌病关系研究以及选择性S1PR4调节剂的发现，本发明人在S1PR4-R82C/NDUFA10-R217W双突变导致的肌营养不良疾病模型中，评价了化合物30的体内药效。

[0464] 实验结果表明，给药S1PR4激动剂可以改善肌营养不良的表型，同时减少肌肉炎症和纤维化。

[0465] 本项研究说明S1PR4和NDUFA10突变在肌营养不良的发病过程中发挥着重要作用，并为肌营养不良的治疗提供了炎症相关的新靶点和治疗药物选择。

[0466] 实验动物与分组

[0467] 实验动物：S1PR4-R82C/NDUFA10-R217W小鼠总共34只，分成如下所示的6组。

组号	分组	只数	给药方式	给药次数
1	Model	6	灌胃	每日一次
2	泼尼松龙 1 mg/kg	5	灌胃	每日一次
3	BAF312 1 mg/kg	5	灌胃	每日一次
4	30 0.3 mg/kg	6	灌胃	每日一次
5	30 1 mg/kg	6	灌胃	每日一次
6	30 3 mg/kg	6	灌胃	每日一次

- [0468] 1.主要试剂与药品
- [0469] 阳性药泼尼松龙(1mg/kg)，BAF312(1mg/kg)，化合物30(0.3/1/3mg/kg)
- [0470] 2实验方法
- [0471] 从第0天开始灌胃给药，期间每天称量体重，以调整药物剂量。实验开始和实验结束时测量握力，观察小鼠的运动变化。检测小鼠四肢握力、血清肌酸激酶含量和肌肉纤维化/炎症变化作为评价药效指标。
- [0472] 2.1经药治疗结束后检验内容
- [0473] 2.1.1四肢握力检测
- [0474] 小鼠被水平放置在抓握试验板上，抓住小鼠尾部向反方向拉拽，动作轻缓，切勿暴力操作，逐渐拉鼠尾，直至小鼠松开握力感受器，握力感受器记录的最大值，即为握力数值，重复3次取平均值。
- [0475] 2.1.2血清肌酸激酶含量检测
- [0476] 给药结束后，经眼眶取血，静置30min，经3000rpm/min，4℃离心15min，提取血清，-20℃冷冻保存，按照试剂盒说明检测。
- [0477] 2.1.3肌肉组织切片病理检测
- [0478] 实验结束后，取小鼠胫骨前肌、趾长伸肌和膈肌固定后切片进行HE染色、天狼猩红染色观察肌肉纤维化程度。切片免疫荧光孵育F4/80观察肌肉炎症水平。
- [0479] 双突变小鼠在给药后的体重变化如图6所示：
- [0480] 双突变小鼠经过给药治疗后，与模型组相比，BAF312 1mg/kg组和化合物30 0.3、1、3mg/kg组体重增长趋势无差别，泼尼松龙1mg/kg体重增长趋势与其它组相比，较为缓慢。
- [0481] 双突变小鼠在给药后的握力变化如图7所示：

- [0482] 双突变小鼠经过给药治疗后，在给药开始和给药结束时测量握力，统计握力与体重的比值来代表小鼠握力变化，以排除体重的影响。给药开始时双突变鼠的握力与野生型小鼠相比显著降低，经过21天的给药治疗后，化合物30在0.3、1mg/kg组和泼尼松龙1mg/kg组的握力显著升高，显示出较好的治疗效果。
- [0483] 双突变小鼠的肌酸激酶变化如图8所示：
- [0484] 双突变小鼠血清中肌酸激酶含量与健康小鼠相比显著升高。经过给药治疗后，化合物30 1mg/kg、4mg/kg和BAF312 1mg/kg可显著降低肌酸激酶的含量，泼尼松龙1mg/kg组无降低作用。
- [0485] 目前肌营养不良的诊断标准为肌肉活检，通过观察肌肉纤维化和炎症水平来最终判断肌营养不良的改善情况。通过HE染色观察肌肉中有核纤维数量可判断纤维化程度。正常的肌纤维间的间隙正常，细胞核位于周围，肌纤维没有炎细胞浸润；发生纤维化的肌肉会出现肥大与萎缩，导致肌纤维大小不一，肥大纤维轮廓变圆，肌细胞核内移，受损的细胞周围有大量的炎细胞浸润。中心定位细胞核的再生肌纤维，这些细胞核在未受损的肌肉中几乎完全缺失，因此可以用作先前坏死再生周期的标记。
- [0486] 双突变小鼠的中间有核纤维代表图如图9所示，有核纤维统计如图10所示。
- [0487] 通过统计肌肉中间有核纤维数量可判断肌肉纤维化程度。统计结果显示，模型组的有核纤维占比最高，经过给药治疗后，各给药组都可以显著降低中间有核纤维的数量。化合物30在1mg/kg组降低有核纤维幅度最大，强于BAF312 1mg/kg组和泼尼松龙1mg/kg组，表明化合物30 1mg/kg治疗效果好于BAF312 1mg/kg组和泼尼松龙1mg/kg组，而且化合物30 1mg/kg降幅高于化合物30 3mg/kg治疗效果无差别，表明化合物30在1mg/kg即可达到治疗效果。
- [0488] 双突变小鼠的胶原面积代表图如图11所示；胶原面积统计如图12所示。
- [0489] 判断纤维化程度的另一个指标为胶原面积。与健康者相比，肌营养不良患者出现胶原沉积，导致肌肉中胶原面积占比显著升高。实验统计结果显示模型组胶原面积占比最高，经过给药治疗后，化合物30 1mg/kg、3mg/kg、BAF312 1mg/kg和泼尼松龙1mg/kg组显著减低了胶原沉积。

- [0490] 综合中间有核纤维数量和胶原沉积占比可知，化合物30 1mg/kg、化合物30 3 mg/kg、BAF312 1mg/kg和泼尼松龙1mg/kg组可显著改善双突变小鼠的纤维化程度。化合物30 1mg/kg的治疗效果强于泼尼松龙1mg/kg组，表明化合物30 1mg/kg即可达到治疗作用。
- [0491] 双突变小鼠的巨噬细胞免疫荧光代表图如图13所示；巨噬细胞免疫荧光统计图如图14所示。
- [0492] 肌营养不良的典型病理特征之一即为肌肉炎症，双突变小鼠经过给药治疗后，各给药都组显著减低了巨噬细胞的含量，减轻肌肉炎症，其中化合物30 1mg/kg组降幅最大。
- [0493] 综合以上所有结果，化合物30 1mg/kg可显著改善双突变小鼠的病理特征，包括降低肌酸激酶含量，减少纤维化水平以及减轻肌肉炎症，以达到治疗作用。治疗效果强于阳性药泼尼松龙1mg/kg组，说明化合物30有望成为治疗肌营养不良的新化合物。
- [0494] 实施例7.杜氏肌营养不良体内药效测试(化合物30)
- [0495] 为了验证化合物30在其他肌病模型中的应用潜力，我们进一步选取杜氏肌营养不良模型进行体内药效评价，实验方案及结果如下：
- [0496] 1实验材料
- [0497] 实验动物与分组
- [0498] 实验动物：杜氏肌营养不良模型小鼠总共35只，分成如下所示的6组。

组号	分组	只数	给药方式	给药次数
1	Model	6	灌胃	每日一次
2	泼尼松龙 1 mg/kg	5	灌胃	每日一次
3	BAF312 1 mg/kg	6	灌胃	每日一次
4	30 0.3 mg/kg	6	灌胃	每日一次
5	30 1 mg/kg	6	灌胃	每日一次
6	30 3 mg/kg	6	灌胃	每日一次

- [0499] 主要试剂与药品

- [0500] 阳性药泼尼松(1mg/kg)：杜氏肌营养不良是肌营养不良亚型中发病人数最多的，也是所有肌营养不良亚型中研究报道最多的。目前已经批准上市的杜氏肌营养不良的治疗方法包括抗炎的糖皮质激素以及基因治疗。
- [0501] 2实验方法
- [0502] 从第0天开始灌胃给药，期间每天称量体重，以调整药物剂量。每隔2天进行握力测试，观察小鼠的握力变化，直到第21天实验结束。检测小鼠四肢握力、血清肌酸激酶含量和肌肉纤维化/炎症变化作为评价药效指标。
- [0503] 2.1经药治疗结束后检验内容
- [0504] 2.1.1四肢握力检测
- [0505] 小鼠被水平放置在抓握试验板上，抓住小鼠尾部向反方向拉拽，动作轻缓，切勿暴力操，逐渐拉鼠尾，直至小鼠松开握力感受器，握力感受器记录的最大值，即为握力数值，重复3次取平均值。
- [0506] 2.1.2血清肌酸激酶含量检测
- [0507] 给药结束后，经眼眶取血，静置30min，经3000rpm/min，4℃离心15min，提取血清，-20℃冷冻保存，按照试剂盒说明检测。
- [0508] 2.1.3肌肉组织切片病理检测
- [0509] 实验结束后，取小鼠胫骨前肌、趾长伸肌和膈肌固定后切片进行HE染色、天狼星红染色观察肌肉纤维化程度。切片免疫组化孵育F4/80观察肌肉炎症水平。
- [0510] 杜氏肌营养不良模型小鼠在给药后的体重变化如图15所示。
- [0511] 杜氏肌营养不良模型小鼠经过给药治疗后，与模型组相比，BAF312 1mg/kg组，泼尼松龙组和化合物30 0.3、1mg/kg组体重增长趋势无差别，化合物30 3mg/kg体重增长趋势与其它组相比，较为缓慢。
- [0512] 杜氏肌营养不良模型小鼠在给药后的握力变化如图16所示。
- [0513] 杜氏肌营养不良模型小鼠经过给药治疗后，每2天测量一次握力，统计握力与体重的比值来代表小鼠握力变化，以排除体重的影响。在前14天，所有组小鼠握力都有上升，其中给药组上升速度都高于模型组，尤其是化合物30 3mg/kg握力上升最为显著，显示出较好的治疗效果。但是从14天之后，所有组握力都开

始下降，分析原因，可能是握力测量过于频繁，小鼠已经习惯了握力测试，不再激烈抓握反抗。

- [0514] 杜氏肌营养不良模型小鼠的肌酸激酶变化如图17所示
- [0515] 杜氏肌营养不良模型小鼠血清中肌酸激酶含量与健康小鼠相比显著升高。经过给药治疗后，化合物30 0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg和泼尼松龙1mg/kg可显著降低肌酸激酶的含量，BAF312 1mg/kg组无降低作用。且30 1mg/kg组降低幅度大于泼尼松龙1mg/kg组，说明30 1mg/kg的治疗效果优于泼尼松龙。
- [0516] 目前肌营养不良的诊断金标准为肌肉活检，通过观察肌肉纤维化和炎症水平来最终判断肌营养不良的改善情况。通过HE染色观察肌肉中有核纤维数量可判断纤维化程度。正常的肌纤维间的间隙正常，细胞核位于周围，肌纤维没有炎细胞浸润；发生纤维化的肌肉会出现肥大与萎缩，导致肌纤维大小不一，肥大纤维轮廓变圆，肌细胞核内移，受损的细胞周围有大量的炎细胞浸润。中心定位细胞核的再生肌纤维，这些细胞核在未受损的肌肉中几乎完全缺失，因此可以用作先前坏死再生周期的标记。
- [0517] 杜氏肌营养不良模型小鼠的中间有核纤维代表如图18所示；有核纤维统计如图19所示。
- [0518] 统计肌肉中间有核纤维数量可判断肌肉纤维化程度。统计结果显示，模型组的有核纤维占比最高，经过给药治疗后，化合物30 1mg/kg、化合物30 3mg/kg、BAF312 1mg/kg和泼尼松龙1mg/kg组都可以显著降低中间有核纤维的数量，化合物30 0.3mg/kg组与模型组相比无显著性。化合物30 1mg/kg和化合物30 3mg/kg组降低有核纤维幅度最大，强于BAF312 1mg/kg组和泼尼松龙1mg/kg组，表明化合物30 1mg/kg和化合物30 3mg/kg治疗效果好于BAF312 1mg/kg组和泼尼松龙1mg/kg组，而且化合物30 1mg/kg和化合物30 3mg/kg治疗效果无差别，说明化合物30 1mg/kg即可达到治疗效果。
- [0519] 杜氏肌营养不良模型小鼠的胶原面积代表如图20所示；胶原面积统计如图21所示。
- [0520] 判断纤维化程度的另一个指标为胶原面积。与健康者相比，肌营养不良患者出现胶原沉积，导致肌肉中胶原面积占比显著升高。实验统计结果显示模型组胶

原面积占比最高，经过给药治疗后，化合物30 0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg和泼尼松龙1mg/kg组显著减低了胶原沉积。BAF312 1mg/kg组与模型组相比无差别，表明其不能降低胶原沉积。化合物30 1mg/kg、3mg/kg降低胶原沉积的效果强于泼尼松龙1mg/kg组，并且化合物30 1mg/kg、3mg/kg降低胶原沉积的效果无差别。

- [0521] 综合中间有核纤维数量和胶原沉积占比可知，化合物30 1mg/kg、3mg/kg和泼尼松龙1mg/kg组可显著改善杜氏肌营养不良小鼠的纤维化程度，BAF312 1mg/kg组对肌肉纤维化的改善效果较差。化合物30 1mg/kg、3mg/kg的治疗效果强于泼尼松龙1mg/kg组，且化合物30 1mg/kg、3mg/kg的治疗效果无差别，表明化合物30 1mg/kg即可达到治疗作用。
- [0522] 杜氏肌营养不良模型小鼠的巨噬细胞免疫荧光代表图如图22所示；巨噬细胞免疫荧光统计图如图23所示。
- [0523] 杜氏肌营养不良的典型病理特征之一即为肌肉炎症，目前治疗杜氏肌营养不良的一线药物糖皮质激素即是通过减轻肌肉炎症发挥治疗作用。杜氏肌营养不良模型小鼠经过给药治疗后，化合物30 1mg/kg、3mg/kg和泼尼松龙1g/kg组显著减低了巨噬细胞的含量，减轻肌肉炎症。BAF312 1mg/kg组对肌肉炎症无改善作用。
- [0524] 综合以上所有结果，化合物30 1mg/kg和3mg/kg以及泼尼松龙1mg/kg可显著改善杜氏肌营养不良模型小鼠的病理特征，包括降低肌酸激酶含量，减少纤维化水平以及减轻肌肉炎症，以达到治疗作用。且化合物30 1mg/kg和3mg/kg组的治疗效果强于阳性药泼尼松龙1mg/kg组，说明化合物30有望成为治疗杜氏肌营养不良的新化合物，进一步证明了选择性S1PR4激动剂在治疗肌病中的研究价值。
- [0525] 实施例8.化合物30对脓毒症诱发的肌病药效学评价
- [0526] 脓毒症(Sepsis)诱发的肌病(Sepsis induced myopathy, SIM)定义为一种快速发展的肌肉疾病，可以影响肌肉电生理及形态学表现，并可同时影响呼吸肌和四肢肌。大约40%的重症脓毒症患者可发展为重症监护室获得性肌无力(Intensive Care Unit acquired weakness, ICUAW)，表现为肌肉质量的丢失，肌纤维尺寸的减小及肌肉力量的下降，最终导致病人持续的身体损伤。

[0527] 向动物体内注射外源性毒素可建立脓毒症动物模型。在本研究中，使用腹腔注射脂多糖建立脓毒症模型，观测化合物对获得性肌无力发生发展的影响。这是一种广泛使用的脓毒症建模方法。小鼠注射脂多糖后脓毒症严重程度升高，前肢抓力下降，复合型肌肉动作电位(CMAP, Compound Muscle Action Potential)振幅下降、潜伏期延长，肌纤维直径和横截面积减少，提示小鼠脓毒症获得性肌无力模型构建成功。

[0528] 实验方法

[0529] 用脂多糖诱导的骨骼肌萎缩模型，这可以模拟临床上脓毒症引起的肌肉萎缩。

[0530] 小鼠单次腹腔注射LPS(1mg/kg)，随后连续腹腔注射溶剂(1% DMSO溶于生理盐水中)或化合物30 14天。每天称重，LPS处理14天后，麻醉小鼠，取腓肠肌和胫骨前肌。

[0531] 实验材料

[0532] 2.1实验动物与分组

组号	分组	只数	给药方式	给药次数
1	Control 组	8	不给药	不给药
2	Model 组	8	不给药	不给药
3	LPS +化合物 30 (0.1mg/kg)	8	腹腔注射	每日一次
4	LPS +化合物 30 (1mg/kg)	8	腹腔注射	每日一次
5	LPS +化合物 30 (10mg/kg)	8	腹腔注射	每日一次

[0533] 2.2主要试剂与药品

[0534] LPS，化合物30；

[0535] 3.实验结果

[0536] LPS单次腹腔注射LPS(1mg/kg)，注射后14天，对照组存活率为100%(8(存活)/8(总数))LPS组存活率为50%(4(存活)/8(总数))，化合物30高剂量组存活率为87.5%(7(存活)/8(总数))，化合物30中剂量组存活率为50%(4(存活)/8(总数))，化合物30低剂量组存活率为75%。

[0537] 化合物30对LPS造模脓毒症模型中胫骨前肌(tibialis)腓肠肌(gastrocnemius)的影响如图24所示。

[0538] 结论：

[0539] LPS处理14天后，麻醉小鼠，取腓肠肌和胫骨前肌。模型组腓肠肌和胫骨前肌相较于对照组均出现萎缩，且化合物30中、高剂量可显著抑制胫骨前肌的萎缩。

[0540] 实施例9.杜氏肌营养不良体内药效测试(化合物67)mdx小鼠的药效学评价

[0541] 1.实验材料

[0542] 1.1实验动物与分组

[0543] 实验动物：杜氏肌营养不良模型小鼠总共18只，分成3组。每组6只。

组号	分组	只数	给药方式	给药次数
1	Model	6	灌胃	每日一次
2	化合物 67 3 mg/kg	6	灌胃	每日一次
3	Vamorolone 20 mg/kg	6	灌胃	每日一次

[0544] 1.2主要试剂与药品

[0545] 阳性药Vamorolone(20mg/kg)：杜氏肌营养不良是肌营养不良亚型中发病人数最多的，也是所有肌营养不良亚型中研究报道最多的。近日，获得美国FDA批准上市的类固醇药物Vamorolone用于治疗杜氏肌营养不良，治疗同时能够减少副作用的发生。

[0546] 主要仪器与设备

[0547] 握力仪上海欣软信息科技有限公司

[0548] 2.实验方法

[0549] 从第0天开始灌胃给药，期间每天称量体重，以调整药物剂量。于第20天、第42天进行握力与旋转杆测试。检测小鼠四肢握力、运动持续时间和肌肉纤维化/炎症变化作为评价药效指标。

[0550] 2.1经药治疗后检验内容

[0551] 2.1.1四肢握力检测

[0552] 小鼠被水平放置在抓握试验板上，抓住小鼠尾部向反方向拉拽，动作轻缓，切勿暴力操，逐渐拉鼠尾，直至小鼠松开握力感受器，握力感受器记录的最大值，即为握力数值，重复3次取平均值。

[0553] 2.1.2转棒测试

[0554] 分别在第0天、第20天和第42天转棒测试。该测试以加速速度(0-16rpm)进行，在300s后达到最大速度，最大测试时间为600s。记录直到动物掉落的时间⁷。

[0555] 2.1.3肌肉组织切片病理检测

[0556] 实验结束后，取小鼠胫骨前肌、趾长伸肌和膈肌固定后切片进行HE染色、天狼星红染色观察肌肉纤维化程度。

[0557] 实验结果：

[0558] 杜氏肌营养不良模型小鼠经过给药治疗后，与模型组相比，各给药组体重变化无明显差别(图25)。

[0559] 经过42天的治疗后，与模型组相比，各给药组小鼠的握力都有显著上升。化合物673mg/kg和Vamorolone 20mg/kg握力上升显著，显示出较好的治疗效果(图26)。

[0560] 转棒持续时间可以评价动物运动耐力。在给药第42天，与模型组相比各给药组转棒时间有所上升，化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg握力上升显著，显示出较好的治疗效果，且化合物67 3mg/kg比Vamorolone 20mg/kg握力上升更为显著(图27)。

[0561] 目前肌营养不良的诊断金标准为肌肉活检，通过观察肌肉纤维化和炎症水平来最终判断肌营养不良的改善情况。通过HE染色观察肌肉中有核纤维数量可判断纤维化程度。正常的肌纤维间的间隙正常，细胞核位于周围，肌纤维没有炎细胞浸润；发生纤维化的肌肉会出现肥大与萎缩，导致肌纤维大小不一，肥大纤维轮廓变圆，肌细胞核内移，受损的细胞周围有大量的炎细胞浸润。中心定位细胞核的再生肌纤维，这些细胞核在未受损的肌肉中几乎完全缺失，因此可以用作先前坏死再生周期的标记。给与化合物67和Vamorolone后的中间有核纤维如图28所示。给与化合物67和Vamorolone后的有核纤维统计如图29所示。

[0562] 通过统计肌肉中间有核纤维数量可判断肌肉纤维化程度。统计结果显示，模型组的有核纤维占比最高，经过给药治疗后，化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg显著降低中间有核纤维的数量。化合物67 3mg/kg组降低有核纤维幅度最大，强于BAF312 1mg/kg组和Vamorolone 20mg/kg组，表明化合物67 3mg/kg治疗效

果好于Vamorolone 20mg/kg组。给与化合物67和Vamorolone后的胶原面积如图30所示。

[0563] 判断纤维化程度的另一个指标为胶原面积。与健康者相比，肌营养不良患者出现胶原沉积，导致肌肉中胶原面积占比显著升高。实验统计结果显示模型组胶原面积占比最高，经过给药治疗后，化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg组显著减低了胶原沉积。化合物67 3mg/kg降低胶原沉积的效果与Vamorolone 20mg/kg无差别。综合中间有核纤维数量和胶原沉积占比可知，化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg组可显著改善杜氏肌营养不良小鼠的纤维化程度。给与化合物67和Vamorolone后的胶原面积统计如图31所示。

[0564] 杜氏肌营养不良的典型病理特征之一即为肌肉炎症，目前治疗杜氏肌营养不良的一线药物糖皮质激素即是通过减轻肌肉炎症发挥治疗作用。杜氏肌营养不良模型小鼠经过给药治疗后，化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg组显著减低了巨噬细胞的含量，减轻肌肉炎症。并且化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg组对F4/80的降低作用没有显著性差异，说明二者改善肌肉炎症的效果相当。给与化合物67和Vamorolone后的F4/80巨噬细胞标志物数量(肌肉炎症)如图32所示。给与化合物67和Vamorolone后的F4/80巨噬细胞标志物数量(肌肉炎症)统计如图33所示。

[0565] 杜氏肌营养不良模型小鼠血清中肌酸激酶含量与健康小鼠相比显著升高。经过给药治疗后，Vamorolone 20mg/kg组和化合物67 3mg/kg组可显著降低肌酸激酶的含量。并且化合物67 3mg/kg组对肌酸激酶的降低作用强于Vamorolone 20mg/kg组，说明化合物67 3mg/kg组的治疗作用由于Vamorolone 20mg/kg组。给与化合物67和Vamorolone后的血清肌酸激酶统计如图34所示。

[0566] 综合以上所有结果，化合物67 3mg/kg和Vamorolone 20mg/kg可显著改善杜氏肌营养不良模型小鼠症状和病理特征，包括减少纤维化水平、减轻肌肉炎症并且降低血清肌酸激酶含量，以达到治疗作用。

[0567] 讨论：

[0568] 发明人经过广泛而深入的研究，首先确证了S1PR4和NDUFA10在肌营养不良的发病过程中发挥着重要作用，并为肌营养不良的治疗提供了相关的新靶点。

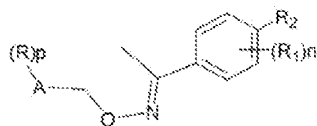
进而设计并合成得到了一系列未见文献报道的S1P受体调节剂小分子化合物，对得到的化合物进行了细胞水平活性测试，得到一批能够调节S1PR4和S1PR4突变蛋白的化合物，并且对活性最好的S1PR4激动剂进行了体内药代动力学参数测定，发现其具有良好的口服吸收性质，具备一定的开发潜力，在内化功能测试中，化合物30、67展示出非选择性激动剂无法达到的持续内化能力。在杜氏肌营养不良小鼠模型和S1PR4-R82C/NDUFA10-R217W小鼠肌营养不良模型中，化合物30、67展示出显著优于阳性药泼尼松和BAF312的体内药效，进一步证明了以S1PR4为靶标治疗肌营养不良性疾病的重大价值，也证明了化合物30、67对S1PR4和S1PR4突变导致的疾病具有显著改善治疗作用。同时，在LPS处理得到的脓毒症模型中，化合物30、67中、高剂量可显著抑制胫骨前肌的萎缩。

[0569] 以上工作为由S1PR4受体介导的肌肉营养不良疾病以及其它肌病的治疗奠定了基础。

[0570] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权利要求书

[权利要求 1] 式I所示的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐：



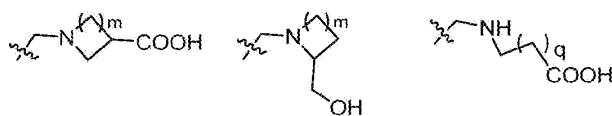
A选自取代或未取代的C₅-C₈芳环(例如苯基)或C₈-C₁₄稠芳环(例如萘基)、取代或未取代的含有1-3个选自N或O的杂原子的五元或六元杂环基；

R独立选自下组：氢、卤素、氰基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(例如，甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基或环烯基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₅-C₈芳基(例如苯基)、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基或杂芳基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基甲酰基，p为1-3的整数；

R¹选自下组：氢、卤素、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、取代或未取代的C₂-C₆链烯基、取代或未取代的C₃-C₆环烯基、取代或未取代的C₃-C₈内酯基、取代或未取代的C₁-C₁₀酰胺基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基、取代或未取代的C₅-C₈芳杂环基；

n选自1-3整数；

R²选自下组：

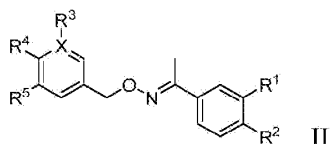


m选自1-4整数；

q选自1-2整数。

[权利要求 2]

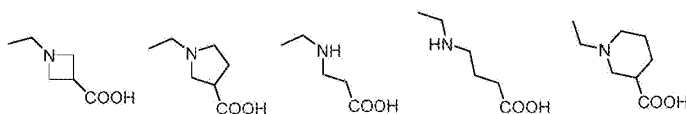
如权利要求1所述的化合物，其特征在于，所述化合物如下式II所示，



式中，

R¹选自下组：氢、卤素(优选F、Cl或Br)、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基(优选甲氧基)、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(优选取代或未取代的C₁-C₆烷基，例如，甲基、乙基、三氟甲基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、取代或未取代的C₂-C₆链烯基、取代或未取代的C₃-C₆环烯基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基、取代或未取代的C₅-C₈芳杂环基；

R²选自下组：



X选自：C或N；

R³不存在或是选自下组的取代基：氢、氰基、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(例如，甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基；

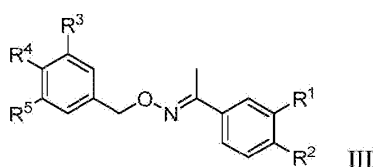
R⁵选自下组：氢、氰基、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(例如，甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基甲酰基、取代或未取代的C₅-

C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基；

R⁴选自下组：氢、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基、取代或未取代的C₃-C₈环烷基或环烯基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基或杂芳基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的芳基甲酰基。

[权利要求 3]

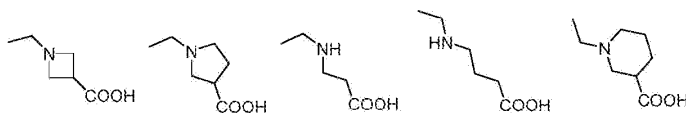
如权利要求1所述的化合物，其特征在于，所述化合物如下式Ⅲ所示，



式中，

R¹选自下组：氢、卤素(优选F、Cl或Br)、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基(优选甲氧基)、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(优选取代或未取代的C₁-C₆烷基，例如，甲基、乙基、三氟甲基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、取代或未取代的C₂-C₆链烯基、取代或未取代的C₃-C₆环烯基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基、取代或未取代的C₅-C₈芳杂环基；

R²选自下组：



R³选自下组的取代基：氢、氰基、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(例如，甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基甲酰基、取代或未取

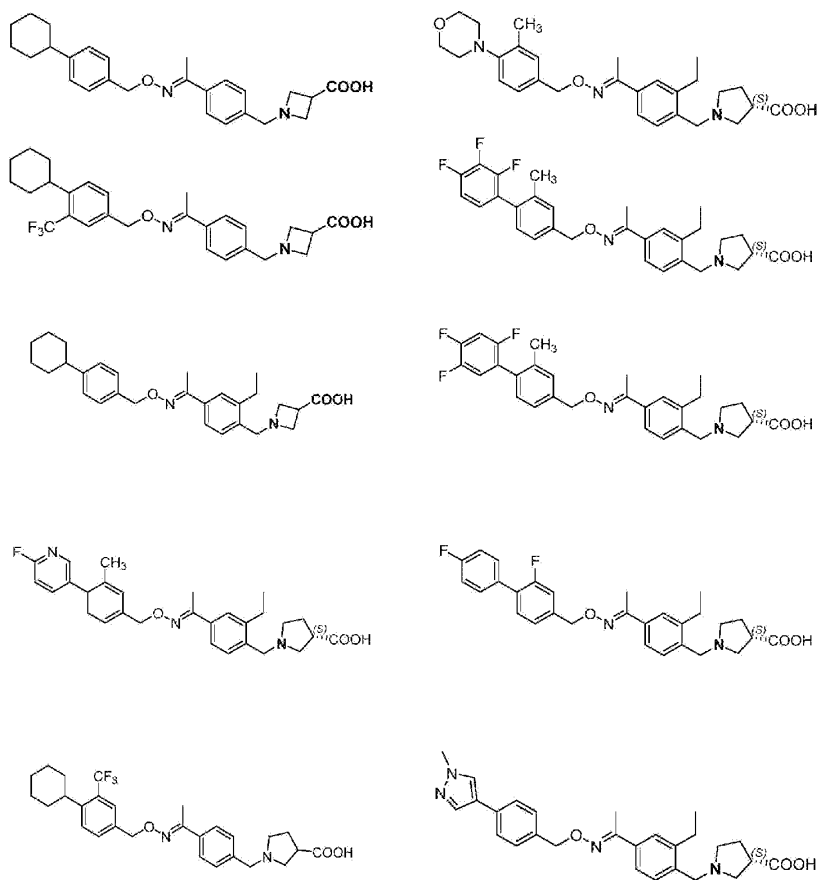
代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基；

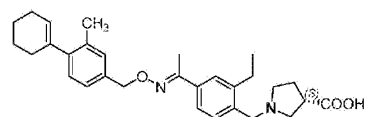
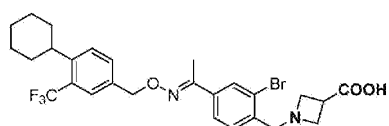
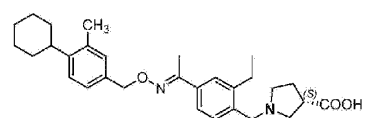
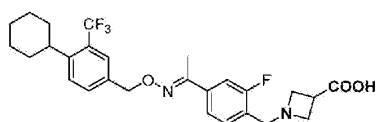
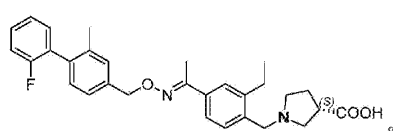
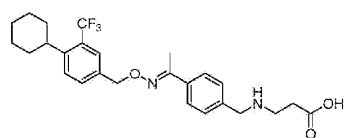
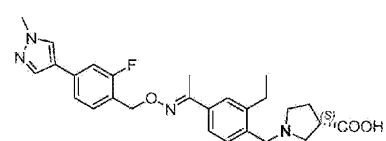
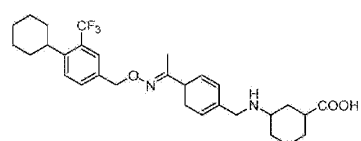
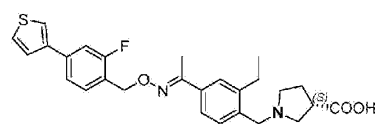
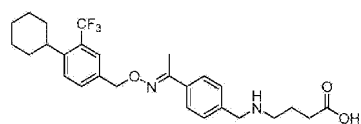
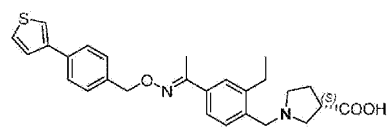
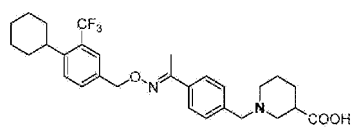
R⁵选自下组：氢、氰基、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基(例如，甲基、三氟甲基、三氟乙基)、取代或未取代的C₃-C₈环烷基、氰基、取代或未取代的C₁-C₅烷氧基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基甲酰基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基；

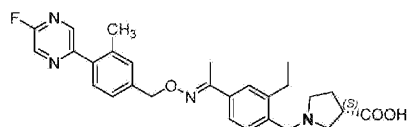
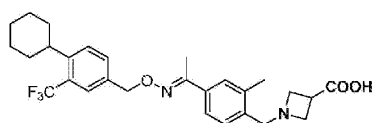
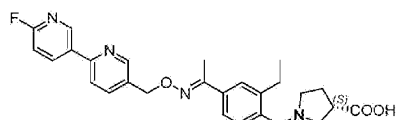
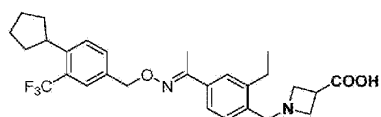
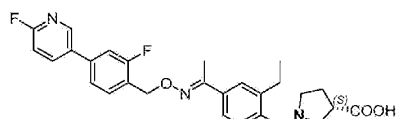
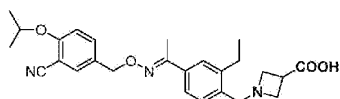
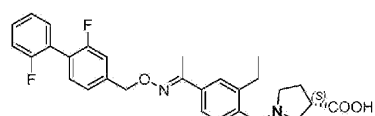
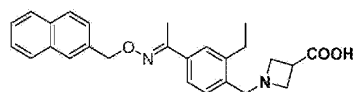
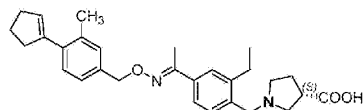
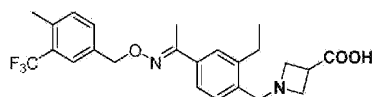
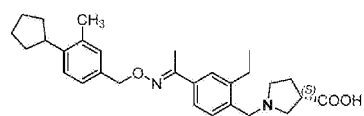
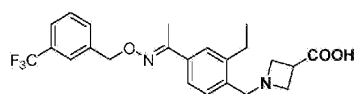
R⁴选自下组：氢、卤素、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基、取代或未取代的C₃-C₈环烷基或环烯基、取代或未取代的C₅-C₈芳基、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基或杂芳基、取代或未取代的C₁-C₁₀烷基甲酰基、取代或未取代的芳基甲酰基。

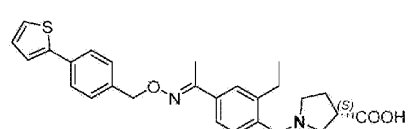
[权利要求 4]

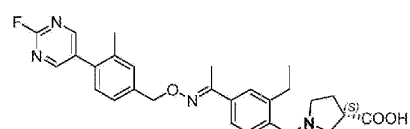
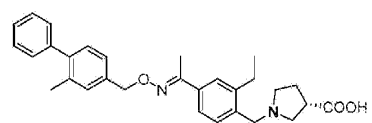
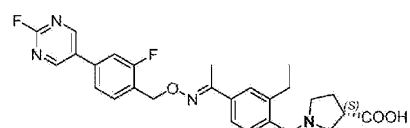
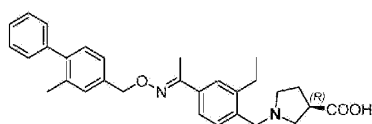
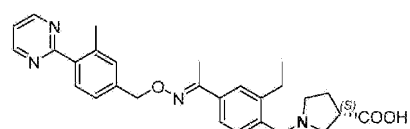
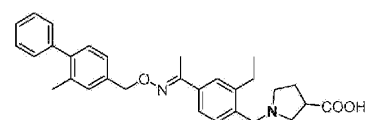
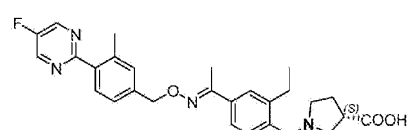
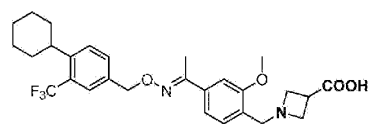
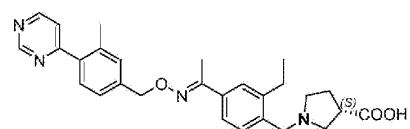
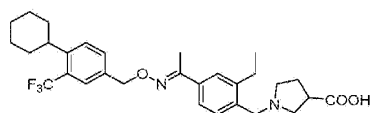
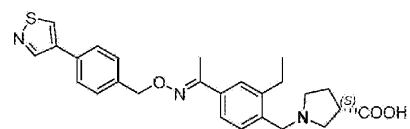
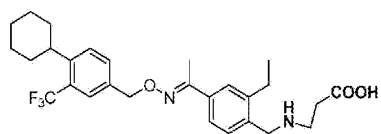
选自下组的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐：

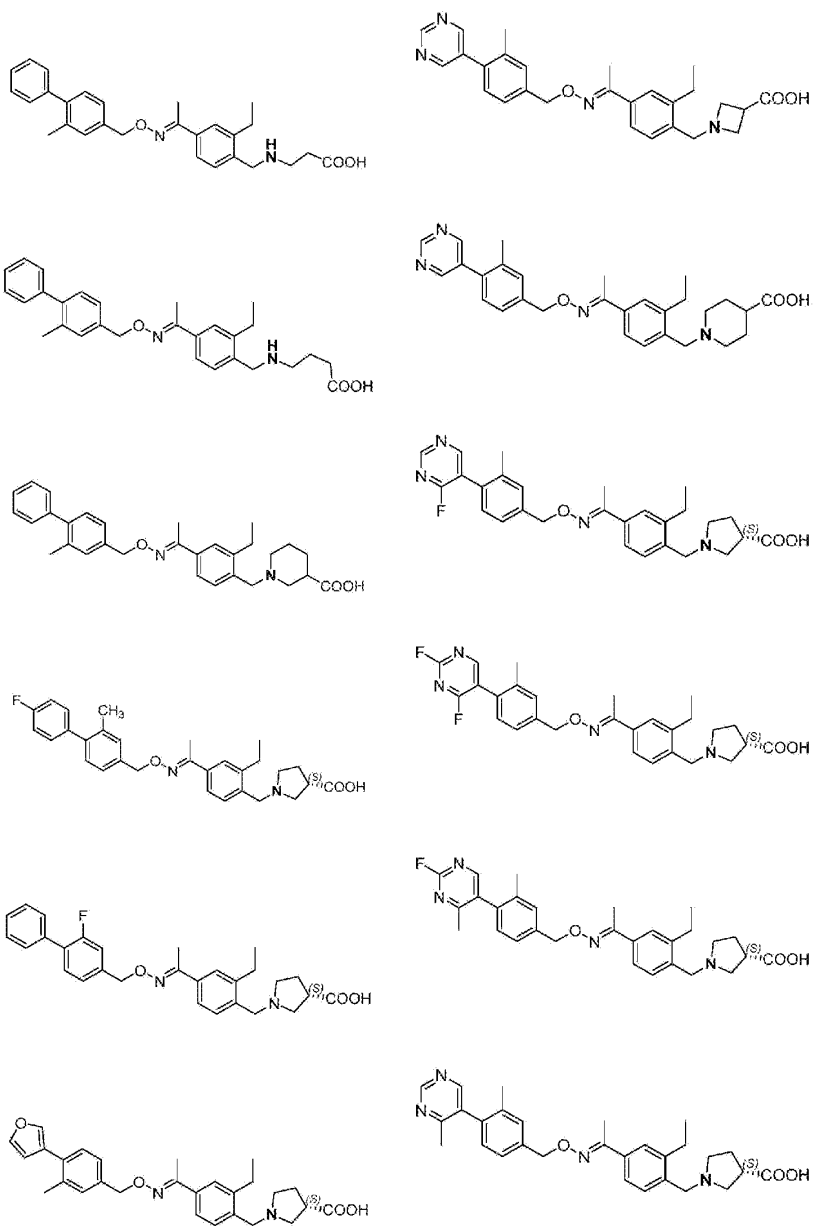


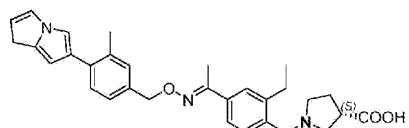


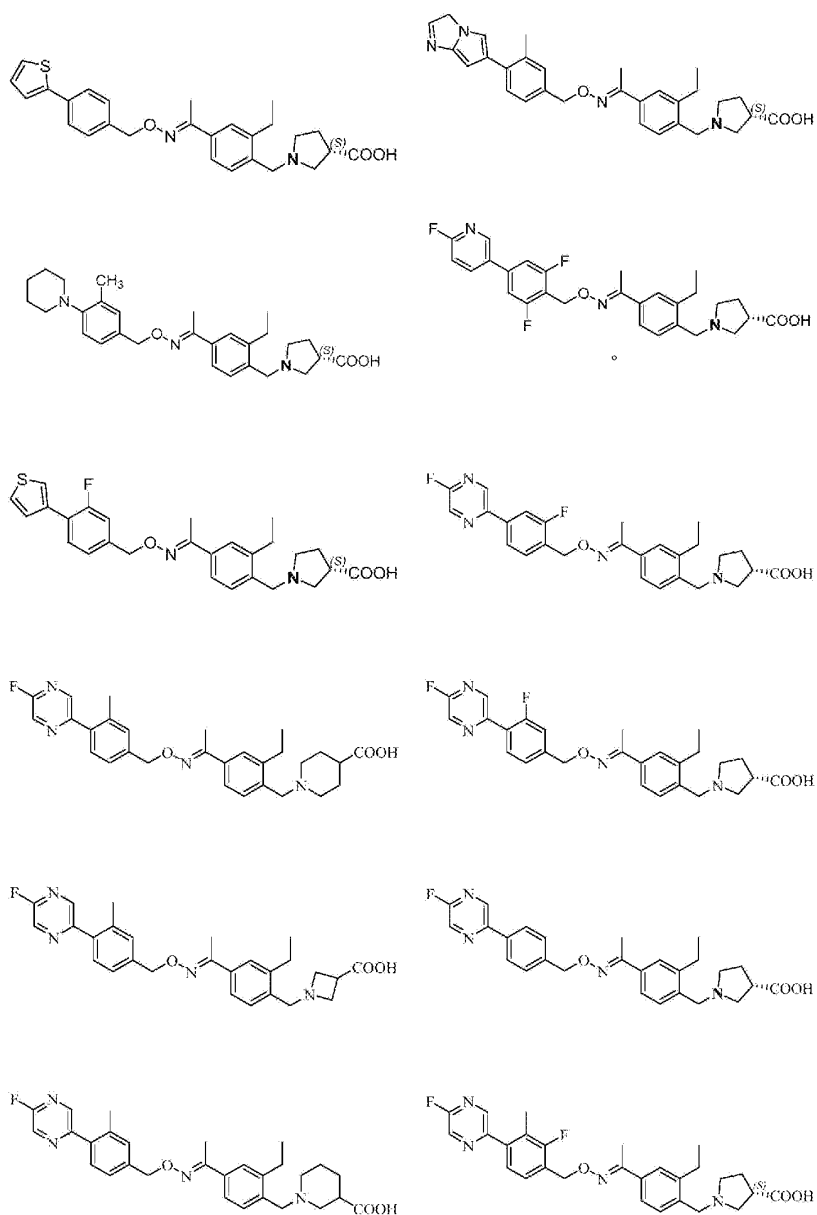


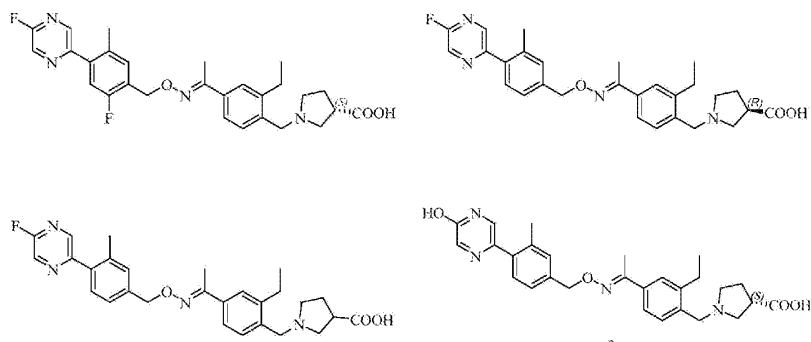










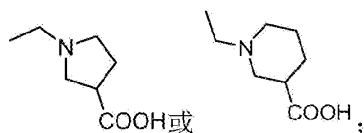


[权利要求 5]

如权利要求3所述的化合物, 其特征在于, 式Ⅲ中,

R^1 选自下组: 氢、卤素(优选F、Cl或Br)、氰基、取代或未取代的 C_1 - C_5 烷氧基(优选甲氧基)、取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基(优选甲基、乙基、丙基);

R^2 为:

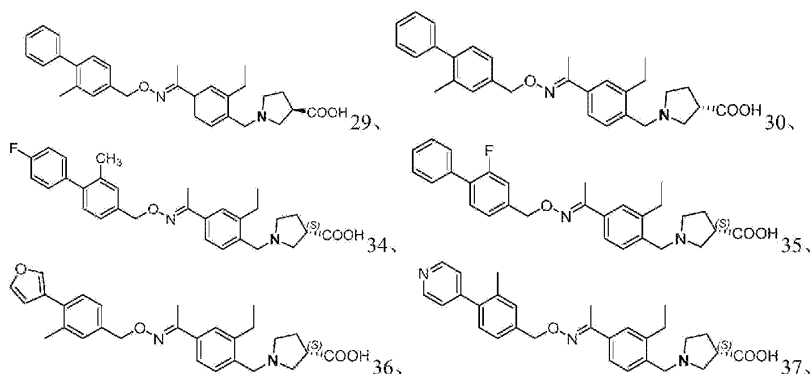


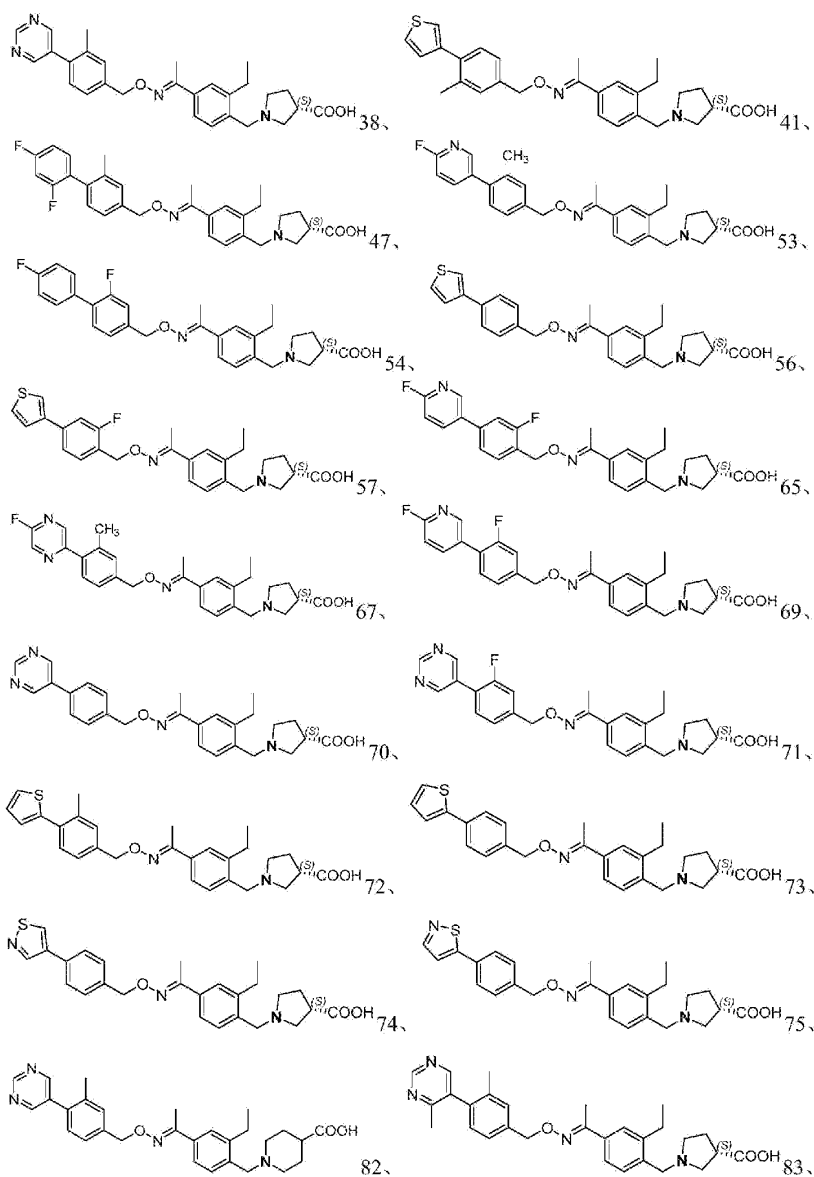
R^3 和 R^5 独立选自下组: 氢、取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基(优选甲基、乙基或丙基)、卤素(优选F);

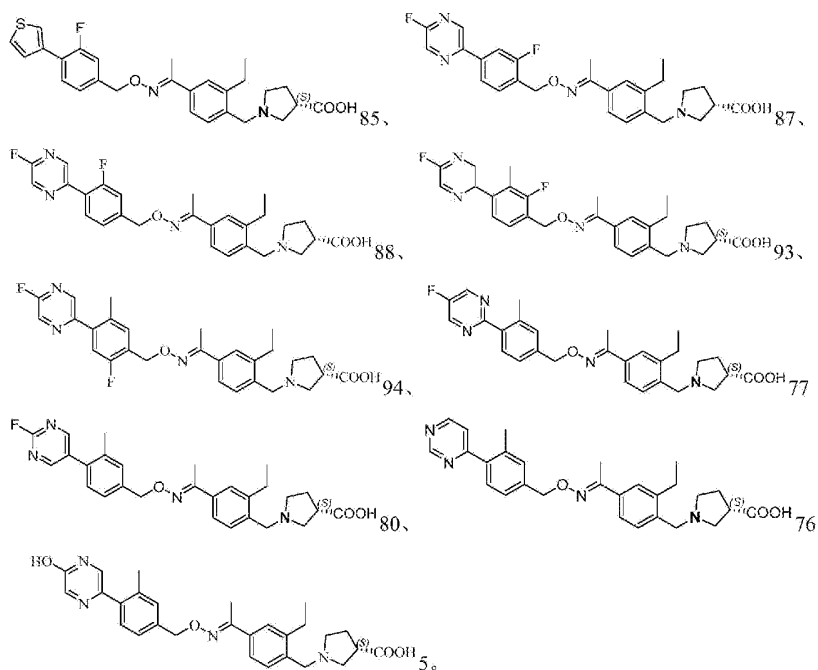
R^4 选自下组: 取代或未取代的 C_5 - C_8 芳基(优选苯基或F取代的苯基)、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂环基或杂芳基。

[权利要求 6]

选自下组的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐:



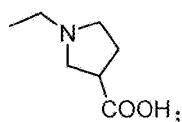




[权利要求 7]

如权利要求3所述的化合物, 其特征在于, 式Ⅲ中,

R^1 选自下组: 氰基、取代或未取代的 C_1-C_5 烷氧基(优选甲氧基)、
取代或未取代的 C_1-C_6 烷基(优选甲基、乙基、丙基);

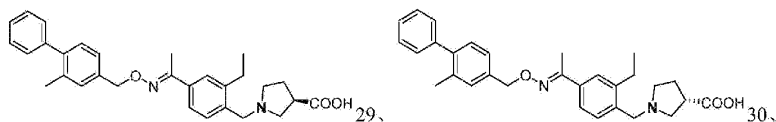
 R^2 为:

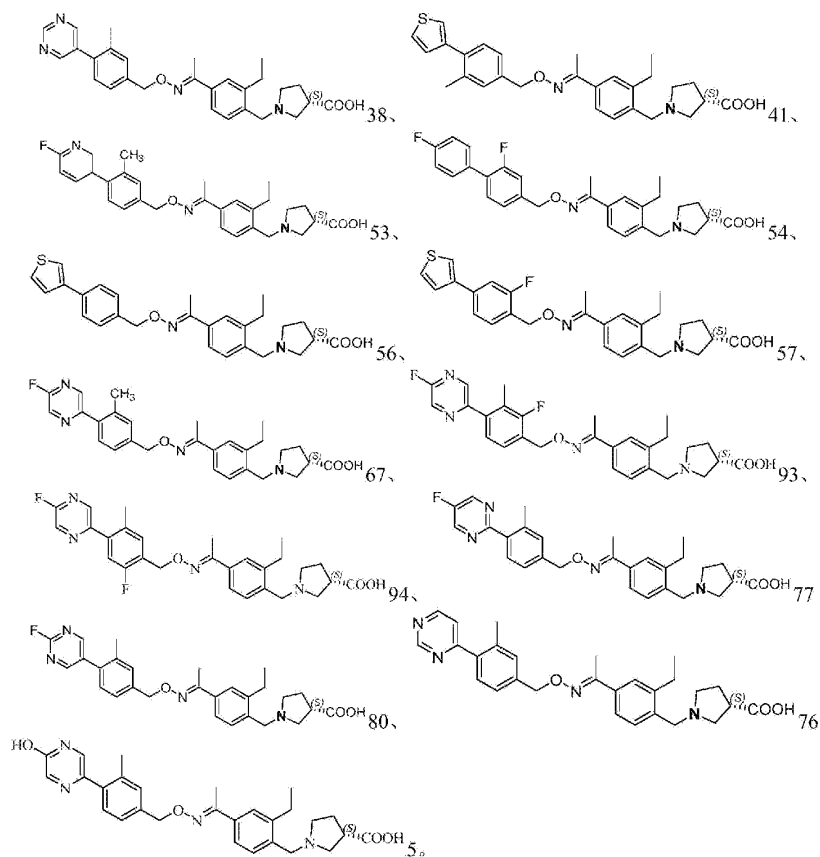
R^3 和 R^5 独立选自下组: 氢、取代或未取代的 C_1-C_3 烷基(优选甲基、乙基或丙基)、卤素(优选F);

R^4 选自下组: 取代或未取代的 C_5-C_8 芳基(优选苯基或F取代的苯基)、取代或未取代的含有1-2个选自N、O或S的杂原子的五元或六元杂芳基。

[权利要求 8]

选自下组的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐:





[权利要求 9]

一种药物组合物，所述药物组合物含有权利要求1-8中任一项所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐，以及药学上可接受的载体或赋形剂。

[权利要求 10]

权利要求1-8中任一项所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐在制备S1PR调节剂中的用途，在优选的实施方式中，所述S1PR调节剂是S1PR4选择性激动剂、S1PR4突变体选择性激动剂。

[权利要求 11]

一种在受试者体内调节S1PR的方法，所述方法包括将有效量的权利要求1-8中任一项所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐或权利要求9所述的药物组合物给予有此需要的受试者的步骤。

- [权利要求 12] 权利要求1-8中任一项所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐或权利要求9所述的药物组合物，用于治疗或预防S1PR4介导的疾病。
- [权利要求 13] 一种包含权利要求1-8中任一项所述的化合物、或其旋光异构体或药学上可接受的盐或权利要求9所述的药物组合物，用于治疗或预防S1PR4介导的疾病的药物。