

一种 N-苄基色胺酮衍生物及其制备方法和应用

技术领域

5 本发明属于药物化学技术领域，具体涉及一种 N-苄基色胺酮衍生物及其制备方法和应用。

背景技术

10 吲哚胺-2,3-双加氧酶(简称 IDO; MW 48,000; EC 1.13.11.42)是含有血红素的酶，该酶是哺乳动物色氨酸代谢途径中的第一个酶并且是限速酶。IDO 催化必需氨基酸—色氨酸通过双氧转化为 N-甲酰犬尿氨酸的氧化反应，并且负责清理人体中的色氨酸。IDO 通过降解色氨酸，造成体内色氨酸缺失的微环境，进而导致了癌症、白内障、神经紊乱等多种与色氨酸缺失密切相关的疾病的发生。因此，寻找基于 IDO 靶点的高效抑制剂已成为近年来药物开发的研究热点。

15 干扰素 γ 是若干潜在的 IDO 表达诱导剂中的一种。在高水平干扰素 γ 刺激的持续活化期间，IDO 降低了游离血清色氨酸的利用度，因而也减少了 5-羟色胺的产生。这些变化与诸如喹啉酸的具有神经活性的犬尿氨酸代谢物的蓄积(也由 IDO 诱导)相结合，促进神经病/精神病病症的发生并且是多种心理障碍的诱因，也是具有 IDO 活化和色氨酸降解特征的慢性病的相关症状的诱因。

20 IDO 活性还涉及与年龄相关的核性白内障的发生。IDO 是晶状体中紫外线滤器生物合成中的第一个酶，并且是限速酶。来自色氨酸降解的紫外线滤器化合物(犬尿氨酸和 3-羟基犬尿氨酸葡萄糖苷)修饰存在于人晶状体中的蛋白质。这些紫外线滤器化合物的量随着年龄增长而增加，并且会导致晶状体逐渐浑浊，进而导致被称为与年龄相关的核性白内障。

25 IDO 表达还涉及通过阻止局部 T-淋巴细胞增殖而进行的免疫应答抑制。T-淋巴细胞对色氨酸的缺乏非常敏感并且在色氨酸缺失条件下，T-淋巴细胞停滞在细胞周期的 G1 期。这种 T 细胞介导的免疫应答抑制是导致许多疾病的因素，所述疾病包括自身免疫性疾病、异体排斥反应、神经退行性病症、抑郁症、细菌或病毒感染(例如人免疫缺陷病毒 HIV)和癌症(Swanson et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2003 30, 311)。

30 已经发现，大多数人类肿瘤组成性地表达 IDO。来自预先免疫小鼠的小鼠肿瘤细胞已经显示可以通过表达 IDO 而保护其不受排斥反应，通过 1-MT 的给药消除了上述效应。然后通过 IDO 抑制剂的伴行给药改善了癌症治疗的有效性。

35 IDO 抑制剂可以用于心理障碍的抑制以及治疗其他具有 IDO 介导的色氨酸代谢途径的病理学特征的疾病，这些疾病包括诸如 AIDS 等病毒的感染、莱姆病和链球菌感染等细菌感染、神经退行性病症(例如阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病)、抑郁症、癌症(包括 T 细胞白血病和结肠癌)、眼部疾病(例如白内障和与年龄相关的黄化)以及自身免疫性疾病等。可以使用多种体外分析(Takikawa, et al. J. Biol. Chem. 1998, 263, 2041)来筛选(例如高通量筛选)、测试反应参照物或从天然来源得到的提取物的 IDO 抑制剂活性，或确定其 IDO 抑制动力学常数。

IDO 与多种疾病发病机制密切相关, 已被证实它是癌症、阿尔茨海默病、抑郁症、白内障等重大疾病的靶标。IDO 抑制剂作为药物具有广阔的应用前景, 但是迄今未有合适的 IDO 抑制剂可作为药物上市, 因此, 寻找新型高效的 IDO 抑制剂具有重要的理论意义和应用价值。

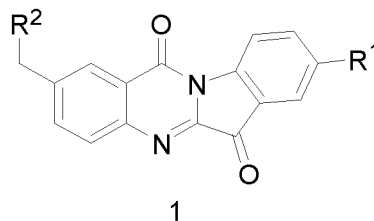
5 现有研究表明, IDO 抑制剂 1-MT(1-甲基色氨酸)在体外能增强肿瘤细胞对 T 细胞的免疫刺激的敏感性; 在动物模型中能体内延缓肿瘤细胞的生长并增强化疗药物的抗肿瘤效果, 而且对几乎所有的自发性肿瘤都起作用。但遗憾的是, 现有的 IDO 抑制剂大都抑制效力低下, 1-MT 作为各种体内外实验中常用的 IDO 抑制剂, 其抑制常数 K_i 也仅为 $34 \mu\text{M}$ 。

10 因此, 本领域迫切需要开发新型高效的 IDO 抑制剂。

发明内容

本发明的目的在于提供一种 N-苄基色胺酮类衍生物及其制备方法和应用。

15 本发明的第一方面, 提供了一种 N-苄基色胺酮类衍生物, 所述衍生物具有如下式 1 所示的结构通式:



式 1 中

R^1 为氢或氟;

20 R^2 为 $-\text{NR}^3\text{R}^4$;

所述的 R^3 、 R^4 各自独立地选自下组: H、取代的或未取代的 C1-C4 烷基、取代的或未取代的 C2-C4 烯基、取代的或未取代的 C2-C4 炔基、取代的或未取代的 C3-C6 环烷基;

25 或 R^3 、 R^4 与相邻的氮原子共同构成取代或未取代的 5-7 元杂环, 其中, 所述的 5-6 元饱和环上具有 1-2 个氮原子, 和 0-2 个选自下组的杂原子: O、S;

所述的取代指基团上的一个或多个氢原子(优选为氮原子上的氢原子)被选自下组的取代基取代: C1-C4 烷基、C1-C4 卤代烷基、胺基保护基(优选叔丁氧羰基)、卤素。

30 在另一优选例中, 当所述的 R^3 、 R^4 与相邻的氮原子共同构成取代或未取代的 5-6 元饱和环时, 环上的氮原子上可以任选地具有胺基保护基。

在另一优选例中, 所述的胺基保护基选自下组:

在另一优选例中, 所述的 5-7 元杂环不是杂芳环。

在另一优选例中, 所述的 5-7 元杂环为饱和杂环, 优选 5-6 元饱和杂环。

在另一优选例中, 所述的 5-7 元杂环仅含有一个或二个杂原子。

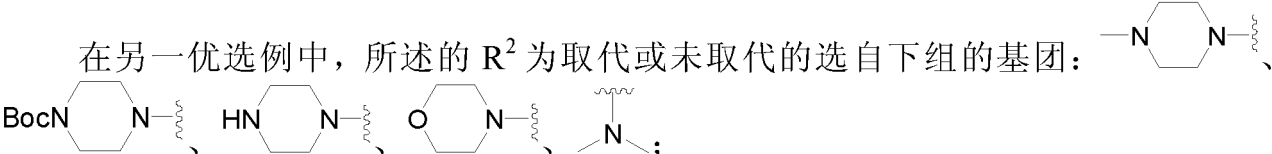
35 在另一优选例中, 所述的 5-7 元杂环中所有的杂原子为 N。

在另一优选例中, R^3 、 R^4 各自独立地选自下组: C1-C4 烷基; 或 R^3 、 R^4 与相

邻的氮原子共同构成取代或未取代的 5-6 元饱和环，其中，所述的 5-6 元饱和环上具有 1 或 2 个氮原子，和任选的 1 个选自下组的杂原子：O。

在另一优选例中， R^3 、 R^4 不同时为 H。

在另一优选例中， R^2 为环状亚胺。

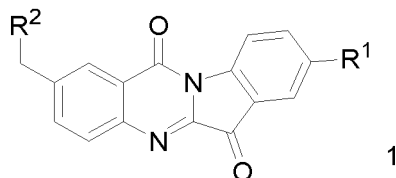
5 在另一优选例中，所述的 R^2 为取代或未取代的选自下组的基团：

其中，“~”表示连接位点；

所述的取代指基团上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基取代：C1-C4 烷基、卤素。

10 在另一优选例中， R^1 为 F。

本发明的第二方面，提供了一种 N-苄基色胺酮类衍生物，所述衍生物的结构通式如下：

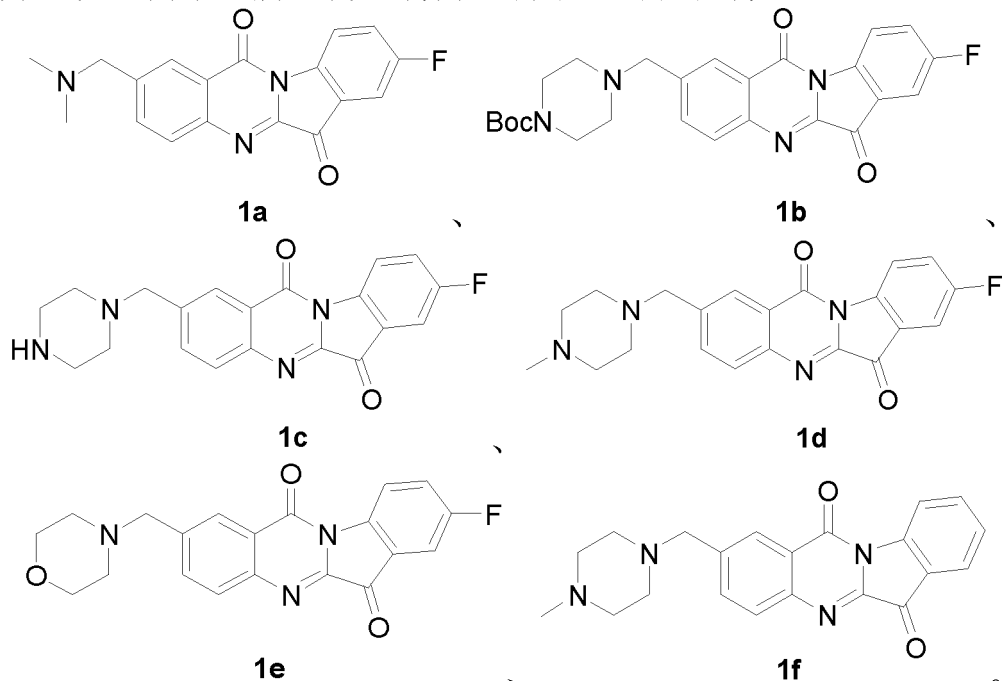


$R^1 = H, F$

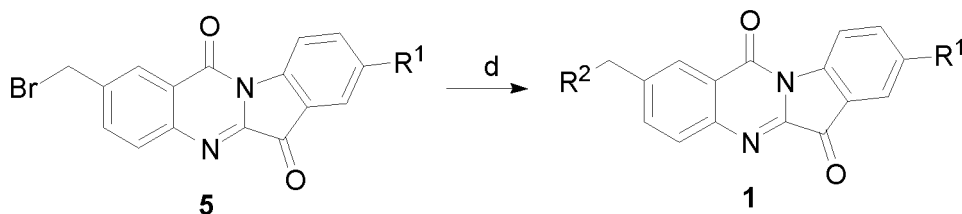


其中：所述取代基 R^2 为环状亚胺或二烷基取代胺， R^1 为氢或氟。

15 在另一优选例中，所述衍生物为选自下组的化合物：



20 本发明的第三方面，提供了一种如本发明第一方面或第二方面所述的 N-苄基色胺酮类衍生物的制备方法，所述方法包括步骤：



(d) 在惰性溶剂中, 在三乙胺存在下, 用式 5 化合物(溴代 2-甲基色胺酮)与 R^2H 反应, 得到式 1 化合物, 式中, R^1 、 R^2 的定义如上。

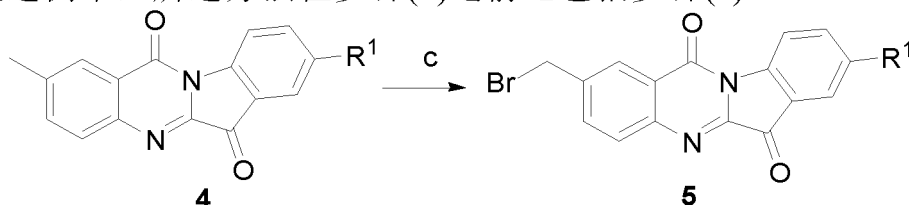
5 在另一优选例中, 在所述步骤(d)中, 所述的惰性溶剂为 DMF, 较佳地为无水 DMF。

在另一优选例中, 在所述步骤(d)中, 所述反应在约 $10\sim 40^\circ\text{C}$ 下进行。

在另一优选例中, 在所述步骤(d)中, 所述反应时间为 0.5-12 小时, 较佳地 1-5 小时。

10 在另一优选例中, 在所述步骤(d)中, 所述的式 5 化合物、 R^2H 和三乙胺的摩尔比为 1: (1-2):(2-5)。

在另一优选例中, 所述方法在步骤(d)之前还包括步骤(c):



15 (c) 在惰性溶剂中, 用式 4 化合物与溴代试剂反应, 得到式 5 化合物; 较佳地, 所述的溴代试剂为 NBS。

在另一优选例中, 所述步骤(c)的反应在引发剂存在下进行, 较佳地在 AIBN 存在下进行。

在另一优选例中, 所述步骤(c)包括: 用 NBS 与 AIBN 混合, 然后与式 4 化合物进行反应。

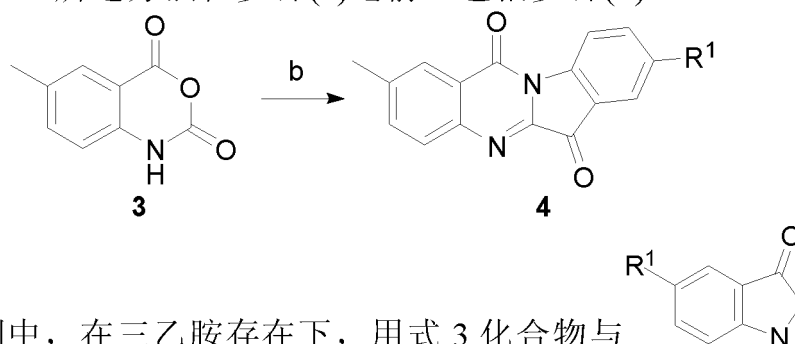
20 在另一优选例中, 步骤(c)中所述的惰性溶剂为二氯甲烷, 较佳地为无水二氯甲烷。

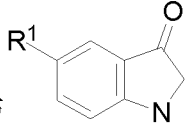
在另一优选例中, 在所述步骤(c)中, 所述反应在 $75\sim 85^\circ\text{C}$ 下进行。

在另一优选例中, 在所述步骤(c)中, 所述反应时间为 15-17 小时。

25 在另一优选例中, 在所述步骤(c)中, 所述反应中, 所述的式 4 化合物、NBS 和 AIBN 的摩尔比为 1: 1:(0.005-0.02)。

在另一优选例中, 所述方法在步骤(c)之前还包括步骤(b):



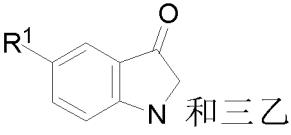
(b) 在惰性溶剂中, 在三乙胺存在下, 用式 3 化合物与  反应, 得

到式 4 化合物。

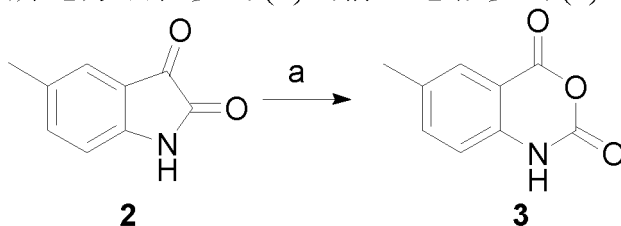
在另一优选例中, 在所述步骤(b)中, 所述的惰性溶剂为甲苯, 较佳地为无水甲苯。

在另一优选例中, 在所述步骤(b)中, 所述反应在 100~120℃ 下进行。

5 在另一优选例中, 在所述步骤(b)中, 所述反应时间为 3.5-4.5 小时。

在另一优选例中, 在所述步骤(b)中, 所述的式 3 化合物、 和三乙胺的摩尔比为(0.2-0.5):(0.2-0.5):1。

在另一优选例中, 所述方法在步骤(b)之前还包括步骤(a):



10 (a) 在惰性溶剂中, 用式 2 化合物与氧化试剂反应, 得到式 3 化合物; 较佳地, 所述的氧化试剂是间-氯过氧苯甲酸。

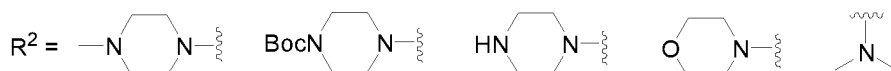
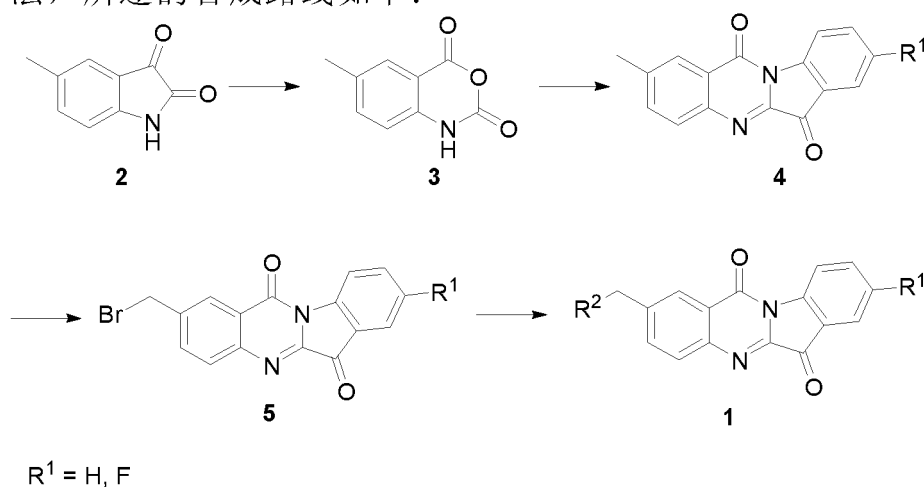
在另一优选例中, 在所述步骤(a)中, 所述的惰性溶剂为二氯甲烷, 较佳地为无水二氯甲烷

15 在另一优选例中, 在所述步骤(a)中, 所述反应在室温(优选为 10~40℃)下进行。

在另一优选例中, 在所述步骤(a)中, 所述反应时间为 1.5-2.5 小时。

在另一优选例中, 在所述步骤(a)中, 所述的式 2 化合物和氧化试剂的摩尔比为(0.5-1):1。

20 本发明的第四方面, 提供了一种如本发明第二方面所述的 N-苄基色胺酮类衍生物的制备方法, 所述的合成路线如下:



具体步骤如下:

(1) 甲基靛红酸酐(3)的合成

5-甲基靛红悬浮于干燥二氯甲烷中，在 0 °C 下分批加入间-氯过氧苯甲酸，在室温下搅拌 1.5-2.5 小时；TLC 检测反应完全后，过滤反应形成的白色固体，用乙酸乙酯洗涤三次，得到 5-甲基靛红酸酐；其中，5-甲基靛红和间-氯过氧苯甲酸摩尔比为：(0.5-1):1；

5 (2) 2-甲基色胺酮(4)的合成

将甲基靛红酸酐、5-氟靛红和三乙胺的混合物悬浮于干燥甲苯中，在 100-120 °C 下加热 3.5-4.5 小时，溶剂在减压条件下蒸去，黄色的固体溶解于二氯甲烷中，再加入乙酸乙酯，形成的黄色固体经过滤用乙酸乙酯洗涤三次，得到 2-甲基色胺酮；其中，甲基靛红酸酐和 5-氟靛红和三乙胺摩尔比为：(0.2-0.5):(0.2-0.5):1；

10 (3) 溴代 2-甲基色胺酮(5)的合成

在 75-85 °C 和氮气保护的条件下，将步骤(2)所得的 2-甲基色胺酮溶解于干燥的二氯甲烷中，然后分批加入 NBS 和 AIBN 的混合物。反应液在 75°C 加热 15-17 小时，TLC 检测反应完全。反应液冷却到室温后经盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到的黄色产物；其中，2-甲基色胺酮和 NBS 和 AIBN 摩尔比为：1:

15 1:(0.005-0.02)；

(4) N-苄基色胺酮(1)的合成

将溴代 2-甲基色胺酮、脂肪胺和三乙胺在干燥 DMF 中于室温下搅拌 1.5-2.5 小时，TLC 检测反应完全后，加入 50 ml 水，再用 10 ml 二氯甲烷萃取三次，合并的二氯甲烷相用水洗三次再用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体用硅胶分离，得到黄色的 N-苄基色胺酮衍生物；其中，溴代 2-甲基色胺酮和脂肪胺和三乙胺摩尔比为：1: (1-2):(2-5)。

本发明的第五方面，提供了一种如本发明第一或第二方面所述的 N-苄基色胺酮衍生物在制备预防和/或治疗具有 IDO 介导的色氨酸代谢紊乱的病理学特征的疾病的药物中的应用。

25 本发明的第六方面，提供了一种如本发明第一或第二方面所述的式 1 化合物或其药学上可接受的盐的用途，用于：

(i) 制备 IDO 抑制剂；

(ii) 制备色氨酸代谢紊乱相关疾病的药物；

(iii) 体外非治疗性地抑制 IDO。

30 在另一优选例中，所述色氨酸代谢紊乱相关疾病选自下组：肿瘤、抑郁症、焦虑症、艾滋病、自身免疫疾病、心理障碍、莱姆病感染、链球菌感染、神经退行性病症(例如阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病)、抑郁症、癌症(包括 T 细胞白血病和结肠癌)、眼部疾病(例如白内障和与年龄相关的黄化)，或自身免疫性疾病。

35 本发明的第七方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物包含(i)如本发明第一或第二方面所述的式 1 化合物，或其药学上可接受的盐；以及(ii)药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的药物组合物用于治疗与色氨酸代谢紊乱相关的疾病。

在另一优选例中，所述色氨酸代谢紊乱相关疾病选自下组：肿瘤、抑郁症、

焦虑症、艾滋病、自身免疫疾病、心理障碍、莱姆病感染、链球菌感染、神经退行性病症(例如阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病)、抑郁症、癌症(包括 T 细胞白血病和结肠癌)、眼部疾病(例如白内障和与年龄相关的黄化),或自身免疫性疾病。

5 本发明的第八方面,提供了一种 IDO 抑制剂,所述的 IDO 抑制剂包含如本发明第一或第二方面所述的式 1 化合物,或其药学上可接受的盐。

本发明的第九方面,提供了一种体外非治疗性地抑制 IDO 活性的方法,所述方法包括步骤:使抑制有效量的如本发明第一或第二方面所述的式 1 化合物,或其药学上可接受的盐与待抑制对象接触。

10 本发明的第十方面,提供了一种制备治疗色氨酸代谢紊乱相关疾病的药物组合物的方法,所述方法包括:将治疗有效量的如本发明第一或第二方面所述的式 1 化合物或其药学上可接受的盐与药学上可接受的载体混合,从而形成药物组合物。

15 本发明的第十一方面,提供了一种治疗色氨酸代谢紊乱相关疾病的方法,所述方法包括:对治疗对象施用治疗有效量的如本发明第一或第二方面所述的式 1 化合物,或其药学上可接受的盐。

20 在另一优选例中,所述色氨酸代谢紊乱相关疾病选自下组:肿瘤、抑郁症、焦虑症、艾滋病、自身免疫疾病、心理障碍、莱姆病感染、链球菌感染、神经退行性病症(例如阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病)、抑郁症、癌症(包括 T 细胞白血病和结肠癌)、眼部疾病(例如白内障和与年龄相关的黄化),或自身免疫性疾病。

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。

25

具体实施方式

30 本发明人经过长期而深入的研究,意外地发现,具有如式 1 所示结构的一类 N-苄基色胺酮类衍生物具有相当优异的 IDO 抑制活性,所述化合物与一些和其结构非常相近的 N-苄基色胺酮类衍生物相比,IDO 抑制活性(IC₅₀)居然有极其显著的改善(IC₅₀ 值可降低 1-3 个数量级),因此具有很好的应用前景。基于上述发现,发明人完成了本发明。

术语

35 除特别说明之处,本发明的所有化合物均包括所有光学异构体或互变异构体形式。

术语“C1~C4 烷基”指具有 1~4 个碳原子的直链或支链烷基,例如甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、或类似基团。

术语“C2~C4 烯基”指具有 2~4 个碳原子的直链或支链烯基,例如乙烯基、丙烯基、丁烯基、或类似基团。

术语“C2~C4 炔基”指具有 2~4 个碳原子的直链或支链炔基，例如乙炔基、丙炔基、丁炔基、或类似基团。

术语“5-7 元杂环”指具有 5 至 7 元的单环，所述的环不具有完全共轭的 π 电子系统。特别地，在本发明中，所述的环上可以任意地具有 1-3 个杂原子，所述的杂原子包括 O 或 N。代表性的饱和环例子包括：哌嗪基、吗啡啉基等。

除非特别说明，术语“取代”指基团上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基进行取代：C1-C4 烷基、C1-C4 卤代烷基、胺基保护基（如叔丁氧羰基）、卤素。

术语“卤素”指 F、Cl、Br 和 I。

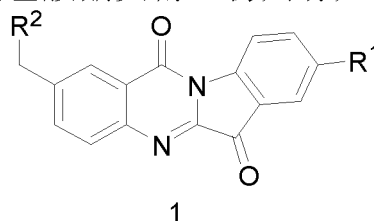
N-苄基色胺酮类衍生物

色胺酮为吲哚喹啉类生物碱，其化学名称为吲哚[2,1-b]喹啉-6, 12-二酮。色胺酮是一种黄色针状结晶，主要存在于马蓝、蓼蓝、菰蓝等产蓝植物中。另外，也可以从微生物的发酵液中提取。

虽然从产蓝植物及微生物的代谢产物中可提取色胺酮，但其分离过程长、提取率低，难以满足研究和临床用药的需求。只有通过探索耗时短、收率高、简便易得的人工合成途径才能为色胺酮的应用提供更多的资源，使其进一步的开发和应用成为可能。

为了克服现有技术的不足，本发明对色胺酮进行了结构改造，以改善色胺酮的溶解性能和药理活性，目的在于获得有应用价值的活性化合物。本发明的研究和药理试验表明，在色胺酮分子中引入水溶性基团而形成的 N-苄基色胺酮衍生物可以作为更高效的 IDO 抑制剂，其具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性，有广阔的应用前景。此外，相比已有的色胺酮衍生物合成方法而言，本发明的合成方法具有操作简单、条件温和、收率高等优点，更易于工业化生产。

具体地，本发明的 N-苄基色胺酮类衍生物具有如下式 1 所示的结构通式：



式中

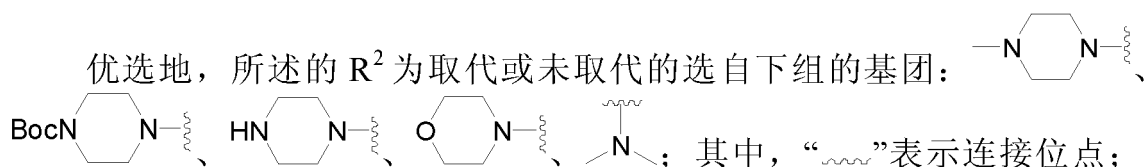
R^1 为氢或氟；

R^2 为 $-NR^3R^4$ ；

所述的 R^3 、 R^4 各自独立地选自下组：C1-C4 烷基；或 R^3 、 R^4 与相邻的氮原子共同构成取代或未取代的 5-6 元饱和环，其中，所述的 5-6 元饱和环上具有至少一个氮原子，和任选的 1-2 个选自下组的杂原子：O、N；

所述的取代指基团上的一个或多个氢原子(优选为氮原子上的氢原子)被选自下组的取代基取代：C1-C4 烷基、叔丁氧羰基、卤素。

优选地，所述的 R^2 上具有 1 个氮原子，以及 1 个选自下组的杂原子：O、N。

优选地, 所述的 R^2 为取代或未取代的选自下组的基团: ; 其中, “~”表示连接位点;

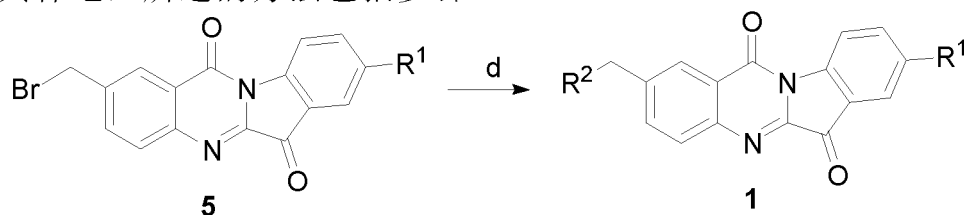
所述的取代指基团上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基取代: C1-C4 烷基、卤素。

- 5 本发明所述的化合物、其互变异构形式、其结构类似物或其药物可接受的盐, 以及含有至少一种该化合物、其结构类似物或其药物可接受的盐的组合物均可以用于抑制 IDO, 以及在治疗和/或预防具有 IDO 介导的色氨酸代谢途径的病理学特征的疾病中的用途。这样的疾病包括但不限于, 肿瘤、癌症、眼部疾病、自身免疫性疾病、心理障碍、抑郁症和焦虑症。所述用途包括体内和体外应用, 以及在
- 10 制备药物、IDO 抑制剂和药物组合物中的用途。特别地, 本发明人发现, 在一种特别优选的实施例中, 当 R^1 为 F 时, 所述的化合物具有最佳的 IDO 抑制活性。

N-苄基色胺酮类衍生物的制备

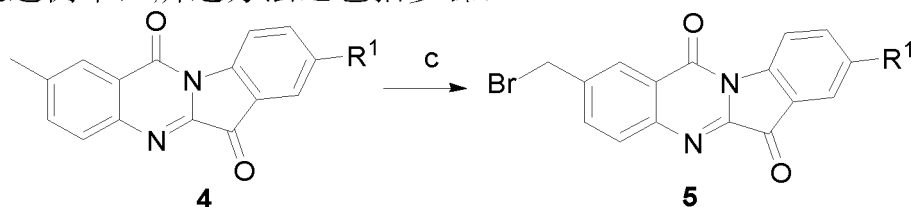
- 近年来, 药物化学家一直致力于色胺酮及其衍生物的合成研究, 合成色胺酮
- 15 的主要方法是吡啶酮与靛红酸酐反应, 该方法简单收率高、反应条件温和。另外, 可以在吡啶酮与靛红酸酐两种原料母体上引入功能化基团, 可以合成各种功能化色胺酮。目前, 合成吡啶酮最主要的方法是利用水合三氯乙醛、羟胺和苯胺在盐酸水溶液中反应生成脒类化合物, 然后在浓硫酸作用下闭环得到吡啶酮, 该方法非常适用于合成含卤素和烷基的色胺酮, 收率也较高。但该方法难以合成含活性
- 20 基团的色胺酮, 这是由于在合成吡啶酮的过程中, 这些基团易于发生多种副反应。

本发明人经过长期的研究, 成功得到了一种制备具有活性基团的色胺酮的合成方法。具体地, 所述的方法包括步骤:



- (d) 在惰性溶剂中, 在三乙胺存在下, 用式 5 化合物(溴代 2-甲基色胺酮)与
- 25 R^2H 反应, 得到式 1 化合物。

在另一优选例中, 所述方法还包括步骤:

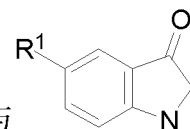
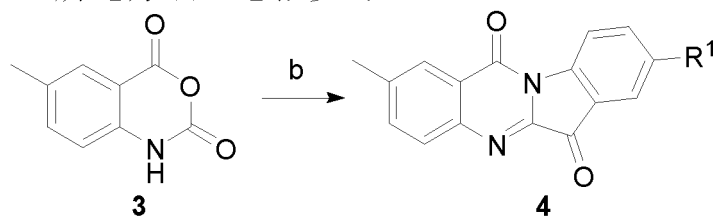


(c) 在惰性溶剂中, 用式 4 化合物(2-甲基色胺酮)与溴代试剂反应, 得到式 5 化合物; 较佳地, 所述的溴代试剂为 NBS。

- 30 在本发明的一个优选实施例中, 所述的溴代反应在引发剂, 例如 AIBN 存在下进行。优选的实施方式包括: 用 NBS 与 AIBN 混合, 然后与式 4 化合物进行反

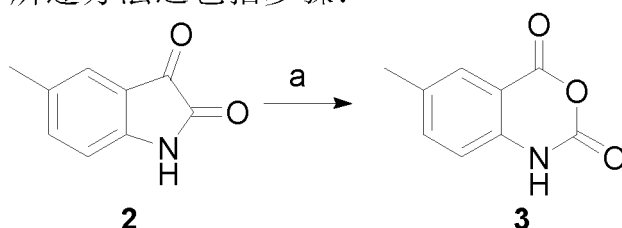
应。

在另一优选例中，所述方法还包括步骤：



(b) 在惰性溶剂中，在三乙胺存在下，用式 3 化合物与
5 到式 4 化合物。

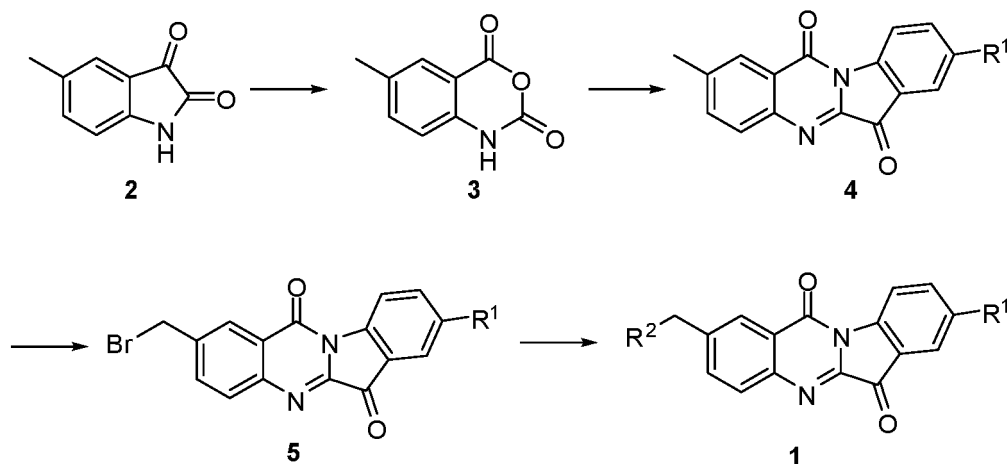
在另一优选例中，所述方法还包括步骤：



(a) 在惰性溶剂中，用式 2 化合物与氧化试剂反应，得到式 3 化合物；较佳地，所述的氧化试剂是间-氯过氧苯甲酸。

10 上述各步骤的反应时间，反应温度等可以根据实际情况加以调整，例如采用本领域常用的方法(如 TLC 法)确定反应终点。各步骤的溶剂没有特别的限制，可以选用本领域常用的，不与反应物发生反应的惰性溶剂。应理解，在本申请公开了上述反应路线后，各步骤的具体条件是本领域技术人员结合现有技术中的知识可以确定的。

15 本发明的 N-苄基色胺酮类衍生物的制备方法中，一种最佳的合成路线如下：



(1)甲基靛红酸酐(3)的合成

5-甲基靛红悬浮于干燥二氯甲烷中，在 0 °C 下分批加入间-氯过氧苯甲酸，在室温下搅拌 1.5-2.5 小时；TLC 检测反应完全后，过滤反应形成的白色固体，用乙酸乙酯洗涤三次，得到 5-甲基靛红酸酐；其中，5-甲基靛红和间-氯过氧苯甲酸摩尔比为：0.5-1:1。

(2)2-甲基色胺酮(4)的合成

将甲基靛红酸酐、5-氟靛红和三乙胺的混合物悬浮于干燥甲苯中，在 100-120 °C 下加热 3.5-4.5 小时，溶剂在减压条件下蒸去，黄色的固体溶解于二氯甲烷中，再加入乙酸乙酯，形成的黄色固体经过滤用乙酸乙酯洗涤三次，得到 2-甲基色胺酮；其中，甲基靛红酸酐和 5-氟靛红和三乙胺摩尔比为：0.2-0.5:0.2-0.5:1。

5 (3)溴代 2-甲基色胺酮(5)的合成

在 75-85 °C 和氮气保护的条件下，将步骤(2)所得的 2-甲基色胺酮溶解于干燥的二氯甲烷中，然后分批加入 NBS 和 AIBN 的混合物。反应液在 75°C 加热 15-17 小时，TLC 检测反应完全。反应液冷却到室温后经盐水洗涤，无水硫酸钠干燥，浓缩得到的黄色产物；其中，2-甲基色胺酮和 NBS 和 AIBN 摩尔比为：1:1:0.005-0.02。

10 (4)N-苄基色胺酮(1)的合成

将溴代 2-甲基色胺酮、脂肪胺和三乙胺在干燥 DMF 中于室温下搅拌 1.5-2.5 小时，TLC 检测反应完全后，加入 50 ml 水，再用 10 ml 二氯甲烷萃取三次，合并的二氯甲烷相用水洗三次再用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体用硅胶分离，得到黄色的 N-苄基色胺酮衍生物。其中，溴代 2-甲基色胺酮和脂肪胺和三乙胺摩尔比为：1:1-2:2-5。

上述各式中，各基团的定义如上文所述。

IDO 抑制剂及其用途

20 由于本发明的 N-苄基色胺酮衍生物具有十分优异的 IDO 抑制活性，因此可以用于制备预防和/或治疗具有 IDO 介导的色氨酸代谢紊乱的病理学特征的疾病的药物(如肿瘤等)。

所述的色氨酸代谢紊乱疾病可以是任何本领域已知或未知的具有 IDO 介导的色氨酸代谢紊乱的病理学特征的疾病，优选地，所述色氨酸代谢紊乱相关疾病选自下组：肿瘤、抑郁症、焦虑症、艾滋病、自身免疫疾病、心理障碍、莱姆病感染、链球菌感染、神经退行性病症(例如阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病)、抑郁症、癌症(包括 T 细胞白血病和结肠癌)、眼部疾病(例如白内障和与年龄相关的黄化)，或自身免疫性疾病。

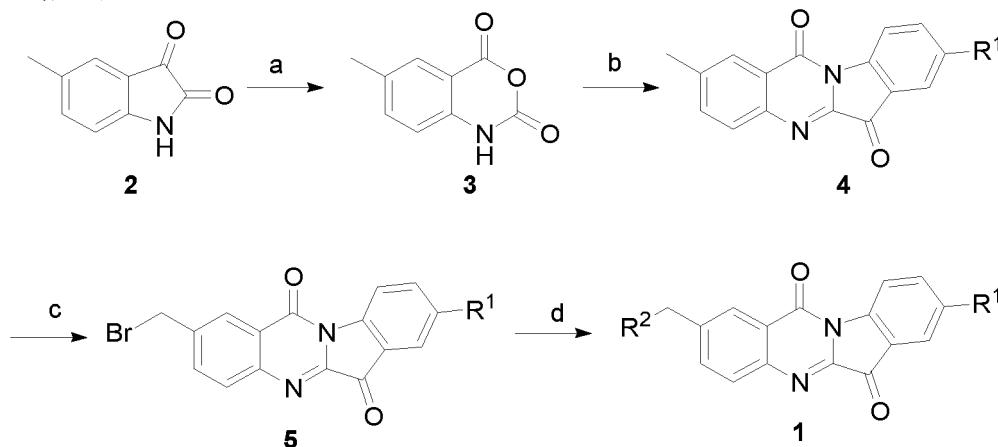
30 与现有技术相比，本发明的主要优点包括：

(1) 本发明提供了一类结构新颖的 IDO 抑制剂，与结构接近的化合物相比，该类抑制剂具有令人意外的活性改善。所述化合物既具有 IDO 抑制活性，同时也可以作为进一步修饰的药物中间体，具有开发成新的治疗癌症药物的潜在应用价值。

35 (2) 本发明还提供了一类合成的 N-苄基色胺酮衍生物的方法，该合成路线具有操作简便、反应条件温和、节省溶剂、减少污染等优点，便于工业化生产。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施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。如无特别说明, 以下实施例中所涉及到的试剂或原料均为市售。具体合成路线如下:



5 各步骤反应条件:

步骤 a. m-CPBA (2 eq.), CH_2Cl_2 , RT;

步骤 b. Et_3N , 甲苯, 回流, 75%;

步骤 c. NBS, AIBN, CH_2Cl_2 , 回流;

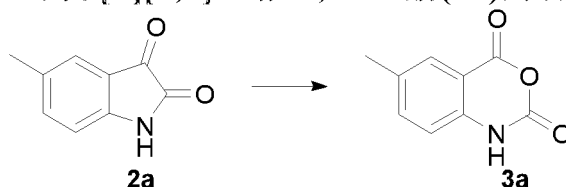
步骤 d. K_2CO_3 , KI, DMF, 胺。

10

实施例 1 2-((二甲基氨基)甲基)-8-氟咪唑并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(1a)的合成

具体步骤如下:

步骤(1)、6-甲基-1H-苯并[d][1,3]恶嗪-1,4-二酮(3a)的合成

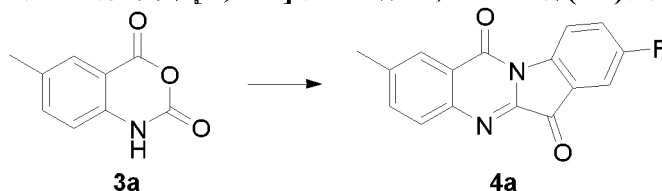


15

化合物 2a (500 mg, 3 mmol) 悬浮于 10 ml 的干燥二氯甲烷中, 在 0°C 下分批加入间-氯过氧苯甲酸 (1.3 g, 6 mmol, 75%)。在室温条件下搅拌 2 小时后。TLC 检测反应完全后, 过滤反应形成的白色固体, 然后用 10 ml 乙酸乙酯洗涤三次后, 得到化合物 3a (350 mg, 65%)。

20

步骤(2)、8-氟-2-甲基咪唑并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(4a)的合成



25

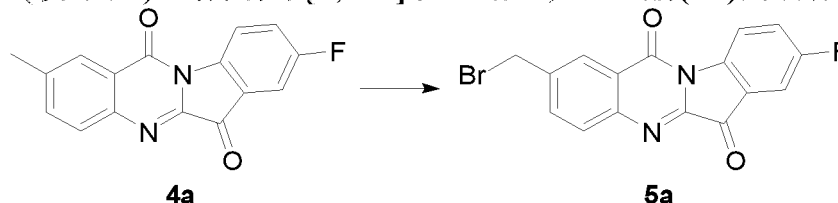
化合物 3a (1 g, 5.6 mmol), 5-氟靛红 (0.93 g, 5.6 mmol)和三乙胺 (1.5 ml, 11.2 mmol)的混合物悬浮于干燥的甲苯(10 ml)中, 在 110°C 下加热 4 小时。减压蒸去溶剂, 所获黄色固体溶于 2 ml 的二氯甲烷中, 然后再加入 2 ml 乙酸乙酯, 形成黄色固体经过滤, 用 2 ml 乙酸乙酯洗涤三次, 得到黄色固体化合物 4a (1.1 g,

75%)。

表征数据:

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.50 (dd, $J = 8.8, 4.2$ Hz, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.86 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.82 – 7.76 (m, 1H), 7.76 – 7.67 (m, 1H), 7.44 – 7.37 (m, 1H), 2.53 (s, 3H).

步骤(3)、2-(溴甲基)-8-氟吲哚[2,1-b]喹啉-6,12-二酮(5a)的合成

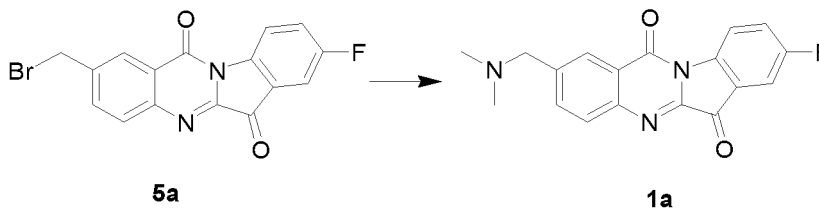


在 80°C 和氮气保护的条件下, 向化合物 **4a** (500 mg, 1.78 mmol) 的二氯甲烷(3.6 ml)溶液中分三批加入 NBS (381 mg, 2.14 mmol) 和 AIBN (29 mg, 0.18 mmol) 的混合物。反应液在 80°C 加热 16 小时。TLC 检测反应完全, 反应液冷至室温, 盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得到黄色产物 **5a**。

表征数据:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.66 (dd, $J = 8.8, 4.0$ Hz, 1H), 8.45 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.04 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J = 6.5, 2.6$ Hz, 1H), 7.52 (td, $J = 8.6, 2.7$ Hz, 1H), 4.65 (s, 2H)。

步骤(4)、2-((二甲基氨基)甲基)-8-氟吲哚并[2,1-b]喹啉-6,12-二酮(1a)的合成



化合物 **5a** (500 mg, 1.39 mmol), 盐酸二甲胺(Dimethylamine hydrochloride) (227mg, 2.78mmol), 碘化钾(10mg)和三乙胺(0.5ml)在 5ml 的 DMF 中在室温搅拌 2 小时。TLC 检测反应完全后, 加入 50 ml 水, 用 10 ml 乙酸乙酯萃取三次后, 合并的有机相用水洗三次, 再用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体用硅胶柱分离后得到黄色的化合物 **1a**。

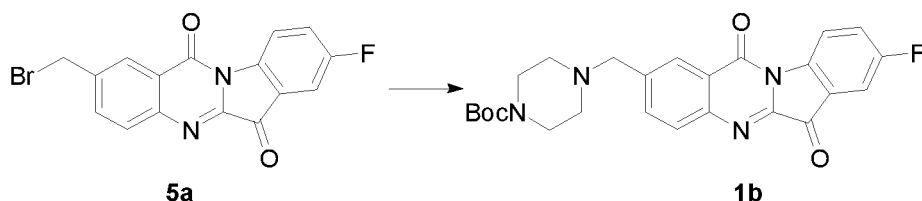
表征数据:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.63 (dd, $J = 8.8, 4.1$ Hz, 1H), 8.33 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.87 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.58 (dd, $J = 6.5, 2.6$ Hz, 1H), 7.48 (td, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 3.61 (s, 2H), 2.30 (s, 6H)。

实施例 2 4-((8-氟-6,12-二氧代-6,12-二羟基吲哚并[2,1-b]喹啉-2-基)甲基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1b)的合成

步骤(1)-步骤(3)同实施例 1。

步骤(4): 4-((8-氟-6,12-二氧代-6,12-二羟基吲哚并[2,1-b]喹啉-2-基)甲基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯(1b)的合成

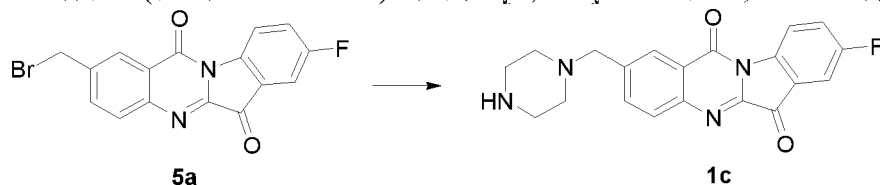


化合物 **5a** (500 mg, 1.39 mmol), N-Boc 哌嗪(N-Bocpiperazine) (546 mg, 2.78 mmol), 碘化钾 (10 mg)和三乙胺 (0.5 ml) 在 5 ml 的 DMF 中, 于室温下搅拌 2 小时。TLC 检测反应完全后, 加入 50 ml 水, 用 10 ml 乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相用水洗三次, 再用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体用硅胶柱分离后得到黄色化合物 **1b**。

表征数据:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.66 (dd, $J = 8.8, 4.0$ Hz, 1H), 8.39 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 6.5, 2.6$ Hz, 1H), 7.51 (td, $J = 8.6, 2.7$ Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.47 (m, 4H), 2.46 (m, 4H), 1.48 (s, 9H)。

实施例 3 8-氟-2-(哌嗪-1-基甲基)咪唑并[2,1-b]喹啉-6,12-二酮(**1c**)的合成



步骤(1)-步骤(3)同实施例 1。

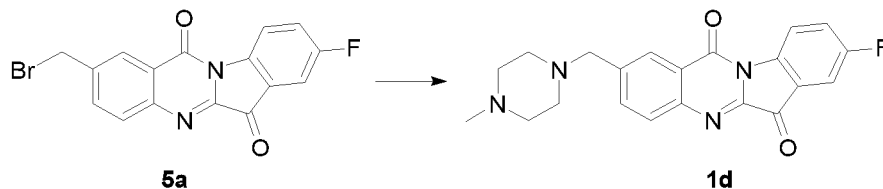
步骤(4): 8-氟-2-(哌嗪-1-基甲基)咪唑并[2,1-b]喹啉-6,12-二酮(**1c**)的合成

化合物 **5a** (500 mg, 1.39 mmol), N-叔丁氧羰基哌嗪(N-Bocpiperazine) (546 mg, 2.78 mmol), 碘化钾 (10 mg)和三乙胺 (0.5 ml) 在 5 ml 的 DMF 中于室温搅拌 2 小时。TLC 检测反应完全后, 加入 50 ml 水, 用 10 ml 乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相用水洗三次, 再用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体。将黄色固体溶解于 3 毫升的二氯甲烷中, 在室温条件下加入三氟乙酸 1 毫升。反应液在室温搅拌 1 小时后, TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=10/1$, R_f 0.2) 检测反应完全后, 溶剂在减压条件下去除, 加入保护 NaHCO_3 溶液 10 毫升, 用乙酸乙酯 (10 ml $\times$ 3)萃取后, 有机相用盐水洗涤, 干燥, 然后浓缩得到固体用硅胶柱分离得到黄色固体化合物 **1c**。

表征数据:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.65 (dd, $J = 8.8, 4.0$ Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.89 (dd, $J = 8.3, 1.6$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 6.5, 2.6$ Hz, 1H), 7.50 (td, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.51 – 3.44 (m, 4H), 2.46 (s, 4H)。

实施例 4: 8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]喹啉-6,12-二酮(**1d**)的合成



步骤(1)-步骤(3)同实施例 1。

步骤(4): 8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(1d)的合成

化合物 5a (220 mg, 0.61 mmol), N-甲基哌嗪(N-Methylpiperazine) (122 mg, 1.22 mmol), 碘化钾 (10 mg)和三乙胺 (0.5 ml) 在 5 ml 的 DMF 中在室温搅拌 2 小时。TLC 检测反应完全后, 加入 50 ml 水, 用 10 ml 乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相用水洗三次, 再用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体用硅胶柱分离后得到黄色化合物 1d。

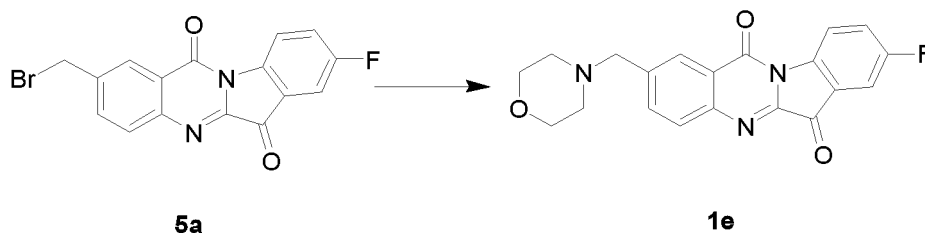
表征数据:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.65 (dd, $J = 8.8, 4.0$ Hz, 1H), 8.38 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.87 (dd, $J = 8.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 6.5, 2.6$ Hz, 1H), 7.50 (td, $J = 8.7, 2.7$ Hz, 1H), 3.50 (s, 2H), 2.59 (s, 8H), 2.38 (s, 3H)。

实施例 5 8-氟-2-((吗啡啉-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]喹唑啉-6, 12-二酮(1e)的合成

步骤(1)-步骤(3)同实施例 1。

步骤(4): 8-氟-2-((吗啡啉-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]喹唑啉-6, 12-二酮(1e)的合成



化合物 5a (500 mg, 1.39 mmol), 吗啡啉 (242 mg, 2.78 mmol), 碘化钾 (10 mg) 和三乙胺 (0.5 ml) 在 5 ml DMF 中在室温搅拌 2 小时。TLC (EtOAc, R_f 0.5) 检测反应完全后, 加入 50 ml 水, 用 10 ml 乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相水洗三次, 用无水硫酸钠干燥, 浓缩得到黄色固体用硅胶柱 (EtOAc) 分离后得到黄色化合物 1e。

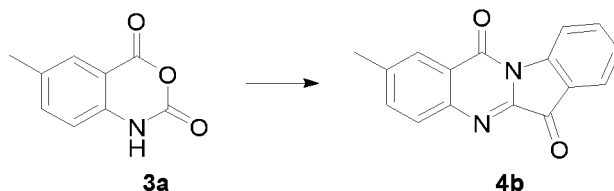
表征数据:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.66 (dd, $J = 8.8, 4.1$ Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.90 (dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J = 6.5, 2.7$ Hz, 1H), 7.51 (td, $J = 8.6, 2.7$ Hz, 1H), 3.79 – 3.73 (m, 4H), 3.70 (s, 2H), 2.52 (s, 4H)。

实施例 6 2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(1f)的合成

步骤(1)同实施例 1,

步骤(2)、2-甲基咪唑[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(4b)的合成

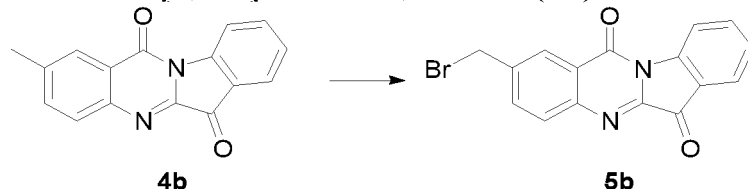


化合物 **3a** (1.7 g, 9.6 mmol), 靛红 (1.4 g, 9.6 mmol) 和三乙胺 (2.7 ml, 19.2 mmol) 的混合物悬浮于干燥的甲苯(18 ml)中, 在 110 °C 下加热 4 小时。反应液冷至室温后, 形成的黄色固体经过滤, 用 2 ml 乙酸乙酯洗涤三次, 得到黄色固体化合物 **4b** (0.5 g, 20%)。

表征数据:

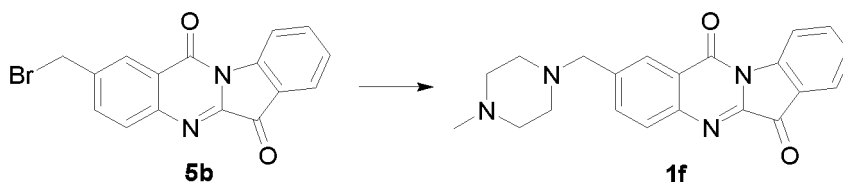
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.94 (dd, *J* = 7.8, 5.0 Hz, 2H), 7.85 – 7.75 (m, 1H), 7.71 – 7.64 (m, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.58 (s, 3H)。

步骤(3)、2-甲基咪唑[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(**5b**)的合成



在 80 °C 和氮气保护的条件下, 向化合物 **4b** (262 mg, 1.0 mmol) 的二氯甲烷 (5 ml) 溶液中分三批加入 NBS (381 mg, 2.14 mmol) 和 AIBN (29 mg, 0.18 mmol) 的混合物。反应液冷却到室温, 盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩后得到的黄色产物 **5b** (245 mg, 91%)。

步骤(4)、2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(**1f**)的合成



化合物 **5b** (220 mg, 0.61 mmol), N-甲基哌啶 (116 mg, 1.616 mmol), 碘化钾 (10 mg) 和三乙胺 (0.5 ml) 在 5 ml DMF 中于室温下搅拌 2 小时。TLC 检测反应完全后, 加入 50 ml 水, 用 10ml 乙酸乙酯萃取三次, 合并有机相用水洗三次, 用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体用硅胶柱分离得到黄色化合物 **1f** (120 mg, 55%)。

表征数据:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.66 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.94 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.89 (dd, *J* = 8.2, 1.7 Hz, 1H), 7.82 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 2.71 – 2.41 (m, 8H), 2.33 (s, 3H)。

实施例 7 IDO 抑制活性检测

含人 IDO 基因的质粒的构建、在大肠杆菌中的表达、提取及纯化均按 Littlejohn 等报道的方法进行(Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, et al. *J.*

Biol. Chem. 1988, 263, 2041-2048)。各化合物对 IDO 的抑制活性按文献介绍的方法检测。在 96 孔板上将 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5), 40 mM 维生素 C, 400 $\mu\text{g/ml}$ 过氧化氢酶, 20 μM 亚甲基蓝和 IDO 酶混合。向上述混合液内加入底物 L-色氨酸和待测样品。反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 60 分钟, 加入 30% (w/v) 三氯乙酸使反应终止。96 孔板在 65 $^{\circ}\text{C}$ 下加热 15 分钟, 使之完成从甲酰犬尿氨酸到犬尿氨酸的转化, 然后 6000g 旋转 5 分钟。每孔取出 100 μl 上清液转移到新的 96 孔板内, 加入 2% (w/v) 对-(二甲基氨基) 苯甲醛的乙酸溶液, 犬尿氨酸与之反应产成的黄颜色可使用酶标仪在 490 nm 观测, 实验结果如表 1 所示。

10

实施例 8 是否为可逆抑制剂的判定

在固定抑制剂浓度的情况下, 用一系列不同浓度的酶与抑制剂反应并测定反应速度。以反应速度对酶浓度 ($v \sim [E]$) 作图, 根据曲线的特征可以判定是否是可逆抑制剂。

15 反应条件: 在 500 μl 的反应体系中, 先加入 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5), 40 mM 维生素 C, 400 $\mu\text{g/ml}$ 过氧化氢酶, 20 μM 亚甲基蓝, 300 mM 底物 L-色氨酸或同时加入 100 mM 抑制剂, 混合液 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟, 再向上述混合液内分别加入不同体积的 IDO 酶, 反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 30 分钟, 加入 30% (w/v) 三氯乙酸 200 μl 使反应终止, 反应体系在 65 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 分钟, 使之完成从甲酰犬尿氨酸到犬尿氨酸的转化, 然后 12000 rpm 旋转 10 分钟, 取上清与等体积 2% (w/v) 对-二甲氨基苯甲醛的乙酸溶液混合, 用酶标仪检测 490 nm 波长读数。以 $v \sim [E]$ 作图, 实验结果如表 1 所示。

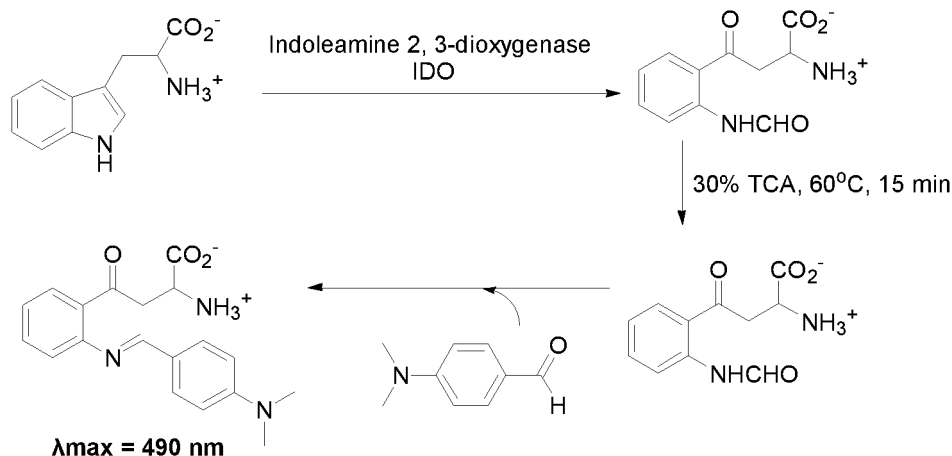
实施例 9 抑制剂类型判断及 K_i 值测定

25 在 500 μl 的反应体系中, 先加入 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5), 40 mM 维生素 C, 400 $\mu\text{g/ml}$ 过氧化氢酶, 20 μM 亚甲基蓝, 分别加入 100、250、300 mM 底物 L-色氨酸, 在一个底物浓度下, 向各管反应体系中分别加入不同浓度的化合物, 混合液 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟, 再向上述混合液内加入 10 μl IDO (约 20 nM), 反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 30 分钟, 加入 30% (w/v) 三氯乙酸 200 μl 使反应终止, 反应体系在 30 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 15 分钟, 使之完成从甲酰犬尿氨酸到犬尿氨酸的转化, 然后 12000 rpm 离心 10 分钟, 取上清与等体积 2% (w/v) 对-二甲氨基苯甲醛的乙酸溶液混匀反应, 用酶标仪检测 490nm 波长读数。以 Dixon 作图法 ($1/v \sim [I]$) 判定化合物的抑制剂类型, 以 $S/v \sim [I]$ 作图, 得到抑制剂的 K_i 值, 实验结果如表 1 所示。

35 实施例 10 半数有效抑制浓度 IC_{50} 的测定

先将 50 mM 磷酸钾缓冲液 (pH 6.5), 40 mM 维生素 C, 400 $\mu\text{g/ml}$ 过氧化氢酶, 20 μM 亚甲基蓝, 底物 L-色氨酸 150 mM 和抑制剂混合。抑制剂浓度选用 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 μM 混合液 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟, 再向上述混合液内加入 IDO 酶。反应在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行 30 分钟, 加入 30% (w/v) 三氯乙酸 200 μl 使反

应终止，反应体系在 65℃加热 15 分钟，使之完成从甲酰犬尿氨酸到犬尿氨酸的转化，然后 12000 rpm 旋转 10 分钟，取 200 μl 上清与等体积 2%(w/v)对-二甲氨基苯甲醛的乙酸溶液混合，犬尿氨酸与之反应产生的黄颜色可使用酶标仪在 490 nm 检测，所得结果利用 IC₅₀ 计算软件计算,得到抑制剂的 IC₅₀ 值，实验结果如表 1 所示。



实施例 11 半数有效抑制浓度 IC₅₀(细胞)的测定

利用脂质体 Lipofectamin 2000 介导质粒 pcDNA3.1-hIDO 瞬转 HEK 293 细胞。在细胞水平抑制剂活性测定时，HEK293 细胞培养基为高糖 DMEM，含 50 U/mL 青霉素，50 U/mL 链霉素，10% FBS，37℃，5%CO₂ 培养。细胞转染质粒 24 h 后，加入待测药物，孵育一段时间后，取上清到另一 96 孔板中，加入 10 μL 30%(w/v)三氯乙酸，在 65℃加热 15 min 使之完成甲酰犬尿氨酸向犬尿氨酸的转化，然后 12000 rpm 离心 10 min，取等体积 2%(w/v)对二甲氨基苯甲醛的乙酸溶液混合显色，最后采用酶标仪在 490 nm 下检测吸光值，实验结果如表 1 所示。

利用上述实施例 7-11 的方法，对实施例 1-6 制备的化合物的 IDO 抑制活性进行测定，并用目前体内、外实验中通用的 IDO 抑制剂 1-甲基色氨酸(1-MT，市售)作为对照物，测定结果如表 1 所示。

表 1 上述实施例中合成的 N-苄基色胺酮衍生物(I)的 IDO 抑制活性

化合物	抑制类型	K _i (μM)	IC ₅₀ (μM) (体外)	IC ₅₀ (μM) (细胞)
1-MT	竞争性	34	380	18.4
实施例 1	反竞争性	0.31	0.11	1.01×10 ⁻³
实施例 2	反竞争性	7.21	1.88	0.64
实施例 3	非竞争性	4.12	0.68	7.38×10 ⁻²
实施例 4	反竞争性	2.64	0.50	2.24×10 ⁻²
实施例 5	反竞争性	0.47	0.40	1.21×10 ⁻³
实施例 6	反竞争性	5.97	2.52	0.97

实施例 12 T 细胞增殖实验**12.1 脾脏淋巴细胞分离(按照小鼠淋巴细胞分离液说明操作):**

1. 断颈处死 2 只小鼠, 在超净台中取出脾脏, 放在装有 RP1640 培养基的 6 cm 板中待用。

2. 在 50 mL 离心管中放入 100 μ m 筛网, 脾脏用剪刀剪碎, 在筛网上研磨, 加少量 RP1640 可起到保护作用。

3. 加入研磨液 2 倍体积的淋巴细胞分离液。

4. 800g 水平离心 20 min, 离心结束可看到液体分 3 层, 中间层略带黄色。

5. 吸取中间层细胞, 加入 RP1640 培养基, 颠倒洗涤。室温, 250 g 离心 10 min 收集细胞。

6. 吸去培养基, 用 RP1640 培养基重悬细胞, 细胞计数。

12.2 LLC(Lewis lung carcinoma, Lewis 肺癌)细胞处理:

1. 吸去培养基(高糖 DMEM, 10% FBS), PBS 洗 1-2 次;

2. 加入 0.25% 胰酶消化;

3. 吸去胰酶, 加入培养基, 将细胞吹打下来, 转移至 1.5 mL 离心管中;

4. 离心, 吸去上清, 加入 1 mL DMEM 培养基重新悬浮细胞;

5. 加入丝裂霉素 C(终浓度 25 μ g/mL), 吹打混匀, 37 $^{\circ}$ C, 水浴 30 min;

6. RP1640 洗 3 次, 细胞计数, 待用。

12.3 实验步骤

1. 将处理过的 LLC 细胞 2×10^4 个/孔(刺激细胞), 脾脏淋巴细胞 10^5 个/孔(反应细胞), 加入 96 孔板, 加入 RP1640 (10%FBS), 补齐至 200 μ L;

2. 分组, 给药组加入 50 μ M IDO 抑制剂, 置于 37 $^{\circ}$ C、湿度 95%、5% CO₂ 的培养箱中培养, 培养 72 h;

3. WST-1 试剂盒测定 T 细胞增殖情况, 酶标仪测定 450 nm 波长处吸光度值;

4. 计算 T 淋巴细胞增殖率:

T 淋巴细胞增殖率(%) = [给药孔(T 淋巴细胞+ LLC 细胞+IDO 抑制剂) OD 值 - 对照孔(T 淋巴细胞+ LLC 细胞)OD 值]/对照孔(T 淋巴细胞+ LLC 细胞)OD 值 $\times 100\%$

12.4 实验结果

表 2 上述实施例中合成的 N-苄基色胺酮衍生物(I)刺激 T 细胞增殖的作用

	1-MT	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5	实施例 6
T 细胞增殖率	4.88%	38.48	40.64	41.24	50.27	39.40	13.84

实施例 13 8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮(实施例 4)抗肿瘤作用

1. LLC Lewis 肿瘤模型建立: 健康雌性 C57BL/6 小鼠, 体重 20 ± 1 g, 购自上海斯莱克动物实验中心, SPF 级实验室喂养。用无菌生理盐水将 Lewis 肺癌细胞浓度为 1×10^7 /mL 细胞悬液。在无菌操作下在小鼠腋下皮下注射, 每只接种 0.2 mL。

2. 实验分组及预防给药: 小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只。对照组给以等量

0.5%羧甲基纤维素钠，灌胃给药；1-甲基色氨酸(1-MT)高剂量组为 150 mg/kg，低剂量组为 75 mg/kg，灌胃给药；8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮高剂量组为 150 mg/kg，低剂量组为 75 mg/kg，灌胃给药。连续给药 7 天后接种肿瘤，之后继续给药 21 天并观察肿瘤生长情况。从接瘤当天开始测量肿瘤长径(a)和短径(b)，每隔一天测量一次，肿瘤体积 $=ab^2/2$ 。停药后次日断颈处死小鼠，剥瘤称重，液氮保存。

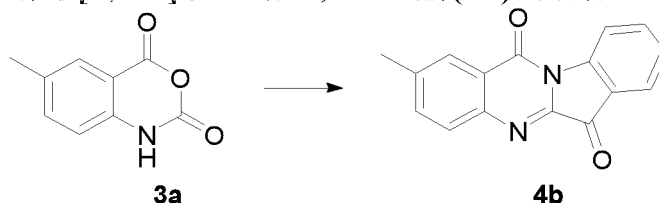
3. 预防给药治疗结果：小鼠经预防给药一周及接种后继续给药治疗，给与 8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮组的小鼠体内 Lewis 肺癌肿瘤的生长明显受到抑制，高剂量给药开始后第 20 天依然没有明显的肿瘤生成，而对照组于给药后第 11 天发现肿瘤，1-MT 组于给药后第 13 天发生肿瘤。从肿瘤体积角度看，8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮和 1-MT 高剂量给药的肿瘤抑制率分别为 62.15%和 32.35%，低剂量给药的肿瘤抑制率分别为 46.62%和 27.00%。从肿瘤重量角度，高剂量 8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮和 1-MT 的肿瘤抑制率分别为 57.8%和 28.2%。8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮给药组小鼠体重正常、皮毛有光泽、反应较灵活。

4. 实验分组及接瘤后给药：小鼠于接种肿瘤 48 h 后，随机分为 4 组，每组 10 只。当肿瘤直径达到 5 mm 时，首次给药。对照组给以等量 0.5% CMC(羧甲基纤维素钠)，灌胃给药；1-MT 组，给药量为 200 mg/kg，灌胃给药；8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮组，给药量为 200 mg/kg，灌胃给药；紫杉醇组，给药量为 100 mg/kg，尾静脉注射，每周一次；8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮+紫杉醇组，8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮给药量 200 mg/kg，紫杉醇组给药量为 100 mg/kg (尾静脉注射)，连续给药两周。从给药当天开始测量肿瘤长径(a)和短径(b)，每隔一天测量一次，肿瘤体积 $=ab^2/2$ 。停药后次日断颈处死小鼠，剥瘤称重，液氮保存。

5. 接瘤后给药治疗结果：小鼠经 200 mg/kg 的 8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮或 1-MT 连续灌胃给药两周后，体内 Lewis 肺癌肿瘤的生长与对照组相比明显受到抑制，并且 8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮组抑制肿瘤生长的效果比 1-MT 组更好。从肿瘤体积角度，8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮、1-MT、紫杉醇、8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮+紫杉醇的抑制率分别为 23.38%、15.68%、51.45%、72.48%。紫杉醇作为一种临床上常用的化疗药，虽然几乎能抑制肿瘤的生长，但存在较强的毒副作用，实验过程中发现小鼠体形消瘦、皮毛疏松、少动现象。而 8-氟-2-((4-甲基哌嗪-1-基)甲基)咪唑并[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮单独给药尽管不能引起肿瘤消退，但能较大程度抑制肿瘤生长，并且该组小鼠体重正常、皮毛有光泽、反应较灵活。

对比例 2-甲基咪唑[2,1-b]噻唑啉-6,12-二酮的制备及活性测试
步骤(1)同实施例 1。

步骤(2)、2-甲基咪唑[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(4b)的合成



化合物 **3a** (1.7 g, 9.6 mmol), 靛红 (1.4 g, 9.6 mmol) 和三乙胺 (2.7 ml, 19.2 mmol) 的混合物悬浮于干燥的甲苯(18 ml)中, 在 110 °C 下加热 4 小时。反应液冷至室温后, 形成的黄色固体经过滤, 用 2 ml 乙酸乙酯洗涤三次, 得到黄色固体化合物 **4b** (0.5 g, 20%)。

表征数据:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.94 (dd, *J* = 7.8, 5.0 Hz, 2H), 7.85 – 7.75 (m, 1H), 7.71 – 7.64 (m, 1H), 7.44 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.58 (s, 3H)。

用如实施例 9-11 所述的方法测定对比例所得化合物的活性, IDO 抑制活性体外 IC₅₀ 为 997.25 μM, Ki 及体内 IC₅₀ 未测出。

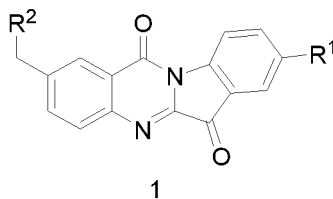
从表 1 和上述实验数据中可以看出, 与现有技术中的 IDO 抑制剂, 以及具有类似结构的化合物相比, 本申请的化合物具有异常优异的 IDO 抑制活性。具体地, 相较于现有技术中已知的 IDO 抑制剂 1-MT, 本申请化合物的体外和细胞内 IC₅₀ 值都降低了 1-3 个数量级, 这说明本申请化合物具有十分优异的 IDO 抑制活性。

值得注意的是, 本申请的化合物和一些与其结构十分相近的化合物(如对比例化合物)相比, 抑制活性方面的改进非常显著。甚至与一些结构中同样具有活性基团的 IDO 抑制剂相比, 其抑制活性也具有相当大的提高。相较于本领域常规的化合物结构与活性的相关性, 本申请化合物与其类似结构在生物活性方面的区别是一种罕见的例外情况。这说明, 本申请化合物是一类相当独特的结构, 其生物活性是令人意外的。

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

1、一种 N-苄基色胺酮类衍生物，其特征在于，所述衍生物具有如下式 1 所示的结构通式：



式 中

R^1 为氢或氟；

R^2 为 $-NR^3R^4$ ；

所述的 R^3 、 R^4 各自独立地选自下组：H、取代的或未取代的 C1-C4 烷基、取代的或未取代的 C2-C4 烯基、取代的或未取代的 C2-C4 炔基、取代的或未取代的 C3-C6 环烷基；

或 R^3 、 R^4 与相邻的氮原子共同构成取代或未取代的 5-7 元杂环，其中，所述的 5-6 元饱和环上具有 1-2 个氮原子，和 0-2 个选自下组的杂原子：O、S；

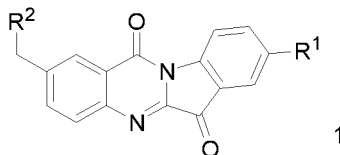
所述的取代指基团上的一个或多个氢原子(优选为氮原子上的氢原子)被选自下组的取代基取代：C1-C4 烷基、C1-C4 卤代烷基、胺基保护基(优选叔丁氧羰基)、卤素。

2、如权利要求 1 所述的 N-苄基色胺酮类衍生物，其特征在于， R^3 、 R^4 各自独立地选自下组：C1-C4 烷基；或 R^3 、 R^4 与相邻的氮原子共同构成取代或未取代的 5-6 元饱和环，其中，所述的 5-6 元饱和环上具有 1 或 2 个氮原子，和任选的 1 个选自下组的杂原子：O。

3、如权利要求 1 所述的 N-苄基色胺酮类衍生物，其特征在于，所述的 R^2 为取代或未取代的选自下组的基团：；其中，“~”表示连接位点；

所述的取代指基团上的一个或多个氢原子被选自下组的取代基取代：C1-C4 烷基、卤素。

4、一种 N-苄基色胺酮类衍生物，其特征在于所述衍生物的结构通式如下：

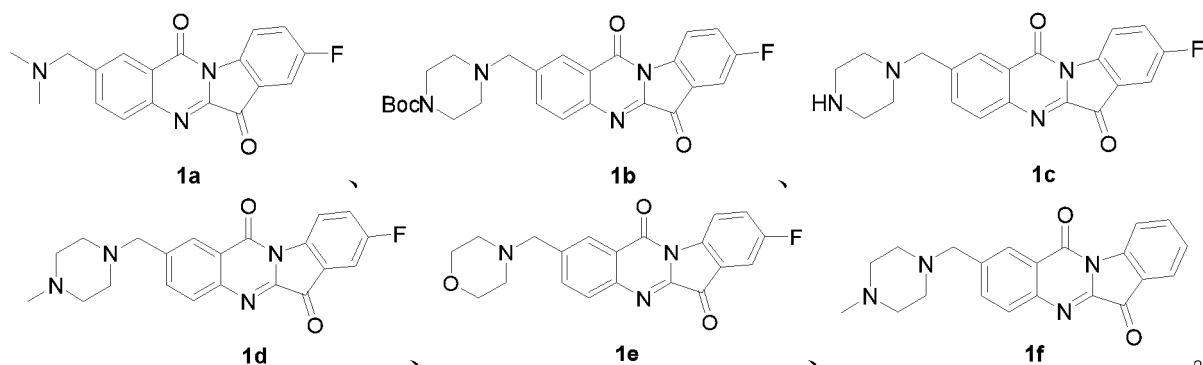


$R^1 = H, F$

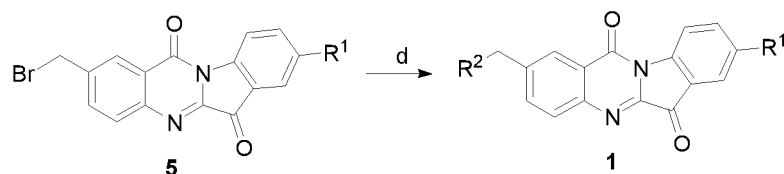
$R^2 =$

其中：所述取代基 R^2 为环状亚胺或二烷基取代胺， R^1 为氢或氟。

5、如权利要求 1 或 4 所述的 N-苄基色胺酮类衍生物，其特征在于，所述衍生物为选自下组的化合物：

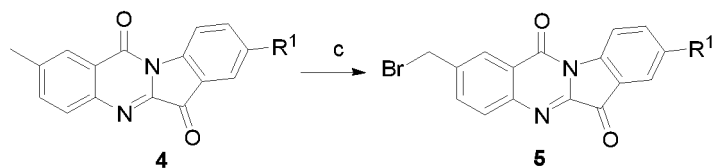


6、如权利要求 1 或 4 所述的 N-苄基色胺酮类衍生物的制备方法，其特征在于，包括步骤：



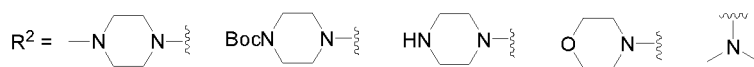
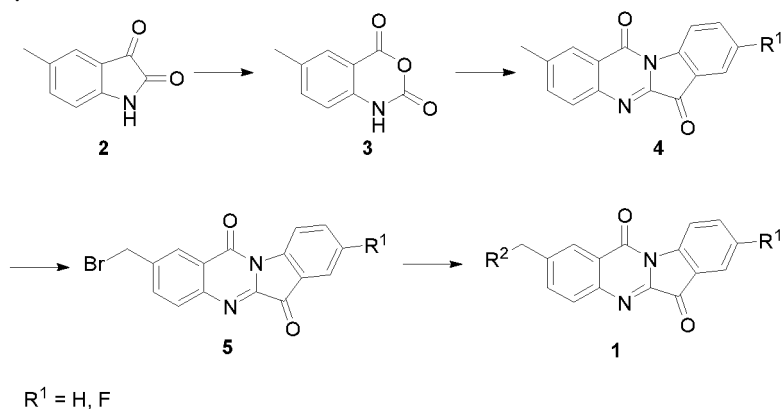
(d) 在惰性溶剂中，在三乙胺存在下，用式 5 化合物(溴代 2-甲基色胺酮)与 R^2H 反应，得到式 1 化合物，
式中， R^1 、 R^2 的定义如上。

7、如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述方法在步骤(d)之前还包括步骤(c)：



(c) 在惰性溶剂中，用式 4 化合物与溴代试剂反应，得到式 5 化合物；较佳地，所述的溴代试剂为 NBS。

8、一种如权利要求 4 所述的 N-苄基色胺酮类衍生物的制备方法，其特征在于，合成路线如下：



具体步骤如下：

(1) 甲基靛红酸酐(3)的合成

5-甲基靛红悬浮于干燥二氯甲烷中，在 0°C 下分批加入间-氯过氧苯甲酸，在室温下搅拌 1.5-2.5 小时；TLC 检测反应完全后，过滤反应形成的白色固体，用乙

酸乙酯洗涤三次, 得到 5-甲基靛红酸酐; 其中, 5-甲基靛红和间-氯过氧苯甲酸摩尔比为: (0.5-1):1;

(2) 2-甲基色胺酮(4)的合成

5 将甲基靛红酸酐、5-氟靛红和三乙胺的混合物悬浮于干燥甲苯中, 在 100-120 °C 下加热 3.5-4.5 小时, 溶剂在减压条件下蒸去, 黄色的固体溶解于二氯甲烷中, 再加入乙酸乙酯, 形成的黄色固体经过滤用乙酸乙酯洗涤三次, 得到 2-甲基色胺酮; 其中, 甲基靛红酸酐和 5-氟靛红和三乙胺摩尔比为: (0.2-0.5):(0.2-0.5):1;

(3) 溴代 2-甲基色胺酮(5)的合成

10 在 75-85 °C 和氮气保护的条件下, 将步骤(2)所得的 2-甲基色胺酮溶解于干燥的二氯甲烷中, 然后分批加入 NBS 和 AIBN 的混合物; 反应液在 75°C 加热 15-17 小时, TLC 检测反应完全; 反应液冷却到室温后经盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 浓缩得到的黄色产物; 其中, 2-甲基色胺酮和 NBS 和 AIBN 摩尔比为: 1: 1:(0.005-0.02);

(4) N-苄基色胺酮(1)的合成

15 将溴代 2-甲基色胺酮、脂肪胺和三乙胺在干燥 DMF 中于室温下搅拌 1.5-2.5 小时, TLC 检测反应完全后, 加入 50 ml 水, 再用 10 ml 二氯甲烷萃取三次, 合并的二氯甲烷相用水洗三次再用无水硫酸钠干燥; 浓缩得到的黄色固体用硅胶分离, 得到黄色的 N-苄基色胺酮衍生物; 其中, 溴代 2-甲基色胺酮和脂肪胺和三乙胺摩尔比为: 1: (1-2):(2-5)。

20 9、一种如权利要求 1 或 4 所述的 N-苄基色胺酮衍生物在制备预防和/或治疗具有 IDO 介导的色氨酸代谢紊乱的病理学特征的疾病的药物中的应用。

10、一种权利要求 1 或 4 所述的式 1 化合物或其药学上可接受的盐的用途, 其特征在于, 用于:

(i) 制备 IDO 抑制剂;

25 (ii) 制备色氨酸代谢紊乱相关疾病的药物;

(iii) 体外非治疗性地抑制 IDO。

11、一种药物组合物, 其特征在于, 包含(i)如权利要求 1 或 4 所述的式 1 化合物, 或其药学上可接受的盐; 以及(ii)药学上可接受的载体。

30 12、一种 IDO 抑制剂, 其特征在于, 包含如权利要求 1 或 4 所述的式 1 化合物, 或其药学上可接受的盐。

13、一种体外非治疗性地抑制 IDO 活性的方法, 其特征在于, 所述方法包括步骤: 使抑制有效量的如权利要求 1 或 4 所述的式 1 化合物, 或其药学上可接受的盐与待抑制对象接触。

35 14、一种制备治疗色氨酸代谢紊乱相关疾病的药物组合物的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 将治疗有效量的如权利要求 1 或 4 所述的式 1 化合物或其药学上可接受的盐与药学上可接受的载体混合, 从而形成药物组合物。

15、一种治疗色氨酸代谢紊乱相关疾病的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 对治疗对象施用治疗有效量的如权利要求 1 或 4 所述的式 1 化合物, 或其药学上可接受的盐。