(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103570727 B
(45)授权公告日 2015.08.19

(21)申请号 201310560572.0
(22)申请日 2013.11.12
(73)专利权人 复旦大学
地址 200433 上海市杨浦区邯郸路220号
(72)发明人 杨青 匡春香
(74)专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司 31200
代理人 张磊
(51)Int.Cl.
C07D 487/04(2006.01)
A61K 31/519(2006.01)
A61K 31/5377(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 3/00(2006.01)

(56)对比文件
US 5830615 A,1998.11.03,全文.
WO 00/61159 A1,2000.10.19,全文.
CN 102532144 A,2012.07.04,全文.
US 5441955 A,1995.08.15,全文.

审查员 李广科

权利要求书2页 说明书12页

(54)发明名称

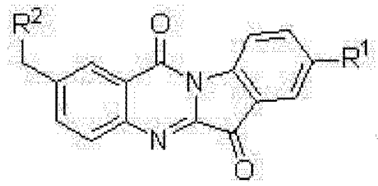
一种N-苄基色胺酮衍生物及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种N-苄基色胺酮衍生物及其制备方法和用途。本发明以靛红及其衍生物为原料,氧化成靛红酸酐。在三乙胺碱性条件下,甲苯溶剂中与5-氟靛红回流反应,过滤洗涤后得到甲基色胺酮。甲基色胺酮在二氯甲烷中与N-丁二酰亚胺回流,浓缩过滤得到黄色的单溴代的甲基色胺酮。单溴代的甲基色胺酮与脂肪胺,在二甲亚砜和碱存在在下,搅拌,萃取水洗得到所需产物。本发明所述的N-苄基色胺酮衍生物具有优良的吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制活性,可应用于治疗具有IDO介导的色氨酸代谢的病理学特征的疾病,至少包括肿瘤、癌症、阿尔茨海默病、自身免疫性疾病、抑郁症、焦虑症。本发明方法具有操作简单、条件温和、收率高等优点,易于工业化生产。

CN 103570727 B

1. 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：

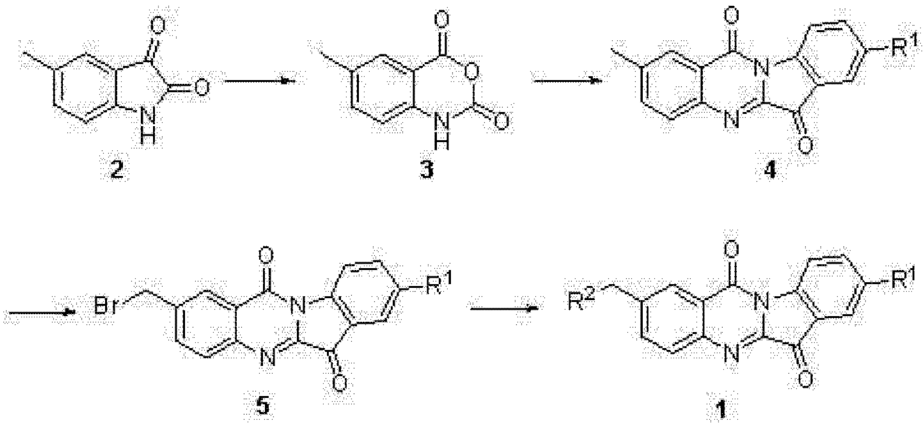


1

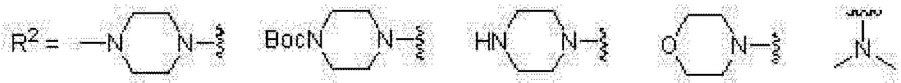
R^1 = H, F

其中，“”表示连接位点。

2. 一种如权利要求 1 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：



R^1 = H, F



其中，“”表示连接位点；

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 ℃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 ℃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

在 75-85 ℃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℃ 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

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)。

3. 一种如权利要求1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。

一种N-苄基色胺酮衍生物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 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

[0002] 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。目前已知1-甲基-L-色氨酸（1-MT）和β-(3-苯并呋喃基)-DL-丙氨酸等某些色氨酸（底物）类似物是IDO的竞争性抑制剂（Cady, S. G. and Sono, M. Arch. Biochem. Biophys. 1991, 291, 326）。

[0003] 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，所述慢性病例如获得性免疫缺陷综合症（AIDS）、阿尔茨海默病、多种类型的抑郁症和癌症（Wirleitner, Curr. Med. Chem. 2003, 10, 1581）。

[0004] 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（Takikawa et al. Adv. Exp. Med. Biol. 1999, 241, 467）并且已经报道了这些紫外线滤器化合物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。IDO抑制剂会阻断该自然过程（Takikawa et al. Exp. Eye Res. 2001, 72, 271）。

[0005] 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）。IDO抑制剂可以用于调节T细胞介导的免疫应答。

[0006] 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（Uyttenhove et al. Nat. Med. 2003, 9, 1269）。

[0007] 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、诸如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。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。

[0008] 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。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，这给肿瘤的免疫治疗带来了新希望。1-MT 被美国国立癌症研究所列入 RAID (rapid access to intervention development) 计划，并于 2007 年秋进入 I 期临床试验。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 Ki 也仅为 34 μM。因此，发现新型高效的 IDO 抑制剂具有重大应用价值。

[0009] 色胺酮为吲哚喹唑啉类生物碱，其化学名称为吲哚 [2,1-b] 喹唑啉 -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、菘蓝等产蓝植物中(Honda G, et al. Planta Medica , 1980, 38(3): 275-276.)。另外，也可以从微生物的发酵液中提取(Hosoe T, et al. Mycopathologia, 1999, 144(1): 9-12.)。近年来，国内、外学者对色胺酮的药理进行了部分研究，其药理作用主要表现在抗菌、抗炎、抗肿瘤及抗寄生虫(Oberthur C, et al. Fitoterapia, 2005, 76(3-4): 324-332; Motoki T, et al. Biol Pharm Bull, 2005, 28(2): 260-266)等方面。虽然从蓼蓝、马蓝、菘蓝等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。

[0010] 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，合成色胺酮的主要方法是吲哚醌与靛红酸酐反应，该方法简单收率高、反应条件温和。另外，可以在吲哚醌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。目前合成吲哚醌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肟类化合物，然后在浓硫酸作用下闭环得到吲哚醌，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基团的色胺酮，这是由于在合成吲哚醌的过程中，这些基团易于发生多种副反应。靛红酸酐的合成方法目前主要有以下两种。方法一 :邻氨基苯甲酸与三光气反应，该方法收率高。但是在原料上引入活性基是仍然是非常复杂的。因此，功能化色胺酮的合成是对有机合成的挑战。

发明内容

[0011] 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

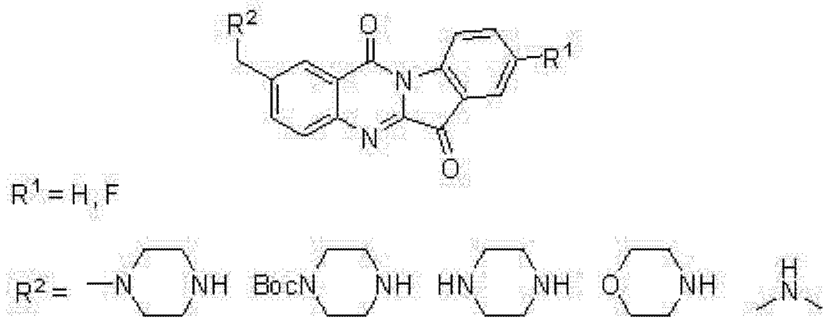
解性能和药理活性，目的在于获得有应用价值的活性化合物。本发明的研究和药理试验表明，在色胺酮分子中引入水溶性基团而形成的 N- 苄基色胺酮衍生物可以作为更高效的 IDO 抑制剂，其具有抗菌、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性，有广阔的应用前景。此外，相比已有的色胺酮衍生物合成方法而言，本发明的合成方法具有操作简单、条件温和、收率高等优点，更易于工业化生产。

[0012]　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。

[0013]　本发明涉及所述的化合物、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，以及在制备药物、IDO 抑制剂和药物组合物中的用途。

[0014]　本发明提出的 N- 苄基色胺酮类衍生物，其结构通式如下：

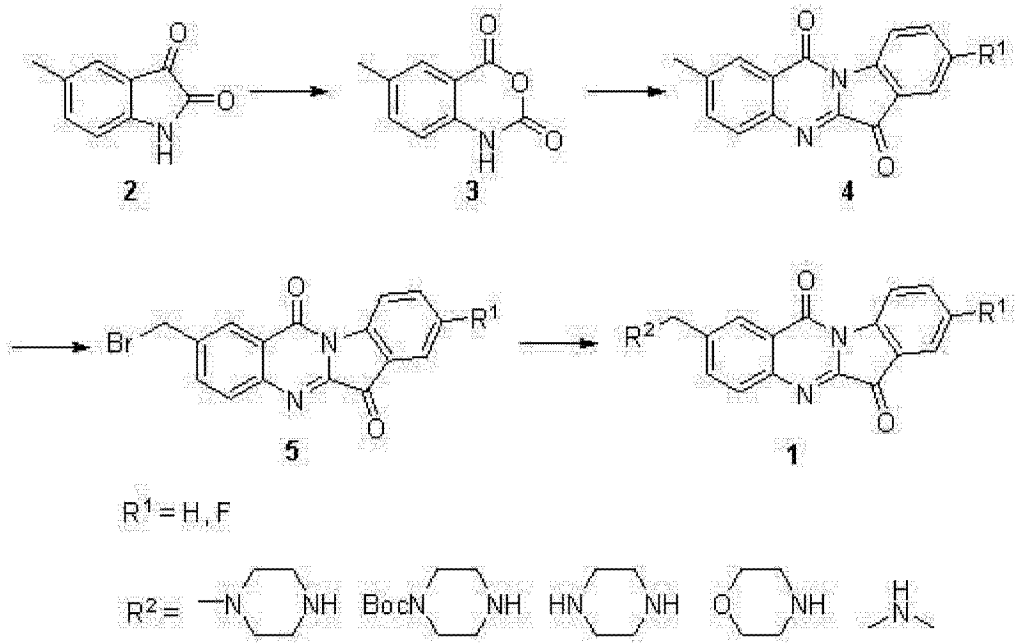
[0015]



[0016]　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。

[0017]　本发明提出的 N- 苄基色胺酮类衍生物的制备方法，其合成路线如下：

[0018]



[0019]　具体步骤如下：

[0020]　（1）甲基靛红酸酐（3）的合成

[0021] 5-甲基靛红悬浮于干燥二氯甲烷中，在0 ℃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。

[0022] （2）2-甲基色胺酮（4）的合成

[0023] 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 ℃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。

[0024] （3）溴代2-甲基色胺酮（5）的合成

[0025] 在75-85 ℃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℃ 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。

[0026] （4）N-苄基色胺酮（1）的合成

[0027] 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。

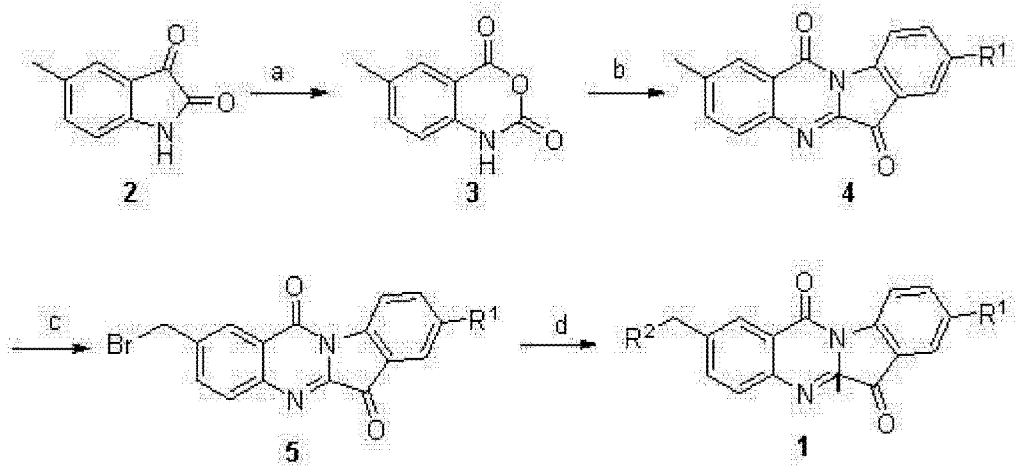
[0028] 本发明提出的N-苄基色胺酮衍生物在制备预防和/或治疗具有IDO介导的色氨酸代谢紊乱的病理学特征的疾病的药物中的用途。优选地，所述疾病选自肿瘤。

[0029] 利用本发明方法合成的N-苄基色胺酮衍生物，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。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。

具体实施方式

[0030] 下面通过实施例进一步说明本发明，但并不因此限制本发明的保护范围。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：

[0031]

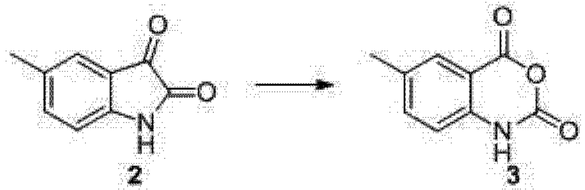


Reaction Conditions: a. m-CPBA (2 eq.), CH_2Cl_2, RT; b. Et_3N, Toluene, reflux, 75%; c. NBS, AIBN, CH_2Cl_2, reflux; d. K_2CO_3, KI, DMF, Amine

[0032] 实施例 1:2-((二甲基氨基)甲基)-8 -氟吲哚并 [2,1-b]喹唑啉 -6,12-二酮(1)的合成,具体步骤如下 :

[0033] 步骤 (1)、6 -甲基 -1H-苯并 [d][1,3]恶嗪 -1,4 -二酮(3) 的合成

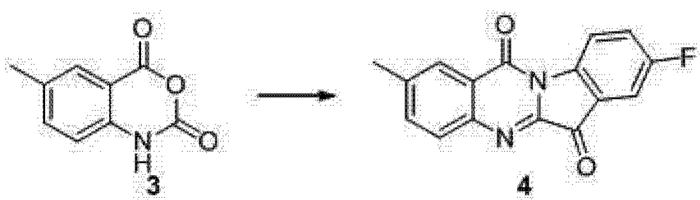
[0034]



[0035] 化合物 2 (500 mg, 3 mmol) 悬浮于 10 ml 的干燥二氯甲烷中,在 0 ℃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,得到了化合物 3 (350 mg, 65%)。

[0036] 步骤 (2)、8 -氟 -2-甲基吲哚并 [2,1-b]喹唑啉 -6,12-二酮(4) 的合成

[0037]



[0038] 化合物 3 (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 ℃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 4 (1.1 g, 75%)。

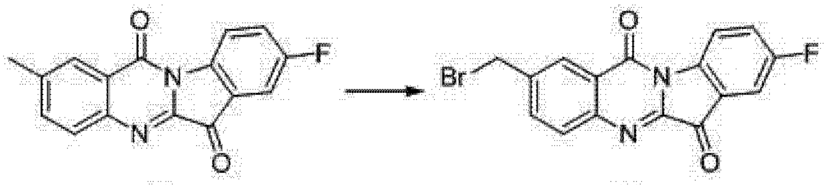
[0039] 表征数据 :

[0040] ^{1}H 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).

[0041] 步骤(3)、2 -(溴甲基)8 -氟吲哚[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(5)的合成

[0042]



4 5

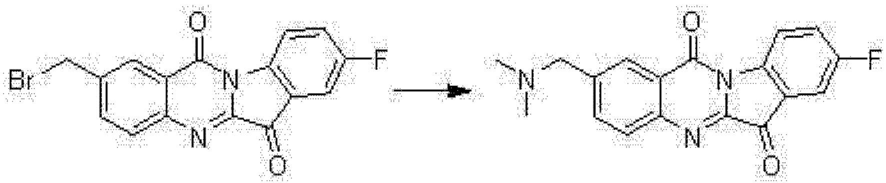
[0043] 在 80 ℃和氮气保护的条件下,向化合物 4 (500 mg, 1.78 mmol) 的二氯甲烷(3.6 ml)溶液中分三批加入NBS (381 mg, 2.14 mmol) 和 AIBN (29 mg, 0.18 mmol) 的混合物。反应液在80 ℃ 加热16 小时。TLC检测反应完全,反应液冷至室温,盐水洗涤,无水硫酸钠干燥,浓缩得到黄色产物5。

[0044] 表征数据:

[0045] ^{1}H 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)。

[0046] 步骤(4)、2-((二甲基氨基)甲基)-8 -氟吲哚并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(1)的合成

[0047]



5 1

[0048] 化合物5 (500 mg, 1.39 mmol), 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1。

[0049] 表征数据:

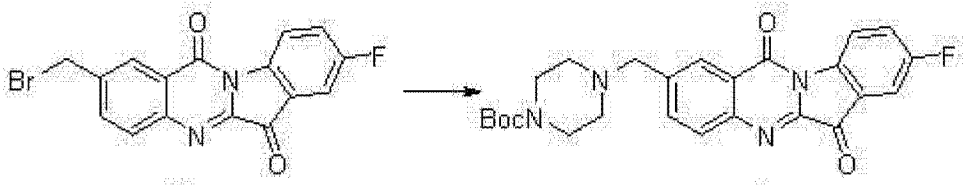
[0050] ^{1}HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.63 (dd, J = 8.8, 4.1 Hz, 1H), 8.33 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.87 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 6.5, 2.6 Hz, 1H), 7.48 (td, J = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 3.61 (s, 2H), 2.30 (s, 6H)。

[0051] 实施例2:

[0052] 步骤(1)-步骤(3)同实施例1,

[0053] 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(1)的合成

[0054]



5 1

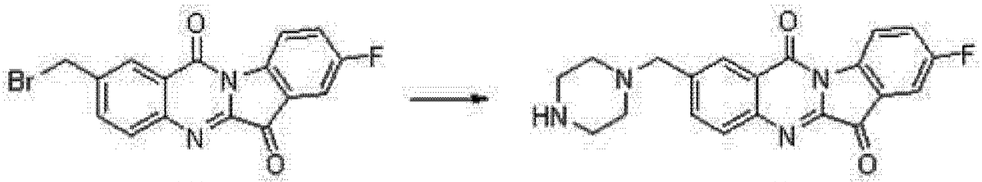
[0055] 化合物 5 (500 mg, 1.39 mmol), N-Bocpiperazine (546 mg, 2.78 mmol), 碘化钾 (10 mg) 和三乙胺 (0.5 ml) 在 5 ml 的 DMF 中于室温搅拌 2 小时。TLC 检测反应完全后,加入 50 ml 水,用 10 ml 乙酸乙酯萃取三次,合并有机相用水洗三次,再用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体用硅胶柱分离后得到黄色化合物 1。

[0056] 表征数据:

[0057] [1]H 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)。

[0058] 实施例 3:8-氟 -2-(哌嗪 -1-基甲基)吲哚并 [2,1-b]喹唑啉 -6,12-二酮(1)的合成

[0059]



5 1

[0060] 步骤 (1)-步骤 (3)同实施例 1,

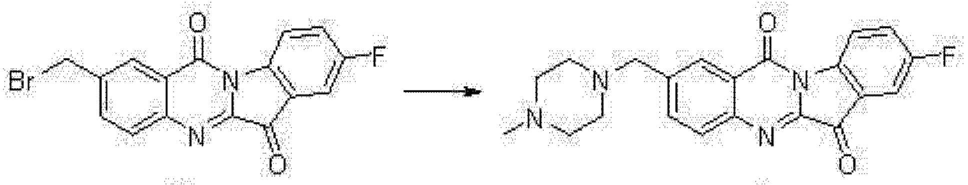
[0061] 步骤(4):化合物 5 (500 mg, 1.39 mmol), *N*-Bocpiperazine (546 mg, 2.78 mmol), 碘化钾 (10 mg) 和三乙胺 (0.5 ml) 在 5 ml 的 DMF 中于室温搅拌 2 小时。TLC 检测反应完全后,加入 50 ml 水,用 10 ml 乙酸乙酯萃取三次,合并有机相用水洗三次,再用无水硫酸钠干燥。浓缩得到的黄色固体。将黄色固体溶解于 3 毫升的二氯甲烷中,在室温条件下加入三氟乙酸 1 毫升。反应液在室温搅拌 1 小时后,TLC (CH_2Cl_2/MeOH=10/1, Rf 0.2) 检测反应完全后,溶剂在减压条件下去除,加入保护 $NaHCO_3$ 溶液 10 毫升,用乙酸乙酯 (10 ml×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 1。

[0062] 表征数据:

[0063] [1]H 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)。

[0064] 实施例 4:8-氟 -2-((4 -甲基哌嗪 -1-基)甲基)吲哚并 [2,1-b]喹唑啉 -6,12-二酮(1)的合成

[0065]



5 1

[0066] 步骤(1)-步骤(3)同实施例1，

[0067] 步骤(4):化合物5 (220 mg, 0.61 mmol), 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1。

[0068] 表征数据：

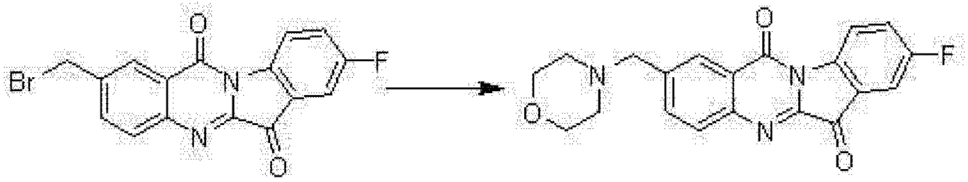
[0069] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.65 (dd, J = 8.8, 4.0 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.99 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.87 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.59 (dd, J = 6.5, 2.6 Hz, 1H), 7.50 (td, J = 8.7, 2.7 Hz, 1H), 3.50 (s, 2H), 2.59 (s, 8H), 2.38 (s, 3H)。

[0070] 实施例5：

[0071] 步骤(1)-步骤(3)同实施例1，

[0072] 步骤(4):8 -氟-2 -((吗啡啉-1-基)甲基)吲哚并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(1)的合成

[0073]



5 1

[0074] 化合物5 (500 mg,1.39 mmol), 吗啡啉 (242 mg,2.78 mmol), 碘化钾 (10 mg) 和三乙胺(0.5ml)在5 mlDMF中在室温搅拌2小时。TLC (EtOAc, Rf 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1。

[0075] 表征数据：

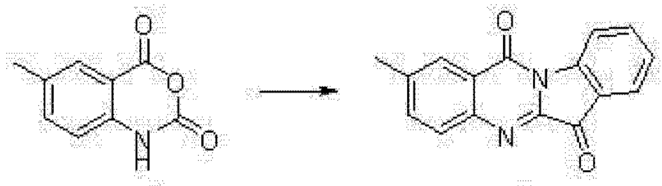
[0076] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.66 (dd, J = 8.8, 4.1 Hz, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.01 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.90 (dd, J = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 6.5, 2.7 Hz, 1H), 7.51 (td, J = 8.6, 2.7 Hz, 1H), 3.79 - 3.73 (m, 4H), 3.70 (s, 2H), 2.52 (s, 4H)。

[0077] 实施例6：

[0078] 步骤(1)同实施例1，

[0079] 步骤(2)、2 -甲基吲哚[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(4)的合成

[0080]



3 4

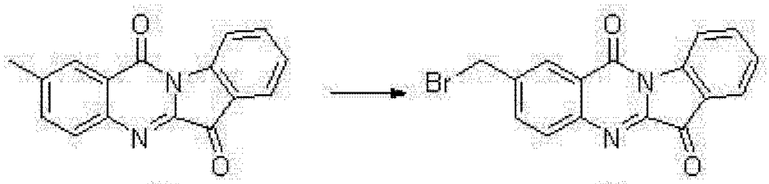
[0081] 化合物3 (1.7 g, 9.6 mmol), 靛红 (1.4 g, 9.6 mmol) 和三乙胺 (2.7 ml, 19.2 mmol) 的混合物悬浮于干燥的甲苯(18 ml)中,在110 ℃下加热 4小时。反应液冷至室温后,形成的黄色固体经过滤,用2 ml乙酸乙酯洗涤三次,得到黄色固体化合物 4 (0.5 g, 20%)。

[0082] 表征数据:

[0083] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) 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)。

[0084] 步骤(3)、2 -甲基吲哚[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(5)的合成

[0085]

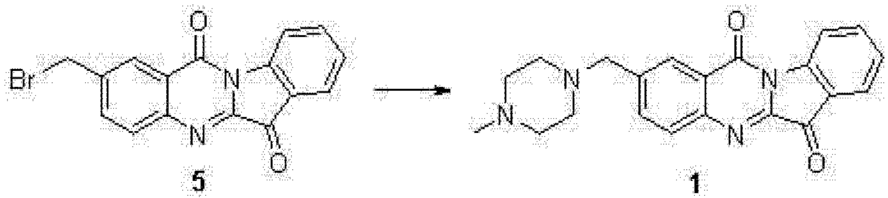


4 5

[0086] 在 80 ℃和氮气保护的条件下,向化合物 4 (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 5 (245 mg, 91%)。

[0087] 步骤(4)、2-((4 -甲基哌嗪-1 - 基)甲基)吲哚并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮(1)的合成

[0088]



5 1

[0089] 化合物5 (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 mlDMF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 1 (120 mg, 55%)。

[0090] 表征数据:

[0091] ^{1}H 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)。

[0092] 实施例.7:IDO抑制活性检测

[0093] 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 μg/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℃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℃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100μl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490nm观测。

[0094] 实施例8:是否为可逆抑制剂的判定

[0095] 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 ～[E])作图,根据曲线的特征可以判定是否是可逆抑制剂。

[0096] 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 μg/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℃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℃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 ～[E]做图。

[0097] 实施例9:抑制剂类型判断及Ki值测定

[0098] 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 μg/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℃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℃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℃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~[I])判定化合物的抑制剂类型,以S/v~[I]作图,得到抑制剂的Ki值。

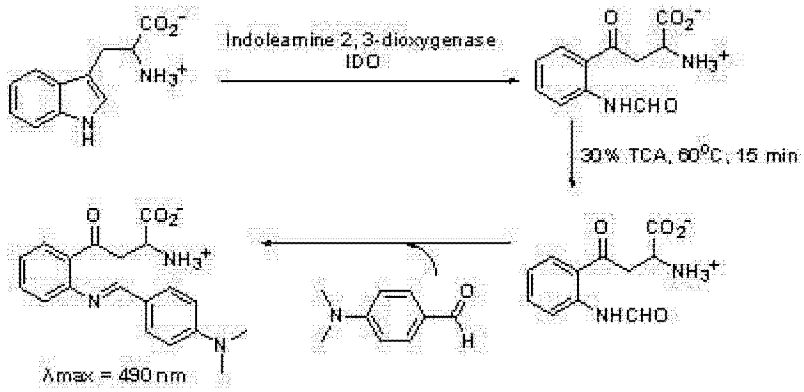
[0099] 实施例10:半数有效抑制浓度IC_{50}的测定

[0100] 先将50 mM磷酸钾缓冲液(pH 6.5),40 mM维生素C,400 μg/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℃保温5分钟,再向上述混合液内加入IDO酶。反应在37℃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IC_{50}计算软件计算。

[0101] 利用上述方法,对N-苄基色胺酮衍生物(I)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，各项指标如下。

[0102]



[0103] 上述实施例中合成含 N- 苄基色胺酮衍生物（I）的 IDO 抑制活性如下：

[0104]

化合物	抑制类型	K_i (μM)	IC_{50} (μM)（体外）
1-MT	竞争性	34	380
实施例 1	反竞争性	0.31	0.11
实施例 2	反竞争性	7.21	1.88
实施例 3	非竞争性	4.12	0.68
实施例 4	反竞争性	2.64	0.50
实施例 5	反竞争性	0.47	0.40
实施例 6	反竞争性	5.97	2.52

[0105] 实施例 11 ：8-氟 -2-（（4 -甲基哌嗪 -1-基）甲基）吲哚并 [2,1-b]喹唑啉 -6,12-二酮（实施例 4）抗肿瘤作用

[0106] 1. Lewis 肿瘤模型建立：健康雌性 C57BL/6 小鼠 40 只，体重 20±1g，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。

[0107] 2. 实验分组：小鼠随机分为 4 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）组，给药量为 200 mg/kg，灌胃给药；8- 氟 -2-（（4 - 甲基哌嗪 -1- 基）甲基）吲哚并 [2,1-b] 喹唑啉 -6,12- 二酮 (1) 组，给药量为 200 mg/kg，灌胃给药。连续给药 7 天接种肿瘤，之后继续给药 18 天并观察肿瘤生长情况。停药后次日断颈处死小鼠，剥瘤称重，液氮保存。

[0108] 3. 结果

[0109] 小鼠经 200 mg/kg 的 8- 氟 -2-（（4 - 甲基哌嗪 -1- 基）甲基）吲哚并 [2,1-b] 喹唑啉 -6,12- 二酮预防给药一周及接种后给药治疗，体内 Lewis 肺癌肿瘤的生长明显

受到抑制，直至给药开始后第25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。从肿瘤重量角度，8-氟-2-((4 -甲基哌嗪-1-基)甲基)吲哚并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮和1-MT的抑制率分别为82.8%和23.1%。8-氟-2-((4 -甲基哌嗪-1-基)甲基)吲哚并[2,1-b]喹唑啉-6,12-二酮给药组小鼠体重正常、皮毛有光泽、反应较灵活。