	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0103986 (43) 공개일자 2016년09월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07D 487/04</i> (2006.01) <i>A61K 31/519</i> (2006.01) <i>A61K 31/5377</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>C07D 487/04</i> (2013.01) <i>A61K 31/519</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2016-7015465 (22) 출원일자(국제) 2014년11월12일 심사청구일자 없음 (85) 번역문제출일자 2015년06월10일 (86) 국제출원번호 PCT/CN2014/090947 (87) 국제공개번호 WO 2015/070766 국제공개일자 2015년05월21일 (30) 우선권주장 201310560572.0 2013년11월12일 중국(CN)		(71) 출원인 푸단 유니버시티 중국 200433 상하이 양푸 디스트릭트 한단 로드 220 (72) 발명자 양 칭 중국 200433 상하이 양푸 디스트릭스 한단 로드 넘버. 220 왕 춘상 중국 200433 상하이 양푸 디스트릭스 한단 로드 넘버. 220 (74) 대리인 리앤목특허법인

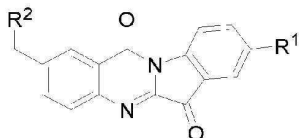
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 N-벤질 트립탄트린 유도체, 및 이의 제조 방법 및 적용

(57) 요약

본 발명은 N-벤질 트립탄트린 유도체, 및 이의 제조방법 및 용도에 관한 것이다. 본 발명의 N-벤질 트립탄트린 유도체는 유도체가 화학식 1에 의해 표현되는 바와 같은 구조적 일반식을 가지는 것을 특징으로 하며, 여기서, 각 기는 명세서에서 정의된 바와 같다. 본 화합물의 제조방법은 단순하고, 온화한 조건 및 고수율을 가지며, 산업적 생산을 위해 적합하다. N-벤질 트립탄트린 유도체는 양호한 인돌아민-2,3-디옥시게나아제(IDO) 억제 활성을 가지며, IDO-매개 트립토판 대사의 병리학적 특징을 갖는 질병을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

[화학식 1]



(52) CPC특허분류

A61K 31/5377 (2013.01)

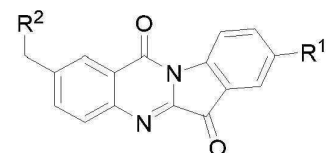
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1에 나타난 바와 같은 일반 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 N-벤질 트립탄트린 유도체:

[화학식 1]



상기 식에서,

R^1 은 수소 또는 불소에 해당하고;

R^2 은 $-NR^3R^4$ 에 해당하고;

R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 H, 치환되거나 비치환된 C1-C4 알킬기, 치환되거나 비치환된 C2-C4 알케닐기, 치환되거나 비치환된 C2-C4 알키닐기, 및 치환되거나 비치환된 C3-C6 시클로알킬기의 군으로부터 선택되거나;

R^3 및 R^4 는 인접한 질소 원자와 함께 치환되거나 비치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릭 고리를 형성하며, 여기서, 상기 5원 내지 6원 포화된 고리는 1개 내지 2개의 질소 원자, 뿐만 아니라, O 및 S의 군으로부터 선택된 0개 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고;

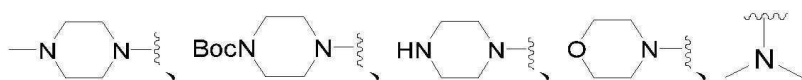
여기서, 치환은 제공된 기 상에 존재하는 하나 이상의 수소 원자(바람직하게, 질소 원자 상에 존재한 수소 원자)는 C1-C4 알킬기, C1-C4 할로알킬기, 아미노-보호기(바람직하게, t-부톡시카보닐) 및 할로겐의 군으로부터 선택된 치환체에 의해 치환되는 경우를 지칭함.

청구항 2

제1항에 있어서, R^3 및 R^4 가 각각 독립적으로 C1-C4 알킬기의 군으로부터 선택되거나; R^3 및 R^4 가 인접한 질소 원자와 함께 치환되거나 비치환된 5원 내지 6원 포화된 고리를 형성하며, 여기서, 상기 5원 내지 6원 포화된 고리는 1개 또는 2개의 질소 원자, 뿐만 아니라 O의 군으로부터 선택된 선택적인 1개의 헤테로원자를 포함하는 것을 특징으로 하는, N-벤질 트립탄트린 유도체.

청구항 3

제1항에 있어서, R^2 가 하기 군으로부터 선택된 치환되거나 비치환된 기인 것을 특징으로 하는, N-벤질 트립탄트린 유도체:



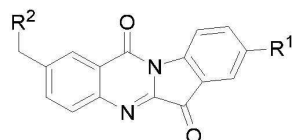
상기 식에서, "~~~~~"는 연결 부위를 지시하며;

여기서, 치환은 제공된 기 상에 존재하는 하나 이상의 수소 원자가 C1-C4 알킬기 및 할로겐의 군으로부터 선택된 치환체에 의해 치환되는 경우를 지칭함.

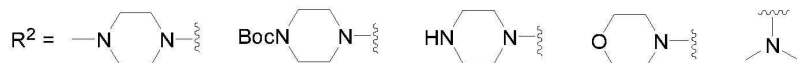
청구항 4

N-벤질 트립탄트린 유도체의 일반 구조가 하기에 제공된 바와 같은 것을 특징으로 하는, N-벤질 트립탄트린 유도체:

[화학식 1]



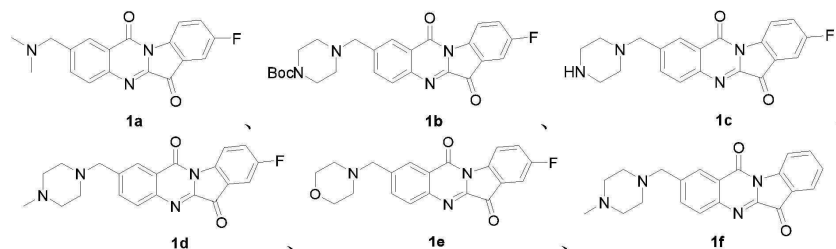
$R^1 = H, F$



여기서, 치환체 R^2 는 시클릭 이민 또는 디알킬-치환된 아민에 해당하며, R^1 은 수소 또는 불소에 해당함.

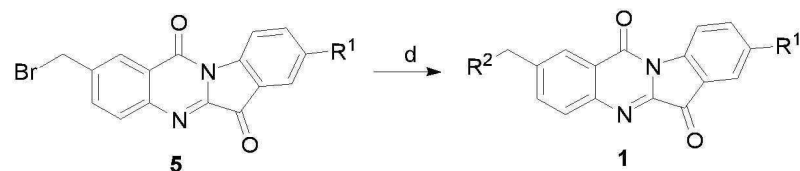
청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 유도체가 하기 군으로부터 선택된 화합물인 것을 특징으로 하는, N-벤질 트립탄트린 유도체:



청구항 6

제1항 또는 제4항에 따른 N-벤질 트립탄트린 유도체를 제조하는 방법으로서,

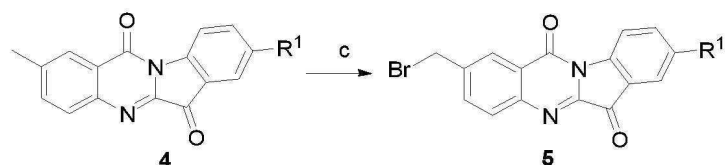


(상기 식에서, R^1 및 R^2 는 상기에서 정의된 바와 같음)

(d) 화학식 5로 제공된 화합물(2-브로모메틸-트립탄트린)을 트리에틸아민의 존재 하에 불활성 용매 중에서 R^2H 와 반응시켜 화학식 1로 나타난 화합물을 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

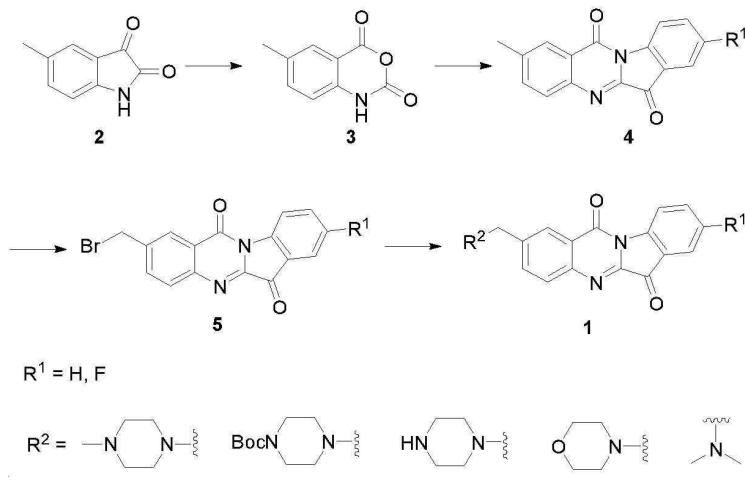
제6항에 있어서, 상기 방법이 단계 (d) 이전에 단계 (c)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:



(c) 화학식 4로 제공된 화합물을 불활성 용매 중에서 브롬화 시약과 반응시켜, 화학식 5로 제공된 화합물을 수득하는 단계; 여기서, 사용되는 브롬화 시약은 바람직하게 NBS임.

청구항 8

제4항에 따른 N-벤질 트립탄트린 유도체를 제조하는 방법으로서, 합성 경로가 하기와 같으며:



특정 단계는 하기와 같은 것을 특징으로 하는 방법:

(1) 메틸이사토산 무수물(3)의 합성

건조된 디클로로메탄 중에 5-메틸이사틴을 현탁시키고, 0℃에서 배치방식으로 메타-클로로퍼옥시벤조산을 첨가하고, 이후에 실온에서 1.5 내지 2.5시간 동안 교반하고; TLC를 통해 반응이 완료된 것으로 확인되면, 반응에서 생성된 백색 고형물을 여과시키고 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 5-메틸이사토산 무수물을 수득하였으며; 5-메틸이사틴 및 메타-클로로퍼옥시벤조산의 몰비는 (0.5 내지 1) : 1임;

(2) 2-메틸트립탄트린(4)의 합성

건조된 톨루엔 중에 메틸이사토산 무수물, 5-플루오로이사틴 및 트리에틸아민의 혼합물을 현탁시키고, 100 내지 120℃의 온도에서 3.5 내지 4.5시간 동안 가열시키고, 감압 하에 용매를 증류시키고; 디클로로메탄 중에 얻어진 황색 고형물을 용해시키고, 에틸 아세테이트를 첨가하고, 이후에 얻어진 황색 고형물을 여과하고, 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 2-메틸트립탄트린을 수득하였으며; 여기서, 메틸이사토산 무수물, 5-플루오로이사틴 및 트리에틸아민의 몰비는 (0.2 내지 0.5) : (0.2 내지 0.5) : 1임;

(3) 2-브로모메틸-트립탄트린(5)의 합성

질소 가스의 보호 하에 75 내지 85℃에서 건조된 디클로로메탄 중에 단계 (2)에서 수득된 2-메틸트립탄트린을 용해시키고, 이후에 배치방식으로 NBS 및 AIBN의 혼합물에 첨가하고; 반응 용액을 15 내지 17시간 동안 75℃에서 가열시키고, TLC를 통해 반응이 완료된 것을 확인하고, 반응 용액을 실온까지 냉각시킨 후에, 염 용액으로 세척을 수행하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시켜 농축된 황색 생성물을 수득하였으며, 여기서, 2-메틸트립탄트린, NBS 및 AIBN의 몰비는 1 : 1 : (0.005 내지 0.02)임; 및

(4) N-벤질트립탄트린(1)의 합성

건조된 DMF 중에서 실온에서 1.5 내지 2.5시간 동안 2-브로모메틸-트립탄트린, 지방족 아민 및 트리에틸아민을 함께 교반하고, TLC를 통해 반응이 완료된 것으로서 확인되면, 50 ml의 물을 첨가하고 10 ml의 디클로로메탄을 사용하여 3회의 순차적인 추출을 수행하고; 다음으로, 수득된 전체 부피의 디클로로메탄을 물로 3회 세척하고, 이후에 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고; 실리카겔을 사용하여 수득된 농축된 황색 고형물의 분리를 수행하여 황색 색상의 N-벤질 트립탄트린 유도체를 수득하였으며; 여기서, 2-브로모메틸-트립탄트린, 지방족 아민 및 트리에틸아민의 몰비는 1 : (1 내지 2) : (2 내지 5)임.

청구항 9

병리학적 특징(pathological feature)으로서 트립토판의 IDO-매개 대사의 장애를 포함하는 질병을 예방하고/예방하거나 치료하도록 고안된 약물의 제조에서 제1항 또는 제4항에 따른 N-벤질 트립탄트린 유도체에 대한 적용.

청구항 10

제1항 또는 제4항에 따른 화학식 1로 제공된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염에 대한 적용으로서,

(i) IDO 억제제의 제조;

- (ii) 트립토판 대사 장애-관련 질병의 치료를 위한 약물의 제조; 및
- (iii) 시험관내 IDO의 비-치료 억제를 위해 사용되는 것을 특징으로 하는 적용.

청구항 11

- (i) 제1항 또는 제4항에 따른 화학식 1로 제공된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 뿐만 아니라
- (ii) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 12

제1항 또는 제4항에 따른 화학식 1로 제공된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 것을 특징으로 하는 IDO 억제제.

청구항 13

시험관내에서 IDO 활성을 비-치료학적으로 억제하는 방법으로서, 제1항 또는 제4항에 따른 화학식 1로 제공된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 효과적인 억제를 생성시키는 양으로 억제 표적과 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제1항 또는 제4항에 따른 화학식 1로 제공된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 약학 조성물을 형성시키기 위한 치료학적 유효량으로 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합시키는 것을 특징으로 하는, 트립토판 대사에서 장애와 관련된 질병을 치료하기 위해 사용되는 약학 조성물을 제조하는 방법.

청구항 15

제1항 또는 제4항에 따른 화학식 1로 제공된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 치료 피검체에 치료학적 유효량으로 적용하는 것을 특징으로 하는 트립토판 대사에서 장애와 관련된 질병을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약제 화학의 기술 분야에 속하는 것으로서, 상세하게 N-벤질 트립탄트린 유도체, 및 이의 제조 방법 및 적용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인돌-2,3-디옥시게나아제(IDO로서 약칭됨; MW 48,000; EC 1.13.11.42)는 제1 효소를 구성하는 헴(heme)-함유 효소, 뿐만 아니라 포유동물 트립토판 대사 경로에서 속도-제한 효소이다. IDO는 산화 반응을 촉매화시키는데, 이러한 반응에서 필수 아미노산 트립토판은 이중 산화되어 N-포르밀카이누레닌을 형성시키고, 생체내에서 트립토판의 생리학적 제거(clean-up)에 대한 원인이 된다. 트립토판을 분해시킴으로써, IDO는 생체내에서 트립토판-부족 미세 환경을 형성시키고, 이에 의해 트립토판의 결여와 밀접하게 연관된 다양한 질병, 예를 들어, 암, 백내장 및 신경학적 장애의 발생을 야기시킨다. 이에 따라, IDO를 표적화하는 매우 효율적인 억제제에 대한 조사는 최근에 약물 연구 및 개발의 초점이 되었다.

[0003] IFN- γ 는 IDO 발현의 다수의 잠재적인 유발물질들 중 하나이다. 높은 수준의 IFN- γ 자극 하에서 지속적인 활성화 동안, IDO는 자유 혈청 트립토판의 이용 가능성을 감소시키고, 이에 따라, 5-히드록시트립탄틴 생산을 감소시킨다. 이들 변화는 신경학적 활성 카이누레닌 대사 산물, 예를 들어, 퀴놀리산(또는 IDO에 의해 유도됨)의 축적과 함께, 신경학적/정신적 장애의 발병을 증진시키고, 다양한 정신적 장애의 원인으로 작용하며, 또한, IDO 활성 및 트립토판 분해에 의해 특징되는 만성 질병과 관련된 증상을 유발시킨다.

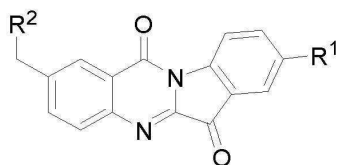
[0004] IDO 활성은 또한, 노화 핵백내장(age-related nuclear cataract)의 발병과 관련이 있다. IDO는 수정체에서 UV 필터 생합성에 관여하는 제1 효소이고, 또한, 속도-제한 효소이다. 트립토판(3-히드록시카이누레닌 및 카이누레닌 글루코시드)의 분해에 의해 유도된 UV 필터 화합물은 인간 수정체에 존재하는 단백질을 개질한다. UV 필터 화합물의 양은 나이에 따라 증가하여, 수정체를 점차적으로 탁하게 되게 하며, 이는 소위 노화 핵백내장을 추가

로 초래하게 된다.

- [0005] IDO 발현은 또한, 국소 T-림프구 증식을 차단함으로써 야기된 면역 반응의 억제에 관한 것이다. T-림프구는 트립토판의 결여에 대해 매우 민감하며, T-림프구는 트립토판의 부재 하에 세포 주기의 G1기에서 저지될 것이다. 이러한 T 세포-매개 면역 반응 억제는 자가면역 질병, 동종이식 거부, 신경퇴행성 장애, 우울증, 박테리아 또는 바이러스 감염증(예를 들어, 인간 면역결핍 바이러스(HIV)) 및 암을 포함하는 여러 질병의 원인이다[Swanson et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2003, 30, 311].
- [0006] 대부분의 인간 종양이 IDO를 본질적으로 발현시킨다는 것이 확인되었다. 이미 면역화된 마우스로부터 얻어진 무린 종양 세포는 IDO의 발현이 거부로부터의 보호를 제공할 수 있으며 1-MT의 투여가 상술된 효과를 제거하는 것을 나타낸다. 또한, IDO 억제제의 수반되는 투여는 암 치료의 효과를 개선시켰다.
- [0007] IDO 억제제는 정신 장애의 조절, 뿐만 아니라 병리학적 특징으로서 트립토판의 IDO-매개 대사를 포함하는 다른 질병의 치료에서 사용될 수 있다; 상기 질병은 바이러스 감염증, 예를 들어, AIDS, 박테리아 감염증, 예를 들어, 라임병(Lyme disease) 및 연쇄상구균 감염증(streptococcal infection), 신경퇴행성 장애(예를 들어, 알츠하이머병, 헌팅턴병 및 파킨슨병), 우울증, 암(T-세포 백혈병 및 결장 암을 포함함), 안구 질병(예를 들어, 백내장 및 노화 황변화(age-related yellowing)) 및 자가면역 질병을 포함한다. 다양한 상이한 시험관내 검정(Takikawa, et al. J. Biol. Chem. 1998, 263, 2041)은 천연 공급원으로부터 얻어진 추출물 또는 반응 기준물의 IDO 억제 활성을 (예를 들어, 고처리량 스크리닝을 통해) 필터링하고 측정하거나, IDO 억제-관련 동역학 상수를 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0008] IDO는 여러 상이한 질병의 발병기전(pathogenesis)과 밀접하게 연관되어 있고, 이미 암, 알츠하이머병, 우울증, 백내장 및 다른 심각한 질병에 대한 표적인 것으로 나타났다. IDO 억제제는 약물로서 적용을 위한 넓은 가능성을 가지지만, 지금까지 어떠한 적합한 IDO 억제제도 약물로서 시판되지 않았다; 이에 따라, 신규하고 효율적인 IDO 억제제에 대한 조사는 중요한 이론적 유의성 및 잠재적인 이용가치를 갖는다.
- [0009] 현존하는 연구에서는, IDO 억제제 1-MT(1-메틸-트립토판)가 시험관내 T-세포 면역 자극에 대한 종양 세포의 민감성을 향상시킬 수 있으며; 동일한 제제가 종양 세포의 성장을 지연시키고 동물 모델에서 생체내에서 화학요법 약물 항-종양 효능을 향상시킬 수 있는 것으로 나타났으며, 그 효과는 사실상 모든 자발적으로 일어나는 종양에 대해 관찰되었다. 불행하게도, 대부분의 존재하는 IDO 억제제의 억제 효율은 낮으며, 생체내 및 시험관내 시험에서 가장 일반적으로 사용되는 IDO 억제제(1-MT)의 억제 상수(Ki)는 단지 34 μ M이다.
- [0010] 이에 따라, 이러한 분야에서 신규하고 효율적인 IDO 억제제를 개발하는 것이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

- [0011] 본 발명의 목적은 N-벤질 트립탄트린 유도체, 및 이의 제조 방법 및 적용을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 제1 양태는 N-벤질 트립탄트린 유도체를 제공하며, 여기서 상기 유도체는 하기 화학식 1로 나타낸 바와 같은 일반 구조를 갖는다:
- [0013] [화학식 1]



- [0014]
- [0015] 상기 식에서,
- [0016] R^1 은 수소 또는 불소에 해당하고;
- [0017] R^2 는 $-NR^3R^4$ 에 해당하고;
- [0018] R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 H, 치환되거나 비치환된 C1-C4 알킬기, 치환되거나 비치환된 C2-C4 알케닐기, 치환되거나 비치환된 C2-C4 알키닐기, 및 치환되거나 비치환된 C3-C6 시클로알킬기의 군으로부터 선택되거나;

[0019] R^3 및 R^4 는 인접한 질소 원자와 함께 치환되거나 비치환된 5원 내지 7원 헤테로시클릭 고리를 형성하고, 여기서, 상기 5원 내지 6원 포화된 고리는 1개 내지 2개의 질소 원자, 뿐만 아니라 0 및 S의 군으로부터 선택된 0개 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고;

[0020] 여기서, 치환은, 제공된 기 상에 존재하는 하나 이상의 수소 원자(바람직하게, 질소 원자 상에 존재하는 수소 원자)가 C1-C4 알킬기, C1-C4 할로알킬기, 아미노-보호기(바람직하게, t-부톡시카보닐) 및 할로겐의 군으로부터 선택된 치환체에 의해 치환된다.

[0021] 다른 바람직한 구현예에서, R^3 및 R^4 가 인접한 질소 원자와 함께 치환되거나 비치환된 5원 내지 6원 포화된 고리를 형성할 때, 고리 상에 존재하는 질소 원자는 아미노-보호기를 선택적으로 지닐 수 있다.

[0022] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 아미노-보호기는 하기 군으로부터 선택된다:

[0023] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 5원 내지 7원 헤테로시클릭 고리는 헤테로아릴 고리가 아니다.

[0024] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 5원 내지 7원 헤테로시클릭 고리는 포화된 헤테로시클릭 고리, 바람직하게 5원 내지 6원의 포화된 헤테로시클릭 고리이다.

[0025] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 5원 내지 7원 헤테로시클릭 고리는 단지 하나 또는 두 개의 헤테로원자를 함유한다.

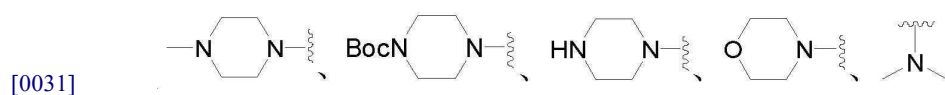
[0026] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 5원 내지 7원 헤테로시클릭 고리의 모든 헤테로원자는 N에 의해 구성된다.

[0027] 다른 바람직한 구현예에서, R^3 및 R^4 는 함께, 각각 독립적으로 C1-C4 알킬기의 군으로부터 선택되거나; R^3 및 R^4 는 인접한 질소 원자와 함께, 치환되거나 비치환된 5원 내지 6원 포화된 고리를 형성하며, 여기서, 상기 5원 내지 6원 포화된 고리는 1개 내지 2개의 질소 원자, 뿐만 아니라, 0로부터 선택된 선택적인 하나의 헤테로원자를 포함한다.

[0028] 다른 바람직한 구현예에서, R^3 및 R^4 는 동시에 H에 의해 구성되지 않는다.

[0029] 다른 바람직한 구현예에서, R^2 는 시클릭 이민이다.

[0030] 다른 바람직한 구현예에서, R^2 는 하기 군으로부터 선택된 치환되거나 비치환된 기이다:



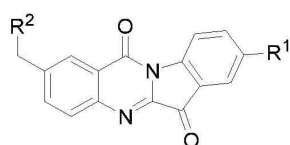
[0032] 여기서, "~~~~~"는 연결 부위를 지시하는 것이며;

[0033] 여기서, 치환은 제공된 기 상에 존재하는 하나 이상의 수소 원자가 C1-C4 알킬기 및 할로겐의 군으로부터 선택된 치환체에 의해 치환되는 경우를 지칭한다.

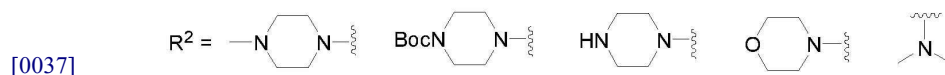
[0034] 다른 바람직한 구현예에서, R^1 은 F에 해당한다.

[0035] 본 발명의 제2 양태는 N-벤질 트립탄트린 유도체를 제공하며, 여기서, 상기 유도체의 일반 구조는 하기에 나타낸 바와 같다:

[0036] [화학식 1]

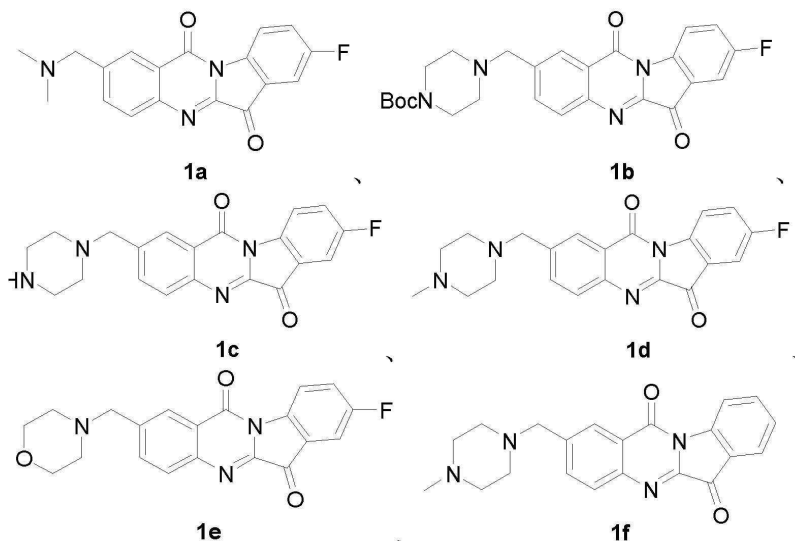


$R^1 = H, F$



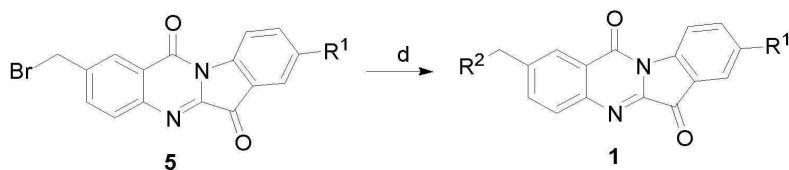
[0038] 여기서, 치환체 R^2 는 시클릭 이민 또는 디알킬-치환된 아민에 해당하고, R^1 은 수소 또는 불소에 해당한다.

[0039] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 유도체는 하기 군으로부터 선택된 화합물이다:



[0040]

[0041] 본 발명의 제3 양태는 본 발명의 제1 양태 또는 제2 양태에서 제공된 바와 같은 N-벤질 트립탄트린 유도체를 제조하는 방법으로서, 하기 단계를 포함하는 방법을 제공한다:



[0042]

[0043] (d) 화학식 5에서 제공된 화합물(2-브로모메틸-트립탄트린)을 트리에틸아민의 존재 하에 불활성 용매 중에서 R^2H 와 반응시켜 화학식 1에 도시된 화합물을 수득하는 단계(여기서, R^1 및 R^2 는 상기에서 정의된 바와 같음).

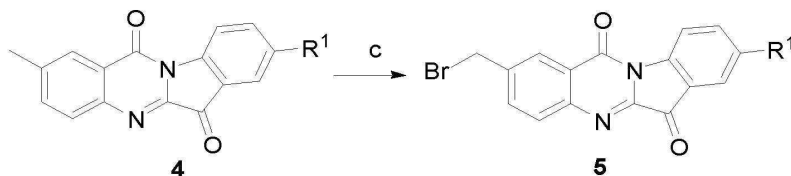
[0044] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (d)에서, 상기 불활성 용매는 DMF, 바람직하게 무수 DMF에 의해 구성된다.

[0045] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (d)에서, 상기 반응은 대략 10 내지 40°C에서 수행된다.

[0046] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (d)에서, 상기 반응 시간은 0.5 내지 12시간이며, 1 내지 5시간의 범위가 바람직하다.

[0047] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (d)에서, 화학식 5로 제공된 화합물, R^2H 및 트리에틸아민의 몰비는 1 : (1 내지 2) : (2 내지 5)이다.

[0048] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 단계 (d) 이전에 단계 (c)를 추가로 포함한다:



[0049]

[0050] (c) 화학식 4로 제공된 화합물을 불활성 용매 중에서 브롬화 시약과 반응시켜 화학식 5로 제공된 화합물을 수득하는 단계로서, 여기서 사용되는 브롬화 시약은 바람직하게 NBS이다.

[0051] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (c)에서의 반응은 개시제의 존재 하에 수행되고, 바람직하게, AIBN의 존재 하에 수행된다.

[0052] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (c)는 NBS 및 AIBN을 혼합한 후에, 화학식 4로 제공된 화합물과 반응시키는 것

을 포함한다.

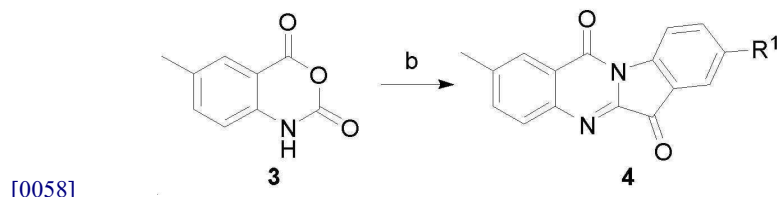
[0053] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (c)에서 명시된 불활성 용매는 디클로로메탄이며, 무수 디클로로메탄이 바람직하다.

[0054] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (c)에서, 상기 반응은 대략 75 내지 85℃에서 수행된다.

[0055] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (c)에서, 상기 반응 시간은 15 내지 17시간이다.

[0056] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (c)에서, 화학식 4로 제공된 화합물, NBS 및 AIBN의 몰비는 1 : 1 : (0.005 내지 0.02)이다.

[0057] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 단계 (c) 이전에 단계 (b)를 추가로 포함한다:

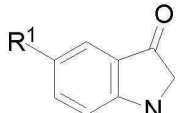


[0059] (b) 화학식 3으로 제공된 화합물을 트리에틸아민의 존재 하에 불활성 용매 중에서 화학식 4로 도식된 화합물을 수득하는 단계.

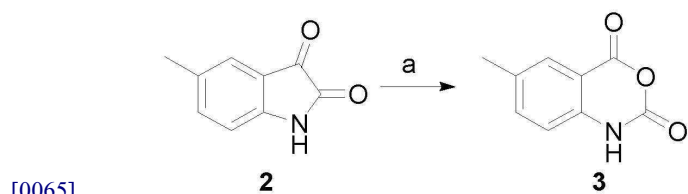
[0060] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (b)에서, 상기 불활성 용매는 톨루엔, 바람직하게 무수 톨루엔에 의해 구성된다.

[0061] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (b)에서, 상기 반응은 대략 100 내지 120℃에서 수행된다.

[0062] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (b)에서, 상기 반응 시간은 3.5 내지 4.5시간이다.

[0063] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (b)에서, 화학식 3으로 제공된 화합물,  및 트리에틸아민의 몰비는 (0.2 내지 0.5) : (0.2 내지 0.5) : 1이다.

[0064] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 단계 (b) 이전에 단계 (a)를 추가로 포함한다:



[0066] (a) 화학식 2로 제공된 화합물을 불활성 용매 중에서 산화제와 반응시켜 화학식 3으로 제공된 화합물을 수득하는 단계; 여기서, 사용되는 산화제는 바람직하게 메타-클로로퍼옥시벤조산이다.

[0067] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (a)에서 명시된 불활성 용매는 디클로로메탄이며, 무수 디클로로메탄이 바람직하다.

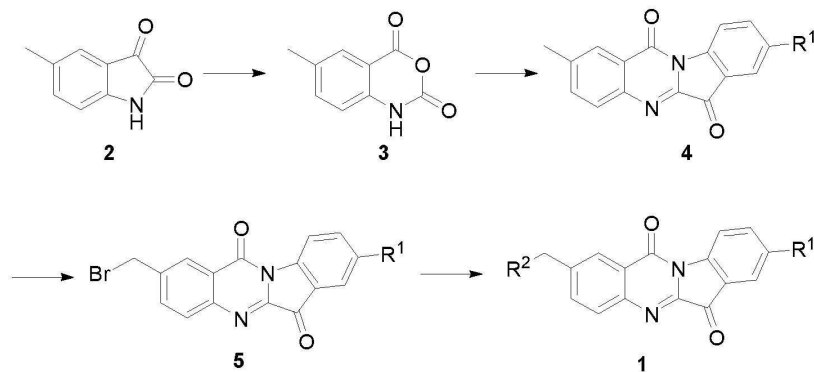
[0068] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (a)에서, 상기 반응은 실온에서 수행된다(10 내지 40℃의 범위가 바람직하다).

[0069] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (a)에서, 상기 반응 시간은 1.5 내지 2.5시간이다.

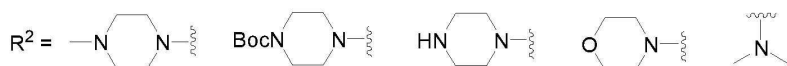
[0070] 다른 바람직한 구현예에서, 단계 (a)에서, 화학식 2로 제공된 화합물 및 산화제의 몰비는 (0.5 내지 1) : 1이다.

[0071] 본 발명의 제4 양태는 본 발명의 제2 양태에서 제공된 바와 같은 N-벤질 트립탄트린 유도체를 제조하는 방법을

제공하며, 여기서, 합성 경로는 하기에 기술된 바와 같다:



$R^1 = H, F$



[0072]

특정 단계는 하기와 같다:

[0073]

(1) 메틸이사토산 무수물(3)의 합성

[0074]

건조된 디클로로메탄 중에 5-메틸이사틴을 현탁시키고, 0℃에서 배치방식으로 메타-클로로퍼옥시벤조산을 첨가하고, 이후에, 실온에서 1.5 내지 2.5시간 동안 교반하고; TLC를 통해 반응이 완료된 것으로서 확인된 후에, 반응에서 형성된 백색 고형물을 여과하고, 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 5-메틸이사토산 무수물을 수득한다. 5-메틸이사틴 및 메타-클로로퍼옥시벤조산의 몰비가 (0.5 내지 1) : 1이라는 것이 주지된다;

[0075]

(2) 2-메틸트립탄트린(4)의 합성

[0076]

건조된 톨루엔 중에 메틸이사토산 무수물, 5-플루오로이사틴 및 트리에틸아민의 혼합물을 현탁시키고, 100 내지 120℃의 온도에서 3.5 내지 4.5시간 동안 가열시키고, 감압 하에 용매를 증류시키고; 디클로로메탄 중에 얻어진 황색 고형물을 용해시키고, 에틸 아세테이트를 첨가하고, 이후에 얻어진 황색 고형물을 여과하고, 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 2-메틸트립탄트린을 수득한다; 메틸이사토산 무수물, 5-플루오로이사틴 및 트리에틸아민의 몰비가 (0.2 내지 0.5) : (0.2 내지 0.5) : 1이라는 것이 주지된다;

[0077]

(3) 2-브로모메틸-트립탄트린(5)의 합성

[0078]

질소 가스의 보호 하에 75 내지 85℃에서 건조된 디클로로메탄 중에 단계 (2)에서 수득된 2-메틸트립탄트린을 용해시키고, 이후에 배치방식으로 NBS 및 AIBN의 혼합물에 첨가한다. 반응 용액을 15 내지 17시간 동안 75℃에서 가열시키고, TLC를 통해 반응이 완료된 것을 확인한다. 반응 용액을 실온까지 냉각시킨 후에, 염 용액으로 세척을 수행하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시켜 농축된 황색 생성물을 수득한다; 2-메틸트립탄트린, NBS 및 AIBN의 몰비가 1 : 1 : (0.005 내지 0.02)라는 것이 주지된다;

[0079]

(4) N-벤질트립탄트린(1)의 합성

[0080]

실온에서 건조된 DMF 중에서 1.5 내지 2.5시간 동안 2-브로모메틸-트립탄트린, 지방족 아민 및 트리에틸아민을 함께 교반하고, TLC를 통해 반응이 완료된 것으로서 확인된 후에, 50 ml의 물을 첨가하고 10 ml의 디클로로메탄을 사용하여 3회의 순차적인 추출을 수행하고; 다음으로, 얻어진 전체 부피의 디클로로메탄을 물로 3회 세척하고, 이후에 무수 황산나트륨 상에서 건조시킨다. 실리카겔을 사용하여 수득된 농축된 황색 고형물의 분리를 수행하여 황색 색상의 N-벤질 트립탄트린 유도체를 수득한다; 2-브로모메틸-트립탄트린, 지방족 아민 및 트리에틸아민의 몰비가 1 : (1 내지 2) : (2 내지 5)라는 것이 주지된다.

[0081]

본 발명의 제5 양태는 병리학적 특징으로서 트립토판의 IDO-매개 대사의 장애를 포함하는 질병을 예방하고/예방하거나 치료하기 위해 디자인된 약물의 제조에서 본 발명의 제1 양태 및 제2 양태에서 제공된 N-벤질 트립탄트린 유도체에 대한 적용을 제공한다.

[0082]

본 발명의 제6 양태는

[0083]

(i) IDO 억제제의 제조;

[0084]

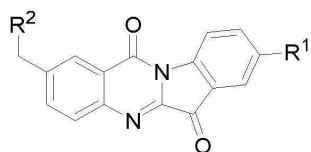
- [0085] (ii) 트립토판 대사 장애-관련 질병의 치료를 위한 약물의 제조; 및
- [0086] (iii) 시험관내에서 IDO의 비-치료학적 억제를 위해 사용되는,
- [0087] 본 발명의 제1 양태 및 제2 양태에 기술된 바와 같은 화학식 1로 제공된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 위한 적용을 제공한다.
- [0088] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 트립토판 대사 장애-관련 질병은 중양, 우울증, 불안, AIDS, 자가면역 질병, 정신 장애, 라임병 감염증, 연쇄상구균 감염증, 신경퇴행성 장애(예를 들어, 알츠하이머병, 헌팅톤병 및 파킨슨병), 우울증, 암(T-세포 백혈병 및 결장 암을 포함함), 안구 질병(예를 들어, 백내장 및 노화 황변화) 및 자가면역 질병의 군으로부터 선택된다.
- [0089] 본 발명의 제7 양태는 약학 조성물로서, (i) 본 발명의 제1 양태 및 제2 양태에서 기술된 바와 같은 화학식 1로 제공된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 뿐만 아니라 (ii) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0090] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 약학 조성물은 트립토판 대사에서의 장애와 관련된 질병의 치료를 위해 사용된다.
- [0091] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 트립토판 대사 장애-관련 질병은 중양, 우울증, 불안, AIDS, 자가면역 질병, 정신 장애, 라임병 감염증, 연쇄상구균 감염증, 신경퇴행성 장애(예를 들어, 알츠하이머병, 헌팅톤병 및 파킨슨병), 우울증, 암(T-세포 백혈병 및 결장 암을 포함함), 안구 질병(예를 들어, 백내장 및 노화 황변화) 및 자가면역 질병의 군으로부터 선택된다.
- [0092] 본 발명의 제8 양태는 IDO 억제제로서, 본 발명의 제1 양태 및 제2 양태에 기술된 바와 같은 화학식 1로 제공된 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 IDO 억제제를 제공한다.
- [0093] 본 발명의 제9 양태는 시험관내에서 IDO 활성을 비-치료학적으로 억제하는 방법으로서, 하기 공정을 포함하는 방법을 제공한다: 본 발명의 제1 양태 및 제2 양태에 기술된 바와 같은 화학식 1로 제공된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 효과적인 억제를 형성시키는 양으로 억제 표적과 접촉시키는 공정.
- [0094] 본 발명의 제10 양태는 트립토판 대사에서의 장애와 관련된 질병을 치료하기 위해 사용되는 약학 조성물을 제조하는 방법으로서, 약학 조성물을 형성시키기 위해 본 발명의 제1 양태 및 제2 양태에 기술된 바와 같은 화학식 1로 제공된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 치료학적 유효량으로 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하는 방법을 제공한다.
- [0095] 본 발명의 제11 양태는 트립토판 대사에서의 장애와 관련된 질병을 치료하는 방법으로서, 본 발명의 제1 양태 및 제2 양태에 기술된 바와 같은 화학식 1로 제공된 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 치료학적 유효량으로 치료 피검체에 적용하는 방법을 제공한다.
- [0096] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 트립토판 대사 장애-관련 질병은 중양, 우울증, 불안, AIDS, 자가면역 질병, 정신 장애, 라임병 감염증, 연쇄상구균 감염증, 신경퇴행성 장애(예를 들어, 알츠하이머병, 헌팅톤병 및 파킨슨병), 우울증, 암(T-세포 백혈병 및 결장 암을 포함함), 안구 질병(예를 들어, 백내장 및 노화 황변화) 및 자가면역 질병의 군으로부터 선택된다.
- [0097] 본 발명의 범위 내에서, 본 발명의 상술된 기술적 특징 및 하기 본문(text)(예를 들어, 실시예)에서 보다 상세하게 기술되는 기술적 특징이 서로 조합되어, 신규하거나 바람직한 기술적 해법을 생성시킬 수 있다는 것이 주지되어야 한다. 이러한 것은 공간 제약으로 인하여 여기에서 철저히 나열하지 못하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0098] 본 발명의 발명자들에 의해 수행된 장기간 및 심층 연구 이후에, 본 발명자들은 매우 특이적인 IDO 억제 활성을 나타내고 IDO 억제 활성(IC₅₀)이 매우 유사한 구조를 갖는 특정의 다른 N-벤질 트립탄트린 유도체에 비해 상기 화합물에서 예상치 못하게 현저하게 개선되고(IC₅₀ 수치는 10배 내지 10³배까지 떨어질 수 있음) 이에 따라 상기 화합물이 양호한 적용 가능성을 갖는 화학식 1로 나타난 바와 같은 구조를 갖는 N-벤질 트립탄트린 유도체의 한 타입을 예상치 못하게 발견하였다. 본 발명은 상술된 발견을 기반으로 하여 발명자들에 의해 완성되었다.
- [0099] 용어

- [0100] 달리 기술하지 않는 한, 본 발명과 관련된 모든 화합물들은 이들의 모든 광학 이성질체 또는 토토머 형태를 포함할 것이다.
- [0101] 용어 "C1-C4 알킬기"는 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2차-부틸, 3차-부틸 또는 유사한 기를 지칭한다.
- [0102] 용어 "C2-C4 알케닐기"는 2 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알케닐기, 예를 들어, 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 또는 유사한 기를 지칭한다.
- [0103] 용어 "C2-C4 알키닐기"는 2 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알키닐기, 예를 들어, 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 또는 유사한 기를 지칭한다.
- [0104] 용어 "5원 내지 7원 헤테로시클릭 고리"는 5 내지 7개의 원소를 함유한 단일 고리를 지칭하는 것으로서, 여기서 상기 고리는 완전히 컨주게이션된 π -전자 시스템을 갖지 않는다. 특히, 본 발명의 문맥에서, 상기 고리는 1 내지 3개의 헤테로원자를 선택적으로 함유할 수 있으며, 여기서, 상기 헤테로원자는 O 및 N을 포함한다. 포화된 고리의 예시적인 예는 피페라지닐 기, 모르폴리노 기, 등을 포함한다.
- [0105] 달리 기술하지 않는 한, 용어 "치환"은 제공된 기 상에 존재하는 하나 이상의 수소 원자가 C1-C4 알킬기, C1-C4 할로알킬기, 아미노-보호기(바람직하게, t-부톡시카보닐) 및 할로겐의 군으로부터 선택된 치환체에 의해 치환되는 경우를 지칭한다.
- [0106] 용어 "할로겐"은 F, Cl, Br 및 I를 지칭한다.
- [0107] **N-벤질 트립탄트린 유도체**
- [0108] 트립탄트린은 인돌 퀴나졸린 알칼로이드의 하나의 타입으로서, 이는 화학명 인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온을 갖는다. 트립탄트린은 이의 순수한 형태의 황색 니들형 결정이고, 인디고(indigo) 과(family), 예를 들어, 스트로빌란테스 쿠시아(*Strobilanthes cusia*), 폴리고눔 틱토토리움(*Polygonum tinctorium*) 및 이사티스 틱토토리아(*Isatis tinctoria*)에 속하는 식물에서 주로 발견될 수 있다. 대안적으로, 이는 특정 미생물을 함유한 발효 브로쓰(fermentation broth)로부터 추출될 수 있다.
- [0109] 트립탄트린이 인디고 식물, 뿐만 아니라 미생물의 대사 산물로부터 추출될 수 있지만, 분리 공정은 길며, 수율은 낮아서, 연구-관련 및 임상 약물 수요를 만족시키기에는 어렵다. 단지 빠르고, 높은 수율이고 단순하고 용이하게 이용 가능한 합성 경로를 탐구함으로써, 추가 연구, 개발 및 적용을 가능하게 하는, 트립탄트린 적용을 위한 보다 많은 자원(resource)이 제공될 수 있다.
- [0110] 현존하는 기술의 단점들을 극복하기 위하여, 본 발명은 이용가치를 갖는 활성 화합물을 얻는 목적과 함께, 트립탄트린의 용해도 및 약리학적 활성을 개선시키기 위해 트립탄트린을 구조적으로 개질시킨다. 본 발명과 관련된 조사 및 약리학적 시험에서는, 수용성 기를 트립탄트린 분자에 도입함으로써 형성된 N-벤질 트립탄트린 유도체가 IDO 억제제로서 더욱 효율적인 가능성을 가져서, 다양한 약리학적 활성, 예를 들어, 항-박테리아, 항-염증, 및 항-종양 활성을 나타내고, 광범위한 적용 가능성을 갖는다는 것을 나타낸다. 또한, 트립탄트린 유도체를 합성하기 위한 통상적인 방법과 비교하여, 본 발명에 의해 구성된 합성 방법은 온화한 조건을 사용하고 고수율을 형성하면서, 작업이 단순하다는 장점을 제공하여, 이를 산업적 생산을 위해 더욱 적합하게 만든다.
- [0111] 상세하게, 본 발명에 의해 구성된 N-벤질 트립탄트린 유도체는 하기 화학식 1에 나타난 바와 같은 일반 구조를 갖는다:

[0112] [화학식 1]



[0113]

[0114] 상기 식에서,

[0115] R¹은 수소 또는 불소에 해당하고;

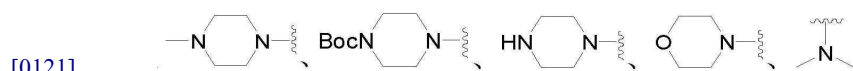
[0116] R^2 는 $-NR^3R^4$ 에 해당하고;

[0117] 여기서, R^3 및 R^4 는 각각 독립적으로 C1-C4 알킬기의 군으로부터 선택되거나; R^3 및 R^4 는 인접한 질소 원자와 함께 치환되거나 비치환된 5원 내지 6원 포화된 고리를 형성하며, 여기서, 상기 5원 내지 6원 포화된 고리는 적어도 하나의 질소 원자, 뿐만 아니라, 0 및 N의 군으로부터 선택된 선택적 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고;

[0118] 여기서, 치환은 제공된 기 상에 존재하는 하나 이상의 수소 원자(바람직하게, 질소 원자 상에 존재하는 수소 원자)가 C1-C4 알킬기, t-부톡시카보닐기 및 할로겐의 군으로부터 선택된 치환체에 의해 치환되는 경우를 지칭한다.

[0119] 바람직하게, R^2 는 질소 원자, 뿐만 아니라, 0 및 N의 군으로부터 선택된 헤테로원자를 지녀야 한다.

[0120] 바람직하게, R^2 는 하기 군으로부터 선택된 치환되거나 비치환된 기이어야 한다:



[0122] 상기 식에서, "~~~~~"은 연결 부위를 지시하며;

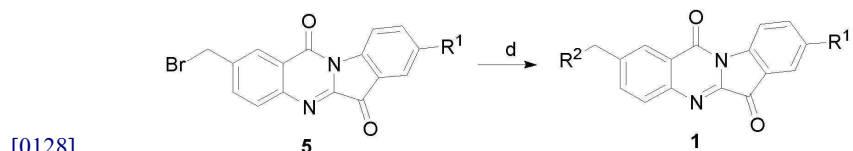
[0123] 여기서, 치환은 제공된 기 상에 존재하는 하나 이상의 수소 원자가 C1-C4 알킬기 및 할로겐의 군으로부터 선택된 치환체에 의해 치환되는 경우를 지칭한다.

[0124] 본 발명에 의해 기술된 화합물, 이의 토트머 형태, 구조적 유사체 또는 약제학적으로 허용되는 염, 뿐만 아니라 상기 화합물, 이의 구조적 유사체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 적어도 하나의 경우를 함유하는 조성물은 모두 IDO를 억제하기 위해, 뿐만 아니라 병리학적 특징으로서 IDO-매개 트립토판 대사를 포함하는 질병의 치료 및/또는 예방을 위한 적용에서 사용될 수 있다. 이러한 질병은 종양, 암, 안구 질병, 자가면역 질병, 정신 장애, 우울증 및 불안을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 상기 적용은 시험관내 및 생체내 적용, 뿐만 아니라, 약물, IDO 억제제 및 약학 조성물의 제조에서의 적용을 포함한다. 특히, 본 발명의 발명자들은, 특히 바람직한 구현예에서, R^1 이 F에 해당할 때, 화합물이 최적의 IDO 억제 활성을 나타낸다는 것을 발견하였다.

[0125] N-벤질 트립탄트린 유도체의 제조

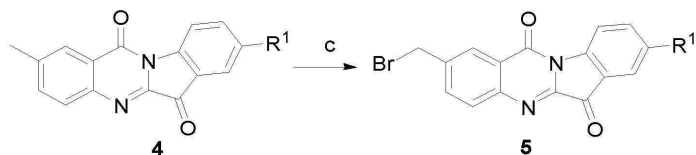
[0126] 최근에, 약제 화학자들은 트립탄트린 및 이의 유도체의 합성을 조사하기 위해 광범위하게 노력하였으며, 트립탄트린을 합성하기 위해 사용되는 주요 방법은 이사틴과 이사토산 무수물의 반응으로서; 상기 방법은 단순하고, 고수율을 제공하고, 온화한 반응 조건을 사용한다. 또한, 다양한 상이한 작용성 트립탄트린을 합성하기 위해 출발 물질 이사틴 및 이사토산 무수물에 추가적인 작용기를 첨가하는 것이 가능하다. 현재, 이사틴을 합성하기 위해 사용되는 주요 방법은 수성 염산 중에서 클로랄 수화물, 히드록실아민 및 아닐린을 반응시켜 옥심을 형성시키고, 이후에, 진한 황산 하에서 고리 폐쇄를 유도하여 이사틴을 수득하는 것을 포함하며; 상기 방법은 할로겐 및 알킬-함유 트립탄트린의 합성을 위해 매우 적합하고, 고수율을 제공한다. 그러나, 이사틴을 합성하는 공정 동안 상기 활성 기가 부산물 반응을 용이하게 형성시킨다는 사실로 인해, 활성 기를 함유한 트립탄트린을 형성시키기 위해 이러한 방법을 사용하는 것이 어렵다.

[0127] 오랜 조사 노력 이후에, 본 발명의 발명자들은 활성 기를 갖는 트립탄트린을 제조하기 위해 사용될 수 있는 합성 방법을 성공적으로 개발하였다. 특히, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:



[0129] (d) 화학식 5로 제공된 화합물(2-브로모메틸-트립탄트린)을 트리에틸아민의 존재 하에 불활성 용매 중에 R^2H 와 반응하여 화학식 1로 나타낸 화합물을 수득한다.

[0130] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 하기 단계를 추가로 포함한다:

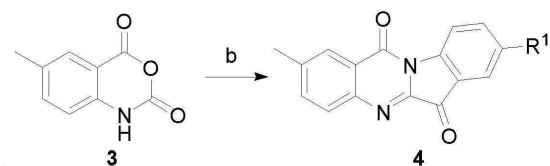


[0131]

[0132] (c) 화학식 4로 제공된 화합물(2-메틸트립탄트린)을 불활성 용매 중에 브롬화 시약과 반응시켜 화학식 5로 제공된 화합물을 수득한다; 여기서, 사용되는 브롬화 시약은 바람직하게, NBS이다.

[0133] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 브롬화 반응은 AIBN과 같은 개시제의 존재 하에 수행된다. 바람직한 구현예는 NBS 및 AIBN을 혼합하고, 이후에 화학식 4로 제공된 화합물과 반응시키는 것을 포함한다.

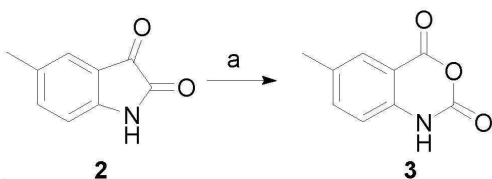
[0134] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 하기 단계를 추가로 포함한다:



[0135]

[0136] (b) 화학식 3으로 제공된 화합물을 트리에틸아민의 존재 하에 불활성 용매 중에서 화학식 4에 나타낸 화합물을 수득한다.

[0137] 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 하기 단계를 추가로 포함한다:

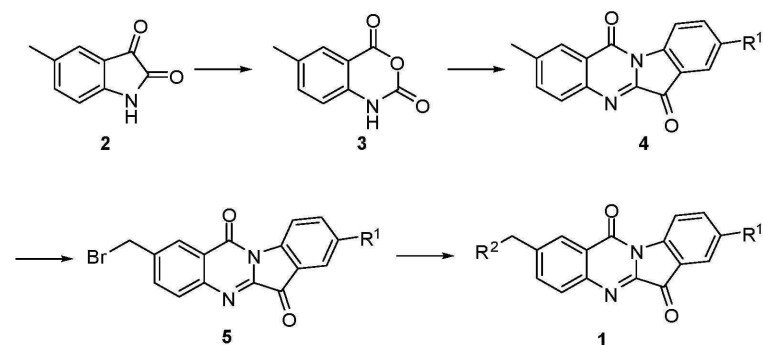


[0138]

[0139] (a) 화학식 2로 제공된 화합물을 불활성 용매 중에 산화제와 반응시켜 화학식 3으로 제공된 화합물을 수득한다; 여기서, 사용된 산화제는 바람직하게 메타-클로로퍼옥시벤조산이다.

[0140] 상술된 단계에서 제공된, 반응 시간, 반응 온도 등은 실제 조건을 기준으로 하여 조정될 수 있다; 예를 들어, 본 분야에서 일반적인 방법(예를 들어, TLC 검정)은 반응의 종료를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 각 단계에서 사용되는 용매는 어떠한 방식으로든 특별히 제한되지 않으며, 본 분야에 대해 일반적인 반응물들과 반응하지 않는 불활성 용매가 사용될 수 있다. 상술된 반응식이 본 출원에 기술될 때, 각 단계에서 특정 조건이 본 분야 내의 현존하는 기술을 고려하여 당업자에 의해 확립될 수 있다는 것으로 이해되어야 한다.

[0141] 본 발명에 의해 구성된 N-벤질 트립탄트린 유도체를 제조하는 방법들 중에서, 최적의 합성 경로는 하기에 제공된다:

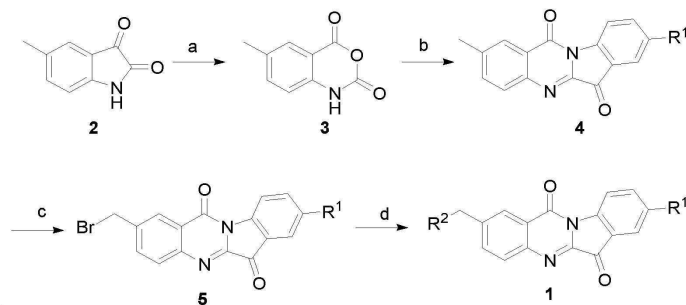


[0142]

[0143] (1) 메틸이사토산 무수물(3)의 합성

- [0144] 건조된 디클로로메탄 중에 5-메틸이사틴을 현탁시키고, 0℃에서 배치방식으로 메타-클로로퍼옥시벤조산을 첨가하고, 이후에, 실온에서 1.5 내지 2.5시간 동안 교반하고; TLC를 통해 반응이 완료된 것으로서 확인된 후에, 반응에서 형성된 백색 고형물을 여과하고, 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 5-메틸이사틴 무수물을 수득한다; 5-메틸이사틴 및 메타-클로로퍼옥시벤조산의 몰비가 (0.5 내지 1) : 1이라는 것이 주지된다;
- [0145] (2) 2-메틸트립탄트린(4)의 합성
- [0146] 건조된 톨루엔 중에 메틸이사토산 무수물, 5-플루오로이사틴 및 트리에틸아민의 혼합물을 현탁시키고, 100 내지 120℃의 온도에서 3.5 내지 4.5시간 동안 가열시키고, 감압 하에 용매를 증류시키고; 디클로로메탄 중에 얻어진 황색 고형물을 용해시키고, 에틸 아세테이트를 첨가하고, 이후에 얻어진 황색 고형물을 여과하고, 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 2-메틸트립탄트린을 수득한다; 메틸이사토산 무수물, 5-플루오로이사틴 및 트리에틸아민의 몰비가 (0.2 내지 0.5) : (0.2 내지 0.5) : 1이라는 것이 주지된다;
- [0147] (3) 2-브로모메틸-트립탄트린(5)의 합성
- [0148] 질소 가스의 보호 하에 75 내지 85℃에서 건조된 디클로로메탄 중에 단계 (2)에서 수득된 2-메틸트립탄트린을 용해시키고, 이후에 배치방식으로 NBS 및 AIBN의 혼합물에 첨가한다. 반응 용액을 15 내지 17시간 동안 75℃에서 가열시키고, TLC를 통해 반응이 완료된 것을 확인한다. 반응 용액을 실온까지 냉각시킨 후에, 염 용액으로의 세척을 수행하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시켜 농축된 황색 생성물을 수득한다; 2-메틸트립탄트린, NBS 및 AIBN의 몰비가 1 : 1 : (0.005 내지 0.02)라는 것이 주지된다;
- [0149] (4) N-벤질트립탄트린(1)의 합성
- [0150] 실온에서 건조된 DMF 중에서 1.5 내지 2.5시간 동안 2-브로모메틸-트립탄트린, 지방족 아민 및 트리에틸아민을 함께 교반하고, TLC를 통해 반응이 완료된 것으로서 확인된 후에, 50 ml의 물을 첨가하고 10 ml의 디클로로메탄을 사용하여 3회의 순차적인 추출을 수행하고; 다음으로, 얻어진 전체 부피의 디클로로메탄을 물로 3회 세척하고, 이후에 무수 황산나트륨 상에서 건조시킨다. 실리카겔을 사용하여 수득된 농축된 황색 고형물의 분리를 수행하여 황색 색상의 N-벤질 트립탄트린 유도체를 수득한다. 여기에서, 2-브로모메틸-트립탄트린, 지방족 아민 및 트리에틸아민의 몰비가 1 : (1 내지 2) : (2 내지 5)라는 것이 주지된다.
- [0151] 상기 화학식에서, 각 기에 대한 정의는 상기에 제공된 바와 같다.
- [0152] **IDO 억제제 및 이의 적용**
- [0153] 본 발명에 의해 구성된 N-벤질 트립탄트린 유도체가 매우 특이적인 IDO 억제 활성을 나타낸다는 사실에 기인하여, 이는 병리학적 특징으로서 트립토판의 IDO-매개 대사의 장애를 포함하는 질병(예를 들어, 종양)을 치료하고/치료하거나 예방하기 위해 사용되는 약물의 제조에서 사용될 수 있다.
- [0154] 트립토판 대사의 장애를 포함하는 상기 질병은 본 분야 내에 공지되거나 공지되지 않은 병리학적 특징으로서 트립토판의 IDO-매개 대사의 장애를 포함하는 임의의 질병을 포함하며, 바람직하게, 상기 트립토판 대사 장애-관련 질병은 종양, 우울증, 불안, AIDS, 자가면역 질병, 정신 장애, 라임병 감염증, 연쇄상구균 감염증, 신경퇴행성 장애(예를 들어, 알츠하이머병, 헌팅톤병 및 파킨슨병), 우울증, 암(T-세포 백혈병 및 결장 암을 포함함), 안구 질병(예를 들어, 백내장 및 노화 황변화) 및 자가면역 질병의 군으로부터 선택된다.
- [0155] **현존하는 기술과 비교하여, 본 발명은 하기 주요 장점들을 제공한다:**
- [0156] (1) 본 발명은 유사한 구조를 갖는 화합물과 비교하여, 활성에 있어서 놀라운 개선을 나타내는 신규한 구조를 갖는 IDO 억제제의 한 부류를 제공한다. 상기 화합물은 IDO 억제 활성을 형성시킬 뿐만 아니라, 이러한 것은 동시에 추가의 개질된 약제학적 중간체로서 제공할 수 있고, 신규한 암 치료 약물의 개발에서 잠재적인 이용가치를 갖는다.
- [0157] (2) 본 발명은 또한, N-벤질 트립탄트린 유도체의 합성 방법을 제공하며, 상기 합성 경로는 작업이 단순하며 온화한 반응 조건을 사용하고 용매 사용을 감소시키고 오염물, 등을 감소시키고 대량 생산을 위해 적합하다는 장점들을 제공한다.
- [0158] 하기 섹션에서, 본 발명은 특정 구현에 의해 추가로 기술될 것이다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하는 것으로서, 본 발명의 범위를 제한하도록 의도되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 특정 조건을 특정하지 않는 하기 구현예에 포함된 실험 방법을 위하여, 통상적인 조건 또는 제조업체에 의해 제안된 조건이 사용된다. 달리 명시하지 않는 한, 백분율 및 일부 양은 중량 기준으로 계산된 것이다. 달리 기술하지 않는 한, 하기 구현예에서 제

공된 시약 및 출발 물질은 상업적으로 입수 가능한 제품에 해당한다. 특정 합성 경로는 하기에 제공되어 있다:



각 단계에 대한 반응 조건:

단계 a. m-CPBA(2 당량), CH₂Cl₂, RT;

단계 b. Et₃N, 톨루엔, 환류, 75%;

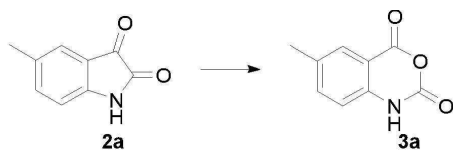
단계 c. NBS, AIBN, CH₂Cl₂, 환류;

단계 d. K₂CO₃, KI, DMF, 아민.

구현예 1 - 2-((디메틸아미노)메틸)-8-플루오로-인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1a)의 합성

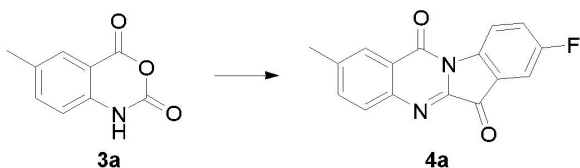
특정 단계는 하기와 같다:

단계 (1): 6-메틸-1H-벤조[d][1,3]옥사진-1,4-디온(3a)의 합성



화합물 2a(500 mg, 3 mmol)를 10 ml의 건조된 디클로로메탄 중에 현탁시키고, 그 후에, 메타-클로로퍼옥시벤조산(1.3 g, 6 mmol, 75%)을 0℃에서 배치방식으로 첨가하였다. TLC는 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 후에 반응이 완료되었다는 것을 나타내었으며, 그 후에, 반응에서 형성된 백색 고형물을 여과하고, 3회의 세척을 10 ml 에틸 아세테이트로 수행하여 화합물 3a(350 mg, 65%)를 수득하였다.

단계 (2): 8-플루오로-2-메틸-인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(4a)의 합성

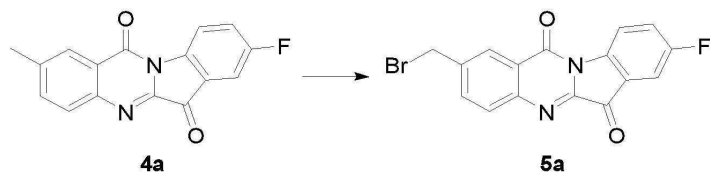


화합물 3a(1 g, 5.6 mmol), 5-플루오로이사틴(0.93 g, 5.6 mmol) 및 트리에틸아민(1.5 ml, 11.2 mmol)의 혼합물을 건조된 톨루엔(10 ml) 중에 현탁시키고, 110℃에서 4시간 동안 가열하였다. 용매를 감압 하에서 증류하고, 이에 따라 수득된 황색 고형물을 2 ml의 디클로로메탄 중에 용해시키고, 그 후에, 2 ml의 에틸 아세테이트를 첨가하고, 황색 고형물을 여과하고, 2 ml 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 황색 고체 화합물, 즉 화합물 4a(1.1 g, 75%)를 수득하였다.

특징분석 데이터:

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).

[0175] 단계 (3): 2-(브로모메틸)-8-플루오로-인돌[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(5a)의 합성



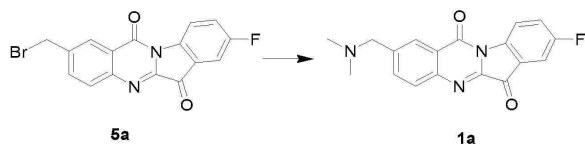
[0176]

[0177] NBS(381 mg, 2.14 mmol) 및 AIBN(29 mg, 0.18 mmol)의 혼합물을 질소 가스의 보호 하에 80℃의 온도에서 3 배치로 화합물 4a(500 mg, 1.78 mmol)를 함유한 디클로로메탄 용액(3.6 ml)에 첨가하였다. 반응 용액을 80℃까지 16시간 동안 가열하였다. 반응이 완료된 것을 TLC로 확인한 후에, 반응 용액을 실온까지 냉각시키고, 염 용액으로 세척하고, 무수 황산나트륨 상에서 건조시켜 농축된 황색 생성물(5a)을 수득하였다.

[0178] 특징분석 데이터:

[0179] ^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).

[0180] 단계 (4): 2-((디메틸아미노)메틸)-8-플루오로인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1a)의 합성



[0181]

[0182] 화합물 5a(500 mg, 1.39 mmol), 디메틸아민 히드로클로라이드(227 mg, 2.78 mmol), 칼륨 요오다이드(10 mg) 및 트리에틸아민(0.5 ml)을 실온에서 2시간 동안 5 ml의 DMF 용액 중에서 교반하였다. 반응이 완료된 것을 TLC로 확인한 후에, 50 ml의 물을 첨가하고, 3회의 연속적인 추출을 10 ml의 에틸 아세테이트를 사용하여 수행하였고, 그 후에, 유기상을 물로 3회 세척하고, 건조를 무수 황산나트륨 상에서 수행하였다. 수득된 농축된 황색 고형물을 실리카겔 컬럼을 이용하여 분리하여 황색 화합물(1a)을 수득하였다.

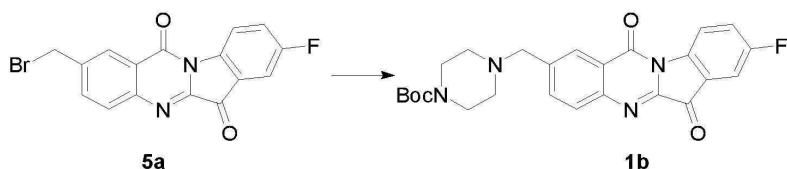
[0183] 특징분석 데이터:

[0184] ^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).

[0185] 구현예 2 - 4-((8-플루오로-6,12-디옥소-6,12-디히드록시-인돌로[2,1-b]퀴놀린-2-일)메틸)피페라진-1-카복실산 3차-부틸 에스테르(1b)의 합성

[0186] 단계 (1) 내지 단계 (3)은 구현예 1에서 기술된 바와 같다.

[0187] 단계 (4): 4-((8-플루오로-6,12-디옥소-6,12-디히드록시-인돌로[2,1-b]퀴놀린-2-일)메틸)피페라진-1-카복실산 3차-부틸 에스테르(1b)의 합성



[0188]

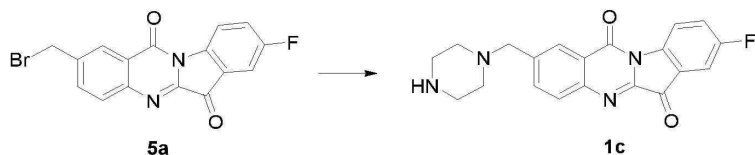
[0189] 화합물 5a(500 mg, 1.39 mmol), N-Boc피페라진(546 mg, 2.78 mmol), 칼륨 요오다이드(10 mg) 및 트리에틸아민(0.5 ml)을 실온에서 2시간 동안 5 ml의 DMF 용액 중에서 교반하였다. 반응이 완료된 것을 TLC로 확인한 후에, 50 ml의 물을 첨가하고, 3회의 연속적인 추출을 10 ml의 에틸 아세테이트를 사용하여 수행하였고, 그 후에, 유기상을 물로 3회 세척하고, 건조를 무수 황산나트륨 상에서 수행하였다. 수득된 농축된 황색 고형물을 실리카겔

컬럼을 이용하여 분리하여 황색 화합물(1b)을 수득하였다.

특징분석 데이터:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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).

구현예 3 - 8-플루오로-2-(피페라진-1-일메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1c)의 합성



단계 (1) 내지 단계 (3)은 구현예 1에 기술된 바와 같다.

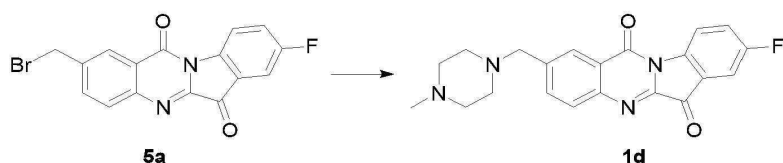
단계 (4): 8-플루오로-2-(피페라진-1-일메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1c)의 합성

화합물 5a(500 mg, 1.39 mmol), N-Boc피페라진(546 mg, 2.78 mmol), 칼륨 요오다이드(10 mg) 및 트리에틸아민 (0.5 ml)을 실온에서 2시간 동안 5 ml의 DMF 용액 중에서 교반하였다. 반응이 완료된 것을 TLC로 확인한 후에, 50 ml의 물을 첨가하고, 3회의 연속적인 추출을 10 ml의 에틸 아세테이트를 사용하여 수행하였고, 그 후에, 유기상을 물로 3회 세척하고, 건조를 무수 황산나트륨 상에서 수행하여 농축된 황색 고형물을 수득하였다. 황색 고형물을 3 ml의 디클로로메탄 중에 용해시키고, 추가 1 ml의 트리플루오아세트산을 실온에서 첨가하였다. 반응 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하고, 반응이 완료된 것을 TLC(CH₂Cl₂/MeOH=10/1, R_f 0.2)로 확인한 후에, 용매를 감압 하에 제거하고, 10 ml의 보호 NaHCO₃ 용액을 첨가하고, 에틸 아세테이트(10 ml x 3)를 사용하여 추출을 수행하고, 그 후에, 유기상을 염 용액으로 세척하고, 건조를 수행하여 농축된 고형물을 수득하고, 이를 실리카겔 컬럼을 이용하여 분리하여 황색 고형물 화합물(1c)을 수득하였다.

특징분석 데이터:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 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).

구현예 4 - 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b] 퀴나졸린-6,12-디온(1d)의 합성



단계 (1) 내지 단계 (3)은 구현예 1에 기술된 바와 같다.

단계 (4): 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1d)의 합성

화합물 5a(220 mg, 0.61 mmol), N-메틸피페라진(122 mg, 1.22 mmol), 칼륨 요오다이드(10 mg) 및 트리에틸아민 (0.5 ml)을 실온에서 2시간 동안 5 ml의 DMF 용액 중에서 교반하였다. 반응이 완료된 것을 TLC로 확인한 후에, 50 ml의 물을 첨가하고, 3회의 연속적인 추출을 10 ml의 에틸 아세테이트를 사용하여 수행하였고, 그 후에, 유기상을 물로 3회 세척하고, 건조를 무수 황산나트륨 상에서 수행하였다. 수득된 농축된 황색 고형물을 실리카겔 컬럼을 이용하여 분리하여 황색 화합물(1d)을 수득하였다.

특징분석 데이터:

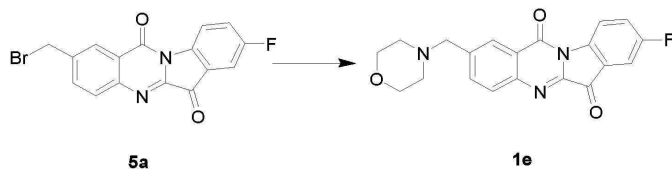
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.65 (dd, *J* = 8.8, 4.0 Hz, 1H), 8.38 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.87 (dd, *J* = 8.3, 1.8 Hz, 1H), 7.59 (dd, *J* = 6.5, 2.6 Hz, 1H), 7.50 (td, *J* = 8.7, 2.7 Hz,

1H), 3.50 (s, 2H), 2.59 (s, 8H), 2.38 (s, 3H).

[0206] **구현예 5 - 8-플루오로-2-((모르폴리노-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1e)의 합성**

[0207] 단계 (1) 내지 단계 (3)은 구현예 1에 기술된 바와 같다.

[0208] **단계 (4): 8-플루오로-2-((모르폴리노-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1e)의 합성**



[0209]

[0210] 화합물 5a(500 mg, 1.39 mmol), 모르폴린(242 mg, 2.78 mmol), 칼륨 요오다이드(10 mg) 및 트리에틸아민(0.5 ml)을 실온에서 2시간 동안 5 ml의 DMF 용액 중에서 교반하였다. 반응이 완료되었음을 TLC(EtOAc, R_f 0.5)로 확인한 후에, 50 ml의 물을 첨가하고, 3회의 연속적인 추출을 10 ml의 에틸 아세테이트를 사용하여 수행하였고, 그 후에, 유기상을 물로 3회 세척하고, 건조를 무수 황산나트륨 상에서 수행하여 농축된 황색 고형물을 수득하고, 이를 실리카겔 컬럼(EtOAc)을 이용하여 분리하여 황색 화합물(1e)을 수득하였다.

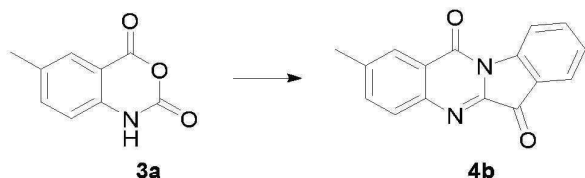
[0211] 특징분석 데이터:

[0212] ^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).

[0213] **구현예 6 - 2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1f)의 합성**

[0214] 단계 (1)은 구현예 1에 기술된 바와 같다.

[0215] **단계 (2): 2-메틸-인돌[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(4b)의 합성**



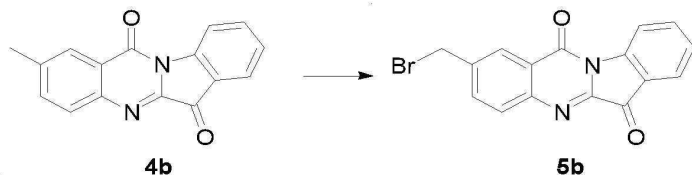
[0216]

[0217] 화합물 3a(1.7 g, 9.6 mmol), 이사틴(1.4 g, 9.6 mmol) 및 트리에틸아민(2.7 ml, 19.2 mmol)의 혼합물을 건조된 톨루엔(18 ml) 중에 현탁시키고, 110°C에서 4시간 동안 가열하였다. 반응 용액을 실온까지 냉각시킨 후에, 얻어진 황색 고형물을 여과하고, 2 ml의 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 황색 고형물 화합물(4b)(0.5 g, 20%)을 수득하였다.

[0218] 특징분석 데이터:

[0219] ^1H 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).

[0220] **단계 (3): 2-메틸-인돌[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(5b)의 합성**

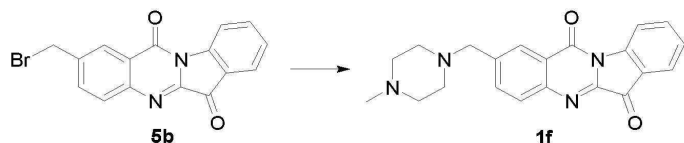


[0221]

[0222] NBS(381 mg, 2.14 mmol) 및 AIBN(29 mg, 0.18 mmol)의 혼합물을 질소 가스의 보호 하에 80°C의 온도에서 3 배치로 화합물 4b(262 mg, 1.0 mmol)를 함유한 디클로로메탄 용액(5 ml) 중에 첨가하였다. 반응 용액을 실온으로

냉각시킨 후에, 세척을 염 용액으로 수행하고, 건조를 무수 황산나트륨 상에서 수행하여 농축된 황색 생성물 (5b)(245 mg, 91%)을 수득하였다.

[0223] 단계 (4): 2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(1f)의 합성



[0224]

[0225] 화합물 5b(220 mg, 0.61 mmol), N-메틸피페라진(116 mg, 1.616 mmol), 칼륨 요오다이드(10 mg) 및 트리에틸아민(0.5 ml)을 실온에서 2시간 동안 5 ml의 DMF 용액 중에서 교반하였다. 반응이 완료된 것을 TLC로 확인한 후에, 50 ml의 물을 첨가하고, 3회의 연속적인 추출을 10 ml의 에틸 아세테이트를 사용하여 수행하였고, 그 후에, 유기상을 물로 3회 세척하고, 건조를 무수 황산나트륨 상에서 수행하였다. 수득된 농축된 황색 고형물을 실리카겔 컬럼을 이용하여 분리하여 황색 화합물(1f)(120 mg, 55%)을 수득하였다.

[0226] 특징분석 데이터:

[0227] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) 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).

[0228] 구현예 7 - IDO 억제 활성의 검출

[0229] 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현되는 인간 IDO 유전자를 함유한 플라스미드의 제작 동안, 추출 및 정제를 문헌[Littlejohn, et al. (Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, et al. J. Biol. Chem. 1988, 263, 2041 - 2048)]에 보고된 방법에 따라 수행하였다. 각 화합물에 대한 IDO 억제 활성을 문헌에 기술된 방법을 이용하여 검출하였다. 50 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.5), 40 mM 비타민 C, 400 $\mu\text{g/ml}$ 카탈라제, 20 μM 메틸렌 블루 및 IDO 효소를 96-웰 플레이트에서 함께 혼합하였다. 기질 L-트립토판 및 시험될 샘플을 이후에 상술된 혼합물에 첨가하였다. 반응을 37°C에서 60분 동안 수행하고, 그 후에, 30%(w/v) 트리클로로아세트산을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 96-웰 플레이트를 15분 동안 65°C까지 가열시켜 포르밀카이누레닌에서 카이누레닌으로의 전환을 완료하였고, 원심분리를 6000 g로 5분 동안 수행하였다. 100 μl 의 상청액을 각 웰로부터 제거하고, 새로운 96-웰 플레이트로 옮기고, 그 후에, 2%(w/v) p-(디메틸아미노)벤즈알데하이드의 아세트산 용액을 첨가하고, 카이누레닌과의 얻어진 반응의 결과로서 형성된 황색 색상은 마이크로플레이트 판독기에서 490 nm에서 관찰될 수 있다; 실험 결과는 표 1에 나타내었다.

[0230] 구현예 8 - 억제제가 가역적인지의 여부를 결정함

[0231] 일련의 상이한 효소 농도를 고정된 농도의 억제제를 고려하여 시험하였으며, 얻어진 반응 속도를 측정하였다. 효소 농도에 대한 반응 속도의 그래프(v - [E])를 플로팅하였으며, 얻어진 곡선의 특징을 기반으로 하여 억제제가 가역적인지의 여부를 결정하는 것이 가능하였다.

[0232] 반응 조건: 50 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.5), 40 mM 비타민 C, 400 $\mu\text{g/ml}$ 카탈라제, 20 μM 메틸렌 블루 및 300 mM의 기질 L-트립토판 또는 동시에 100 mM의 억제제를 500 μl 반응 시스템에 첨가하고, 그 후에, 혼합물을 37°C에서 5분 동안 유지하였고, 그 후에, 다양한 부피의 IDO 효소를 상술된 혼합물에 첨가하고, 얻어진 반응을 37°C에서 30분 동안 진행하였고, 200 μl 의 30%(w/v) 트리클로로아세트산을 첨가하여 반응을 종결시켰다; 반응 시스템을 15분 동안 65°C까지 가열시켜 포르밀카이누레닌에서 카이누레닌으로의 전환을 완료하였고, 그 후에, 원심분리를 12,000 rpm에서 10분 동안 수행하였고, 상청액을 제거하고, 동일한 부피의 2%(w/v) p-디메틸아미노벤즈알데하이드 아세트산 용액과 혼합하고, 측정을 490 nm의 파장에서 플레이트 판독기를 이용하여 수행하였다. v - [E]를 플로팅하고, 실험 결과는 표 1에 나타내었다.

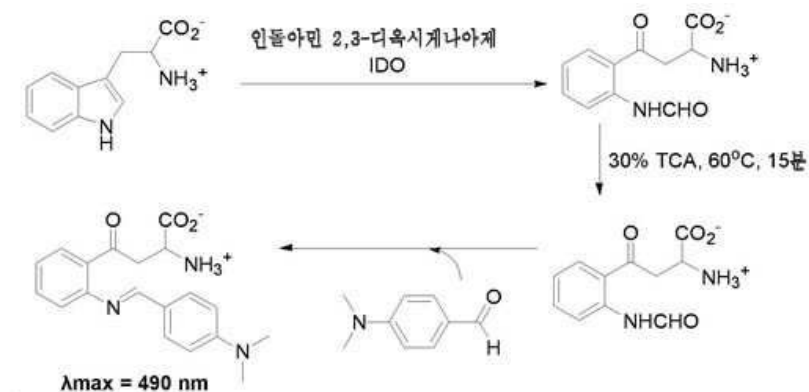
[0233] 구현예 9 - 억제제 타입의 결정 및 K_i 값 측정

[0234] 50 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.5), 40 mM 비타민 C, 400 $\mu\text{g/ml}$ 카탈라제, 20 μM 메틸렌 블루 및 100, 250 또는 300 mM의 기질 L-트립토판을 500 μl 의 반응 시스템에 첨가하고, 다양한 농도의 화합물을 제공된 단일 기질 농도에 대해 각 반응 시스템에 첨가하고, 그 후에, 혼합물을 37°C에서 5분 동안 유지시키고, 그 후에, 10 μl 의 IDO(대략 20 nM)를 상술된 혼합물에 첨가하고, 얻어진 반응을 37°C에서 30분 동안 진행시키고, 200 μl 의

30%(w/v) 트리클로로아세트산을 첨가하여 반응을 종결시켰다; 반응 시스템을 수조 내에서 15분 동안 65℃까지 가열시켜 포르밀카이누레닌에서 카이누레닌으로의 전환을 완료하였고, 그 후에, 원심분리를 12,000 rpm에서 10분 동안 수행하였고, 상청액을 제거하고, 동일한 부피의 2%(w/v) p-디메틸아미노벤즈알데하이드 아세트산 용액과 혼합하고, 측정을 490 nm의 파장에서 플레이트 판독기를 이용하여 수행하였다. 디xon 플롯(Dixon plot)(1/v - [I])을 이용하여 화합물에 의해 구성된 억제제의 타입을 결정하였으며, S/v - [I]의 플롯을 형성시켜 억제제 Ki 값을 획득하였다; 실험 결과는 표 1에 나타내었다.

[0235] **구현예 10 - 중앙 유효 억제 농도 IC₅₀의 측정**

[0236] 50 mM 칼륨 포스페이트 완충제(pH 6.5), 40 mM 비타민 C, 400 µg/ml 카탈라제, 20 µM 메틸렌 블루, 150 mM의 기질 L-트립토판 및 억제제를 함께 혼합하였다. 100, 200, 400, 600, 800, 1000 또는 1200 µM의 억제제를 함유한 혼합물을 5분 동안 37℃까지 가열시키고, 이후에, IDO 효소를 상기 혼합물에 첨가하였다. 반응을 37℃에서 30분 동안 진행하였고, 그 후에, 200 µl의 30%(w/v) 트리클로로아세트산을 첨가하여 반응을 종결하였다; 반응 시스템을 15분 동안 65℃까지 가열시켜 포르밀카이누레닌에서 카이누레닌으로의 전환을 완료하였고, 그 후에, 원심분리를 12,000 rpm에서 10분 동안 수행하였고, 200 µl의 상청액을 제거하고, 동일한 부피의 2%(w/v) p-디메틸아미노벤즈알데하이드 아세트산 용액과 혼합하고, 카이누레닌과의 얻어진 반응의 결과로서 형성된 황색 색상은 마이크로플레이트 판독기에서 490 nm의 파장에서 관찰될 수 있었고; 이에 따라 얻어진 결과를 IC₅₀ 계산 소프트웨어에 제공하여 억제제 IC₅₀ 값을 획득하고; 실험 결과는 표 1에 나타내었다.



[0237]

[0238] **구현예 11 - 중앙 유효 억제 농도 IC₅₀(세포)의 측정**

[0239] 리포솜 리포펙타민 2000을 사용하여 HEK 293 세포를 pcDNA3.1-hIDO 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 세포 수준에서 억제 활성을 측정할 때, HEK293 세포 배양 배지는 50 U/mL 페니실린, 50 U/mL 스트렙토마이신 및 10% FBS를 함유한 고 글루코오스 DMEM에 해당하며, 배양을 5% CO₂ 하, 37℃에서 수행하였다. 플라스미드로 세포 트랜스펙션 후 24시간에, 시험 약물을 첨가하고, 인큐베이션을 수행하였고, 그 후에, 상청액을 다른 96-웰 플레이트로 옮기고, 10 µl 30%(w/v) 트리클로로아세트산을 첨가하고, 혼합물을 15분 동안 65℃까지 가열시켜 포르밀카이누레닌에서 카이누레닌으로의 전환을 완료하였고, 그 후에, 원심분리를 12,000 rpm에서 10분 동안 수행하였고, 동일한 부피의 2%(w/v) p-디메틸아미노벤즈알데하이드 아세트산 용액과 혼합하고, 흡광도를 490 nm에서 플레이트 판독기를 이용하여 측정하였으며; 실험 결과는 표 1에 나타내었다.

[0240] 구현예 1 내지 구현예 6에서 얻어진 화합물의 IDO 억제 활성의 측정을 상기 구현예 7 내지 구현예 11에서 제공된 방법을 사용해 수행하였으며, *생체내* 및 *시험관내* 실험 둘 모두에서 현재 일반적으로 사용되는 IDO 억제제 1-메틸-트립토판(1-MT, 상업적으로 입수 가능함)을 대조군으로서 사용하였으며; 결과는 표 1에 나타내었다.

[0241] [표 1] 상기 구현예에서 합성된 N-벤질 트립탄트린 유도체 (I)의 IDO 억제 활성

화합물	억제 타입	K_i (μ M) (시험관내)	IC_{50} (μ M) (세포)	IC_{50} (μ M)
	경쟁적	34	380	18.4
구현예 1	반경쟁적	0.31	0.11	1.01×10^{-3}
구현예 2	반경쟁적	7.21	1.88	0.64
구현예 3	비경쟁적	4.12	0.68	7.38×10^{-2}
구현예 4	반경쟁적	2.64	0.50	2.24×10^{-2}
구현예 5	반경쟁적	0.47	0.40	1.21×10^{-3}
구현예 6	반경쟁적	5.97	2.52	0.97

[0242]

[0243] 실시예 12 - T-세포 증식 검정

[0244] 12.1. 비장 림프구의 단리(림프구 분리 배지 설명서에 따라 수행됨):

[0245] 1. 2마리의 마우스를 경추 탈골(cervical dislocation)에 의해 희생시키고, 비장을 멸균 테이블 상에서 제거하고, 후속 사용을 위해 RP1640 배양 배지를 함유한 6 cm 플레이트에 배치시켰다.

[0246] 2. 100 μ m 메시를 50 ml 원심분리 튜브에 배치시키고, 각 비장을 가위를 이용하여 보다 작은 조각으로 절단하고, 시브의 상부 상에 밀링하고, 소량의 RP1640을 보존 목적을 위해 첨가하였다.

[0247] 3. 얻어진 슬러리 부피의 두 배인 림프구 분리 배지를 이후에 첨가하였다.

[0248] 4. 원심분리를 800 g에서 20분 동안 수행하였고, 그 후에, 3개의 별도의 층들이 보여졌으며, 중간 층은 옅은 황색 색조를 나타낸다.

[0249] 5. 중간 층에서의 세포를 제거하고, RP1640 배양 배지를 첨가하여 리버스 세척(reverse wash)을 수행하였다. 이후, 세포를 실온에서 250 g으로 10분 동안 원심분리하고, 세포를 수집하였다.

[0250] 6. 배양 배지를 흡입하고, 세포를 RP1640 배지에 재현탁시키고, 그 후에, 세포 계수(cell count)를 수행하였다.

[0251] 12.2. LLC(루이스 폐 암종) 세포 처리:

[0252] 1. 배지(고 글루코오스 DMEM, 10% FBS)를 흡입하고, 세척을 PBS를 사용하여 1 내지 2회 수행하였다;

[0253] 2. 0.25% 트립신을 첨가하여 소화를 개시하였다;

[0254] 3. 트립신을 흡입하고, 배양 배지를 첨가하고, 그 후에, 세포를 피펫팅하고, 1.5 ml 원심분리 튜브로 옮겼다;

[0255] 4. 원심분리 이후에 상청액의 흡입을 수행하고, 세포를 1 ml의 DMEM 배양 배지에 재현탁시켰다;

[0256] 5. 미토마이신 C(최종 농도: 25 μ g/mL)를 첨가하고, 혼합물을 균질하게 될 때까지 상하로 피펫팅하고, 혼합물을 37°C 베쓰(bath)에서 30분 동안 배치시켰다;

[0257] 6. 세척을 RP1640으로 3회 수행하고, 세포를 계수하고, 샘플을 확보하였다.

[0258] 12.3. 실험 절차

[0259] 1. 처리된 LLC 세포(2×10^4 세포/웰; 자극제 세포) 및 비장 림프구(10^5 세포/웰; 반응 세포)를 96-웰 플레이트에 첨가하고, 그 후에, RP1640(10% FBS)를 부피를 200 μ l가 될 때까지 첨가하였다;

[0260] 2. 그룹핑(Grouping)을 수행하고, 50 μ M IDO 억제제를 투여 그룹에 대해 첨가하고, 그 후에, 샘플을 37°C, 95% RH, 5% CO₂ 인큐베이터에 배치시키고, 72시간 동안 배양하였다;

[0261] 3. WST-1 시약 키트를 사용하여 T-세포 증식을 측정하였고, 450 nm의 파장에서의 흡광도 수치를 플레이트 판독기를 이용하여 측정하였다;

[0262] 4. T 림프구 증식 속도의 계산:

[0263] T 림프구 증식 속도(%) = [투여 그룹 웰(T 림프구 + LLC 세포 + IDO 억제제) OD 값 - 대조군 웰(T 림프구 +

LLC 세포) OD 값] / 대조군 웰(T 림프구 + LLC 세포) OD 값 × 100%

12.4. 실험 결과

[표 2] 상술된 구현예에서 합성된 N-벤질 트립타민 유도체에 의한 T-세포 증식의 자극

구현예 1	구현예 2	구현예 3	구현예 4	구현예 5	구현예 6	T-세포 증식율
4.88%	38.48	40.64	41.24	50.27	39.40	13.84

구현예 13 - 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(구현예 4)의 항-종양 효과

1. LLC 루이스 종양 모델의 확립: 체중이 20 ± 1 g이고 Shanghai Slyke Experimental Animal Center로부터 구매한 건강한 암컷 C57BL/6 마우스를 SPF 등급 실험실에서 사육하였다. 멸균 염수를 사용하여 루이스 폐 암종 세포를 1×10^7 /mL의 농도로 현탁시켰다. 세포를 멸균 작업 조건 하에서 마우스의 겨드랑이 아래 영역에서 피하로 접종하였으며, 0.2 ml를 각 동물에서 접종하였다.

2. 실험 그룹핑 및 예방적 투여: 마우스를 10 마리 동물의 5개 그룹으로 무작위적으로 나누었다. 대조군에는 위관영양법(gavage)을 통해 동일한 부피의 0.5% 소듐 카복시메틸 셀룰로오스가 제공되었다; 위관영양법을 통해 1-메틸-트립토판(1-MT)을 고 투약 그룹에서 150 mg/kg의 농도로 투여하고, 저 투약 그룹에서 75 mg/kg의 농도로 투여하였다; 위관영양법을 통해 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온을 고 용량 그룹에서 150 mg/kg의 농도로 투여하고, 저 투약 그룹에서 75 mg/kg의 농도로 투여하였다. 종양 접종을 수행하고, 7일의 연속 투여를 수행하였고, 그 후에, 투여를 21일 동안 계속하였고, 종양 성장을 관찰하였다. 긴 축(a) 및 짧은 축(b)을 따른 종양 길이를 종양 접종 일에 출발하여 그 후 격일에 측정하였으며, 종양 부피는 $ab^2/2$ 이었다. 투여를 중지한 날에, 마우스를 경추 탈골을 통해 희생시키고, 종양을 제거하고, 계량하고, 액체 질소에서 보존하였다.

3. 예방학적 투여에 대한 치료 결과: 1주 지속하여 예방학적 투여 후 접종 후 연속적인 투여 후에, 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온이 투여된 마우스는 생체내에서 현저하게 억제된 루이스 폐 암종 종양 성장을 나타내었으며, 투여가 개시되고 20일 후에 고 투약 그룹에서 현저하지 않은 종양 형성이 관찰되었으며, 종양 형성은 대조군에서 투여의 개시 후 단지 11일에 주지되었으며; 1-MT 그룹에서 마우스는 투여 개시 후 13일에 종양 형성을 나타내었다. 종양 부피를 기반으로 하여, 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온 및 1-MT 고 투약 그룹에 대하여 관찰된 종양 억제율은 각각 62.15% 및 32.35%이었으며, 종양 억제율은 저 투약 그룹에서 46.62% 및 27.00%이었다. 종양 중량을 기준으로 하여, 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온 및 1-MT 고 투약 그룹에 대해 관찰된 종양 억제율은 각각 57.8% 및 28.2%이었다. 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온이 투여된 동물은 정상 체중, 반들반들한 털(shiny coat) 및 더욱 유연한 반응(more flexible response)을 나타내었다.

4. 실험적 그룹핑 및 접종후 투여: 종양 접종이 수행되고 48시간 후에 마우스를 10 마리 동물의 4개의 그룹으로 무작위적으로 나누었다. 종양 직경이 5 mm에 도달한 직후에 초기 용량을 투여하였다. 대조군에서 동물에 위관영양법을 통해 동일한 부피의 0.5% CMC(소듐 카복시메틸 셀룰로오스)을 투여하였다; 1-MT 그룹에서 동물에 위관영양법을 통해 200 mg/kg의 용량으로 투여하였다; 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온 그룹에서 동물에 위관영양법을 통해 200 mg/kg의 용량으로 투여하였다; 파클리탁셀 그룹에서 동물에 1주일에 한번 정맥내 주사를 통해 100 mg/kg의 용량으로 투여하였다; 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온 + 파클리탁셀 그룹에서 동물에 200 mg/kg 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온 및 100 mg/kg 파클리탁셀(꼬리 정맥 정맥내 주사)을 2주 동안 연속적으로 투여하였다. 긴 축(a) 및 짧은 축(b)을 따른 종양 길이를 투여 일에 출발하여 그 후 격일에 측정하였으며, 종양 부피는 $ab^2/2$ 이었다. 투여를 중지한 후 격일에는, 마우스를 경추 탈골을 통해 희생시키고, 종양을 제거하고, 계량하고, 액체 질소에서 보존하였다.

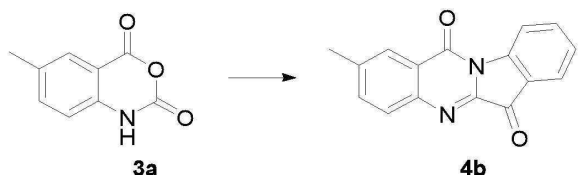
5. 접종 후 투여에 대한 치료 결과: 동물에 위관영양법을 통해 200 mg/kg의 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온 또는 1-MT를 2주의 연속적인 투여 후에, 생체내 루이스 폐 암종 종양 성장은 대조군과 비교하여 현저한 억제를 나타내었으며, 종양 성장의 억제는 1-MT 그룹에 비해 8-플루오로-2-

((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온 그룹에서 더욱 현저하였다. 종양 부피를 기준으로 하여, 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온, 1-MT, 파클리탁셀 및 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온 + 파클리탁셀 그룹에 대해 관찰된 종양 억제율은 각각 23.38%, 15.68%, 51.45% 및 72.48%이었다. 임상 실무에서 일반적으로 사용되는 화학치료 약물로서, 파클리탁셀은 일반적으로 종양 성장의 억제를 형성시켰지만, 약물은 또한, 보다 강력한 독성 부작용을 형성시켰으며; 실험 과정 동안, 마우스는 체중이 줄어들고, 이들의 털이 손실되고 일반적으로 보다 적은 운동을 나타내는 것으로서 관찰되었다. 다른 한편으로, 단지 8-플루오로-2-((4-메틸-피페라진-1-일)메틸)인돌로[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온의 투여가 종양의 완전한 소멸을 야기시키지 못하지만, 종양의 보다 현저한 억제가 관찰되었으며, 이에 따라 치료된 마우스는 정상 체중, 반들반들한 털 및 더욱 유연한 반응을 나타내었다.

[0273] **비교예 - 2-메틸-인돌[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온의 제조 및 활성 시험**

[0274] 단계 (1)은 구현예 1에 기술된 바와 같다.

[0275] **단계 (2): 2-메틸-인돌[2,1-b]퀴나졸린-6,12-디온(4b)의 합성**



[0276]

[0277] 화합물 3a(1.7 g, 9.6 mmol), 이사틴(1.4 g, 9.6 mmol) 및 트리에틸아민(2.7 ml, 19.2 mmol)의 혼합물을 건조된 톨루엔(18 ml) 중에 현탁시키고, 110℃에서 4시간 동안 가열하였다. 반응 용액을 실온까지 냉각시킨 후에, 얻어진 황색 고형물을 여과하고, 2 ml의 에틸 아세테이트로 3회 세척하여 황색 고형물 화합물(4b)(0.5 g, 20%)을 수득하였다.

[0278] 특징분석 데이터:

[0279] ^1H 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).

[0280] 비교예에서 얻어진 화합물의 활성을 측정하기 위해 구현예 9 내지 구현예 11에 기술된 측정 방법을 이용하여, 997.25 μM 의 IDO 억제 활성 시험관내 IC_{50} 을 산출하였으며, K_i 및 생체내 IC_{50} 은 측정되지 않았다.

[0281] 표 1에서의 실험 데이터가 나타낸 바와 같이, 본 출원과 관련된 화합물은 현재 입수 가능한 통상적인 IDO 억제제, 뿐만 아니라 유사한 구조를 갖는 화합물에 비해 특별히 양호한 IDO 억제 활성을 나타낸다. 보다 상세하게, 현존하는 통상적인 IDO 억제제 1-MT와 비교하여, 본 출원에 의해 구성된 화합물에 대해 얻어진 시험관내 및 세포내 IC_{50} 값은 10 내지 10^3 배 더욱 낮아지는데, 이는 본 출원에 의해 구성된 화합물이 우수한 IDO 억제 활성을 형성시킴을 지시하는 것이다.

[0282] 억제 활성의 측면에서 매우 유사한 구조(예를 들어, 비교예에서 제공된 화합물)를 갖는 다른 화합물에 비해 본 출원에 의해 구성된 화합물의 매우 현저한 개선이 존재한다는 것이 가치가 있다. 억제 활성은 심지어 이의 구조에 있어서 활성기를 유사하게 특징으로 하는 특징의 IDO 억제제와 비교하여 여전히 크게 증가된다. 이러한 분야에서 통상적으로 관찰되는 화합물 구조와 활성 간의 연결을 고려하여, 본 출원에 의해 구성된 화합물과 유사한 구조 간에 관찰된 차이는 고도로 특별한 현상이다. 이는 본 출원에 의해 구성된 화합물이 매우 독특한 타입의 구조를 구성하며, 이의 생물학적 활성은 놀라운 것이다.

[0283] 본 발명에서 언급된 모든 공개문은 마치 각 개개 공개문이 참조문헌으로서 인용된 것처럼 참조로 포함된다. 또한, 본 발명에 제공된 설명을 읽은 후에, 당업자는 본 발명에 대한 다양한 변형에 또는 개질을 만들 수 있을 것이며, 이러한 균등한 형태가 또한 본 출원에 포함되는 청구항의 범위 내에 속한다.