

# 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 抑制剂的设计、合成及初步活性研究

王太禹<sup>1</sup>, 王利娜<sup>1</sup>, 赵力挥<sup>1</sup>, 王国成<sup>2\*</sup>

(1. 天士力控股集团有限公司天士力研究院, 天津 300410; 2. 江苏天士力帝益药业有限公司, 江苏 淮安 223003)

**摘要:** 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 是人体色氨酸代谢通路中的关键酶, 可介导肿瘤免疫应答的关键性免疫抑制酶, IDO1 抑制剂是一种潜在的肿瘤免疫治疗药物。本研究在新近报道的 IDO1 蛋白-抑制剂复合物晶体 (PDBID: 6AZV) 基础上, 通过分析抑制剂与 IDO1 的相互作用模式, 参考复合物晶体中的抑制剂结构, 设计合成了 11 个化合物, 其结构经图谱数据确认。初步活性研究表明, 在目标化合物中含有联苯 (吡啶) 四唑结构的化合物 (**B1** 和 **B2**) 与含有磺酰胺结构的联苯化合物 (**D1**、**D2** 和 **D3**), 在酶和细胞水平的抑制活性实验中, 均具有优良的 IDO1 抑制活性, 与阳性对照 INCB24360 相当或更优。

**关键词:** 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1; IDO1; 抑制剂; 合成; 肿瘤免疫

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)11-2039-10

## Design, synthesis and inhibitory activity of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibitors

WANG Tai-yu<sup>1</sup>, WANG Li-na<sup>1</sup>, ZHAO Li-hui<sup>1</sup>, WANG Guo-cheng<sup>2\*</sup>

(1. Tasly Institute, Tasly Holding Group, Tianjin 300410, China;

2. Jiangsu Tasly Diyi Pharmaceutical Co., Ltd., Huaian 223003, China)

**Abstract:** Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) is a key enzyme in the human tryptophan metabolism pathway, which can mediate tumor immune response. An IDO1 inhibitor would be a potential cancer immunotherapy drug. Based on the recently reported crystal of an IDO1 protein-inhibitor complex (PDBID: 6AZV), the structure of reported inhibitor, and by analyzing the interaction mode between the inhibitor and IDO1, new inhibitor molecules were designed and synthesized. All structures were confirmed by spectral data. Preliminary activity studies showed that compounds containing an azabiphenyl tetrazole structure (**B1** and **B2**) and biphenyl compounds containing a sulfonamide structure (**D1**, **D2** and **D3**) had excellent inhibitory activity of IDO1 at the enzyme and cell level, and were comparable or even better than the control drug INCB24360.

**Key words:** indoleamine 2,3-dioxygenase 1; IDO1; inhibitor; synthesis; tumor immunology

吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 含有 403 个氨基酸, 其编码基因位于人类第 8 号染色体上<sup>[1]</sup>。IDO1 是一种含亚铁血红素的双加氧酶, 结构主要由  $\alpha$ -螺旋构成, 并形成包含血红素的底物结合口袋<sup>[2,3]</sup>。

IDO1 是体内 *L*-色氨酸沿犬尿氨酸途径代谢通路中的第一个限速酶, 有两个同工酶 IDO2<sup>[4]</sup> 和色氨酸-2,3-双加氧酶 (tryptophan 2,3-dioxygenase, TDO)<sup>[5]</sup>。IDO2 在体内表达量极低, TDO 主要在肝脏表达, 而 IDO1 在人体各组织和器官广泛表达, 因此 IDO1 在色氨酸代谢通路中备受关注。

IDO1 通过降低体内 *L*-色氨酸浓度从而发挥抑制 T 细胞增殖和活化的作用, 从而抑制正常的免疫应答<sup>[6,7]</sup>。研究表明, IDO1 对 *L*-色氨酸的持续降解, 导致

收稿日期: 2019-08-27; 修回日期: 2019-09-16.

基金项目: 江苏省基础 Research 计划资助项目 (面上项目 BK20181209).

\*通讯作者 Tel: 86-22-26736511, E-mail: wanggc@tasly.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0685

最终代谢产物犬尿氨酸浓度的增加,以及犬尿氨酸一系列的代谢产物的累积,均可直接抑制免疫应答和T细胞的增殖活化<sup>[8]</sup>。此外,犬尿氨酸也能诱导IDO1的表达,进一步抑制T细胞的免疫应答。因此,IDO1抑制剂具有扭转T细胞免疫抑制的作用,是潜在的肿瘤免疫治疗药物<sup>[9]</sup>。

目前已有多个小分子IDO1抑制剂进入临床研究,包括D-1-MT (**1**,  $IC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , HeLa  $IC_{50} = 1.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[10]</sup>、GDC-0919 (**2**,  $IC_{50} = 13 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , T-REX-293  $IC_{50} = 75 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[11]</sup>、INCB24360 (**3**,  $IC_{50} = 72 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , HeLa  $IC_{50} = 7.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[12]</sup>和BMS-986205 (**4**, HeLa  $IC_{50}=0.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[13]</sup>,另有一些化合物处于临床前研究阶段 (**5**,  $IC_{50} = 534 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , HEK293  $IC_{50}= 23 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; **6**,  $IC_{50} = 35.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , HeLa  $EC_{50}= 67.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; **7**, Amg-1,  $IC_{50} = 3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (图1)<sup>[14-16]</sup>,某些天然产物也具有IDO1抑制活性<sup>[17]</sup>。

IDO1复合物的晶体结构于2006年首次被报道<sup>[18]</sup>,揭示了IDO1蛋白的整体三维结构。2018年,Nelp等<sup>[19]</sup>最新报道了一个IDO1抑制剂BMS-978587 (**8**,图1)与IDO1的共结晶结构(PDBID: 6AZV),揭示了抑制剂分子与底物配体分子之间具有一种新的结合模式。复合物结构显示,抑制剂分子可以占据结合口袋空间中原本属于亚铁血红素卟啉环的空间,导致IDO1的重要辅基血红素不能结合,从而阻止了酶对L-色氨酸底物的氧化作用。该抑制剂与IDO1残基之间形成的两个氢键,对抑制剂的结合起到重要作用:抑制剂中的脲结构与SER-167残基之间形成稳定氢键,抑制剂分子中的羧酸与残基HIS-346、SER-264和ALA-263形成稳定的氢键,是这类分子与蛋白之间结合的基础。实验结果显示,该化合物对IDO1的抑制活性达到 $IC_{50}=4.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  (HeLa细胞)(图2)。参考BMS-978587结构以及与IDO1蛋白的结合模式,本研究进行了基于配体结构的药物设计。

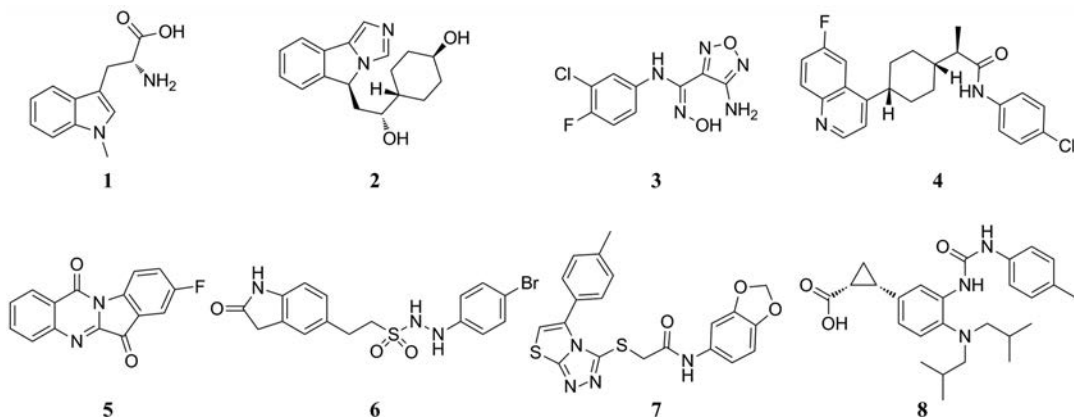


Figure 1 Structures of IDO1 inhibitors in clinical and preclinical studies

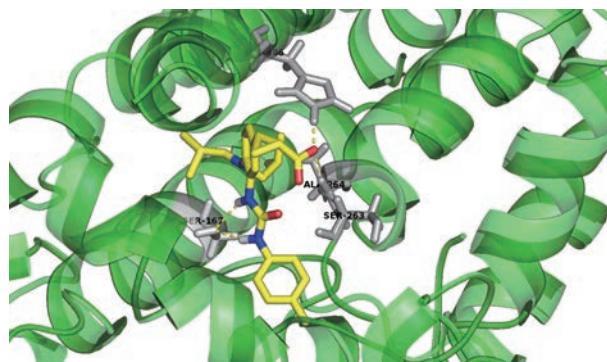


Figure 2 Interaction between IDO1 and BMS-978587 (BMS-978587 colored in yellow, residues involved in interaction colored in gray, hydrogen bond showed with dotted lines)

基于对抑制剂与IDO1之间的相互作用的认识,为了探索与残基HIS-346、SER-264和ALA-263形成氢键的抑制剂,设计A、B和C三个系列化合物;同时考察调节分子理化性质对抑制剂活性的影响,设计D系列化合物(图3)。A系列化合物在邻苯二胺母核4-位上采用芳氨基取代,所选的3种氨基苯甲酸异构体片段可以探索羧酸基团在口袋中的不同排布位置;B系列化合物含有联苯(吡啶联苯)四唑结构母核,探索四唑

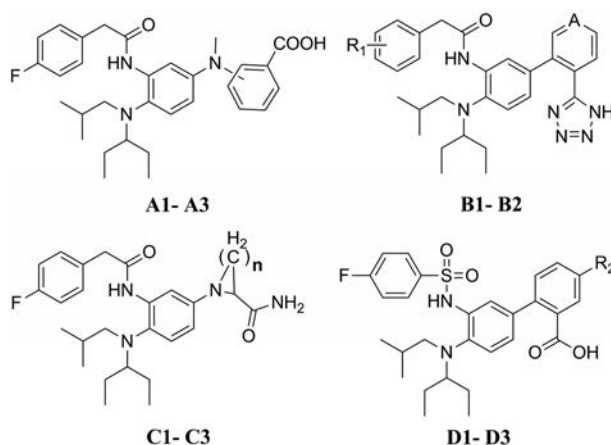


Figure 3 Design of the target compounds

结构作为羧酸结构的生物电子等排体在口袋中的结合方式; C 系列是邻苯二胺母核 4-位上采用含有氮杂环烷羧酸的取代, 进一步探索羧酸基团在口袋中的空间位置变化; D 系列化合物是 B 系列化合物的电子等排体, 在分子中引入磺酰胺基团, 调节分子的亲水性, 探索理化性质的改变对制剂活性的影响。

各系列化合物的合成如路线 1 所示。化合物 9 与 *N*-异丁基-*N*-(3-正戊基) 氨经氨化反应得到 *N*-异丁基-*N*-(3-正戊基)-2-硝基-4-溴-苯胺 (10), 随后与氨基苯甲酸酯生成二苯胺类化合物 (14), 再依次经过氨的甲基化、硝基还原和酰胺化反应得到 3 个 A 系列化合物 (A1~A3)。化合物 11 经过酰胺化得到化合物 12a 和 12b, 再经过偶联反应和四氮唑化反应得到 2 个 B 系列化合物 (B1、B2)。化合物 12a 与相应的氮杂环丙烷甲酸酯、氮杂环丁烷甲酸酯以及氮杂环戊烷甲酸酯通过氨的芳基化反应得到 3 个 C 系列化合物 (C1~C3)。化合物 11 经过磺酰化、偶联反应和氰基的水解反应得到 3 个 D 系列化合物 (D1~D3)。

## 结果与讨论

### 1 化合物的结构确证

采用上述路线, 合成了 11 个化合物, 纯度经 HPLC 测定, 结构全部经  $^1\text{H NMR}$  和 ESI-MS 确证, 且未见文献报道, 化合物的图谱数据见表 1。

### 2 化合物的 IDO1 抑制活性及结果讨论

以进入临床研究中的 IDO1 抑制剂 INCB24360 作为阳性对照, 测定了目标化合物对人源 IDO1 酶抑制活性<sup>[20]</sup>, 结果显示, 化合物 A1、A3、C1、C2 和 C3 对酶的抑制活性一般,  $\text{IC}_{50} > 3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 这些化合物在相应的细胞学实验中也显示了较弱的抑制活性; 其余化合物的  $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 与阳性对照的活性相当, 其中化合物 B1、D2 和 D3 在 HeLa 细胞中对 IDO1 的抑制活性优于阳性对照 (表 2)。

考虑到 TDO 作为 IDO1 的同工酶和潜在的肿瘤免疫药物靶点<sup>[5]</sup>, 本研究也考察了部分化合物对 TDO 酶的初步抑制活性。采用 U-87-MG 细胞, 测定了  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下化合物对细胞中的 TDO 酶抑制活性<sup>[19]</sup>, 结果发现化合物 D2 有一定的抑制活性, 抑制率达到 65% (阳性对照 680C91 为 92%, 表 3)。

根据上述结果, 总结了初步构效关系: ① 邻苯二胺母核上 4-位的取代基对活性有较大影响, A 系列活性强弱: A1 > A2 > A3, 可能是由于氨基苯甲酸片段中羧酸基团在空间不同的朝向影响到与 HIS-346 侧链形成氢键的能力; ② B 系列化合物活性较优, 可能与结构中邻苯/吡啶邻苯四唑结构有关, 该结构使得分子整

体刚性有所增加, 从而可能影响到四唑结构与口袋的结合; ③ C 系列化合物中, 羧酸活性优于酰胺, 但整体活性相对较差, 可能由于氮杂环系体积较小, 羧酸与邻苯二胺母核之间的距离较近, 从而影响了与 HIS-346 等残基的相互作用; ④ D 系列化合物作为 B 系列化合物的电子等排体, 保留了 B 系列的活性, 同时磺酰胺基团增加分子的亲水性也可能对活性增强是有利的。

### 3 分子对接结果分析

采用分子对接的方法比较了 IDO1 酶 (PDB ID: 6AZV) 分别与化合物 B1、C1 和 D3 之间的作用模式 (图 4)。结果显示, B1 与 BMS-978587 的作用模式非常相似, 分子中酰胺键与 SER-167 残基之间形成稳定氢键, 四唑结构与残基 HIS-346 和 ALA-263 形成氢键, 与文献报道的关键相互作用一致<sup>[19]</sup>, 体现出较好的活性 (图 4a)。C1 虽然与 BMS-978587 有相似的空间构象, 但是四氢吡咯环上的酰胺基团由于空间距离较远, 并没有与 HIS-346 和 ALA-263 残基相互作用, 因而抑酶活性较弱 (图 4b)。化合物 D3 虽然与 BMS-978587 分子整体结构的差异较大, 但分子中的羧酸基团与 HIS-346 残基之间形成氢键, ALA-263 与磺酰胺基团也形成氢键, 进一步稳定了与酶之间的结合, 因此也显现出较好的抑酶活性 (图 4c)。分子对接结果提示, 设计分子中含有能与残基 HIS-346、SER-264 和 ALA-263 形成相互作用的基团, 是产生抑酶作用的一个关键因素。

### 4 小结

根据抑制剂 BMS-978587 与 IDO1 的作用模式, 设计合成了 11 个结构新颖的化合物, 并分别测定了它们对 IDO1 酶和对 HeLa 细胞中 IDO1 的抑制活性。其中 4 个化合物显示出一定的酶抑制活性; 初步总结了此类化合物的构效关系, 并采用分子对接的方法分析了所设计化合物产生抑酶活性的可能原因, 期望为该类型 IDO1 抑制剂的进一步结构优化, 以及发现 IDO1 和 TDO 双重抑制剂提供有益参考。

## 实验部分

核磁共振图谱采用布鲁克 AVANCE III 400M 型核磁共振波谱仪记录, 氘代氯仿或 TMS 为内标; 质谱采用赛默飞世尔 LCQ 型质谱仪; HPLC 采用 Agilent 1100 高效液相色谱仪, DAD 检测器。实验所用试剂均为市售分析纯。中间体及目标化合物制备反应收率未做进一步优化。

### 1 化学合成

**1.1 *N*-异丁基-*N*-(3-正戊基)-2-硝基-4-溴-苯胺的制备 (10)** 将 3-硝基-4-氟-溴苯 (9) (49 g, 223 mmol) 加入到 *N*-异丁基-*N*-(3-正戊基) 氨 (32 g, 223 mmol) 的三

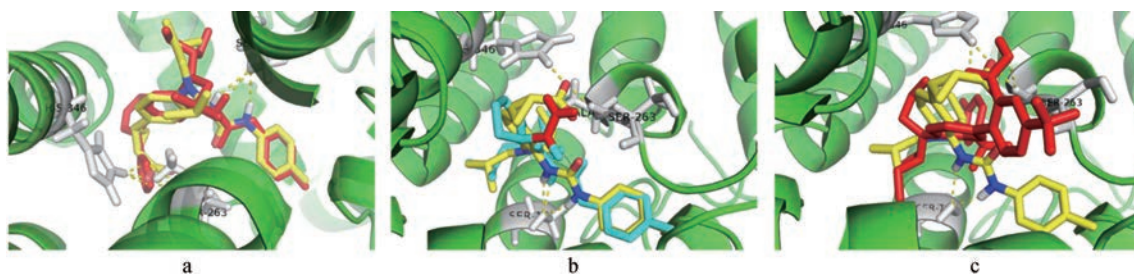


**Table 1** Physico-chemical data of **A1–A3**, **B1–B2**, **C1–C3** and **D1–D3**. <sup>a</sup>Purity was calculated by area normalization method of HPLC

Compd.	Purity /% <sup>a</sup>	ESI-MS (m/z)	<sup>1</sup> H NMR (400 MHz in CDCl <sub>3</sub> or DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	<sup>13</sup> C NMR (100 MHz in CDCl <sub>3</sub> or DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )
<b>A1</b>	98.6	520.3 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 12.82 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 7.78 (d, 1H, <i>J</i> = 7.6 Hz), 7.73 (s, 1H), 7.56 (t, 1H, <i>J</i> = 7.6 Hz), 7.35–7.26 (m, 4H), 7.15 (t, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.03 (t, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 6.16 (dd, 1H, <i>J</i> = 2.0, 6.4 Hz), 3.66 (s, 2H), 3.12 (s, 3H), 2.60 (s, 2H), 2.27 (t, 1H, <i>J</i> = 6.4 Hz), 1.46–1.36 (m, 4H), 1.24 (t, 1H, <i>J</i> = 6.4 Hz), 0.85 (s, 6H), 0.71 (d, 6H, <i>J</i> = 6.4 Hz)	169.3, 168.2, 161.1, 144.0, 138.5, 134.8, 132.4, 131.2, 124.3, 121.8, 118.1, 117.2, 116.0, 115.6, 113.1, 67.2, 60.3, 44.5, 42.7, 26.8, 25.2, 20.9, 11.2
<b>A2</b>	100.0	520.3 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 12.85 (s, 1H), 8.68 (s, 1H), 8.01 (d, 1H, <i>J</i> = 1.6 Hz), 7.37 (s, 2H), 7.32–7.27 (m, 3H), 7.23 (d, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.14–7.07 (m, 3H), 6.75 (dd, 1H, <i>J</i> = 2.0, 6.4 Hz), 3.68 (s, 2H), 3.21 (s, 3H), 2.66 (s, 2H), 2.36 (t, 1H, <i>J</i> = 6.4 Hz), 1.48–1.38 (m, 4H), 1.29 (t, 1H, <i>J</i> = 6.4 Hz), 0.85 (t, 6H, <i>J</i> = 6.8 Hz), 0.71 (d, 6H, <i>J</i> = 6.4 Hz)	169.3, 168.0, 164.1, 145.0, 138.7, 134.9, 133.4, 131.5, 124.3, 121.9, 118.6, 117.2, 116.4, 115.8, 113.1, 67.5, 60.4, 44.5, 42.9, 26.9, 25.3, 20.9, 11.2
<b>A3</b>	99.3	520.3 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 12.26 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.71 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.30 (t, 3H, <i>J</i> = 8.0 Hz), 7.13 (t, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 6.89 (d, 1H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 6.73 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 3.70 (s, 2H), 3.24 (s, 3H), 2.68 (d, 2H, <i>J</i> = 4.8 Hz), 2.41 (t, 1H, <i>J</i> = 5.6 Hz), 1.50–1.40 (m, 4H), 1.32 (t, 1H, <i>J</i> = 6.8 Hz), 0.86 (t, 6H, <i>J</i> = 7.2 Hz), 0.73 (d, 6H, <i>J</i> = 6.4 Hz)	169.3, 168.2, 161.1, 144.0, 138.5, 134.8, 132.4, 131.5, 124.3, 121.8, 118.1, 117.2, 116.3, 115.6, 67.2, 60.3, 44.5, 42.7, 26.8, 25.2, 20.9, 11.2
<b>B1</b>	99.6	525.4 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 8.15 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.56 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.22 (d, <i>J</i> = 8.0 Hz, 1H), 7.21–7.12 (m, 5H), 6.66 (q, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 3.74 (s, 2H), 2.72 (q, <i>J</i> = 3.2 Hz, 2H), 2.50–2.44 (m, 4H), 2.34 (s, 3H), 1.55–1.44 (m, 4H), 1.36–1.35 (m, 1H), 0.89 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 6H), 0.73 (d, <i>J</i> = 6.8 Hz, 6H)	169.5, 163.2, 141.5, 138.5, 137.2, 135.2, 132.5, 131.3, 129.5, 128.6, 126.3, 123.6, 67.5, 60.2, 44.5, 26.8, 25.3, 21.3, 20.6, 11.2
<b>B2</b>	98.9	516.3 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 8.79 (s, 1H), 8.73 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.80 (d, <i>J</i> = 5.2 Hz, 1H), 7.35 (t, <i>J</i> = 2.8 Hz, 2H), 7.25 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.12 (t, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 6.84 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H), 3.77 (s, 2H), 2.52 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 1H), 1.59–1.42 (m, 5H), 0.92 (t, <i>J</i> = 7.6 Hz, 6H), 0.77 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 6H)	168.9, 163.5, 161.2, 149.4, 148.2, 142.1, 131.2, 123.1, 120.3, 119.2, 116.5, 67.2, 60.4, 44.5, 26.8, 25.3, 20.1, 11.2
<b>C1</b>	100.0	483.3 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 8.77 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.29–7.15 (m, 3H), 7.14–7.09 (m, 3H), 6.97 (s, 1H), 6.13 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 3.79–3.78 (m, 1H), 3.69 (s, 2H), 3.49–3.47 (m, 1H), 3.14–3.12 (m, 1H), 2.49–2.48 (m, 1H), 2.26–2.09 (m, 2H), 1.94–1.93 (m, 3H), 1.45–1.26 (m, 6H), 0.88–0.69 (m, 12H)	176.5, 161.5, 139.6, 132.4, 131.2, 124.6, 121.8, 116.0, 109.3, 77.6, 67.1, 60.4, 51.3, 44.5, 29.3, 26.9, 24.6, 20.9, 11.0
<b>C2</b>	100.0	455.2 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 8.69 (s, 1H), 7.92 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H), 7.36–7.31 (m, 3H), 7.18–7.14 (m, 4H), 6.64 (dd, <i>J</i> = 2.4, 15.6 Hz, 1H), 3.72 (s, 2H), 2.64–2.63 (m, 2H), 2.57–2.55 (m, 1H), 2.34–2.29 (m, 2H), 2.23–2.21 (m, 1H), 1.47–1.21 (m, 4H), 0.85–0.69 (m, 12H)	176.5, 161.5, 139.6, 132.4, 131.2, 124.6, 121.8, 116.0, 109.3, 77.6, 67.1, 60.4, 51.3, 44.5, 29.3, 26.7, 24.6, 20.9, 11.0
<b>C3</b>	100.0	470.3 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 8.77 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.32–7.09 (m, 5H), 6.13 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 1H), 3.97–3.94 (m, 2H), 3.81–3.79 (m, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.49–3.36 (m, 2H), 2.62–2.60 (m, 1H), 2.27–2.26 (m, 1H), 1.41–1.23 (m, 5H), 0.86–0.69 (m, 12H)	177.5, 161.5, 139.8, 132.4, 131.6, 124.7, 121.8, 116.4, 109.3, 77.8, 67.0, 60.2, 51.3, 44.2, 26.7, 24.8, 20.9, 11.0
<b>D1</b>	99.9	513.2 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 13.29 (b, 1H), 7.67–7.63 (m, 2H), 7.56–7.52 (m, 1H), 7.43–7.40 (m, 3H), 7.39 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.14 (d, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.02–6.98 (m, 1H), 2.68 (d, 2H, <i>J</i> = 6.4 Hz), 2.13 (t, 1H, <i>J</i> = 6.8 Hz), 1.50–1.48 (m, 2H), 1.39–1.34 (m, 3H), 0.72–0.66 (m, 12H)	167.6, 166.1, 136.5, 135.0, 134.5, 130.8, 128.5, 127.3, 126.3, 121.6, 118.2, 115.3, 68.2, 60.3, 26.8, 25.2, 20.9, 11.0
<b>D2</b>	100.0	530.2 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 13.31 (b, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.45 (t, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.32–7.29 (m, 5H), 7.17 (t, 2H, <i>J</i> = 8.8 Hz), 7.05 (t, 1H, <i>J</i> = 6.8 Hz), 2.69 (d, 2H, <i>J</i> = 6.4 Hz), 2.14–2.09 (m, 1H), 1.47–1.43 (m, 2H), 1.33–1.30 (m, 3H), 0.77–0.72 (m, 12H)	167.6, 167.3, 166.1, 136.8, 136.2, 134.7, 133.9, 130.6, 128.1, 126.0, 121.6, 118.2, 115.3, 68.5, 60.9, 26.7, 25.2, 20.9, 11.1
<b>D3</b>	100.0	580.3 [M+H] <sup>+</sup>	$\delta$ 12.99 (b, 1H), 7.88–7.83 (m, 2H), 7.67–7.64 (m, 2H), 7.43–7.40 (m, 3H), 7.37–7.34 (m, 1H), 7.19–7.15 (m, 2H), 7.07–7.01 (m, 1H), 2.69 (d, 2H, <i>J</i> = 6.7 Hz), 2.13 (t, 1H, <i>J</i> = 6.8 Hz), 1.43–1.40 (m, 2H), 1.33–1.30 (m, 3H), 0.73–0.69 (m, 12H)	167.6, 166.1, 136.9, 135.0, 134.5, 130.9, 130.5, 128.5, 127.3, 127.3, 123.5, 121.6, 118.0, 115.0, 68.3, 60.8, 26.6, 25.2, 20.9, 11.2

乙胺 (33.7 g, 334 mmol) 溶液中。将以上反应液加热到 140 °C 反应 30 h。反应在结束后加入 500 mL 石油醚 (PE) 和 100 mL 甲基叔丁基醚搅拌 0.5 h, 静置后分

取有机层, 依次用水、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 然后浓缩; 浓缩物用硅胶柱色谱分离 (PE, 300~400 目硅胶), 得到化合物 **10** (53 g, 69%)。<sup>1</sup>H NMR



**Figure 4** Comparison of binding to IDO1 between BMS-978587 and **B1** (a), **C1** (b) and **D3** (c), respectively. BMS-978587 colored in yellow, residues involved in interaction colored in gray, **B1** and **D3** in red, **C1** in cyan, and hydrogen bond showed with dotted lines

**Table 2** IDO1 inhibition of target compounds ( $IC_{50}$ )

Compd.	$IC_{50}/\mu\text{mol}$	
	IDO1	HeLa IDO1
<b>A1</b>	3.520	0.333
<b>A2</b>	0.601	0.273
<b>A3</b>	>30	7.963
<b>B1</b>	0.079	0.008
<b>B2</b>	0.363	0.080
<b>C1</b>	>30	9.635
<b>C2</b>	>30	8.652
<b>C3</b>	3.258	0.880
<b>D1</b>	0.121	0.054
<b>D2</b>	0.100	0.019
<b>D3</b>	0.075	0.008
INCB24360	0.394	0.076

**Table 3** TDO inhibition rate of selected target compounds in U-87-MG cells (%)

Compd.	TDO Inhibition rate/%
<b>B1</b>	17
<b>D1</b>	30
<b>D2</b>	65
<b>D3</b>	26
680C91	92

(400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.75 (d,  $J = 2.8$  Hz, 1H), 7.42 (q,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 6.96 (d,  $J = 9.6$  Hz, 1H), 2.84 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.79~2.72 (m, 1H), 1.74~1.61 (m, 1H), 1.59~1.54 (m, 2H), 1.51~1.46 (m, 3H), 0.88~0.79 (m, 12H); ESI-MS( $m/z$ ): 344.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**1.2** *N*-异丁基-*N*-(3-正戊基)-2-氨基-4-溴-苯胺的制备 (**11**) 室温下将锌粉 (15.2 g, 234 mmol) 分批加入到化合物 **10** (8 g, 23.4 mmol)、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  (12.5 g, 234 mmol)、160 mL 乙醇和 20 mL 水中, 混合物搅拌反应 14 h, 加入二氯甲烷继续搅拌 30 min; 以硅藻土过滤, 分取有机层, 减压浓缩, 加入乙酸乙酯 (EA), 溶液分别用水、饱和食盐水洗涤, 以无水硫酸钠干燥, 硅胶柱色谱分离 ( $V_{\text{PE}}:V_{\text{EA}}=100:1$ ) 得到灰色油状物 **11** (5.0 g, 68%)。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.85 (q,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 6.78 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.12 (q,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.60~

2.53 (m, 1H), 1.58~1.51 (m, 5H), 0.96~0.81 (m, 12H); ESI-MS ( $m/z$ ): 313.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**1.3** *N*-[2-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-5-溴-苯基]-4-甲基苯乙酰胺的制备 (**12a**) 取化合物 **11** (2.00 g, 6.38 mmol) 和 4-氟苯乙酸 (1.48 g, 9.57 mmol) 溶于 50 mL DMF 中, 室温下加入三乙胺 (1.29 g, 12.7 mmol) 和 苯并三氮唑-1-基氧基三(二甲基氨基)磷鎓六氟磷酸盐 (BOP) (4.22 g, 9.57 mmol), 室温搅拌 12 h, 待 TLC 检测化合物 **11** 消耗完毕后终止反应, 于 50 °C 减压除去溶剂, 柱色谱分离 ( $V_{\text{PE}}:V_{\text{EA}}=10:1$ ) 得到白色固体 **12a** (2.35 g, 82%)。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.56 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.22 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.21~7.12 (m, 4H), 3.84 (s, 2H), 3.27 (d, 2H), 2.46 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.65 (s, 1H), 1.52 (m, 4H), 0.85 (t,  $J = 7.6$  Hz, 6H), 0.78 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H); ESI-MS ( $m/z$ ): 445.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

以 4-甲基苯乙酸与化合物 **11** 缩合, 得到化合物 **12b**, 收率 87%。 $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.56 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.25 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.23~7.08 (m, 4H), 3.85 (s, 2H), 3.27 (d, 2H), 2.43 (m, 1H), 1.68 (s, 1H), 1.50 (m, 4H), 0.87 (t,  $J = 7.6$  Hz, 6H), 0.75 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H); ESI-MS ( $m/z$ ): 449.2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

**1.4** 4'-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3'-(4-甲基苯乙酰胺基)-2-氰基-5-甲基-联苯的制备 (**13a**) 将化合物 **12a** (0.72 g, 1.61 mmol) 室温下溶于 20 mL 叔丁醇中, 加入 4,4,5,5-四甲基-2-(2-氰基-5-甲基苯基)-1,3,2-二氧杂硼烷 (2.42 mmol, 0.59 g), 室温下加入  $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$  (150 mg, 0.16 mmol)、X-Phos (308 mg, 0.64 mmol) 和 碳酸铯 (1.32 g, 4.03 mmol), 减压除去空气, 通氮气 5 min, 氮气保护下加热到 120 °C 保持 2 h, TLC 检测 ( $V_{\text{PE}}:V_{\text{EA}}=1:1$ ) 反应完全, 降温到室温, 减压除去溶剂, 硅胶柱色谱分离得到化合物 **13a** 粗品, 直接用于下一步反应。

以类似的方法制备得到化合物 **13b** 粗品。

**1.5** 2-[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-硝基]苯胺基苯甲酸甲酯的制备 (**14a**) 取 4,5-双(二苯基膦基)-9,9-

二甲基氧杂蒽 (17 mg, 0.029 mmol)、碳酸铯 (141 mg, 0.43 mmol)、Pd(AcO)<sub>2</sub> (3.3 mg, 0.015 mmol)、化合物 **10** (100 mg, 0.29 mmol) 和相应的氨基苯甲酸酯 (44 mg, 0.29 mmol), 将混合物在 110 °C 搅拌 4 h, 减压除去溶剂, 柱色谱得到棕色固体 **14a** (60 mg, 50%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.88 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.59 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.34 (s, 1H), 7.14 (t, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.03 (t, 1H, *J* = 8.8 Hz), 6.66 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.4 Hz), 6.54 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.89 (s, 2H), 2.26 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 1.46~1.39 (m, 4H), 1.23 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 0.85 (s, 6H), 0.71 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz); ESI-MS (*m/z*): 414.2 [M+H]<sup>+</sup>。

**14b** 和 **14c** 的合成方法与 **14a** 相似, 收率分别为 59% 和 42%。**14b**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.01 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 7.39~7.30 (m, 3H), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.17 (m, 1H), 6.72 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.4 Hz), 3.95 (s, 3H), 2.69 (s, 2H), 2.43 (t, 1H, *J* = 6.5 Hz), 1.49~1.43 (m, 4H), 1.31 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 0.86 (t, 6H, *J* = 6.9 Hz), 0.71 (d, 6H, *J* = 6.5 Hz); ESI-MS(*m/z*): 414.2 [M+H]<sup>+</sup>。**14c**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.71 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.73 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.69 (s, 1H), 6.51 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.4 Hz), 6.24 (s, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.78 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz), 1.75 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz), 1.50~1.44 (m, 4H), 1.36 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz), 0.87 (t, 6H, *J* = 7.2 Hz), 0.74 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz); ESI-MS (*m/z*): 414.2 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.6 N-[[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-氨基]苯基]-*N*-甲基-胺基苯甲酸甲酯的制备 (**15a**)** 将化合物 **14a** (350 mg, 0.84 mmol) 溶于 20 mL DMF 中, 0 °C 加入 NaH (70 mg, 1.68 mmol, 60%), 然后缓慢加入碘甲烷 (350 mg, 2.52 mmol), 室温搅拌 1 h, 将反应混合物倒入 20 mL 水中, 乙酸乙酯萃取两次 (2×20 mL), 合并有机层, 干燥浓缩粗品, 将所得粗品溶于甲醇中, 加入 Pd/C (30 mg), 氢气存在下室温搅拌 6 h, 过滤, 浓缩滤液, 得到黄色固体 **15a** (250 mg, 69%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.78 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.56 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.15 (t, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.03 (t, 1H, *J* = 8.8 Hz), 6.54 (s, 1H), 6.46 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.4 Hz), 6.34 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 2.64 (s, 2H), 2.27 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 1.46~1.36 (m, 4H), 1.24 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 0.85 (s, 6H), 0.71 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz); ESI-MS (*m/z*): 398.2 [M+H]<sup>+</sup>。

**15b** 和 **15c** 的合成方法与 **15a** 相似, 收率分别为 93% 和 86%。**15b**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.01 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 7.35~7.26 (m, 3H), 7.20 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.07 (m, 1H), 6.55 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.4 Hz),

3.95 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.66 (s, 2H), 2.43 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 1.49~1.40 (m, 4H), 1.29 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 0.85 (t, 6H, *J* = 6.8 Hz), 0.71 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz); ESI-MS (*m/z*): 398.2 [M+H]<sup>+</sup>。**15c**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.71 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.73 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.54 (s, 1H), 6.46 (dd, 1H, *J* = 2.0, 6.4 Hz), 6.34 (s, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.68 (d, 2H, *J* = 4.8 Hz), 3.22 (s, 3H), 1.71 (t, 1H, *J* = 5.6 Hz), 1.50~1.42 (m, 4H), 1.32 (t, 1H, *J* = 6.8 Hz), 0.86 (t, 6H, *J* = 7.2 Hz), 0.73 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz); ESI-MS (*m/z*): 398.2 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.7 N-[[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-(4-氟苯乙酰氨基)苯基]-*N*-甲基-胺基苯甲酸甲酯的制备 (**16a**)** 将化合物 **16a** (300 mg, 0.756 mmol) 和 4-氟苯乙酸 (174 mg, 1.13 mmol) 溶解于 20 mL 二氯甲烷中, 加入三乙胺 (152 mg, 1.512 mmol) 和 HATU (430 mg, 1.13 mmol), 室温搅拌过夜, 减压除去溶剂后柱色谱分离, 得到黄色固体 **16a** (310 mg, 77%)。ESI-MS (*m/z*): 534.3 [M+H]<sup>+</sup>。

**16b** 和 **16c** 的合成方法与 **16a** 相似, 收率分别为 72% 和 75%。**16b**: ESI-MS (*m/z*): 534.3 [M+H]<sup>+</sup>。**16c**: ESI-MS (*m/z*): 534.3 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.8 N-[2-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-5-溴苯基]-4-氟苯磺酰胺的制备 (**17**)** 将 *N*-甲基吗啉 (3.0 g, 30 mmol)、化合物 **11** (2.3 g, 7.3 mmol)、4-氟苯磺酰氯 (1.4 g, 7 mmol) 加入到 40 mL 二氯甲烷中, 在氩气保护下室温搅拌 20 h, 加入石油醚和水, 搅拌 30 min, 以饱和食盐水洗涤有机层, 减压浓缩, 浓缩物以硅胶柱色谱分离 (300~400 目, *V*<sub>PE</sub>:*V*<sub>EA</sub>=50:1), 得到浅灰色固体 **17** (2.0 g, 59%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.44 (b, 1H), 7.55~7.51 (m, 1H), 7.49~7.42 (m, 1H), 7.39 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.17~7.10 (m, 2H), 7.09~7.02 (m, 1H), 2.78 (d, 2H, *J* = 6.4 Hz), 2.68 (b, 2H), 2.13 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 1.50~1.46 (m, 2H), 1.39~1.34 (m, 3H), 0.72~0.68 (m, 12H); ESI-MS (*m/z*): 471.1 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.9 N-[[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-2'-氰基]-[1, 1'-联苯]-2-基]-4-氟苯磺酰胺的制备 (**18a**)** 将化合物 **17** (0.15 g, 1 mmol)、2-氰基苯硼酸频那醇酯 (0.14 g, 2 mmol)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0.40 g, 4 mmol) 和 Pd[P(Ph<sub>3</sub>)<sub>4</sub>] (0.10 g, 0.1 mmol) 溶于 4 mL 二氧六环和 2 mL 水中, 氩气保护下将混合物在 130 °C 反应 30 min, 将混合物真空中减压浓缩, 浓缩物以硅胶柱色谱分离得到白色固体 **18a** (0.14 g, 86%)。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 12.89 (b, 1H), 7.80 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 7.75 (s, 1H), 7.63 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.56 (t, 1H, *J* = 6.4 Hz), 7.48 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.27~7.21 (m, 3H), 7.19 (t, 2H, *J* = 2.4 Hz),

2.72 (d, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 2.24 (t, 1H,  $J = 6.4$  Hz), 1.52~1.48 (m, 2H), 1.38~1.34 (m, 3H), 0.75~0.80 (m, 12H); ESI-MS ( $m/z$ ): 494.0 [M+H]<sup>+</sup>。

**18b** 和 **18c** 的制备方法与 **18a** 类似, 收率均为 86%。

**18b**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.90 (b, 1H), 9.85 (s, 1H), 7.70 (d, 2H,  $J = 6.8$  Hz), 7.45~7.40 (m, 2H), 7.40 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz), 7.19 (t, 3H,  $J = 6.4$  Hz), 2.72 (d, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 2.07 (t, 1H,  $J = 6.4$  Hz), 1.43~1.40 (m, 2H), 1.33~1.30 (m, 3H), 0.74~0.79 (m, 12H); ESI-MS ( $m/z$ ): 512.2 [M+H]<sup>+</sup>。 **18c**: <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12.5 (b, 1H), 9.65~9.62 (m, 1H), 7.88 (d, 1H,  $J = 6.4$  Hz), 7.77 (s, 1H), 7.48~7.45 (m, 2H), 7.41~7.36 (m, 2H), 7.33~7.30 (m, 1H), 7.17 (t, 2H,  $J = 8.9$  Hz), 2.75 (d, 2H,  $J = 6.9$  Hz), 2.50 (t, 1H,  $J = 7.0$  Hz), 1.56~1.52 (m, 2H), 1.37~1.32 (m, 4H), 0.78~0.73 (m, 12H); ESI-MS ( $m/z$ ): 562.0 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.10 1-[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-(4-氟苯乙酰氨基)-苯基]-2-吡咯烷甲酸甲酯的制备 (19)** 将 **12a** (1.5 g, 3.34 mmol)、吡咯烷-2-羧酸甲酯 (0.65 g, 5.02 mmol)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.17 g, 6.68 mmol)、S-phos (137 mg, 0.33 mmol) 和 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> (153 mg, 0.17 mmol) 混合于 20 mL 1,4-二氧六环中, 吹氮气 3 min, 在氮气保护下于 100 °C 搅拌 8 h, 以乙酸乙酯稀释 (150 mL), 水洗涤 (30 mL×2), 无水硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 硅胶柱色谱分离 ( $V_{PE}: V_{EA}=1:1$ ) 得到黄色固体 **19** (0.8 g, 48%)。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.99 (s, 1H), 7.69 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.29~7.26 (m, 3H), 7.04~6.99 (m, 3H), 6.12 (dd,  $J = 2.8, 8.8$  Hz, 1H), 4.15~4.05 (m, 4H), 3.73 (s, 3H), 3.66 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 3.54~3.50 (m, 1H), 2.85~2.82 (m, 1H), 2.44~2.29 (m, 2H), 1.49~1.31 (m, 5H), 1.06~0.72 (m, 12H); ESI-MS ( $m/z$ ): 498.3 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.11 1-[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-(4-氟苯乙酰氨基)-苯基]-2-吡咯烷甲酸的制备 (20)** 将 LiOH (77 mg, 3.22 mmol) 加入到化合物 **19** (0.81 g, 1.61 mmol) 的 THF/MeOH/H<sub>2</sub>O (20 mL) 混合溶剂组成的溶液中, 室温搅拌 3 h。减压去除有机溶剂, 以 1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 调节水相至 pH=6.0, 用乙酸乙酯 (50 mL×2) 萃取, 无水硫酸镁干燥, 采用制备 HPLC (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 0.05% HF) 分离得到白色固体 **20** (120 mg, 15%)。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.77 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.32~7.09 (m, 5H), 6.13 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 3.97~3.94 (m, 2H), 3.81~3.79 (m, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.49~3.36 (m, 2H), 2.62~2.60 (m, 1H), 2.27~2.26 (m, 1H), 1.41~1.23 (m, 5H), 0.86~0.69 (m, 12H); ESI-MS ( $m/z$ ): 484.3 [M+H]<sup>+</sup>。

化合物 **21** 和 **22** 的制备分别与化合物 **19** 和 **20**

的制备方法类似, 相对分子质量经质谱确认, 分别为 ESI-MS ( $m/z$ ): 470.3 [M+H]<sup>+</sup> 和 ESI-MS ( $m/z$ ): 456.3 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.12 1-[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-(4-氟苯乙酰氨基)-苯基]-氮杂环丁烷-3-甲酸乙酯的制备 (23)** 化合物 **23** 的制备方法与化合物 **19** 类似, 收率 48%。 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.99 (s, 1H), 7.69 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.29~7.26 (m, 3H), 7.04~6.99 (m, 3H), 6.12 (dd,  $J = 2.8, 8.8$  Hz, 1H), 4.15~4.05 (m, 4H), 3.73 (s, 3H), 3.66 (d,  $J = 2.4$  Hz, 2H), 3.54~3.50 (m, 1H), 2.85~2.82 (m, 1H), 2.44~2.29 (m, 2H), 1.49~1.31 (m, 5H), 1.06~0.72 (m, 12H); ESI-MS ( $m/z$ ): 498.3 [M+H]<sup>+</sup>。

**1.13 *N*-{[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-(4-氟苯乙酰氨基)]苯基}-*N*-甲基-胺基苯甲酸的制备 (A1)** 将 **16a** (200 mg, 0.38 mmol) 溶于甲醇-水 (3:1, 20 mL) 中, 加入氢氧化钠 (45 mg, 1.12 mmol), 回流过夜反应, 减压除去溶剂, 加入 10 mL 水, 以 5% 盐酸调节 pH=2~3, 过滤, 滤饼以 15 mL 石油醚洗涤, 干燥得白色固体 **A1** (120 mg, 61%)。

**A2** 和 **A3** 的合成方法与 **A1** 相似, 收率分别为 72% 和 56%。

**1.14 5-[[4'-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基]-3'-(4-甲基苯乙酰氨基)]-5-甲基-[1,1'-联苯]-2-基]四氮唑的制备 (B1)** 将化合物 **13a** (0.89 g, 1.85 mmol) 室温下加入单口瓶中, 加入 20 mL 甲苯, 室温下加入 NaN<sub>3</sub> (12.9 mmol, 0.85 g) 和 *n*-Bu<sub>3</sub>SnCl (5.18 g, 12.9 mmol), 加热到 120 °C 搅拌保持 40 h, TLC 检测 ( $V_{二氯甲烷}: V_{甲醇}=10:1$ ) **13a** 反应完全, 降温到室温, 减压除去溶剂, 用 KF 溶液 (100 mL, 10%) 洗涤, 然后倒入 100 mL 水中, 用二氯甲烷萃取 (100 mL×3), 合并二氯甲烷, 干燥, 硅胶柱色谱分离得到白色固体 **B1** (0.43 g, 42%)。

以化合物 **13b** 采用类似方法制备得到化合物 **B2**, 收率 35%。

**1.15 1-[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-(4-氟苯乙酰氨基)-苯基]-2-吡咯烷甲酰胺的制备 (C1)** 将 NH<sub>4</sub>Cl (74 mg, 1.40 mmol)、HATU (532 mg, 1.96 mmol) 和 Et<sub>3</sub>N (212 mg, 2.10 mmol) 加入到 20 mL 化合物 **20** (367 mg, 0.70 mmol) 的 DMF 溶液, 混合物室温搅拌 3 h, 加入 100 mL 水然后以乙酸乙酯萃取 (200 mL×3), 合并有机层并干燥, 以 pre-HPLC 分离 (CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O, 0.05% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 得到白色固体 **C1** (105 mg, 31%)。

化合物 **C2** 的制备方法与 **C1** 类似, 收率 43%。

**1.16 1-[4-(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)氨基-3-(4-氟苯乙酰氨基)-苯基]-氮杂环丁烷-3-甲酸的制备 (C3)** 化合物 **C3** 的制备方法与化合物 **20** 类似, 收率 35%。

**1.17 3'-(4-氟苯磺酰胺基)-4'-[(*N*-异丁基-*N*-3-正戊基)-氨基]-[1,1'-联苯]-2-甲酸的制备 (D1)** 将 0.12 g 化合物 **1** 加入到 2 mL 水、2 mL 硫酸和 2 mL 乙酸中, 氩气保护下将反应物于 120 °C 搅拌 14 h。冷却后, 加入乙酸乙酯和水。加入固体碳酸钠, 用 5% 稀盐酸将 pH 调节到 5~6。将有机层减压浓缩, 浓缩物通过硅胶柱色谱得到白色固体 **D1** (43 mg, 34%)。

**D2** 和 **D3** 的制备方法与 **D1** 类似, 收率分别为 42% 和 33%。

## 2 分子模拟实验

分子对接采用 UCSF 的 DOCK 6.9 程序, 采用的蛋白质晶体结构的 PDB 编号为 6AZV。采用 Chimera 处理蛋白和配体文件, 保存 DMS 文件, 加氢, 加电荷, 采用 Flexible Ligand Docking 模式进行对接, 其他参数采用默认值。程序运行在 CentOS 7 系统上, 采用 Pymol 1.5.0.3 软件作图。

## 3 抑制活性实验

IDO1 酶学实验参考文献方法<sup>[19]</sup>, 在标准反应混合液 [50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸钾缓冲溶液 (pH=6.5), 20 mmol·L<sup>-1</sup> 抗坏血酸钠, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 亚甲基蓝, 200 μg·mL<sup>-1</sup> 过氧化氢酶, 50 nmol·L<sup>-1</sup> IDO1 酶, 100 μmol·L<sup>-1</sup> L-色氨酸] 中加入不同量待测化合物 (阳性对照、加 DMSO 的空白对照), 在 37 °C 下反应 60 min, 加入适量三氯乙酸终止反应, 在 65 °C 下孵育 15 min, 离心取上清液转移到 96 孔板中, 与 125 μL 2% 的对二甲氨基苯甲醛醋酸溶液混合, 室温孵育 10 min。依据 480 nm 波长处吸光度值 (OD) 计算抑制率, 从而计算 IC<sub>50</sub>。

IDO1 细胞学实验参考文献<sup>[21]</sup>, 将待测化合物及对照化合物用 DMSO 配成贮备液, 用 DMEM 稀释至不同浓度; 取对数生长期的 HeLa 细胞以每孔 2×10<sup>5</sup> 个细胞接种于 96 孔板, 加入 100 μL IFN-γ, 使用手动移液管将特定浓度的化合物添加孔中, 将细胞置于 37 °C 培养 20 h。适量三氯乙酸终止反应。在 50 °C 下孵育 30 min。离心取上清液, 加入 2% (w/v) Ehrlich 试剂于透明 96 孔底板中, 然后在室温下孵育 10 min。依据 490 nm 处 OD 值计算抑制率, 从而计算化合物 IC<sub>50</sub> 值。

TDO 细胞学实验参考文献<sup>[22]</sup>, 对合成的化合物及对照化合物用 DMSO 配成 100 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度的储备液, 用 DMEM 继续稀释至 1 μmol·L<sup>-1</sup>; 取对数生长期的 U-87-MG 细胞以每孔 2×10<sup>4</sup> 个细胞接种于 96 孔板, 培养 12 h 后, 加入上述待测化合物溶液和 L-色氨酸, 继续培养 8 h 后将 DMEM 培养基上清液转移至新的试管中, 并加入三氯乙酸终止反应。65 °C 水浴中孵育 15 min 后, 离心取上清液转移至 96 孔板中, 与等体积 4-二甲氨基苯甲醛混合。依据 492 nm OD 值计算抑制率。

## References

- [1] Murray MF. The human indoleamine 2,3-dioxygenase gene and related human genes [J]. *Curr Drug Metab*, 2007, 8: 197-200.
- [2] Lewis-Ballester A, Karkashon S, Batabyal D, et al. Inhibition mechanisms of human indoleamine 2,3-dioxygenase 1 [J]. *J Am Chem Soc*, 2018, 140: 8518-8525.
- [3] Rohrig UF, Somi Reddy M, Pierre V, et al. Challenges in the discovery of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 9421-9437.
- [4] Fatokun AA, Hunt NH, Ball HJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: characteristics and potential roles in health and disease [J]. *Amino Acids*, 2013, 45: 1319-1329.
- [5] Michael P, Nikolaus VKD, Iris O, et al. Cancer immunotherapy by targeting IDO1/TDO and their downstream effectors [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 673.
- [6] Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism [J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 1363-1372.
- [7] Klockow JL, Glass TE. Development of a fluorescent chemosensor for the detection of kynurenine [J]. *Org Lett*, 2013, 15: 235-237.
- [8] Jochems C, Fantini M, Fernando RI, et al. The IDO1 selective inhibitor epacadostat enhances dendritic cell immunogenicity and lytic ability of tumor antigen-specific T cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7: 37762-37772.
- [9] Zhang XY, Cui GN, Xu BL. The research progress of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 53: 1784-1796.
- [10] Hong R, Zhou Y, Tian X, et al. Selective inhibition of IDO1, D-1-methyl-tryptophan (D-1MT), effectively increased EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody MT110 efficacy against IDO1<sup>hi</sup> breast cancer via enhancing immune cells activity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 54: 118-124.
- [11] Spahn J, Peng J, Lorenzana E, et al. Improved anti-tumor immunity and efficacy upon combination of the IDO1 inhibitor GDC-0919 with anti-PD-11 blockade versus anti-PD-11 alone in preclinical tumor models [J]. *J Immunother Cancer*, 2015, 3 (S2): 1.
- [12] Beatty GL, O'Dwyer PJ, Clark J, et al. First-in-human phase I study of the oral inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase-1 Epacadostat (INCB024360) in patients with advanced solid malignancies [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23: 3269-3276.
- [13] Siu LL, Gelmon K, Chu Q, et al. Abstract CT116: BMS-986205, an optimized indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor, is well tolerated with potent pharmacodynamic (PD) activity, alone and in combination with nivolumab (nivo) in advanced cancers in a phase 1/2a trial [J]. *Cancer Res*, 2017, 77 (13 Suppl): CT116.
- [14] Meininger D, Zalameda L, Liu Y, et al. Purification and kinetic characterization of human indoleamine 2,3-dioxygenases 1 and 2

- (IDO1 and IDO2) and discovery of selective IDO1 inhibitors [J]. BBA Proteins Proteom, 2011, 1814: 1947-1954.
- [15] Cheng MF, Hung MS, Song JS, et al. Discovery and structure-activity relationships of phenyl benzenesulfonylhydrazides as novel indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2014, 24: 3403-3406.
- [16] Catarina C, David S, Martyn I, et al. Benzofuranquinones as inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Synthesis and biological evaluation [J]. Org Biomol Chem, 2014, 12: 2663-2674.
- [17] Pang WQ, Gao L, Dou YY, et al. Screening of natural small molecule IDO-1 inhibitors with anti-tumor role [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2017, 52: 1416-1423.
- [18] Zhang Y, Kang S, Mukherjee T, et al. Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolate biosynthesis? [J]. Biochemistry, 2007, 46: 145-155.
- [19] Nelp MT, Kates PA, Hunt JT, et al. Immune-modulating enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase is effectively inhibited by targeting its apo-form [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018, 115: 3249-3254
- [20] Liu X, Shin N, Koblisch HK, et al. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity [J]. Blood, 2010, 115: 3520-3530.
- [21] Qiang L, Liang Y, Pan X, et al. Discovery of a polysaccharide from the fruiting bodies of *Lepista sordida* as potent inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in HepG2 cells via blocking of STAT1-mediated JAK-PKC- $\delta$  signaling pathways [J]. Carbohydr Polym, 2018, 197: 540-547.
- [22] Zhang S, Qi F, Fang X, et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase inhibitory activities of tryptanthrin derivatives [J]. Eur J Med Chem, 2018, 160: 133-145.