

## 新型 AhR 激动剂的设计、合成及活性研究

贾剑敏\*, 蔡亚仙, 韩自省, 徐佳佳, 蔡开明, 胡晓慧

(上海泽德曼医药科技有限公司研发部, 上海 201203)

**摘要:** 芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 是一种配体激活的转录因子, 它在包括免疫细胞和上皮细胞在内的多种细胞中调节基因表达。AhR 信号通路在健康和疾病状态下的免疫系统中均发挥着重要作用。Tapinarof 目前是全球首个且唯一被批准用于治疗银屑病的小分子外用治疗性 AhR 调节剂。为了提高 Tapinarof 的活性和光化学稳定性, 本研究设计并合成了一系列 2-苯基-色烯-4H-酮衍生物, 并评价了该系列化合物作为新型 AhR 激动剂的潜力。其中, 化合物 **5a**、**5c**、**5e** 和 **5f** 显示出良好的 AhR 激活作用, 其  $EC_{50}$  值分别为 7、9、6 和 6  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 比 Tapinarof 高 10~14 倍。化合物 **5a** 和 **5e** 对干扰素- $\gamma$  产生的抑制效果与 Tapinarof 相当。此外, 化合物 **5a**~**5f** 相较于 Tapinarof 具有更好的光化学稳定性。本研究为后续新型 AhR 激动剂的开发提供新的分子骨架。

**关键词:** 芳香烃受体; 激动剂; Tapinarof; 干扰素- $\gamma$ ; 光化学稳定性

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)11-2997-09

## Design, synthesis and biological evaluation of novel AhR agonists

JIA Jian-min\*, CAI Ya-xian, HAN Zi-xing, XU Jia-jia, CAI Kai-ming, HU Xiao-hui

(Research and development department, Thederma Shanghai Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

**Abstract:** The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor that regulates gene expression in a range of cells, including immune and epithelial cells. AhR signaling plays important roles in the immune system in both health and disease states. Tapinarof is a first-in-class small-molecule topical therapeutic AhR modulating agent launched for the treatment of psoriasis. To improve the activity and chemical stability of Tapinarof, a series of 2-phenylchromen-4-one derivatives were designed, synthesized and evaluated as novel AhR agonists. Compounds **5a**, **5c**, **5e** and **5f** potentially activated AhR with an  $EC_{50}$  value of 7, 9, 6 and 6  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively, which are 10–14 fold more potent than Tapinarof. Compounds **5a** and **5e** exhibit comparable inhibitory effects on IFN- $\gamma$  production as Tapinarof. Furthermore, compounds **5a**–**5f** exhibited favorable photochemical stability compared to Tapinarof. The compounds may eventually serve as lead compounds for the development of new AhR agonists.

**Key words:** aryl hydrocarbon receptor; agonist; Tapinarof; IFN- $\gamma$ ; photochemical stability

芳香烃受体 (aryl hydrocarbon receptor, AhR) 是碱性螺旋-环-螺旋 (basic helix-loop-helix, bHLH) 转录因子超家族的成员之一, 属于 bHLH-PAS (PER-ARNT-SIM) 亚家族。与其他 bHLH 成员不同, 到目前为止, AhR 是已知的唯一一个配体激活的 bHLH 转录因子<sup>[1]</sup>。传统上, AhR 被认为是典型配体 2,3,7,8-四氯二苯并二

噁英 (通常被称为“二噁英”) 产生毒性和致癌作用中的关键因子<sup>[2,3]</sup>。由于 AhR 配体可能具有毒性效应, 并且能够诱导细胞色素 P450 等酶的产生, AhR 曾在相当长的一段时间内被认为不可以作为药物治疗的靶点<sup>[4]</sup>。然而, 近年来, 有大量研究表明, AhR 对免疫系统、肝脏、心血管、血管和生殖等系统正常功能的维持具有重要贡献, 使得 AhR 逐渐成为热门的研究领域<sup>[5]</sup>。AhR 在不同细胞类型中广泛表达, 包括许多免疫细胞和屏障器官, 如皮肤、肠道和肺<sup>[6]</sup>等。因此, 对 AhR 配

收稿日期: 2024-05-31; 修回日期: 2024-09-04.

\*通讯作者 Tel: 86-21-60191631, Fax: 86-21-60191661,

E-mail: jianmin\_jia@thederma.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0517

体的进一步研究能促使人们重新考虑它们潜在的治疗应用。

在没有结合配体时(非活化形式), AhR 位于细胞质中的伴侣蛋白复合体内, 该复合体由两个 90 kDa 的热休克蛋白分子、一个乙型肝炎病毒 X 相关蛋白 2 (也称为 AhR 相互作用蛋白)、共伴侣蛋白 p23 及 AhR 蛋白等组成<sup>[7]</sup>。当 AhR 与配体结合时, AhR 复合体会发生构象变化, 随后转移到细胞核中。在细胞核内, AhR 蛋白从其复合体中释放出来, 然后与芳香烃受体核转运蛋白 (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) 形成异二聚体。这个二聚体能与 DNA 中的外源性反应元件结合, 从而启动下游基因的表达。此外, AhR 还可以与其他转录因子相互作用, 从而影响这些结合转录因子调控基因的表达<sup>[8-11]</sup>。AhR 与 ARNT 的二聚体形成及与其他转录因子的相互作用对于细胞信号传导和基因表达调控至关重要。

目前已有多个 AhR 小分子配体被报道<sup>[12,13]</sup>。根据其来源, 可分为天然配体和合成配体两大类。天然配体是指在生物体内产生的可与 AhR 结合的配体, 可以是内源性 (宿主或微生物群) 或外源性 (饮食摄入或微生物群) 配体; 合成配体是指人工合成的 AhR 配体, 包括各种合成类化合物或分离得到的天然产物<sup>[14-18]</sup>。部分天然的和由制药公司开发的 AhR 小分子激动剂<sup>[19-21]</sup>如图 1 所示, 其中, Tapinarof 是目前第一个也是唯一一个获得 FDA 批准的 AhR 激动剂<sup>[22,23]</sup>。Tapinarof 是从一种土壤线虫的共生细菌代谢产物中分离出来的非激素类小分子化学药, 能够激活 AhR 信号通路, 用于治疗自身免疫炎症性疾病, 例如银屑病和特应性皮炎等, 其作用机制涉及调节免疫反应和减少皮肤炎症。然而, 作为第一个靶向 AhR 的小分子药物, Tapinarof 仍然存在一些问题, 尤其是光化学稳定性较差<sup>[24]</sup>, 导致其临床

应用受限。本研究针对上述问题, 以 Tapinarof 的结构为基础进行合理优化, 设计、合成得到了一系列新型 2-苯基-色烯-4*H*-酮衍生物, 其显示出更好的 AhR 激动活性及良好的光化学稳定性。

首先, 为了提高二苯乙烯结构的光化学稳定性, 通过环化 Tapinarof 的烯键, 得到了一系列 2-苯基-色烯-4*H*-酮母核的衍生物 (图 2A); 其次, 为了增强化合物与 AhR 受体之间的  $\pi$ - $\pi$  相互作用<sup>[25]</sup> (图 2B、C), 通过用氟取代芳香环上的氢原子来改变化合物的电子云分布, 从而设计并合成了化合物 **5a**~**5f**。

## 结果与讨论

### 1 化合物的合成

化合物 **5a**~**5f** 的合成见合成路线 1。将取代苯乙酮 **1** 与取代苯甲醛 **2** 在碱性条件下进行羟醛缩合反应, 得到关键中间体 **3a**~**3f**。进而通过在高温条件下进行由碘催化的环化反应得到化合物 **4a**~**4f**。最后使用 BBr<sub>3</sub> 对 **4a**~**4f** 进行去甲基化反应得到目标化合物 **5a**~**5f**。

### 2 活性评价

通过 HepG2-Lucia AhR 报告基因实验评价目标化合物对 AhR 的激动活性。HepG2-Lucia AhR 细胞是从人源 HepG2 肝癌细胞改造而来, 通过监测 Cyp1a1 诱导的 Lucia 荧光素酶活性显示 AhR 的激活状态, 使用 Tapinarof 作为阳性对照。结果如表 1 所示, 当 Tapinarof 的烯键被环化时, 化合物 **5b** 的活性显著降低, EC<sub>50</sub> 为 1 333 nmol·L<sup>-1</sup>。推测是由于烯键的环化改变了苯环的电子云分布, 从而削弱了化合物与 AhR 之间的  $\pi$ - $\pi$  相互作用。为了证实这一假设, 通过引入不同的取代基来改变化合物的电子云分布。当在芳香环上引入氟取代基时, 化合物的激动活性显著增强, 其中化合物 **5c**、

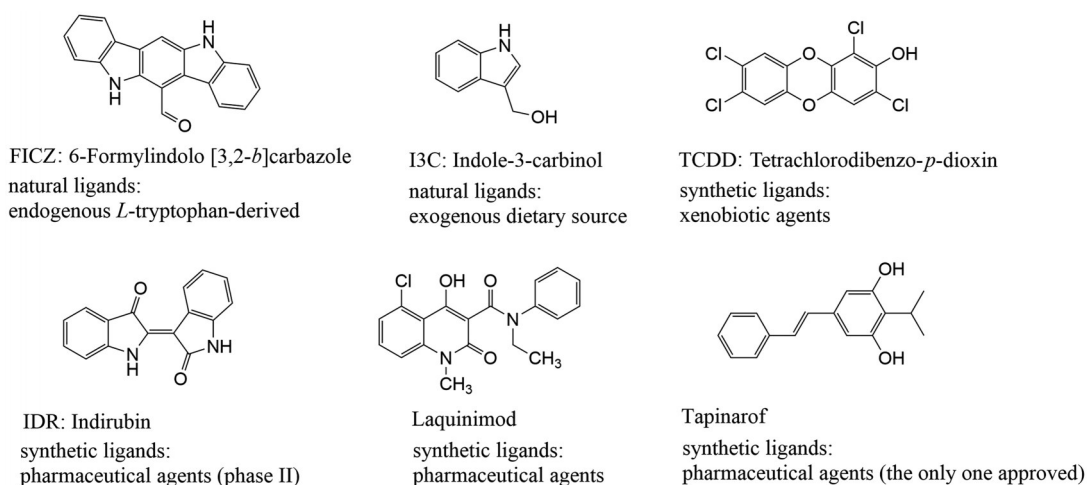
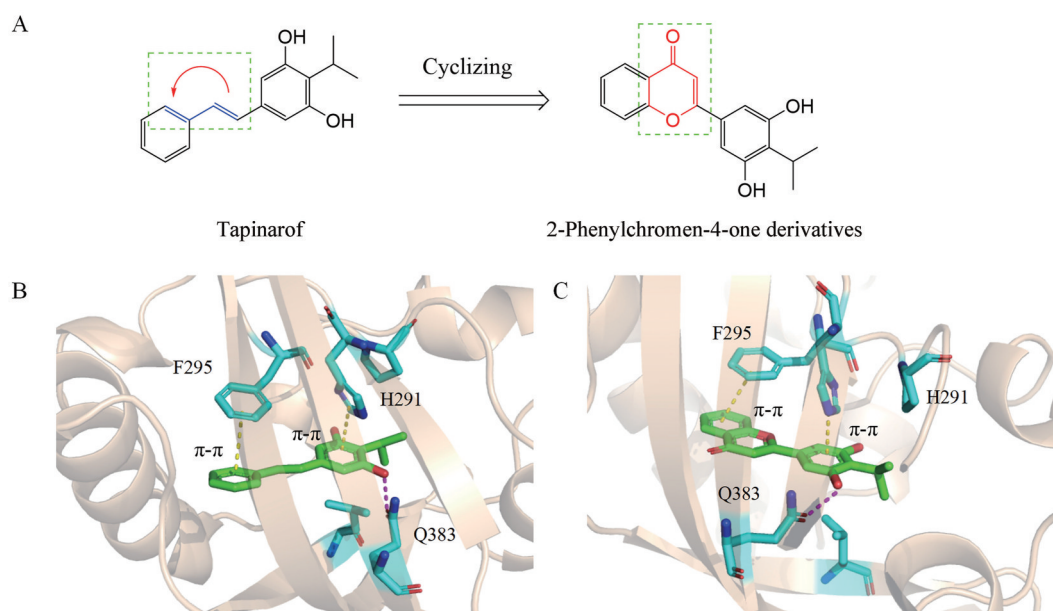
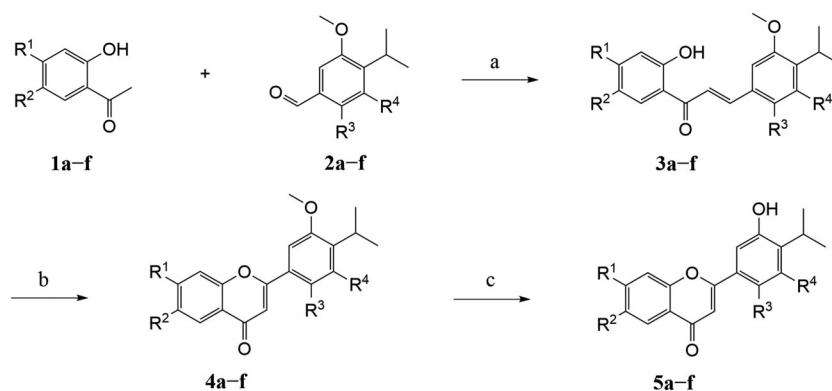


Figure 1 Structures of representative natural, xenobiotics, and synthetic AhR agonists. AhR: Aryl hydrocarbon receptor



**Figure 2** Compounds design and the binding modes predicted by molecular docking. A: Design of 2-phenylchromen-4-one based AhR agonists; B: The binding mode of Tapinarof to AhR protein; C: The binding mode of target compound to AhR protein. The docking based on X-ray cocrystal structure from PDB 7ZUB. Yellow dash lines represent  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions and purple dash lines represent hydrogen bond



1a	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H	2a	R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	3a	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	4a	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	5a	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H
1b	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H	2b	R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -OMe	3b	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -OMe	4b	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -OMe	5b	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -OH
1c	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -F	2c	R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	3c	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -F, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	4c	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -F, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	5c	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -F, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H
1d	R <sup>1</sup> -F, R <sup>2</sup> -H	2d	R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	3d	R <sup>1</sup> -F, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	4d	R <sup>1</sup> -F, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H	5d	R <sup>1</sup> -F, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -H, R <sup>4</sup> -H
1e	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H	2e	R <sup>3</sup> -F, R <sup>4</sup> -OMe	3e	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -F, R <sup>4</sup> -OMe	4e	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -F, R <sup>4</sup> -OMe	5e	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -F, R <sup>4</sup> -OH
1f	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H	2f	R <sup>3</sup> -F, R <sup>4</sup> -F	3f	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -F, R <sup>4</sup> -F	4f	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -F, R <sup>4</sup> -F	5f	R <sup>1</sup> -H, R <sup>2</sup> -H, R <sup>3</sup> -F, R <sup>4</sup> -F

**Scheme 1** Synthesis of compounds of 5a-5f. a: KOH, EtOH, r.t., 6 h; b: I<sub>2</sub>, DMSO, 140 °C, 1 h; c: BBr<sub>3</sub>, DCM, 0 °C-r.t., 1 h

**5e** 和 **5f** ( $EC_{50} < 10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的活性较阳性对照药 Tapinarof ( $EC_{50} = 86 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 高出 10~14 倍, 表明通过引入氟原子可以加强这些化合物与 AhR 之间的  $\pi$ - $\pi$  相互作用。有趣的是, 去除羟基 (**5a**) 和引入氟原子 (**5c**、**5e** 和 **5f**) 都可以增加化合物的 AhR 活性, 这可能是由于去除羟基和引入氟原子对芳香环电子云分布的影响相似所致。

患有银屑病或特应性皮炎等皮肤疾病的患者, 与

正常人相比, 他们的皮肤中活化的 T 细胞数量显著增高。这些 T 细胞释放炎症因子, 包括细胞因子  $\gamma$ -干扰素 (interferon-gamma, IFN- $\gamma$ ), 促进角质形成细胞的激活、过度增殖和分化改变, 导致炎症性皮肤病的形成。为了评估新化合物 **5a**、**5c**~**5f** 是否能影响体外 T 细胞活性, 在有/无药物存在的情况下培养人外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC), 并加入活化刺激物菜豆素凝集素 (phaseolus vulgaris

**Table 1** The agonist activity of different compounds to AhR.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ 

Compound	Structure	EC <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Tapinarof		0.086 ± 0.011
5a		0.007 ± 0.001
5b		1.333 ± 0.060
5c		0.009 ± 0.002
5d		0.044 ± 0.007
5e		0.006 ± 0.001
5f		0.006 ± 0.001

leucoagglutinin, PHA-L), 以 Tapinarof 作为阳性对照, 测定化合物 **5a**、**5c**~**5f** 对 T 细胞活力和细胞因子 IFN- $\gamma$  的影响。除 **5f** 外, 所测试的化合物均能够剂量依赖地抑制 PHA-L 刺激的 PBMC 增殖, IC<sub>50</sub> 如表 2 所示。在最高浓度 (30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 时, **5a**、**5c**、**5d** 和 Tapinarof 都显示出了一定的细胞毒性 (对细胞增殖的抑制作用强于 DMSO 组), 而化合物 **5e** 未显示出细胞毒性 (图 3A)。同时, 除了 **5f** 外, 受试化合物都能以剂量依赖方式抑制 IFN- $\gamma$  的产生 (图 3B), 15  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时抑制率超过 80%, 与阳性对照 Tapinarof 相当。

### 3 光化学稳定性评价

Hu 等<sup>[24]</sup>研究显示, Tapinarof 的光稳定性较差。为了验证 Tapinarof 双键环化后的化合物 **5a**~**5f** 可以提高化合物的光稳定性, 利用紫外线 (ultraviolet, UV) 照度 (12.08 $\times$ 100  $\mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) 照射, 在照射后的不同时间点

(0~72 h), 通过高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 分析了化合物的纯度, 以评估其光稳定性。结果如图 4 所示, 与 Tapinarof 相比, 化合物 **5a**~**5f** 表现出优异的光稳定性 (72 h 内纯度均维持在 100%)。这表明 Tapinarof 双键的环化可以显著提高化合物的光稳定性, 从而验证了作者的假设, 即 Tapinarof 的光不稳定性源于其二苯乙烯的化学结构。

### 4 结论

为了增加 AhR 激动剂药物 Tapinarof 的光稳定性, 同时进一步增强活性, 本研究以 Tapinarof 结构为基础, 通过环化二苯乙烯双键, 设计、合成了 6 个新型 2-苯基-色烯-4*H*-酮类化合物。其中大部分的化合物显示出了良好的激动活性, 较 Tapinarof 提高 10~14 倍。进一步的研究表明, 化合物能够抑制 PHA-L 刺激的 PBMC 细胞增殖, 并能够降低细胞因子 IFN- $\gamma$  的含量, 表明其具有改善皮肤病患者炎症因子水平的潜在作用。值得注意的是, 目标化合物在紫外线照射实验中, 显示出了优秀的光化学稳定性, 0~72 h 内, 其降解率大大低于 Tapinarof, 为发现具有稳定化学性质的 AhR 激动剂提供了基础。

### 实验部分

本文化合物的 <sup>1</sup>H NMR 及 <sup>13</sup>C NMR 使用 Bruker AVANCE 400MHz 型核磁共振波谱仪测定; HR-MS-ESI 使用超高分辨 Waters Xevo G2-XS QTOF 质谱仪测定; 高效液相制备使用 Shimadzu LC-20AP 制备型色谱仪; 高效液相色谱仪使用 Agilent LC-1260 型色谱仪; 所有试剂均为市售分析纯或色谱级, 除特别说明外, 一般不经纯化直接使用。HepG2-Lucia AhR Reporter 细胞株购于 InvivoGen 公司, PBMC 细胞购于上海儒百生物科技有限公司, EMEM 培养基购于 ATCC, RPMI 1640 培养基、10X NEAA、青霉素-链霉素和胎牛血清均购于 Gibco 公司, PHA 购于 Roche 公司, 6-甲酰基吲哚并[3,2-b]吡啶 [6-formylindolo(3,2-b)carbazole, FICZ] 购于 MCE 公司, QUANTI-Luc<sup>TM</sup> 检测试剂购于 InvivoGen 公司, CellTiter-Glo<sup>®</sup> 发光法细胞活力检测试剂购于 Promega 公司, IFN- $\gamma$  ELISA 试剂盒购于 BD 公司。

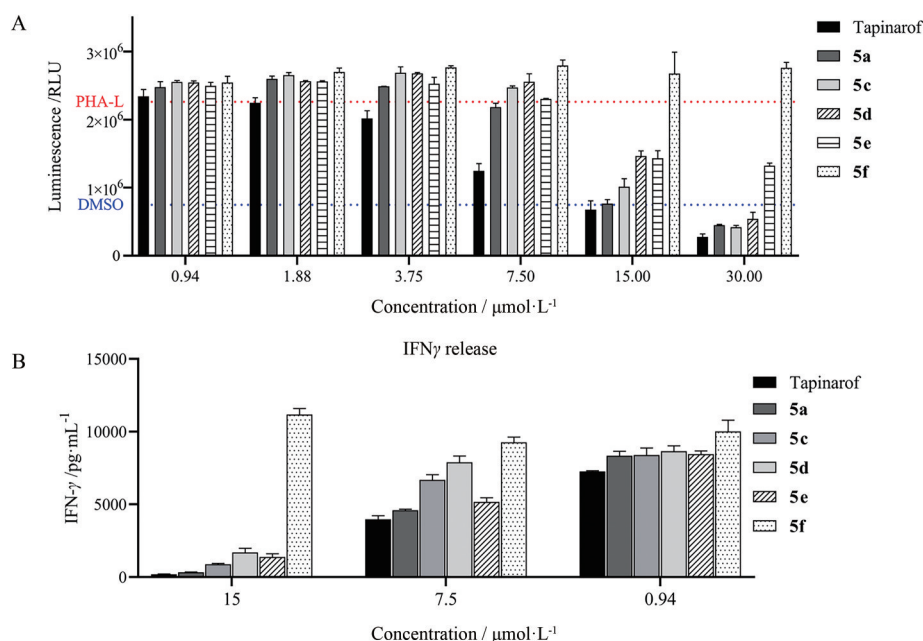
### 1 化学实验

#### 1.1 4-异丙基-3-甲氧基苯甲醛 (2a)

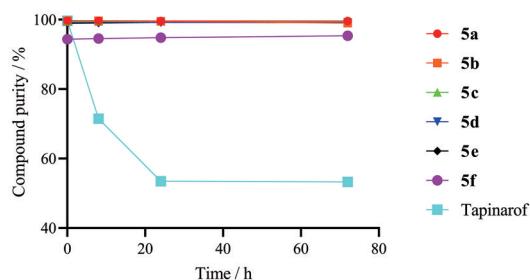
**1.1.1 2-(4-溴-2-甲氧基苯基)丙-2-醇** 将 4-溴-2-甲氧基苯甲酸甲酯 (10 g, 40.8 mmol) 溶于四氢呋喃 (100 mL)

**Table 2** Effect of compounds **5a**, **5c**–**5f** and Tapinarof against human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) proliferation.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ 

Compound	Tapinarof	5a	5c	5d	5e	5f
IC <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	7.7 ± 0.57	10.6 ± 0.17	9.8 ± 0.21	14.6 ± 0.09	12.4 ± 0.88	> 30



**Figure 3** Effect of new compounds **5a**, **5c**–**5f** on T cell activity *in vitro*. A: The compounds affect phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) stimulated PBMC proliferation; B: The inhibitory effects of these compounds on interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) production. The red line is the mean value of test data in PHA-L positive control group, and the blue line is the mean value of test data in DMSO blank control group



**Figure 4** Stability and degradation rate of compounds under ultraviolet (UV) light exposure, detection times at 0, 8, 24 and 72 h

中, 氮气保护下, 降温至  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 滴加甲基溴化镁 (89.7 mL, 89.7 mmol), 升温至  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  后, 继续反应 1 h。降温至  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 加入饱和氯化铵 (500 mL), 反应液用乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 300 mL, 有机相用饱和氯化钠 (100 mL) 洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到无色油状产物 10.0 g, 产率为 99%。

**1.1.2 4-溴-1-异丙基-2-甲氧基苯** 将 2-(4-溴-2-甲氧基苯基)丙-2-醇 (12.0 g, 48.9 mmol) 溶于二氯甲烷 (100 mL) 中, 氮气保护下, 降温  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 滴加三甲基硅烷 (25 g, 215.0 mmol) 和三氟乙酸 (38.5 g, 337.6 mmol)。升温至  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  后, 继续反应 12 h。降温至  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 加入饱和碳酸氢钠溶液 (200 mL), 反应液用二氯甲烷萃取 2 次, 每次 60 mL。有机相用饱和氯化钠 (40 mL) 洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色

谱 [石油醚:乙酸乙酯 (v/v) = 10:1] 分离得到无色油状产物 10.0 g, 产率为 89%。

**1.1.3 4-异丙基-3-甲氧基苯甲醛 (2a/2c/2d)** 将 4-溴-1-异丙基-2-甲氧基苯 (3 g, 13.09 mmol) 溶于四氢呋喃中, 氮气保护下, 降温  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 滴加正丁基锂 (6.29 mL, 15.73 mmol)。滴加完毕, 在  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  继续反应 1 h。在  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 滴加 DMF (4.79 g, 65.47 mmol)。升温至  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 继续反应 1 h。反应毕, 降温至  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 加入饱和氯化铵 (100 mL), 反应液用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 100 mL。有机相用饱和氯化钠洗涤 2 次, 每次 100 mL, 有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 [石油醚:乙酸乙酯 (v/v) = 1:0~10:1] 分离得到无色油状产物 1.8 g, 产率为 77.1%。

## 1.2 4-异丙基-3,5-二甲氧基苯甲醛 (2b)

将 3,5-二甲氧基-4-异丙基苯基甲醇 (0.5 g, 2.38 mmol) 和戴斯-马丁试剂 (2.02 g, 4.76 mmol) 加入到二氯甲烷 (20 mL) 中, 在  $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  下, 继续反应 12 h。反应结束后, 向反应体系中加入饱和碳酸钠溶液 (60 mL), 反应液用二氯甲烷 (80 mL) 萃取 1 次, 有机相用饱和碳酸钠 (60 mL) 洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 得到红色产物 0.4 g, 产率为 82.79%。

## 1.3 2-氟-4-异丙基-3,5-二甲氧基苯甲醛 (2e)

**1.3.1 (2-氟-4-异丙基-3,5-二甲氧基苯基)甲醇** 将 3,5-二甲氧基-4-异丙基苯基甲醇 (25 g, 118.9 mmol) 溶

于乙腈 (250 mL) 中, 氮气保护下, 降温 0 °C, 加入选择性氟 (42.12 g, 118.9 mmol)。在 10 °C 下, 继续反应 5 h。向反应液加入水 (250 mL), 用乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 100 mL。有机相分别用饱和碳酸氢钠 (100 mL) 和饱和氯化钠 (100 mL) 各洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 [石油醚: 乙酸乙酯 (v/v) = 30:1~5:1] 分离得到黄色油状产物 16.0 g, 产率为 50.70%。

**1.3.2 2-氟-4-异丙基-3,5-二甲氧基苯甲醛 (2e)** 将(2-氟-4-异丙基-3,5-二甲氧基苯基)甲醇 (15 g, 65.71 mmol) 和戴斯-马丁试剂 (30.66 g, 72.29 mmol) 加入到二氯甲烷 (300 mL), 在 20~25 °C 下, 继续反应 16 h。反应结束后, 分别用饱和碳酸钠溶液 (200 mL), 饱和食盐水 (100 mL) 萃洗。有机相用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 [石油醚: 乙酸乙酯 (v/v) = 100:1~20:1] 分离得到白色固体产物 11.5 g, 产率为 77.35%。

#### 1.4 2,3-二氟-5-甲氧基-4-(丙-2-基)苯-1-甲醛 (2f)

**1.4.1 1-(2,3-二氟-6-甲氧基苯基)乙烷-1-酮** 将 1,2-二氟-4-甲氧基苯 (15.0 g, 104 mmol) 溶于四氢呋喃 (100 mL) 中。氮气保护下, 降温 -78 °C, 滴加正丁基锂 (45.8 mL, 114.5 mmol)。在 -78 °C 下, 继续反应 0.5 h。在 -60 °C 下, 滴加 *N*-甲氧基-*N*-甲基乙酰胺 (12.9 g, 124.9 mmol)。在 -78 °C 下, 继续反应 2 h。升温至 0 °C, 加入饱和氯化铵 (1 000 mL) 淬灭反应, 反应液用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 100 mL。有机相用饱和氯化钠洗涤 2 次, 每次 100 mL, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 [石油醚: 乙酸乙酯 (v/v) = 30:1~10:1] 分离得到无色油状产物 6.0 g, 产率为 31.0%。

**1.4.2 2-(2,3-二氟-6-甲氧基苯基)丙烷-2-醇** 将 1-(2,3-二氟-6-甲氧基苯基)乙烷-1-酮 (4.50 g, 24.2 mmol) 溶于四氢呋喃 (100 mL) 中。氮气保护下, 降温 -78 °C, 滴加甲基溴化镁 (29 mL, 29 mmol)。在 25 °C 下, 继续反应 1 h。降温至 0 °C, 加入饱和氯化铵 (500 mL) 淬灭反应, 反应液用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 100 mL。有机相用饱和氯化钠洗涤 2 次, 每次 50 mL, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 [石油醚: 乙酸乙酯 (v/v) = 30:1~10:1] 分离得到黄色油状产物 4.5 g, 产率为 92.1%。

**1.4.3 1,2-二氟-3-异丙基-4-甲氧基苯** 参照 4-溴-1-异丙基-2-甲氧基苯的合成方法, 得到黄色油状物。

**1.4.4 2,3-二氟-5-甲氧基-4-(丙-2-基)苯-1-甲醛 (2f)** 将 1,2-二氟-3-异丙基-4-甲氧基苯 (0.50 g, 2.69 mmol) 溶于四氢呋喃 (20 mL) 中。氮气保护下, 降温 -78 °C, 滴加正丁基锂 (1.29 mL, 3.23 mmol)。在 -78 °C 下, 继续反

应 0.5 h。在 -60 °C 下, 滴加 DMF (0.62 mL, 8.06 mmol)。在 -78 °C 下, 继续反应 2 h。升温至 0 °C, 加入饱和氯化铵 (50 mL) 淬灭反应, 反应液用乙酸乙酯萃取 3 次, 每次 50 mL。无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 [石油醚: 乙酸乙酯 (v/v) = 30:1~10:1] 分离得到黄色油状产物 0.2 g, 产率为 34.8%。

#### 1.5 (*E*)-1-(2-羟基苯基)-3-(4-异丙基-3-甲氧基苯基)丙-2-烯-1-酮 (3a)

将 4-异丙基-3-甲氧基苯甲醛 (500 mg, 2.8 mmol) 和 1-(2-羟基苯基)乙烷-1-酮 (381.9 mg, 2.8 mmol) 溶于无水乙醇 (5 mL) 中。在 25 °C 下, 加入氢氧化钾 (393.5 mg, 7.0 mmol)。在 25 °C 下, 继续反应 6 h。反应液减压浓缩, 加入水 (10 mL), 用二氯甲烷萃取 2 次, 每次 20 mL。有机相用饱和氯化钠 (20 mL) 洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 [石油醚: 乙酸乙酯 (v/v) = 1:0~20:1] 分离得到黄色油状产物 700 mg, 产率为 84%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 12.61 (s, 1H), 8.27 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.02 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 7.83 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 7.59~7.54 (m, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.43~7.39 (m, 1H), 7.30~7.27 (m, 1H), 7.03~6.99 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.31~3.23 (m, 1H), 1.17 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H)。

#### 1.6 目标化合物 3b~3f 合成通法

采用化合物 3a 类似合成步骤合成目标化合物 3b~3f。

#### 1.7 2-(4-异丙基-3-甲氧基苯基)-4*H*-色烯-4-酮 (4a)

将 (*E*)-1-(2-羟基苯基)-3-(4-异丙基-3-甲氧基苯基)丙-2-烯-1-酮 (600 mg, 2.0 mmol) 溶于 DMSO (6 mL) 中。在 140 °C 下, 继续反应 1 h。降温至 0 °C, 加入 10% 的硫代硫酸钠 (100 mL)。反应液用乙酸乙酯萃取 2 次, 每次 50 mL。有机相用饱和氯化钠 (100 mL) 洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 硅胶柱色谱 [石油醚: 乙酸乙酯 (v/v) = 20:1~5:1] 分离得到黄色固体 500 mg, 产率为 83%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 8.06 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.2 Hz, 1H), 7.86~7.78 (m, 2H), 7.68~7.64 (m, 1H), 7.58 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.55~7.47 (m, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.10 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.32~3.26 (m, 1H), 1.19 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H)。

#### 1.8 目标化合物 4b~4f 的合成通法

采用化合物 4a 类似合成步骤合成目标化合物 4b~4f。

#### 1.9 2-(3-羟基-4-异丙基苯基)-4*H*-色烯-4-酮 (5a)

将 2-(4-异丙基-3-甲氧基苯基)-4*H*-色烯-4-酮 (0.5 g, 1.7 mmol) 溶于二氯甲烷 (5 mL)。在 0 °C 下, 滴加三溴

化硼 (851.1 mg, 3.4 mmol)。在 25 °C 下, 继续反应 0.5 h。降温至 0 °C, 饱和碳酸氢钠 (20 mL) 淬灭反应, 调节 pH 至 7~8, 用二氯甲烷萃取 2 次, 每次 40 mL。有机相用饱和氯化钠 (20 mL) 洗涤 1 次, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩滤液, 制备液相 (色谱柱: Phenomenex luna C18 150 mm × 40 mm × 15 μm; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为乙腈; 洗脱梯度: 0~11 min, 55%→25%A) 分离得到白色固体 285.8 mg, 产率为 59%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 9.83 (s, 1H), 8.06 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.88~7.81 (m, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.55~7.48 (m, 2H), 7.43 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 3.31~3.23 (m, 1H), 1.20 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 177.41, 163.51, 156.10, 155.34, 139.30, 134.78, 129.82, 127.25, 125.96, 125.30, 123.84, 118.80, 118.05, 112.68, 106.77, 27.01, 22.63; HR-MS-ESI (*m/z*) calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 281.117 8; found, 281.118 0。

#### 1.10 2-(3,5-二羟基-4-异丙基苯基)-4H-色烯-4-酮 (5b)

采用 5a 类似合成方法。得到灰色固体 292.57 mg, 产率为 84%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 9.56 (s, 2H), 8.05 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.85~7.80 (m, 1H), 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.54~7.50 (m, 1H), 6.90 (s, 2H), 6.56 (s, 1H), 3.54~3.46 (m, 1H), 1.27 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 177.29, 163.83, 157.29, 156.07, 134.86, 129.34, 125.99, 125.35, 124.84, 123.84, 118.68, 106.49, 105.14, 24.34, 20.66; HR-MS-ESI (*m/z*) calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 297.112 7; found, 297.113 1。

#### 1.11 6-氟-2-(3-羟基-4-异丙基苯基)-4H-色烯-4-酮 (5c)

采用 5a 类似合成方法。得到粉红色固体 307.8 mg, 产率为 63%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 9.81 (s, 1H), 7.85~7.79 (m, 1H), 7.77~7.68 (m, 2H), 7.51 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 3.29~3.22 (m, 1H), 1.20 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 176.74, 163.85, 160.68, 158.26, 155.34, 152.53, 139.50, 129.61, 127.26, 125.07, 122.88, 121.64, 118.15, 112.74, 110.08, 106.09, 27.02, 22.62; HR-MS-ESI (*m/z*) calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>FO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 299.108 3; found, 299.108 4。

#### 1.12 7-氟-2-(3-羟基-4-异丙基苯基)-4H-色烯-4-酮 (5d)

采用 5a 类似合成方法。得到类白色固体 157.0 mg, 产率为 24%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 9.87~9.78 (m, 1H), 8.11 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.66

(dd, *J* = 7.2 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.49 (dd, *J* = 8.0 Hz, 2.0 Hz, 1H), 7.42~7.36 (m, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 3.28~3.23 (m, 1H), 1.20 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 176.59, 166.74, 164.24, 163.91, 157.23, 155.33, 139.50, 129.54, 128.19, 127.26, 121.01, 118.10, 114.63, 112.72, 106.83, 105.80, 27.01, 22.64; HR-MS-ESI (*m/z*) calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>FO<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 299.108 3; found, 299.107 6。

#### 1.13 2-(2-氟-3,5-二羟基-4-异丙基苯基)-4H-色烯-4-酮 (5e)

采用 5a 类似合成方法。得到黄色固体 37.8 mg, 产率为 17%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 9.62 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 9.56 (s, 1H), 8.07 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.86~7.83 (m, 1H), 7.65 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.56~7.49 (m, 1H), 6.81 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 3.57~3.45 (m, 1H), 1.28 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 177.29, 159.71, 156.24, 152.33, 144.58, 144.43, 135.04, 127.54, 126.13, 125.36, 123.64, 118.73, 111.35, 111.24, 104.62, 24.99, 20.48; HR-MS-ESI (*m/z*) calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>FO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 315.103 3; found, 315.102 6。

#### 1.14 2-(2,3-二氟-5-羟基-4-异丙基苯基)-4H-色烯-4-酮 (5f)

采用 5a 类似合成方法。得到黄色固体 93.1 mg, 产率为 43%。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>H</sub>: 10.28 (s, 1H), 8.07 (dd, *J* = 8.0 Hz, 1.6 Hz, 1H), 7.88~7.84 (m, 1H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.58~7.50 (m, 1H), 7.19~7.14 (m, 1H), 6.72 (s, 1H), 3.48~3.39 (m, 1H), 1.31 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H); <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ<sub>C</sub>: 177.20, 158.25, 156.18, 152.10, 151.40, 148.99, 143.73, 141.28, 135.15, 127.27, 126.25, 125.37, 123.61, 118.77, 118.39, 111.95, 109.16, 25.10, 20.94; HR-MS-ESI (*m/z*) calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>, 317.098 9; found, 317.098 4。

#### 1.15 化合物稳定性检测色谱条件

用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂; 以水为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱; 洗脱梯度: 0 min, 60% A→20~30 min, 10% A→32~40 min, 60% A; 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 柱温为 35 °C; 检测波长为 220 nm; 进样体积 10 μL。

## 2 药理活性试验

### 2.1 体外 AhR 活性检测

以 FICZ 作为阳性对照药, 采用 QUANTI-Luc™ 检测试剂盒测定化合物的 AhR 活性。用含 10% 血清的 EMEM 培养基将细胞调整至 1.1×10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>, 接种于 96 孔

板, 每孔 180  $\mu\text{L}$ 。随后加入 20  $\mu\text{L}$  不同浓度的化合物, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内孵育 24 h。每孔中 DMSO 的终浓度为 0.1%。根据测得的相对发光单位 (relative light unit, RLU) 值, 以 0.1% DMSO 为溶剂对照组, 根据公式 (1) 计算化合物在不同浓度下的激活率变化, 进而获得化合物的  $\text{EC}_{50}$  值, 用于评价化合物在体外的 AhR 活性。

$$\text{激活率}(\%) = \frac{(\text{RLU}_{\text{化合物}} - \text{RLU}_{\text{溶剂}})}{(\text{RLU}_{\text{阳性}} - \text{RLU}_{\text{溶剂}})} \times 100\% \quad (1)$$

## 2.2 体外 T 细胞活性评价

**2.2.1 T 细胞增殖功能测定** 采用 PHA-L 作为诱导 PBMC 增殖的刺激剂。用含 10% 血清的 RPMI 1640 培养基将细胞调整至  $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ , 接种于 96 孔板, 每孔 100  $\mu\text{L}$ 。随后加入不同浓度的化合物, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内孵育 30 min 后, 每孔加入最终质量浓度为 10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  PHA-L, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内孵育 48 h 后, 收集上清液用于检测细胞因子, 其余部分用 CellTiter-Glo<sup>®</sup> 发光法细胞活力检测试剂盒检测细胞活力。根据测出的 RLU 值, 以未加 PHA-L 的体系作为空白对照, 即可计算出测试样品对 PBMC 增殖的抑制作用的  $\text{IC}_{50}$  值。

**2.2.2 IFN- $\gamma$  水平检测** 用 ELISA 法检测 IFN- $\gamma$  的含量, 按试剂盒内所附说明书进行实验操作。实验组选取 1.5、7.5 和 94  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  3 个浓度点进行检测, 以 PHA-L 组作为阳性对照, 即可计算出 IFN- $\gamma$  的抑制百分比, 用于评价化合物对 IFN- $\gamma$  的抑制活性。

**作者贡献:** 贾剑敏完成化合物设计、实验设计、数据分析及论文撰写; 蔡亚仙完成化合物设计、实验指导和论文审核; 韩自省、蔡开明完成化合物合成、表征及数据复核; 徐佳佳完成药理活性测试和数据整理; 胡晓慧完成化合物稳定性测试和数据整理。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Bersten DC, Sullivan AE, Peet DJ, et al. bHLH-PAS proteins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13: 827-841.
- [2] Denison MS, Nagy SR. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43: 309-334.
- [3] Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1982, 22: 517-554.
- [4] Cannon AS, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Targeting AhR as a novel therapeutic modality against inflammatory diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23: 288.
- [5] Mulero-Navarro S, Fernandez-Salguero PM. New trends in aryl hydrocarbon receptor biology [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2016, 4: 45.
- [6] Frericks M, Meissner M, Esser C. Microarray analysis of the AHR system: tissue-specific flexibility in signal and target genes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 220: 320-332.
- [7] Hord NG, Perdeu GH. Physicochemical and immunocytochemical analysis of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator: characterization of two monoclonal antibodies to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator [J]. *Mol Pharmacol*, 1994, 46: 618-626.
- [8] Busbee PB, Rouse M, Nagarkatti M, et al. Use of natural AhR ligands as potential therapeutic modalities against inflammatory disorders [J]. *Nutr Rev*, 2013, 71: 353-369.
- [9] Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1619: 263-268.
- [10] Corre S, Tardif N, Mouchet N, et al. Sustained activation of the aryl hydrocarbon receptor transcription factor promotes resistance to BRAF-inhibitors in melanoma [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 4775.
- [11] Esser C, Rannug A, Stockinger B. The aryl hydrocarbon receptor in immunity [J]. *Trends Immunol*, 2009, 30: 447-454.
- [12] Ho PP, Steinman L. The aryl hydrocarbon receptor: a regulator of Th17 and Treg cell development in disease [J]. *Cell Res*, 2008, 18: 605-608.
- [13] Gutiérrez-Vázquez C, Quintana FJ. Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Immunity*, 2018, 48: 19-33.
- [14] Segner H, Bailey C, Tafalla C, et al. Immunotoxicity of xenobiotics in fish: a role for the aryl hydrocarbon receptor (AhR)? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 9460.
- [15] Vogel CFA, Van Winkle LS, Esser C, et al. The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors- implications for pollution mediated stress and inflammatory responses [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101530.
- [16] Patrizi B, Siciliani de Cumis M. TCDD toxicity mediated by epigenetic mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 4101.
- [17] Um JY, Kim HB, Kang SY, et al. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin regulates the expression of aryl hydrocarbon receptor-related factors and cytokines in peripheral blood mononuclear cells and CD4+ T cells from patients with atopic dermatitis and psoriasis [J]. *Ann Dermatol*, 2020, 32: 360-369.
- [18] Abdulla OA, Neamah W, Sultan M, et al. The ability of AhR ligands to attenuate delayed type hypersensitivity reaction is associated with alterations in the gut microbiota [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 684727.
- [19] Naganuma M, Sugimoto S, Mitsuyama K, et al. Efficacy of indigo naturalis in a multicenter randomized controlled trial of patients with ulcerative colitis [J]. *Gastroenterology*, 2018, 154: 935-947.

- [20] D'Haens G, Sandborn WJ, Colombel JF, et al. A phase II study of laquinimod in Crohn's disease [J]. *Gut*, 2015, 64: 1227-1235.
- [21] Bissonnette R, Stein Gold L, Rubenstein DS, et al. Tapinarof in the treatment of psoriasis: a review of the unique mechanism of action of a novel therapeutic aryl hydrocarbon receptor-modulating agent [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2021, 84: 1059-1067.
- [22] Paul VJ, Frautschy S, Fenical W, et al. Antibiotics in microbial ecology: isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp [J]. *J Chem Ecol*, 1981, 7: 589-597.
- [23] Richardson WH, Schmidt TM, Neelson KH. Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *xenorhabdus luminescens* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 1602-1605.
- [24] Hu SJ, Jiang RL, Wen XX. Benvimod impurity compound as well as preparation method, detection method and application thereof: CN, 113004127 A [P]. 2021-06-22.
- [25] Gruszczyk J, Grandvuillemin L, Lai-Kee-Him J, et al. Cryo-EM structure of the agonist-bound Hsp90-XAP2-AHR cytosolic complex [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 7010.