

· 综述 ·

## 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 抑制剂的研究进展

程雨兰, 门金霞, 周金培\*, 张惠斌

(中国药科大学药物化学教研室, 南京 210009)

**摘要** 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 是介导色氨酸沿犬尿氨酸途径分解代谢的限速酶。IDO1 在肿瘤细胞和抗原呈递细胞 (antigen presenting cells, APC) 中存在过度表达现象, 通过色氨酸的消耗及其代谢产物的聚积抑制局部免疫应答, 使肿瘤细胞逃避免疫系统的监测, 这与多数肿瘤治疗的不良预后有关。因此, IDO1 是肿瘤免疫疗法的重要靶点。目前有多种骨架的 IDO1 抑制剂正在研究当中, 其中 3 个已经进入了临床研究阶段。本文介绍了 IDO1 在肿瘤免疫耐受中的作用, 并按结构分类, 综述了 IDO1 抑制剂的研究进展。

**关键词** 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1; 抑制剂; 肿瘤; 免疫疗法

**中图分类号** R914.2; R967 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)03-0361-10

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170318

**引用本文** 程雨兰, 门金霞, 周金培, 等. 吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 抑制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(3):361-370.

**Cite this article as:** CHENG Yulan, MEN Jinxia, ZHOU Jinpei, et al. Advances in indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibitors[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(3):361-370.

## Advances in indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibitors

CHENG Yulan, MEN Jinxia, ZHOU Jinpei\*, ZHANG Huibin

Department of Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

**Abstract** Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) is the rate-limiting enzyme which catalyses the metabolism of L-tryptophan (L-Trp) in the kynurenine pathway. It is overexpressed in many tumor cells and antigen presenting cells. This enzyme inhibits local immune response and supports tumor cells to evade immune surveillance by depleting L-Trp and producing kynurenine metabolites, thus, it is an important target for cancer immunotherapy. There are several IDO1 inhibitors with different scaffold under investigation, three of which have already entered clinical stage. The role of IDO1 in tumor immune tolerance and the research progress on IDO1 inhibitors in recent years are summarized in this paper.

**Key words** indoleamine 2,3-dioxygenase 1; inhibitors; tumor; immunotherapy

近年来, 因免疫检查点抑制剂<sup>[1]</sup>, 嵌合抗原受体 T 细胞疗法 (CAR-T)<sup>[2]</sup> 以及肿瘤浸润淋巴细胞的过继性细胞疗法<sup>[3]</sup> 在多种肿瘤中的显著疗效, 使肿瘤免疫疗法成为新兴抗肿瘤疗法。目前在临床开发和市场上可用的肿瘤免疫疗法主要是抗体等大分子生物制剂<sup>[4]</sup>。而小分子免疫调节剂因其相对简单的给药方式和较低的研发成本, 也逐渐发展成为肿瘤免疫疗法中一个重要的研究领域。犬尿氨酸通路在免疫调节中具有重要作用<sup>[5]</sup>, 吲哚

胺 2,3-双加氧酶 1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1, IDO1) 作为 L-色氨酸 (L-tryptophan, L-Trp) 沿犬尿氨酸途径氧化裂解的关键酶, 被认为是肿瘤免疫疗法的潜在小分子靶点。大量研究表明, IDO1 的异常表达与肿瘤细胞逃避免疫系统有关, 因此抑制 IDO1 有望成为一种新型肿瘤治疗策略。目前, indoximod、epacadostat 和 NLG919 是处于临床研究阶段的 IDO1 抑制剂, 此外还有多个抑制剂处于生物活性测试阶段。本文介绍了 IDO1 在肿瘤免疫

耐受中的作用,并按结构分类,对 IDO1 抑制剂的研究进展进行综述。

## 1 IDO1 是肿瘤免疫耐受中的重要调节酶

### 1.1 IDO1 的结构和功能

在人体中,L-Trp 是维持多种细胞功能的必需氨基酸。L-Trp 一旦被摄取,可通过 4 种机制代谢:脱羧为色胺,蛋白质合成,5-羟色胺途径和犬尿氨酸途径<sup>[6]</sup>。其中,犬尿氨酸途径负责代谢哺乳动物饮食摄取的 95% Trp<sup>[7]</sup>。而 IDO1 是由位于人类第 8 号染色体上 IDO1 基因编码的含 403 个氨基酸的单体蛋白,其作用于 L-Trp 沿犬尿氨酸途径代谢的第一步,也是限速步骤。含亚铁血红素的 IDO1 与氧分子共同作用,催化 L-Trp (1) 吲哚环的 2,3-

双键氧化裂解,产生 *N'*-甲酰-L-犬尿氨酸(2),随后通过甲酰胺酶(formamidase)去甲酰化产生重要代谢物 L-犬尿氨酸(kynurenine, KYN, 3),KYN 通过 3 种不同的酶进一步转化为其他代谢物。其中,犬尿氨酸氨基转移酶(kynurenine aminotransferase, KAT)可使 KYN 转化为犬尿烯酸(kynurenic acid, KYNA, 4),犬尿氨酸 3-单加氧酶(kynurenine 3-monooxygenase, KMO)可将 KYN 氧化为 3-羟基-L-犬尿氨酸(5),进而产生黄尿烯酸(6),而犬尿氨酸酶(kynureninase)可将 KYN 氧化裂解为邻氨基苯甲酸(7),随即转化为 2-氨基黏康酸(9)、2-吡啶甲酸(10)、喹啉酸(QA, 11)和最终的 NAD<sup>+</sup> 等一系列 L-Trp 代谢产物(图 1)<sup>[8]</sup>。

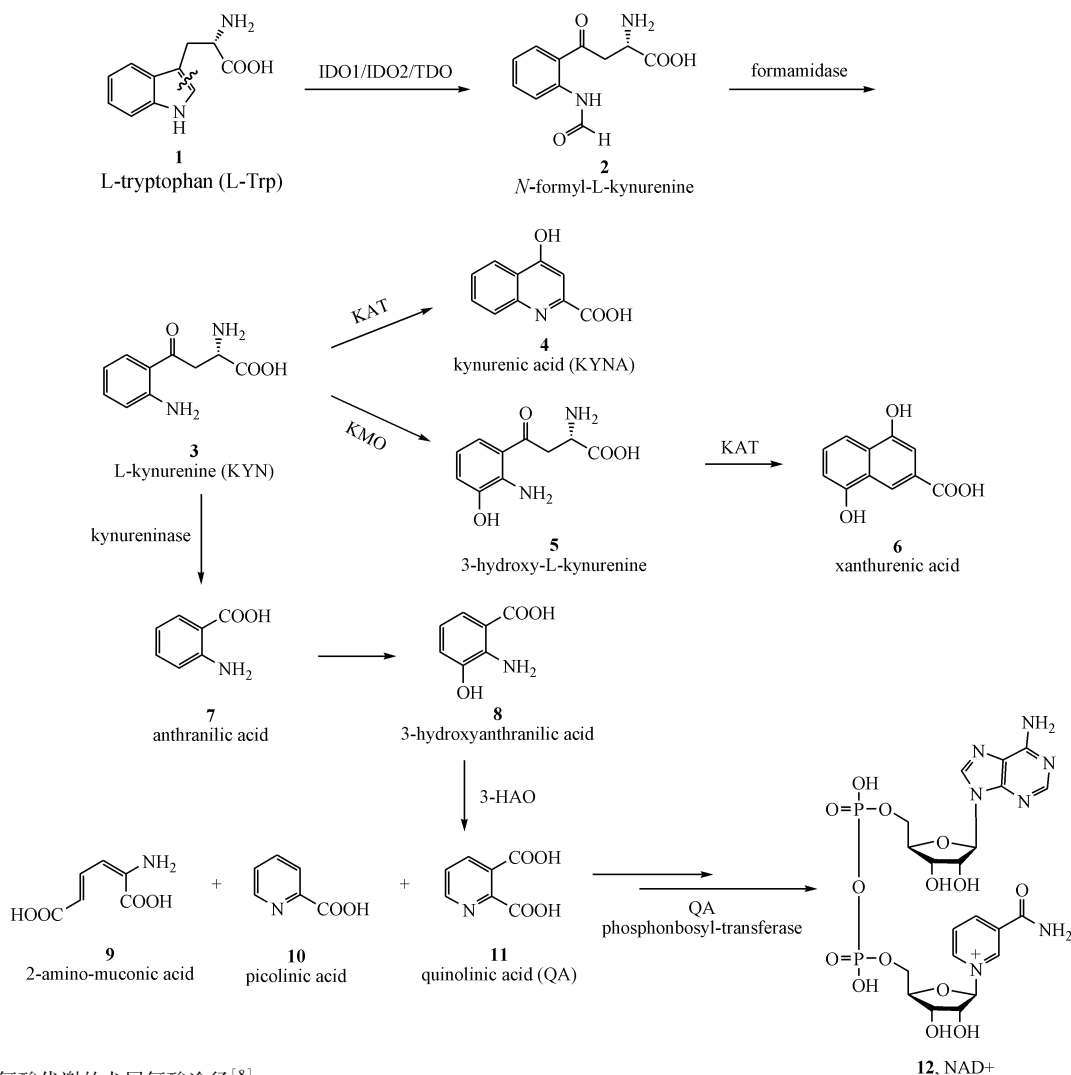


图 1 色氨酸代谢的犬尿氨酸途径<sup>[8]</sup>

1.2 IDO1 和肿瘤免疫耐受的关系

研究表明,L-Trp 代谢的犬尿氨酸途径在免疫调节过程中具有重要作用<sup>[9]</sup>。IDO1 作为犬尿氨酸途径的限速酶,在多种肿瘤组织中存在过度表达现象,这是肿瘤细胞逃避免疫系统监测的重要方式<sup>[10]</sup>,IDO1 的高表达也与多数肿瘤的不良预后有关<sup>[11]</sup>。体内外研究表明,IDO1 抑制剂能够提高放疗、化疗及其他肿瘤免疫疗法的治疗效果<sup>[12]</sup>。近年来,功能相关的色氨酸 2,3-双加氧酶(TDO)也具有类似的免疫抑制作用,但主要异常表达于肝癌中<sup>[13]</sup>。而 IDO1 的同源物吡啶胺 2,3-双加氧酶 2 (IDO2)<sup>[14]</sup>催化 L-Trp 代谢的活性极低,在病理状态下也基本不存在异常表达现象,目前其是否与肿瘤免疫耐受相关仍存在争议<sup>[15]</sup>。因此,在这 3 种酶中,IDO1 是最具潜力的治疗靶点,研究者们直接把 IDO 视为 IDO1。

在炎症反应中,多种炎症细胞因子尤其是 IFN $\gamma$  能够诱导 IDO1 的表达,加速 L-Trp 的代谢<sup>[5]</sup>,IDO1 作为免疫应答的一部分,通过消耗病原体生长所必需的色氨酸,保护宿主免于病原体的感染。而在肿瘤组织中,肿瘤细胞也能利用 IDO1 的这一功能,抑制机体的免疫应答反应。

DO1 主要通过 GCN2、m-TOR 和 AhR 这 3 种机制介导体内免疫抑制功能(图 2)。首先,IDO1 降解 L-Trp,使局部组织微环境中 L-Trp 耗尽,导致转运 L-Trp 的 tRNA 处于游离状态,压力应答激酶(general control nonderepressible 2,GCN2)因其含有一个感应游离 tRNA 的变构调节位点而得到激活,活化的 GCN2 激酶使下游的真核细胞转录起始

因子-2 $\alpha$  (Eukaryotic translation initiation factor-2 $\alpha$ , eIF-2 $\alpha$ ) 磷酸化,导致 eIF-2 $\alpha$  促转录功能弱化,从而抑制 T 细胞中多种 RNA 的转录和蛋白质的翻译过程<sup>[16]</sup>;其次,L-Trp 的缺乏能够抑制氨基酸感应激酶 1(master amino acid-sensing kinase 1, GLK1),进而抑制 m-TOR 信号分子,触发 T 细胞免疫无能和自噬<sup>[17]</sup>,因此,这两种机制是通过激活氨基酸不足信号(GCN2/eIF-2 $\alpha$ )和抑制氨基酸充足信号(GLK1/m-TOR)介导的;第 3 种机制是由 L-Trp 代谢产物犬尿氨酸(KYN)介导的,IDO1 通过代谢 L-Trp 产生的 KYN 是芳香烃受体(AhR)的内源性配体,KYN 与 AhR 结合导致未成熟的 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化为抑制性 T 细胞(Treg),此外,KYN 与 AhR 结合也能诱导 IDO1 的表达,进一步抑制 T 细胞的免疫应答<sup>[18]</sup>。

IDO1 在大部分组织中的表达是沉默的,只有胎盘中存在高表达,这有利于母体对胎儿的免疫耐受作用。而在多种肿瘤细胞和 APC 中存在 IDO1 组成性或诱导性地异常表达现象<sup>[20]</sup>。IDO1 在肿瘤细胞中表达异常与肿瘤抑制基因 Bin1 有关。Bin1 蛋白与 c-myc 蛋白 N-末端相互作用,抑制肿瘤生成<sup>[21]</sup>。Bin1 也能够通过下调 IDO1 的表达,抑制肿瘤生成和肿瘤免疫耐受。临床上发现乳腺癌、前列腺癌和黑色素瘤等多种肿瘤中都存在 Bin1 缺失和 IDO1 过表达,这也与肿瘤患者的不良预后有关<sup>[22]</sup>。Bin1 基因敲除小鼠研究表明,Bin1 缺失会使基于 STAT1 和 NF- $\kappa$ B 通路的 IFN $\gamma$  增加,从而诱导 IDO1 过表达<sup>[23]</sup>。

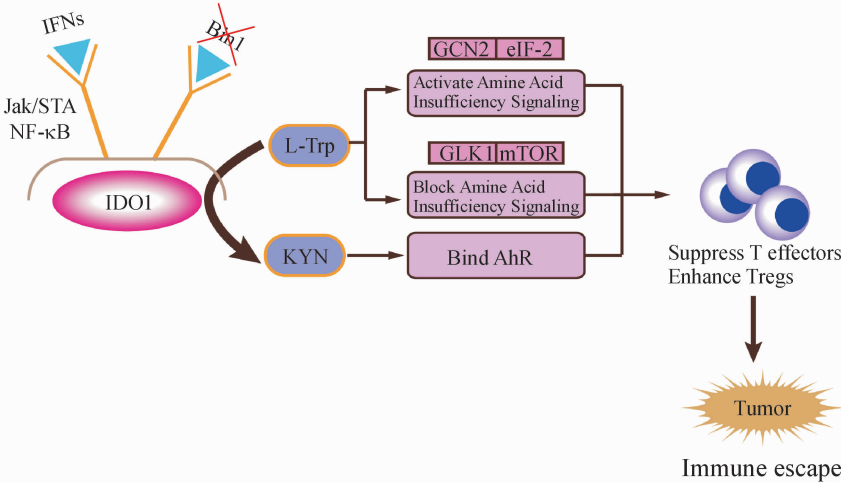


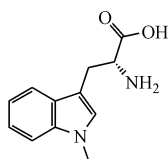
图 2 IDO1 信号的效应通路<sup>[19]</sup>

## 2 IDO1 抑制剂

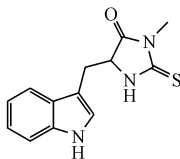
近年来, Bristol-Myers Squibb, Roche, Incyte, NewLink Genetics 等制药公司通过高通量筛选以及基于结构的药物设计, 已经发现了多种新型骨架的 IDO1 抑制剂。目前尚无 IDO1 抑制剂作为肿瘤免疫疗法药物上市, 但有 3 个 IDO1 抑制剂 (indoximod, epacadostat 和 NLG919) 已经进入了临床研究阶段<sup>[24]</sup>, 另外还有许多 IDO1 抑制剂处于生物活性测试阶段。现根据文献和专利报道的 IDO1 抑制剂进行综述。

### 2.1 色氨酸类似物

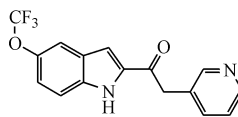
色氨酸类似物是最早发现的 IDO1 抑制剂, 这类化合物为 IDO1 的竞争性抑制剂, 化合物 **13** (indoximod, D-1MT) 是 NewLink Genetics 公司研发的最具代表性的色氨酸类似物, 目前刚进入 II 期临床试验阶段, 用于前列腺癌、乳腺癌、脑癌、黑色素瘤、胰腺癌等多种肿瘤的治疗, I 期临床试验结果



**13** (Indoximod)  
 $K_i = 19\text{--}53 \mu\text{mol/L}$



**14**  
 $K_i = 12 \mu\text{mol/L}$



**15**  
 $K_i = 13 \mu\text{mol/L}$

### 2.2 苯基咪唑及其衍生物

化合物 **16** (PIM) 是一种已知的血红素黏合剂, 也是较早发现的活性较弱的 IDO1 抑制剂 ( $\text{IC}_{50} = 48 \mu\text{mol/L}$ )。2006 年 IDO1/PIM 复合物晶体结构 (PDB: 2D0T) 的获得使其受到广泛关注, 这是 IDO1 抑制剂在基于结构药物设计 (SBDD) 领域的开端<sup>[26]</sup>。由 IDO1/PIM 复合物晶体结构可知, IDO1 由亚铁血红素结构和两个疏水口袋 (Pocket A 和 Pocket B) 组成。PIM 咪唑末梢的氮原子与 IDO1 的血红素亚铁直接作用, 苯基伸入 Pocket A, 并与其中的 Phe163 形成  $\pi\text{--}\pi$  堆积作用, 化合物与 Pocket B 并没有任何相互作用 (图 3)。

目前, 已经公布的 IDO1/IDO1 抑制剂复合物晶体结构有 4 个 (PDB code: 2D0T, 2D0U, 4PK5, 4PK6)<sup>[27]</sup>, 由这些复合物晶体结构可知, IDO1 抑制剂侧链和骨架灵活性的不同可使 IDO1 形成不同构象的活性位点, 通常表现为较大的 Pocket A 和不同形状和大小的 Pocket B。这种结合模式的

显示: 在 48 例实体瘤患者中, 剂量为每日 2 次, 每次 2 000 mg 时, 并没有达到最大耐受剂量 (MTD); 3 例先前使用过检查点抑制剂治疗的患者在剂量为每日 1 次, 每次 200 mg 的情况下出现了下垂体炎; 5 例患者疾病维持稳定时期大于 6 个月; indoximod 血浆药峰浓度 ( $c_{\text{max}}$ ) 约为  $12 \mu\text{mol/L}$  (在每日 2 次, 每次 2 000 mg 时), 出现于给药后 2.9 h, 半衰期为 10.5 h; 在多个剂量水平中, C 反应蛋白 (CRP) 水平均有所升高。这些结果表明: indoximod 口服生物利用度较高, 患者耐受性较好, 同时疗效也较好, 5 例患者疾病稳定期大于 6 个月, indoximod 也能诱导下垂体炎, 增加肿瘤抗原自身抗体和 CRP 水平<sup>[25]</sup>。这类化合物还有后续结构优化得到的化合物 **14** 和化合物 **15**, 但活性也只有微摩尔级, 这可能是因为色氨酸本身对 IDO1 的亲合力就不高 ( $K_d = 290 \sim 320 \mu\text{mol/L}$ )<sup>[26]</sup>。为研发活性更高的化合物, 需要将结合于 IDO1 血红素亚铁的氧分子考虑在内, 使化合物模拟酶促反应过渡态。

灵活性给 IDO1 抑制剂对接研究带来了不便, 因为化合物对接的过程所选取的 IDO1 构象是不变的, 并不存在这种灵活性, 这将导致对接的可信度不高, 不能作为化合物设计的理论依据。另外, 活性位点的血红素亚铁可以与抑制剂形成共价键, 抑制剂与血红素亚铁作用部分的电子性质对其活性影响较大, 这种影响难以通过计算方法描述, 这也是对接中存在的另一个问题。

由取代 PIM 的构效关系 (SAR) 研究可知, 发现 PIM 苯环上 2-羟基取代的化合物 **17** 活性最佳 ( $\text{IC}_{50} = 4.8 \mu\text{mol/L}$ )。之后对化合物 **17** 进一步优化, 通过延长伸入 Pocket B 的侧链, NewLink Genetics 公司于 2011 年公开了一系列含醚键侧链的专利化合物如化合物 **18**, IDO1 酶活性得到了进一步提高 ( $\text{IC}_{50} < 1 \mu\text{mol/L}$ )<sup>[28]</sup>。2012 年, NewLink Genetics 公司又在此基础上公开了一篇含三环骨架结构的专利化合物如化合物 **19**<sup>[29]</sup>, 最新的 SAR 数据显示, 化合物 **19** 上的羟基是维持 IDO1 活性

和选择性的关键基团。NewLink Genetics 公司和 Genentech 公司合作研发的临床候选化合物 NLG919 是活性较好的 IDO1 抑制剂( $K_i = 7 \text{ nmol/L}$ ),其结构未公开,可能与化合物 **19** 是类似物<sup>[30]</sup>。目前 NLG919 处于临床 I 期研究阶段,用于复发性和进行性实体瘤的治疗。已完成的部分 I 期临床试验结果显示,NLG919 能够快速被患者吸收,患者耐受性较好,当给药剂量为每日 2 次、每次 800 mg 时使血浆犬尿氨酸含量降低 30%,同时未观察到其对血浆色氨酸水平的显著调节作用;36 例患者中,不良事件(AEs)包括疲劳(26%)、咳嗽(16%)、食欲降低(21%)、恶心(16%)、瘙痒(37%),呕吐(10.5%)和呼吸困难(5%)等症状<sup>[31]</sup>。

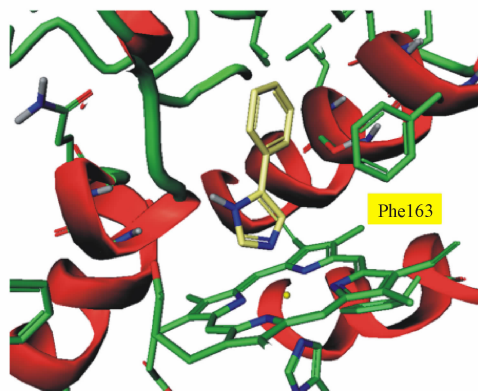
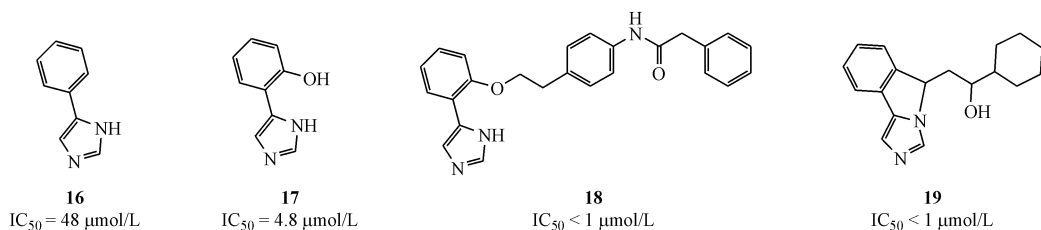
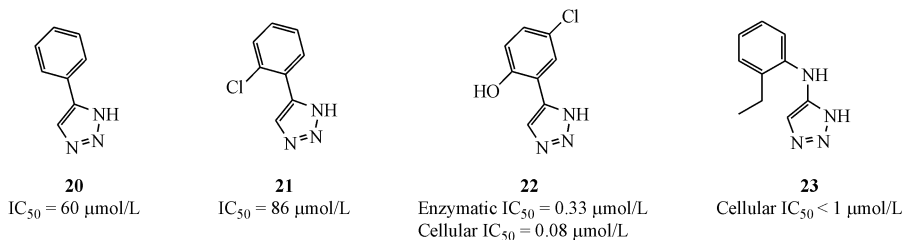


图 3 IDO1/PIM 复合物晶体结构<sup>[8]</sup>



2010 年,研究人员在 PIM 的结构基础上,通过药效团模型的构建,发现了 4-芳基-1,2,3-三唑类 IDO1 抑制剂化合物 **20** ( $\text{IC}_{50} = 60 \text{ } \mu\text{mol/L}$ )<sup>[32]</sup>。后续的研究报道了活性相似的化合物 **21** ( $\text{IC}_{50} = 86 \text{ } \mu\text{mol/L}$ )<sup>[33]</sup>。但另一个研究组织通过构效关系

研究得到了细胞毒性低,选择性高的化合物 **22** (MMG-0358),其酶活性( $\text{IC}_{50} = 0.33 \text{ } \mu\text{mol/L}$ )和细胞活性( $\text{IC}_{50} = 0.08 \text{ } \mu\text{mol/L}$ )均达到了纳摩尔级<sup>[34]</sup>。另外,Vertex 公司的 *N*-苯基-1,2,3-三唑-4-胺类化合物 **23** 的活性也达到了纳摩尔级<sup>[35]</sup>。



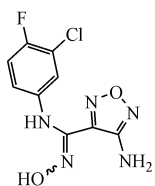
### 2.3 *N*-羟基脒类

Incyte 公司通过高通量筛选(HTS)得到一系列 *N*-羟基脒类 IDO1 抑制剂。4-氟取代的化合物 **24** 在这类先导物中活性最高(IDO1  $\text{IC}_{50} = 67 \text{ nmol/L}$ , HeLa  $\text{IC}_{50} = 19 \text{ nmol/L}$ ),能够抑制体内犬尿氨酸生成和小鼠黑色素瘤生长<sup>[36]</sup>。化合物 **24** 与 IDO1 的对接结果显示,羟基脒上的氧原子与血红素亚铁作用,并与苯胺氮原子形成氢键,苯环部分伸入 Pocket A,噁二唑环上的氨基与亚铁血红素环上的丙酸基形成氢键,而噁二唑环伸向溶剂区,并没有与 IDO1

紧密接触<sup>[36]</sup>。之后化合物 **24** 被广泛地作为 IDO1 抑制剂的阳性对照物进行研究,也经常会被错误地当作 Incyte 公司的临床候选化合物 epacadostat(enzymatic  $\text{IC}_{50} = 72 \text{ nmol/L}$ , cellular  $\text{IC}_{50} = 7.1 \text{ nmol/L}$ )出售,而 epacadostat 的正确结构为化合物 **25**。Epacadostat 与 IDO1 的结合模式与化合物 **24** 相似,不同的是其噁二唑环上延伸出的侧链与 Pocket B 形成疏水作用<sup>[37]</sup>。Epacadostat 主要用于卵巢癌、黑色素瘤和骨髓增生异常综合征的治疗,另外 epacadostat 与 pembrolizumab 联用于转移性

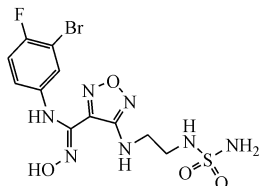


黑素瘤的治疗项目于 2016 年 6 月 22 日已经进入 III 期临床研究阶段。Epicadostat 与 pembrolizumab 联用的 I / II 期临床试验结果显示, IDO1 抑制剂 epicadostat 能够增强 PD-1 单抗 pembrolizumab 的抗肿瘤效果, 60 例进行性或转移性肿瘤患者中, 总反应率 (ORR) 为 53%, 疾病控制率为 74%; 其中有 19 名黑素瘤患者表现出较好的疗效, 这些患者先前均没有接受过全身系统性治疗; 在接受每日 2 次、每次 300 mg 剂量的 6 名患者中出现了剂量限制性毒性 (DLT); 最常见的不良事件是皮疹、关节痛, 同时增加天冬氨酸氨基转移酶的水平, 但这些都是可控的, 没有出现 3 或 4 级治疗相关的不良事件, 仅有 5% 的患者停止治疗<sup>[38]</sup>。



24

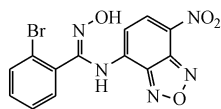
Enzymatic  $IC_{50}$  = 67 nmol/L  
Cellular  $IC_{50}$  = 19 nmol/L



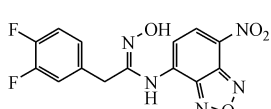
25 (Epicadostat)

Enzymatic  $IC_{50}$  = 72 nmol/L  
Cellular  $IC_{50}$  = 7.1 nmol/L

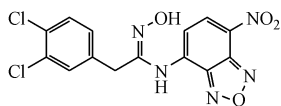
此外, Paul 等<sup>[39]</sup>报道了一系列含硝基苯并噁二唑环结构的 *N*-羟基脒类 IDO1 抑制剂, 其中经优化后的化合物 26、27 和 28 的 IDO1 酶活性范围为 ( $IC_{50}$  = 39 ~ 80 nmol/L), 在人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中的细胞活性也达到了纳摩尔级 ( $IC_{50}$  = 50 ~ 71 nmol/L), 并且细胞毒性很低, 相对于 TDO 的选择性也较高 (312 ~ 1 593 倍)。



26



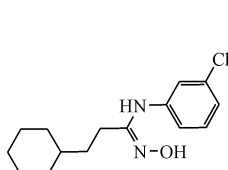
27



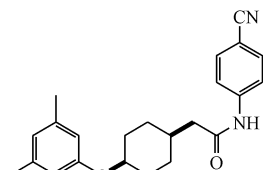
28

2015 年, Bristol-Myers Squibb 公司收购了美国私人生物技术公司 Flexus Biosciences, 获得了 Flexus 公司临床前小分子 IDO1 抑制剂 F001287 的全部权利。虽然 F001287 的结构尚未公开, 但近期 Flexus 公开了 4 篇关于 IDO 抑制剂的专利<sup>[40-43]</sup>, 抑制剂结构类型是 *N*-羟基脒或酰胺类, 如化合物

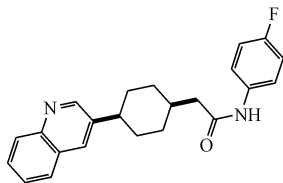
29、30、31 和 32。这些专利中, 多个化合物的  $IC_{50}$  < 50 nmol/L。推测 F001287 可能是这 4 篇专利里涉及的化合物, 结构为 *N*-羟基脒类或酰胺类。



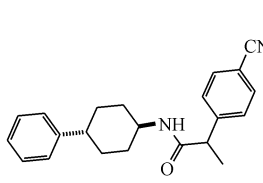
29



30



31



32

#### 2.4 噻唑并三唑和咪唑并噻唑类

Amgen 公司通过高通量筛选得到了一类噻唑并三唑骨架的 IDO1 抑制剂<sup>[27]</sup>。化合物 33 (Amg-1) 是这类结构中活性最好的抑制剂 ( $IC_{50}$  = 3  $\mu$ mol/L), 并且相对于 IDO2 和 TDO, 选择性较好 (IDO2  $IC_{50}$  > 250  $\mu$ mol/L 和 TDO  $IC_{50}$  > 62.5  $\mu$ mol/L)。

Tojo 等<sup>[27]</sup>对 Amg-1 进行了基于结构的药物设计。他们通过 IDO1 定向诱变研究发现, Pocket B 的 Phe226 和 Arg231 是 IDO1 催化活性所必需的氨基酸残基, 且与底物识别有关。为了通过化合物与 Pocket B 形成作用力而提高化合物的抑制活性, 研究人员首先获得了 IDO1/Amg-1 复合物晶体结构 (PDB: 4PK5)。通过分析发现, Amg-1 的噻唑并三唑环上的氮原子直接与血红素亚铁作用, 甲基基与 Pocket A 形成疏水作用, 氨基侧链伸入 Pocket B, 其中亚甲基二氧苯基部分与 Phe226 和 Arg231 相邻。由于 Amg-1 的结构明显大于 PIM, 所以 IDO1/Amg-1 晶体结构的 Pocket B 有所扩大, 存在一种诱导契合现象 (图 4)。

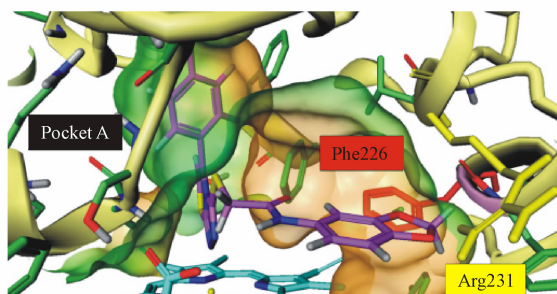
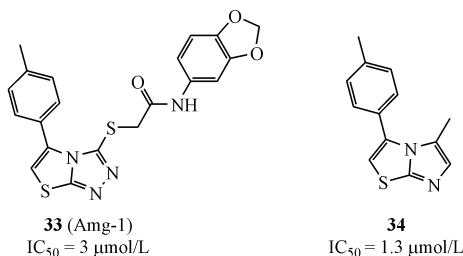


图 4 IDO1/Amg-1 复合物晶体结构<sup>[8]</sup>

由于配体的碱性对形成金属复合物非常重要, 所以通过提高 Amg-1 的氮原子碱性有可能会使活性得到提高, 也就是说, 氮原子碱性越强, 可能与 IDO1 血红素亚铁结合得更紧密, 从而使 IDO1 抑制活性更好。因此, 通过计算直接与血红素亚铁作用的氮原子的  $pK_a$  筛选出了咪唑并噻唑骨架的化合物 **34** ( $IC_{50} = 1.3 \mu\text{mol/L}$ )。化合物 **34** 和 PIM 直接与 IDO1 血红素亚铁结合的氮原子  $pK_a$  相当, 分别为 7.04 和 6.56, 而 Amg-1 的  $pK_a = 1.09$ , 这也印证了 Amg-1 的活性不如化合物 **34**。



接下来对这一骨架的修饰主要在咪唑并噻唑甲基部分引入连接臂和芳环, 得到化合物 **35** ( $IC_{50} = 1.9 \mu\text{mol/L}$ ) 等化合物。IDO1/**35** 复合物晶体结构(图 5)显示, 化合物 **35** 的亚甲基部分严重弯曲, Pocket B 的 Phe226 发生了迁移而产生诱导契合, 使得化合物 **35** 只能与 Phe226 相邻, 而远离了 Arg231, 这对活性的影响是不利的。于是在此基础上引入一个刚性的脒基得到化合物 **36**, 使其脒基侧链与 Pocket B 的 Phe226 和 Arg231 均能相互作用, 这与化合物 **36** 的活性结果 ( $IC_{50} = 77 \text{ nmol/L}$ ) 一致, 是该类结构中活性最好的化合物。

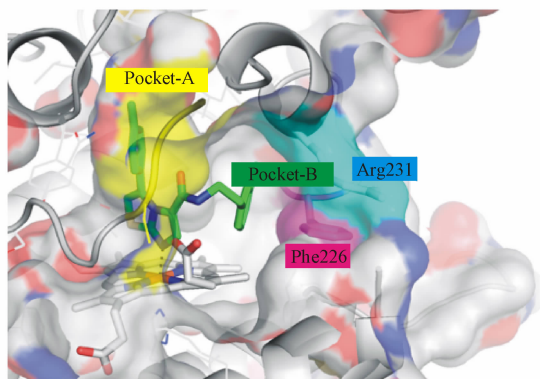
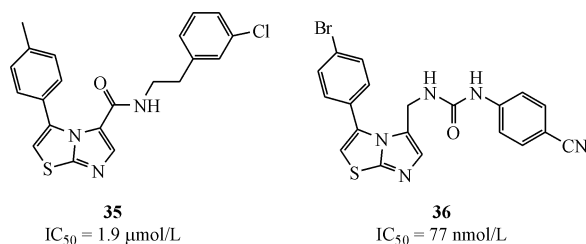


图5 IDO1/**35** 复合物晶体结构<sup>[27]</sup>



## 2.5 苯基苯磺酰肼类

Cheng 等<sup>[44]</sup>通过 HTS 得到了 IDO 抑制活性较好的苯基苯磺酰肼化合物 **37** ( $hIDO IC_{50} = 77 \text{ nmol/L}$ )。虽然化合物 **37** 的 IDO 酶活性较好, 但却几乎没有细胞活性 ( $HeLa EC_{50} > 10 \mu\text{mol/L}$ ), 这表明化合物 **37** 的细胞渗透性差。经结构改造得到细胞活性提高的化合物 **38** ( $hIDO IC_{50} = 130 \text{ nmol/L}$ ,  $HeLa EC_{50} = 85 \text{ nmol/L}$ ), 但 IDO 酶活性有所降低。通过继续优化又得到了 IDO 酶活性提高的化合物 **39** ( $hIDO IC_{50} = 61 \text{ nmol/L}$ ,  $HeLa EC_{50} = 172 \text{ nmol/L}$ ), 而细胞活性稍有减弱。随后研究人员将化合物 **39** 与 IDO1 (PDB code 2D0T) 进行了分子对接, 发现化合物 **39** 磺基的其中一个氧原子与血红素亚铁结合, 另一个氧原子与 Ala264 的氨基形成氢键。化合物 **39** 形成一个 V 型结构, 同时占据 Pocket A 和 Pocket B 并形成疏水作用, 其中苯甲酸部分与 Pocket A 的 Cys129 的巯基形成氢键, 溴苯肼部分伸入 Pocket B。分子对接的结果对后续的结构优化具有较好的参考意义。2016 年, 该研究组的 Lin 等<sup>[45]</sup>又报道了苯基苯磺酰肼类化合物进一步优化的情况。由于化合物 **38** 和 **39** 的酶活性和细胞活性均较好, 研究人员便对这两个化合物的血浆稳定性和药物代谢动力学性质进行了评估, 发现化合物 **39** 的大鼠血浆稳定性差 (5 min 内降解 80%), 于是终止了对其后续的研究。通过药物代谢动力学和药效学研究, 得到了对化合物 **38** 进行优化后的化合物 **40**, 化合物 **40** 是活性、选择性和口服生物利用度等性质均较优的 IDO1 抑制剂 ( $hIDO IC_{50} = 36 \text{ nmol/L}$ ,  $HeLa EC_{50} = 68 \text{ nmol/L}$ ,  $F = 59\%$ )。

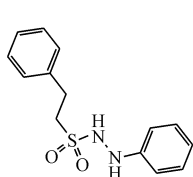
## 2.6 其他类

除上述 IDO1 抑制剂外, 多家制药公司也报道了其他结构类型的专利化合物。

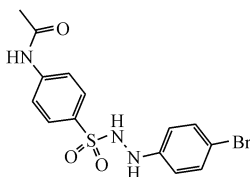
2014 年, Curadev 公司公开了氨基脒类 IDO 抑制剂如化合物 **41** ( $IC_{50} < 0.2 \mu\text{mol/L}$ )<sup>[46]</sup>。随后又报道了活性相当或更好的 2-氨基咪唑并吡啶类

IDO1 抑制剂如化合物 **42** ( $IC_{50} < 0.2 \mu\text{mol/L}$ )<sup>[47]</sup>, 这类化合物的 3 位和 7 位都有庞大的取代基, 很难预测其与 IDO1 活性位点的作用。2016 年, 该公司又

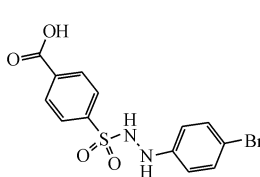
报道了亚胺腈类 IDO1 抑制剂如化合物 **43**, 化合物 **43** 能够使 LPS 诱导的 C57BL/6 小鼠血浆犬尿氨酸水平降低 87%<sup>[48]</sup>。



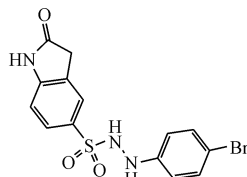
**37**  
hIDO  $IC_{50}$  = 77 nmol/L  
HeLa  $EC_{50}$  > 10  $\mu\text{mol/L}$



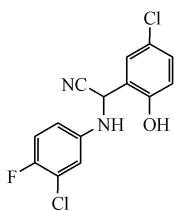
**38**  
hIDO  $IC_{50}$  = 130 nmol/L  
HeLa  $EC_{50}$  = 85 nmol/L



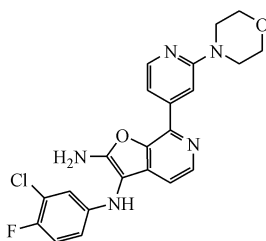
**39**  
hIDO  $IC_{50}$  = 61 nmol/L  
HeLa  $EC_{50}$  = 172 nmol/L



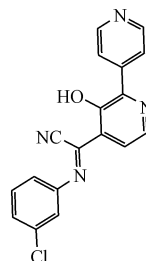
**40**  
hIDO  $IC_{50}$  = 36 nmol/L  
HeLa  $EC_{50}$  = 68 nmol/L



**41**



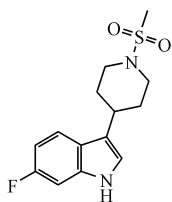
**42**



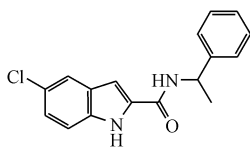
**43**

2015 ~ 2016 年, IOmet Pharma 公司公开了吡啶、异噁唑、苯并吡唑等骨架类型的 IDO 抑制剂如化合

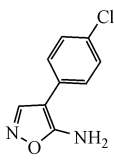
物 **44** ~ **48**<sup>[49-53]</sup>, 一些活性较好的化合物能达到  $pIC_{50} > 6.00$ , 这些化合物正处于生物活性测试阶段。



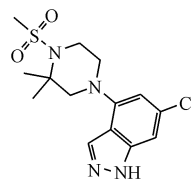
**44**



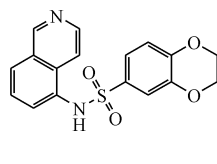
**45**



**46**



**47**



**48**

### 3 结 语

IDO1 因其在肿瘤免疫耐受方面的重要作用而成为肿瘤免疫疗法的重要研究靶点。研究学者竞相研发其小分子抑制剂, 近 5 年来, 通过高通量筛选和基于结构的药物设计等方法, 已经得到了几类不同骨架的新型 IDO1 抑制剂。然而, 其中也有很多结构骨架的 IDO1 抑制剂自首次报道后即没有继续研究, 可能是由于其体内外活性不一致所导致, 因此, 只有体外 IDO1 抑制活性并不一定是较好的 IDO1 抑制剂, 还必须具备体内 IDO1 抑制活性。此外, 由于 IDO1 是含有血红素亚铁的酶, 因此需考虑可能影响抑制剂与血红素亚铁之间特殊作用力的因素, 如抑制剂中与血红素亚铁结合的原子的碱性; 同时, 因为

IDO1 结构中 PocketB 的形态和大小存在诱导契合的灵活性, 因此, 分子对接过程中应该考虑这一因素的影响。尽管目前尚无 IDO1 抑制剂上市, 但随着 IDO1 抑制剂与 IDO1 之间结合模式、IDO1 导致肿瘤免疫抑制机制的不断阐明, 相信以 IDO1 为靶点的小分子药物终将成功上市, 为肿瘤患者带来福音。

### 参 考 文 献

- [1] Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM, *et al.* Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy [J]. *Cancer Cell*, 2015, **27**(4): 450-461.
- [2] Jena B, Moyes JS, Huls H, *et al.* Driving CAR-based T-cell therapy to success [J]. *Curr Hematol Malig Rep*, 2014, **9**(1): 50-56.
- [3] Rosenberg SA. Raising the bar: the curative potential of human cancer immunotherapy [J]. *Sci Transl Med*, 2012, **4**(127): 844.



- 844.
- [4] Spranger S, Koblisch HK, Horton B, *et al.* Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells directly within the tumor microenvironment[J]. *J Immunother Cancer*, 2014, **2**(1): 1–14.
- [5] Vécsei L, Szalárdy L, Fülöp F, *et al.* Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, **12**(1): 64–82.
- [6] Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, *et al.* L-Tryptophan: basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications[J]. *Int J Tryptophan Res*, 2009, **2**(2): 45–60.
- [7] Beadle GW, Mitchell HK, Nyc JF. Kynurenine as an intermediate in the formation of nicotinic acid from tryptophane by neurospora[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1947, **33**(6): 155–158.
- [8] Dounay AB, Tuttle JB, Verhoest PR. Challenges and opportunities in the discovery of new therapeutics targeting the kynurenine pathway[J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(22): 8762–8782.
- [9] Barth H, Raghuraman S. Persistent infectious diseases say -IDO. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in disease pathogenesis and implications for therapy[J]. *Crit Rev Microbiol*, 2014, **40**(4): 360–368.
- [10] Théate I, van Baren N, Pilotte L, *et al.* Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, **3**(2): 161–172.
- [11] Godin-Ethier J, Hanafi LA, Piccirillo CA, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, **17**(22): 6985–6991.
- [12] Li M, Bolduc AR, Hoda MN, *et al.* The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway controls complement-dependent enhancement of chemo-radiation therapy against murine glioblastoma[J]. *J Immunother Cancer*, 2014, **2**(1): 1–13.
- [13] Pilotte L, Larrieu P, Stroobant V, *et al.* Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, **109**(7): 2497–2502.
- [14] Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, *et al.* Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice[J]. *Gene*, 2007, **396**(1): 203–213.
- [15] van Baren N, Van den Eynde BJ. Tumoral immune resistance mediated by enzymes that degrade tryptophan[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, **3**(9): 978–985.
- [16] Munn DH, Sharma MD, Baban B, *et al.* GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. *Immunity*, 2005, **22**(5): 633–642.
- [17] Metz R, Rust S, Duhadaway JB, *et al.* IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR; a novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan[J]. *Oncoimmunology*, 2012, **1**(9): 1460–1468.
- [18] Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses[J]. *Trends Immunol*, 2013, **34**(3): 137–143.
- [19] Qian S, Zhang M, Chen Q, *et al.* IDO as a drug target for cancer immunotherapy: recent developments in IDO inhibitors discovery[J]. *RSC Adv*, 2016, **6**(9): 7575–7581.
- [20] van Baren N, Van den Eynde BJ. Tumoral immune resistance mediated by enzymes that degrade tryptophan[J]. *Cancer Immunol Res*, 2015, **3**(9): 978–985.
- [21] Sakamuro D, Elliott KJ, Wechslerreya R, *et al.* BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor[J]. *Nat Genet*, 1996, **14**(1): 69–77.
- [22] Jia Y, Wang H, Wang Y, *et al.* Low expression of Bin1, along with high expression of IDO in tumor tissue and draining lymph nodes, are predictors of poor prognosis for esophageal squamous cell cancer patients[J]. *Int J Cancer*, 2015, **137**(5): 1095–1106.
- [23] Muller AJ, Duhadaway JB, Donover PS, *et al.* Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy[J]. *Nat Med*, 2005, **11**(3): 312–319.
- [24] Rohrig UF, Majjigapu SR, Vogel P, *et al.* Challenges in the discovery of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2015, **58**(24): 9421–9437.
- [25] Soliman HH, Minton SE, Han HS, *et al.* A phase I study of indoximod in patients with advanced malignancies[J]. *Oncotarget*, 2016, **7**(16): 22928–22938.
- [26] Sugimoto H, Oda S, Otsuki T, *et al.* Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, **103**(8): 2611–2616.
- [27] Tojo S, Kohno T, Tanaka T, *et al.* Crystal structures and structure-activity relationships of imidazothiazole derivatives as IDO1 inhibitors[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, **5**(10): 1119–1123.
- [28] Mautino MR, Kumar S, Jaipuri FA, *et al.* Imidazole derivatives as IDO inhibitors; IN, 2011056652 A1 [P]. 2011-05-12 [2016-07-17].
- [29] Mautino MR, Kumar S, Waldo J, *et al.* Fused imidazole derivatives as IDO inhibitors; IN, 2012142237 A1 [P]. 2012-10-18 [2016-07-17].
- [30] Mautino MR, Jaipuri FA, Waldo J, *et al.* Abstract 491: NLG919, a novel indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)-pathway inhibitor drug candidate for cancer therapy[J]. *Cancer Res*, 2013, **73**(8): 491–491.
- [31] Nayak A, Hao Z, Sadek R, *et al.* Phase 1a study of the safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of GDC-0919 in patients with recurrent/advanced solid tumors[J]. *Eur J Cancer*, 2015, **51**(1): S69–S69.
- [32] Rährig UF, Awad L, Grosdidier A, *et al.* Rational design of

- indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2010, **53**(3):1172–1189.
- [33] Huang Q, Zheng M, Yang S, *et al.* Structure-activity relationship and enzyme kinetic studies on 4-aryl-1*H*-1, 2, 3-triazoles as indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) inhibitors[J]. *Eur J Med Chem*, 2011, **46**(11):5680–5687.
- [34] Röhrig UF, Majjigapu SR, Grosdidier A, *et al.* Rational design of 4-aryl-1,2,3-triazoles for indoleamine 2,3-dioxygenase 1 inhibition[J]. *J Med Chem*, 2012, **55**(11):5270–5290.
- [35] Boyall D, Davis C, Dodd J, *et al.* Compounds useful as inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase; *IN*, 2014081689 A1[P]. 2014-05-30[2016-07-17].
- [36] Yue EW, Douty B, Wayland B, *et al.* Discovery of potent competitive inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase with *in vivo* pharmacodynamic activity and efficacy in a mouse melanoma model[J]. *J Med Chem*, 2009, **52**(52):7364–7367.
- [37] Combs AP, Yue EW, Sparks RB, *et al.* 1, 2, 5-oxadiazoles as inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase; *IN*, 2010005958 A1[P]. 2010-01-14[2016-07-17].
- [38] Gangadhar TC, Hamid O, Smith DC, *et al.* Preliminary results from a Phase I/II study of epacadostat (INC024360) in combination with pembrolizumab in patients with selected advanced cancers[J]. *J Immunother Cancer*, 2015, **3**(S2):1–2.
- [39] Paul S, Roy A, Deka SJ, *et al.* Nitrobenzofurazan derivatives of *N'*-hydroxyamidines as potent inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase 1[J]. *Eur J Med Chem*, 2016, **121**(10):364–375.
- [40] Jaen JC, Osipov M, Powers JP, *et al.* Immunoregulatory agents; *IN*, 2015188085 A1[P]. 2015-12-10[2016-07-17].
- [41] Beck HP, Jaen JC, Osipov M, *et al.* Immunoregulatory agents; *IN*, 2016073774 A2[P]. 2016-05-12[2016-07-17].
- [42] Beck HP, Jaen JC, Osipov M, *et al.* Immunoregulatory agents; *IN*, 2016073770 A1[P]. 2016-05-12[2016-07-17].
- [43] Beck HP, Jaen JC, Osipov M, *et al.* Immunoregulatory agents; *IN*, 2016073738 A2[P]. 2016-05-12[2016-07-17].
- [44] 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**(15):3403–3406.
- [45] Lin SY, Yeh TK, Kuo CC, *et al.* Phenyl benzenesulfonylhydrazides exhibit selective indoleamine 2,3-dioxygenase inhibition with potent *in vivo* pharmacodynamic activity and antitumor efficacy[J]. *J Med Chem*, 2016, **59**(1):419–430.
- [46] Banerjee M, Middya S, Shrivastava R, *et al.* Aminonitriles as kynurenine pathway inhibitors; *IN*, 2014141110 A2[P]. 2014-09-18[2016-07-17].
- [47] Banerjee M, Middya S, Shrivastava R, *et al.* Inhibitors of the kynurenine pathway; *IN*, 2014186035 A1[P]. 2014-11-20[2016-07-17].
- [48] Middya S, Yadav DB, Shrivastava R, *et al.* Novel iminonitrile derivatives; *IN*, 2016027241 A1[P]. 2016-02-25[2016-07-17].
- [49] Cowley P, Wise A. Inhibitors of tryptophan 2,3-dioxygenase or indoleamine 2,3-dioxygenase; *IN*, 2016071283 A1[P]. 2016-05-12[2016-07-17].
- [50] Cowley P, Wise A. Pharmaceutical compound; *IN*, 2016071293 A2[P]. 2016-05-12[2016-07-17].
- [51] Cowley P, Wise A. Pharmaceutical compound; *IN*, 2016026772 A1[P]. 2016-02-25[2016-07-17].
- [52] Cowley P, Wise A. Indole derivatives for use in medicine; *IN*, 2015150097 A1[P]. 2015-10-08[2016-07-17].
- [53] Cowley P, Wise A. Pharmaceutical compound; *IN*, 2015082499 A2[P]. 2015-06-11[2016-07-17].