

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2021年7月22日 (22.07.2021)



(10) 国际公布号  
**WO 2021/143937 A1**

(51) 国际专利分类号:  
C07D 207/34 (2006.01) A61K 31/402 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/074874

(22) 国际申请日: 2021年2月2日 (02.02.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202010052579.1 2020年1月17日 (17.01.2020) CN

(71) 申请人: 中国药科大学 (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。南京中澳转化医学研究院有限公司 (CHINA-AUSTRALIA INSTITUTE OF TRANSLATIONAL MEDICINE CO. LTD., NANJING, CHINA) [CN/CN]; 中国江苏省南京市江北新区长芦街道宁六路606号D栋12楼, Jiangsu 210047 (CN)。

(72) 发明人: 赖宜生 (LAI, Yisheng); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。葛书山 (GE, Shushan); 中国江苏省南京市江宁区龙眠大道639号, Jiangsu 211198 (CN)。徐强 (XU, Qiang); 中国江苏省南京市江北新区长芦街道宁六路606号D栋12楼, Jiangsu

210047 (CN)。郭文洁 (GUO, Wenjie); 中国江苏省南京市江北新区长芦街道宁六路606号D栋12楼, Jiangsu 210047 (CN)。

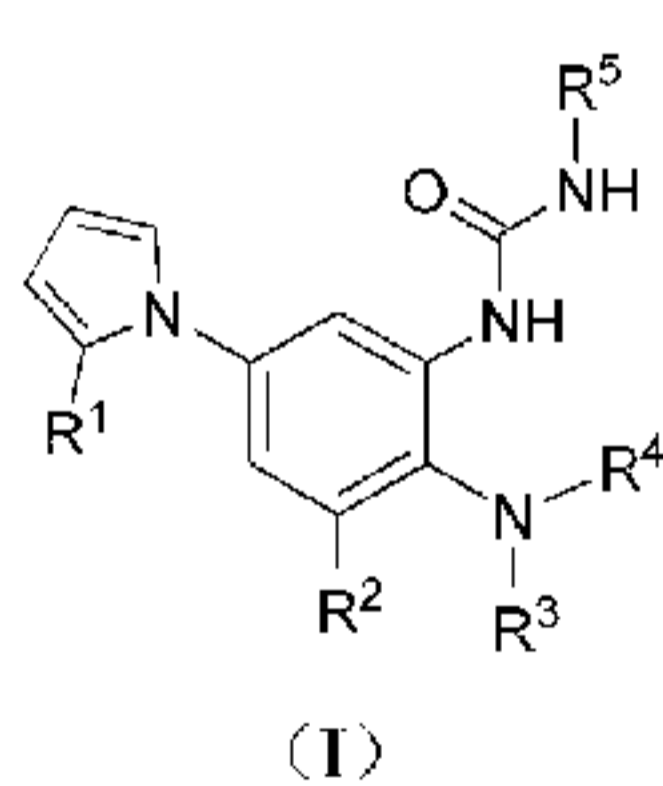
(74) 代理人: 南京苏高专利商标事务所 (普通合伙) (NANJING SUGAO PATENT AND TRADEMARK FIRM (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江苏省南京市白下区中山东路198号龙台国际大厦1912室, Jiangsu 210005 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: PYRROLE COMPOUNDS, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 吡咯类化合物、其制备方法和药物组合物与用途



(57) Abstract: Disclosed are pyrrole compounds with structural characteristics of formula (I), metabolites, metabolic precursors, prodrugs, solvates, crystals or pharmaceutically acceptable salts thereof, a preparation method therefor, and the use thereof in the preparation of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) inhibitor drugs. Experimental results indicate that the pyrrole compounds of the present invention have a significant inhibitory effect on the activity of IDO1, and can effectively promote the proliferation of T lymphocytes, inhibit the differentiation of naive T lymphocytes into regulatory T cells, and reverse IDO1-mediated immunosuppression, and can thus be used in the treatment of related diseases having a pathological feature of IDO1-mediated kynurenine metabolic pathway, such diseases comprising cancer, viral infections, neurodegenerative diseases, cataracts, organ transplant rejection, depression, autoimmune diseases, etc.

(57) 摘要: 本发明公开了一种具有式(I)结构特征的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐、其制备方法、以及它们在制备吡咯胺2,3-双加氧酶1(IDO1)抑制剂药物的用途。实验结果表明, 本发明的吡咯类化合物对IDO1的活性具有显著抑制作用, 能够有效地促进T淋巴细胞增殖, 抑制初始T淋巴细胞分化为调节性T细胞, 逆转IDO1介导的免疫抑制作用, 可以用于治疗具有IDO1介导的犬尿氨酸代谢途径的病理学特征的相关疾病, 包括癌症、病毒感染、神经变性疾病、白内障、器官移植排斥、抑郁症和自身免疫性疾病等。

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

**本国际公布：**

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括关于请求恢复一项或多项优先权要求的信息(细则26之二.3和48.2(b)(vii))。

## 吡咯类化合物、其制备方法和药物组合物与用途

### 技术领域

本发明属于新化合物领域，具体涉及一类作为吡咯胺 2,3-双加氧酶 1 (IDO1) 抑制剂的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐，它们的制备方法、含有这些化合物的药物组合物、以及这些化合物或组合物在治疗与 IDO1 介导的免疫抑制的相关疾病方面的用途。

### 背景技术

吡咯胺 2,3-双加氧酶 1 (IDO1) 是人体肝脏外催化色氨酸的犬尿氨酸代谢途径中的限速酶。IDO1 在多种组织（如肺、肾、脑、胎盘、胸腺）以及多种细胞（如巨噬细胞和树突状细胞）中表达，细胞因子如 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 可诱导 IDO1 表达。

IDO1 可以通过催化色氨酸氧化代谢参与机体的固有免疫和适应性免疫的调控。IDO1 主要是通过催化色氨酸导致色氨酸局部耗竭及其代谢产物蓄积来实现其对免疫系统的调控作用：一方面，色氨酸的耗竭可通过激活 GCN2 通路诱导 T 细胞分裂周期停滞于 G1 期，从而抑制 T 细胞的增殖，同时还抑制初始 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化为辅助性 T 细胞 17 (Th17)，进而产生免疫抑制；另一方面，犬尿氨酸等色氨酸代谢产物具有细胞毒性，可以杀灭 T 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞，而且这些代谢产物还可以通过激活芳香烃受体 (AhR) 来诱导 CD4<sup>+</sup> T 细胞分化为调节性 T 细胞 (Treg)，并促进树突状细胞 (DC) 转化成致耐受性 DC；此外，色氨酸代谢产物可以通过下调 NK 细胞受体的表达来抑制 NK 细胞的功能，这些都可以进一步抑制机体的免疫反应。

IDO1 与很多生理病理过程有关。研究表明，IDO1 在宿主免疫防御和母胎免疫耐受等生理应激过程中起重要作用，期间细胞因子如 IFN- $\gamma$  分泌显著增加，从而诱导 IDO1 表达，导致色氨酸耗竭和犬尿氨酸等代谢产物聚积，从而抑制母体的 T 细胞反应，诱导母体免疫耐受，确保胎儿不被母体的免疫系统排斥。而在宿主微环境中的色氨酸耗竭使其不能为病原微生物复制提供所必需的色氨酸，从而导致病原微生物死亡，与此同时 IDO1 介导的免疫抑制可以避免机体免疫系统的过度激活。IDO1 对移植组织在新宿主中的存活也发挥免疫抑制作用。这些研究结果说明 IDO1 是一种免疫调节酶，参与机体的免疫耐受。

众多研究表明，IDO1 介导的免疫耐受与肿瘤免疫逃逸、病毒感染、神经变性疾病、器官移植排斥、自身免疫性疾病、神经精神疾病和白内障等疾病的密切相关。在这些疾病中，过度表达的 IDO1 所介导的色氨酸局部耗竭及其代谢产物的聚积可以抑制 T 细胞的激活，导致机体的免疫耐受。

此外，IDO1 催化的色氨酸代谢产物如犬尿氨酸和喹啉酸等具有神经毒性，并且这些代谢产物与神经变性疾病如记忆障碍症、阿尔茨海默病 (AD)、认知障碍症、老年痴呆症、帕金森病、帕金森综合症和运动障碍性疾病的发生密切相关。神经精神疾病如抑郁症、精神分裂症、焦虑症也与 IDO1 过度表达和犬尿氨酸等代谢产物水平升高有关。IDO1 的过度表达造成色氨酸耗竭，从而减少用于合成神经递质 5-羟色胺的色氨酸的量，导致 5-羟色胺缺乏，再加上具有神经毒性的犬尿氨酸和喹啉酸等代谢产物的聚积，共同促进神经精神疾病的发生，而且是多种心境障碍的因素。

IDO1 过度表达所介导的色氨酸耗竭也存在于各种自身免疫性疾病中。在类风湿关节炎患者滑膜关节组织的 DCs 高表达 IDO1，患者血清中色氨酸浓度降低，而犬尿氨酸浓度和犬尿氨酸/色氨酸比值均明显升高。

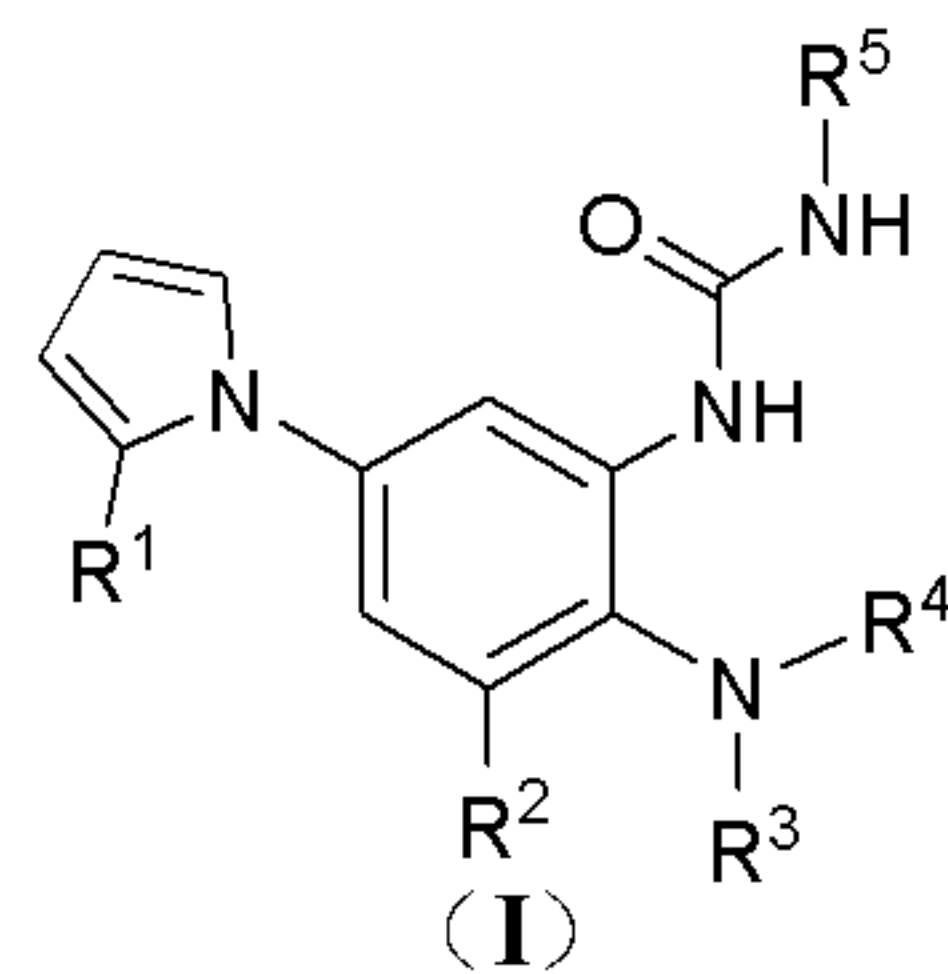
IDO1 诱导的免疫抑制在肿瘤免疫逃逸中起重要作用。IDO1 过度表达于各类肿瘤及其微环境中的细胞如 DC 细胞和基质细胞, 导致肿瘤局部色氨酸耗竭和色氨酸代谢产物聚积, 从而诱导肿瘤免疫逃逸, 帮助肿瘤细胞逃避机体免疫系统的攻击。

IDO1 抑制剂可以降低色氨酸代谢和犬尿氨酸等代谢产物的聚积, 从而逆转 IDO1 介导的免疫抑制作用, 恢复 T 细胞和 NK 细胞的增殖和功能, 并且抑制 Treg 细胞的增殖, 从而增强机体的免疫应答, 因此 IDO1 抑制剂可用于治疗或预防由 IDO1 介导的免疫抑制所引起的上述相关疾病, 包括癌症、病毒感染、神经变性疾病、白内障、器官移植排斥、抑郁症和自身免疫性疾病等。此外, IDO1 抑制剂还可以和其他化疗剂、靶向抗肿瘤药物、免疫检查点抑制剂、免疫检查点激动剂、抗肿瘤疫苗、抗病毒剂、抗病毒疫苗、细胞因子疗法、过继性细胞免疫治疗和放射治疗联合使用, 达到协同或增强疗法的目的。

### 发明内容

发明目的: 本发明所要解决的技术问题在于提供了一种具有通式 (I) 结构特征的化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶及其药学上可接受的盐、制备方法、药物组合物及用途。本发明的化合物具有优异的 IDO1 抑制活性, 可以用于治疗和/或预防 IDO1 介导的免疫抑制所引起的各种相关疾病。

技术方案: 本发明提供了通式 (I) 结构特征的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐:



其中:

$R^1$  代表氰基、 $-CO_2R^6$  或  $-CONR^7R^8$ ;

$R^2$  代表氢、卤素、氰基、羟基或硝基;

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  环烷基、 $C_2-C_8$  烯基、 $C_2-C_8$  炔基、 $C_1-C_8$  烷氨基或  $R^3$  和  $R^4$  与跟它们连接的氮原子一起形成 5-7 元杂环; 其中所述的杂环可任选地包含一个或多个选自 O、S 或 N 杂原子; 其中所述的杂环上可任选地被一个或多个以下基团取代: 卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_1-C_8$  烷氧基或  $C_3-C_6$  环烷基;

$R^5$  代表芳基或芳杂环, 其中所述的芳基或芳杂环可任选地被一个或多个  $R^9$  取代;

$R^6$ 、 $R^7$  和  $R^8$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  环烷基、 $C_2-C_8$  烯基、 $C_2-C_8$  炔基、 $C_1-C_8$  烷氨基;

$R^9$  代表氢、卤素、氰基、羟基、巯基、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_1-C_8$  烷氧基、 $C_1-C_8$  烷氨基或卤代烷基;

所述的烷基代表直链烷基、支链烷基或环状烷基; 所述的烷氧基代表直链烷氧基、支链烷氧基或环状烷氧基; 所述的烷氨基代表直链烷氨基、支链烷氨基或环状烷氨基; 所述的烯基代表直链烯基、支链烯基或环状烯基; 所述的炔基代表直链炔基或支链炔基;

所述的芳基代表苯基、萘基、茚基或四氢萘基; 所述的芳杂环代表吡咯基、吡唑基、咪唑基、呋喃基、噻吩基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、异噻唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基或哒嗪基的单环杂环;

或喹啉基、喹喔啉基、吡啶基、苯并咪唑基、苯并噁唑基、苯并异噁唑基、苯并噻唑基、苯并异噻唑基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、2,3-二氢苯并[1,4]二氧杂环己烯基、或苯并[1,3]二氧杂环戊烯基的双环杂环；

所述的卤代烷基为具有 1-8 个碳原子的直链或支链饱和烃基，或为具有 3-8 个碳原子的环状饱和烃基，或为连接具有 1-8 个碳原子的直链或支链饱和烃基的具有 3-8 个碳原子的环状饱和烃基；其中一个或多个氢原子被一个或多个卤原子取代。

优选，所述吡咯类化合物及其衍生物结构中：

$R^1$  代表氰基、 $-CO_2R^6$  或  $-CONR^7R^8$ ；

$R^2$  代表氢或卤素；

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  环烷基、 $C_1-C_8$  烷氨基或  $R^3$  和  $R^4$  与跟它们连接的氮原子一起形成 5-7 元杂环；其中所述的杂环可任选地包含一个或多个选自 O、S 或 N 杂原子；其中所述的杂环上可任选地被一个或多个以下基团取代： $C_1-C_8$  烷基或  $C_3-C_6$  环烷基；

$R^5$  代表芳基或芳杂环，其中所述的芳基或芳杂环可任选地被一个或多个  $R^9$  取代；

$R^6$ 、 $R^7$  和  $R^8$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_8$  烷基或  $C_3-C_8$  环烷基；

$R^9$  代表氢、卤素、氰基、羟基、巯基、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_1-C_8$  烷氧基、 $C_1-C_8$  烷氨基或卤代烷基。

优选，所述吡咯类化合物及其衍生物结构中：

$R^1$  代表氰基、 $-CO_2R^6$  或  $-CONR^7R^8$ ；

$R^2$  代表氢或卤素；

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_4$  烷基、 $C_3-C_6$  环烷基、 $C_1-C_6$  烷氨基或  $R^3$  和  $R^4$  与跟它们连接的氮原子一起形成 5-7 元杂环；其中所述的杂环可任选地包含一个或多个选自 O、S 或 N 杂原子；其中所述的杂环上可任选地被一个或多个甲基取代；

$R^5$  代表苯环或异噁唑基，其中所述的苯环可任选地被一个或多个  $R^9$  取代；

$R^6$ 、 $R^7$  和  $R^8$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_3$  烷基或  $C_3-C_6$  环烷基；

$R^9$  代表氢、卤素、氰基、 $C_1-C_5$  烷基、 $C_1-C_5$  烷氧基或三氟甲基。

优选，所述吡咯类化合物及其衍生物结构中：

$R^1$  代表  $COOH$ ；

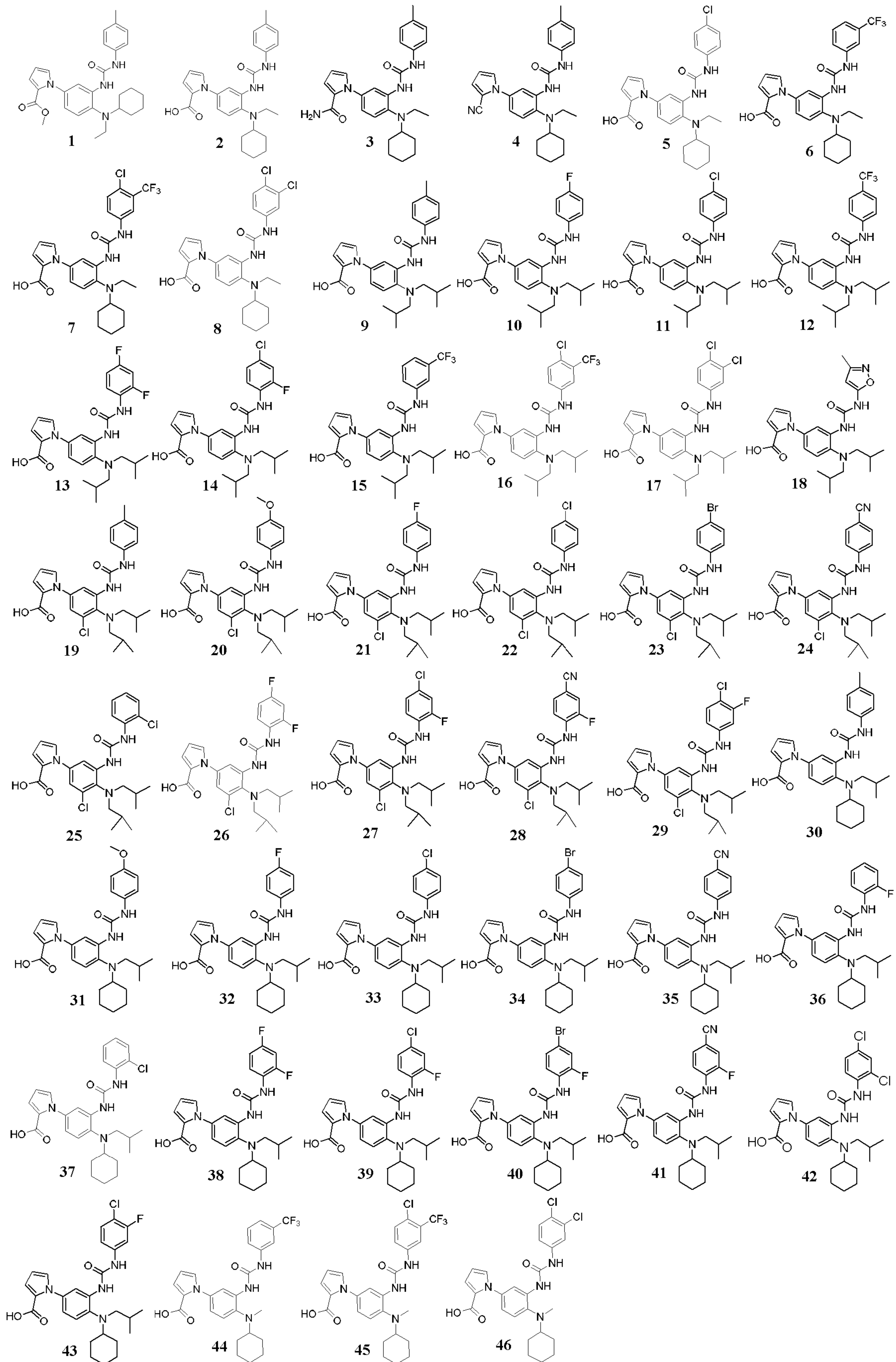
$R^2$  代表氢或卤素；

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地代表  $C_1-C_4$  烷基或  $C_3-C_6$  环烷基；

$R^5$  代表苯环，所述的苯环可任选地被一个或多个  $R^9$  取代；

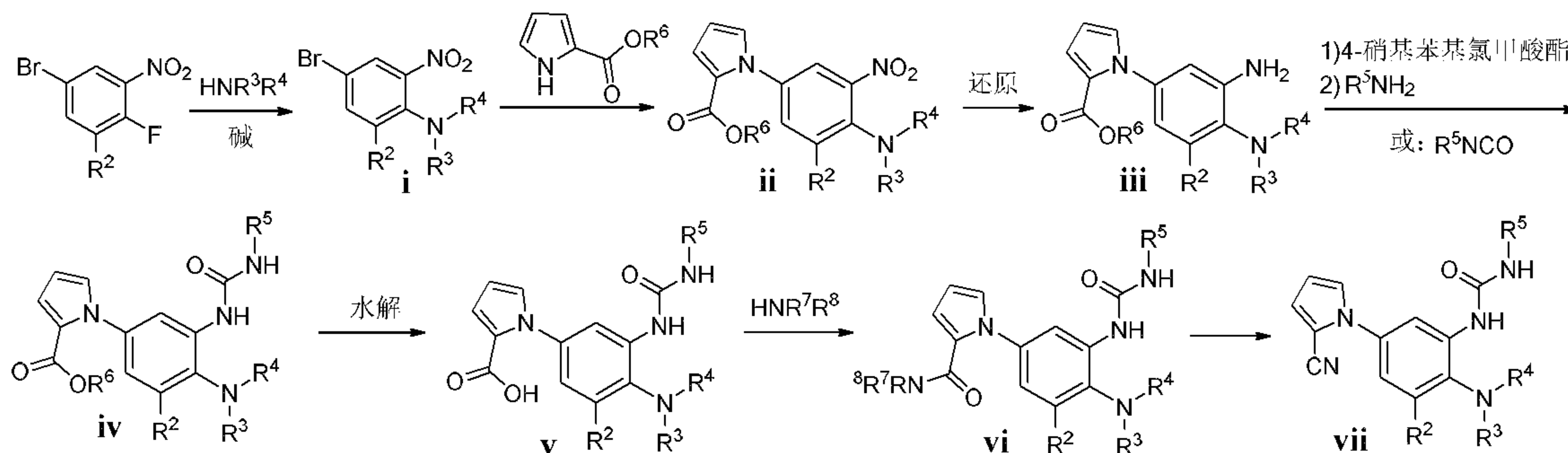
$R^9$  代表氢、卤素、氰基、 $C_1-C_5$  烷基或  $C_1-C_5$  烷氧基。

更具体地，所述吡咯类化合物为以下任一化合物：



本发明的另一目的在于提供通式 (I) 所示化合物的制备方法, 所述制备方法为以下任一方法:

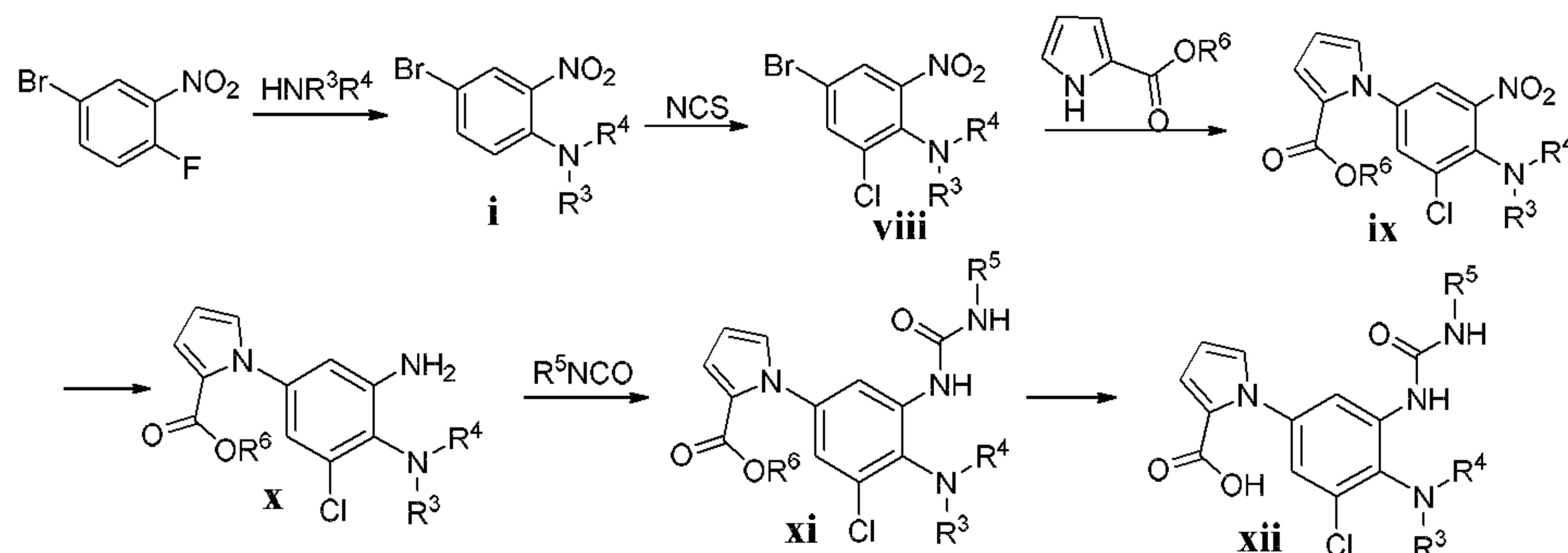
方法一: 以取代硝基苯为原料, 在碱作用下与胺类化合物  $\text{HNR}^3\text{R}^4$  反应制得中间体 **i**, **i** 与吡咯-2-羧酸酯经 Ullmann 反应制得中间体 **ii**, **ii** 经还原制得中间体 **iii**, **iii** 与取代苯异氰酸酯  $\text{R}^5\text{NCO}$  缩合制得化合物 **iv**, 或者 **iii** 先与氯甲酸-4-硝基苯酯形成活性中间体, 然后再与胺类化合物  $\text{R}^5\text{NH}_2$  反应制得目标化合物 **iv**; **iv** 经水解制得目标化合物 **v**; **v** 与草酰氯或氯化亚砷反应制成酰氯后再与胺类化合物  $\text{HNR}^7\text{R}^8$  反应制得目标化合物 **vi**; **vi** 经高温脱水制得目标化合物 **vii**;



其中,  $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$  和  $\text{R}^8$  的定义如前所述;

所述的碱选自三乙胺、DIPEA、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$  或  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ ; 所述的还原剂选自锌粉和氯化铵或铁粉和氯化铵; **vi** 在三氯氧磷中经高温脱水制得目标化合物 **vii**。

方法二: 以 2-氟-5-溴硝基苯为原料, 在碱作用下与胺类化合物  $\text{HNR}^3\text{R}^4$  反应制得中间体 **i**, **i** 经 NCS 氯代反应得到中间体 **viii**, **viii** 与吡咯-2-羧酸酯经 Ullmann 反应制得中间体 **ix**, **ix** 经还原剂还原制得中间体 **x**, **x** 与取代苯异氰酸酯  $\text{R}^5\text{NCO}$  缩合制得中间体 **xi**, **xi** 经水解制得目标化合物 **xii**;



其中,  $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$  和  $\text{R}^6$  的定义如前所述。

其中, 步骤 1) 所述的碱选自三乙胺、DIPEA、 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、 $\text{K}_2\text{CO}_3$  或  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ 。

其中, 步骤 4) 所述的还原剂选自锌粉和氯化铵或铁粉和氯化铵。

所述通式 (I) 化合物的药学上可接受的盐可通过一般的化学方法合成。

一般情况下, 盐的制备可以通过游离碱或酸与等化学当量或过量酸 (无机酸或有机酸) 或碱 (无机碱或有机碱) 在合适的溶剂或溶剂组合物中反应制得。

本发明还提供了一种药物组合物, 其主要由在治疗上有效量的活性组分和药学上可接受的辅料组成; 所述的活性组分包括通式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐的一种或多种。所述药物组合物中, 所述的辅料包括药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。

根据治疗目的可将药物组合物制成各种类型的给药单位剂型, 如片剂、丸剂、粉剂、液体、悬浮液、乳液、颗粒剂、胶囊、栓剂和针剂 (溶液和悬浮液) 等, 优选片剂、胶囊、液体、悬浮液和针剂 (溶液

和悬浮液)。

为了使片剂、丸剂或栓剂形式的药物组合物成形,可使用本领域任何已知并广泛使用的赋形剂。

为了制备针剂形式的药物组合物,可将溶液或悬浮液消毒后(最好加入适量的氯化钠,葡萄糖或甘油),制成与血液等渗压的针剂。在制备针剂时,也可以使用本领域内任何常用的载体。例如:水、乙醇、丙二醇、乙氧基化的异硬脂醇、聚乙氧基化的异硬脂醇和聚乙烯脱水山梨醇的脂肪酸酯等。此外,还可以加入通常溶解剂和缓冲剂等。

本发明所述的组合物在药物组合物中的含量物特殊限制,可在很宽的范围内进行选择,通常可为质量百分比的 5~95%, 优先为质量百分比的 30~85%。

本发明所述的药物组合物的给药方法没有特殊限制。可根据患者年龄、性别和其它条件及症状,选择各种剂型的制剂给药。

本发明还提供了所述通式 (I) 化合物、其药学上可接受的盐或所述的药物组合物在制备吲哚胺 2,3-双加氧酶 1 (IDO1) 抑制剂药物中的用途。所述的 IDO1 抑制剂药物用于治疗 IDO1 介导的免疫抑制的相关疾病,所述的相关疾病包括癌症、病毒感染、神经变性疾病、白内障、器官移植排斥、抑郁症或自身免疫性疾病。

本发明还提供了所述通式 (I) 化合物、其药学上可接受的盐或所述药物组合物在制备药物中的用途,所述药物用于治疗癌症、病毒感染、神经变性疾病、白内障、器官移植排斥、抑郁症或自身免疫性疾病。

所述的癌症包括但不限于:恶性黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、胰腺癌、淋巴瘤、白血病、前列腺癌、睾丸癌、肾癌、脑癌、头颈癌、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌、间皮癌、甲状腺瘤、肝癌、食管癌中的一种或多种。

所述的病毒感染包括但不限于:由人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、流感病毒、脊髓灰质病毒、巨细胞病毒、柯萨奇病毒、人类乳头状瘤病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、水痘-带状疱疹病毒中的一种或多种引起的感染。

所述的神经变性疾病包括但不限于:记忆障碍症、阿尔茨海默病、认知障碍症、老年痴呆症、帕金森症、运动障碍性疾病中的一种或多种。

所述的自身免疫性疾病包括但不限于:类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、皮炎、硬皮病、结节性脉管炎、多发性硬化症、肾病、重症肌无力、混合性结缔组织病、银屑病、肝病、内分泌相关疾病、由于感染引起的自身免疫反应中的一种或多种。

进一步,本发明还提供了所述通式 (I) 化合物、其药学上可接受的盐或所述药物组合物可以与一种或多种其他种类的治疗剂和/或治疗方法联合用于治疗由 IDO1 介导的相关疾病。

所述其他种类的治疗剂和/或治疗方法包括但不限于:化疗剂、靶向抗肿瘤药物、免疫检查点抑制剂、免疫检查点激动剂、抗肿瘤疫苗、抗病毒剂、抗病毒疫苗、细胞因子疗法、过继性细胞免疫治疗或放射治疗。

有益效果:与现有技术相比,本发明具有以下显著优点:

本发明的化合物对 IDO1 具有很高的抑制活性。药理实验结果表明,这些吡咯类化合物能够有效逆转 IDO1 介导的免疫抑制作用,促进 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的增殖,提高颗粒酶 B 和干扰素- $\gamma$  的分泌,减少 CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> 调节性 T 细胞的生成,降低 PCNA 蛋白的表达。体内药效学评价结果表明,本发明



的化合物能够显著抑制各种肿瘤类型的小鼠移植瘤的生长,而对免疫系统缺陷的裸鼠移植瘤的生长则无影响,说明这些化合物是通过激活宿主免疫应答而起抗肿瘤作用。

### 附图说明

图1为本发明化合物对IDO1蛋白表达的影响,其中:图1A为化合物**2**、**14**、**26**、**27**和**39**对IDO1蛋白表达的影响,图1B为图1A的灰度扫描统计结果;

图2为本发明化合物对B16F1黑色素瘤小鼠移植瘤生长的影响,其中:图2A为化合物**2**对B16F1黑色素移植瘤体积的影响,图2B为化合物**2**对B16F1黑色素移植瘤重量的影响;

图3为本发明化合物对CT26结直肠癌BALB/c小鼠移植瘤生长的影响;

图4为本发明化合物对免疫系统缺陷的裸鼠移植瘤不产生抑制;

图5为本发明化合物对PAN02胰腺癌小鼠移植瘤生长的影响;

图6为本发明化合物在不同温度下对IDO1活性的影响,其中:图6A为Epacadostat在不同温度下对IDO1活性的影响,图6B为化合物**26**在不同温度下对IDO1活性的影响,图6C为化合物**39**在不同温度下对IDO1活性的影响。

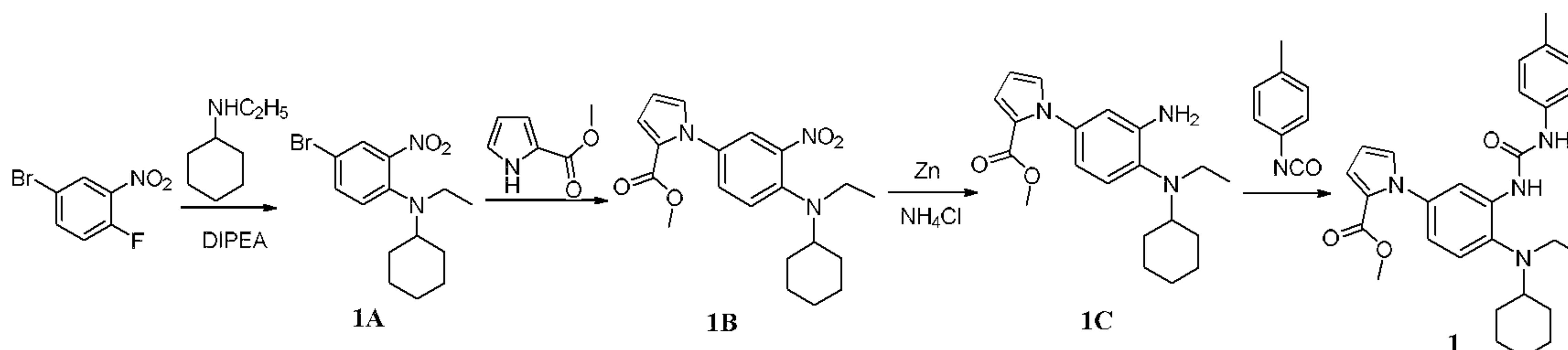
### 具体实施方式

下面结合实施例对本发明的技术方案作进一步说明。

试剂与材料:实验所需要的试剂未经特别说明均为市售化学纯或分析纯产品。

仪器:<sup>1</sup>H NMR用Bruker AV-300或400MHz型核磁共振仪测定,耦合常数(*J*)值以Hz为单位,TMS为内标。质谱分析仪器为岛津LCMS-2020型质谱仪测定。薄层层析使用青岛海洋化学有限公司生产HG/T2354-92型GF254薄层层析硅胶。ZF7型三用紫外分析仪254nm显色。

实施例1:1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸甲酯(**1**)的合成



(1) 2-硝基-4-溴-*N,N*-(乙基)环己基苯胺(**1A**)的合成

将2-氟-5-溴硝基苯(3 g, 13.6 mmol)、*N*-乙基环己胺(2.61 g, 20.5 mmol)和*N,N*-二异丙基乙胺(3.53 g, 27.3 mmol)加入*N,N*-二甲基二酰胺(50 mL)中,80°C搅拌4小时,乙酸乙酯萃取(100 mL×3),柱层析纯化,得红色固体4.03 g,收率90.4%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 7.75 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.49 (dt, *J* = 8.8, 2.1 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.8, 1.7 Hz, 1H), 3.13 (m, 2H), 3.00-2.85 (m, 1H), 1.75 (d, *J* = 15.0 Hz, 3H), 1.63-1.55 (m, 1H), 1.47-1.01 (m, 6H), 0.95 (td, *J* = 7.1, 1.7 Hz, 3H); MS (EI) *m/z* 325.1 [M-H].

(2) 1-(3-硝基-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸甲酯(**1B**)的合成

将**1A**(3 g, 9.2 mmol)、吡咯-2-甲酸甲酯(1.15 g, 9.2 mmol)、碘化亚铜(3.49 g, 18.4 mmol)、碳酸铯(5.97 g, 18.4 mmol)和*L*-脯氨酸(2.12 g, 18.4 mmol)加入DMF(50 mL)中,氮气保护80°C下搅拌12小时,乙酸乙酯萃取(100 mL×3),柱层析纯化,得黄色固体1.52 g,收率44.6%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 7.76 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.57-7.37 (m, 2H), 7.30 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 3.9, 1.88 Hz, 1H), 6.33 (dd, *J* = 3.9, 2.7 Hz, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.15 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.95 (tt, *J* = 11.7,

2.7 Hz, 1H), 1.84-1.63 (m, 4H), 1.55 (d,  $J = 11.3$  Hz, 1H), 1.37 (td,  $J = 14.6, 13.7, 6.8$  Hz, 2H), 1.28-1.01 (m, 3H), 0.91 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H); MS (EI)  $m/z$  370.5 [M-H].

(3) 1-(3-氨基-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1H-吡咯-2-甲酸甲酯 (1C) 的合成

将 1B (1.52 g, 4.09 mmol)、锌粉 (1.33 g, 20.46 mmol) 和氯化铵 (1.31 g, 20.46 mmol) 加入 20 mL 乙醇中, 氮气保护下常温反应 4 小时, 乙酸乙酯萃取, 减压浓缩, 得淡黄色固体 1.34 g。

(4) 1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1H-吡咯-2-甲酸甲酯 (1) 的合成

将 1C (1.54 g, 3.92 mmol) 溶于无水四氢呋喃 (20 mL) 中, 加入对甲苯异氰酸酯 (0.53 g, 3.92 mmol), 常温反应 4 小时, 减压浓缩, 柱层析纯化, 得白色固体 1.32 g, 收率 63.7%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 9.50 (s, 1H), 8.6 (s, 1H), 8.17 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.30-7.17 (m, 2H), 7.14-7.00 (m, 3H), 6.88 (dd,  $J = 8.6, 2.6$  Hz, 1H), 6.30 (t,  $J = 3.2$  Hz, 1H), 3.61 (s, 3H), 3.05 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.77 (s, 1H), 2.24 (s, 3H), 1.96 (d,  $J = 14.6$  Hz, 2H), 1.71 (s, 2H), 1.55 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 1.18 (s, 5H), 0.87 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H); MS (EI)  $m/z$  473.2 [M-H].

实施例 2: 1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-(环己基(乙基)氨基)苯基)-1H-吡咯-2-甲酸 (2) 的合成

将 1 (1.32 g, 2.78 mmol) 和氢氧化钠 (0.56 g, 13.92 mmol) 加入 20 mL 乙醇中, 65°C 下搅拌 8 小时, 减压浓缩, 稀盐酸 (1M) 调 pH 至 3~4, 乙酸乙酯萃取, 柱层析纯化, 得白色固体 0.68 g, 收率 53.1%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 8.51 (s, 1H), 8.26 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.21 (d,  $J = 2.0$  Hz, 3H), 7.16 (dt,  $J = 3.9, 2.0$  Hz, 1H), 7.12-6.99 (m, 3H), 6.91 (dd,  $J = 8.4, 2.4$  Hz, 1H), 6.27 (dd,  $J = 3.9, 2.6$  Hz, 1H), 2.91-2.8 (m, 2H), 2.55 (s, 1H), 2.37 (s, 3H), 1.59 (d,  $J = 9.7$  Hz, 5H), 1.07 (t,  $J = 12.9$  Hz, 5H), 0.77 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H); MS (EI)  $m/z$  459.3 [M-H].

实施例 3: 1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1H-吡咯-2-甲酰胺 (3) 的合成

将 2 (1 g, 1.96 mmol) 溶于 15 mL 无水二氯甲烷中, 冰浴冷却, 加入 2 mL 草酰氯, 室温反应过夜, 减压除去过量的草酰氯, 加入 15 mL 无水二氯甲烷溶解, 冰浴冷却, 滴入 3 mL 氨水, 室温反应 5 小时, 二氯甲烷萃取, 柱层析纯化, 得白色固体 0.5 g, 收率 50.1%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 8.58 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.80 (dd,  $J = 7.4, 1.5$  Hz), 7.80 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.22 (dd,  $J = 7.6, 2.3$  Hz, 3H), 7.09 (dd,  $J = 7.5, 1.5$  Hz, 1H), 6.96 (dd,  $J = 7.5, 1.3$  Hz, 2H), 6.81 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.76 (s, 2H), 6.64 (t,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 3.29 (q,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.33 (d,  $J = 1.2$  Hz, 3H), 1.79-1.67 (m, 4H), 1.60 (t,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 1.45-1.29 (m, 4H), 1.18 (t,  $J = 8.0$  Hz, 3H); MS (EI)  $m/z$  458.3 [M-H].

实施例 4: 1-(2-((乙基)环己基氨基)-5-(2-氰基-1H-吡咯基-1)苯基)-3-(4-甲基苯基)脲 (4) 的合成

将 3 (0.4 g, 0.87 mmol) 溶于 10 mL 二氯甲烷中, 加入 3 mL 三氯氧磷, 65°C 反应 8 小时。冷却, 将反应液倒入冰水中, 加入氢氧化钠水溶液 (4M) 调 pH 值至 9, 二氯甲烷萃取, 柱层析纯化, 得白色固体 0.2 g, 收率 52.0%。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 8.53 (s, 1H), 8.45 (d,  $J = 2.6$  Hz, 1H), 7.28 (s, 3H), 7.23-7.12 (m, 3H), 7.10 (dd,  $J = 8.4, 2.6$  Hz, 1H), 6.99 (dd,  $J = 4.0, 1.6$  Hz, 1H), 6.33 (t,  $J = 3.3$  Hz, 2H), 2.88 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.56 (t,  $J = 10.8$  Hz, 1H), 2.39 (s, 3H), 1.27 (d,  $J = 2.9$  Hz, 4H), 1.16-0.99 (m, 3H), 0.90 (t,  $J = 8.8$  Hz, 3H), 0.80 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H); MS (EI)  $m/z$  440.3 [M-H].

采用与实施例 1 和实施例 2 相似的操作, 制得下列化合物:

编号	<sup>1</sup> H NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) $\delta$ (ppm)	ESI-MS [M-H] <sup>-</sup>
5	(Chloroform- <i>d</i> ) 7.73 (dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 5.7, 3.3$ Hz, 1H), 7.40-6.89 (m,	479

	7H), 6.28 (dd, $J = 3.9, 2.6$ Hz, 1H), 2.66 (s, 1H), 1.56-1.39 (m, 3H), 0.93 (m, 10H).	
6	8.14 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.62 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.52 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.30 (t, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.17 (s, 1H), 6.95 (dd, $J = 14.3, 6.0$ Hz, 2H), 6.27 (t, $J = 3.1$ Hz, 1H), 3.06 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.77 (s, 1H), 1.97 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.70 (s, 2H), 1.55 (d, $J = 12.2$ Hz, 1H), 1.18 (t, $J = 10.0$ Hz, 5H), 0.87 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).	513
7	(400MHz) 10.17 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.14 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 8.08 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.69 (dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.33-7.22 (m, 1H), 7.16 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.00-6.88 (m, 2H), 3.07 (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 2.77 (s, 1H), 1.95 (s, 2H), 1.70 (s, 2H), 1.28-1.11 (m, 6H), 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H).	547
8	(400MHz) 9.98 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 8.71(s,1H), 8.14 (d, $J = 10.3$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 11.8$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.30 (m, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.05-6.88 (m, 2H), 6.27 (s, 1H), 3.05 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.77 (s, 1H), 1.98-1.89 (m, 2H), 1.70 (s, 2H), 1.23-1.00 (m, 6H), 0.86 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H).	513
9	9.33 (s, 1H), 7.85 (s, 2H), 7.30-6.59 (m, 8H), 6.11 (s, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.55 (s, 2H), 0.74 (d, $J = 6.6$ Hz, 12H).	461
10	9.59 (s, 1H), 8.07-7.93 (m, 2H), 7.53-7.41 (m, 2H), 7.27 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.19-7.06 (m, 3H), 7.00-6.86 (m, 2H), 6.25 (dd, $J = 3.8, 2.6$ Hz, 1H), 2.72 (d, $J = 6.9$ Hz, 4H), 1.69 (m, 2H), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 12H).	465
11	10.08 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.59-7.49 (m, 2H), 7.36-7.20 (m, 3H), 6.99-6.86 (m, 2H), 6.25 (dd, $J = 3.9, 2.7$ Hz, 1H), 2.75 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 1.72 (m, 2H), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 12H).	481
12	9.86 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.53 (d, $J = 9.1$ Hz, 3H), 7.15 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.12 (s, 1H), 2.60 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 1.56 (s, 2H), 1.19-0.39 (m, 12H).	515
13	(400 MHz) 9.39 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.34-7.21 (m, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.04 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 6.99-6.88 (m, 2H), 6.25 (s, 1H), 2.73 (d, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.72 (m, 2H), 0.87 (d, $J = 7.1$ Hz, 12H).	483
14	12.06 (s, 1H), 9.55 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.02 (t, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 11.1, 2.1$ Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.15-7.07 (m, 1H), 6.94-6.90 (m, 2H), 6.23 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 2.73 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H), 1.75-1.66 (m, 2H), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 12H).	499
15	10.03 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.96 (s, 2H), 6.25 (s, 1H), 2.73 (d, $J = 6.7$ Hz, 4H), 1.70 (d, $J = 13.9$ Hz, 2H), 1.09 (t, $J = 7.0$ Hz, 4H), 0.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 8H).	515
16	12.08 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.99-6.92 (m, 2H), 6.28-6.23 (m, 1H), 2.73 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 1.69 (dt, $J = 13.2, 6.8$ Hz, 2H), 0.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 12H).	549
17	8.64 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 7.30 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 2.74 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 1.77-1.64 (m, 2H), 0.89 (d, $J = 6.5$ Hz, 12H).	515

18	8.21 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 7.00-6.93 (m, 2H), 6.25 (dd, $J = 3.8, 2.7$ Hz, 1H), 2.69 (d, $J = 7.0$ Hz, 4H), 1.70 (dt, $J = 13.4, 6.7$ Hz, 2H), 0.97-0.77 (m, 15H).	452
19	9.51 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.20 (s, 1H), 7.09 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.01-6.94 (m, 2H), 6.30-6.24 (m, 1H), 3.01 (dd, $J = 12.7, 6.6$ Hz, 2H), 2.88 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 2.24 (s, 3H), 1.70 (dt, $J = 13.2, 6.5$ Hz, 2H), 0.87 (dd, $J = 11.6, 6.6$ Hz, 12H).	495
20	9.43 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.08 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.20 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.99-6.96 (m, 2H), 6.89 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.29-6.26 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.00 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 2.91-2.85 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 1.73-1.65 (m, 2H), 0.87 (dd, $J = 12.0, 6.6$ Hz, 12H).	511
21	12.20 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.47 (dd, $J = 8.8, 5.0$ Hz, 2H), 7.20 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.13 (t, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.06-6.95 (m, 2H), 6.32-6.25 (m, 1H), 3.02 (dd, $J = 12.7, 6.5$ Hz, 2H), 2.90 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 1.71 (dt, $J = 13.2, 6.7$ Hz, 2H), 0.88 (dd, $J = 11.7, 6.6$ Hz, 12H).	499
22	9.78 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.22 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.98 (dd, $J = 3.8, 1.8$ Hz, 1H), 6.28 (dd, $J = 3.8, 2.7$ Hz, 1H), 3.03 (dd, $J = 12.6, 6.5$ Hz, 2H), 2.90 (d, $J = 2.8$ Hz, 2H), 1.70 (m, 2H), 0.87 (dd, $J = 11.3, 6.6$ Hz, 12H).	515
23	12.17 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.46 (s, 4H), 7.21 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.03 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.98-6.96 (m, 1H), 6.29-6.27 (m, 1H), 3.02 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 2.89 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 1.77-1.64 (m, 2H), 0.87 (dd, $J = 11.4, 6.6$ Hz, 12H).	559
24	12.19 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.70 (q, $J = 9.0$ Hz, 4H), 7.22 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.07 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.99-6.97 (m, 1H), 6.29-6.27 (m, 1H), 3.04 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 2.89 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 1.75-1.66 (m, 2H), 0.87 (dd, $J = 10.6, 6.6$ Hz, 12H).	506
25	12.19 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.60 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 1.5, 8.1$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 1.5, 8.1$ Hz, 1H), 7.33-7.28 (m, 1H), 7.20 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.17-7.11 (m, 1H), 7.04 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.97-6.95 (m, 1H), 6.33-6.21 (m, 1H), 3.00 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 2.88 (dd, $J = 12.6, 6.9$ Hz, 2H), 1.75-1.66 (m, 2H), 0.88 (dd, $J = 9.9, 6.6$ Hz, 13H).	514
26	7.83 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.30 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.02 (s, 2H), 6.90 (s, 1H), 6.23 (s, 1H), 3.01 (dd, $J = 12.4, 6.1$ Hz, 2H), 2.86 (dd, $J = 12.4, 6.5$ Hz, 2H), 1.74-1.64 (m, 2H), 0.86 (dd, $J = 10.7, 6.8$ Hz, 12H).	517
27	12.18 (s, 1H), 9.66 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.07-7.87 (m, 2H), 7.48 (dd, $J = 11.1, 2.5$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 9.5$ Hz, 2H), 7.05 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.96 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.27 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 12.6, 6.4$ Hz, 2H), 2.87 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 1.70 (dt, $J = 13.0, 6.6$ Hz, 2H), 0.86 (dd, $J = 10.6, 6.6$ Hz, 11H).	533
28	12.20 (s, 1H), 10.06 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.31 (t, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.89 (dd, $J = 11.7, 2.1$ Hz, 1H), 7.64-7.61 (m, 1H), 7.29-7.17 (m, 1H), 7.09 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H), 6.97 (dd, $J = 3.9, 1.8$ Hz, 1H), 6.28 (dd, $J = 2.7, 3.6$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J = 12.3, 6.6$ Hz, 2H), 2.86 (dd, $J = 12.3, 6.6$ Hz, 2H), 1.75-1.66 (m, 2H), 0.85 (dd, $J = 9.9, 6.6$ Hz, 12H).	533

29	12.12 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.06 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.69 (dd, $J = 12.3, 2.4$ Hz, 1H), 7.49 (t, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.22-7.18 (m, 2H), 7.06 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.98-6.96 (m, 1H), 6.36-6.12 (m, 1H), 3.04 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 2.90 (dd, $J = 12.6, 6.6$ Hz, 2H), 1.75-1.66 (m, 2H), 0.87 (dd, $J = 11.4, 6.6$ Hz, 12H).	532
30	(ppm) 9.49 (s, 1H), 8.18-8.02 (m, 2H), 7.39-7.31 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.15 (dd, $J = 2.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.11-7.04 (m, 2H), 6.97-6.85 (m, 2H), 6.25 (dd, $J = 3.9, 2.7$ Hz, 1H), 2.82 (s, 2H), 2.67-2.53 (m, 1H), 2.24 (s, 3H), 1.94 (s, 2H), 1.71 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 1.38 (dt, $J = 13.1, 6.6$ Hz, 1H), 1.29-0.96 (m, 5H), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	487
31	12.03 (s, 1H), 9.37 (s, 1H), 8.07 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 7.36 (m, 2H), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.96-6.94 (m, 1H), 6.89-6.86 (m, 3H), 6.25 (q, $J = 2.7$ Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.82 (s, 2H), 2.56 (t, $J = 10.5$ Hz, 1H), 1.89 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 1.71 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 1.41-1.32 (m, 1H), 1.26-1.03 (m, 5H), 0.84 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	503
32	9.64 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.06 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.55-7.39 (m, 2H), 7.25 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.19-7.06 (m, 3H), 7.00-6.85 (m, 2H), 6.25 (dd, $J = 3.8, 2.6$ Hz, 1H), 2.84 (s, 2H), 2.62 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H), 1.95 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 1.38 (m, 1H), 1.29-0.94 (m, 6H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	491
33	8.20 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.58-7.45 (m, 2H), 7.37-7.29 (m, 2H), 7.25 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 2.7, 1.9$ Hz, 1H), 6.99-6.85 (m, 2H), 6.25 (dd, $J = 3.8, 2.7$ Hz, 1H), 2.84 (s, 2H), 2.61 (t, $J = 10.7$ Hz, 1H), 1.97 (d, $J = 14.0$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 1.38 (m, 1H), 1.29-0.95 (m, 6H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	507
34	12.05 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.05 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.46 (s, 4H), 7.25 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 7.16 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.97-6.90 (m, 2H), 6.25 (q, $J = 2.7$ Hz, 1H), 2.84 (d, $J = 4.5$ Hz, 2H), 2.61 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H), 1.96 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H), 1.43-1.32 (m, 1H), 1.28-0.99 (m, 5H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	551
35	12.05 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.04 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.70 (q, $J = 9.0$ Hz, 4H), 7.28 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H), 7.17 (m, 1H), 6.96-6.93 (m, 2H), 6.26 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 2.85 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 2.63 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H), 1.97 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 11.4$ Hz, 1H), 1.43-1.34 (m, 1H), 1.28-1.03 (m, 5H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	498
36	12.05 (s, 1H), 9.50 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.97 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.94-7.91 (m, 1H), 7.28-7.05 (m, 5H), 6.96-6.90 (m, 2H), 6.25 (q, $J = 3.0$ Hz, 1H), 2.82 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 11.1$ Hz, 1H), 1.92 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 1.71 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 1.42-1.38 (m, 1H), 1.27-1.07 (m, 5H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	491
37	12.04 (s, 1H), 9.21 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.91 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.74 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.48 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 7.31 (t, $J = 9.0, 7.0$ Hz, 1H), 7.22-7.11 (m, 3H), 6.95-6.90 (m, 2H), 6.25 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 2.81 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 2.60 (t, $J = 11.4$ Hz, 1H), 1.88 (d, $J = 9.6$ Hz, 2H), 1.71 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 1.42-1.38 (m, 1H), 1.28-1.07 (m, 5H), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	507
38	9.46 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.87 (td, $J = 9.2, 6.2$ Hz, 1H), 7.31 (m, 1H), 7.23 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.15 (dd, $J = 2.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.09-6.99 (m, 1H), 6.98-6.87 (m, 2H), 6.25 (dd, $J = 3.9, 2.7$ Hz, 1H), 2.82 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.59 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H),	509

	1.91 (d, $J = 11.4$ Hz, 2H), 1.71 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 1.39 (dt, $J = 13.1, 6.5$ Hz, 1H), 1.31-0.95 (m, 5H), 0.85 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	
39	9.64 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.98 (s, 2H), 7.73 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 7.35-7.23 (m, 3H), 7.14 (dd, $J = 20.4, 8.9$ Hz, 3H), 6.95 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 2.82 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.65-2.58 (m, 1H), 1.92 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H), 1.70 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 1.52 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 1.41-1.35 (m, 1H), 1.25-1.05 (m, 5H), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	525
40	12.05 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.00-7.95 (m, 2H), 7.58 (dd, $J = 10.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.35 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.16 (m, 1H), 6.97-6.92 (m, 2H), 6.26 (t, $J = 3.1$ Hz, 1H), 2.83 (d, $J = 1.2$ Hz, 2H), 2.64 (t, $J = 9.9$ Hz, 1H), 1.94 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 1.43-1.39 (m, 1H), 1.28-1.07 (m, 5H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	569
41	12.07 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.35 (t, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.93 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.88 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.25 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.17 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.99-6.96 (m, 2H), 6.26 (q, $J = 2.7$ Hz, 1H), 2.85 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J = 11.1$ Hz, 1H), 1.96 (d, $J = 11.1$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 9.9$ Hz, 2H), 1.53 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H), 1.48-1.38 (m, 1H), 1.28-1.03 (m, 5H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	516
42	12.05 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.87 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.39 (dd, $J = 9.0, 2.4$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J = 2.1$ Hz, 1H), 6.96-6.92 (m, 2H), 6.26-6.24 (m, 1H), 2.83 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 10.8$ Hz, 1H), 1.92 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 1.46-1.37 (m, 1H), 1.29-1.07 (m, 5H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H).	541
43	10.17 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.03 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.72 (dd, $J = 12.4, 2.4$ Hz, 1H), 7.46 (t, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.25-7.20 (m, 2H), 7.09 (s, 1H), 6.93 (dd, $J = 8.4, 2.1$ Hz, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.22 (t, $J = 3.0$ Hz, 1H), 2.84 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 11.2$ Hz, 1H), 1.97 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 1.54 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H), 1.46-1.37 (m, 1H), 1.30-1.00 (m, 5H), 0.86 (d, $J = 6.4$ Hz, 6H).	525
44	(400 MHz) 9.99 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 8.06 (d, $J = 42.8$ Hz, 2H), 7.70-7.43 (m, 2H), 7.30 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.05-6.83 (m, 2H), 6.27 (s, 1H), 2.64 (s, 4H), 1.90 (d, $J = 11.3$ Hz, 2H), 1.72 (d, $J = 11.8$ Hz, 2H), 1.56 (d, $J = 11.3$ Hz, 1H), 1.20 (m, 5H).	499
45	10.15 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.99-7.90 (m, 2H), 7.58-7.45 (m, 2H), 7.19 (s, 1H), 7.03 (t, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.88-6.79 (m, 2H), 6.13 (t, $J = 3.4$ Hz, 1H), 2.54 (s, 4H), 1.76 (s, 2H), 1.58 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 1.42 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H), 1.07 (m, 5H).	533
46	11.95 (s, 1H), 9.84 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H), 7.77 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.21-7.11 (m, 2H), 7.01 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.85-6.76 (m, 2H), 6.13 (t, $J = 3.3$ Hz, 1H), 2.50 (s, 4H), 1.76 (d, $J = 11.0$ Hz, 2H), 1.58 (d, $J = 10.5$ Hz, 2H), 1.42 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H), 1.06 (m, 5H).	499

### 实施例 5: 药理活性评价

#### 1. 基于 HeLa 细胞的 IDO1 抑制活性测试

##### 1.1 实验材料和主要仪器

HeLa 细胞株: ATCC, 离心机: Eppendorf (CHINA), 电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-924385-III): 上海新苗医疗器械制造有限公司, 乙酸 (冰醋酸): 南京化学试剂股份有限公司, 三氟乙酸: 上海凌峰化学试剂有限公司, 电子天平: Sartorius, 对二甲氨基苯甲醛 (CAS: 100-10-7): Aladdin, Recombinant

Human IFN- $\gamma$ (Catalog#AF-300-02): PEPROTECH.

### 1.2 实验方法

从ATCC购买的HeLa细胞保存在最低基础培养基(2 mM L-谷氨酰胺和调成含有1.5 g/L 碳酸氢钠、0.1 mM 非必需氨基酸、1 mM 丙酮酸钠和 10% 胎牛血清的 Earle 氏 BSS) 中。在 37°C 下将 HeLa 细胞保存在提供 5% CO<sub>2</sub> 的控湿培养箱中。

按  $5 \times 10^3$ /孔的密度将 HeLa 细胞接种在 96 孔培养板中, 并培养过夜。第二天, 将 IFN- $\gamma$  (终浓度 100 ng/mL) 和化合物的系列稀释液 (总体积 200  $\mu$ L 培养基) 加给细胞。温育 24 小时后将 140  $\mu$ L 上清液/孔移至新的 96 孔板中, 加入 10  $\mu$ L 6.1 mol/L 的三氯乙酸, 在恒温烘箱中 50°C 温育 30 min 以使产生的 N-甲酰基犬尿氨酸水解为犬尿氨酸。然后以 4000 rpm 将反应混合物离心 10 min 以去除沉淀物。将 100  $\mu$ L 上清液/孔移至另一 96 孔板中, 与等体积 2% (w/v) 对-二甲氨基苯甲醛的乙酸溶液混合。使用酶标仪在 480 nm 处检测吸光值, 所得结果利用 IC<sub>50</sub> 计算器计算。实验设 3 个复孔。

此外, 采用 MTT 法检测各组 HeLa 细胞的存活率, 目的是为了考察化合物是否是通过抑制 HeLa 细胞的增殖来抑制 IDO1 的活性。

具体操作: 于 96 孔板中每孔加入 20  $\mu$ L 4 mg/mL MTT 溶液, 放入细胞培养箱孵育 4 小时, 将 96 孔板进行离心, 小心吸去孔内液体, 每孔加入 200  $\mu$ L 二甲基亚砜, 放置在摇床上 300 r 振荡 10 min, 使紫色结晶物质充分溶解。最后, 在酶标仪 570 nm 处检测吸光值。

### 1.3 实验结果

实验结果 (表 1) 表明, 本发明的化合物对 IDO1 的活性具有显著的抑制作用。其中, 化合物 **27** 的活性最强 (IC<sub>50</sub>: 0.010 nM)。此外, MTT 检测结果表明, 各组 HeLa 细胞的存活率均保持在 90% 以上, 表明这些化合物不是通过抑制 HeLa 细胞的增殖来抑制 IDO1 的活性。

表 1. 本发明化合物对 IDO1 的抑制活性

化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)	化合物	IC <sub>50</sub> (M)
<b>1</b>	$5.97 \times 10^{-7}$	<b>17</b>	$13.08 \times 10^{-6}$	<b>33</b>	$4.20 \times 10^{-11}$
<b>2</b>	$8.26 \times 10^{-9}$	<b>18</b>	$>2.0 \times 10^{-5}$	<b>34</b>	$4.21 \times 10^{-11}$
<b>3</b>	$1.35 \times 10^{-7}$	<b>19</b>	$9.76 \times 10^{-10}$	<b>35</b>	$7.31 \times 10^{-11}$
<b>4</b>	$>2.0 \times 10^{-5}$	<b>20</b>	$1.81 \times 10^{-10}$	<b>36</b>	$3.12 \times 10^{-11}$
<b>5</b>	$1.29 \times 10^{-9}$	<b>21</b>	$1.49 \times 10^{-9}$	<b>37</b>	$4.65 \times 10^{-9}$
<b>6</b>	$1.78 \times 10^{-6}$	<b>22</b>	$1.05 \times 10^{-9}$	<b>38</b>	$4.26 \times 10^{-11}$
<b>7</b>	$2.42 \times 10^{-6}$	<b>23</b>	$7.96 \times 10^{-11}$	<b>39</b>	$1.60 \times 10^{-11}$
<b>8</b>	$3.47 \times 10^{-8}$	<b>24</b>	$1.05 \times 10^{-10}$	<b>40</b>	$2.71 \times 10^{-11}$
<b>9</b>	$3.16 \times 10^{-9}$	<b>25</b>	$5.94 \times 10^{-9}$	<b>41</b>	$2.82 \times 10^{-11}$
<b>10</b>	$8.04 \times 10^{-10}$	<b>26</b>	$1.37 \times 10^{-10}$	<b>42</b>	$1.01 \times 10^{-10}$
<b>11</b>	$7.08 \times 10^{-10}$	<b>27</b>	$1.0 \times 10^{-11}$	<b>43</b>	$1.0 \times 10^{-10}$
<b>12</b>	$1.86 \times 10^{-7}$	<b>28</b>	$4.77 \times 10^{-11}$	<b>44</b>	$3.50 \times 10^{-6}$
<b>13</b>	$1.16 \times 10^{-9}$	<b>29</b>	$1.07 \times 10^{-9}$	<b>45</b>	$1.72 \times 10^{-5}$
<b>14</b>	$3.12 \times 10^{-11}$	<b>30</b>	$1.0 \times 10^{-10}$	<b>46</b>	$4.70 \times 10^{-7}$
<b>15</b>	$6.40 \times 10^{-7}$	<b>31</b>	$1.09 \times 10^{-10}$	BMS-52*	$2.95 \times 10^{-8}$
<b>16</b>	$3.02 \times 10^{-7}$	<b>32</b>	$1.58 \times 10^{-10}$	/	/

\*阳性对照: BMS-52 是 WO2015031295A1 中的第 52 号化合物。

## 2. 本发明化合物对 IDO1 蛋白表达的影响

本实验的目的是为了考察本发明化合物是否通过下调 IDO1 蛋白的表达来抑制 IDO1 的活性。使用免疫印迹方法检测了化合物对 IDO1 蛋白表达的影响。

### 2.1 实验方法

将 HeLa 细胞以  $2 \times 10^5$  每孔的密度种于 6 孔板培养，于  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 12 h。空白对照（只加培养基），模型组（加入 IFN- $\gamma$ 、对应阳性药），药物处理组（加入 IFN- $\gamma$ 、对应化合物），于  $37^\circ\text{C}$ ，5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h，收集细胞，Western blot 检测 IDO1 表达。

### 2.2 实验结果

实验结果（图 1）表明，本发明的化合物不会影响 IDO1 蛋白的表达，同时灰度扫描结果也显示加药组的 IDO1 蛋白/Actin 蛋白比值与对照组相比没有变化。说明本发明化合物不是通过下调 IDO1 蛋白的表达来抑制 IDO1 的活性。

## 3. 本发明化合物对 T 淋巴细胞增殖和 IFN- $\gamma$ 释放的影响

T 淋巴细胞是人体内免疫系统的核心执行者，在肿瘤免疫应答中起核心作用。IDO1 过度表达造成的局部色氨酸耗竭和犬尿氨酸聚积会抑制 T 淋巴细胞的增殖和诱导其凋亡，同时还能促进初始 T 淋巴细胞向调节性 T 淋巴细胞分化，抑制细胞因子如 IFN- $\gamma$ 、IL-2 和 TNF- $\alpha$  等分泌。本实验的目的是检测本发明化合物逆转 IDO1 介导的免疫抑制的能力。

### 3.1 实验方法

**B16F1 细胞处理：**吸去培养基（高糖 DMEM，10% FBS），PBS 洗 1-2 次。加入 0.25% 胰酶消化。吸去胰酶，加入培养基，将细胞吹打下来，转移至 1.5 mL 离心管中，离心，吸去上清，加入 1 mL DMEM 培养基重新悬浮细胞。加入丝裂霉素 C（终浓度  $25 \mu\text{g/mL}$ ），吹打混匀， $37^\circ\text{C}$ ，水浴 30 min，RP1640 洗 3 次，细胞计数，待用。

**脾脏细胞的制备：**取 C57/BL6 小鼠，摘眼球放血处死，无菌取出脾脏放入含有 2 mL 无菌的预冷 RPMI 1640 培养基的 35 mm 的培养皿中，用 5 mL 注射器针芯轻轻将脾细胞挤出。再加入 2 mL 培养基，用 5 mL 移液管反复吹打直至悬液均匀。将细胞悬液用  $70 \mu\text{m}$  滤器过滤， $300 \text{g}$  离心 5 min ( $4^\circ\text{C}$ )。弃上清后脾细胞加入 10 mL Tris- $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，吹均，静置 2-3 min， $300 \text{g}$  离心 5 min ( $4^\circ\text{C}$ )，去除红细胞。弃上清后，用 PRMI 1640 洗涤两次，待用。

1) 将处理过的 B16F1 细胞  $2 \times 10^4$  个/孔（刺激细胞），脾脏淋巴细胞  $1 \times 10^6$  个/孔（反应细胞），加入 96 孔板，加入 RP1640（10% FBS），补齐至 200  $\mu\text{L}$ 。

2) 分组：给药组（刺激细胞+反应细胞+对应化合物），空白对照（只加反应细胞），模型组（刺激细胞+反应细胞），除空白对照外，其他组均加入 ConA（终浓度  $5 \mu\text{g/mL}$ ），置于  $37^\circ\text{C}$ 、湿度 95%、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养，培养 48 h。

3) 加入 20  $\mu\text{L}$  MTT（终浓度  $4 \text{mg/mL}$ ）培养箱中继续培养 4 h，酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度值；计算 T 淋巴细胞增殖率：

$$\text{T 细胞增殖率}(\%) = \frac{[\text{给药孔}(\text{T 细胞} + \text{B16F1 细胞} + \text{化合物})\text{OD 值} - \text{对照孔}(\text{T 细胞} + \text{B16F1 细胞})\text{OD 值}]}{\text{对照孔}(\text{T 细胞} + \text{B16F1 细胞})\text{OD 值}} \times 100\%$$

### 3.2 实验结果

实验结果表明，在混合淋巴细胞体系中，B16F1 细胞高表达 IDO1，对 T 淋巴细胞的增殖能够产生抑制作用。当加入化合物 2、14、26、27、39（3 倍  $\text{IC}_{50}$  浓度）培养 48 h 后，利用 MTT 检测 T 淋巴细



胞的增殖，这些化合物均能显著增加 T 淋巴细胞的增殖，增殖率达到 139.8%~173.0%，而且这些化合物还能提高细胞因子 IFN- $\gamma$  的释放（提高率：125.8%~134.5%）。这些实验说明本发明化合物能够有效逆转 IDO1 介导的免疫抑制，从而增强 T 淋巴细胞的增殖能力，促进 IFN- $\gamma$  的分泌，提高 T 细胞的免疫功能。

#### 4. 本发明化合物对调节性 T 淋巴细胞的影响

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T 淋巴细胞是一类重要的调节性 T 淋巴细胞，在人体免疫系统中起重要的负性调节作用。研究表明，IDO1 能够介导初始 T 细胞向调节性 T 淋巴细胞转化，导致肿瘤微环境中调节性 T 淋巴细胞比例增高，从而诱导形成免疫抑制的肿瘤微环境。为此，我们选择高表达 IDO1 的小鼠黑色素瘤 B16F1 细胞株，对其加化合物处理后，取其上清与小鼠脾脏细胞进行共培养，模拟肿瘤微环境。收集细胞后使用流式细胞仪检测在共培养体系中化合物对初始 T 细胞向调节性 T 细胞分化的影响。

##### 4.1 实验方法

将处理过的 B16F1 细胞（ $8 \times 10^4$  个/孔），脾脏淋巴细胞（ $10^6$  个/孔，使用 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 ConA 刺激）加入 24 孔板中，加入对应浓度的化合物后置于 37°C、湿度 95%、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 48 h；收集上清液测试 ELISA，使用抗 CD4、抗 CD25、抗 Foxp3 抗体染色，在流式细胞仪中检测 T 细胞的分化。

##### 4.2 实验结果

实验结果表明，当初始 T 淋巴细胞与黑色素瘤 B16F1 细胞株共培养时，调节性 T 淋巴细胞的数量和仅含初始 T 淋巴细胞的实验组（3.2%）相比上升了 4 倍（12.7%）。当化合物 2、14、26、27、39（3 倍 IC<sub>50</sub> 浓度）加入体系中后能够显著逆转这种效应，其将调节性 T 淋巴细胞比例分别下调至 7.8%、5.3%、6.2%、4.7% 和 4.5%，说明本发明化合物能够通过抑制 IDO1 的活性逆转初始 T 淋巴细胞向调节性 T 淋巴细胞的分化。

#### 5. 本发明化合物体内药效学评价

颗粒酶 B 是常见于细胞毒性 T 淋巴细胞（CTL）和天然杀伤（NK）细胞颗粒中的丝氨酸蛋白酶，是 CTL 和 NK 细胞发挥细胞毒的主要效应因子。而增殖细胞核抗原（PCNA）则是真核细胞 DNA 合成所必需的一种核蛋白，检测 PCNA 可以客观评价肿瘤细胞的增殖状态。为此，在开展体内药效学评价过程中，利用免疫组化和 TUNEL 分析检测肿瘤组织中的颗粒酶 B、IFN- $\gamma$  和 PCNA 水平。

##### 5.1 实验方法

小鼠的培养：选择 7~8 周的雌鼠，在 SPF 级动物饲养室饲养一周，每只小鼠体重大约在 18~20 g。

肿瘤细胞的处理：分别采集处于对数生长期的 CT26、B16F1、PAN02 细胞，180 g 离心 5 min（4°C），使用预冷的 PBS 洗 2 次，吹打均匀，终细胞浓度为  $1 \times 10^7/\text{mL}$ ，冰浴备用。

肿瘤细胞的移植：分别将 CT26、B16F1、PAN02 细胞悬浮液接种至小鼠右侧腋窝皮下，接种的肿瘤细胞数为  $1 \times 10^6$ /只。每两天使用游标卡尺测量小鼠肿瘤大小一次，称小鼠体重一次。肿瘤的体积按照以下公式计算： $V$ （体积）=  $A \times B^2 / 2$ ，其中 A 是肿瘤长边的长度，B 是肿瘤短边的长度。当肿瘤体积均值达到  $40 \text{ mm}^3$  左右时，开始给药。

当肿瘤体积达到一定大小后，结束动物实验。称量小鼠体重，对其进行眼球取血，并对小鼠实施安乐死，剥取肿瘤组织，对肿瘤组织进行称重并拍照。同时，将部分组织置于 10% 中性固定液中，送样进行石蜡包埋组织、制作石蜡组织切片，并开展 H&E 染色、TUNEL 和免疫组化分析。实验操作参考检测试剂盒说明书。

### 5.1.1 B16F1 黑色素瘤小鼠移植瘤模型

移植 B16F1 黑色素瘤的 C57BL/6 雌鼠分为 5 组, 每组 6 只。模型组(PBS + 2%的吐温 20 + 2% DMSO, i.p., qd.), 阳性对照组(顺铂, 剂量: 1 mg/kg, i.p., qod.), 给药组 1-3 (实施例化合物 2, 剂量: 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg, i.p., qd.)。

### 5.1.2 CT26 结直肠癌 BALB/c 小鼠移植瘤模型

移植 CT26 结直肠肿瘤的 BALB/c 雌鼠分为 5 组, 每组 8 只。模型组(PBS + 2%的吐温 20 + 2% DMSO, i.p., qd.), 阳性对照组(5-FU, 剂量: 25 mg/kg, i.p., qod.), 给药组(实施例化合物 2, 剂量: 5 mg/kg, i.p., qd.)。

### 5.1.3 CT26 结直肠癌裸鼠移植瘤模型

为了验证本发明化合物是否是通过免疫系统发挥抗肿瘤作用, 在免疫系统缺陷的小鼠上构建了 CT26 结肠癌移植瘤模型。

移植 CT26 结直肠肿瘤的 BALB/c (nu/nu) 裸鼠分为 3 组, 每组 8 只。模型组(PBS + 2%的吐温 20 + 2% DMSO, i.p., qd.), 阳性对照组(5-FU, 剂量: 25 mg/kg, i.p., qod.), 给药组(实施例化合物 2, 剂量: 10 mg/kg, i.p., qd.)。

### 5.1.4 PAN02 胰腺癌小鼠移植瘤模型

移植 PAN02 胰腺癌的 C57BL/6 雌鼠分为 4 组, 每组 6 只。模型组(PBS + 2%的吐温 20 + 2% DMSO, i.g., qd.), 阳性对照组 1 (吉西他滨, 剂量: 30 mg/kg, i.p., qod.), 阳性对照组 2 (Epacadostat, 剂量: 50 mg/kg, i.g., bid.), 给药组(实施例化合物 9, 剂量: 15 mg/kg, i.g., qd.)。

## 5.2 实验结果

### 5.2.1 本发明化合物呈剂量依赖性抑制 B16F1 黑色素瘤小鼠移植瘤的生长

实验结果(图 2)表明, 随着给药剂量的升高, 化合物 2 对 B16F1 黑色素瘤小鼠移植瘤的抑制效果也随之增加, 显示剂量依赖性。所有给药组小鼠体重保持在 20-23 g 之间, 说明化合物 2 并不影响小鼠的体重。免疫组化和 TUNEL 实验表明, 化合物 2 (5 mg/kg) 可以增加 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润, 减少 Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞的数量, 促进颗粒酶 B 和 IFN- $\gamma$  的分泌, 并且增加肿瘤细胞的凋亡。

### 5.2.2 本发明化合物能够显著抑制 CT26 结直肠癌 BALB/c 小鼠移植瘤的生长

实验结果(图 3)表明, 实施例化合物 2 能够显著抑制 CT26 结直肠癌 BALB/c 小鼠移植瘤的生长, 并且小鼠的肝脏未见明显的纤维化和炎症表现, 其余脏器如心脏、肾脏、脾脏和肺的形态结构也没有发生明显改变, 说明这些化合物对小鼠各器官没有出现显著的药物性损伤影响。此外, 与模型组相比, 5-FU 组的小鼠体重自第 9 天后开始下降, 而化合物 2 的给药组小鼠的体重保持稳定, 说明化合物 2 并不影响小鼠的体重。

免疫组化和 TUNEL 实验结果表明, 化合物 2 可以增加 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润, 提高肿瘤组织中 IFN- $\gamma$  的表达, 同时能够减少 Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞群的数量, 并且还可以显著促进颗粒酶 B 的分泌, 降低 PCNA 蛋白的表达, 进一步增加肿瘤细胞的凋亡。

### 5.2.3 本发明化合物对免疫系统缺陷的裸鼠移植瘤不产生抑制

实验结果(图 4)表明, 细胞毒药物 5-FU 能够明显抑制 CT26 结直肠癌裸鼠移植瘤的生长, 然而, 实施例化合物 2 却对免疫系统缺陷的裸鼠移植瘤不产生抑制作用。说明化合物 2 是通过免疫系统发挥抗肿瘤作用。

#### 5.2.4 本发明化合物能够显著抑制 PAN02 胰腺癌小鼠移植瘤的生长

实验结果（图 5）表明，相比于模型组，化合物 9 在 PAN02 胰腺癌小鼠移植瘤模型中能够显著抑制肿瘤的生长。免疫组化和 TUNEL 实验表明，化合物 9 能有效逆转 IDO1 介导的免疫抑制现象。

需要指出的是，本发明中的其他化合物在多种肿瘤类型如 CT26、EMT6、B16F1、PAN02 和 LLC 等小鼠移植瘤模型中同样表现出显著的抗肿瘤作用。例如，化合物 20、23、24、26、27、28、30、31、33、34、35、36、38、39、40 和 41 等在低剂量下（2.5 mg/kg~15 mg/kg）便能显著抑制小鼠移植瘤的生长。此外，对肿瘤组织的免疫组化和 TUNEL 实验结果表明，这些化合物同样能够增加 CD8<sup>+</sup> T 细胞浸润，促进颗粒酶 B 的分泌，提高肿瘤组织中 IFN- $\gamma$  的表达，同时还能够减少 Foxp3<sup>+</sup> Treg 细胞群的数量，降低 PCNA 蛋白的表达。这些实验表明本发明化合物能够有效逆转 IDO1 介导的免疫抑制作用。

### 6. 本发明化合物与 IDO1 蛋白的相互作用

#### 6.1 实验方法

1) 细胞热迁移实验 (CETSA)：其原理是随着温度的升高，蛋白质的三级结构会受到影响进而逐渐降解，但当小分子与蛋白结合后，则可以增加蛋白质的热稳定性，减缓降解趋势。

具体操作：B16F1 细胞加入 IFN- $\gamma$  (终浓度 100 ng/mL) 刺激 24 h 之后平均分成 2 组：对照组和化合物处理组。加入化合物 2 和 27，确保终浓度为 1  $\mu$ M，对照组加入等体积的 DMSO，3 h 后收集细胞，用 PBS 洗两遍，500  $\mu$ L PBS 重悬细胞，将其平均分为 10 份置于进口 PCR 管中。将 PCR 仪器设置 10 个温度（43、46、49、52、55、58、61、64、67、70 $^{\circ}$ C），将对照组与实验组的每个样品按照对应温度进行加热：每组加热 3 min 后室温放置 3 min，然后置于冰上。最后，将样品放置在 -80 $^{\circ}$ C 过夜，第二天取出，置室温融化后利用液氮反复冻融 3 次。将处理好的样本转移到 1.5 mL EP 管中，12000 g，20 min 离心，取上清 40  $\mu$ L 加入 6 $\times$ loading 混匀，然后进行免疫印迹分析。

2) 微量热泳动 (MST)：该技术是基于分子在温度梯度中的定向运动而引起分子性质的变化，如分子大小、电荷和水化层及构象等。MST 是一种新型的测量分子间相互作用的技术，可以测量不同的结合模式，包括二聚化、协同作用和竞争作用。该技术适应性强，可用于不同的环境、不同的生物分子和不同的溶液，可以在复杂的生物溶液甚至细胞溶解液中完成而无需样品纯化。

具体操作：将 IDO 蛋白进行荧光标记，进行正式操作前先测量一定稀释倍数下蛋白的荧光值，以观察是否存在吸附等问题。随后，将待测化合物 2 的 27 设置 16 个不同浓度梯度，并在进口 PCR 管中用蛋白 Buffer 配好，每管体积为 10  $\mu$ L。向 PCR 管中加入稀释后的蛋白，总体积 20  $\mu$ L。用毛细管吸取 10  $\mu$ L 上机检测并分析数据。

#### 6.2 实验结果

CETSA 实验结果表明，对照组（仅含 DMSO）的 IDO1 蛋白在 58 $^{\circ}$ C 就已经完全降解，而与对照组相比，本发明化合物 2 和 27 在 61 $^{\circ}$ C 高温下依然能维持 IDO1 蛋白的稳定性，使其不易被降解。说明化合物 2 和 27 能够进入 B16F1 细胞，并与 IDO1 蛋白结合。

MST 实验结果显示，本发明化合物 2 和 27 与 IDO1 蛋白的解离常数  $K_D$  分别为  $3.9 \times 10^{-8}$  M 和  $1.3 \times 10^{-10}$  M，说明化合物 2 和 27 与 IDO1 蛋白之间的亲和力很强，并且能够对 IDO1 有极强的选择结合力。

### 7. 本发明化合物与 IDO1 蛋白的结合方式

早期研发的 IDO1 抑制剂主要是通过通过与含血红素的 IDO1 (holo-IDO1) 结合来抑制 IDO1 的活性。以 Epacadostat 为代表的 holo-IDO1 抑制剂主要通过通过与血红素铁离子络合而占据 IDO1 催化口袋，从而产

生抑制活性。本实验的目的是为了验证本发明化合物与 IDO1 蛋白的结合方式。

### 7.1 实验方法

1) 不同温度下酶学实验: 研究表明, IDO1 蛋白的稳定性会随着温度的变化而变化。在 25°C 时, 血红素与 IDO1 蛋白的结合比较牢固, 此时当其与 apo-IDO1 抑制剂共孵育时, 抑制剂无法将血红素挤出 IDO1 蛋白的结合口袋。而当温度升高至 37°C 时, 血红素与 IDO1 蛋白结合的稳定性会降低, 此时血红素就易被 apo-IDO1 抑制剂挤出 IDO1 的结合口袋。然而, holo-IDO1 抑制剂如 Epacadostat 无论在什么温度下都能通过与铁离子络合稳定血红素与 IDO1 蛋白的结合。因此可以利用不同温度下酶学实验检测抑制剂与 IDO1 的结合方式 (Ortizmeoz RF, *et al. bioRxiv*, 2018)。

具体操作: 将不同浓度的受试物和 IDO1 蛋白分为两组, 混匀加入 EP 管中, 分别在 25°C 和 37°C 预孵育 2 h, 加入过氧化氢酶溶液、亚甲基蓝溶液、TritonX-100 溶液、VCNa 溶液, 在 37°C 下孵育 15 min。加入 D-Trp 溶液, 反应总体系为 250  $\mu$ L, 继续孵育 60 min, 按照 1.2 检测方法进行检测。

2) X 射线衍射实验: 为了培养本发明化合物与 IDO1 蛋白结合的复合物晶体, 在 50 mM Tris buffer, pH 7.4 的条件下, 用 42°C 的水浴孵育化合物 **39** 和 hIDO1, 持续 2 h。15000 rpm 离心 5 min 后, 将上清用 96 孔的 sitting-drop trays 进行坐滴, 再加上结晶溶液后进行晶体生长, 获得 **39**/hIDO1 复合物晶体后在上海光源 BL19U 线站采集 X 射线衍射的数据。

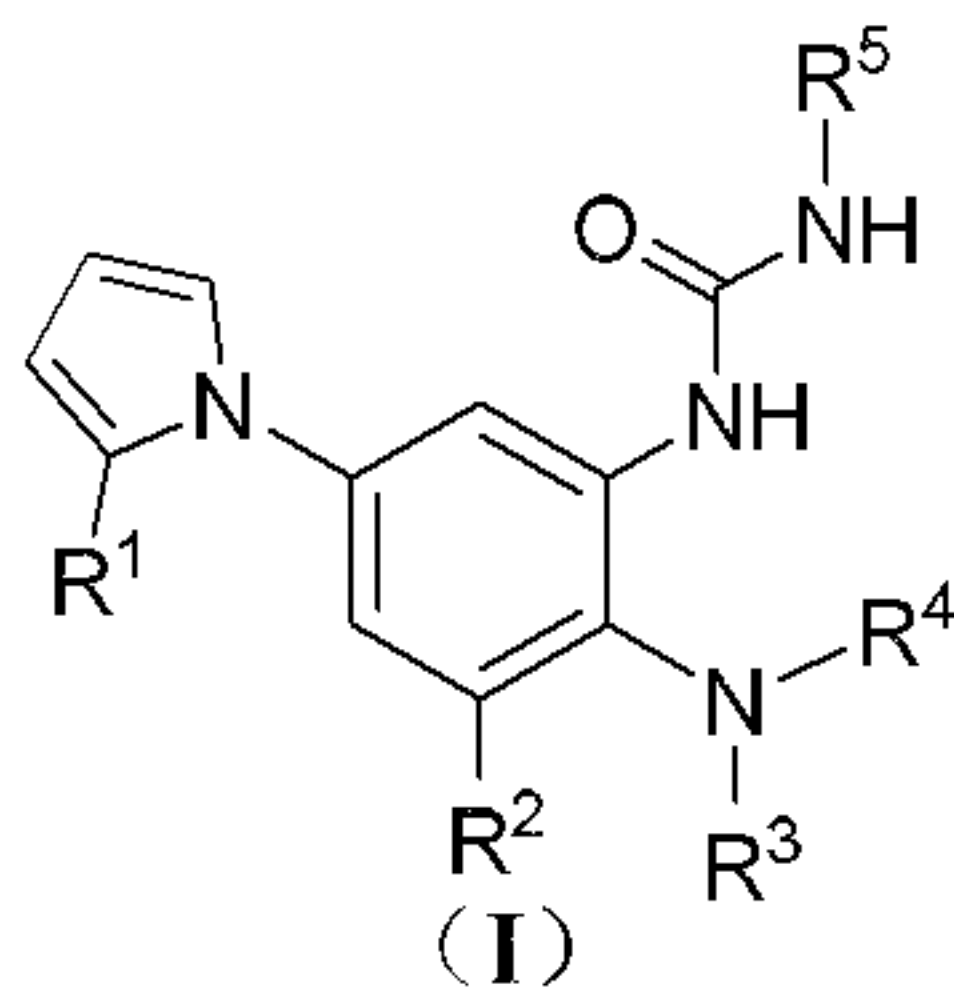
### 7.2 实验结果

酶学实验结果表明, 无论是在 25°C 还是 37°C 下, Epacadostat 都能与含有血红素的 IDO1 结合, 因此在两种不同温度下对 IDO1 都具有较强的抑制活性 (图 6A)。然而, 在 25°C 下, 实施例化合物 **26** 和 **39** 对 IDO1 的抑制作用很弱, 只有在 37°C 时才显示出极强的抑制活性 (图 6B 和图 6C)。表明本发明化合物主要是通过与血红素竞争性结合 IDO1 蛋白而抑制其活性。

进一步地, 通过晶体培养获得了实施例化合物 **39** 与 IDO1 蛋白复合物晶体, 经 X 射线衍射结果显示, 实施例化合物 **39** 能够与 apo-IDO1 蛋白结合, 这进一步证实了本发明化合物是一类 apo-IDO1 抑制剂。

# 权利要求书

1. 一种通式 (I) 所示的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐：



其中：

$R^1$  代表氰基、 $-CO_2R^6$  或  $-CONR^7R^8$ ；

$R^2$  代表氢、卤素、氰基、羟基或硝基；

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  环烷基、 $C_2-C_8$  烯基、 $C_2-C_8$  炔基、 $C_1-C_8$  烷氨基或  $R^3$  和  $R^4$  与跟它们连接的氮原子一起形成 5-7 元杂环；其中所述的杂环可任选地包含一个或多个选自 O、S 或 N 杂原子；其中所述的杂环上可任选地被一个或多个以下基团取代：卤素、硝基、氰基、羟基、氨基、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_1-C_8$  烷氧基或  $C_3-C_6$  环烷基；

$R^5$  代表芳基或芳杂环，其中所述的芳基或芳杂环可任选地被一个或多个  $R^9$  取代；

$R^6$ 、 $R^7$  和  $R^8$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  环烷基、 $C_2-C_8$  烯基、 $C_2-C_8$  炔基、 $C_1-C_8$  烷氨基；

$R^9$  代表氢、卤素、氰基、羟基、巯基、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_1-C_8$  烷氧基、 $C_1-C_8$  烷氨基或卤代烷基。

2. 根据权利要求 1 所述的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐，其特征在于：

$R^1$  代表氰基、 $-CO_2R^6$  或  $-CONR^7R^8$ ；

$R^2$  代表氢或卤素；

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_3-C_8$  环烷基、 $C_1-C_8$  烷氨基或  $R^3$  和  $R^4$  与跟它们连接的氮原子一起形成 5-7 元杂环；其中所述的杂环可任选地包含一个或多个选自 O、S 或 N 杂原子；其中所述的杂环上可任选地被一个或多个以下基团取代： $C_1-C_8$  烷基或  $C_3-C_6$  环烷基；

$R^5$  代表芳基或芳杂环，其中所述的芳基或芳杂环可任选地被一个或多个  $R^9$  取代；

$R^6$ 、 $R^7$  和  $R^8$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_8$  烷基或  $C_3-C_8$  环烷基；

$R^9$  代表氢、卤素、氰基、羟基、巯基、 $C_1-C_8$  烷基、 $C_1-C_8$  烷氧基、 $C_1-C_8$  烷氨基或卤代烷基。

3. 根据权利要求 1 所述的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐，其特征在于：

$R^1$  代表氰基、 $-CO_2R^6$  或  $-CONR^7R^8$ ；

$R^2$  代表氢或卤素；

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_4$  烷基、 $C_3-C_6$  环烷基、 $C_1-C_6$  烷氨基或  $R^3$  和  $R^4$  与跟它们连接的氮原子一起形成 5-7 元杂环；其中所述的杂环可任选地包含一个或多个选自 O、S 或 N 杂原子；其中所述的杂环上可任选地被一个或多个甲基取代；

$R^5$  代表苯环或异噁唑基，其中所述的苯环可任选地被一个或多个  $R^9$  取代；

$R^6$ 、 $R^7$  和  $R^8$  各自独立地代表氢、 $C_1-C_3$  烷基或  $C_3-C_6$  环烷基；

R<sup>9</sup>代表氢、卤素、氰基、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷氧基或三氟甲基。

4. 根据权利要求1所述的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐，其特征在于：

R<sup>1</sup>代表COOH；

R<sup>2</sup>代表氢或卤素；

R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>各自独立地代表C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基或C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>环烷基；

R<sup>5</sup>代表苯环，所述的苯环可任选地被一个或多个R<sup>9</sup>取代；

R<sup>9</sup>代表氢、卤素、氰基、C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷基或C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>烷氧基。

5. 根据权利要求1所述的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐，其特征在于，所述吡咯类化合物选自以下任一化合物：

1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸甲酯 (1) ，

1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (2) ，

1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酰胺 (3) ，

1-(2-((乙基)环己基氨基)-5-(2-氰基-1*H*-吡咯基-1)苯基)-3-(4-甲基苯基)脲 (4) ，

1-(3-(3-(4-氯苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (5) ，

1-(3-(3-(3-三氟甲基苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (6) ，

1-(3-(3-(4-氯-3-三氟甲基苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (7) ，

1-(3-(3-(3,4-二氯苯基)脲基)-4-((乙基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (8) ，

1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (9) ，

1-(3-(3-(4-氟苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (10) ，

1-(3-(3-(4-氯苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (11) ，

1-(3-(3-(4-三氟甲基苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (12) ，

1-(3-(3-(2,4-二氟苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (13) ，

1-(3-(3-(2-氟-4-氯苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (14) ，

1-(3-(3-(3-三氟甲基苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (15) ，

1-(3-(3-(4-氯-3-三氟甲基苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (16) ，

1-(3-(3-(3,4-二氯苯基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (17) ，

1-(3-(3-(3-甲基异噁唑-5-基)脲基)-4-(二异丁氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (18) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(4-甲基苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (19) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(4-甲氧基苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (20) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(4-氟苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (21) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(4-氯苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (22) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(4-溴苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (23) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(4-氰基苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (24) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(2-氯苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (25) ，

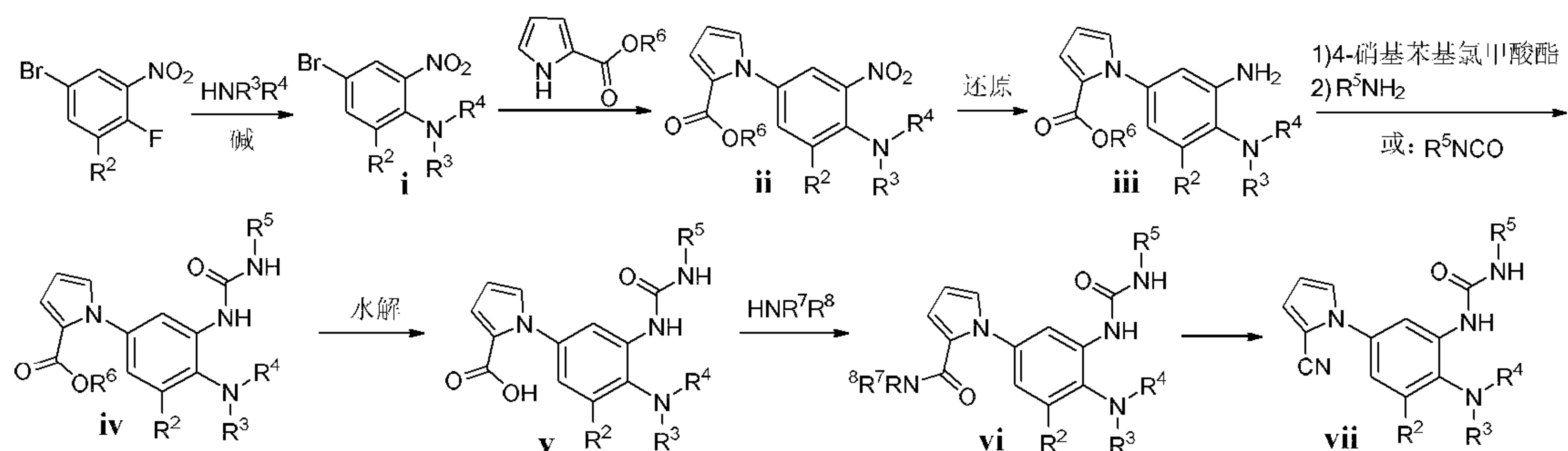
1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(2,4-二氟苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (26) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(2-氟-4-氯苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (27) ，

1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(2-氟-4-氰基苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (28),  
 1-(3-氯-4-(二异丁氨基)-5-(3-(3-氟-4-氯苯基)脲基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (29),  
 1-(3-(3-(4-甲基苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (30),  
 1-(3-(3-(4-甲氧基苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (31),  
 1-(3-(3-(4-氟苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (32),  
 1-(3-(3-(4-氯苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (33),  
 1-(3-(3-(4-溴苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (34),  
 1-(3-(3-(4-氰基苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (35),  
 1-(3-(3-(2-氟苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (36),  
 1-(3-(3-(2-氯苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (37),  
 1-(3-(3-(2,4-二氟苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (38),  
 1-(3-(3-(2-氟-4-氯苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (39),  
 1-(3-(3-(2-氟-4-溴苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (40),  
 1-(3-(3-(2-氟-4-氰基苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (41),  
 1-(3-(3-(2,4-二氯苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (42),  
 1-(3-(3-(3-氟-4-氯苯基)脲基)-4-((异丁基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (43),  
 1-(3-(3-(3-三氟甲基苯基)脲基)-4-((甲基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (44),  
 1-(3-(3-(4-氯-3-三氟甲基苯基)脲基)-4-((甲基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (45),  
 1-(3-(3-(3,4-二氯苯基)脲基)-4-((甲基)环己基氨基)苯基)-1*H*-吡咯-2-甲酸 (46)。

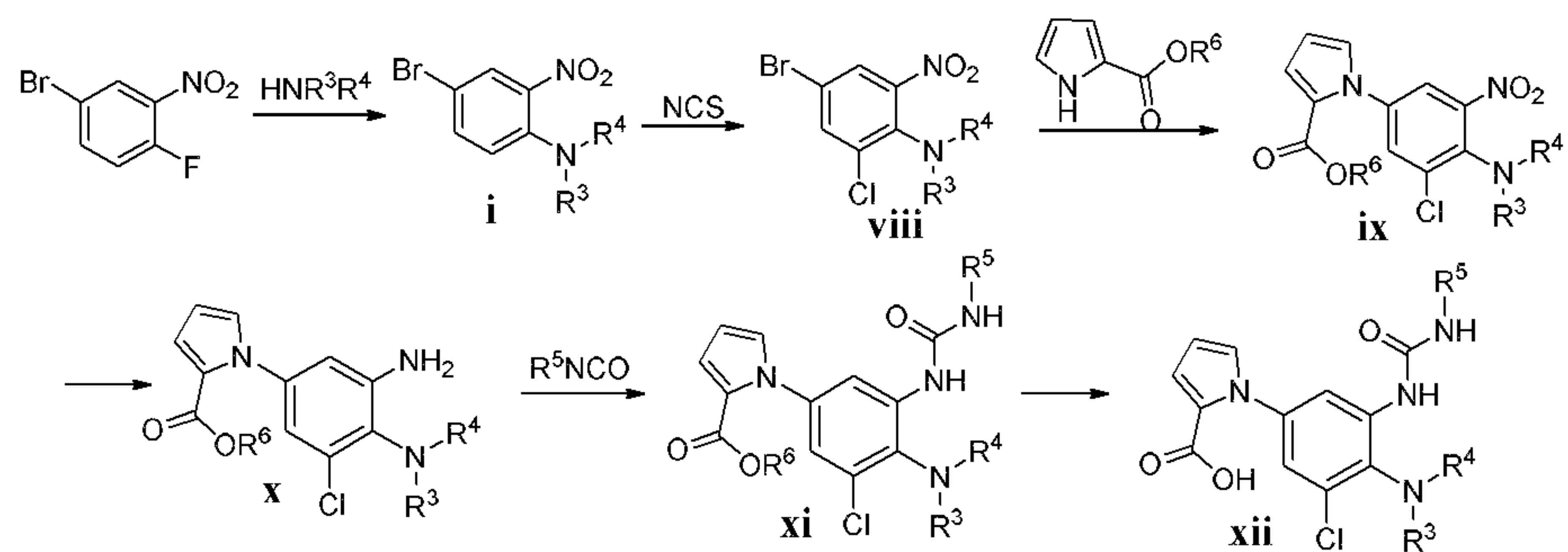
6. 一种权利要求 1 所述的吡咯类化合物的制备方法, 其特征在于, 所述制备方法为以下任一方法:

方法一: 以取代硝基苯为原料, 在碱作用下与胺类化合物  $\text{HNR}^3\text{R}^4$  反应制得中间体 **i**, **i** 与吡咯-2-羧酸酯经 Ullmann 反应制得中间体 **ii**, **ii** 经还原制得中间体 **iii**, **iii** 与取代苯异氰酸酯  $\text{R}^5\text{NCO}$  缩合制得化合物 **iv**, 或者 **iii** 先与氯甲酸-4-硝基苯酯形成活性中间体, 然后再与胺类化合物  $\text{R}^5\text{NH}_2$  反应制得目标化合物 **iv**; **iv** 经水解制得目标化合物 **v**; **v** 与草酰氯或氯化亚砷反应制成酰氯后再与胺类化合物  $\text{HNR}^7\text{R}^8$  反应制得目标化合物 **vi**; **vi** 经高温脱水制得目标化合物 **vii**;



其中,  $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$  和  $\text{R}^8$  的定义如权利要求 1 所述;

方法二: 以 2-氟-5-溴硝基苯为原料, 在碱作用下与胺类化合物  $\text{HNR}^3\text{R}^4$  反应制得中间体 **i**, **i** 经 NCS 氯代反应得到中间体 **viii**, **viii** 与吡咯-2-羧酸酯经 Ullmann 反应制得中间体 **ix**, **ix** 经还原剂还原制得中间体 **x**, **x** 与取代苯异氰酸酯  $\text{R}^5\text{NCO}$  缩合制得中间体 **xi**, **xi** 经水解制得目标化合物 **xii**;



其中， $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 和 $\text{R}^6$ 的定义如权利要求1所述。

7. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包括在治疗上有效量的活性组分和药学上可接受的辅料；所述的活性组分包括如权利要求1-5中任一项所述的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐。

8. 一种权利要求1-5中任一项所述的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐在制备吲哚胺2,3-双加氧酶1抑制剂药物中的应用。

9. 一种权利要求1-5中任一项所述的吡咯类化合物、其代谢产物、代谢前体、前药、溶剂化物、结晶或其药学上可接受的盐在制备治疗吲哚胺2,3-双加氧酶1介导的免疫抑制相关疾病药物中的用途。

10. 根据权利要求8或9所述的用途，其特征在于，所述药物用于治疗癌症、病毒感染、神经变性疾病、白内障、器官移植排斥、抑郁症或自身免疫性疾病。



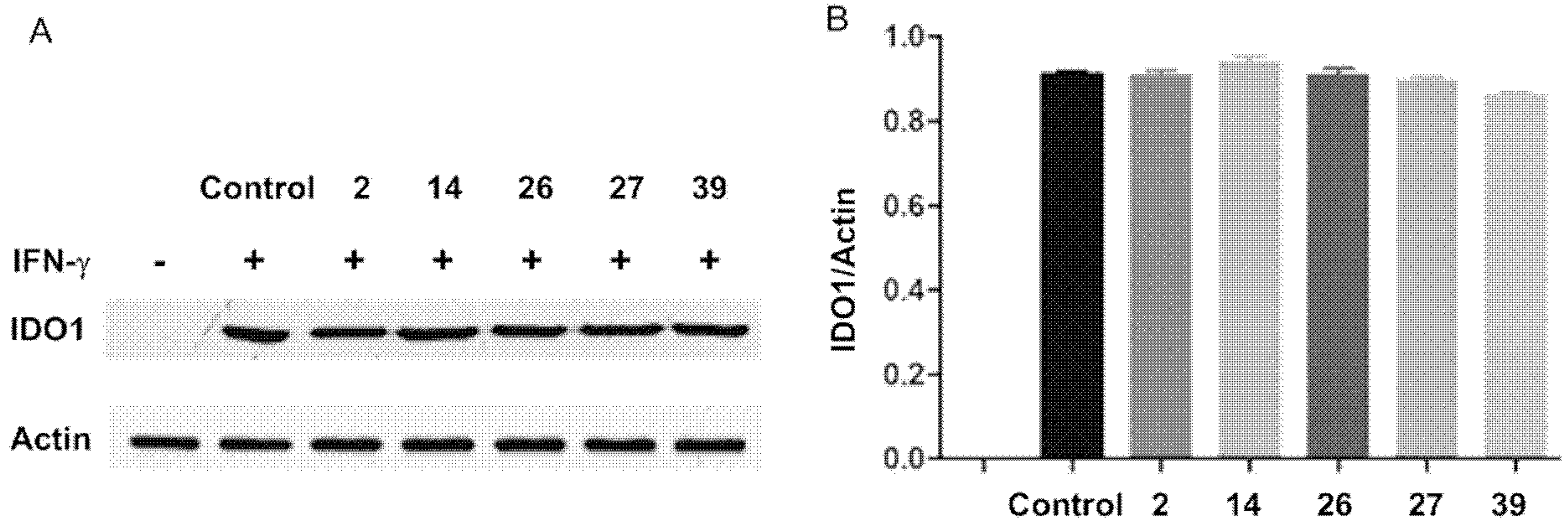


图 1

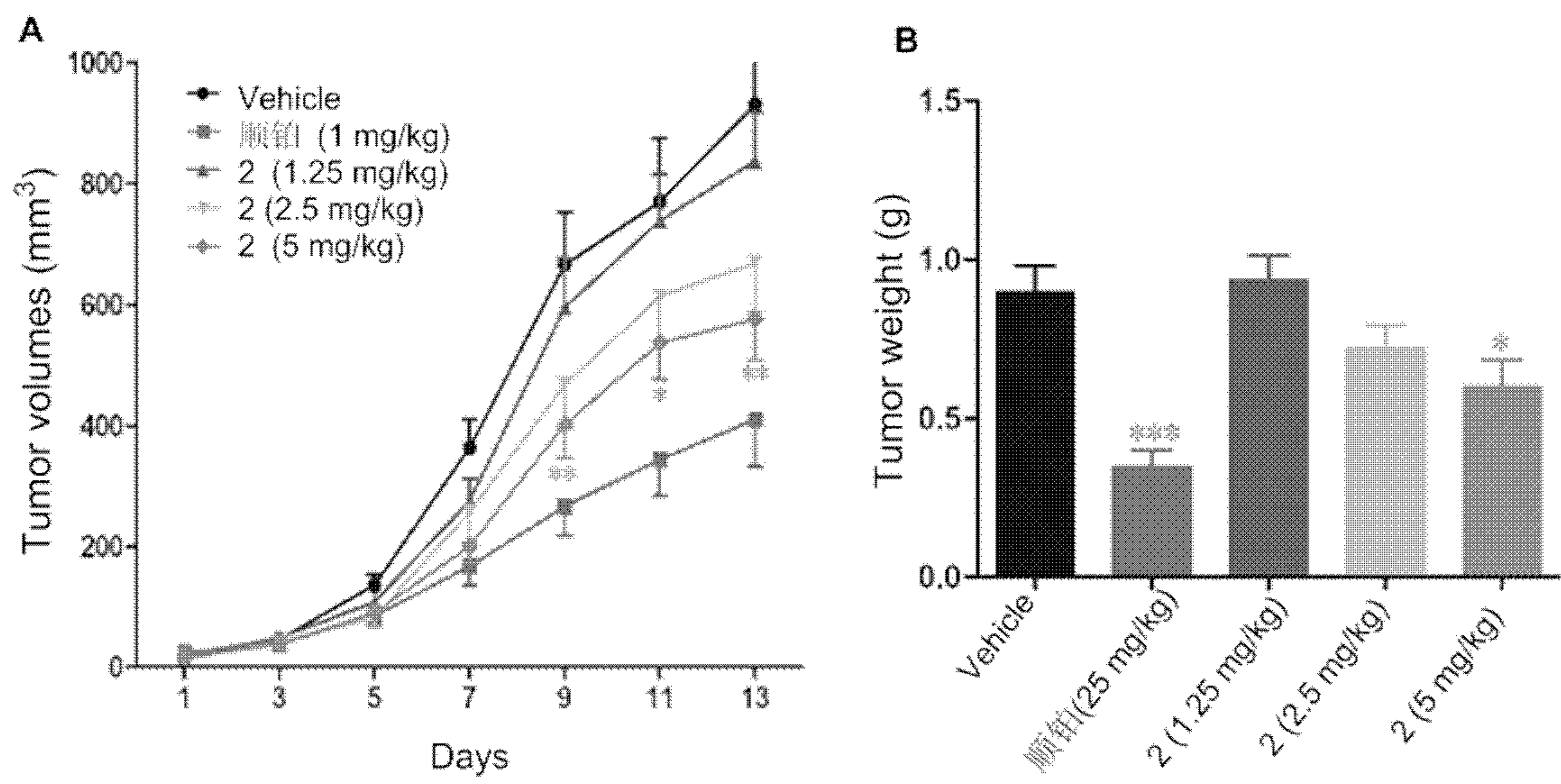


图 2

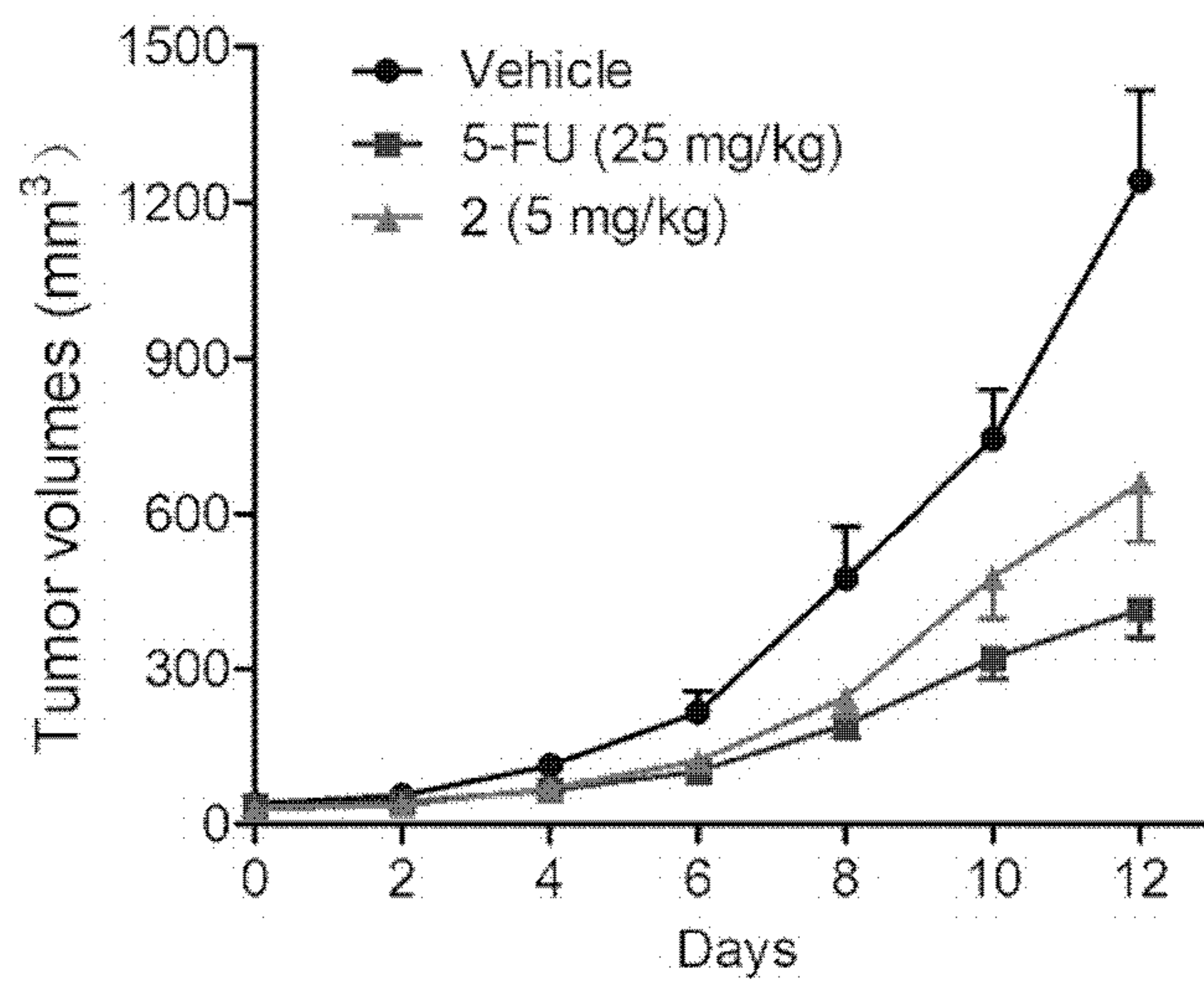


图 3

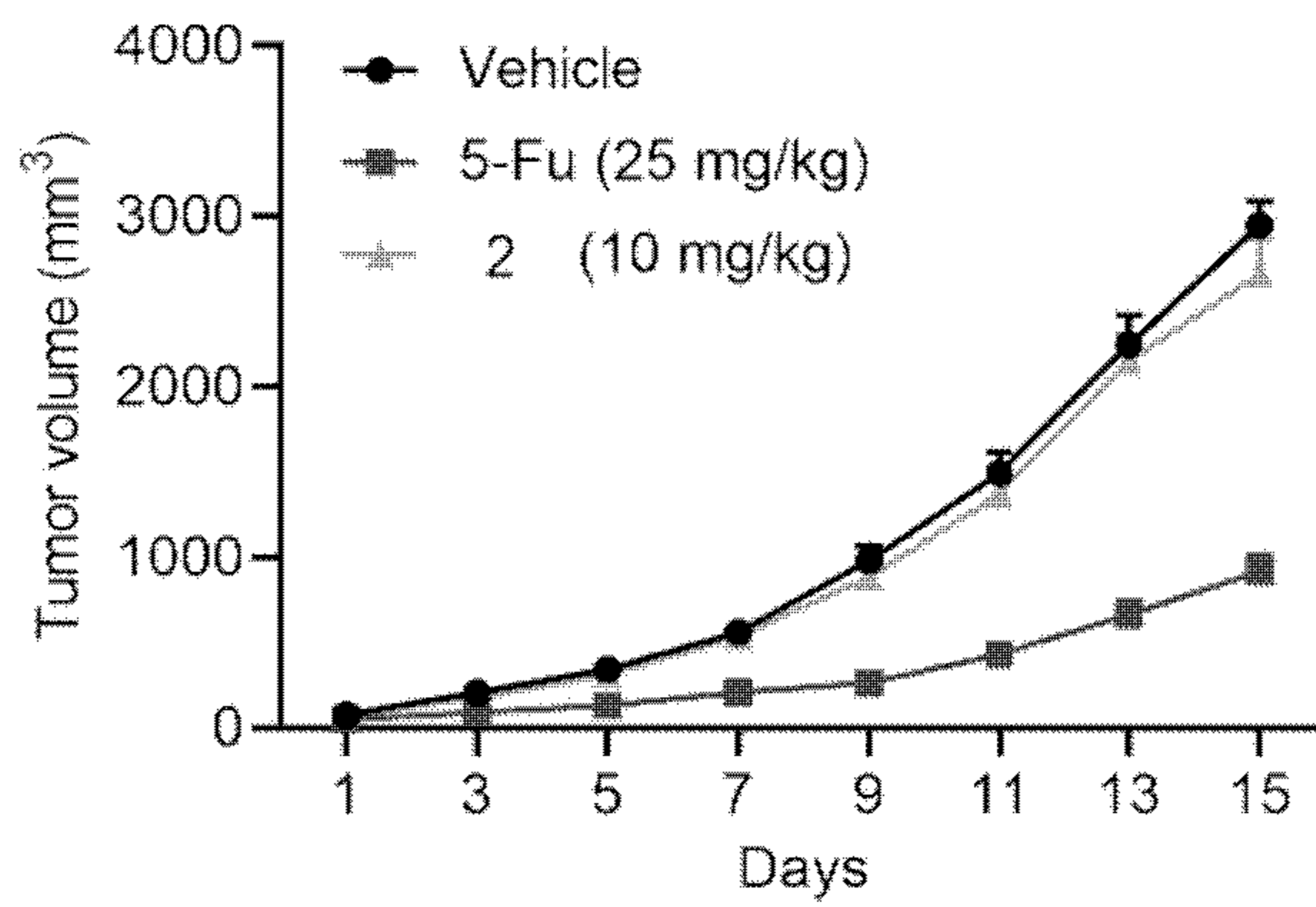


图 4

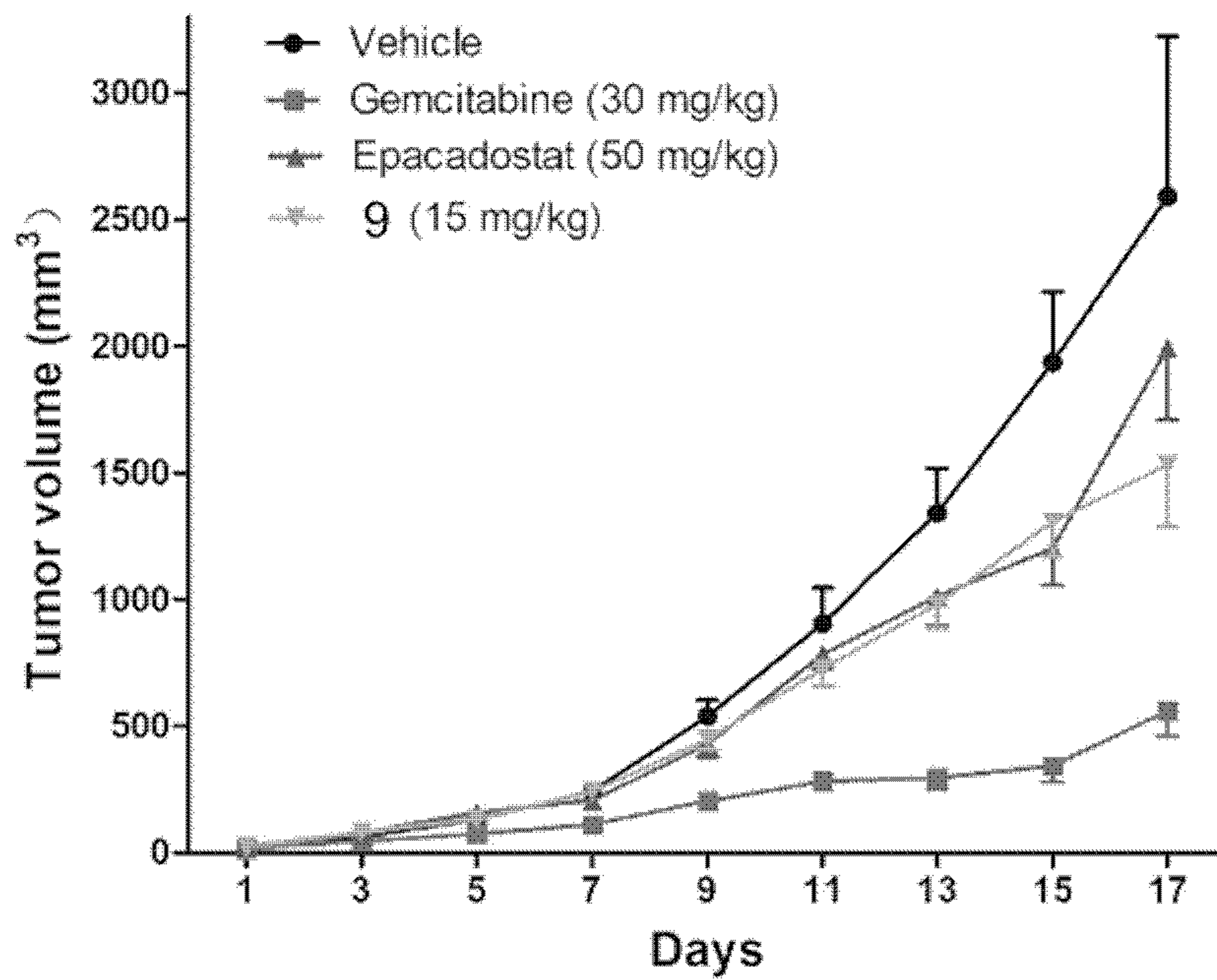


图 5

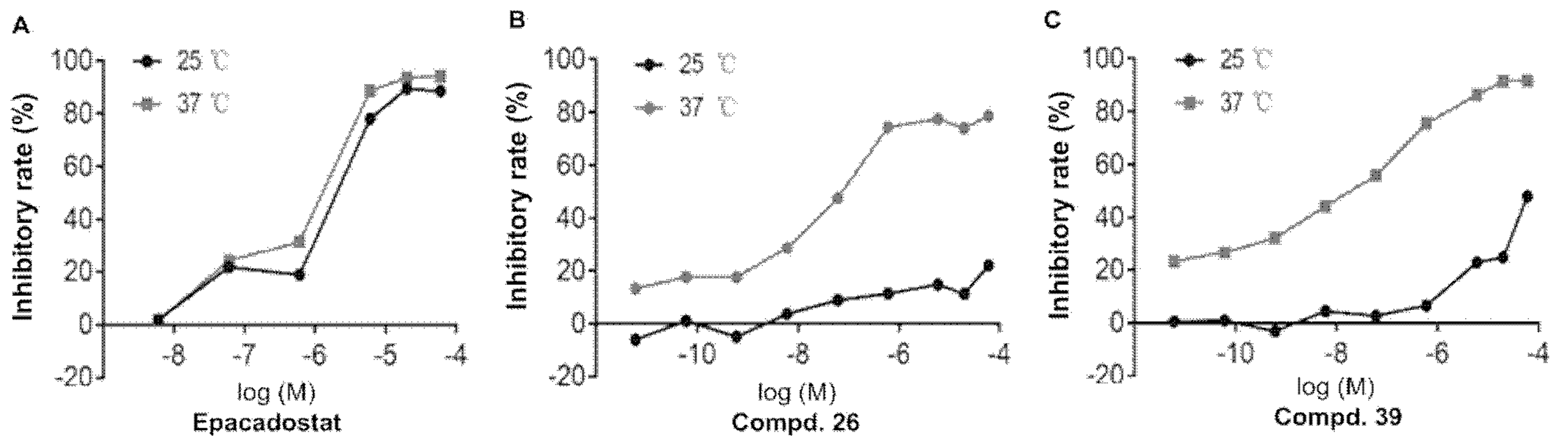


图 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/074874

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07D 207/34(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 31/402(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D; A61P; A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN, CNABS, CNTXT, CNKI, STN-REG, CAP, MAR, 万方: 吡啶胺 5D 双加氧酶, Indoleamine 2, 3-dioxygenase, IDO1, 中国药科大学, 赖宜生, 葛书山, 邹毅, 郑英博, 徐强, 脲 8d 苯 8d (氨 or 胺)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 111153846 A (CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY et al.) 15 May 2020 (2020-05-15) see claims 1-10	1-10
X	CN 105658643 B (SQUIBB BRISTOL MYERS CO.) 01 March 2019 (2019-03-01) see embodiment 40 and description page 254 line 7	1-10
A	CN 109071423 A (INVENTISBIO INC et al.) 21 December 2018 (2018-12-21) see entire document	1-10
A	YANG Xiaojun et al. "Design, synthesis and biological evaluation of 2, 5-dimethylfuran-3-carboxylic acid derivatives as potential IDO1 inhibitors" <i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry</i> , Vol. 27, 05 May 2019 (2019-05-05), pp. 1605-1618	1-10
A	CAI Shi et al. "Design, synthesis and biological evaluation of bicyclic carboxylic acid derivatives as IDO1 inhibitors" <i>Bioorganic Chemistry</i> , Vol. 94, 21 November 2019 (2019-11-21), p. 103356	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search <b>13 April 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>19 April 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China</b>		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/074874

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	叶科 等 (YE, Ke et al.). "吲哚胺 2, 3-双加氧酶-1及其抑制剂的研究进展 (Research Advances of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase-1 and Its Inhibitors)" <i>药学进展 (Progress in Pharmaceutical Sciences)</i> , Vol. 43, No. 7, 31 July 2019 (2019-07-31), pp. 483-503	1-10
.....		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2021/074874**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111153846	A	15 May 2020	None			
<hr/>							
CN	105658643	B	01 March 2019	MX	2016002075	A	26 May 2016
				US	9758492	B2	12 September 2017
				EP	3039020	A1	06 July 2016
				EA	201690306	A1	30 June 2016
				CN	105658643	A	08 June 2016
				EA	029981	B1	29 June 2018
				US	2016200674	A1	14 July 2016
				WO	2015031295	A1	05 March 2015
				JP	2016530283	A	29 September 2016
				JP	6371851	B2	08 August 2018
				CA	2921199	A1	05 March 2015
				EP	3039020	B1	19 July 2017
<hr/>							
CN	109071423	A	21 December 2018	WO	2017139414	A1	17 August 2017
				BR	112018015413	A2	18 December 2018
				RU	2018128334	A	10 March 2020
				CA	3012133	A1	17 August 2017
				EP	3414224	A4	25 September 2019
				US	2020046697	A1	13 February 2020
				KR	20180113557	A	16 October 2018
				EP	3414224	A1	19 December 2018
				AU	2017217536	A1	09 August 2018
				MX	2018009633	A	17 December 2018
				JP	2019510810	A	18 April 2019
<hr/>							

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/074874

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C07D 207/34(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61K 31/402(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																							
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07D; A61P; A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>VEN, CNABS, CNTXT, CNKI, STN-REG, CAP, MAR, 万方: 吲哚胺 5D 双加氧酶, Indoleamine 2, 3-dioxygenase, ID01, 中国药科大学, 赖宜生, 葛书山, 邹毅, 郑英博, 徐强, 脲 8d 苯 8d (氨 or 胺)</p>																							
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>CN 111153846 A (中国药科大学等) 2020年 5月 15日 (2020 - 05 - 15) 参见权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 105658643 B (百时美施贵宝公司) 2019年 3月 1日 (2019 - 03 - 01) 参见实施例40和说明书第254页第7行</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 109071423 A (益方生物科技上海有限公司等) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>YANG Xiaojun等. "Design, synthesis and biological evaluation of 2, 5-dimethylfuran-3-carboxylic acid derivatives as potential ID01 inhibitors" Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry, 第27卷, 2019年 5月 5日 (2019 - 05 - 05), 第1605-1618页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CAI Shi等. "Design, synthesis and biological evaluation of bicyclic carboxylic acid derivatives as ID01 inhibitors" Bioorganic Chemistry, 第94卷, 2019年 11月 21日 (2019 - 11 - 21), 第103356页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>叶科等. "吲哚胺 2, 3-双加氧酶-1及其抑制剂的研究进展" 药学进展, 第43卷, 第7期, 2019年 7月 31日 (2019 - 07 - 31), 第483-503页</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 111153846 A (中国药科大学等) 2020年 5月 15日 (2020 - 05 - 15) 参见权利要求1-10	1-10	X	CN 105658643 B (百时美施贵宝公司) 2019年 3月 1日 (2019 - 03 - 01) 参见实施例40和说明书第254页第7行	1-10	A	CN 109071423 A (益方生物科技上海有限公司等) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 参见全文	1-10	A	YANG Xiaojun等. "Design, synthesis and biological evaluation of 2, 5-dimethylfuran-3-carboxylic acid derivatives as potential ID01 inhibitors" Bioorganic & Medicinal Chemistry, 第27卷, 2019年 5月 5日 (2019 - 05 - 05), 第1605-1618页	1-10	A	CAI Shi等. "Design, synthesis and biological evaluation of bicyclic carboxylic acid derivatives as ID01 inhibitors" Bioorganic Chemistry, 第94卷, 2019年 11月 21日 (2019 - 11 - 21), 第103356页	1-10	A	叶科等. "吲哚胺 2, 3-双加氧酶-1及其抑制剂的研究进展" 药学进展, 第43卷, 第7期, 2019年 7月 31日 (2019 - 07 - 31), 第483-503页	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 111153846 A (中国药科大学等) 2020年 5月 15日 (2020 - 05 - 15) 参见权利要求1-10	1-10																					
X	CN 105658643 B (百时美施贵宝公司) 2019年 3月 1日 (2019 - 03 - 01) 参见实施例40和说明书第254页第7行	1-10																					
A	CN 109071423 A (益方生物科技上海有限公司等) 2018年 12月 21日 (2018 - 12 - 21) 参见全文	1-10																					
A	YANG Xiaojun等. "Design, synthesis and biological evaluation of 2, 5-dimethylfuran-3-carboxylic acid derivatives as potential ID01 inhibitors" Bioorganic & Medicinal Chemistry, 第27卷, 2019年 5月 5日 (2019 - 05 - 05), 第1605-1618页	1-10																					
A	CAI Shi等. "Design, synthesis and biological evaluation of bicyclic carboxylic acid derivatives as ID01 inhibitors" Bioorganic Chemistry, 第94卷, 2019年 11月 21日 (2019 - 11 - 21), 第103356页	1-10																					
A	叶科等. "吲哚胺 2, 3-双加氧酶-1及其抑制剂的研究进展" 药学进展, 第43卷, 第7期, 2019年 7月 31日 (2019 - 07 - 31), 第483-503页	1-10																					
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2021年 4月 13日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2021年 4月 19日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>赵鹏</p> <p>电话号码 010-62084369</p>																					

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/074874

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	111153846	A	2020年 5月 15日	无			
CN	105658643	B	2019年 3月 1日	MX	2016002075	A	2016年 5月 26日
				US	9758492	B2	2017年 9月 12日
				EP	3039020	A1	2016年 7月 6日
				EA	201690306	A1	2016年 6月 30日
				CN	105658643	A	2016年 6月 8日
				EA	029981	B1	2018年 6月 29日
				US	2016200674	A1	2016年 7月 14日
				WO	2015031295	A1	2015年 3月 5日
				JP	2016530283	A	2016年 9月 29日
				JP	6371851	B2	2018年 8月 8日
				CA	2921199	A1	2015年 3月 5日
				EP	3039020	B1	2017年 7月 19日
CN	109071423	A	2018年 12月 21日	WO	2017139414	A1	2017年 8月 17日
				BR	112018015413	A2	2018年 12月 18日
				RU	2018128334	A	2020年 3月 10日
				CA	3012133	A1	2017年 8月 17日
				EP	3414224	A4	2019年 9月 25日
				US	2020046697	A1	2020年 2月 13日
				KR	20180113557	A	2018年 10月 16日
				EP	3414224	A1	2018年 12月 19日
				AU	2017217536	A1	2018年 8月 9日
				MX	2018009633	A	2018年 12月 17日
				JP	2019510810	A	2019年 4月 18日