



Laurence MOINEAUX (Grant Télévie),
Johan WOUTERS (Promoteur),

Namur Medicine & Drug Innovation Center (NAMEDIC; membre de
NARILIS) Université de Namur (UNamur), rue de Bruxelles, 61,
B-5000 Namur, Belgique
laurence.moineaux@unamur.be, johan.wouters@unamur.be

Conception, synthèse et étude d'inhibiteurs de la tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO), une cible prometteuse pour le traitement du cancer

Introduction

Le L-tryptophane (L-Trp) est un acide aminé essentiel ayant différentes fonctions biologiques importantes. En plus de participer à la biosynthèse des protéines, le tryptophane est métabolisé chez les mammifères selon diverses voies, à savoir celles de la sérotonine et de la kynurénine. Dans cette dernière, le tryptophane est catabolisé en produits finaux tels que l'acide nicotinique, la niacine (vitamine B3) et le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺). Bien que les enzymes tryptophane 2,3-dioxygénase (TDO) et indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) ne possèdent pas la même localisation cellulaire et ne sont pas induites par les mêmes partenaires, ces deux enzymes catalysent toutes deux, de manière similaire, la première étape de la dégradation du tryptophane. La réaction convertit le L-Trp en *N*-fomyl-L-kynurénine par le clivage de la liaison C₂-C₃ du L-Trp et incorporation de deux atomes d'une molécule de dioxygène (Figure 1) (Schröcksnadel K., 2006 ; Viola A., 2007).

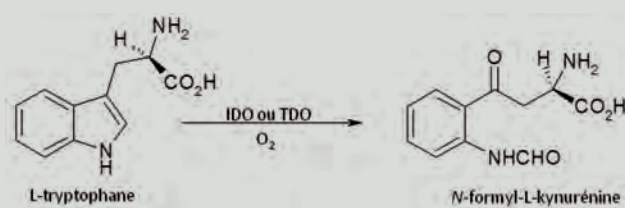


Figure 1 : Oxydation du substrat, le L-Trp, pour former le produit, *N*-formyl-L-kynurénine, catalysée par IDO ou TDO.

Depuis plusieurs années, de plus en plus de preuves indiquent l'implication d'IDO dans le phénomène de tolérance immunitaire (Figure 2). Celui-ci se traduit par la capacité du système immunitaire de l'organisme à supporter la présence d'antigènes sans manifester de réaction immunitaire de défense.

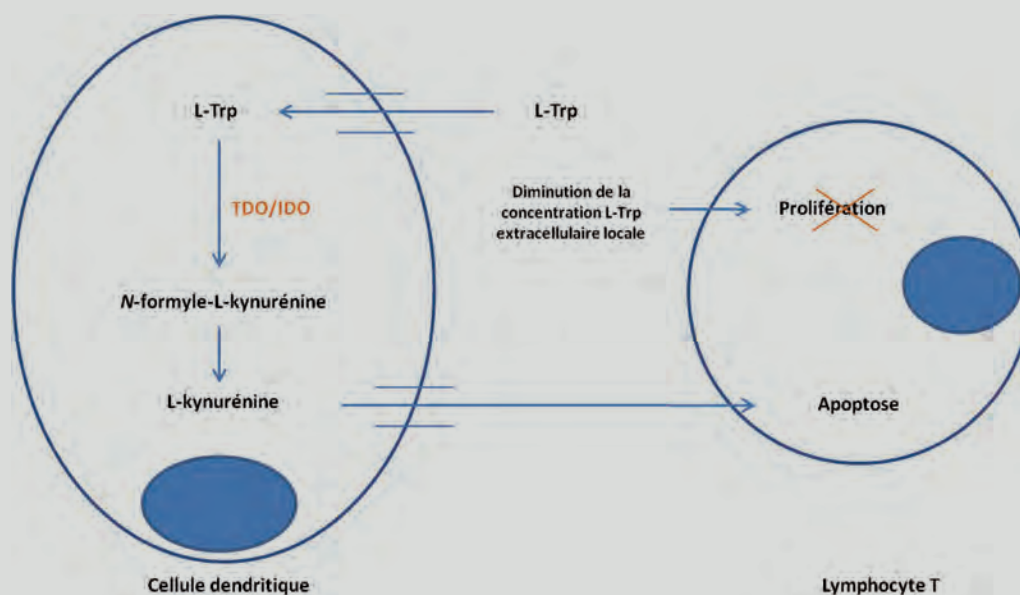


Figure 2 :
Mécanisme de
l'immunosuppression
par les enzymes TDO/
IDO (adapté de Baurain
J-F., 2008).

L'activation d'IDO limite alors la concentration locale en L-Trp. Le retrait de cet acide aminé essentiel provoque l'arrêt de la biosynthèse des protéines et donc de la croissance des pathogènes et la prolifération cellulaire. En effet, le L-Trp est requis pour la synthèse des protéines. En d'autres termes, la baisse de L-Trp est considérée comme un mécanisme de défense induit par l'IFN- γ dans les cellules immunocompétentes durant la réponse immunitaire. (L'IFN- γ est une protéine naturelle fabriquée par les cellules de l'organisme et qui exerce des effets variés sur les cellules du système immunitaire. Elle active notamment les macrophages (phagocytose) et possède des propriétés antivirales, antiprolifératives et antifibrotiques).

Ce phénomène agit comme anti-tumoral et limite la croissance des cellules malignes (Pfefferkom E.R., 1984 ; de la Maza L.M., 1988 ; Ozaki Y., 1988). L'activation d'IDO peut également inhiber la réponse des lymphocytes T lors d'une stimulation mitogénique *in vitro* et *in vivo* (Hwu P., 2000 ; Munn D.H., 1999 ; Munn D.H., 2002 ; Grohmann U., 2003). Ceci est d'autant plus vrai quand l'enzyme est activée *via* l'IFN- γ des cellules dendritiques ou macrophages. En plus de la privation de L-Trp, l'effet pro-apoptotique de certains catabolites du L-Trp telle que la kynurénine est aussi important (Terness P., 2002 ; Frumento G., 2002). Selon différentes études, de nombreuses tumeurs humaines expriment de manière constitutive IDO. Cette dernière se voit surexprimée au niveau des cellules tumorales ce qui est corrélé au faible taux de survie dans différents types de cancer. Ceci porte à croire que l'inhibition d'IDO permettrait d'augmenter l'efficacité des traitements anticancéreux. En effet, des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que l'efficacité d'une chimiothérapie ou d'une vaccination thérapeutique peut être améliorée par l'administration concomitante d'un inhibiteur d'IDO (Baurain J-F., 2008). De façon intéressante, TDO est surexprimé également dans de nombreuses tumeurs telles que le mélanome, le cancer colorectal, le cancer de la vessie, la cirrhose, le cancer du sein et aussi le cancer du poumon (Pilotte L., 2012). L'expression de TDO au sein des cellules tumorales a un effet similaire à l'expression d'IDO en prévenant la réjection tumorale par dégradation locale en L-Trp. Or, contrairement à IDO dont plusieurs inhibiteurs ont déjà été découverts, seul un faible nombre de composés de type indolique ou β -carboline ont été rapportés comme inhibiteurs de TDO. Parmi eux, le fluoroindole 680C91 appartenant à la classe des 3-(2-(pyridyl)éthényl)indole décrite par le groupe Wellcome (Figure 3). Ces composés sont décrits comme inhibiteurs combinés de TDO et de la recapture de 5-HT (sérotonine) dans le traitement de la dépression. Il s'avère que le composé 680C91 semble être le meilleur composé avec un potentiel inhibiteur *in vitro* intéressant ($K_i \sim 42$ nM) sur TDO extraite de foie. De plus, à 10 μ M, il est dépourvu de toute activité sur la recapture de 5-HT, différents récepteurs de 5-HT, IDO ainsi que les monoamines oxydases A et B.

Notre groupe a donc voulu investiguer l'effet du composé 680C91 dans un modèle de cancer murin (relatif aux rats ou aux souris) de manière à élucider le rôle de TDO dans la suppression tumorale immune. Cependant, cette étude s'est avérée difficile à cause de la faible solubilité et/ou biodisponibilité de ce composé. C'est pourquoi, ce projet, financé par le Télévie (FNRS grant 7.4.543.07) et mené au centre NAMEDIC (B. Masereel, R. Frédérick, J. Wouters) en collaboration avec les équipes des Pr. Benoît Van Den Eynde

(LICR, UCL), Jean-Marie Frère et Moreno Galleni (CIP, ULg), avait pour but de concevoir de nouveaux inhibiteurs spécifiques de TDO et de caractériser leur mode d'interactions avec l'enzyme en utilisant une approche théorique et expérimentale.

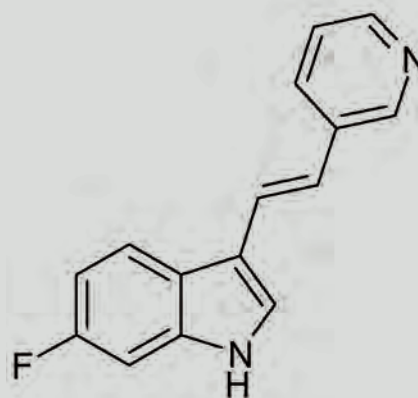


Figure 3 : Structure de l'inhibiteur de référence, 680C91.

A ce jour, seules les structures tridimensionnelles de TDO de *Ralstonia Metallidurans* (*rm*TDO) et *Xanthomonas campestris* (*xc*TDO) sont expérimentalement résolues. Parmi ces deux enzymes bactériennes, *xc*TDO partage une bonne identité de séquence avec la forme humaine (*ht*TDO, 34 %), particulièrement au niveau du site actif. C'est pourquoi il constitue un outil intéressant pour la caractérisation des inhibiteurs au sein du site actif de l'enzyme. L'analyse des interactions stabilisant le 6-fluorotryptophane, un substrat analogue au L-Trp co-cristallisé dans le site actif de l'enzyme *xc*TDO (code Protein Data Bank (PDB) : 2NW9), révèle que le site actif de l'enzyme est complètement protégé du solvant lorsque l'enzyme est en complexe avec son substrat, suggérant que le ligand pourrait masquer l'effet du solvant lors de la liaison. Il faudra en tenir compte dans notre travail, étant donné que notre but est d'améliorer la solubilité aqueuse du composé 680C91 par introduction de manière covalente de groupements solubilisants aux positions favorables à la solvation. Pour ce faire, le groupe solubilisant doit à la fois être reconnu par TDO et permettre une meilleure solubilisation tout en étant enfoncé dans la poche catalytique de l'enzyme.

Résultats

Synthèses de composés indoliques originaux

Notre point de départ est le 680C91 qui a montré son efficacité *in vitro* sur l'enzyme TDO mais qui, par contre, possède une faible biodisponibilité *in vivo* ce qui est probablement dû à une faible solubilité. Sur base d'une étude par *docking*, différentes pharmacomodulations sont envisagées telles que la modification du noyau indolique par l'introduction d'un azote en position 5 et 7, l'introduction d'une chaîne latérale et de groupements solubilisants en R_1 , l'étude de l'influence de la substitution en NH, l'influence de la nature de la liaison de la chaîne latérale et enfin l'introduction de divers substituants en position 2, 4, 5, 6 et 7 (R_2 , R_3) (Schéma 1).

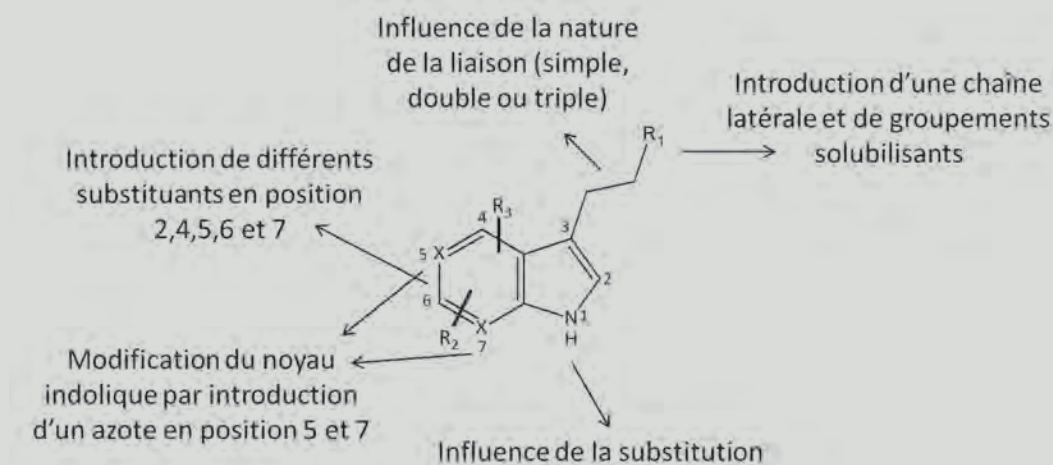


Schéma 1 : Représentation schématique des différentes pharmacomodulations effectuées autour de l'inhibiteur de référence.

L'ensemble de ces composés (~70) a été obtenu en quantité suffisante afin de les utiliser dans un test cellulaire de manière à isoler les molécules les plus affines.

Activité biologique

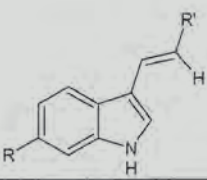
A la suite du test cellulaire, sur cellules transfectées avec TDO, de la septantaine de composés indoliques synthétisés avec les différentes pharmacomodulations, deux composés (**58** et **61**) se sont avérés très intéressants (Tableau 1).

Ces composés présentent, d'une part, une inhibition prometteuse de l'enzyme TDO avec des IC_{50} respectifs de 2 et 3 μM semblables à l'inhibiteur de référence ($IC_{50} = 1 \mu M$) et, d'autre part, ils ont une solubilité calculée respectivement de 2.88 et 130.6 mg/mL pour **58** et **61** bien plus élevée que le composé 680C91 (0.065 mg/mL). C'est pourquoi ces derniers vont être évalués de manière enzymatique sur de l'enzyme humaine TDO purifiée. Cette étude a permis de montrer que les deux composés (**58** et **61**) prometteurs au niveau cellulaire sont tout aussi intéressants au niveau enzymatique ($K_i = 5$ et 41 μM

pour **58** et **61** respectivement). Ils possèdent tous deux un profil d'inhibiteur compétitif (Figure 4).

Les valeurs moyennes de pK_a mesurées expérimentalement (pK_a **58** = 4.68 et pK_a **61** = 4.94) concordent avec les valeurs théoriques calculées (« Pallas Net 2.0 » CompuDrug <http://www.compudrug.com>) qui sont respectivement de 4.57 et 4.52 pour **58** et **61**. De manière intéressante, notre étude met en évidence que le pK_a de l'acide carboxylique ainsi que celui du tétrazole ne sont pas fortement influencés par la présence du noyau indolique qui leur est conjugué par le biais d'un lien éthylénique. La connaissance des pK_a de ces composés permet également de préciser la forme de la molécule qui interagit au niveau de l'enzyme, à pH physiologique. En toute vraisemblance, il s'agit de la forme déprotonnée aussi bien pour **58** que pour **61**. Cette information nous sera utile par la suite lors des simulations de *docking*. Les valeurs de pK_a obtenues pour nos inhibiteurs sont importantes étant donné que ces derniers sont difficilement solubles en milieu aqueux. Il serait donc intéressant de déterminer à partir de quelle valeur de pH les inhibiteurs seraient sous forme déprotonnée et donc plus solubles. Pour ce faire, la solubilité des composés a été évaluée à différents pH.

Tableau 1 : Composés indoliques potentiellement inhibiteurs par modification de la chaîne latérale en position 3.

Composé			$mTDO$ IC_{50} (μM)	LD_{50} (μM) ¹	Donnée calculée	
	R	R'			$\log D_{7.4}$ ²	Solubilité (mg/mL)
58 (LM10)	6-F	tétrazole	2	>400	0.15	2.88
61	6-F	COOH	3	>400	-0.56	130.6

¹Dose létale médiane, mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) dans des conditions d'expérimentation précises.

²Le Log D est une mesure affinée du Log P (qui est une mesure de la solubilité différentielle de composés chimiques dans deux solvants (coefficient de partage octanol/eau)) prenant en compte la modification de celui-ci en fonction du pH de la phase aqueuse ainsi que le pK_a du composé étudié.

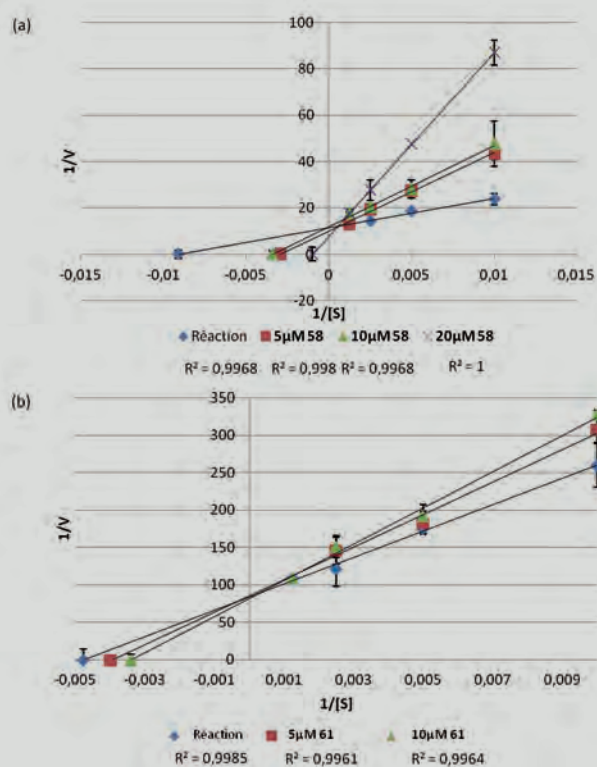


Figure 4 : Détermination du K_i et du mode d'inhibition de la molécule inhibitrice 58 (a) et 61 (b) sur l'enzyme *hTDO* (méthode de Lineweaver-Burk).

Ces pH ont été choisis afin de simuler le pH de l'estomac (pH = 1.0), de l'œsophage (pH = 7.4) et de l'intestin (pH = 9.0) (Van de Waterbeemd H., 2009). Le pK_a d'un ion pyridinium, groupement présent au sein de l'inhibiteur de référence a une valeur de 5.25 (Weast R.C., 1987). A pH = 1.0, cet inhibiteur se trouvera sous sa forme protonnée et présentera donc une meilleure solubilité. Par ailleurs, sous sa forme protonnée, il ne sera pas facilement absorbé au niveau des membranes de l'estomac malgré sa bonne solubilité à ce pH. Néanmoins, lorsque le 680C91 atteindra l'intestin à pH = 9.0, sa solubilité sera beaucoup plus faible même s'il sera mieux absorbé vu son caractère neutre.

Les composés 58 et 61 présentent un pK_a inférieur à 5.25. La valeur du pK_a de la molécule 58 est 4.68 et la molécule est déprotonnée à pH supérieur à 4.68. Elle est donc plus soluble à pH élevé. Par contre, à pH = 1.0, la molécule 58 se trouve sous la forme neutre et est donc moins soluble mais possède encore néanmoins une solubilité relativement élevée. De même pour 61 dont le pK_a est de 4.94, la molécule est déprotonnée au-delà de cette valeur et est donc plus soluble à pH élevé. Les molécules 58 et 61 ont respectivement une solubilité moyenne de 14 et 20 fois plus élevée par rapport à la molécule de référence 680C91.

Ces inhibiteurs s'avèrent donc être des molécules particulièrement intéressantes de ce point de vue par rapport à l'inhibiteur de référence. En effet, la solubilité d'un composé pharmaceutique présente un intérêt particulier lorsqu'elle est supérieure à 60 μg/mL (Kerns E.H., 2008), ce qui correspond respectivement pour 58 et 61 à 262 μM et 292 μM. Ces

valeurs sont de l'ordre de grandeur des valeurs de solubilité déterminées pour ces inhibiteurs à différents pH, ce qui fait des inhibiteurs 58 et 61 des molécules potentiellement pharmaceutiques en termes de solubilité. L'introduction d'un groupement acide carboxylique ou un tétrazole à la place de la pyridine du 680C91 a permis d'améliorer la solubilité tout en conservant un bon potentiel inhibiteur. En plus de cet atout, ces composés possèdent une faible lipophilie. En effet, les valeurs $\text{Log } D_{7,4}$ sont relativement basses 0.15 pour le composé 58 et -0.56 pour le composé 61.

Reste à savoir si ces composés sont stables à ces pH et au cours du temps. Effectivement, après 16 h, 100 % du composé 58 sont retrouvés, ce qui montre qu'il est bien stable au cours du temps à pH 7.4. En plus d'apporter une solubilité améliorée, le composé 58 présente une meilleure stabilité et sélectivité que le composé de référence.

Etudes des interactions entre les inhibiteurs et l'enzyme TDO

La structure cristallographique de l'enzyme TDO humaine n'a pas encore pu être obtenue à ce jour. De plus, nos essais de cristallogénèse sur *rmTDO* (TDO de *Ralstonia metallidurans*) en complexe avec un inhibiteur n'ont pas abouti à une structure 3D exploitable. Nous avons donc choisi parmi les deux enzymes bactériennes cristallisées, celle qui présente le plus d'identité avec l'enzyme humaine, à savoir, *xcTDO* (TDO de *Xanthomonas campestris*) (34 %) (Forouhar F., 2007). Cette identité de séquence, particulièrement au sein du site actif, en fait un bon outil pour étudier le mode de liaison des inhibiteurs. L'analyse du mode d'interaction du 6-fluorotryptophane, un analogue du substrat cristallisé en présence de *xcTDO* met en évidence différentes interactions stabilisantes (Figure 5a). En effet, le noyau indolique est stabilisé *via* un pont H entre le groupement NH de l'indole et le groupement imidazole de l'His55. Une étude de mutagenèse montre que l'His55 n'est pas une base essentielle vu que l'activité catalytique est conservée avec les mutants H55A et H55S. Néanmoins, l'His55 joue un rôle important dans la prévention de la formation d'un complexe ferrique enzyme-ligand non productif. De plus, cette base participe à la stabilisation de molécules d'eau au sein du site actif en l'absence de substrat (Thackray S.J., 2008).

Une autre interaction, de type ionique, stabilise le groupe amino par le propionate de l'hème et l'oxygène de la molécule d'eau conservée dans le site actif. Enfin, la partie carboxylate du substrat interagit avec le guanidinium de l'Arg117 et l'ossature de la Thr254. L'interaction avec l'Arg117 s'avère importante pour l'activité catalytique de l'enzyme si l'on en croit les données obtenues pour IDO. En effet, lorsque l'Arg231 du site actif d'IDO est remplacée par une Ala par mutagenèse, l'activité de l'enzyme est drastiquement réduite (Sugimoto H., 2006). Bien que la région du site actif de l'hème soit exposée au solvant lorsque l'enzyme est seule, celle-ci est complètement protégée du solvant lorsque l'enzyme est en complexe avec son substrat, suggérant que le ligand potentiel pourrait masquer l'effet du solvant lors de la liaison. Cette simulation de *docking* a permis de valider le modèle car les interactions observées dans la structure

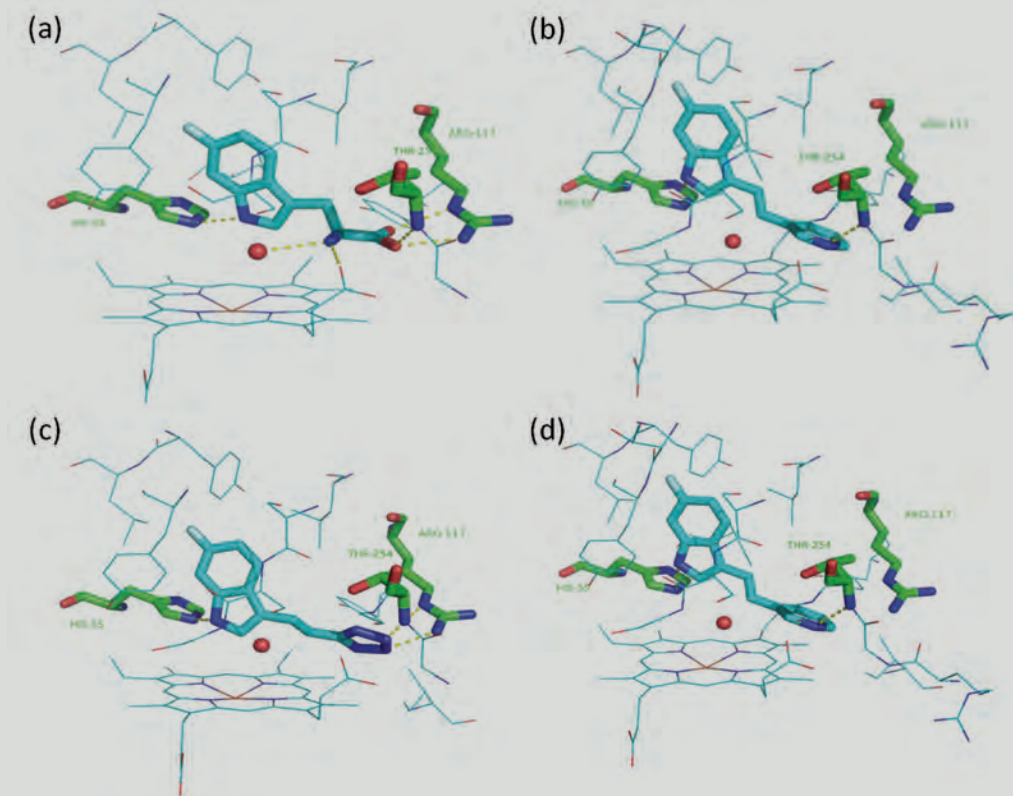


Figure 5 : (a) Vue du 6-fluorotryptophane au sein du site actif de *xcTDO* (PDB : 2NW9) (Forouhar F., 2007) (b) Vue du composé 680C91 au sein du site actif de *xcTDO*. Vue des composés 58 (c) et 61 (d) au sein du site actif de *xcTDO*. La molécule d'eau est représentée par la sphère rouge.

cristallographique sont retrouvées théoriquement. De plus, dans la structure cristallographique de l'enzyme *xcTDO*, le site actif contient une molécule d'eau occupant la place de la molécule de dioxygène coordonnée par l'ion ferreux du groupement hème lorsque l'enzyme est active. Cet ion ferreux ne coordonne donc *a priori* pas l'inhibiteur.

L'inhibiteur de référence ainsi que les composés **58** et **61** ont également été étudiés par simulation de *docking* dans le site actif de *xcTDO*. Les résultats de nos simulations de *docking* sont repris à la Figure 5.

Il en ressort que le composé 680C91 s'oriente de façon similaire au substrat (L-Trp) et conserve le pont H avec l'His55 (Figure 5b).

Dans cette orientation le groupement 3-pyridyle de l'inhibiteur se trouve à l'entrée du site actif et interagit avec le NH du squelette de la Thr254 par un pont H.

Les deux molécules inhibitrices **58** et **61** se placent dans le site actif de la même manière que le composé 680C91 (Figures 5c et 5d). L'oxygène de la molécule d'eau présente dans le site actif interagit avec l'hydrogène lié à l'azote du cycle indolique pour chacun des inhibiteurs. Ces derniers sont insérés profondément dans la cavité du site actif. Le fragment indole est stabilisé perpendiculairement au plan formé par l'hème *via* une liaison hydrogène entre son NH et l'imidazole de l'His72. A l'autre extrémité, les fragments aussi bien tétrazole qu'acide carboxylique pointent vers l'entrée du site

actif et interagissent avec la chaîne guanidinium de l'Arg117. L'analyse par simulation de *docking* de ces composés confirme que l'introduction de groupements chargés négativement en position 3 autour du noyau indole permet une interaction avec le guanidinium de la chaîne latérale de l'Arg117 tout en améliorant sa solubilité ne perturbant pas la stabilisation du composé dans sa configuration inhibitrice.

Les simulations de *docking* mettent également en évidence l'accepteur de pont H (N3') et le donneur de pont H (N1-H1) avec les interactions qu'ils réalisent avec l'His55 et la Thr254.

Evaluation in vivo

Etant donné les résultats encourageants sur les composés **58** et **61**, leur étude de biodisponibilité chez la souris a été réalisée à l'UCL, en comparaison à l'inhibiteur de référence.

Les composés sont dissous dans l'eau de boisson et administrés *ad libitum* à raison de 1 mg/mL à des souris. La consommation moyenne en eau par jour pour une souris est de 4 mL, soit une dose journalière de 160 mg/kg. La concentration plasmatique de chaque inhibiteur ainsi que celle du L-Trp et de la kynurénine est mesurée 0, 1, 2 et 7 jours après le début de l'expérimentation. Cette étude montre que l'inhibiteur de référence a une très faible biodisponibilité puisqu'après administration de 160 mg/kg/J, une concentration plasmatique de seulement 0.1 μ M est détectée après 7 jours. En ce qui concerne le composé **61**, les

concentrations plasmatiques se situent entre 1.4 et 18 μM (soit 0.29-3.7 $\mu\text{g/mL}$). Cela sous-entend que ce dernier est soumis à une élimination et/ou une métabolisation rapide. La molécule **58** se distingue avec une concentration plasmatique élevée décelée entre 84 et 180 μM (soit 19-41 $\mu\text{g/mL}$), suggérant une très bonne biodisponibilité orale chez la souris.

Après avoir réalisé un test de sélectivité sur le composé **58** (LM10), celui-ci a pu être étudié à raison de 160 mg/kg/J dans un traitement systémique sur des souris immunisées. Il ressort que ce composé **58** est très prometteur vu qu'il prévient la croissance des cellules tumorales P815 exprimant TDO. De plus, il ne présente pas de toxicité chronique chez l'animal sur 100 jours de traitement et contribuerait également à diminuer l'anxiété de celui-ci.

Conclusions et perspectives

Ce travail a permis de mettre à jour un inhibiteur présentant une inhibition semblable au composé de référence (680C91)

mais ayant des avantages pharmacologiques supérieurs, ce qui permettra peut-être à l'avenir de traiter le cancer de façon plus efficace et ciblée par la promotion du rejet immunitaire tumoral.

À l'avenir, il serait pertinent de développer un inhibiteur mixte de TDO/IDO ou de coupler l'inhibiteur **58** (LM10) à un inhibiteur d'IDO afin d'améliorer l'efficacité de l'immunothérapie anticancéreuse. En effet, sur une série de 104 lignées tumorales humaines issues de différents types histologiques, il a été observé que 20 tumeurs expriment TDO, 17 expriment IDO et 16 expriment les deux enzymes à la fois (Pilotte L., 2012). Par conséquent, en ciblant à la fois IDO et TDO cela permettrait d'atteindre 51 % des tumeurs au lieu de 32 % avec un inhibiteur visant seulement IDO ou 35 % avec un autre dirigé uniquement sur TDO. En outre, nos résultats suggèrent que l'inhibition de TDO pourrait aussi être utile pour les tumeurs qui n'expriment pas intrinsèquement TDO (Pilotte L., 2012). Si cela se confirme dans de prochaines études, la proportion de tumeurs sensibles à cette thérapie augmentera.

- (1) Baurain J-F., Van Der Bruggen P., Van den Eynde B., Coulie P.G. & Van Baren N., Principes généraux et premiers essais cliniques de vaccination thérapeutique contre le cancer. *Bull. Cancer* **2008**, *95*, 327-335.
- (2) CompuDrug. Pallas Net 2.0. <http://www.compuDrug.com>.
- (3) de la Maza L.M. & Peterson E.M. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 346-50.
- (4) Delano W.L. The PyMOL molecular graphics system on World Wide Web. <http://www.pymol.org>. **2008**.
- (5) Forouhar F., Anderson J.L.R., Mowat C., Vorobiev S.M., Hussain A., Abashidze M., Bruckmann C., Thackray S.J., Seetharaman J., Tucker T., Xiao R., Ma L.C., Zhao L., Acton T.B., Montelione G.T., Chapman S. K. & Tong L. Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104*, 473-478.
- (6) Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U. & Ferrara G.B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 459-68.
- (7) Grohmann U., Fallarino F. & Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* **2003**, *24*, 242-8.
- (8) Hwu P., Du M.X., Lapointe R., Do M., Taylor M.W. & Young H.A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* **2000**, *164*, 3596-699.
- (9) Kerns E.H. & Di L. Drug-like properties: concepts, structure design and methods. *Academic Press* **2008**, 60-65.
- (10) Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A. & Mellor A.L. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* **1999**, *189*, 1363-1372.
- (11) Munn D.H., Sharma M.D., Lee J.R., Jhaver K.G., Johnson T.S., Keskin D.B., Marshall B., Chandler P., Antonia S.J., Burgess R., Slingluff C.L. & Mellor A.L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* **2002**, *297*, 1867-70.
- (12) Ozaki Y., Edelstein M.P. & Duch D.S. Induction of indoleamine 2,3 dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 1242-6.
- (13) Pfefferkorn E.R. Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1984**, *81*, 908-12.
- (14) Pilotte L., Larrieu P., Stroobant V., Colau D., Dolušie E., Frédéric R., De Plaen E., Uyttenhove C., Wouters J., Masereel B. & Van den Eynde B. Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 2497-2502.
- (15) Thackray S.J., Bruckmann C., Anderson J.L.R., Campbell L.P., Xiao R., Zhao L., Mowat C., Forouhar F., Tong L. & Chapman S. K. Histidine 55 of tryptophan 2,3-dioxygenase is not an active site base but regulates catalysis by controlling substrate binding. *Biochem.* **2008**, *47*, 10677-10684.
- (16) Schröcksnadel K., Wirleitner B., Wrinkler C. & Fuchs D. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *364*, 82-90.
- (17) Terness P., Bauer T.M., Röse L., Dufer C., Watzlik A., Simon H. & Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* **2002**, *196*, 447-57.
- (18) Van de Waterbeemd H. & Testa B. Drug bioavailability. *Wiley-VCH* **2009**, 144.
- (19) Viola A. & Bronte V. Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses. *Semin. Cancer Biol.* **2007**, *17*, 309-316.
- (20) Weast R.C., Astle M.J. & Beyer W.H. Handbook of Chemistry and Physics. *CRC Press* **1987**.