



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112679520 B

(45) 授权公告日 2022.03.11

(21) 申请号 202011579538.4

(22) 申请日 2019.08.21

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 112679520 A

(43) 申请公布日 2021.04.20

(66) 本国优先权数据  
201810973172.5 2018.08.24 CN  
201811592949.X 2018.12.25 CN

(62) 分案原申请数据  
201980005215.3 2019.08.21

(73) 专利权人 杭州阿诺生物医药科技有限公司  
地址 311100 浙江省杭州市余杭区仓前街  
道向往街1008号8幢

(72) 发明人 陈宇锋 陈凯旋 李磐 刘灿丰  
王骥 邱庆崇 路杨

(74) 专利代理机构 北京中和立达知识产权代理有限公司 11756

代理人 杨磊

(51) Int.Cl.  
C07D 498/06 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2017175156 A1, 2017.10.12  
WO 2017175156 A1, 2017.10.12  
CN 105164131 A, 2015.12.16  
CN 105164131 A, 2015.12.16  
CN 112351778 A, 2021.02.09  
TW 201613935 A, 2016.04.16  
CN 102802730 A, 2012.11.28  
CN 102802731 A, 2012.11.28  
CN 108349996 A, 2018.07.31

审查员 余晓梦

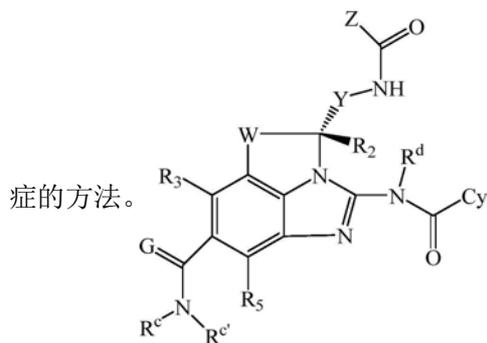
权利要求书1页 说明书17页

(54) 发明名称

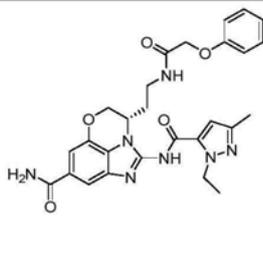
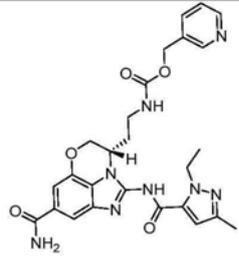
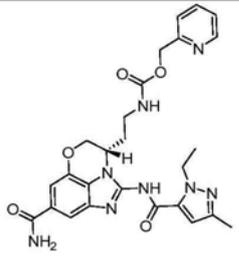
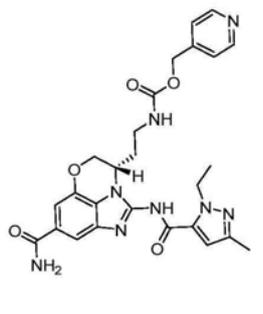
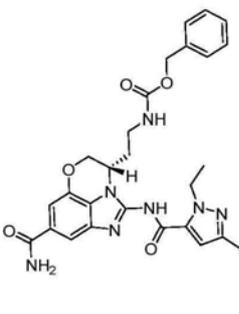
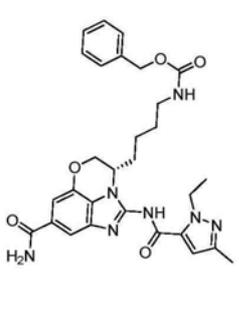
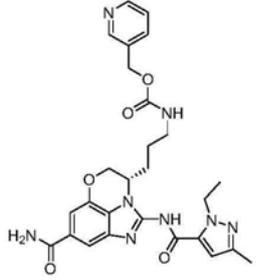
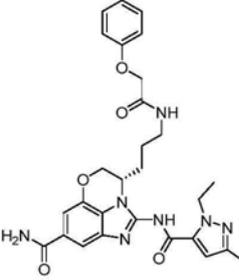
STING激动剂及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种具有(VI)结构的STING蛋白激动剂活性的化合物及其药学上可接受的盐,以及使用式(VI)化合物预防和/或治疗免疫相关病症的方法。



1. 化合物, 具有如下结构:

编 号	化合物结构	编 号	化合物结构	编 号	化合物结构
7		8		9	
10		14		17	
32		33			

## STING激动剂及其制备方法

[0001] 本申请为分案申请,其母案的中国专利申请申请号为201980005215.3,母案申请日为2019年08月21日。

[0002] 本申请要求以下专利申请的优先权:(1)发明名称为“高活性STING蛋白激动剂”于2018年8月24日提交到中国专利局的中国专利申请201810973172.5的优先权,和(2)发明名称为“高活性STING蛋白激动剂”于2018年12月25日提交到中国专利局的中国专利申请201811592949.X的优先权,其内容均通过引用以整体并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及一种杂环化合物,具体地涉及一种高活性的STING蛋白激动剂及其用途。

### 背景技术

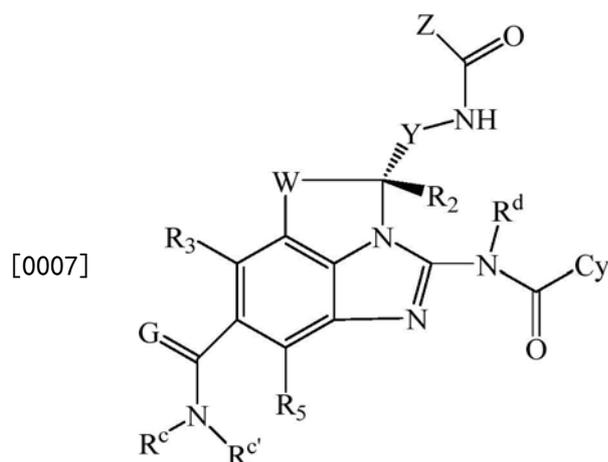
[0004] 免疫治疗的阳性反应通常依赖于肿瘤细胞与肿瘤微环境(TME)内免疫调节的相互作用。在这些相互作用下,肿瘤微环境在抑制或增强免疫应答中发挥着重要的作用。认识免疫治疗与TME间的相互作用不仅是剖析作用机制的关键,也为改善目前免疫治疗的疗效提供了新的方法。细胞因子是可以调节免疫应答的一大类蛋白质,可以直接激活免疫效应细胞或刺激肿瘤基质细胞,以致为淋巴细胞的募集产生的趋化因子和粘附分子。这些功能表明根据不同的肿瘤微环境,针对细胞因子也可以是肿瘤免疫治疗的一种有效途径。

[0005] STING(干扰素基因刺激蛋白)是目前肿瘤免疫治疗领域药物研发中最新最热的免疫治疗靶点。干扰素基因刺激蛋白是一种跨膜蛋白,通常在152-173位区域交接形成二聚体并处于自我抑制状态。当受到部分配体的刺激后分子构型发生变化并被激活,招募细胞质中的TANK结合激酶1,介导TBK1对IRF3的磷酸化,导致干扰素- $\beta$ 和其它多种细胞素的形成。IFN $\beta$ 的产生是STING活化的标志。肿瘤微环境天然免疫的信号传导是肿瘤特异性T细胞的激活和肿瘤浸润性淋巴细胞浸润的关键步骤。其中I型IFN对肿瘤激活的T细胞活化起着关键作用。这样,STING不仅诱导I型干扰素基因的表达,在天然免疫信号通路中起着重要作用;STING激动剂能激活包括树突状细胞等免疫刺激细胞,改变肿瘤微环境并诱导了肿瘤特异性T细胞的产生。在鼠科动物实验中,一种黄酮类血管破坏剂DMXAA通过激活鼠源STING蛋白,诱导IFN- $\beta$ 和其它天然细胞素的产生,并有效地抑制多种实体肿瘤的生长。但是该药在一个人体非小细胞临床实验中和标准化疗联合使用未能观察到明显疗效。后来实验证实,尽管人源和鼠源STING蛋白的相似度高达81%,前者基因编码379个氨基酸,后者基因编码378个氨基酸,但DMXAA却无法激活人源STING蛋白。环二核苷酸是到目前为止发现的唯一一类既能直接激活鼠源又能激活人源STING蛋白的STING激动剂。直接把CDN注射到B16黑色素瘤、CT26直肠癌、和4T1乳腺癌肿块,不仅导致明显的抑制作用直至肿瘤消失,同时也诱导系统的持久性抗原特异性T细胞免疫,造成动物其它部位未注射药物的肿瘤生长也受到抑制。ML RR-S2 CDA引起多种实体肿瘤微环境的改变,激活有效的肿瘤引发的CD8<sup>+</sup>T细胞和持久的疗效。近年来大量的研究报道表明STING通路能有效地启动机体的天然免疫系统,是至今

为数不多的、经多方验证能诱导产生细胞因子干扰素的信号传导通路,该通路在天然免疫中至关重要。淋巴细胞充分浸润到肿瘤组织是免疫治疗成功的关键。该作用靶点通路的激活也促进肿瘤微环境中效应T细胞的浸染及应答,因此该靶点逐渐成为是抗肿瘤治疗尤其是免疫治疗研究的重要靶标。在多个小鼠接种模型中对多种难治症、转移性实体肿瘤有效,不仅直接注射的肿瘤消失,其它部位的肿瘤生长也受到明显抑制,甚至还可以预防肿瘤的发生。

### 发明内容

[0006] 本发明提供了一种具有STING蛋白激动剂活性的化合物及其药学上可接受的盐,其具有式(VI)结构,



式 (VI)

[0008] 其中,Cy表示6-12元芳基或5-12元杂芳基;并且任选地Cy分别独立地被0、1、2、3或4个选自以下基团的取代基所取代:卤素、羟基、氰基、羧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>卤代烷基、磺酸基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、-氨基、硝基、(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)氨基和(二C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)氨基;R<sub>2</sub>选自氢或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基,R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地为卤素、氢、或C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基;其中G为0;Y为C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基;-;W为-O-CR<sup>a</sup>R<sup>a'</sup>-;Z为-O-(C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基)-(6-12元芳基)、-O-(C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>亚烷基)-(5-12元杂芳基)、并且任选地所述6-12元芳基(优选为苯基)或者5-12元杂芳基(优选为吡啶基)各自独立地被0、1、2个选自以下基团的取代基所取代:卤素、羟基、硝基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基、卤代(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)、氨基、磺酰基、氰基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基硫基、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>氨基和(二C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基)氨基;其中R<sup>a</sup>、R<sup>a'</sup>、R<sup>c</sup>、R<sup>c'</sup>各自独立地表示氢、C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基。

[0009] 在本发明的化合物中,其中R<sup>2</sup>为氢或者C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基。

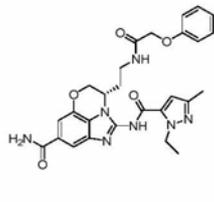
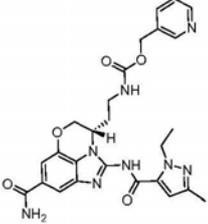
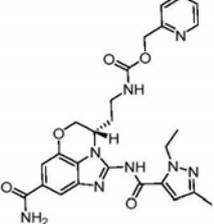
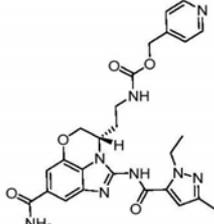
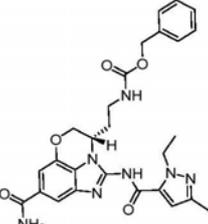
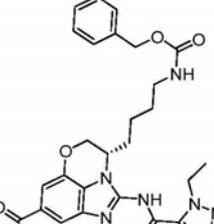
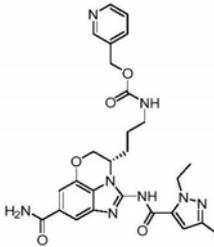
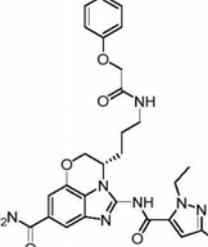
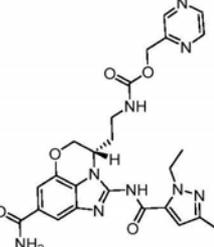
[0010] 在本发明的化合物中,其中R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>各自独立地为氢。

[0011] 在本发明的化合物中,其中R<sup>a</sup>、R<sup>a'</sup>为氢。

[0012] 在本发明的化合物中,其中R<sup>c</sup>、R<sup>c'</sup>为氢。

[0013] 在本发明的化合物中,其中Cy为吡唑基,并且任选地被0、1、2或3个C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>烷基所取代。

[0014] 具有如下结构:

编号	化合物结构	编号	化合物结构	编号	化合物结构
[0015]	7	8	9	10	14
					
	17				
					
[0016]	32	33	41		
					

### 具体实施例

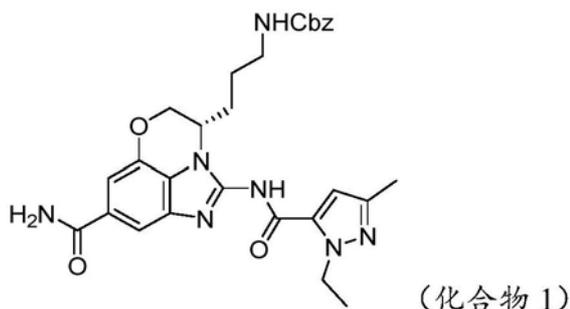
[0017] 当未包括制备途径时,相关中间体是市售的(例如来自Sigma Aldrich,Alfa)。

[0018] 通用过程

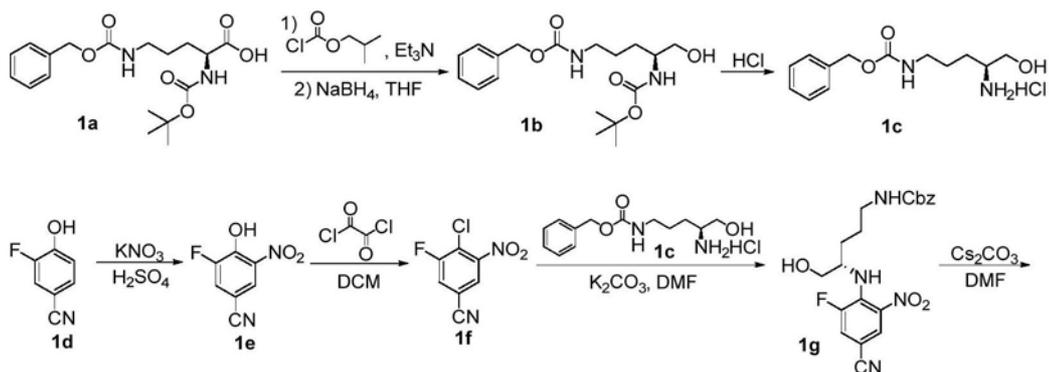
[0019] 使用市售试剂而不需进一步纯化。室温是指20-27℃。1H-NMR谱在Bruker仪器上于500MHz记录。化学位移值以百万分率表示,即 $\delta$ 值。以下简写用于NMR信号的多重性:s=单峰,brs=宽峰,d=二重峰,t=三重峰,m=多重峰。耦合常数以J值列出,以Hz测量。NMR和质谱结果根据背景峰校正。色谱是指使用100筛目硅胶进行并在氮气压力(快速色谱)条件下完成的柱色谱。用于监测反应的TLC指使用特定流动相和来自Merck的硅胶F254作为固定相进行的TLC。

[0020] 实施例1

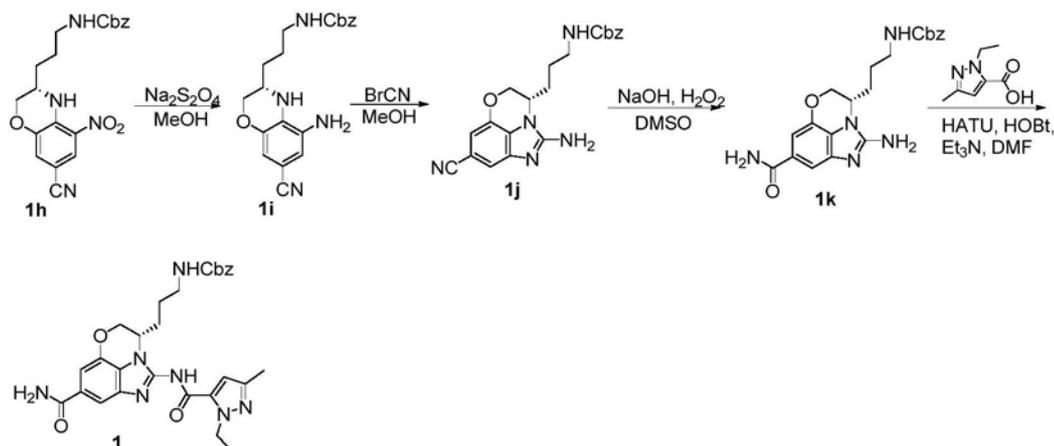
[0021]



[0022] 化合物1由以下步骤制备：



[0023]



[0024] 第一步：将N-叔丁氧羰基-N'-苄氧羰基-L-鸟氨酸1a (25g, 68mmol)，三乙胺 (11.5mL, 81.9mmol) 溶于四氢呋喃 (100mL) 中，在冰浴条件下滴加氯甲酸异丁酯 (10mL, 79mmol)，冰浴下搅拌半小时，依次加入硼氢化钠 (7.8g, 205mmol)，水 (3mL) 缓慢滴加，继续在冰浴下搅拌2小时。LC-MS监测反应结束，加水 (150mL) 淬灭，用乙酸乙酯萃取水相 (150mL\*3)，合并有机相，无水硫酸钠干燥，过滤，浓缩得到化合物1b (20g)，无色油状液体，产率83%。ESI-MS (m/z) : 353.6 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 7.39-7.25 (m, 5H), 7.19 (t, J=5.2Hz, 1H), 6.43 (d, J=8.3Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.53 (t, J=5.4Hz, 1H), 3.30-3.07 (m, 2H), 2.94 (dd, J=12.4, 6.4Hz, 2H), 1.57-1.39 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.23-1.12 (m, 2H)。

[0025] 第二步：将化合物1b (20g, 56mmol) 溶于二氯甲烷 (200mL) 中，加入氯化氢-1,4二氧六环溶液 (70mL, 280mmol)，室温搅拌过夜。LC-MS监测反应结束，旋干溶剂得到化合物1c (13g)，无色油状液体，产率93%。ESI-MS (m/z) : 253.6 [M+H]<sup>+</sup>。

[0026] 第三步：将3-氟-4-羟基苯甲腈1d (13.7g, 100mmol) 溶于浓硫酸 (200mL) 中，冰浴下滴加硝酸 (50mL)，反应混合物在冰浴下搅拌三小时，LC-MS监测反应结束，将反应混合物缓

慢倒入冰水中,用乙酸乙酯萃取水相(300mL\*3),合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到化合物1e(15g),棕色固体,产率82%。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 8.29(s,1H), 8.12(d,J=10.4Hz,1H)。

[0027] 第四步:将化合物1e(15g,82mmol)溶于二氯甲烷(100mL)中,冰浴下滴加草酰氯(13.7mL,163mmol),反应混合物在冰浴下搅拌30分钟后升至80℃搅拌两小时。LC-MS监测反应结束,将反应混合物倒入冰水中,用乙酸乙酯萃取水相(250mL\*3),合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到化合物1f(11.3g),黄色固体,产率69%。<sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ ppm 8.62(s,1H),8.50(dd,J=8.8,1.6Hz,1H)。

[0028] 第五步:取化合物1f(5g,25mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(20mL)中,依次加入化合物1c(13g,51mmol),碳酸钾(6.9g,50mmol)。反应混合物在60℃下搅拌过夜。LC-MS监测反应结束,加水(100mL),用乙酸乙酯萃取水相(150mL\*3),有机相合并后通过硅胶柱层析分离得到化合物1g(6.1g),黄色油状液体,产率57%。ESI-MS(m/z):417.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0029] 第六步:将化合物1g(6g,14mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(15mL)中,加入碳酸铯(9.2g,28mmol)。反应混合物在60℃下搅拌2小时,LC-MS监测反应结束,加水(100mL),用乙酸乙酯萃取水相(150mL\*3),有机相合并后通过硅胶柱层析分离得到化合物1h(4.7g),黄色固体,产率82%。ESI-MS(m/z):397.7[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 8.88(s,1H), 8.12(s,1H),7.38(s,1H),7.36-7.19(m,6H),4.97(s,2H),4.10(dd,J=23.9,10.9Hz,2H), 3.72(s,1H),3.01(s,2H),1.67-1.52(m,4H)。

[0030] 第七步:将化合物1h(4.7g,11.8mmol)溶于甲醇(100mL)中,加入氨水(20mL)。再取连二亚硫酸钠(10g,57mmol)溶于20mL水中,室温下缓慢加入反应液后,继续室温搅拌半小时。LC-MS监测反应结束,向反应混合物中加水(200mL),用乙酸乙酯萃取水相(200mL\*3),有机相合并后,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到化合物1i(3.8g),淡黄色固体,产率87%。ESI-MS(m/z):367.7[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(500MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 7.42-7.23(m,6H),6.45(dd,J=11.9,1.8Hz,2H),5.45(d,J=1.6Hz,1H),5.01(s,2H),4.99(s,2H),4.07(dd,J=10.5,2.5Hz,1H),3.71(dd,J=10.5,6.3Hz,1H),3.34(dd,J=5.9,2.8Hz,1H),3.01(dd,J=12.2,6.2Hz,2H),1.63-1.29(m,4H)。

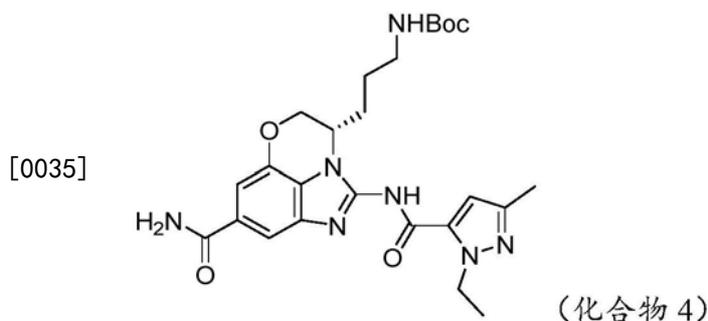
[0031] 第八步:将化合物1i(3.8g,10mmol)溶于甲醇(60mL)中,加入溴化氰(5.4g,51mmol),60℃下搅拌过夜。LC-MS监测反应结束后,浓缩反应液,加入乙酸乙酯(150mL)和饱和碳酸钠水溶液(150mL),分层萃取,水相继续用乙酸乙酯(100mL)萃取两次,合并有机相,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到化合物1j(3.5g),淡黄色固体,产率86%。ESI-MS(m/z):392.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0032] 第九步:将化合物1j(3.5g,9mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(20mL)中,加入氢氧化钠(1g,25mmol),冰浴下缓慢滴加30%双氧水(12mL),升至室温搅拌半小时,LC-MS监测反应结束,向反应混合物中加水(100mL),用乙酸乙酯萃取水相(150mL\*3),有机相合并后,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩得到化合物1k(2.8g),黄色固体,产率76%。ESI-MS(m/z):410.5[M+H]<sup>+</sup>。

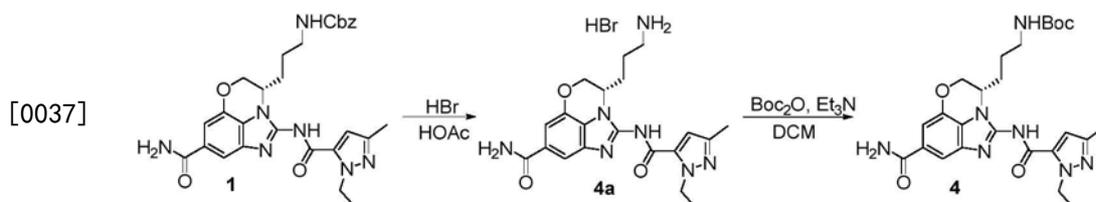
[0033] 第十步:将1-乙基-3-甲基吡唑-5-羧酸(1.6g,10.3mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(8mL)中,依次加入HATU(3.9g,10.3mmol),HOBt(700mg,5.2mmol),三乙胺(2.8mL,20mmol),反应混合物在室温下搅拌半小时。再加入化合物1k(2.8g,6.8mmol),混合物升至60℃下搅

拌5小时。LC-MS监测反应结束,向反应混合物中加水(40mL),用乙酸乙酯萃取水相(100mL\*3),有机相合并浓缩,残余物硅胶柱层析纯化得到化合物1(2.6g),白色固体,产率70%。ESI-MS(m/z):546.4[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 12.71(s, 1H), 7.90(s, 1H), 7.57(s, 1H), 7.34-7.21(m, 8H), 6.62(s, 1H), 4.95(s, 2H), 4.66-4.53(m, 4H), 4.23(d, J=9.5Hz, 1H), 3.08-2.96(m, 2H), 2.15(s, 3H), 1.81-1.72(m, 2H), 1.62-1.52(m, 2H), 1.34(t, J=7.1Hz, 3H)。

[0034] 实施例4



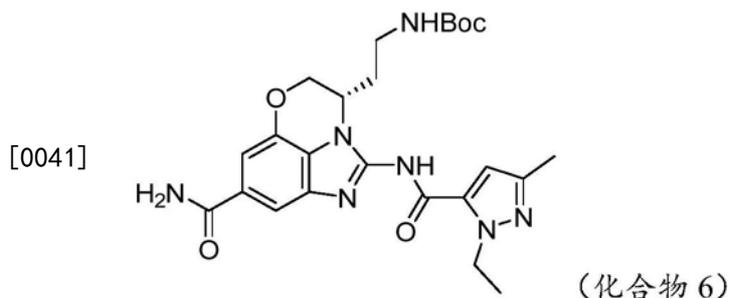
[0036] 化合物4由以下步骤制备:



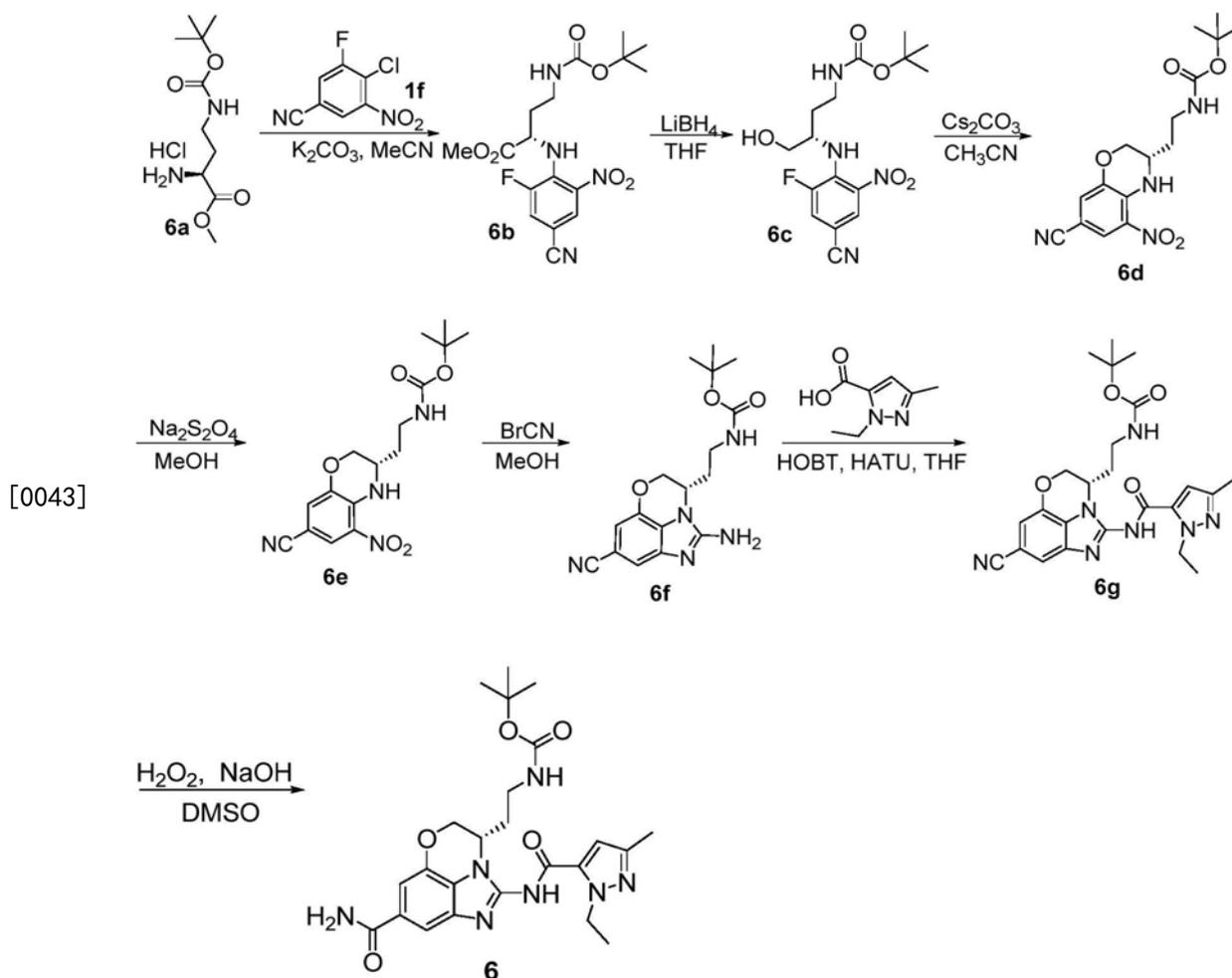
[0038] 第一步:将化合物1(2.5g, 4.6mmol)加入氢溴酸-醋酸溶液(50mL)中,室温搅拌半小时,LC-MS监测反应结束,加入乙醚(50mL),过滤,再用乙醚(30mL\*3)洗滤饼后,将滤饼干燥得到化合物4a(1.8g),白色固体,产率96%。白色固体,ESI-MS(m/z):412.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0039] 第二步:取化合物4a(50mg, 0.12mmol)溶于二氯甲烷(10mL)中,依次加入三乙胺(25mg, 0.25mmol)和二碳酸二叔丁酯(53mg, 0.24mmol),室温搅拌两小时,LC-MS监测反应结束。反应液浓缩,残余物通过反相制备色谱分离得到化合物4(40mg),白色固体,产率64%。ESI-MS(m/z):512.6[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 12.76(s, 1H), 7.93(s, 1H), 7.59(s, 1H), 7.34(s, 1H), 7.32(s, 1H), 6.80(s, 1H), 6.65(s, 1H), 4.68-4.54(m, 4H), 4.29-4.23(m, 1H), 3.01-2.84(m, 2H), 2.18(s, 3H), 1.83-1.71(m, 2H), 1.53(d, J=6.5Hz, 2H), 1.36(t, J=7.1Hz, 3H), 1.32(s, 9H)。

[0040] 实施例6



[0042] 化合物6由以下步骤制备:



[0044] 第一步:将4-氯-3-氟-5-硝基苯胺1f (4g, 20mmol) 和化合物6a (10g, 37.21mmol) 溶于乙腈 (150mL) 中,加入碳酸钾 (8.3g, 60mmol), 氮气保护下70℃反应24小时,点板显示反应完全,冷却到室温,反应物用固体垫硅胶过滤,二氯甲烷 (100mL) 洗固体,滤液浓缩,残余物柱层析纯化得化合物6b (4.3g), 黄色油,产率54.4%。ESI-LC-MS (m/z) : 397.5 [M+H]<sup>+</sup>。

[0045] 第二步:将化合物6b (4.3g, 10.85mmol) 溶于无水四氢呋喃 (40mL) 中,冰浴下慢慢加入硼氢化锂 (354mg, 16.27mmol) 后升至室温反应30分钟,TLC显示反应完全。0℃下缓慢滴加氯化铵水溶液 (10mL) 至反应体系没有气泡,倒入水 (50mL) 中,乙酸乙酯 (50mL\*3) 萃取,有机相用饱和食盐水洗3次,无水硫酸钠干燥,过滤浓缩,残余物拌样过柱得化合物6c (2.3g), 产率57.5%。ESI-LC-MS (m/z) : 369.5 [M+H]<sup>+</sup>。

[0046] 第三步:将化合物6c (2.3g, 6.24mmol) 溶于乙腈 (20mL) 中,加入碳酸铯 (4g, 12.5mmol), 升温至70℃反应过夜,LC-MS监测反应完全,冷却到室温。反应体系经硅胶过滤,二氯甲烷淋洗,滤液浓缩得化合物6d (2g), 棕色油,收率90%。ESI-LC-MS (m/z) : 349.4 [M+H]<sup>+</sup>。

[0047] 第四步:将化合物6d (2g, 5.75mmol) 溶于甲醇 (20mL) 中,加入氨水 (5mL), 保险粉 (5.7g, 17.3mmol) 溶于水 (2mL) 中缓慢滴入反应体系中,30分钟后LC-MS监测反应完全,倒入水中 (50mL), 乙酸乙酯 (50mL\*3) 萃取,有机相用饱和食盐水洗3次,硫酸钠干燥,过滤浓缩得化合物6e (530mg), 棕色油,收率30%,ESI-LC-MS (m/z) : 319.6 [M+H]<sup>+</sup>。

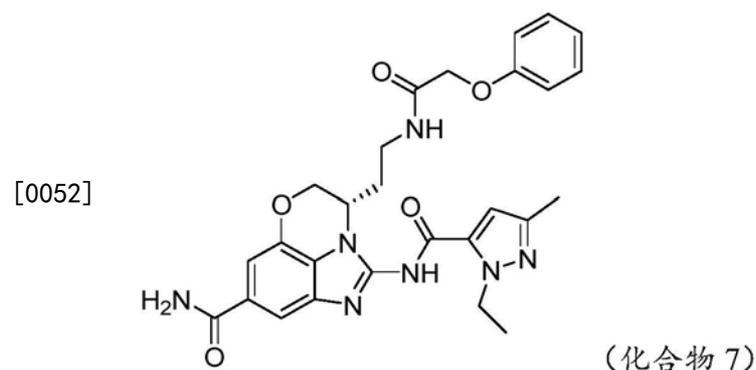
[0048] 第五步:取化合物6e (530mg, 1.67mmol) 溶于甲醇 (10mL) 中,加入溴化氰 (550mg, 5mmol), 室温反应过夜,LC-MS监测反应完全,反应液浓缩,残余物用硅胶柱层析纯化得化合

物6f (550mg), 棕色固体, 收率96.2%。ESI-LC-MS (m/z): 344.5 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.18 (d, J=0.9Hz, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.87 (t, J=7.1Hz, 2H), 4.58 (d, J=12.1Hz, 2H), 4.14 (d, J=10.3Hz, 1H), 3.05 (s, 2H), 1.81-1.64 (m, 2H), 1.37 (s, 9H)。

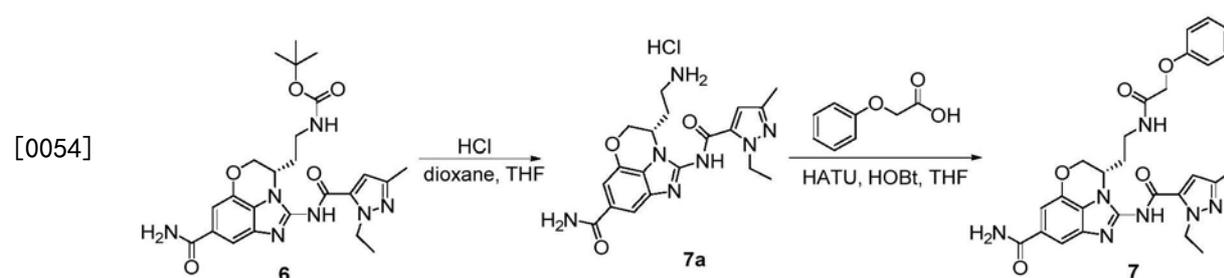
[0049] 第六步: 将化合物6f (550mg, 1.6mmol) 溶于四氢呋喃 (10mL) 中, 依次加入1-乙基-3-甲基吡唑-5-羧酸 (250mg, 1.6mmol), HOBt (219mg, 1.6mmol), HATU (617mg, 1.6mmol) 和TEA (0.67mL, 4.86mmol), 加完后室温反应过夜, LC-MS监测反应完全。反应液用水 (20mL) 稀释, 乙酸乙酯 (15mL\*3) 萃取, 有机相用饱和食盐水洗三次, 硫酸钠干燥, 过滤浓缩得化合物6g (700mg), 棕色油, 收率90%, ESI-LC-MS (m/z): 480.6 [M+H]<sup>+</sup>。

[0050] 第七步: 将化合物6g (20mg, 41.71umol) 溶于DMSO (2mL), 0℃下加入NaOH (5mg, 125.12umol), 后缓慢滴加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%wt in water, 0.2mL), 滴加完毕, 升至室温反应30分钟, LC-MS监测反应完全。反应液直接经反向制备色谱纯化获得化合物6 (6.8mg), 白色固体, 收率32.8%。ESI-LC-MS (m/z): 498.6 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 12.69 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.63 (dt, J=14.0, 8.7Hz, 4H), 4.26 (d, J=9.9Hz, 1H), 3.21-2.96 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.90 (d, J=7.0Hz, 2H), 1.36 (d, J=8.1Hz, 9H), 1.35 (d, J=7.1Hz, 3H)。

[0051] 实施例7



[0053] 化合物7由以下步骤制备:



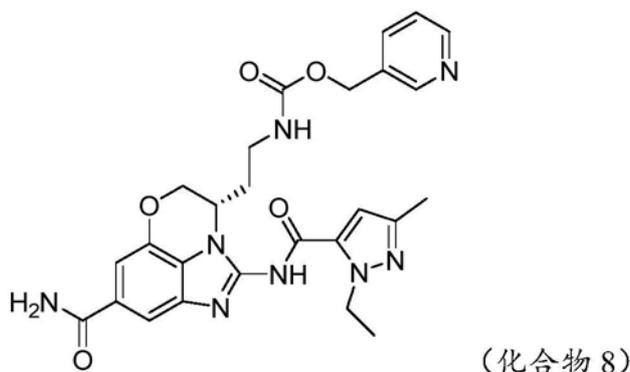
[0055] 第一步: 将化合物6 (530mg, 1.07mmol) 溶于四氢呋喃 (10mL) 中, 滴加氯化氢二氧六环溶液 (4N, 10mL), 室温反应过夜, LC-MS监测反应完全, 反应液浓缩得化合物7a (430mg), 淡黄色固体, 收率93%, ESI-LC-MS (m/z): 396.6 [M+H]<sup>+</sup>。

[0056] 第二步: 将化合物7a (50mg, 115.24umol) 溶于四氢呋喃 (5mL) 中, 依次加入苯氧乙酸 (17.5mg, 115.24umol), HOBt (17.1mg, 126.76umol), HATU (48.2mg, 126.76umol) 和TEA (35mg, 345.71umol), 加料完毕室温反应过夜, LC-MS监测反应完全。反应液直接通过反相制备色谱分离得到化合物7 (13.8mg), 白色固体, 收率22.53%。ESI-LC-MS (m/z): 532.5 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 12.69 (s, 1H), 8.23 (t, J=5.8Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.34 (s,

1H), 7.32-7.25 (m, 3H), 6.95 (t, J=7.8Hz, 3H), 6.68 (s, 1H), 4.70-4.56 (m, 4H), 4.45 (s, 2H), 4.26 (d, J=9.7Hz, 1H), 3.38 (d, J=7.2Hz, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.96 (dt, J=14.4, 7.2Hz, 2H), 1.34 (t, J=7.1Hz, 3H)。

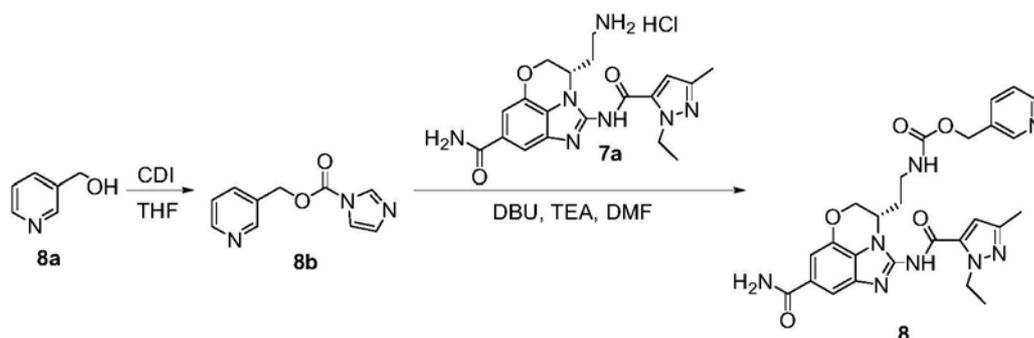
[0057] 实施例8

[0058]



[0059] 化合物8由以下步骤制备：

[0060]

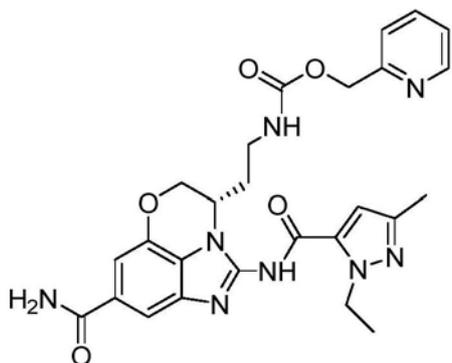


[0061] 第一步：将CDI (1.5g, 9.25mmol) 溶于无水四氢呋喃 (15mL) 中，滴加化合物8a (1g, 9.17mmol) 的四氢呋喃 (2mL) 溶液，滴加完毕，室温反应2小时，TLC显示反应完全。反应液加水 (30mL) 稀释，二氯甲烷 (15mL\*2) 萃取，有机相用饱和食盐水洗三次，硫酸钠干燥，过滤浓缩，残余物拌样过柱得化合物8b (1.2g)，白色固体，收率64%。ESI-LC-MS (m/z) : 204.6 [M+H]<sup>+</sup>。

[0062] 第二步：将化合物7a (30mg, 69.14umol) 加入到DMF (3mL) 中，依次加入三乙胺 (21mg, 207.43umol)，DBU (21mg, 138.28umol) 和8b (28.1mg, 138.28umol) 的DMF (0.5mL) 溶液，50℃反应过夜，LC-MS监测反应完全。反应液通过反向制备色谱分离得到化合物8 (12.6mg)，白色固体，收率34.22%。ESI-LC-MS (m/z) : 533.5 [M+H]<sup>+</sup>；<sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δppm 12.73 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 8.52 (d, J=3.6Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.74 (d, J=7.9Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.39 (dd, J=12.7, 7.4Hz, 2H), 7.34 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 5.06 (q, J=12.8Hz, 2H), 4.73-4.64 (m, 2H), 4.63-4.54 (m, 2H), 4.27 (d, J=10.9Hz, 1H), 3.27-3.20 (m, 1H), 3.20-3.08 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.94 (d, J=6.4Hz, 2H), 1.34 (t, J=7.1Hz, 3H)。

[0063] 实施例9

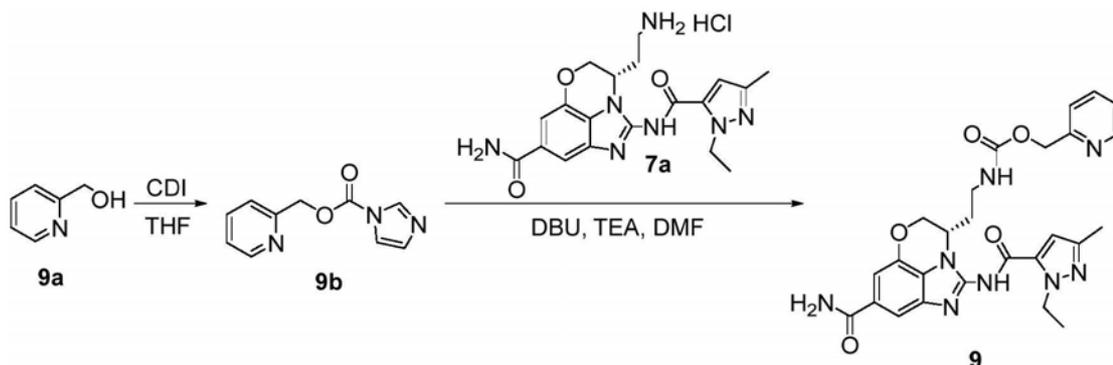
[0064]



(化合物 9)

[0065] 化合物9由以下步骤制备:

[0066]

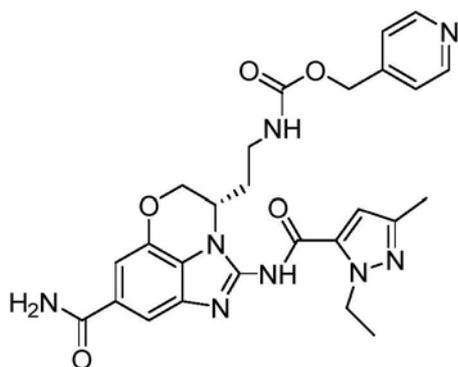


[0067] 第一步:将CDI (750mg, 4.63mmol) 溶于无水四氢呋喃 (10mL) 中,滴加化合物9a (500mg, 4.6mmol) 的四氢呋喃 (1mL) 溶液,滴加完毕,室温反应2小时,TLC显示反应完全。反应液加水 (20mL) 稀释,二氯甲烷 (10mL\*2) 萃取,有机相用饱和食盐水洗三次,硫酸钠干燥,过滤浓缩。残余物硅胶柱层析得化合物9b (560mg),淡黄色油,收率60%。ESI-LC-MS (m/z): 204.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0068] 第二步:将化合物7a (40mg, 92.19 $\mu$ mol) 加入到DMF (3mL) 中,依次加入三乙胺 (28mg, 276.57 $\mu$ mol), DBU (28mg, 184.38 $\mu$ mol) 和9b (37.5mg, 184.38 $\mu$ mol) 的DMF (0.5mL) 溶液,50 $^{\circ}$ C反应过夜,LC-MS监测反应完全。反应液通过反向制备色谱分离得到化合物9 (7.5mg),白色固体,收率15.28%。ESI-LC-MS (m/z): 533.3[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ ppm 12.75 (s, 1H), 8.52 (d, J=4.2Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.78 (t, J=7.6Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.33 (dd, J=14.6, 6.3Hz, 4H), 6.69 (s, 1H), 5.08 (q, J=13.6Hz, 2H), 4.74-4.64 (m, 2H), 4.60 (d, J=10.0Hz, 2H), 4.28 (d, J=10.0Hz, 1H), 3.26 (s, 1H), 3.20-3.11 (m, 1H), 2.11 (d, J=16.5Hz, 3H), 2.00-1.90 (m, 2H), 1.34 (t, J=7.1Hz, 3H)。

[0069] 实施例10

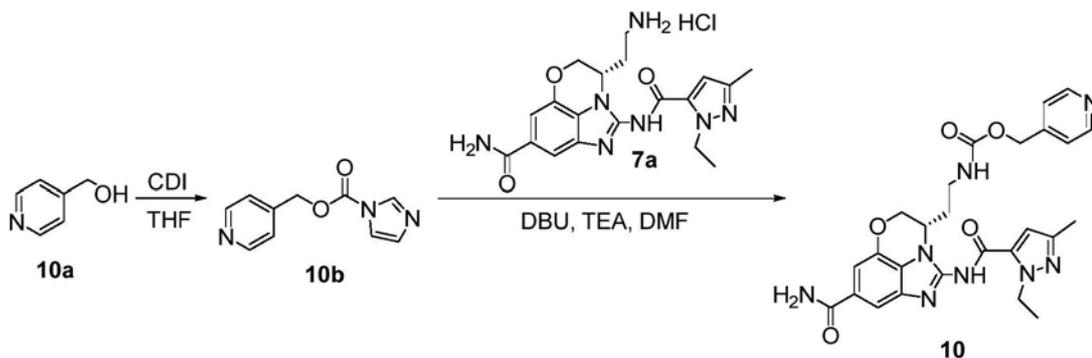
[0070]



(化合物 10)

[0071] 化合物10由以下步骤制备:

[0072]

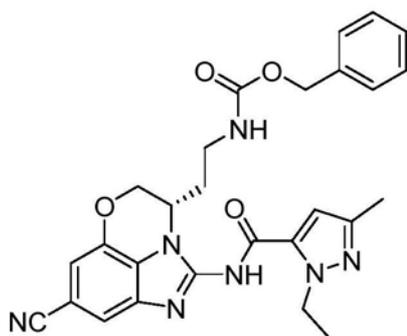


[0073] 第一步:将CDI (750mg, 4.63mmol) 溶于无水四氢呋喃 (100mL) 中,滴加10a (500mg, 4.6mmol) 的四氢呋喃 (1mL) 溶液,滴加完毕,室温反应2小时,点板显示反应完全。反应液加水 (20mL) 稀释,二氯甲烷 (10mL\*2) 萃取,有机相用饱和食盐水洗三次,硫酸钠干燥,过滤浓缩。残余物硅胶柱层析纯化得化合物10b (510mg),淡黄色油,收率54.6%。ESI-LC-MS (m/z): 204.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0074] 第二步:将化合物7a (40mg, 92.19 $\mu$ mol) 加入到DMF (3mL) 中,依次加入三乙胺 (28mg, 276.57 $\mu$ mol), DBU (28mg, 184.38 $\mu$ mol) 和10b (37.5mg, 184.38 $\mu$ mol) 的DMF (0.5mL) 溶液,50 $^{\circ}$ C反应过夜,LC-MS监测反应完全。反应液通过反向制备色谱分离得到化合物10 (13mg),白色固体,收率26.5%。ESI-LC-MS (m/z): 533.4[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.75 (s, 1H), 8.50 (dd, J=26.0, 15.3Hz, 2H), 7.93 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.53 (t, J=5.7Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.26 (dd, J=35.7, 18.7Hz, 3H), 6.69 (s, 1H), 5.07 (q, J=14.4Hz, 2H), 4.69 (dd, J=24.1, 11.5Hz, 2H), 4.60 (dd, J=14.0, 7.0Hz, 2H), 4.28 (d, J=9.8Hz, 1H), 3.25 (s, 1H), 3.20-3.11 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.96 (d, J=6.9Hz, 2H), 1.35 (t, J=7.1Hz, 3H)。

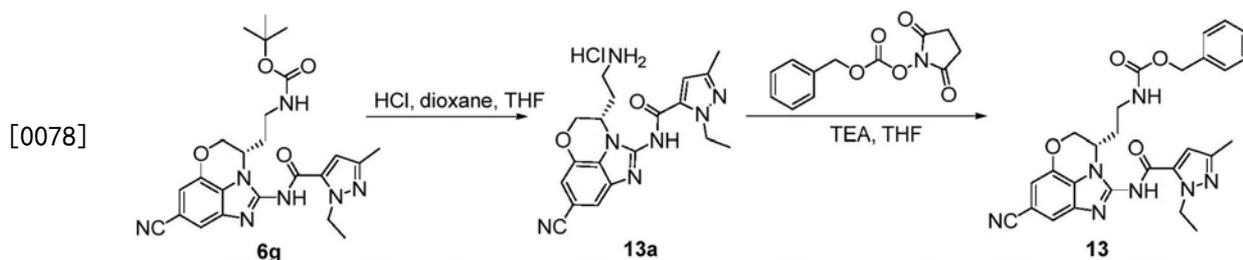
[0075] 实施例13

[0076]



(化合物 13)

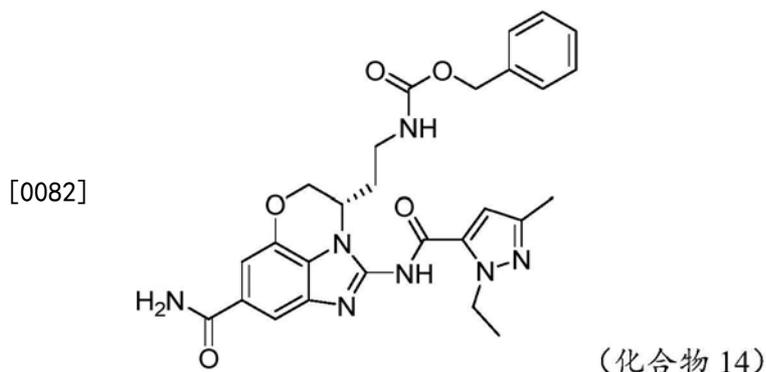
[0077] 化合物13由以下步骤制备:



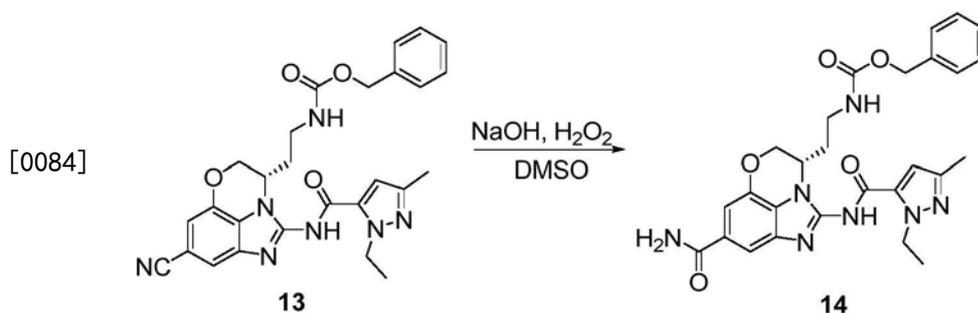
[0079] 第一步:将化合物6g (700mg, 1.46mmol) 溶于四氢呋喃 (10mL) 中,滴加氯化氢二氧六环溶液 (4M, 10mL), 室温反应过夜, LC-MS监测反应完全。反应液浓缩得化合物13a (610mg), 土黄色固体, 收率100%。ESI-LC-MS (m/z): 380.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0080] 第二步:取化合物13a (300mg, 721.37 $\mu$ mol) 加入到四氢呋喃 (10mL) 中, 依次加入苯甲氧羰基琥珀酰亚胺 (198mg, 793.51 $\mu$ mol) 和三乙胺 (219mg, 2.16mmol), 室温反应2小时, LC-MS监测反应完全。反应液直接浓缩, 残余物硅胶柱层析纯化得化合物13 (210mg), 淡黄色固体, 收率56.7%。ESI-LC-MS (m/z): 514.4[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>HNMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ ppm 12.85 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.33 (t, J=7.0Hz, 7H), 6.70 (s, 1H), 5.02 (q, J=12.8Hz, 2H), 4.70 (d, J=10.9Hz, 2H), 4.59 (d, J=7.0Hz, 2H), 4.31 (d, J=11.0Hz, 1H), 3.25 (dd, J=13.6, 6.7Hz, 1H), 3.16 (s, 1H), 2.12 (d, J=28.6Hz, 3H), 1.94 (d, J=7.7Hz, 2H), 1.34 (t, J=7.0Hz, 3H)。

[0081] 实施例14



[0083] 化合物14由以下步骤制备:

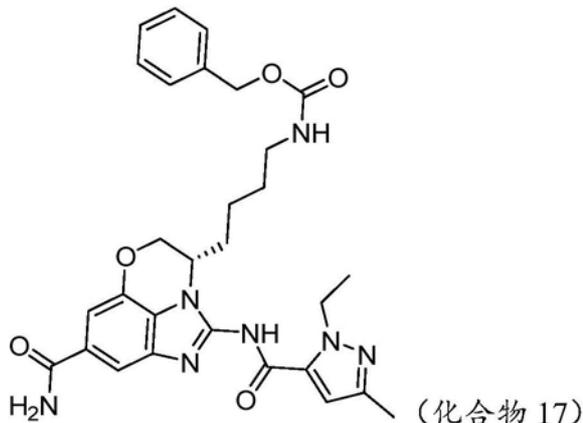


[0085] 第一步:将化合物13 (40mg, 77.89 $\mu$ mol) 溶于DMSO (2mL) 中, 加入氢氧化钠 (9mg, 233.67 $\mu$ mol), 0 $^{\circ}$ C下缓慢滴加30%双氧水 (0.6mL), 滴加完毕, 0 $^{\circ}$ C反应1小时, LC-MS监测反应完全。反应液直接通过反向制备色谱分离得到化合物14 (14mg), 白色固体, 收率34%。ESI-LC-MS (m/z): 532.4[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ ppm 12.74 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.43-7.24 (m, 8H), 6.69 (s, 1H), 5.02 (q, J=12.5Hz, 2H), 4.72-4.64 (m, 2H),

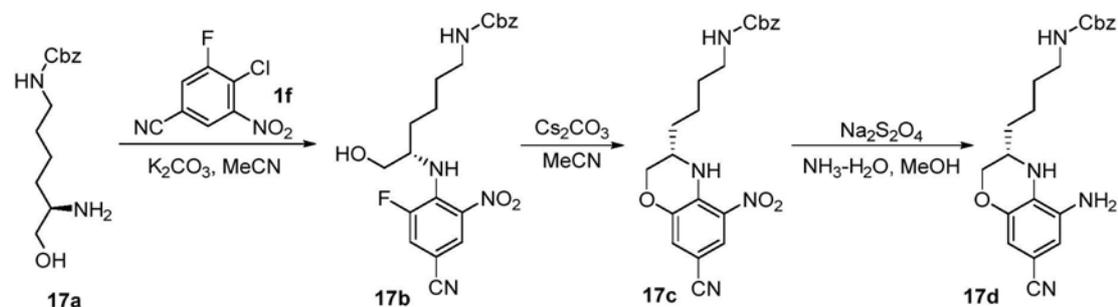
4.60 (dd,  $J=13.9, 6.9\text{Hz}$ , 2H), 4.27 (d,  $J=10.1\text{Hz}$ , 1H), 3.25 (dd,  $J=14.0, 7.0\text{Hz}$ , 1H), 3.14 (d,  $J=6.6\text{Hz}$ , 1H), 2.13 (d,  $J=32.1\text{Hz}$ , 3H), 1.94 (s, 2H), 1.35 (t,  $J=7.1\text{Hz}$ , 3H)。

[0086] 实施例17

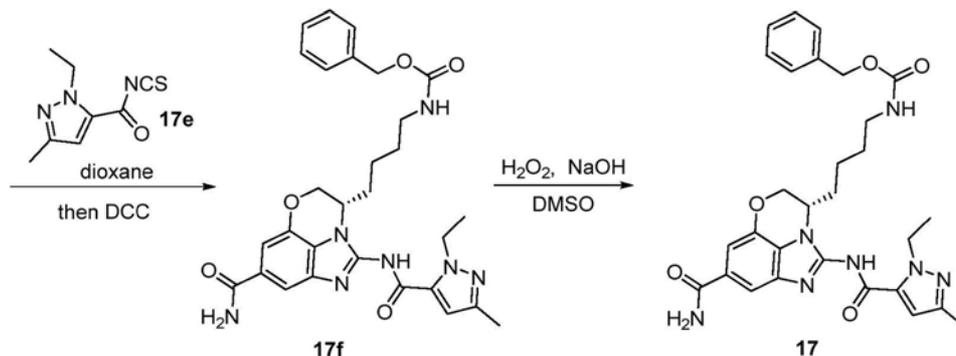
[0087]



[0088] 化合物17由以下步骤制备:



[0089]



[0090] 第一步:将化合物1f (6.0g, 30mmol) 和17a (16.0g, 60mmol) 溶于乙腈 (150mL) 中, 加入碳酸钾 (12.4g, 90mmol), 氮气保护下70℃反应24小时, TLC监测反应完全, 冷却到室温, 反应液通过硅胶垫过滤, 用二氯甲烷 (100mL) 洗固体, 滤液浓缩后通过硅胶柱层析分离纯化得化合物17b (8.2g), 黄色油, 产率63%。ESI-MS ( $m/z$ ): 431.2  $[M+H]^+$ 。

[0091] 第二步:将化合物17b (4.0g, 9.29mmol) 溶于乙腈 (150mL) 中, 加入碳酸铯 (9.08g, 27.88mmol)。氮气保护下70℃反应6小时, TLC监测反应完全, 体系通过硅藻土过滤, 浓缩得粗品17c (3.9g), 纯度68%, 直接用于下一步。ESI-MS ( $m/z$ ): 411.6  $[M+H]^+$ 。

[0092] 第三步:将化合物17c (3.9g, 由第二步反应得到) 溶于甲醇 (30mL) 中, 加入氨水 (5mL), 连二亚硫酸钠 (5.5g, 31.67mmol) 溶于水 (2mL) 中缓慢滴入反应体系中。30分钟后LC-MS监测反应完全, 倒入水 (50mL) 中, 乙酸乙酯 (50mL\*3) 萃取水相, 合并有机相, 用饱和食盐

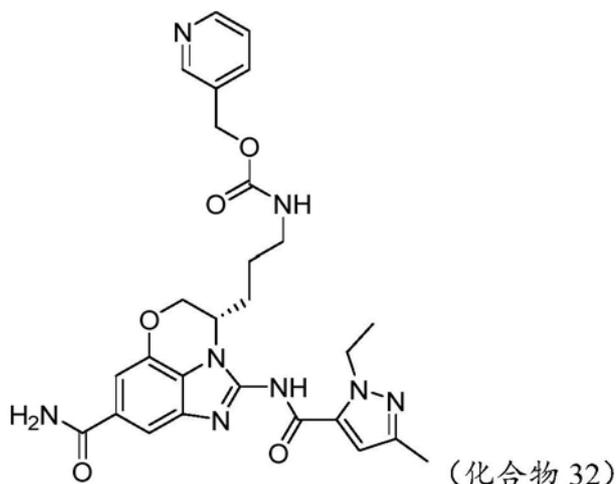
水洗1次,无水硫酸钠干燥,过滤,浓缩后通过硅胶柱层析分离纯化得化合物17d (1.2g),淡黄色固体,两步产率34%。ESI-MS (m/z) :381.6[M+H]<sup>+</sup>。

[0093] 第四步:将化合物17d (700mg, 1.84mmol) 溶于1,4-二氧六环 (10mL) 中,加入17e (333mg, 1.84mmol), 在室温下反应1小时,然后加入DCC (379mg, 1.84mmol), 6小时后LC-MS监测反应结束。将反应液通过硅藻土过滤,用乙酸乙酯 (10mL\*3) 洗涤滤饼,滤液浓缩得粗品17f (970mg), 纯度61%, 未作进一步纯化,直接用于下一步。

[0094] 第五步:将粗品17f (700mg, 由第四步反应得到) 溶解在二甲基亚砜 (5mL) 中,加入氢氧化钠 (200mg, 5mmol), 在0℃缓慢滴加30%双氧水 (0.5mL), 30分钟后反应结束。将反应液通过液相制备HPLC纯化得到17 (400mg)。ESI-MS (m/z) :560.4[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ12.72 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.38-7.27 (m, 7H), 7.21 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 4.96 (s, 2H), 4.68-4.55 (m, 4H), 4.30-4.21 (m, 1H), 3.04-2.93 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.86-1.73 (m, 2H), 1.52-1.40 (m, 4H), 1.35 (t, J=7.0Hz, 3H)。

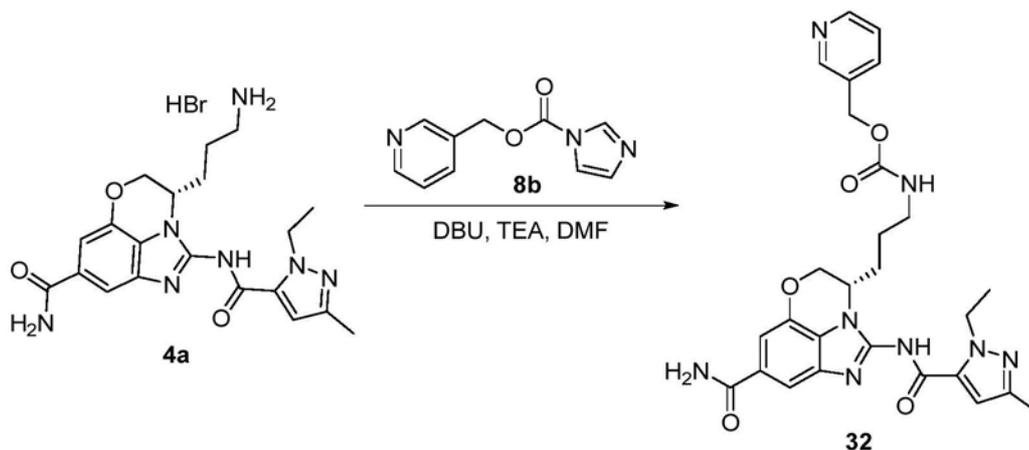
[0095] 实施例32

[0096]



[0097] 化合物32由以下步骤制备:

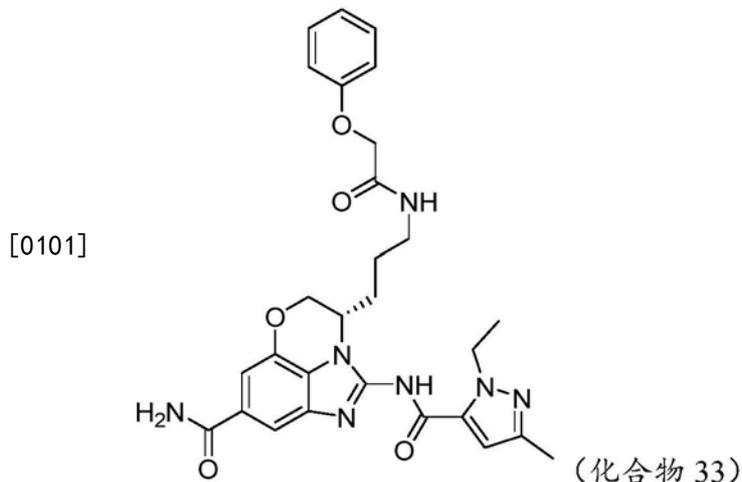
[0098]



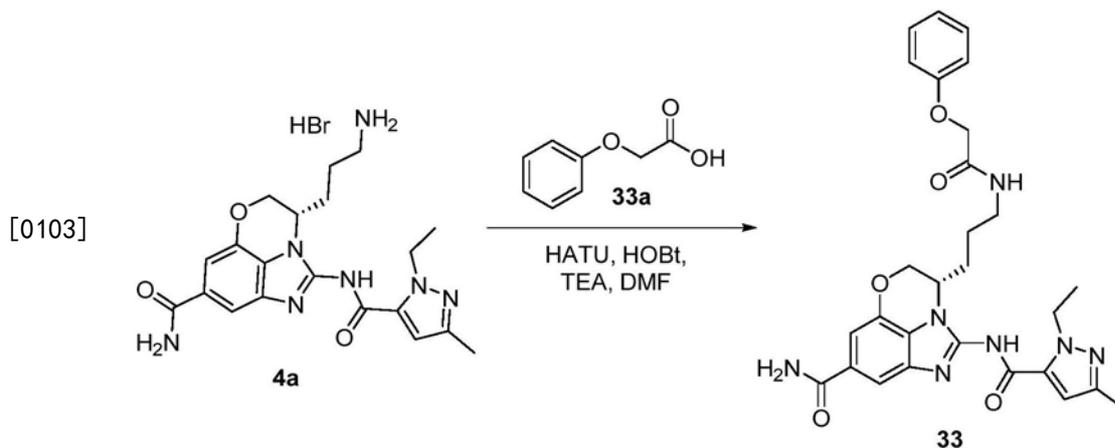
[0099] 第一步:将化合物4a (100mg) 和化合物8b (103mg, 0.51mmol) 溶于N,N-二甲基甲酰胺 (3mL), 加入三乙胺 (77mg, 0.76mmol) 和1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯 (77mg, 0.51mmol), 50℃搅拌过夜, LC-MS显示原料反应完全。向反应液加入水 (15mL), 然后用乙酸乙酯 (15mL\*3) 萃取分液, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩, 残余物经反相制备HPLC纯化得化合物32 (18mg), 白色固体。ESI-MS (m/z) :547.5[M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO) δ

12.61 (br s, 1H), 8.53 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.70 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.39-7.26 (m, 4H), 6.65 (s, 1H), 5.10-4.95 (m, 2H), 4.71-4.50 (m, 4H), 4.26 (d, J=11.5Hz, 1H), 3.13-2.97 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.84-1.77 (m, 2H), 1.62-1.53 (m, 2H), 1.35 (t, J=6.2Hz, 3H)。

[0100] 实施例33



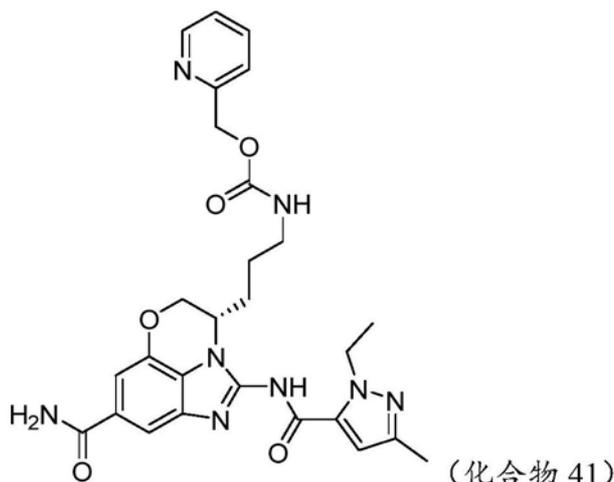
[0102] 化合物33由以下步骤制备:



[0104] 第一步:将化合物33a (58mg, 0.38mmol), HATU (144mg, 0.38mmol) 和HOBt (26mg, 0.19mmol) 溶于N,N-二甲基甲酰胺 (3mL) 中, 室温搅拌30分钟后, 加入三乙胺 (57mg, 0.57mmol), 搅拌10分钟后, 加入化合物4a (100mg), 室温搅拌过夜。LC-MS监测原料反应完毕, 反应液直接用反向制备HPLC纯化得到化合物33 (15mg), 白色固体。ESI-MS (m/z): 546.5 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO) δ12.71 (s, 1H), 8.11-8.04 (m, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.27-7.20 (m, 2H), 6.97-6.85 (m, 3H), 6.66 (s, 1H), 4.72-4.55 (m, 4H), 4.45-4.35 (m, 2H), 4.26 (d, J=11.5Hz, 1H), 3.26-3.19 (m, 1H), 3.18-3.11 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.84-1.70 (m, 2H), 1.68-1.54 (m, 2H), 1.36 (t, J=7.0Hz, 3H)。

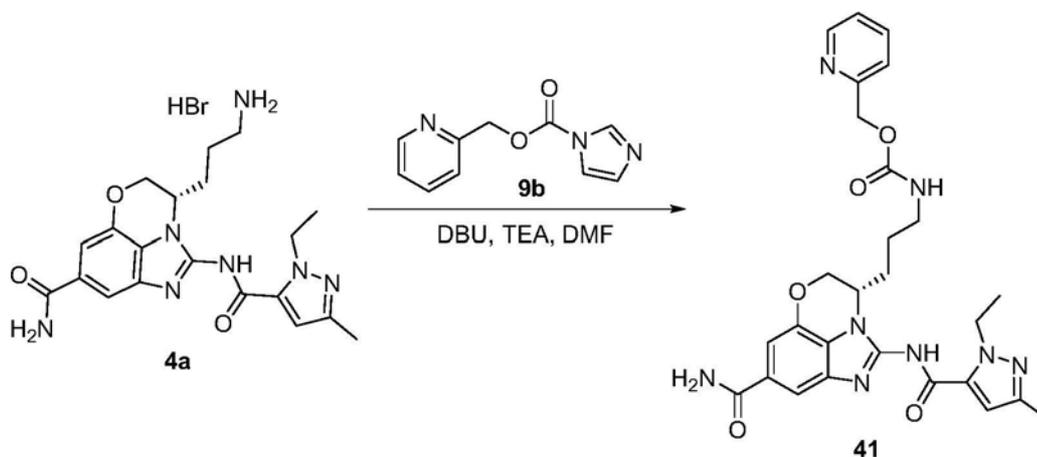
[0105] 实施例41

[0106]



[0107] 化合物41由以下步骤制备:

[0108]



[0109] 第一步:将化合物4a (100mg) 和化合物9b (103mg, 0.51mmol) 溶于N,N-二甲基甲酰胺 (3mL), 加入三乙胺 (64mg, 0.64mmol) 和1,8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯 (77mg, 0.51mmol), 50°C 搅拌过夜。LC-MS显示原料反应完全。向反应液中加入水 (15mL), 然后用乙酸乙酯 (15mL\*3) 萃取分液, 合并有机相, 用无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩, 残留物通过硅胶柱层析分离纯化得化合物41 (15mg), 白色固体。ESI-MS ( $m/z$ ): 547.3 [M+H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500MHz, DMSO)  $\delta$  8.49 (d, J=3.9Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.73 (t, J=7.0Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.40-7.22 (m, 5H), 6.64 (s, 1H), 5.11-4.95 (m, 2H), 4.69-4.54 (m, 4H), 4.26 (d, J=12.0Hz, 1H), 3.12-3.01 (mbr, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.86-1.78 (m, 2H), 1.67-1.56 (m, 2H), 1.35 (t, J=7.5Hz, 3H)。

[0110] 试验例1: 化合物对STING野生型 (WT) 和HAQ亚型激动能力的检测 (方法1)

[0111] STING-232H质粒购买自Origene (RC208418), 并在此质粒的基础上构建STING野生型以及HAQ型 (HAQ型氨基酸突变为R71H, G230A, R293Q) 表达质粒。使用表达STING变体 (野生型和HAQ型) 的质粒转染HEK-Blue<sup>TM</sup> ISG-KO-STING (Invivogen, cat#hkb-kostg) 细胞来检测化合物对STING的激活作用 (参见W02017/175147A1)。GFP (VT2069) 质粒购买自优宝生物。具体操作如下: 第一天以每孔1ng的质粒 (WT, HAQ, GFP), 分别在96孔板中转染HEK-Blue<sup>TM</sup> ISG-KO-STING细胞, 每孔细胞数量为 $0.8 \times 10^5$  细胞, 并控制每孔lipofectamine2000 (Invitrogen, Cat#11668-027) 量为0.1 $\mu$ l。转染24h后更换培养基并加入合适浓度的测试化合物, 控制DMSO浓度为0.5%。孵育24h后取上清, 采用Great EscAPE SEAP

chemiluminescence KIT (Clontech, cat#631738) 进行SEAP检测, 细胞采用CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, cat#G7573) 检测细胞活性。SEAP检测和CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay检测都依据试剂盒操作说明进行。数据采用化合物的刺激信号与0.5%DMSO的信号的比例描述。

化合物	HEK-Blue™ ISG-KO-Sting/variants reporter assay		
	浓度 (μM)	Fold change related to DMSO control	
		WT	HAQ
7	115.2	2.70	13.64
8	73.3	3.47	13.17
9	206.6	2.86	21.28
14	25	1.59	27.44
17	25	1.76	37.64
32	25	1.45	2.88
33	25	2.49	20.81

[0112] 试验例2: 化合物刺激THP1细胞释放IFNβ。

[0114] 本实验通过检测化合物刺激THP1细胞产生IFNβ的能力来评估其激活STING的能力。THP1细胞购买自中科院细胞所 (Cat#TCHu 57)。根据化合物的溶解度设置起始浓度点, 并以3倍稀释设置8个浓度点, 用培养基稀释成2×工作液, DMSO浓度0.2%。取对数生长期的THP1细胞用培养基稀释成 $2 \times 10^6$  cells/ml, 每孔加入50ul细胞悬液后再加50ul稀释好的化合物, 使得DMSO浓度为0.1%。充分混匀后放入37℃, 5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中孵育24h收集上清。用human IFNβ ELISA KIT (R&D, DY814-05) 检测上清中的IFNβ。最终的数据用GraphPad Prism或者XLfit进行曲线拟合并计算EC50。

化合物	hIFNβ ELISA (EC50, μM)
7	inactive
8	inactive
9	inactive
14	NT
17	NT
32	inactive
33	inactive