

HPK1 抑制剂在治疗干扰素相关疾病中的应用

技术领域

5 本发明涉及生物医药领域。具体地说，本发明的涉及 HPK1 抑制剂在治疗干扰素相关疾病，特别是通过恢复或增强 IFN-β 信号通路来治疗病毒感染中的应用。

背景技术

造血祖细胞激酶 1(HPK1)也称为丝裂原激活的蛋白激酶激酶激酶(MAP4K1)，其是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。它参与各种细胞事件，包括促分裂原活化蛋白激酶信号传导，核因子 κB 信号传导，细胞因子信号传导，细胞增殖和凋亡，T 细胞受体/ B 细胞受体信号传导和 T / B /树突状细胞介导的免疫应答。HPK1 主要表达于血液细胞中。在 T 细胞里，HPK1 是 T 细胞受体(TCR)信号的负调节因子，负责抑制免疫响应。TCR 激活导致 HPK1 在细胞膜的招募，随后通过磷酸化 Tyr281\Ser171\Thr165 位点活化。活化的 HPK1 通过磷酸化 SLP76 蛋白的 Ser276 位点，破坏 TCR 信号复合物稳定，从而抑制 T 细胞的激活与增殖。与此同时，HPK1 活化还会抑制干扰素 γ(IFN-γ)分泌。在一系列肿瘤免疫动物模型中，HPK1 敲除/敲低，或者使用 HPK1 抑制剂，都能够有效地阻止 HPK1 对于免疫系统的压制，提高机体免疫，从而增强抗肿瘤效果(Hernandez 等，Cell Reports, 2018)。另一方面，在感染淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)的小鼠中，感染后 21 天后，HPK1 敲低的小鼠血浆中的病毒滴度显著低于野生型小鼠，提示抑制 HPK1 活性或可成为一种新的抗病毒治疗途径。杨森公司(Janssen Sciences Ireland Unlimited Company)申请的专利 (WO2020255022)表明，联合使用乙肝疫苗(HBV)和 HPK1 小分子抑制剂或可成为治愈乙型肝炎的有效疗法。

25 尽管有上述研究基础，迄今为止，HPK1 激酶与病毒感染的内在机制尚未得到阐明；同时尚未有报道探索 HPK1 小分子抑制剂作为广谱抗病毒药物单独或联合使用（非疫苗佐剂）用于病毒相关疾病治疗。

发明内容

30 本发明的目的在于提供一系列新型的 HPK1 抑制剂，这些 HPK1 抑制剂可以用作干扰素相关疾病，特别是病毒感染的治疗药物。

在第一方面，本发明提供 HPK1 抑制剂在制备治疗干扰素相关疾病，或提高免疫力的药物中的应用。

在优选的实施方式中，所述干扰素是 IFN-β 和/或 IFN-γ。

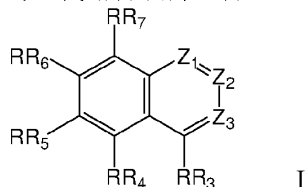
在优选的实施方式中，所述药物是 IFN-β 和/或 IFN-γ 信号通路增强剂。

35 在具体的实施方式中，所述干扰素相关疾病是病毒感染。

在优选的实施方式中，所述病毒感染是 IFN-β/IFN-γ 对其有治疗和/或预防作用的病毒感

染。

在具体的实施方式中，HPK1 抑制剂是式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、互变异构体、前药、代谢物或衍生物，



5 式中， Z_1 选自 N 或 C- RR_1 ；

Z_2 和 Z_3 分别选自 N 或 C- RR_2 ，其中 Z_2 和 Z_3 不相同；

RR_1 选自氢、卤素、氰基、羟基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-6} 环烷基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基、取代或未取代的氨基或取代或未取代的酰氨基；

RR_2 选自取代或未取代的羟基、取代或未取代的氨基、或取代或未取代的巯基；

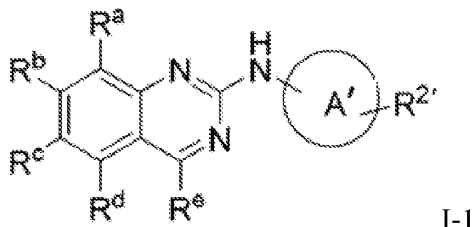
10 RR_3 选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基、取代或未经取代的氨基或取代或未取代的酰氨基；

RR_4 、 RR_5 、 RR_6 、 RR_7 分别独立选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基、取代或未经取代的氨基、取代或未取代的酰氨基、取代或未取代的 C_{5-10} 杂芳基或 RR_8 - Z_4 ；

15 RR_8 选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环基或取代或未取代的羟基；

Z_4 选自 -O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、羰基、羰基氨基或氨基羰基。

在具体的实施方式中，式 I 所示化合物是下式 I-1 所示的化合物：



20 式中， R^a 、 R^b 、 R^c 、 R^d 之一为 $R^{1'}$ - X' ，其余各自独立地选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基；

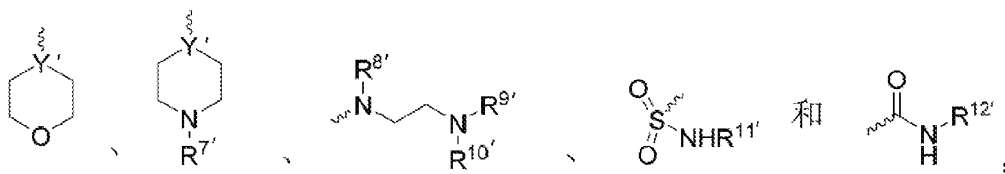
R^e 选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基、或取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基；

X' 选自 -O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、羰基、羰基氨基或氨基羰基；

25 $R^{1'}$ 为取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环基或者 $R^{14'}$ -O-(CH₂)_m-，其中 m 为 0、1、2、3、4 或 5， $R^{14'}$ 为取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基；

A' 环为取代或未取代的芳基(优选取代或未取代的苯基)或取代或未取代的 5-6 元杂芳基，其中，所述杂芳基具有 1-4 个选自 O、S 或 N 的杂原子；

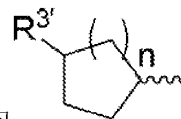
$R^{2'}$ 选自以下取代基:



- 其中 Y' 为 C 或者 N, $R^{7'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{8'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{9'}$ 和 $R^{10'}$ 独立地为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{11'}$ 为 H、取代或未取代的氨基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{12'}$ 为取代或未取代的 4-6 元杂环基。

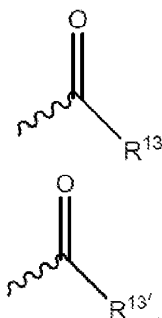
在优选的实施方式中, 所述 $R^{1'}$ 为取代或未取代的 5-8 元环烷基或取代或未取代的 5-8 元杂环基, 其中所述的杂环基具有 1-4 个选自 O、S 或 N 的杂原子。

- 10 在优选的实施方式中, 当 $R^{1'}$ 为取代的 5-8 元环烷基时, 所述 $R^{1'}$ 为



中 n 为 1、2、3 或 4;

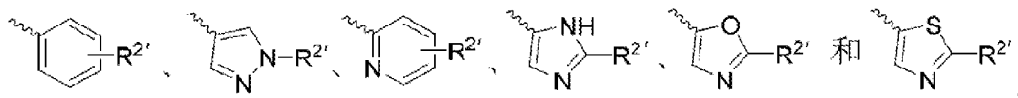
所述 $R^{3'}$ 为 $-OR^{4'}$ 或者 $-NR^{5'}R^{6'}$, 其中 $R^{4'}$ 为 H、



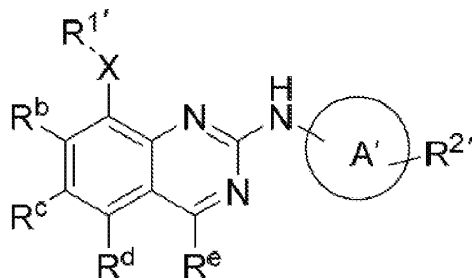
或取代或未取代的环烷基, $R^{5'}$ 和 $R^{6'}$ 独立地为 H、或取代或未取代的环烷基, 其中 $R^{5'}$ 和 $R^{6'}$ 不同时为取代或未取代的环烷基。

- 15 所述 $R^{13'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基。

在优选的实施方式中, 所述 A 环选自以下基团:



在具体的实施方式中, 式 I-1 所示化合物如式 I-1-1 所示,



I-1-1

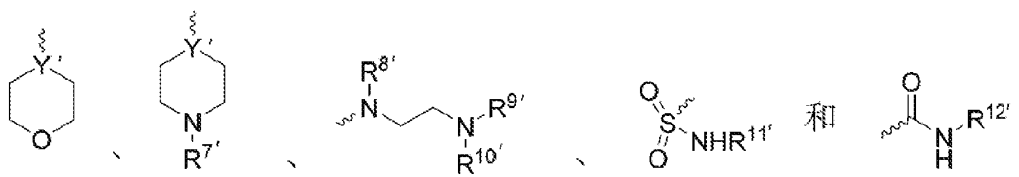
式中, R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 各自独立地选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基;

X' 选自 -O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、羰基、羰基氨基或氨基羰基;

$R^{1'}$ 为取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环基或者 $R^{14'}$ -O-(CH₂)_m-, 其中 m 为 0、1、2、3、4 或 5, $R^{14'}$ 为取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基;

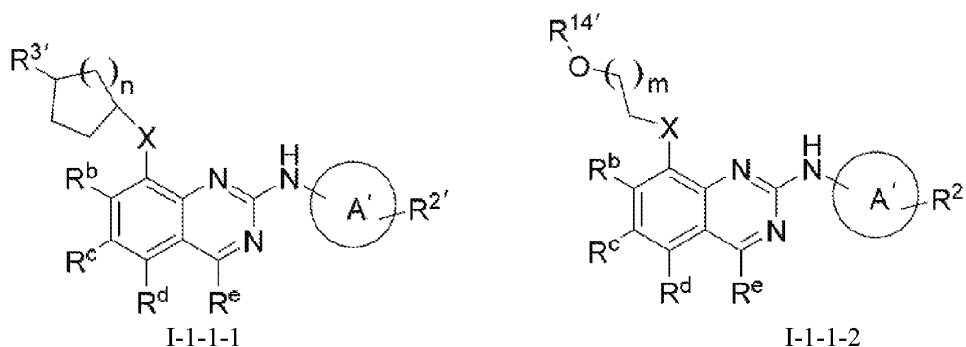
A' 环为取代或未取代的芳基(优选取代或未取代的苯基)或取代或未取代的 5-6 元杂芳基, 其中, 所述杂芳基具有 1-4 个选自 O、S 或 N 的杂原子;

$R^{2'}$ 选自以下取代基:



其中 Y' 为 C 或者 N, $R^{7'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{8'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{9'}$ 和 $R^{10'}$ 独立地为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{11'}$ 为 H、取代或未取代的氨基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{12'}$ 为取代或未取代的 4-6 元杂环基。

在具体的实施方式中, 式 I-1 所示化合物如式 I-1-1-1 或 I-1-1-2 所示,



式中, R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 各自独立地选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基;

X 选自 -O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、羰基、羰基氨基或氨基羰基;

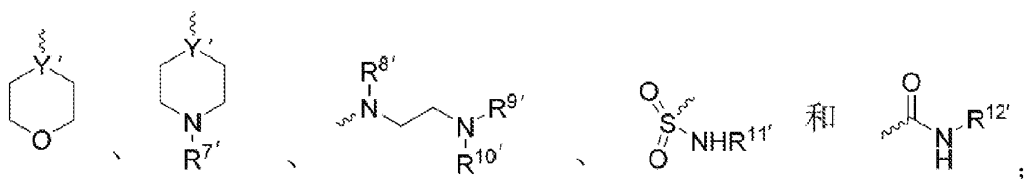
n 为 1、2、3 或 4,

m 为 0、1、2、3、4 或 5,

$R^{14'}$ 为取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基;

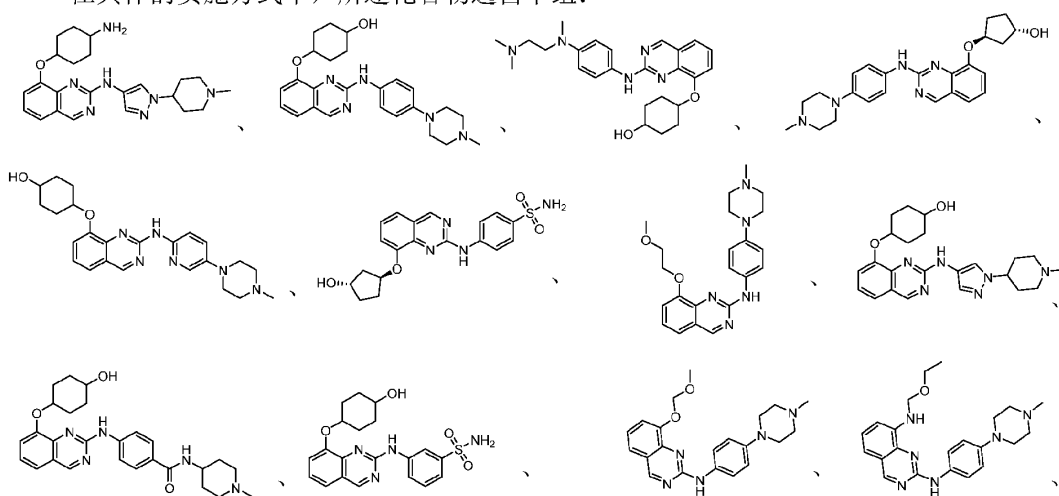
A' 环为取代或未取代的芳基(优选取代或未取代的苯基)或取代或未取代的 5-6 元杂芳基, 其中, 所述杂芳基具有 1-4 个选自 O、S 或 N 的杂原子;

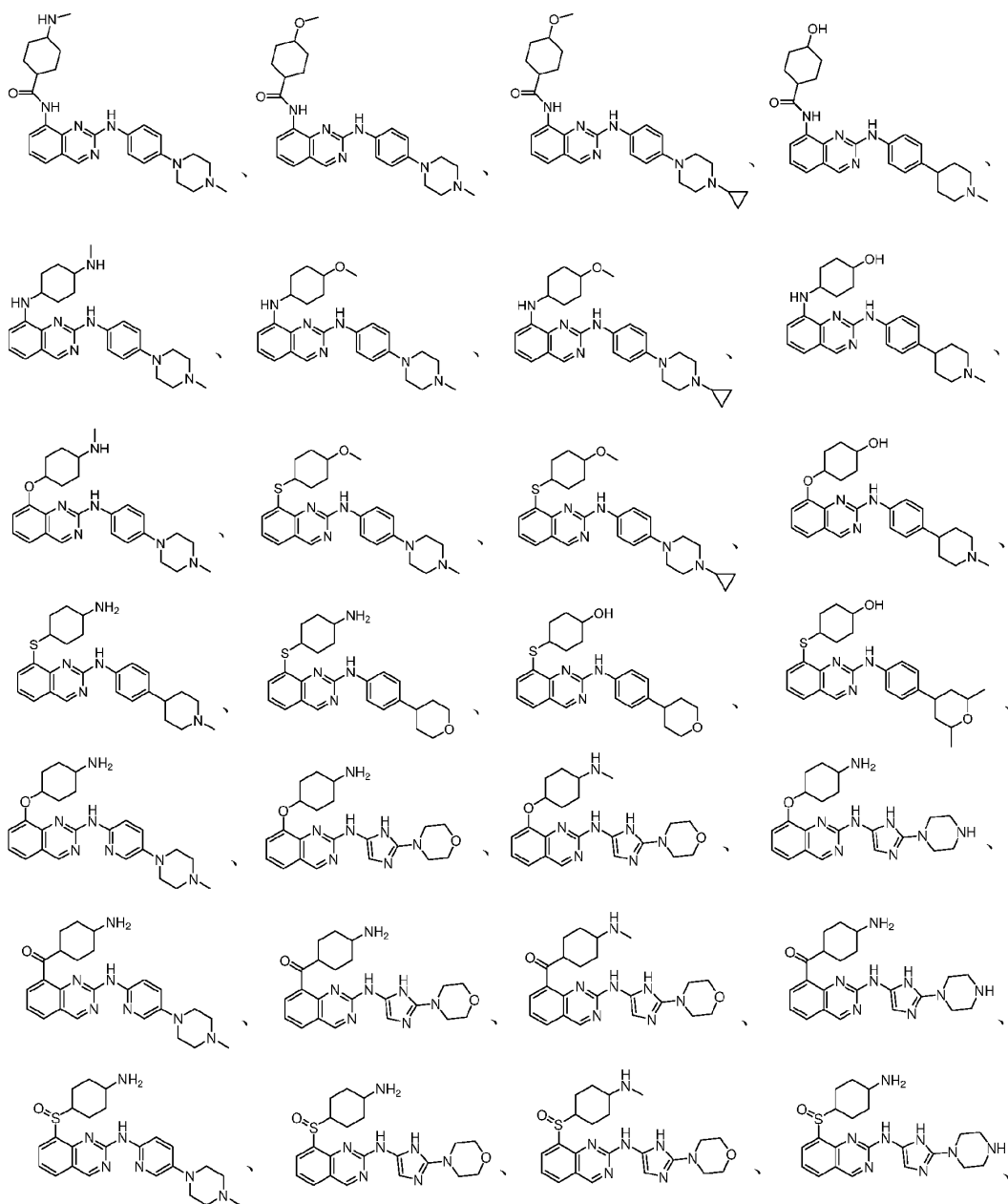
$R^{2'}$ 选自以下取代基:

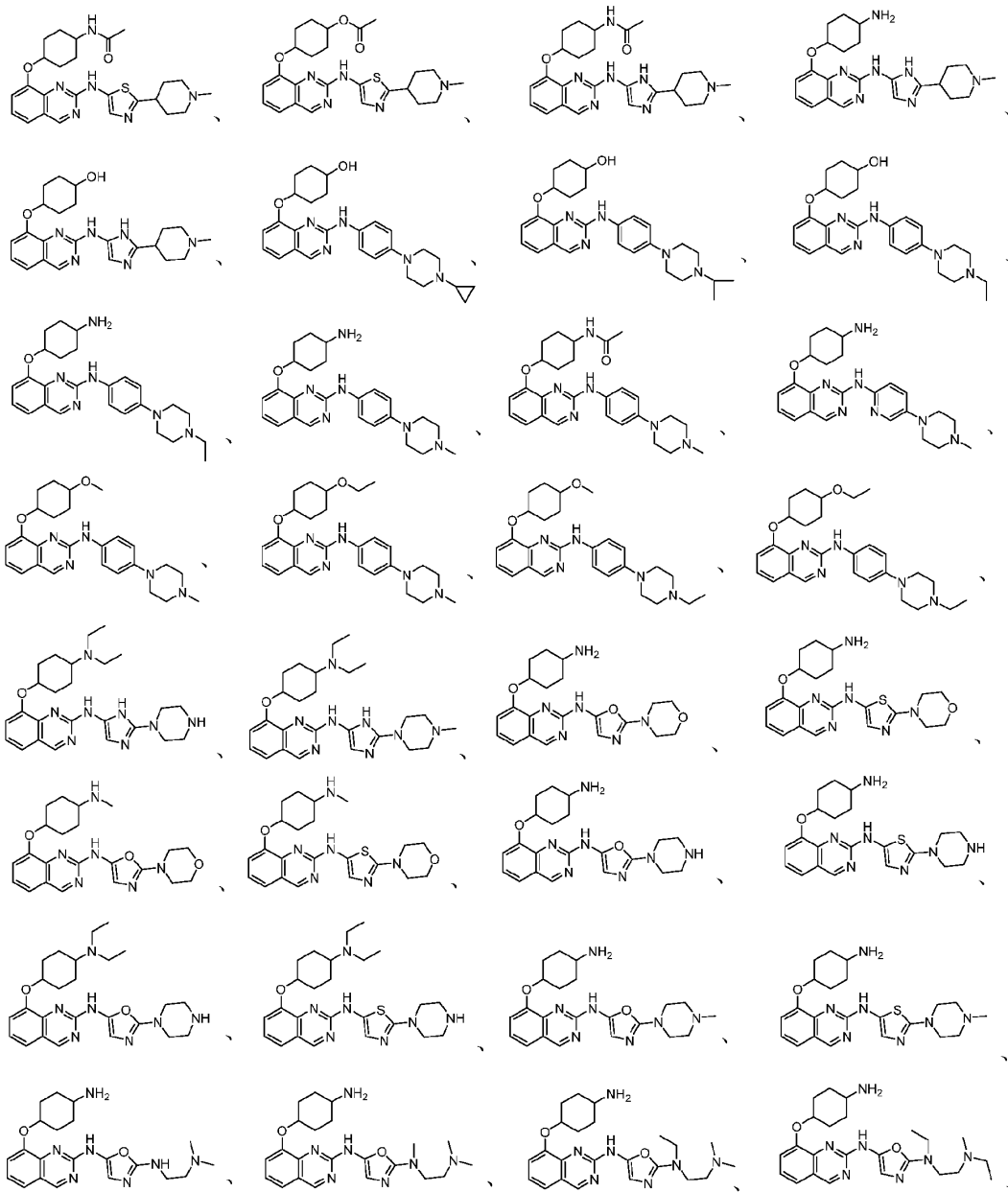


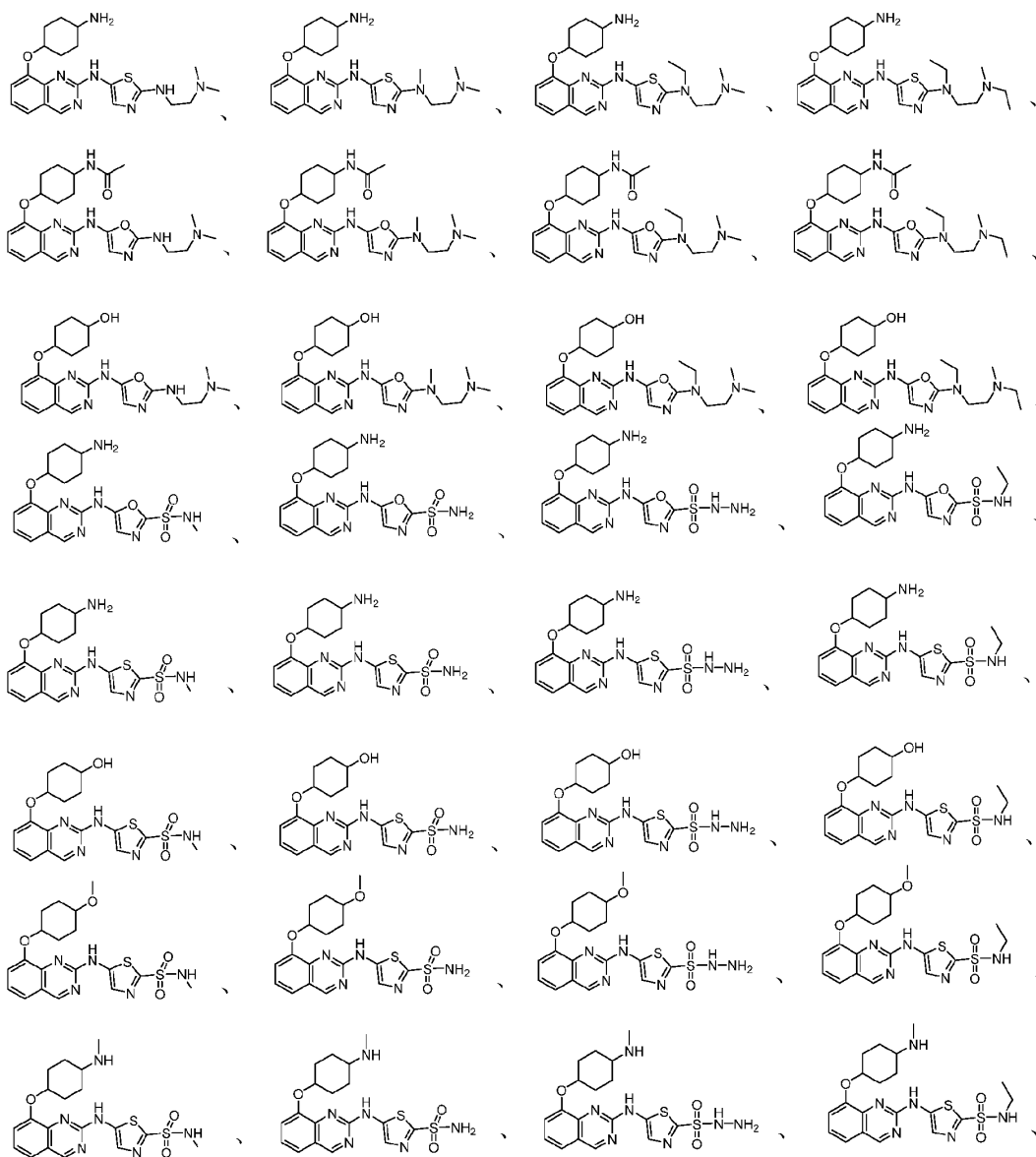
其中 Y' 为 C 或者 N, $R^{7'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{8'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{9'}$ 和 $R^{10'}$ 独立地为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{11'}$ 为 H、取代或未取代的氨基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{12'}$ 为取代或未取代的 4-6 元杂环基。

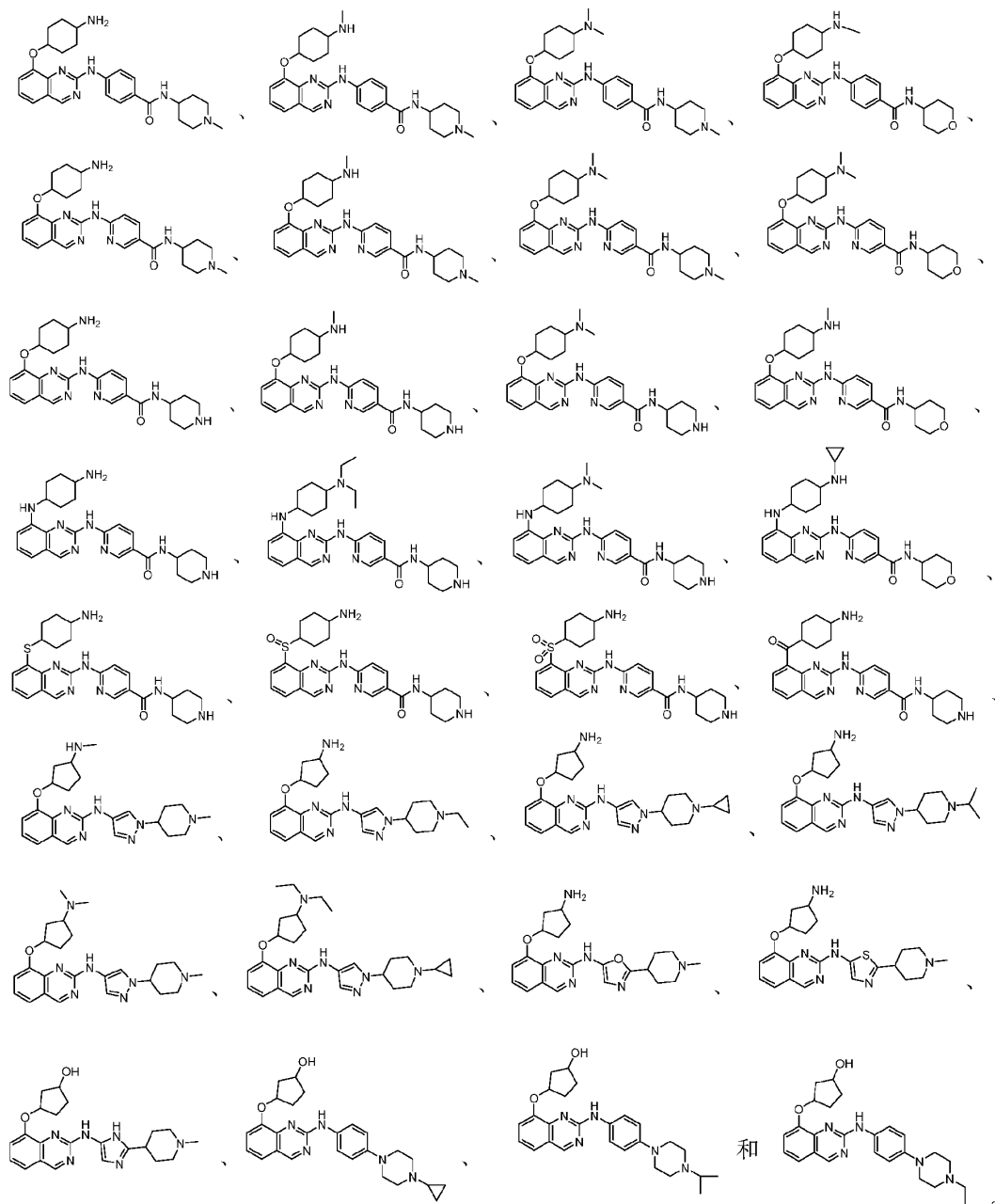
在具体的实施方式中, 所述化合物选自下组:



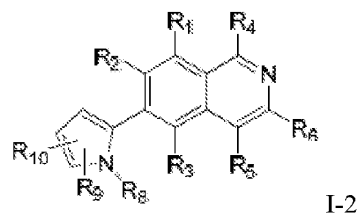






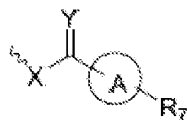


在具体的实施方式中，式 I 所示化合物是下式 I-2 所示的化合物：



R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 和 R_5 各自独立地选自：氢、卤素、氰基、羟基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-6} 环烷基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基、取代或未取代的氨基或取代或未取代的酰氨基，且 R_1 和 R_2 不为氢；

R_6 为：



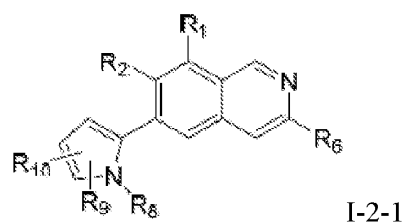
5

X 为 O 或者 NH 或者 S ， Y 为 O 或者 NH 或者 S ， A 环为取代或未取代的 C_{3-6} 环烷基或者取代或未取代的 C_{6-10} 芳基或者取代或未取代的 C_{5-10} 杂芳基，所述杂芳基是指含有一个或者多个 N 、 O 或者 S 杂原子的芳基， R_7 为各类环上的单或者多取代，包括卤素、氰基、羟基、氨基、酰胺基、支链的或直链的 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 杂环基、 C_{6-10} 芳基、 C_{5-10} 杂芳基或 $-C(O)R'$ ，所述 R' 为 C_{3-6} 杂环基、 C_{6-10} 芳基或者 C_{5-10} 杂芳基，所述 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基、 C_{2-6} 炔基、 C_{3-6} 杂环基、 C_{6-10} 芳基和 C_{5-10} 杂芳基还包含各类单或者多取代，包括氢、羟基、卤素、氰基、氨基、 $-CHF_2$ 、 $-CF_3$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2CH_2OH$ 或 $-CONH_2$ ；或者， R_7 与 A 环一起形成取代或未取代的稠环基、桥环基、杂桥环基、螺环基或杂螺环基；

R_8 、 R_9 和 R_{10} 各自独立地选自：

- 15 i. 氢、羟基、卤素、氰基、氨基、二(C_{1-6} 烷基)氨基、单(C_{1-6} 烷基)氨基或 C_{1-6} 烷氧基；
- ii. 支链的或直链的 C_{1-6} 烷基、 C_{2-6} 烯基或 C_{2-6} 炔基，所述烷基、烯基和炔基还包含各类单或者多取代，包括氢、羟基、卤素、氰基、氨基、 $-CHF_2$ 、 $-CF_3$ 、二(C_{1-6} 烷基)氨基、单(C_{1-6} 烷基)氨基、 C_{3-6} 环烷基或 C_{1-6} 烷氧基；
- iii. C_{3-6} 环烷基、 C_{3-6} 杂环基、 C_{6-10} 芳基或 C_{5-10} 杂芳基，所述环烷基、杂环基、芳基或
- 20 杂芳基包含各类单或者多取代，包括氢、 C_{1-6} 烷基、羟基、卤素、氰基、氨基、 $-CHF_2$ 或 $-CF_3$ 。

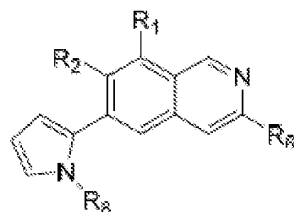
在具体的实施方式中，式 I-2 所示化合物如式 I-2-1 所示：



I-2-1

式中， R_1 、 R_2 、 R_6 、 R_8 、 R_9 和 R_{10} 各自如上文定义。

在具体的实施方式中，式 I-2 所示化合物如式 I-2-2 所示：



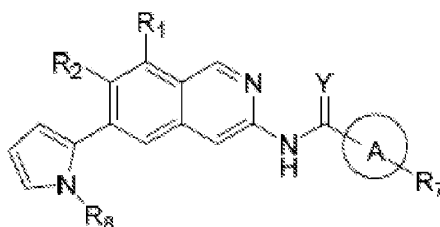
I-2-2

25

式中, R_1 、 R_2 、 R_6 和 R_8 各自如上文定义。

在优选的实施方式中, X 是 NH。

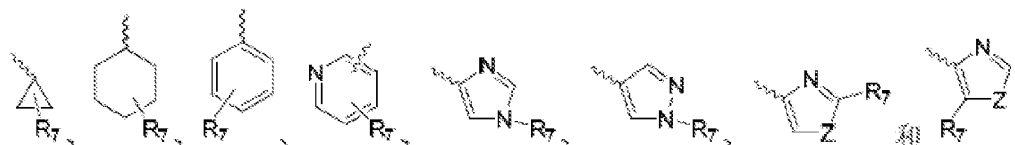
在具体的实施方式中, 式 I-2 所示化合物如式 I-2-3 所示:



I-2-3

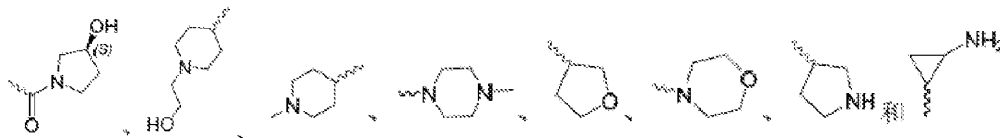
式中, R_1 、 R_2 、 R_8 和 A 环各自如上文定义。

在优选的实施方式中, 所述 A 环选自:

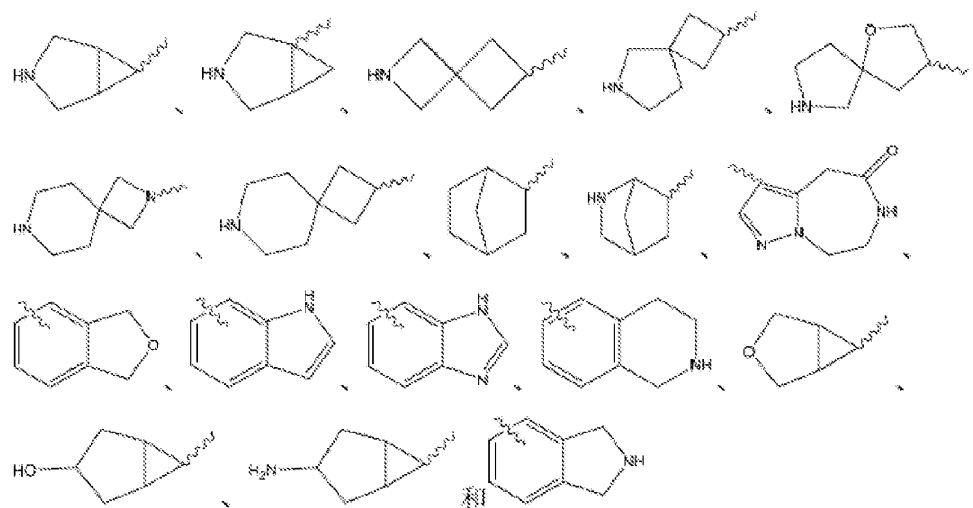


其中, Z 为 O 或者 S。

10 在优选的实施方式中, R_7 选自: 卤素、氰基、羟基、氨基、酰胺基、甲基、乙基、异丙基、环丙基、乙烯基、乙炔基、



在优选的实施方式中, 所述 A 环与 R_7 一起形成选自下组的任选取代的稠环基、桥环基、杂桥环基、螺环基或杂螺环基:



15

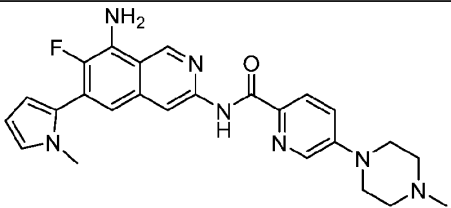
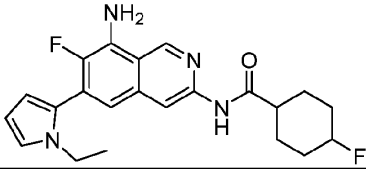
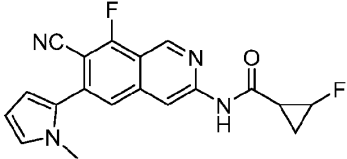
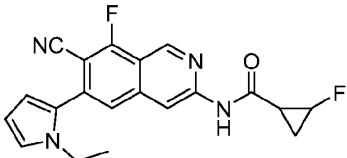
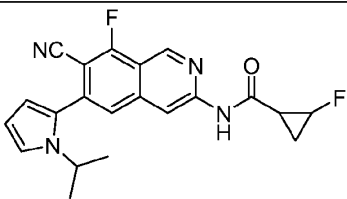
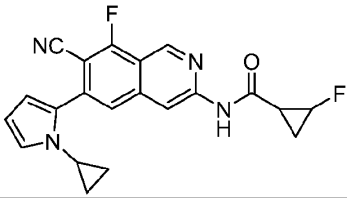
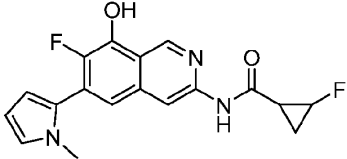
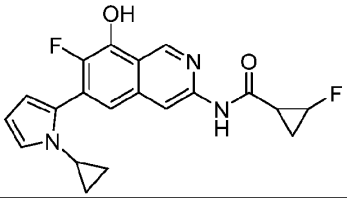
在优选的实施方式中, 所述 R_1 为氨基、羟基、氰基、甲氧基或卤素取代基。

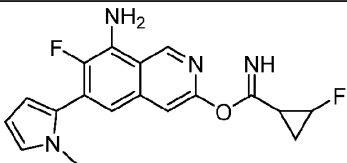
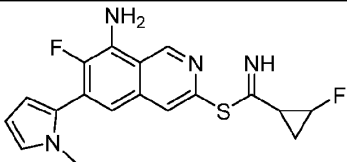
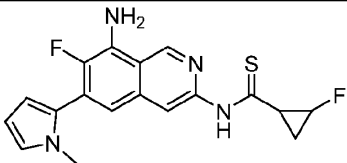
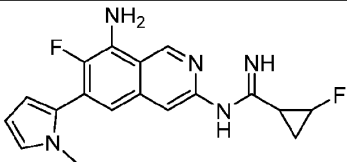
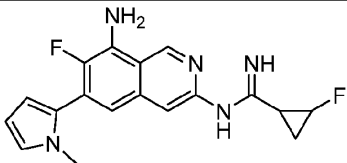
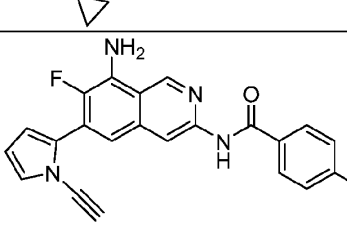
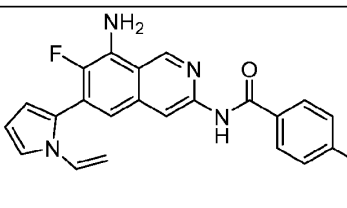
在优选的实施方式中，R₈为甲基、乙基、异丙基、环丙基、乙烯基、乙炔基或取代或未取代的芳基(优选苯基)或5元杂芳基。

在优选的实施方式中，R₈为甲基、乙基、异丙基、环丙基、取代或未取代的苯基。

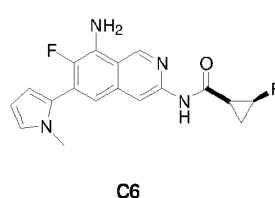
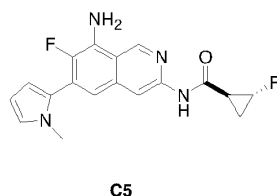
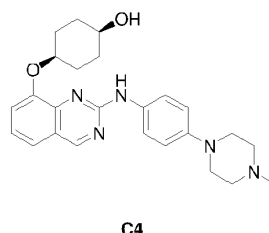
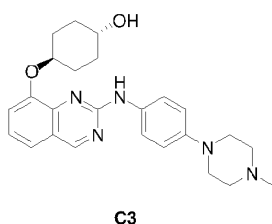
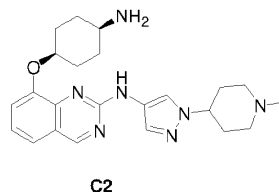
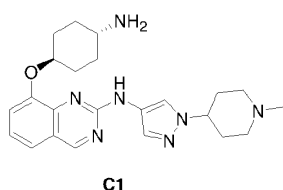
在具体的实施方式中，所述化合物选自：

编号	化合物结构	名称
1		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-羧酰胺
2		N-(8-氨基-6-(1-乙基-1H-吡咯-2-基)-7-氟异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-羧酰胺
3		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-异丙基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-羧酰胺
4		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-乙烯基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-羧酰胺
5		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-4-吗啉代苯甲酰胺
6		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-4-(哌嗪-1-基)苯甲酰胺
7		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯甲酰胺

8		N- (8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -5- (4-甲基哌嗪-1-基) 吡啶酰胺
9		N- (8-氨基-6- (1-乙基-1H-吡咯-2-基) -7-氟异喹啉-3-基) -4-氟环己烷-1-甲酰胺
10		N- (7-氰基-8-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺
11		N- (7-氰基-6- (1-乙基-1H-吡咯-2-基) -8-氟异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺
12		N- (7-氰基-8-氟-6- (1-异丙基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺
13		N- (7-氰基-6- (1-环丙基-1H-吡咯-2-基) -8-氟异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺
14		2-氟-N- (7-氟-8-羟基-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) 环丙烷-1-羧酰胺
15		N- (6- (1-环丙基-1H-吡咯-2-基) -7-氟-8-羟基异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺

16		8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基 2-氟环丙烷-1-氨基甲酸酯
17		8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基 2-氟环丙烷-1-碳酰亚胺硫代酸酯
18		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-碳硫酰胺
19		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-羧酰亚胺
20		N-(8-氨基-6-(1-环丙基-1H-吡咯-2-基)-7-氟异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-羧酰亚胺
21		N-(8-氨基-6-(1-乙炔基-1H-吡咯-2-基)-7-氟异喹啉-3-基)-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯甲酰胺
22		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-乙烯基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯甲酰胺。

在具体的实施方式中，所述化合物是



在具体的实施方式中，所述病毒选自乙肝病毒 (Hepatitis B virus)、麻疹病毒 (Measles Virus)、辛德毕斯病毒 (Sindbis Virus)、西尼罗河病毒 (West Nile Virus)、登革病毒 (Dengue Virus)、疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus)、人巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus HCMV)、埃博拉病毒 (Ebola Virus)、丙肝病毒 (HCV)、流感病毒 (Influenza A Virus)、严重急性呼吸综合征病毒 (SARS-CoV)、寨卡病毒 (Zika Virus)、艾滋病毒 (HIV)、猫传腹病毒 (Feline Infectious Peritonitis Virus)、小鼠肝炎病毒 (Mouse Hepatitis Virus)、犬冠状病毒 (Canine Coronavirus)、猫杯状病毒 (Feline Calicivirus)、猫白血病病毒 (Feline Leukemia Virus)、猫艾滋病毒 (Feline Immunodeficiency Virus)、猫泛白血球减少症病毒 (Feline Panleukopenia Virus)、鸡传染性支气管炎病毒 (Avian Infectious Bronchitis Virus)、猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible Gastroenteritis Virus)、猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus)、猪血凝性脑脊髓炎病毒 (Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus)、牛冠状病毒 (Bovine Coronavirus) 等；优选猫传腹病毒 (Feline Infectious Peritonitis Virus)、小鼠肝炎病毒 (Mouse Hepatitis Virus)、疱疹病毒、严重急性呼吸综合征病毒、寨卡病毒、猫传腹病毒、犬冠状病毒、猫杯状病毒、鸡传染性支气管炎病毒、猪流行性腹泻病毒。

在第二方面，本发明提供一种药物组合物，所述药物组合物包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、互变异构体、前药、代谢物或衍生物和一种或多种其它抗病毒药物，以及任选的药学上可接受的赋形剂。

在第三方面，本发明提供本发明的化合物，用作干扰素相关疾病治疗药物。

在第四方面，本发明提供一种治疗干扰素相关疾病的方法，包括将治疗有效量的本发明化合物或药物组合物给予有此需要的受试者的步骤。

5

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

10 附图说明

- 图 1. 过表达 HPK1 可显著抑制 SeV 病毒诱导的 IFN-β 信号通路。
- 图 2. 过表达不同剂量的 HPK1 可以呈剂量依赖式抑制 SeV 诱导的 IFN-β 表达。
- 图 3. 过表达不同剂量的 HPK1 可以呈剂量依赖式抑制 SeV 诱导的 ISRE 表达。
- 图 4. HPK1 小分子抑制剂恢复 HPK1 抑制的 IFN-β 表达。
- 15 图 5. 化合物 C2 呈剂量依赖恢复 HPK1 抑制的 IFN-β 表达。
- 图 6. HPK1 抑制剂显著降低 MHV 感染 C57 小鼠模型肝组织的病毒表达量。
- 图 7. 口服不同剂量 C1 化合物(一天两次), 对于 MHV 感染 C57 小鼠肝脏中的病毒含量具有呈剂量依赖抑制的效果。
- 图 8. 口服不同剂量 C1 化合物(一天两次), 对于 MHV 感染 C57 小鼠血清中的谷丙转氨

20 酶(ALT)有呈剂量依赖抑制的效果。

- 图 9 显示了化合物 DD02001H 的合成路线。
- 图 10 显示了化合物 DD02013H 的合成路线。
- 图 11 显示了化合物 DD02014H 的合成路线。
- 图 12 显示了化合物 DD02006H 的合成路线。
- 25 图 13 显示了化合物 DD02008H 的合成路线。
- 图 14 显示了化合物 DD02015H 的合成路线。
- 图 15 显示了化合物 DD02021H 的合成路线。
- 图 16 显示了化合物 DD02018H 的合成路线。
- 图 17 显示了化合物 DD02002H 的合成路线。
- 30 图 18 显示了化合物 DD02019H 的合成路线。

具体实施方式

发明人经过广泛而深入的研究，出乎意料地发现一系列高活性、高选择性的 HPK1 小分子抑制剂。本发明人进一步阐述了 HPK1 激酶与病毒感染的内在机制联系，同时评估了这些 HPK1 小分子抑制剂作为单药疗法在细胞以及动物模型水平上的抗病毒效果。研究结果表明，HPK1 小分子抑制剂作为单药或组合物有望作为一种新型的广谱抗病毒疗法用于病毒相

35

关疾病治疗。在此基础上完成了本发明。

术语定义

5 本文所用的术语与本领域技术人员常规理解的相同或相似。为清晰起见，对本文所用的部分术语定义如下。

本文所用的术语“烷基”是指支链和直链的饱和脂族烃基，其含有例如 1 至 12、1 至 6 或 1 至 4 个碳原子。烷基的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基（例如正丙基和异丙基）、丁基（例如正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基）以及戊基（例如正戊基、异戊基、新戊基）、正己基、2-甲基戊基、2-乙基丁基、3-甲基戊基和 4-甲基戊基。以下标形式出现在符号“C”后的数字表示特定基团可含有的碳原子数。例如，“C₁₋₆ 烷基”表示具有 1-6 个碳原子的直链和支链烷基。

本文所用的术语“烯基”是指具有至少一个双键的直链或支链烃基。所述烯基可任选被一个或多个取代基取代，并包括具有“顺式”和“反式”取向的基团，或者“E”和“Z”取向的基团。实例包括但不限于乙烯基、烯丙基等。

15 本文所用的术语“炔基”通常是指具有至少一个三键的支链或直链烃基。炔基可以任选被取代。在本申请中，术语“C2-3 炔基”、“C2-4 炔基”、“C2-5 炔基”、“C2-6 炔基”、“C2-7 炔基”和“C2-8 炔基”通常是指分别含至少 2 个，且最多 3、4、5、6、7 或 8 个碳原子的炔基基团。炔基基团的非限制性实例包括乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基、辛炔基、壬炔基、癸炔基等。

20 本文所用的术语“环烷基”是指环状烃分子失去一个氢原子而得到的基团。环烷基的代表性实例包括但不限于环丙基、环戊基和环己基。单环的环烷基的实例是环丙基、环丁基、环戊基、环己基或环庚基。

本文所用的术语“杂原子”是指氧(O)、硫(S)或氮(N)。“卤代”和“卤素”是指 F、Cl、Br 或 I。相应地，术语“卤代烷基”是指被一个或多个卤素取代的烷基。

25 本文所用的术语“氰基”是指基团-CN。术语“氨基”是指基团-NH₂。

本文所用的术语“杂环烷基”或“杂环基”是指包含 1-4 个杂原子(若为单环的)、1-6 个杂原子(若为双环的)或 1-9 个杂原子(若为三环的)的环烷基，所述杂原子选自 O、S 或 N。杂环烷基可任选被一个或多个取代基取代。在一个实施方案中，杂环烷基各环的 0 个、1 个、2 个、3 个或 4 个原子可被取代基取代。代表性的杂环烷基基团包括哌啶基、哌嗪基、四氢吡喃基、吗啉基、硫代吗啉基、1,3-二氧杂环戊基、THF 基、四氢噻吩基、噻吩基，等等。

30 本文所用的术语“芳香环”或“芳基”是指烃的单环、双环或三环芳族环体系失去一个氢原子而得到的基团。芳基可任选被一个或多个取代基取代。在一个实施方案中，芳基各环的 0 个、1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或 6 个原子可被取代基取代。芳基基团的实例包括苯基、萘基、蒽基、苊基、茚基、茚基、萘基、萘基，等等。

35 本文所用的术语“芳香杂环”或“杂芳基”是指在至少一个环中具有至少一个杂原子(O、S 或 N)的“芳香环”或“芳基”，所述含有杂原子的环优选具有 1、2 或 3 个独立地选自 O、

S 或 N 的杂原子。含有杂原子的杂芳基基团中的每个环可以含有 1 或 2 个氧或硫原子和/或 1-4 个氮原子, 条件是在每个环中杂原子的总数为 4 或更少并且每个环具有至少一个碳原子。杂芳基基团可以连接于任何环的任何可利用的氮或碳原子上。杂芳基环系统可以是未取代的或可以含有一个或多个取代基。杂芳基基团的非限制性实例包括吡啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、噁唑基、噁二唑基、咪唑基、噻唑基、异噻唑基、喹啉基、吡唑基、异噻唑基、哒嗪基、嘧啶基、吡嗪基、三嗪基、异喹啉基、吲唑基等。

本文所用的术语“烷氧基”是指-O-烷基。烷氧基可任选被一个或多个取代基取代。

在本文中,“(CO)”和“C(O)”表示羰基部分。适合的羰基部分的实例包括但不限于酮和醛部分。

10 本文所用的术语“烷基氨基”是指被一个或两个烷基取代的氨基。术语“氨基烷基”则是指被一个或多个氨基取代的烷基。术语“羟基烷基”是指被一个或多个羟基取代的烷基。所述烷基部分任选具有一个或多个取代基。

本文所用的术语“螺环基”表示两个碳环共用一个碳原子的多环基团。杂螺环基”指两个单环共用一个碳原子的多环基团, 其中两个环可含有 1 个或多个杂原子。

15 本文所用的术语“桥环基”指其中任意两个碳环共用两个不直接相连的碳原子的环基, 根据组成环的数目可以分为二环、三环、四环等。“杂桥环基”是指多环的杂环基, 且该多环的杂环基中有两个环共用两个不相邻的碳原子或杂原子。

本文所用的术语“稠环基”表示由两个或两个以上碳环以共有环边而形成的多环有机化合物。“杂稠环基”指多环的杂环基, 且该多环的杂环基中有两个环共用两个相邻的碳原子或杂原子。

20 本文所用的术语“异构体”或“立体异构体”是指具有相同化学组成但原子或基团在空间中的排列不同的化合物。

术语“互变异构体”或“互变异构形式”是指具有不同能量的结构异构体, 其可通过低能垒相互转化。例如, 质子互变异构体(也称为质子互变的异构体)包括通过质子迁移的相互转化, 例如酮-烯醇和亚胺-烯胺异构化。化合价互变异构体包括通过重组一些成键电子的相互转化。

术语“非对映异构体”是指具有两个或更多个不对称中心并且其分子不为彼此的镜像的立体异构体。术语“对映异构体”是指彼此不可重叠的镜像的化合物的两种立体异构体。两种对映异构体的等摩尔混合物称为“外消旋混合物”或“外消旋体”。

30 本文所用的术语“预防和/或治疗”不仅包括预防和/或治疗疾病, 还通常包括预防疾病的发作, 减缓或逆转疾病的进展, 预防或减缓与疾病相关的一种或多种症状的发作, 减少和/或减轻与疾病相关的一种或多种症状, 降低疾病和/或与其相关的任何症状的严重程度和/或持续时间和/或预防疾病和/或与其相关的任何症状的严重程度的进一步增加, 预防、减少或逆转由疾病引起的任何生理损伤, 以及通常对正在治疗的患者有益的任何药理学作用。本中
35 请的化合物或组合物形成可行的治疗剂不需要实现完全治愈或根除疾病的任何症状或表现。如在相关领域中所认识到的, 用作治疗剂的药物可降低给定疾病状态的严重程度, 但不需要

消除疾病的每种表现才能被认为是有用治疗剂。类似地，预防性施用的治疗构成可行的预防剂不需要完全有效地预防病症的发作。简单地在受试者中减少疾病的影响(例如，通过减少其症状的数量或严重程度，或通过提高另一种治疗的有效性，或通过产生另一种有益效果)，或减少疾病发生或恶化的可能性就足够了。本文所用的术语“预防和/或治疗”包括通过各种方式实现的疾病的预防和/或治疗，例如通过提高受试者的免疫力来实现疾病的预防和/或治疗。

本文所用的术语“给药”或“施用”包括将所述化合物引入受试者以实现其预期功能的途径。可使用的给药途径的实例包括注射(皮下、静脉内、肠胃外、腹膜内、鞘内)、局部、口服、吸入、直肠和经皮。

本文所用的术语“有效量”包括在必要的剂量和时间段内有效实现所需结果的量。有效量的化合物可根据例如受试者的疾病状态、年龄和体重等因素以及该化合物在该受试者中引发所需响应的能力而变化。可调整剂量方案以提供最佳治疗响应。“治疗有效量”是指本申请化合物的量，该量(i)治疗或预防特定疾病、病况或病症，(ii)减弱、改善或消除特定疾病、病况或病症的一种或多种症状，或(iii)预防或延迟本申请所述特定疾病、病况或病症的一种或多种症状的发作。

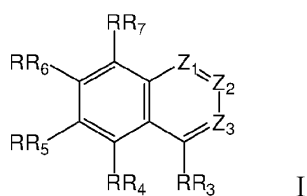
本文所用的术语“受试者”或“患者”是指动物，例如哺乳动物，包括但不限于灵长类动物(例如人)、牛、绵羊、山羊、马、狗、猫、兔、大鼠、小鼠等。在某些实施方案中，所述受试者为人。

本文所用的术语“抑制”意指，与不存在该抑制剂时所述酶的活性相比，降低该目标酶的活性。在一些实施方案中，术语“抑制”意指 HPK1 活性降低至少约 5%、至少约 10%、至少约 20%、至少约 25%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%或至少约 95%；或者 HPK1 活性降低约 5%至约 25%、约 25%至约 50%、约 50%至约 75%或约 75%至 100%；或者 HPK1 活性降低约 95%至 100%，例如活性降低 95%、96%、97%、98%、99%或 100%。

本发明的化合物

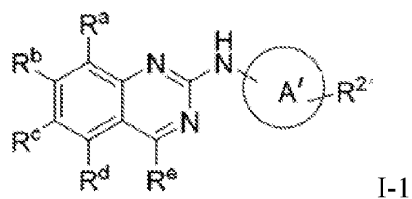
本发明提供了一系列具有 HPK1 抑制活性的化合物。本发明的化合物能够提高或恢复受试者体内的干扰素表达或产生，从而增强受试者的免疫力，进而治疗和/或预防疾病。例如，本发明的 HPK1 抑制活性化合物可以增强 IFN- β 介导的抗病毒作用和/或增强 IFN- γ 介导的 T 细胞活化，从而能够治疗和/或预防病毒感染。在另一方面，本发明的 HPK1 抑制活性化合物还可以用来提高受试者的免疫力。

在具体的实施方式中，本发明提供式 I 所示化合物，



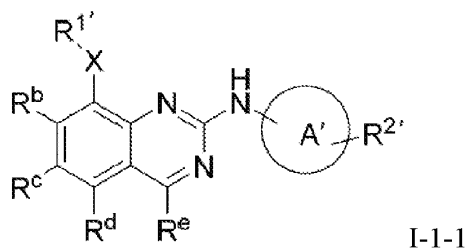
式中的各取代基分别如上文所述。

在优选的实施方式中，本发明的化合物是下式 I-1 所示的化合物：



5 式中的各取代基分别如上文所述。

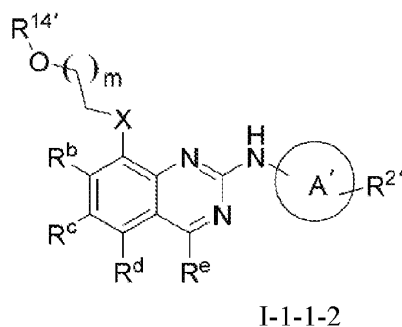
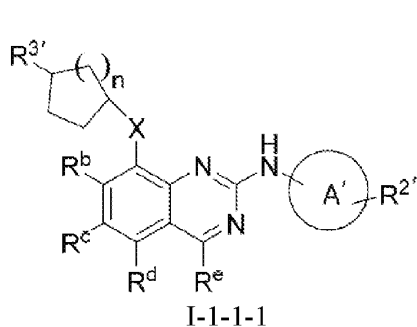
在进一步优选的实施方式中，式 I-1 所示化合物可以是式 I-1-1 所示的化合物：



式中的各取代基分别如上文所述。

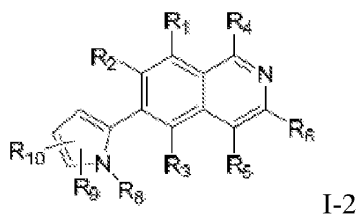
在更优选的实施方式中，式 I-1-1 所示的化合物可以是式 I-1-1-1 或 I-1-1-2 所示的化合物：

10 物：



式中的各取代基分别如上文所述。

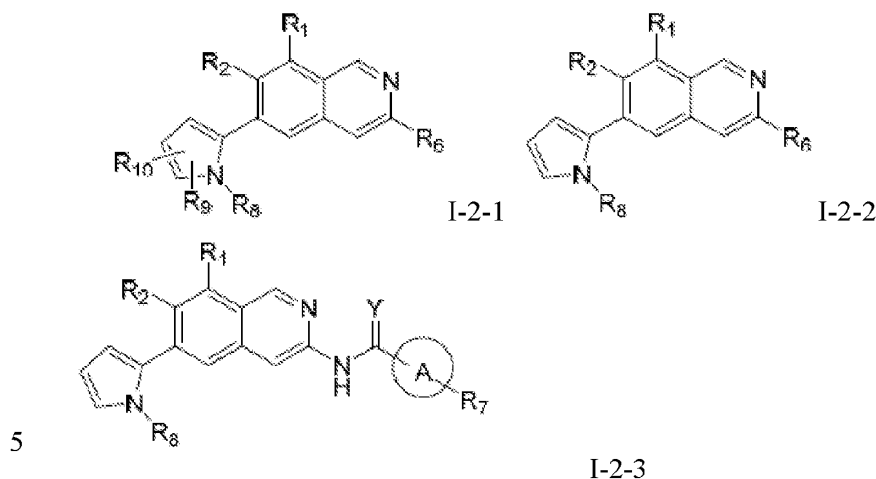
在其它优选的实施方式中，本发明的化合物可以是式 I-2 所示的化合物：



15

式中的各取代基分别如上文所述。

在进一步优选的实施方式中，本发明的化合物可以是式 I-2-1、式 I-2-2 或式 I-2-3 所示的化合物：



式中的各取代基分别如上文所述。

本发明的化合物可以形成药学上可接受的盐，例如本发明化合物形成的有机盐或无机盐。实例性盐包括但不限于硫酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、草酸盐、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、异烟酸盐、乳酸盐、水杨酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、油酸盐、丹宁酸盐、泛酸盐、酒石酸氢盐、抗坏血酸盐、琥珀酸盐、马来酸盐、龙胆酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、糖酸盐、甲酸盐、苯甲酸盐、谷氨酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐、双羟萘酸盐(即 1, 1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸)盐)、碱金属(例如钠和钾)盐、碱土金属(例如镁)盐和铵盐。药学上可接受的盐可涉及包含另一种分子，该分子例如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其它抗衡离子。该抗衡离子可为任何有机或无机部分，其稳定所述母体化合物上的电荷。此外，药学上可接受的盐在其结构中可具有多于一个带电的原子。在多个带电原子为药学上可接受的盐的一部分的实例中，该盐可以具有多个抗衡离子。因此，药学上可接受的盐可具有一个或多个带电原子和/或一个或多个抗衡离子。

本发明的化合物也可以形成溶剂化物(例如，水合物)。术语“溶剂化物”是指化合物与一种或多种溶剂分子(不论有机或无机)的物理性缔合。此物理性缔合包括氢键合。在某些情况下，溶剂化物将是能够分离的，例如当一个或多个溶剂分子掺入结晶固体的晶格中时。示例性的溶剂化物包括水合物、乙醇化物、甲醇化物、异丙醇化物、乙腈溶剂化物和乙酸乙酯溶剂化物。溶剂化方法在本领域中是已知的。

本发明的化合物可在体内代谢。因此，“代谢物”，即通过在体内代谢特定化合物或其盐而产生的产物也应包括在本发明的保护范围内。

本发明的化合物也可以做成“前药”或“前体药物”，即药物前体的化合物，其在给予受试者时，通过代谢或化学过程经历化学转化，得到式 I 化合物或其盐。关于前药的内容

是本领域所熟知的(参见, 例如 Berge 等. (1977) “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66: 1-19)。

本发明的化合物也可以形成酯, 因此酯也在本申请的范围。具体酯的代表性的例子包括但不限于, 甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯和丁二酸乙酯。

- 5 本申请化合物意在包括本申请化合物中出现的原子的所有同位素。例如, 氢的同位素包括氘(D)和氚(T)。碳的同位素包括 ^{13}C 和 ^{14}C 。同位素标记的本申请化合物通常可通过本领域技术人员已知的常规技术或通过类似于本申请所述的方法使用适当的同位素标记的试剂替代在其它情况下所采用的未经标记的试剂来制备。

- 10 术语“衍生物”指母体化合物分子中的原子或原子团被其他原子或原子团取代所形成的化合物。

干扰素相关疾病

- 本文所述的干扰素相关疾病是指可以通过施用本发明的化合物来提高或恢复受试者体内的干扰素表达或产生来治疗和/或预防的疾病。在具体的实施方式中, 所述干扰素是 IFN- β 15 和/或 IFN- γ ; 因此, 本发明的化合物可以作为 IFN- β 和/或 IFN- γ 信号通路的增强剂, 而本文所述的“干扰素相关疾病”亦包括 IFN- β /IFN- γ 对其有治疗和/或预防作用的所有病毒感染。

- 在具体的实施方式中, 所述干扰素相关疾病是病毒感染包括但不限于乙肝病毒 (Hepatitis B virus)、麻疹病毒 (Measles Virus)、辛德毕斯病毒 (Sindbis Virus)、西尼罗河病毒 (West Nile Virus)、登革病毒 (Dengue Virus)、疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus)、人巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus HCMV)、埃博拉病毒 (Ebola Virus)、丙肝病毒 (HCV)、流感病毒 (Influenza A Virus)、严重急性呼吸综合征病毒 (SARS-CoV)、寨卡病毒 (Zika Virus)、艾滋病毒 (HIV)、猫传腹病毒 (Feline Infectious Peritonitis Virus)、小鼠肝炎病毒 (Mouse Hepatitis Virus)、犬冠状病毒 (Canine Coronavirus)、猫杯状病毒 (Feline Calicivirus)、猫白血病毒 (Feline Leukemia Virus)、猫艾滋病毒 (Feline Immunodeficiency Virus)、猫泛白血球减少症病毒 (Feline Panleukopenia Virus)、鸡传染性支气管炎病毒 (Avian Infectious Bronchitis Virus)、猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible Gastroenteritis Virus)、猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus)、猪血凝性脑脊髓炎病毒 (Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus)、牛冠状病毒 (Bovine Coronavirus) 等; 优选猫传腹病毒 (Feline Infectious Peritonitis Virus)、小鼠肝炎病毒 (Mouse Hepatitis Virus)、疱疹病毒、严重急性呼吸 25 吸综合征病毒、寨卡病毒、猫传腹病毒、犬冠状病毒、猫杯状病毒、鸡传染性支气管炎病毒、猪流行性腹泻病毒。

药物组合物

- 鉴于本发明的化合物能够治疗干扰素相关疾病, 可以将本发明的化合物制成药物组合物。在所述药物组合物中, 包含本发明的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、互变异构体、前药、代谢物或衍生物以及任选的药学上可接受的赋形剂。 35

术语“药学上可接受的”是指所描述的化合物、物质、组合物和/或剂型在合理的医药判断范围内适用于与人和动物的组织接触而不引起过度的毒性、刺激性、过敏反应或其它问题或并发症，从而与合理的益处/风险比例相称。

术语“赋形剂”或“载体”是指在所用剂量和浓度下对细胞或哺乳动物无毒的载体、
5 赋形剂或稳定剂。其非限制性实例包括缓冲剂，例如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸；低分子量(小于约 10 个残基)多肽；蛋白质，例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，例如聚乙烯基吡咯烷酮；氨基酸，例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物(包括葡萄糖、甘露糖或糊精)；螯合剂如 EDTA；糖醇如甘露醇或山梨糖醇；成盐的抗衡离子如钠；以及/或非离子表面活性剂，
10 例如 TWEEN™、聚乙二醇(PEG)和 PLURONICS™。在某些实施方案中，所述药学上可接受的载体为非天然存在的药学上可接受的载体。

本发明的化合物可以治疗干扰素相关疾病，特别是病毒感染。因此，除了本发明的化合物以外，本发明的药物组合物中还可以包含一种或多种其它抗病毒药物，从而增强所述药物组合物的疗效。

15

本发明的优点：

1. 本发明提供了新型的高活性、高选择性的 HPK1 小分子抑制剂；
2. 本发明首次阐明了 HPK1 激酶与病毒感染的内在机制联系；
3. 本发明的 HPK1 小分子抑制剂能够作为单药疗法在细胞以及动物模型水平上表现出
20 抗病毒效果，从而为干扰素相关疾病，特别是病毒感染药物的开发奠定了全新的物质基础；
4. 本发明的 HPK1 小分子抑制剂能够作为提高免疫力的辅助/联合用药在细胞以及动物模型水平上表现出抗病毒效果，从而为干扰素相关疾病，特别是病毒感染药物的开发奠定了全新的物质基础。

25

以下结合具体实施例对本发明的技术方案进一步描述，但以下实施例不构成对本发明的限制，所有依据本发明的原理和技术手段采用的各种施用方法，均属于本发明范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。

30

实施例

实施例 1. 本发明化合物的合成

1. 式 I-1 系列化合物的合成及 HPK1 抑制活性检测

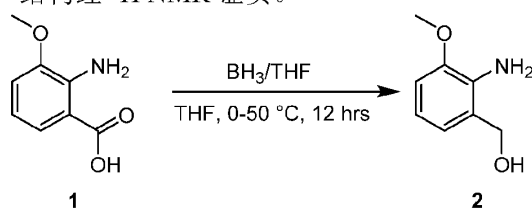
1.1 化合物 DD02001H: 8-(((1s,4s)-4-氨基环己基)氧代)-N-(1-(1-甲基哌啶-4-基)-1H-吡啶-4-基)喹啉-2-胺的合成

35

化合物 DD02001H 的合成路线如图 9 所示。

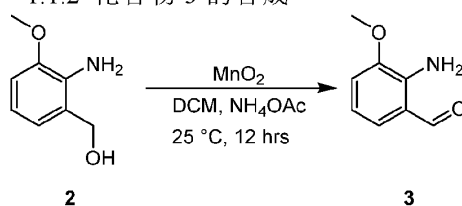
1.1.1 化合物 2 的合成

在 N₂ 保护、0℃下，向化合物 1 (25.0 g, 150 mmol, 1.00 eq) 的 THF (300 mL) 溶液中逐滴添加 BH₃/THF (1.00 M, 329 mL, 2.20 eq)。滴加完毕后，将混合物在 0℃ 下搅拌 30 分钟，然后将混合物加热至 50℃并搅拌 12 小时。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=1:1, 原料 R_f=0.1, 产品 R_f=0.3) 显示有新斑点形成，原料完全消失，反应完全，随后将混合物冷却至 0℃，逐滴添加 MeOH (400 mL) 至无气泡形成，然后添加 40.0 mL H₂O 并用乙酸乙酯 (300 mL*2) 萃取，有机层盐水 (100 mL*2) 洗涤，无水 Na₂SO₄ 干燥并过滤，然后减压浓缩获得化合物 2 (45.0 g, 294 mmol, 98.2%产率)，该物质为淡黄色油状物质，结构经 ¹H NMR 证实。



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.65-6.85 (m, 3H), 4.63 (s, 2H), 3.86 (s, 3H).

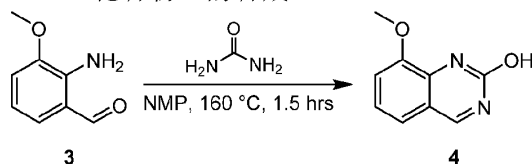
1.1.2 化合物 3 的合成



向化合物 2 (45.0 g, 294 mmol, 1.00 当量) 的二氯甲烷 (DCM) (500 mL) 溶液中添加 MnO₂ (128 g, 1.47 mol, 5.00 当量)，所得混合物在 25℃下搅拌 12 小时。薄层色谱 (石油醚: 乙酸乙酯=1:1, 物料 R_f=0.45, 产品 R_f=0.8) 显示有新斑点形成，原料点消失，反应结束后混合物经硅藻土过滤，滤液减压浓缩。经柱层析法 (SiO₂, 石油醚/乙酸乙酯=30/1 至 5/1) 分离纯化得化合物 3 (25.0 g, 166 mmol, 56.3%产率)，结构经 ¹H NMR 证实。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.85 (s, 1H), 7.18 (dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.02 (dd, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 6.80 (br s, 2H), 6.64 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 3.77-3.87 (m, 3H).

1.1.3 化合物 4 的合成



将化合物 3 (23.0 g, 152 mmol, 1.00 eq)、尿素 (101 g, 1.67 mol, 89.7 mL, 11.0 eq) 和 NH₄OAc (586 mg, 7.61 mmol, 0.05 eq) 的混合物在 160℃下搅拌 0.5 小时，混合物开始从热溶液中析出沉淀。添加 NMP (100 mL) 以溶解固体沉淀后，将反应在 160℃下搅拌 1 小时。LC-MS 显示检测到 MS (RT=0.247 分钟) 目标产物 4，原料消失，反

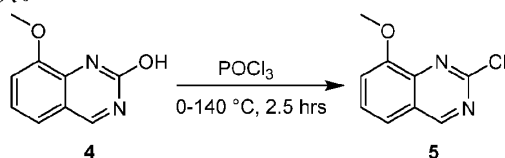
应结束后将混合物冷却至 25°C 并倒入 100 mL H₂O 中，25°C 下搅拌 10 分钟，在减压下过滤。粗产物用石油醚（60.0 mL）在 25°C 下振荡分散 5 min，并在减压下过滤以获得化合物 4（20.0 g，114 mmol，74.6%产率），为灰色固体。结构经 ¹H NMR 证实。

LCMS:产物 RT = 0.247 min, m/z = 177.2 (M+H)⁺

5 **¹H NMR** (400 MHz, DMSO) δ 8.36 (s, 1H), 6.90 (br d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.79 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 5.98 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H)。

1.1.4 化合物 5 的合成

将化合物 4（19.0 g，108 mmol，1.00 eq）于 0°C 下加入 POCl₃（248 g，1.61 mol，150 mL，15.0 eq）中，所得混合物在 25°C 搅拌 0.5 小时，然后升温至 140°C 搅拌 2 小时。
10 **LC-MS** 显示检测到目标产物 MS（RT=0.655 分钟）。反应结束后，将混合物缓慢倒入 0-10°C 的冰水（200 mL）中并搅拌，然后用乙酸乙酯（300 mL*4）萃取，盐水（100 mL*2）洗涤有机层，无水 Na₂SO₄ 干燥，过滤并减压浓缩。在 25°C 下用石油醚（60.0 mL）振荡分散 5 min，过滤得黄色固体化合物 5（7.60 g，39.1 mmol，36.2%产率），结构经 ¹H NMR 确认。

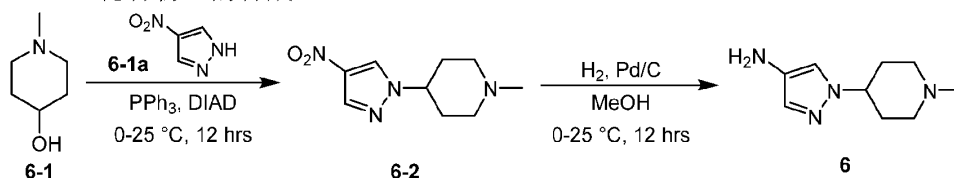


15

LCMS: 产物 RT = 0.655 min, m/z = 195.0 (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.56 (s, 1H), 7.69 - 7.79 (m, 2H), 7.54 (br d, *J* = 4.0 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H)。

1.1.5 化合物 6 的合成



20

在 0°C 下向化合物 6-1（10.0 g，86.8 mmol，10.1 mL，1.00 eq）、化合物 6-1a（11.7 g，104 mmol，1.20 eq）和三苯基膦烷（34.2 g，130 mmol，1.50 eq）的 THF（300 mL）溶液中加入 DIAD（26.3 g，130 mmol，25.3 mL，1.50 eq），所得混合物在 25°C、N₂ 保护下搅拌 12 小时。**LCMS** 显示原料反应完全，产物形成。反应结束后，用 1 M HCl 将反应混合物调节至 pH=4，并用乙酸乙酯（300 mL）萃取，用 NaHCO₃（饱和）将水相调节至 pH=8，并用乙酸乙酯（100 mL*2）再次萃取。用饱和盐水（100 mL）洗涤有机层，有机层使用无水硫酸钠干燥，过滤并减压浓缩得到化合物 6-2（8.00 g，38.1 mmol，43.8%产率），该化合物为黄色油状物质，结构经 ¹H NMR 证实。

25

LCMS 产物 RT = 0.150 min, m/z = 211.1 (M+H)⁺

30 **¹H NMR** (400 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 4.08 - 4.14 (m, 1H), 2.95 -

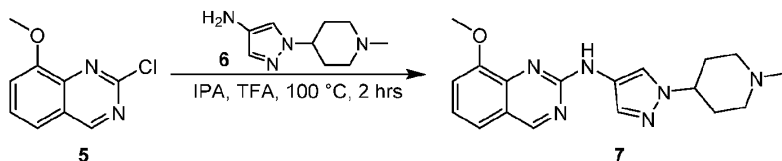
2.98 (m, 2H), 2.31 (s, 3H), 2.09 - 2.15 (m, 6H)。

化合物 6-2 (8.00 g, 38.1 mmol, 1.00 当量)、Pd/C (2.00 g, 10%纯度) 在甲醇 (50.0 mL) 中搅拌, 混合物于 25℃下在 H₂ (15 psi) 下搅拌 12 小时。LCMS 显示化合物 6-2 被完全消耗, 反应结束后将混合物过滤并减压浓缩, 得到黄色油状化合物 6 (5.00 g, 27.7 mmol, 72.9%产率), 结构经 ¹H NMR 证实。

LCMS: 产物 RT = 0.10 min, m/z = 181.1 (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.09 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 3.92 - 3.98 (m, 1H), 2.88 - 2.91 (m, 4H), 2.26 (s, 3H), 1.85 - 2.26 (m, 6H)。

1.1.6 化合物 7 的合成

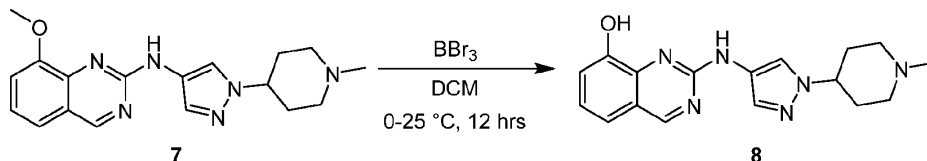


向化合物 5 (400 mg, 2.06 mmol, 1.00 eq) 和化合物 6 (444 mg, 2.47 mmol, 1.20 eq) 的 IPA (10.0 mL) 中溶液中添加 TFA (23.4 mg, 205 μmol, 15.2 μL, 0.10 eq), 所得混合物在 100℃下搅拌 2 小时。LCMS 显示检测到目标产物质量 (RT=0.653 min)。用乙酸乙酯 (100 mL) 稀释混合物并用饱和 NaHCO₃ 溶液 (50.0 mL) 洗涤, 再用盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩得到固体物质, 用石油醚 (25.0 mL) 振荡分散得到化合物 7 (570 mg, 1.68 mmol, 81.9%产率), 其为黄色固体, 结构经 LCMS 和 ¹H NMR 确认。

LCMS: 产物 RT = 0.673 min, m/z = 339.3 (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.05 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.31 - 7.35 (m, 2H), 7.21 - 7.25 (m, 1H), 7.10 - 7.12 (m, 1H), 4.12 - 4.14 (m, 1H), 4.05 (s, 3H), 2.98 - 3.01 (m, 2H), 2.34 (s, 3H), 2.14 - 2.23 (m, 6H)。

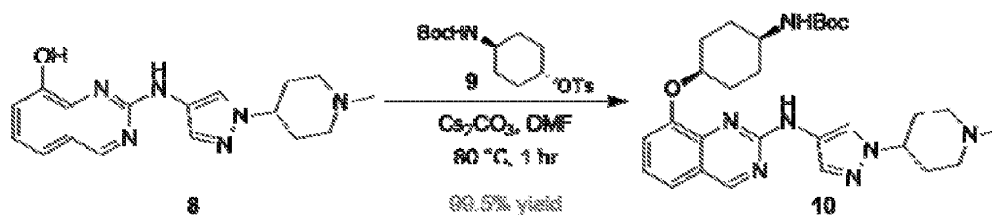
1.1.7 化合物 8 的合成



向化合物 7 (570 mg, 1.68 mmol, 1.00 eq) 的 DCM (15.0 mL) 溶液中逐滴添加 BBr₃ (1.05 g, 4.21 mmol, 405.7 μL, 2.50 eq)。在 25℃下将混合物搅拌 12 小时。LCMS (EW20001-101-P1A1) 显示检测到目标产物 (RT=0.622 min)。反应结束后, 用 DCM (100 mL) 稀释混合物, 并用饱和 NaHCO₃ 溶液 (50.0 mL) 洗涤, 用盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩得到化合物 8 (500 mg, 粗品) 作为黄色固体, 在下一步中直接使用。

LCMS: 产物 RT = 0.847 min, m/z = 325.2 (M+H)⁺

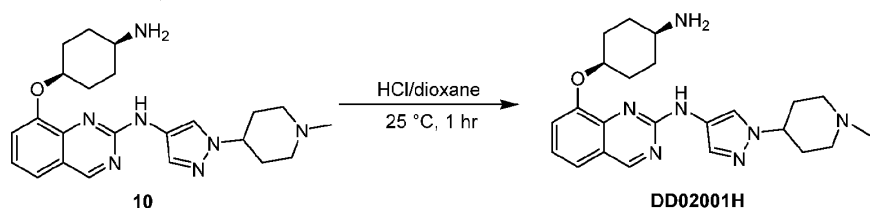
1.1.8 化合物 10 的合成



向化合物 8 (200 mg, 616 μmol , 1.00 eq) 和化合物 9 (273 mg, 740 μmol , 1.20 eq) 的 DMF (3.00 mL) 溶液中添加 Cs_2CO_3 (502 mg, 1.54 mmol, 2.50 eq), 所得混合物在 80°C 下搅拌 1 小时。LCMS 显示检测到目标产物 ($\text{RT}=0.799$ min)。反应结束后, 添加水 (50.0 mL) 淬灭混合物并用乙酸乙酯 (50.0 mL*2) 萃取, 用盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相, 无水硫酸钠上干燥, 过滤并浓缩得到化合物 10 (320 mg, 613 μmol , 99.5%产率), 黄色油状物质, 未经进一步纯化, 下一步直接使用。

LCMS 产物 $\text{RT} = 0.799$ min, $m/z = 522.3$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺。

1.1.9 化合物 DD02001H 的合成



在 25°C 下将化合物 10 (320 mg, 613 μmol , 1.00 eq) 与 HCl/二氧六环 (4 M, 10.0 mL, 65.2 eq) 的混合物搅拌 1 小时。LCMS 显示检测到目标产物 ($\text{RT}=0.651$ min)。将混合物浓缩得到残留物, 通过制备 HPLC 纯化。用饱和 NaHCO_3 溶液将混合物调节至 pH=8, 并用 DCM (50.0 mL*2) 萃取, 用盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩得到化合物 DD02001H, 化合物结构经 LCMS、HPLC

(EW20001-106-P1A2) 和 ^1H -NMR 确认, 为黄色固体 (27.2 mg, 91.7 μmol , 14.9%产率, 96.7%纯度)。

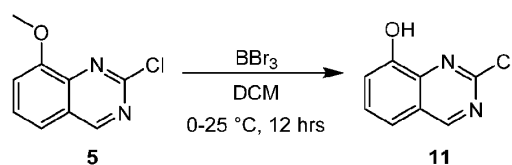
LCMS 产物 $\text{RT} = 0.644$ min, $m/z = 422.3$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.94 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.23 - 7.25 (m, 1H), 7.12 - 7.13 (m, 2H), 7.06 (s, 1H), 4.67 - 4.68 (m, 1H), 4.05 - 4.09 (m, 1H), 2.89 - 2.92 (m, 2H), 2.78 - 2.80 (m, 1H), 2.26 (s, 3H), 2.05 - 2.15 (m, 8H), 1.62 - 1.74 (m, 8H).

1.2 化合物 DD02013H: 4-((2-((4-((2-(二甲氨基)乙基)(甲基氨基)苯基)氨基)喹啉-8-基)氧代)环己烷-1-醇的合成

化合物 DD02013H 的合成路线如图 10 所示。

1.2.1 化合物 11 的合成



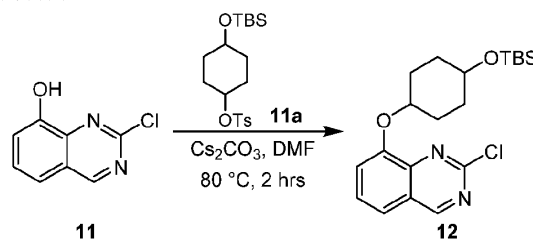
0℃下, 向化合物 5 (500 mg, 2.57 mmol, 1.00 eq) 的 DCM (10.0 mL) 溶液中逐滴加入 BBr_3 (1.42 g, 5.65 mmol, 545 μL , 2.20 eq) 的 DCM (5.00 mL) 溶液。滴加完毕, 在 25℃下将混合物搅拌 12 小时。LCMS 显示检测到目标产品分子量 (RT=0.585 min)。

- 5 反应结束后, 混合物加水 (50.0 mL) 淬灭并用 DCM (50.0 mL) 萃取。用盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩以得到残余物, 该残留物通过柱层析法 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯=20/1 到 10/1, TLC (石油醚: 乙酸乙酯=3:1, $R_f=0.3$) 纯化, 得到黄色固体化合物 11 (400 mg, 2.21 mmol, 86.2%产率), 结构经 LCMS 与 ^1H NMR 确认。

LCMS: 产物 RT = 0.575 min, $m/z = 181.0 (\text{M}+\text{H})^+$

- 10 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.30 (s, 1H), 7.59-7.64 (m, 1H), 7.49-7.52 (m, 1H), 7.42-7.45 (m, 2H)。

1.2.2 化合物 12 的合成

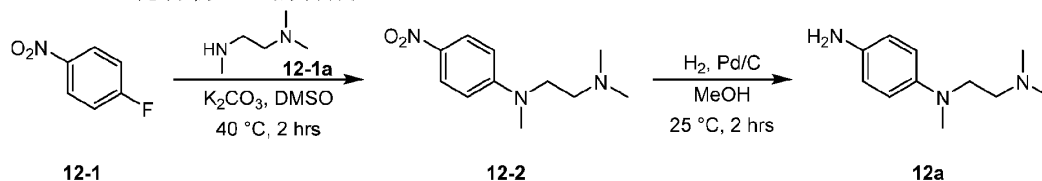


- 向化合物 11 (200 mg, 1.11 mmol, 1.00 eq) 和化合物 11a (639 mg, 1.66 mmol, 1.50 eq) 的 DMF (5.00 mL) 溶液中添加 Cs_2CO_3 (721.6 mg, 2.21 mmol, 2.00 eq), 所得混合物在 80℃下搅拌 2 小时。LCMS 检测到目标产物分子量 (RT=1.229 分钟)。反应结束后, 添加水 (50.0 mL) 淬灭反应, 用乙酸乙酯 (50.0 mL*2) 萃取, 盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩得到残留物, 通过柱层析法 (SiO_2 , 石油醚/乙酸乙酯=20/1 到 10/1, TLC (石油醚/乙酸乙酯=5:1, $R_f=0.4$) 纯化得到黄色固体化合物 12 (100 mg, 254 μmol , 22.9%产率), 结构经 ^1H NMR 证实。

LCMS: 产物 RT = 1.229 mins, $m/z = 393.2 (\text{M}+\text{H})^+$

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.25 (s, 1H), 7.55-7.60 (m, 1H), 7.49-7.51 (m, 1H), 7.34-7.37 (m, 1H), 4.53-4.57 (m, 1H), 3.90-3.92 (m, 1H), 2.15-2.20 (m, 2H), 1.86 -1.89 (m, 4H), 1.60-1.64 (m, 2H), 0.93 (s, 9H), 0.08 (s, 6H)。

- 25 1.2.3 化合物 12a 的合成



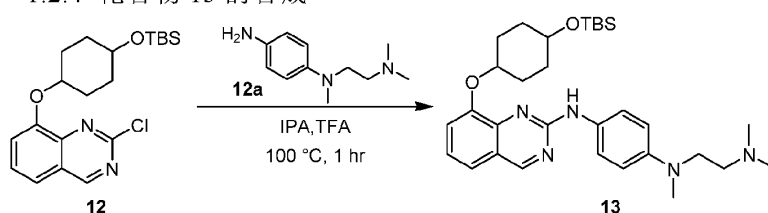
向化合物 12-1 (2.00 g, 14.2 mmol, 1.50 mL, 1.00 eq) 和化合物 12-1a (1.59 g, 15.6 mmol, 2.03 mL, 1.10 eq) 的二甲基亚砜 (10.0 mL) 溶液中添加 K_2CO_3 (3.92 g, 28.4 mmol, 2.00 eq), 所得混合物在 40°C 下搅拌 2 小时。TLC (石油醚: 乙酸乙酯=5:1) 显示化合物 12-1 ($R_f=0.6$) 保留, 并检测到新产物形成。反应结束后, 用 H_2O (100 mL) 稀释反应混合物并用乙酸乙酯 (100 mL*2) 萃取, 饱和盐水 (200 mL) 洗涤合并的有机层, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 得到化合物 12-2 (3.20 g, 原油), 结构经 1H NMR 确认后用于下一步骤, 未进行进一步的纯化。

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09-8.12 (m, 2H), 6.59-6.62 (m, 2H), 3.55 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.10 (s, 1H), 2.50 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.30 (s, 6H)。

向化合物 12-2 (3.20 g, 14.3 mmol, 1.00 当量) 的 MeOH (30.0 mL) 溶液中添加 Pd/C (1.00 g, 10% 纯度, 1.00 当量)。悬浮液在真空下脱气, 并用氢气吹扫几次, 之后所得溶液在 25°C 的 H_2 (15 psi) 氛围下搅拌 2 小时。TLC (二氯甲烷: 甲醇=10:1) 显示化合物 12-2 ($R_f=0.5$) 原料点消失, 并检测到新化合物形成。反应结束后, 将混合物过滤并浓缩以得到化合物 12a (2.30 g, 11.9 mmol, 83.0% 产率), 产物为红棕色油, 结构经 1H NMR 确证, 未经进一步纯化。

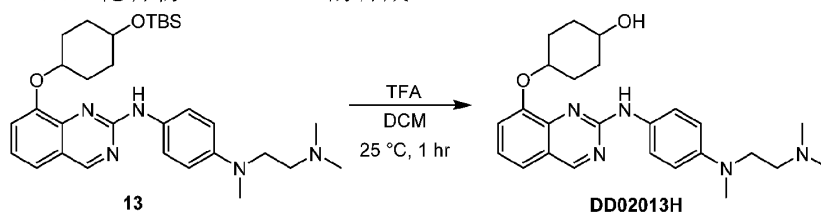
1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 6.47 - 6.54 (m, 4H), 4.34 (br. s, 2H), 3.19 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.72 (s, 1H), 2.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 2.14 (s, 6H)。

1.2.4 化合物 13 的合成



向化合物 12 (100 mg, 254 μ mol, 1.00 eq) 和化合物 12a (59.0 mg, 305 μ mol, 1.20 eq) 的 IPA (3.00 mL) 溶液中添加 TFA (29.0 mg, 255 μ mol, 18.8 μ L, 1.00 eq)。所得混合物在 100°C 下搅拌 1 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量 ($RT=0.913$ min)。反应结束后, 用乙酸乙酯 (100 mL) 萃取, 先后用饱和 $NaHCO_3$ 溶液 (50.0 mL)、盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相, 无水硫酸钠干燥, 过滤并浓缩, 得到化合物 13 (130 mg, 粗品), 黄色固体, 未纯化, 直接用于下一步。

1.2.5 化合物 DD02013H 的合成



向化合物 13 (130 mg, 236 μ mol, 1.00 当量) 的 DCM (5.00 mL) 溶液中添加 TFA

(0.50 mL)，所得混合物在 25℃下搅拌 1 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量 (RT=0.701 min)。反应结束后，将混合物浓缩得到残留固体，通过制备高效液相色谱法纯化，所得固体用饱和 NaHCO₃ 溶液调节至 pH=8，DCM (50.0 mL*2) 萃取，用盐水 (50.0 mL) 洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩，得黄色固体、目标化合物 DD02013H (47.6 mg, 130.7 umol, 55.3%产率, 94.9%纯度)，结构经 LCMS、HPLC 和 ¹H-NMR 确认。

LCMS 产物 RT = 0.997 min, m/z = 436.3 (M+H)⁺

HPLC 产物 RT = 2.951 mins, purity: 95.6%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.00 (s, 1H), 7.83 - 7.85 (m, 2H), 7.29 - 7.31 (m, 1H), 7.17 - 7.19 (m, 3H), 6.85 - 6.87 (m, 2H), 4.78 - 4.79 (m, 1H), 3.76 - 3.81 (m, 1H), 3.49 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.95 (s, 3H), 2.54 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.33 (s, 6H), 2.16 - 2.21 (m, 2H), 2.03 - 2.06 (m, 2H), 1.80 - 1.83 (m, 2H), 1.69 - 1.73 (m, 2H).

1.3 化合物 DD02014H: 4-((2-((1-(1-甲基哌啶-4-基)-1H-吡唑-4-基)氨基)喹唑啉-8-基)氧代)环己烷-1-醇的合成

化合物 DD02014H 的合成路线示于图 11。

向化合物 8 (400 mg, 1.23 mmol, 1.00 eq) 和化合物 11a (569.1 mg, 1.48 mmol, 1.20 eq) 的 DMF (10.0 mL) 溶液中添加 Cs₂CO₃ (1.00 g, 3.08 mmol, 2.50 eq)，所得混合物在 80℃下搅拌 1 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量 (RT=0.958 min)。反应结束后，加入乙酸乙酯 (100 mL)，并先后用饱和 NaHCO₃ 溶液 (50.0 mL)、盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相，无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩得到残余物，所述残留物用石油醚: 乙酸乙酯 (3:1, 20.0 mL) 振荡分散，过滤并干燥，得到黄色固体、化合物 14 (300 mg, 559 umol, 45.3%产率)，结构经 LCMS 表征。

LCMS 产物 RT = 0.912 min, m/z = 537.3 (M+H)⁺。

在 25℃下将化合物 14 (300 mg, 559 umol, 1.00 eq) 与 HCl/MeOH (4 M, 10.0 mL, 71.6 eq) 的混合物搅拌 1 小时，LCMS (EW20001-117-P1A1) 显示检测到产物消失、目标产物分子量出现 (RT=0.729 min)。反应结束后，将混合物浓缩，所得固体经制备 HPLC 纯化，随后用饱和 NaHCO₃ 溶液将混合物调节至 pH=8，DCM (50.0 mL*2) 萃取，盐水 (50.0 mL) 洗涤有机相，无水硫酸钠干燥，过滤并浓缩得黄色固体、化合物 DD02014H (35.5 mg, 138 umol, 24.6%产率, 96.9%纯度)，结构经 LCMS、HPLC 和 ¹H NMR 确证。

LCMS 产物 RT = 0.730 min, m/z = 423.2 (M+H)⁺

HPLC 产物 RT = 1.192 mins, purity: 98.0%

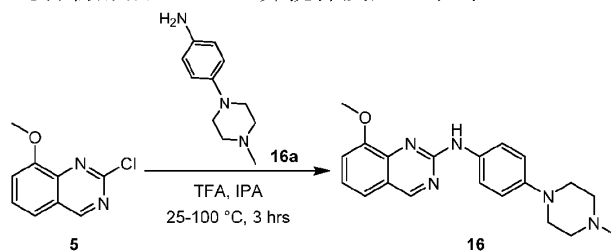
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.01 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.28 - 7.30 (m, 1H), 7.17 - 7.22 (m, 3H), 4.66 - 4.68 (m, 1H), 4.23 - 4.30 (m, 1H), 3.85 - 3.89 (m, 1H), 2.99 - 3.03 (m, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.25 - 2.29 (m, 4H), 2.15 - 2.17 (m, 4H), 1.95 - 2.06 (m, 2H), 1.84 - 1.88 (m, 4H).

1.4 化合物 DD02006H: 4-((2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)喹唑啉-8-基)氧代)环己烷-1-醇的合成

化合物 DD02006H 的合成路线示于图 12。

1.4.1 化合物 16 的合成

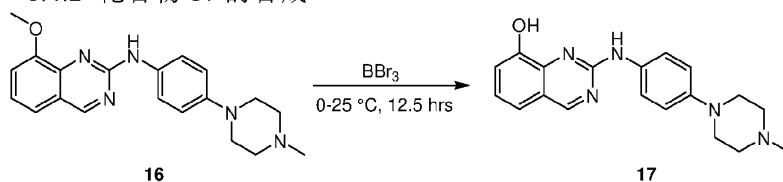
- 5 25℃下, 向化合物 5 (1.00 g, 5.14 mmol, 1.00 eq) 和化合物 16a (1.08 g, 5.65 mmol, 1.10 eq) 的 IPA (20.0 mL) 溶液中添加 TFA (586 mg, 5.14 mmol, 380 uL, 1.00 eq), 混合均匀后, 将反应混合物加热至 100℃并搅拌反应 3 小时。



- 10 LCMS 显示检测到目标产物的分子量 (RT=0.691 分钟)。反应结束后, 将混合物倒入 30.0 mL H₂O 中, 然后用乙酸乙酯 (60.0 mL*4) 萃取, 盐水 (60.0 mL*2) 洗涤有机层, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩, 得到化合物 16 (1.50 g, 粗品), 为一黄色固体。产品未经纯化, 直接用作下一步。

LCMS: 产物 RT = 0.691 min, m/z = 350.2 (M+H)⁺

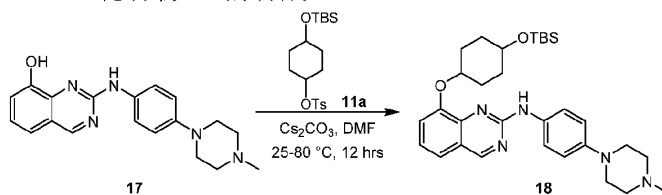
1.4.2 化合物 17 的合成



- 15 0℃下, 向化合物 16 (1.30 g, 3.72 mmol, 1.00 eq) 的 DCM (20.0 mL) 溶液中逐滴添加溶解于 DCM (10.0 mL) 中的 BBr₃ (2.80 g, 11.2 mmol, 1.08 mL, 3.00 eq), 滴加完毕之后, 在 0℃搅拌 30 min, 随后将混合物加热至 25℃并搅拌 12 h. LCMS 显示检测到目标产物的分子量 (RT=0.677 min)。反应结束后, 将混合物倒入冰水 (30.0 mL) 中, 用乙酸乙酯 (60.0 mL*3) 萃取, 将盐水洗涤有机层 (30.0 mL*2), 无水 Na₂SO₄ 上干燥, 过滤并减压浓缩, 得到化合物 17 (1.20 g, 粗品), 为一灰色固体。产品未经纯化, 直接用作下一步。
- 20 LCMS: 产物 RT = 0.677 min, m/z = 336.2 (M+H)⁺

LCMS: 产物 RT = 0.677 min, m/z = 336.2 (M+H)⁺

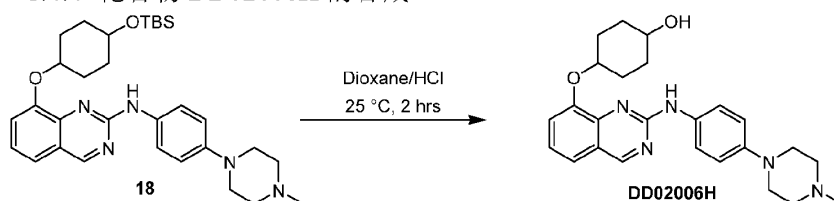
1.4.3 化合物 18 的合成



化合物 17 (150 mg, 447 μmol , 1.00 eq)、化合物 11a (276 mg, 894 μmol , 2.00 eq) 和 Cs_2CO_3 (364 mg, 1.12 mmol, 2.50 eq) 溶解于 DMF (10.0 mL) 中, 随后将混合物加热到 80°C 反应 12 小时。LCMS 显示检测到目标产品分子量 (RT=0.934 分钟)。反应结束后, 将混合物倒入 30.0 mL H_2O 中, 然后用乙酸乙酯 (30.0 mL*4) 萃取, 将有机层
5 盐水 (30.0 mL*2) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩, 得到化合物 18 (200 mg, 粗品), 为一黄色固体。产品未经纯化, 直接用作下一步。

LCMS 产物: RT = 0.934 min, $m/z = 548.4$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺

1.4.4 化合物 DD02006H 的合成



在 25°C 下向化合物 18 (200 mg, 365 μmol , 1.00 eq) 的 DCM (6.00 mL) 溶液中滴加 HCl/1,4-二氧六环 (4 M, 2.00 mL, 21.9 eq), 所得混合物搅拌 2 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量 (RT=0.746 min)。薄层色谱 (DCM:MeOH=8:1, 物料 $R_f=0.5$, 产品 $R_f=0.2$) 显示有新斑点形成, 无残留物质。将混合物倒入 30.0 mL H_2O 中, 用饱和 NaHCO_3 调节 pH 值约 8, 然后用乙酸乙酯 (30.0 mL*4) 萃取, 盐水 (30.0 mL*2) 洗涤
15 有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩。粗产物经预高效液相色谱, 减压浓缩, 得到黄色固体目标产物 (68.6 mg, 157 μmol , 43.1% 产率, 99.4% 纯度), 结构经 ^1H NMR、LCMS 和 HPLC 确认。

LCMS 产物: RT = 0.734 min, $m/z = 434.3$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺;

HPLC 产物 RT = 1.373 mins, 99.4% 纯度;

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.57 - 9.71 (m, 1H), 9.12 - 9.27 (m, 1H), 7.90 - 8.06 (m, 2H), 7.40 - 7.47 (m, 1H), 7.28 - 7.34 (m, 1H), 7.18 - 7.26 (m, 1H), 6.86 - 6.99 (m, 2H), 4.75 (br s, 1H), 4.52 - 4.64 (m, 1H), 3.63 (br s, 1H), 3.07 (br d, $J = 4.0$ Hz, 4H), 2.24 (s, 3H), 1.91 - 2.05 (m, 2H), 1.74 - 1.87 (m, 2H), 1.56 - 1.72 (m, 4H).

1.5 化合物 DD02008H: 8-(2-甲氧基乙氧基)-N-(4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)喹唑啉-2-
25 胺的合成

图 13 显示了化合物 DD02008H 的合成路线。

将化合物 17 (150 mg, 447 μmol , 1.00 eq)、化合物 17a (68.4 mg, 492 μmol , 46.2 μL , 1.10 eq) 和 Cs_2CO_3 (437 mg, 1.34 mmol, 3.00 eq) 溶解于 DMF (10.0 mL) 中, 然后将混合物加热至 80°C 并搅拌反应 12 小时, LCMS 显示检测到目标产品分子量
30 (RT=0.703 分钟)。薄层色谱 (DCM:MeOH=10:1, 物料 $R_f=0.1$, 产品 $R_f=0.3$) 显示有新斑点形成, 无起始原料。反应结束后, 将混合物倒入 30.0 mL H_2O 中, 然后用乙酸乙酯 (30.0 mL*4) 萃取, 盐水 (30.0 mL*2) 洗涤有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压

浓缩。通过柱层析法 (SiO₂, DCM/MeOH=20/1 至 5/1) 纯化, 获得黄色固体目标化合物 DD02008H (71.94 mg, 183 umol, 40.9%产率, 98.6%纯度), 结构经 ¹H NMR、LCMS 和 HPLC 确证。

LCMS 产物: RT = 0.710 min, m/z = 416.2 (M+H+Na)⁺

5 HPLC 产物: RT = 1.267 min, 98.7% purity

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.04 (s, 1H), 7.72 (br d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 7.15 - 7.24 (m, 2H), 6.97 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.33 - 4.41 (m, 2H), 3.91 - 3.99 (m, 2H), 3.56 (s, 3H), 3.13 - 3.25 (m, 4H), 2.58 - 2.65 (m, 4H), 2.38 (s, 3H).

1.6 化合物 DD02015H: 3-((2-((4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯基)氨基)喹唑啉-8-基)氧代)环戊烷-1-醇的合成

图 14 显示了化合物 DD02015H 的合成路线。

将化合物 17 (150 mg, 447 umol, 1.00 eq)、化合物 18a (331 mg, 894 umol, 2.00 eq) 和 Cs₂CO₃ (364 mg, 1.12 mmol, 2.50 eq) 溶解于 DMF (10.0 mL) 中, 然后将混合物加热至 80℃ 并在搅拌反应 12 小时。LCMS 显示检测到目标产品分子量

15 (RT=0.893min), TLC (DCM:MeOH=10:1, 物料 R_f=0.1, 产品 R_f=0.25) 显示有新斑点形成, 无起始原料。反应结束后, 所得混合液倒入 30 mL 水中, 随后用乙酸乙酯(30.0 mL * 4)萃取, 盐水洗涤 (30.0 mL * 2), 无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压除去溶剂, 所得残留固体通过柱层析法 (SiO₂, DCM/MeOH=20/1 至 5/1) 纯化, 得到黄色固体化合物 19 (200 mg, 375 umol, 83.8%产率)。

20 LCMS 产物: RT = 0.893 min, m/z = 534.4 (M+H)⁺

将化合物 19 (200 mg, 375 umol, 1.00 eq) 溶于 DCM (6.00 mL) 中, 25℃ 下滴加 HCl /1,4-二氧六环 (4 M, 4.00 mL, 42.7 eq), 滴加完毕, 搅拌反应 2 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量 (RT=0.721min), 高效液相色谱显示起始原料反应完毕。反应结束后将混合物倒入 30.0 mL H₂O 中, 用饱和 NaHCO₃ 调节至 pH 值约 8, 然后用乙酸乙酯 (30.0 mL*4) 萃取, 有机层盐水 (30.0 mL*2) 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并减压浓缩, 所得粗产物经制备高效液相色谱纯化, 得黄色固体目标化合物 DD02015H (110 mg, 262 umol, 70.0%产率, 100%纯度), 结构经 ¹H NMR、LCMS 和 HPLC 确证。

LCMS 产物: RT = 0.716 min, m/z = 420.3 (M+H)⁺

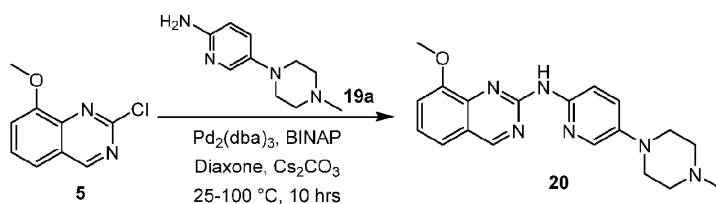
HPLC 产物: RT = 1.286 min, 100%纯度.

30 ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.04 (s, 1 H), 7.60 (br d, *J* = 8.0 Hz, 2 H), 7.32 - 7.38 (m, 1 H), 7.21 - 7.24 (m, 2 H), 6.93 - 7.01 (m, 2 H), 5.15 (t, *J* = 4.0 Hz, 1 H), 4.41 (br t, *J* = 4.0 Hz, 1 H), 3.17 - 3.26 (m, 4 H), 2.62 (m, 4 H), 2.38 (s, 3 H), 1.94 - 2.20 (m, 6 H).

1.7 化合物 DD02021H: 4-((2-((5-(4-甲基哌嗪-1-基)吡啶-2-基)氨基)喹唑啉-8-基)氧代)环己烷-1-醇的合成

35 图 15 显示了化合物 DD02021H 的合成路线。

1.7.1 化合物 20 的合成



在 25℃ 下，将化合物 5（500 mg，2.57 mmol，1.00 eq）、化合物 19a（988 mg，5.14 mmol，2.00 eq）、Pd₂(dba)₃（353 mg，386 μmol，0.15 eq）和 BINAP（184 mg，295 μmol，1.15e-1 eq）溶解于 1,4-二氧六环（30.0 mL）中，所得混合物中加入 Cs₂CO₃（1.67 g，5.14 mmol，2.00 eq），然后将反应混合物加热到 100℃ 并搅拌反应 10 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量（RT=0.643 min）。反应结束后，将混合物倒入 30.0 mL H₂O 中，然后用 DCM（50.0 mL*3）萃取，有机层盐水（30.0 mL*3）洗涤，无水 Na₂SO₄ 上干燥，过滤并减压浓缩，得到化合物 20（600 mg，粗品），为一黄色固体。产品未经纯化，直接用于下一步反应。

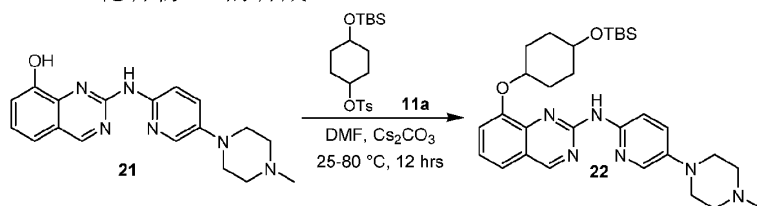
1.7.2 化合物 21 的合成



将化合物 20（600 mg，1.71 mmol，1.00 eq）溶于 DCM（10.0 mL）中，所得溶液逐滴添加溶解于 DCM（5.00 mL）中的 BBr₃（429 mg，1.71 mmol，165 μL，1.00 eq），滴加完毕，体系在 25℃ 下搅拌反应 12 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量（RT=0.321 min）。反应结束后，将混合物倒入冰水（40.0 mL）中，用饱和 NaHCO₃ 将 pH 调整至约 8，然后用 DCM（50.0 mL*3）萃取，有机层经盐水（30.0 mL*3）洗涤，无水硫酸钠干燥，过滤并减压浓缩，得到化合物 21（600 mg，粗品），为一黄色固体。产品未经纯化，直接用于下一步反应。

LCMS 产物 RT = 0.324 min, m/z = 337.2 (M+H)⁺

1.7.3 化合物 22 的合成



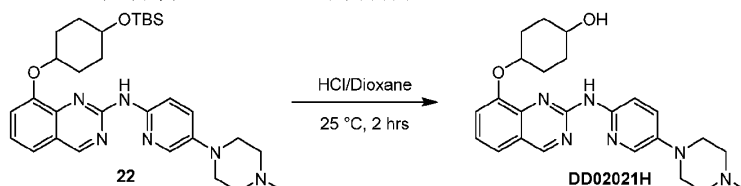
将化合物 21（600 mg，1.78 mmol，1.00 eq）、化合物 11a（1.37 g，3.57 mmol，2.00 eq）和 Cs₂CO₃（1.45 g，4.46 mmol，2.50 eq）溶解于 DMF（10.0 mL）中，所得混合物加热到 80℃ 反应 12 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量（RT=0.830 min），薄层色谱（DCM:MeOH=10:1，物料 R_f=0.1，产品 R_f=0.3）显示有新斑点形成，无起始原料。反应结束后，将混合物倒入 30.0 mL H₂O 中，然后用乙酸乙酯（60.0 mL*3）萃取，

有机层盐水 (40.0 mL*2) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩, 所得物质通过柱层析法 (SiO_2 , $\text{DCM}/\text{MeOH}=40/1$ 至 $5/1$) 纯化, 得到化合物 22 (700 mg, 1.08 mmol, 60.5% 产率, 84.6% 纯度), 为一黄色固体。

LCMS 产物 $\text{RT} = 0.830 \text{ min}$, $m/z = 549.4 (\text{M}+\text{H})^+$

5 HPLC 产物 $\text{RT} = 2.563 \text{ mins}$, 84.6% 纯度.

1.7.4 化合物 DD02021H 的合成



将化合物 22 (600 mg, 925 μmol , 1.00 当量)、 $\text{HCl}/1,4\text{-二氧六环}$ (4 M, 6.00 mL, 25.9 当量) 溶解于 DCM (10.0 mL) 中, 所得混合物在 25°C 下搅拌反应 1 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量 ($\text{RT}=0.680\text{min}$), 薄层色谱 ($\text{DCM}:\text{MeOH}=10:1$, 物料 $R_f=0.3$, 产品 $R_f=0.15$) 显示有新斑点形成, 无起始原料。反应结束后, 搅拌下将混合物缓慢倒入 40.0 mL H_2O 中, 然后用乙酸乙酯 (80.0 mL*3) 萃取, 有机层盐水 (50.0 mL*2) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤并减压浓缩。所得固体经制备高效液相色谱纯化, 所得物质用饱和 NaHCO_3 调节 pH 至 8 左右, 然后用 DCM (40.0 mL*4) 萃取, 盐水 (40.0 mL*3) 洗涤有机层, 无水 Na_2SO_4 上干燥, 减压过滤浓缩, 得到目标产物 DD02021H, (148 mg, 329 μmol , 35.6% 产率, 96.7% 纯度), 为黄色固体, 结构经 $^1\text{H NMR}$ 、LCMS 和 HPLC 确证。

LCMS 产物 $\text{RT} = 0.717 \text{ min}$, $m/z = 435.3 (\text{M}+\text{H})^+$

HPLC 产物 $\text{RT} = 1.232 \text{ min}$, 96.7% 纯度

20 $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO) δ 9.74 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.86 (d, $J = 8.0 \text{ Hz}$, 1H), 8.02 (d, $J = 4.0 \text{ Hz}$, 1H), 7.43 - 7.57 (m, 2H), 7.24 - 7.40 (m, 2H), 4.78 (br s, 1H), 4.62 - 4.73 (m, 1H), 3.54 - 3.69 (m, 1H), 3.08 - 3.16 (m, 4H), 2.47 (m, 3H), 2.23 (s, 3H), 1.93 - 2.04 (m, 2H), 1.74 - 1.88 (m, 2H), 1.58 - 1.72 (m, 4H).

25 1.8 化合物 DD02018H: 4-((8-((4-羟基环己基)氧代)喹啉-2-基)氨基)-N-(1-甲基哌啶-4-基)苯酰胺的合成

图 16 显示了化合物 DD02018H 的合成路线。

25°C 下, 将化合物 11 (400 mg, 2.21 mmol, 1.00 eq)、化合物 11a (1.28 g, 3.32 mmol, 1.50 eq) 和 Cs_2CO_3 (1.44 g, 4.43 mmol, 2.00 eq) 溶解于在 DMF (10.0 mL) 中, 所得混合物加热至 80°C 并搅拌反应 2 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量

30 ($\text{RT}=1.218\text{min}$)。反应结束后, 将混合物缓慢倒入 40.0 mL H_2O 中, 然后用 DCM (80.0 mL*3) 萃取, 有机层盐水 (50.0 mL*2) 洗涤, 无水 Na_2SO_4 上干燥, 过滤并减压浓缩, 得到化合物 15 (310 mg, 粗品), 为一灰色固体。产品未经纯化, 直接用于下一步反应。

将化合物 15 (260 mg, 661 μmol , 1.00 eq)、化合物 15a (231.53 mg, 992.38 μmol , 1.50 eq) 和 TFA (75.4 mg, 661 μmol , 49.0 μL , 1.00 eq) 溶解于 IPA (10.0 mL) 中, 然后将所得混合物加热至 80°C 并搅拌反应 2 小时, 再将混合物加热至 100°C 并搅拌 2 小时。LCMS 显示检测到目标产物分子量 (RT=0.762 min), 高效液相色谱显示纯度为 59.7% (RT=1.535 min)。反应结束后, 在搅拌下将混合物缓慢倒入 40.0 mL H_2O 中, 用饱和 NaHCO_3 调节 pH 至 8 左右, 然后用 DCM (80.0 mL*3) 萃取, 有机层用盐水 (50.0 mL*2) 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤并减压浓缩, 所得粗品经制备高效液相色谱纯化, 所得物质用饱和 NaHCO_3 调节 pH 至 8 左右, 用 DCM (40.0 mL*4) 萃取, 用盐水 (40.0 mL*3) 洗涤有机层, 无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 浓缩, 获得目标产物 DD02018H (17.1 mg, 35.13 μmol , 5.31% 产率, 97.7% 纯度), 为一浅黄色固体, 结构经 ^1H NMR、LCMS 和 HPLC 确证。

LCMS 产物 RT = 0.771 min, m/z = 476.2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

HPLC 产物 RT = 1.535 mins, 97.3% 纯度

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.15 (br s, 1H), 9.30 (br s, 1H), 8.23 (br d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.13 (br s, 1H), 7.83 (br d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.49 (br s, 1H), 7.27 - 7.42 (m, 2H), 4.73 (br s, 1H), 4.60 (br s, 1H), 3.87 (br s, 1H), 3.07 (br s, 2H), 2.62 - 2.67 (m, 2H), 2.33 (br s, 3H), 1.84 - 2.08 (m, 3H), 1.73 (m, 9H).

1.9 化合物 DD02002H: 4-((8-((3-羟基环戊基)氧代)啉啉-2-基)氨基)苯磺酰胺的合成

图 17 显示了化合物 DD02002H 的合成路线。

1.9.1 化合物 23 的合成

氮气保护下, 将化合物 11 (200 mg, 1.11 mmol) 溶于无水四氢呋喃 (5 mL) 中, 依次加入三苯基磷 (581 mg, 2.22 mmol), DIAD (449 mg, 2.22 mmol), 搅拌 15 min, 最后加入 1, 3-环戊二醇 (即化合物 22, 340.1 mg, 3.33 mmol), 反应液室温搅拌过夜, TLC (PE/EA=3:1) 分析显示原料消耗完毕, 有新产物点生成。反应结束后, 将所得混合物浓缩, 除去溶剂, 粗产品经硅胶柱分离得化合物 23 (210 mg), 收率 71.5%, 为一浅黄色固体。

LCMS 产物 RT=2.76 min, m/z = 265.1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

1.9.2 化合物 DD02002H 的合成

氮气保护下, 将化合物 23 (200 mg, 0.76 mmol) 溶于异丙醇 (5 mL) 中, 加入对氨基苯磺酰胺 (260.2 mg, 1.51 mmol), 反应加热至 90°C 反应过夜, 薄层层析分析显示有部分原料剩余, 有新产物点生成, LCMS 显示检测到目标产物分子量。反应结束后, 浓缩, 所得粗品经硅胶柱分离, 得目标分子 DD02002H (104 mg), 收率 34%, 为一白色固体, 结构经 ^1H NMR 和 LCMS 确证。

LCMS 产物 RT = 3.46 min, m/z = 401.1 ($\text{M}+\text{H}$)⁺

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.21 (s, 1H), 8.23-8.25 (m, 2H), 7.87-7.89 (m, 2H), 7.48 (d,

$J = 7.6 \text{ Hz}$, 1H), 7.33-7.37(m, 2H), 4.36(m, 1H), 4.20(m, 1H), 1.76-2.10(m, 6H)。

1.10 化合物 DD02019H: 3-((8-((4-羟基环己基)氧代)喹唑啉-2-基)氨基)苯磺酰胺的合成
图 18 显示了化合物 DD02019H 的合成路线。

1.10.1 化合物 26 的合成

5 氮气保护下, 将化合物 11 (200 mg, 1.11 mmol)溶于无水四氢呋喃 (5 mL) 中, 依次加入三苯基磷 (581 mg, 2.22 mmol), DIAD (449 mg, 2.22 mmol), 所得混合物搅拌 15min, 最后加入 1, 4-环己二醇 (387 mg, 3.33 mmol), 所得反应液室温搅拌过夜, TLC (PE/EA=3:1) 分析显示原料消耗完毕, 有新产物点生成, LCMS 检测到目标产品分子量 (RT = 4.03 min), 反应液浓缩, 所得粗产品经硅胶柱分离得化合物 26 (197 mg),
10 收率 70.7%, 浅黄色固体。

LCMS 产物 RT = 4.03 min, $m/z = 279.1 (M+H)^+$

1.10.2 化合物 DD02019H 的合成

氮气保护下, 将化合物 26 (150 mg, 0.54 mmol)溶于异丙醇 (5 mL) 中, 加入间氨基苯磺酰胺 (185.4 mg, 1.1 mmol), 反应加热至 90℃ 反应过夜, TLC 分析显示原料有剩
15 余, 同时有新产物点生成, LC-MS 检测到目标产物分子量, 反应液浓缩, 所得粗品经硅胶柱分离, 得目标分子 DD02019H (27 mg), 收率 12.1%, 为一白色固体, 结构经 LC-MS 与 ^1H NMR 确证。

LCMS 产物 RT = 3.54 min, $m/z = 415.2 (M+H)^+$

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 9.19 (s, 1H), 8.51(m, 2H), 7.34-7.55(m, 5H), 4.62 (m,
20 1H), 3.73(m, 1H), 1.57-1.94(m, 8H)。

1.11 式 I-1 系列化合物体外抑制 HPK1 激酶活性的测试

表 1. 列出了实验所需试剂及其来源情况

材料与试剂名称	供应商	产品编号
HPK1	Signalchem	M23-11G-10
MBP	Signalchem	M42-52N-1MG
ADP-Glo Kinase Assay	Promega	V9102
DMSO	Sigma	D8418
Sunitinib	Selleck	C64749
ATP	Promega	V915B

所有化合物测试的起始浓度为 10 μM , 三倍浓度梯度稀释, 共 10 个浓度点, 每个浓度重复一次。

25 1.11.1 化合物体外抑制 HPK1 激酶活性测试

实验开始前, 配置好 50 μM DTT 以及酶促反应系统缓冲液。

移液枪将化合物稀释液转移到 384 孔板中, 加毕, 将 384 孔板密封, 转速 1000g 下离心 1 min; 在激酶缓冲液中, 配置好 2 倍浓度的 HPK1 溶液, 随后向 384 孔加入 2.5 μL 配置好的 2 倍浓度的 HPK1 溶液, 在转速 1000 g 下离心 30 s, 室温孵育 10 min; 在激
30 酶缓冲液中, 制备 2 倍浓度的 MBP 和 ATP 的混合液, 向上述反应体系中加入 2.5 μL 配

置好的 2 倍浓度的 MBP 和 ATP 的混合液，反应开始，在转速 1000 g 下离心 30 s，随后室温孵育 1 h；向反应体系中加入 5 μ L ADP-Glo 试剂，室温孵育 40 min；加入 10 μ L 激酶检测试剂，室温孵育 40 min，随后在 Envision 2104 plate 阅读器上读取发光信号，按照以下公式计算抑制率：

$$5 \quad \% \text{ inhibition} = 100 - (\text{Signal}_{\text{cmpd}} - \text{Signal}_{\text{Ave_PC}}) / (\text{Signal}_{\text{Ave_VC}} - \text{Signal}_{\text{Ave_PC}}) \times 100$$

上式中，cmpd 指测试化合物，PC 指阳性对照，VC 指阴性对照。HPK1 实验所采用的阳性对照为 Sunitinib。

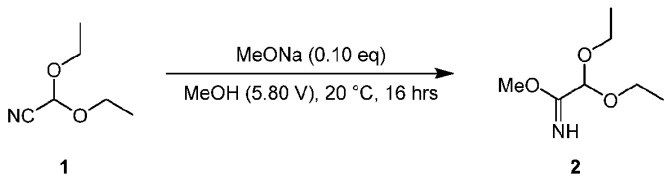
表 2. 列出了各实施例所述的化合物对 HPK1 激酶活性的抑制能力

实施例	HPK1 活性/IC ₅₀ , nM
1	<50
4	<50
2	<50
6	<100
7	<300
9	<300
5	<200
3	<50
8	<50
10	>300
Sunitinib	5.20

10 **2. 式 I-2 系列化合物的合成及 HPK1 抑制活性检测**

2.1 化合物(1S,2S)-N-(8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-甲酰胺(即 DD02001A_cis)与化合物(1S,2R)-N-(8-氨基-7-氟-6-(1-甲基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-甲酰胺(即 DD02001A_trans)的合成

2.1.1 化合物 2 的合成



15

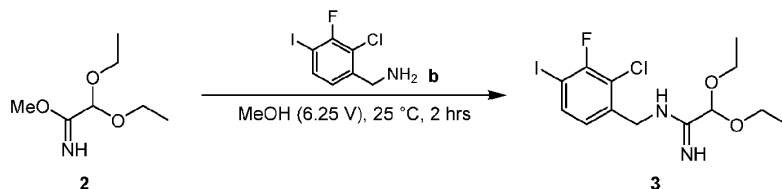
向化合物 1 (345 g, 2.67 mol, 371 mL, 1.00 eq) 的 MeOH (2.00 L) 溶液中加入 MeONa (14.4 g, 267 mmol, 0.10 eq)，用 N₂ 吹扫 3 次，然后在 20℃ 下搅拌 16 小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=5/1) 显示化合物 1 (R_f=0.70) 消失，检测到一个新斑点 (R_f=0.45)。用干冰将所得混合物的 pH 值调整为 9 左右，然后在真空下浓缩得到黄色混合物。将混合物倒入水中 (1.00 升)，然后用乙酸乙酯 (1.00 L*2) 萃取。有机层经无水 Na₂SO₄ 干燥，过滤，真空浓缩，得化合物 2 (400g, 2.48 mol, 收率 92.9%)，为淡黄色油状物质，结构经 ¹H NMR 确证。

20

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (s, 1H), 4.80 (s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.61 -3.53 (m,

4H), 1.24 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H)。

2.1.2 化合物 3 的合成

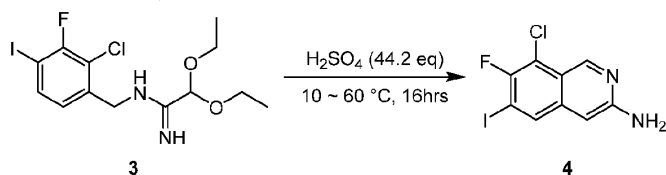


在 25℃ 下向化合物 **b** (80.0 g, 171 mmol, 61.0% 纯度, 1.00 eq) 的 MeOH (500 mL) 溶液中加入化合物 **2** (41.3 g, 256 mmol, 1.50 eq), 然后在 25℃ 下搅拌 2 小时。LCMS 显示化合物 **b** 消失, 并检测到所需质量。反应结束后, 45℃ 下、减压下浓缩所得液体混合物。用乙酸乙酯 (1.00 L) 溶解残留物, 并用盐水 (200 mL*2) 洗涤。有机相用 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并浓缩得到残渣。20℃ 下用石油醚/乙酸乙酯 (5/1, 150ml) 研磨残渣, 并过滤以获得滤饼, 得到化合物 **3** (53.0g, 121mmol, 收率 71.0%, 纯度 95.0%), 为一淡黄色固体, 结构经 LC-MS 以及 ¹H NMR 确证。

LCMS: $m/z = 415.0$ (M+H)⁺

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.76 (dd, $J = 6.2, 8.2$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.62 - 6.19 (m, 1H), 4.76 (s, 1H), 4.23 (s, 2H), 3.66 - 3.42 (m, 4H), 1.15 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H)。

2.1.3 化合物 4 的合成

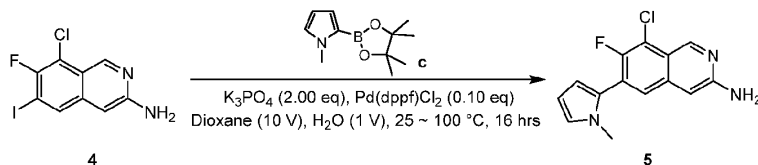


化合物 **3** (94.0 g, 212 mmol, 93.5% 纯度, 1.00 当量) 于 10℃ 下添加至 H₂SO₄ (920 g, 9.38 mol, 500 mL, 44.2 当量) 中, 然后加热至 60℃, 反应 16 小时。LCMS 显示化合物 **3** 被消耗完毕, 并检测到目标产物分子量。反应结束后, 将反应液冷却至 25℃, 冰 (5.00 L) 冷却, 用 NaOH 固体调整 pH 值约 13, 温度保持在 20℃ 以下, 出现大量固体, 过滤, 滤饼真空干燥, 在 25℃ 下用乙酸乙酯 (300 mL) 研磨滤饼, 得黄色固体化合物 **4** (60.0 g, 186 mmol, 87.7% 产率), 结构经 LC-MS 以及 ¹H NMR 确证。

LCMS: $m/z = 322.9$ (M+H)⁺

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.96 (s, 1H), 8.21 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 6.62 (s, 1H), 6.31 (s, 2H)。

2.1.4 化合物 5 的合成

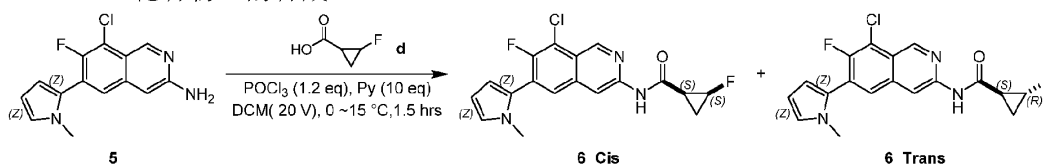


25℃下, 将化合物 4 (41.0 g, 121 mmol, 95.6%纯度, 1.00 当量) 与化合物 c (30.2 g, 146 mmol, 1.20 eq) 溶解于二氧六环 (410 mL) 和 H₂O (41.0 mL) 中, 所得溶液加入 K₃PO₄ (51.6 g, 243 mmol, 2.00 eq) 和 Pd(dppf)Cl₂ (8.89 g, 12.1 mmol, 0.10 eq), 所得悬浮液在真空下进行脱气并用 N₂ 吹扫数次, 随后反应在 100℃下搅拌 7 小时。LCMS 显示化合物 4 被消耗完全, 并检测到目标产物分子量。反应结束后, 所得混合物用冰水 (1000 mL) 淬灭, 然后用二氯甲烷 (1000 mL*2) 萃取, 有机层使用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤并在真空下浓缩, 所得固体在 25℃下用石油醚/乙酸乙酯 (2/1, 200 mL) 研磨, 得到化合物 5 (33.0 g, 103 mmol, 85.3%产率, 86.7%纯度), 为一黄色固体, 结构经 LC-MS 与 ¹H NMR 确证。

LCMS: m/z = 276.1 (M+H)⁺

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 9.20 (s, 1H), 7.41 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.92 - 6.79 (m, 1H), 6.71 (s, 1H), 6.36 (ddd, J = 0.8, 1.6, 3.6 Hz, 1H), 6.27 (dd, J = 2.8, 3.6 Hz, 1H), 4.57 (s, 2H), 3.64 (d, J = 1.6 Hz, 3H)。

2.1.5 化合物 6 的合成



15

5

6_Cis

6_Trans

在 0℃下将化合物 5 (33.0 g, 104 mmol, 86.7%纯度, 1.00 当量)、化合物 d (13.0 g, 124 mmol, 1.20 eq) 和吡啶 Py (82.1 g, 1.04 mol, 83.8 mL, 10.0 eq) 溶解于 DCM (500 mL) 中, 所得的溶液中添加 POCl₃ (19.3 g, 126 mmol, 11.7 mL, 1.22 eq), 随后反应液在 15℃下搅拌反应 1.5 小时。TLC (石油醚/乙酸乙酯=1/1) 显示, 化合物 5 (R_f = 0.40) 消耗完毕, 目标产物斑点 (R_f = 0.47, 0.75) 被检出。反应结束后, 反应混合物在减压下浓缩得到残渣, 残渣经硅胶层析纯化 (石油醚/乙酸乙酯=8/1-5/1, R_f=0.47, 0.75), 得化合物 6_cis 顺式 (7.00g, 19.3mmol, 18.6%产率, 100%纯度), 为一淡黄色固体, 化合物 6_trans 反式 (5.00g, 13.7mmol, 13.2%产率, 99.1%), 为一淡黄色固体。

20

LCMS: RT = 0.959 min, m/z = 362.1 (M+H)⁺

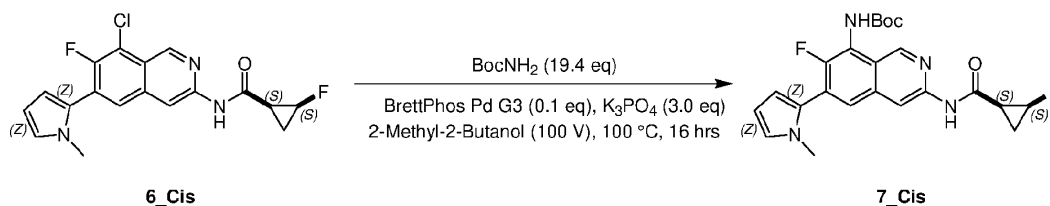
25 LCMS: RT = 0.986 min, m/z = 362.1 (M+H)⁺

化合物 6_cis: ¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 9.31 (s, 1H), 8.61 (s, 2H), 7.66 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.94 - 6.80 (m, 1H), 6.43 (td, J = 1.6, 3.4 Hz, 1H), 6.29 (dd, J = 2.8, 3.6 Hz, 1H), 5.00 - 4.73 (m, 1H), 3.66 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 2.08 - 1.87 (m, 2H), 1.34 - 1.24 (m, 1H)。

化合物 6_trans: ¹H NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ 9.33 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.66 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.93 - 6.80 (m, 1H), 6.42 (td, J = 1.6, 3.4 Hz, 1H), 6.29 (dd, J = 2.8, 3.6 Hz, 1H), 5.10 - 4.81 (m, 1H), 3.66 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 2.21 - 2.08 (m, 1H), 1.60 - 1.50 (m, 2H)。

30

2.1.6 化合物 7_cis 的合成



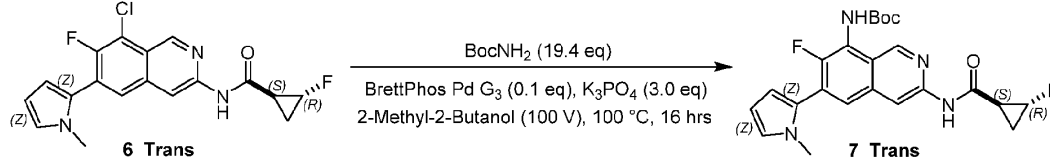
将化合物 6_Cis (10.0 g, 27.6 mmol, 1.00 eq)、BocNH₂ (62.8 g, 536 mmol, 19.4 eq)、BrettPhos Pd G3 (2.51 g, 2.76 mmol, 0.10 eq) 和 K₃PO₄ (17.6 g, 82.9 mmol, 3.00 eq) 溶解于 2-甲基-2-丁醇 (1.00 L) 中, 所得溶液脱气并用 N₂ 吹扫 3 次, 然后在 100 °C 下、N₂ 气氛下搅拌反应 16 小时。LCMS 显示化合物 6_Cis 被消耗完毕, 并检测到目标产物分子量。反应结束后, 过滤, 所得滤液在真空下浓缩, 残渣经硅胶层析纯化 (石油醚/乙酸乙酯=10/1-3/1, R_f=0.40), 得化合物 7_cis (3.90g, 8.31mmol, 收率 30.1%, 纯度 94.3%), 为一淡黄色固体, 结构经 LC-MS 以及 ¹H NMR 确证。

LCMS: m/z = 443.3 (M+H)⁺

HPLC: 94.3% purity under 220 nm.

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10.99 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.52 - 6.29 (m, 1H), 6.23 - 6.13 (m, 1H), 5.15 - 4.81 (m, 1H), 3.63 (s, 3H), 2.30 - 2.15 (m, 1H), 1.77 - 1.60 (m, 1H), 1.47 (s, 9H), 1.25 - 1.02 (m, 1H)。

2.1.7 化合物 7_trans 的合成



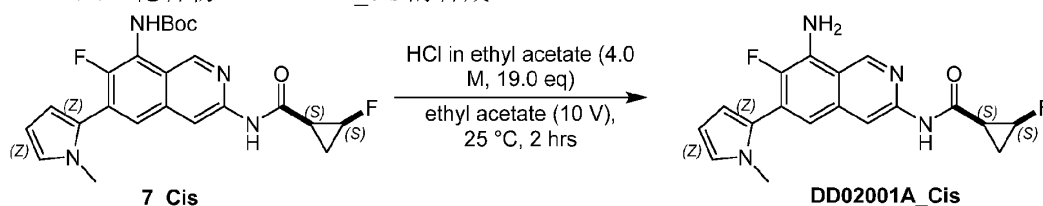
将化合物 6_trans (10.0 g, 27.6 mmol, 1.00 eq)、BocNH₂ (62.8 g, 536 mmol, 19.4 eq)、BrettPhos Pd G₃ (2.51 g, 2.76 mmol, 0.10 eq) 和 K₃PO₄ (17.6 g, 82.9 mmol, 3.00 eq) 溶解于 2-甲基-2-丁醇 (1.00 L) 中, 所得溶液脱气并用 N₂ 吹扫 3 次, 然后在 100°C、N₂ 气氛下搅拌反应 16 小时。LCMS 显示化合物 6_trans 消耗, 并检测到目标产物分子量。反应结束后, 过滤, 滤液减压浓缩, 所得固体经硅胶层析纯化 (石油醚/乙酸乙酯=10/1-5/1, R_f=0.50), 得到化合物 7_trans (5.50g, 10.8mmol, 收率 39.3%, 纯度 87.4%), 为一淡黄色固体, 结构经 LC-MS 以及 ¹H NMR 确证。

LCMS: m/z = 443.3 (M+H)⁺

HPLC: 87.4% purity under 220 nm.

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.11 (s, 1H), 9.33 (s, 1H), 9.09 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.82 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.04 - 6.93 (m, 1H), 6.45 - 6.31 (m, 1H), 6.17 (dd, *J* = 2.6, 3.6 Hz, 1H), 5.11 - 4.77 (m, 1H), 3.62 (s, 3H), 2.74 - 2.57 (m, 1H), 1.67 - 1.42 (m, 10H), 1.27 (dt, *J* = 6.6, 13.0 Hz, 1H)。

2.1.8 化合物 DD02001A_cis 的合成



将化合物 7_Cis (3.90 g, 8.31 mmol, 94.3%纯度, 1.00 当量) 溶于乙酸乙酯 (40.0 mL) 中, 在 25°C 下将 HCl/乙酸乙酯 (4 M, 39.4 mL, 18.9 eq) 加入上述溶液中, 反应在 25°C 下搅拌反应 16 小时。LCMS 显示化合物 7_Cis 被消耗完毕, 并检测到目标产物分子量。反应结束后, 所得溶液减压浓缩得到固体, 用饱和 NaHCO_3 水溶液调节 pH 值约 8, 然后用二氯甲烷/甲醇=10/1 (100 mL) 萃取残留物, 所得有机层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压蒸馏, 得到 DD02001A_Cis (3.07g, 8.17mmol, 收率 98.3%, 纯度 93.2%), 为一黄色固体, 结构经 LCMS、 ^1H NMR 以及 F NMR 确证。

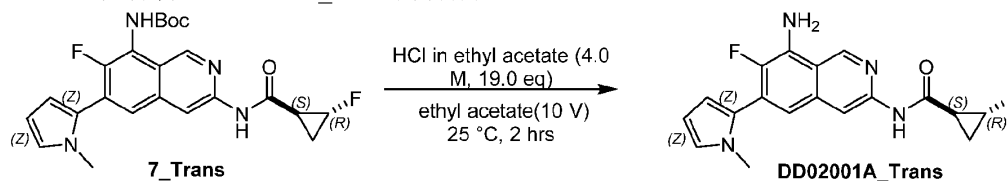
10 **LCMS:** $m/z = 343.2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

HPLC: 93.2% purity under 220 nm.

^1H NMR: (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.80 (s, 1H), 9.36 (s, 1H), 8.28 (s, 1H), 7.06 - 6.88 (m, 2H), 6.31 - 6.10 (m, 4H), 5.08 - 4.78 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 2.30 - 2.17 (m, 1H), 1.74 - 1.60 (m, 1H), 1.18 - 1.09 (m, 1H)

15 **^1F NMR:** (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ -141.11, -221.11。

2.1.9 化合物 DD02001A_trans 的合成



将化合物 7_trans (5.50 g, 10.8 mmol, 87.0%纯度, 1.00 当量) 溶解于乙酸乙酯 (40.0 mL) 中, 在 25°C 下将 HCl/乙酸乙酯 (4 M, 51.3 mL, 19.0 eq) 加入上述溶液中, 所得混合物在 25°C 下搅拌反应 16 小时。LCMS 显示化合物 7_trans 消耗完毕, 并检测到目标产物分子量。反应结束后, 反应液减压浓缩得到固体, 用饱和 NaHCO_3 水溶液调节 pH 值约 8, 然后用二氯甲烷/甲醇=10/1 (100 mL) 萃取, 所得有机层用无水硫酸钠干燥, 过滤, 减压浓缩, 25°C 下用石油醚/乙酸乙酯=2/1 (30 mL) 打浆, 过滤, 滤饼在真空下干燥, 得到黄色固体 DD02001A_trans (3.30g, 9.20mmol, 85.0%收率, 95.4%纯度), 结构经 LCMS、 ^1H NMR 以及 F NMR 确证。

LCMS: $m/z = 343.2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$

HPLC: 95.4% purity under 220 nm.

^1H NMR: (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.94 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 7.03 - 6.91 (m, 2H), 6.25 - 6.22 (m, 3H), 6.14 - 6.12 (m, 3H), 5.07 - 4.79 (m, 1H), 3.60 (s, 3H), 2.67 -

2.54 (m, 1H), 1.62 - 1.44 (m, 1H), 1.35 - 1.19 (m, 1H)

FNMR: (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ -140.94, -206.78。

2.2 式 I-2 系列化合物的体外抑制激酶活性的测试

表 3. 实验所需试剂

材料与试剂名称	供应商	产品编号
HPK1	Signalchem	M23-11G-10
GCK	Signalchem	M24-10G-10
TNIK	Signalchem	T27-11G-10
MBP	Signalchem	M42-52N-1MG
ADP-Glo Kinase Assay	Promega	V9102
DMSO	Sigma	D8418
Sunitinib	Selleck	C64749
ATP	Promega	V915B
PDK1	Invitrogen	P3001
Staurosporine	MCE	HY-15141

5 所有化合物测试的起始浓度为 10 μM，三倍浓度梯度稀释，共 10 个浓度点，每个浓度重复一次。

2.2.1 化合物体外抑制 HPK1 激酶活性测试

实验开始前，配置好 50 μM DTT 以及酶促反应系统缓冲液。

移液枪将化合物稀释液转移到 384 孔板中，加毕，将 384 孔板密封，转速 1000g 下离心 1 min；在激酶缓冲液中，配置好 2 倍浓度的 HPK1 溶液，随后向 384 孔加入 2.5 μL 配置好的 2 倍浓度的 HPK1 溶液，在转速 1000 g 下离心 30 s，室温孵育 10 min；在激酶缓冲液中，制备 2 倍浓度的 MBP 和 ATP 的混合液，向上述反应体系中加入 2.5 μL 配置好的 2 倍浓度的 MBP 和 ATP 的混合液，反应开始，在转速 1000 g 下离心 30 s，随后室温孵育 1 h；向反应体系中加入 5 μL ADP-Glo 试剂，室温孵育 40 min；加入 10 μL 激酶检测试剂，室温孵育 40 min，随后在 Envision 2104 plate 阅读器上读取发光信号，按照如下公式计算抑制率：

$$\% \text{ inhibition} = 100 - (\text{Signal}_{\text{cmpd}} - \text{Signal}_{\text{Ave_PC}}) / (\text{Signal}_{\text{Ave_VC}} - \text{Signal}_{\text{Ave_PC}}) \times 100$$

上式中，cmpd 指测试化合物，PC 指阳性对照，VC 指阴性对照。

2.2.2 化合物体外抑制 GCK、TNIK 与 PDK1 激酶活性测试

20 实验过程与抑制 HPK1 激酶活性测试实验完全一致，所不同的是，HPK1 实验所采用的阳性对照为 Sunitinib，GCK、TNIK 以及 PDK1 实验所采用的阳性对照为 Staurosporine。

表 4. DD02001A_cis 以及 DD02001A_trans 对上述 4 个激酶活性的抑制能力

化合物	活性/IC ₅₀ , nM			
	HPK1	GCK	TNIK	PDK1
DD02001A_cis	<10	>10	>10	>7000
DD02001A_trans	<10	>10	>10	>10000
Sunitinib	<10	-	-	-

Staurosporine	-	0.63	0.422	1.99
---------------	---	------	-------	------

如表 4 所示，DD02001A_trans 对 HPK1 激酶活性有高效的抑制作用。

2.2.3 化合物体外抑制其它蛋白激酶活性测试

表 5. 实验所需试剂及其来源

材料与试剂	供应商	Cat#	材料与试剂	供应商	Cat#
HTRF KinEASE-TK kit	Cisbio	62TK0PEC	AXL	Signalchem	A34-11H-10
ADP-Glo Kinase Assay	Promega	V9102	c-Kit	Carna	08-156
MAP4K1 (HPK1)	Signalchem	M23-10G-05	c-Met	Carna	08-151
GLK/MAP4K3	Invitrogen	PV6351	CSF1R	Invitrogen	4448892
MAP4K4 (HGK)	Carna	07-137	EGFR	Signalchem	E10-112G-10
MAP4K5 (KHS)	Signalchem	M27-10G-05	FGFR1	Invitrogen	PV3146
MAP4K6 (MINK1)	Signalchem	M53-11G-10	FGFR2	Invitrogen	PV3368
ZAP70	Carna	08-177	Her2	Invitrogen	PV3366
LCK	Signalchem	L03-10G-10	IGF1R	Signalchem	I02-11H-10
JNK1	Carna	04-163	ROS1	Signalchem	R14-11G-10
CK1 gamma 1, Active	Signalchem	C64-10G-10	VEGFR1 (FLT1)	Invitrogen	PV3666
Aurora B	Carna	05-102	VEGFR2	Signalchem	K01-11G-10
AKT1	Signalchem	A16-10G-10	JAK1	Invitrogen	PV4774
MNK1	Carna	02-145	Ret WT	Carna	08-159
MNK2	Carna	02-146	CDK2/Cyclin E1	Carna	04-165
TAK1-TAB1	Signalchem	M15-13G	CDK9/CycT1	Carna	04-110
MAPK14 (p38 α)	Signalchem	M39-10BG	CDK4/CyclinD3	Carna	04-105
SYK	Signalchem	S52-10G-10	ERK2	Signalchem	M28-10G-10
LYN (LYN B)	Signalchem	L13-10G-10	LRRK2	Invitrogen	PR8604B
ATR	Eurofins	14-953	CDK7	Invitrogen	PV3868
PAK4	Carna	07-126	CDK12	Biotrus	BP1642/1648/691
TBK1	Signalchem	T02-10G-10	BRAF	Invitrogen	PV3848
IKK-BETA	Signalchem	I03-18G-10	PI3K-alpha	Invitrogen	PV4788
ERK1	Signalchem	M29-10G-10	PKC-alpha	Signalchem	P61-18G

采用与上述抑制 HPK1 激酶活性测试实验类似实验流程，测试了化合物

5 DD02001A_trans 在 10 μ M 浓度下（复孔）对包括 HPK1 在内的 48 个激酶的抑制率。

表 6. DD02001A_trans 在 10 μ M 下对免疫相关蛋白激酶的抑制率

编号	蛋白激酶名称	抑制率 (%)
1	JAK1	97.278
2	CSF1R	101.965
3	SYK	85.074

4	LCK	87.600
5	LYNB	82.948
6	PI3K α	79.095

DD02001A_trans 对绝大多数的激酶，例如 AKT1、HER2、EGFR、ERK1/2、ZAP70、IGF1R、ATR、MNK1/2、ROS1、CDK4、CDK7、CDK12、p38-alpha、IKK-beta、CK1gamma1 等在 10 μ M 浓度下没有显示出明显的抑制效应（抑制率<40%），而对表 6 所示免疫相关蛋白激酶具有高度选择性的抑制，表明化合物 DD02001A_trans 具备优异的激酶抑制选择性。

2.2.4 化合物药代动力学参数的测定

取雄性 SD 大鼠各 3 只分别静脉注射（2 mg/kg）和灌胃（10 mg/kg）给予待测化合物，用液相色谱串联质谱法定量测定血浆中待测化合物的血药浓度，计算药动学参数，考察待测化合物在 SD 雄性大鼠体内的药代动力学特征。待测化合物，口服给药之后，在 0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 24 h 时间点分别取血，静脉给药之后，在 0.083 h、0.25 h、0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h 和 24 h 时间点分别取血，随后，将 50 μ L 血浆样品转移到 96 孔板上，加入 250 μ LACN（内标含 260ng/ml 甲苯磺丁酰胺）沉淀蛋白质，在 4 $^{\circ}$ C、4000 rpm 下离心 20 分钟，将 150 μ L 上清转移到新的 96 孔板中，并与 150 μ L 0.1%FA/水混合，随后取 5 μ L 所得溶液进入 LC-MS/MS 进行分析。

表 7. DD02001A_trans 的口服绝对生物利用度

化合物	口服绝对生物利用度%
DD02001A_trans	61.3

2.2.5 DD02001A_trans 急性毒性实验

分别一次性灌胃给予小鼠 DD02001A_trans (2000、1500、1000、500 mg/kg)，记录小鼠在给药后的反应和两周内的死亡情况。

2.2.5.1 动物：昆明种小鼠(购自广东省实验动物中心，许可证号: SCXK(粤)2018-0002)，10 只，雌雄各半。体重 18-22 g。小鼠购进后，将小鼠饲养三天，适应环境。小鼠在室内笼养，室温 23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C，相对湿度 40%-60%，自由饮食。

2.5.1.2 方法：小鼠实验前禁食不禁水 10 h。分别给予小鼠一次性灌胃各浓度受试药物（0.1ml/10g），连续观察 14 天，详细记录动物在给药后的中毒症状、中毒发生时间和持续时间以及动物死亡情况；对死亡动物及时进行尸检，记录病变情况，若肉眼观察到明显变化应作病理切片检查。

根据急性毒性实验结果，小鼠灌胃 DD02001A_trans 的最大耐受剂量在 1000-1500 mg/kg 范围。

实施例 2. HPK1 抑制 IFN- β 信号通路的检测

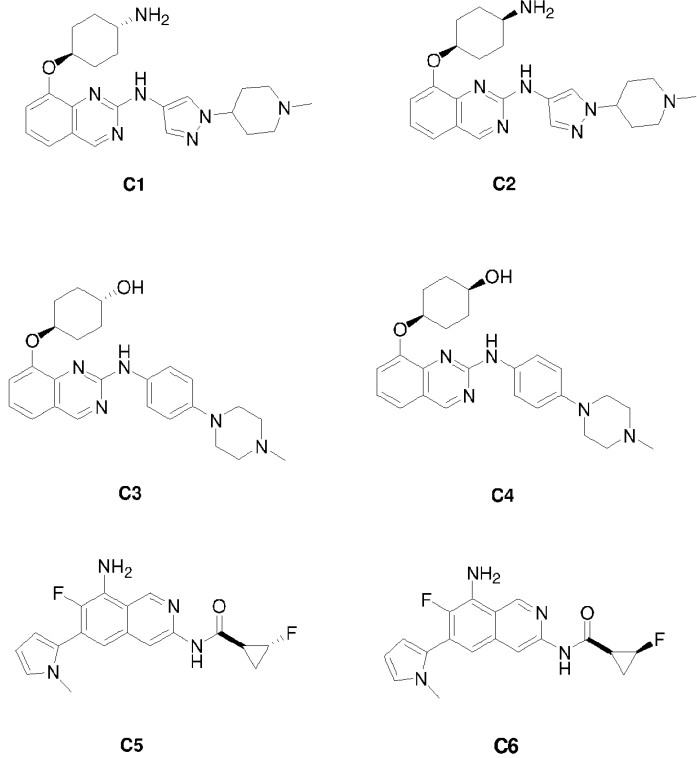
干扰素 β (IFN- β)是由 IFNB1 基因编码的蛋白。天然或重组 IFN- β 蛋白具有抗病毒、抗菌、抗癌活性。为探索 HPK1 与 IFN- β 信号通路的内在联系，在 HEK293 细胞中过表达 HPK1 和 IFN- β Luciferase Reporter 质粒，转染 24 小时后用仙台病毒(SeV)刺激细胞，12 小时后收

集细胞进行 IFN- β Luciferase 活性检查。结果表明，过表达 HPK1(1-274)激酶结构域可以显著抑制 SeV 诱导的 IFN- β 转录(图 1)。更进一步，表达不同量的 HPK1 质粒，可以呈剂量依赖地抑制 SeV 诱导的 IFN- β 转录(图 2)。

ISRE(IFN-stimulated response elements)可被磷酸化的 IRF3 结合，从而介导 IFN- β 转录，是抗病毒通路的另外一个重要指标。在 HEK293 细胞中过表达不同剂量 HPK1 和 ISRE Luciferase Reporter 质粒，转染 24 小时后用仙台病毒(SeV)刺激细胞，12 小时后收集细胞进行 ISRE Luciferase 活性检查。结果表明，HPK1 可以呈剂量依赖地抑制 SeV 诱导的 ISRE 转录(图 3)。

10 实施例 3. 本发明化合物的体外酶活的检测

本发明人使用 ADP-Glo™ 方法检测了本发明化合物(C1-C6)对于 HPK1 激酶的抑制活性。



ADP-Glo™ 激酶检测是一种发光 ADP 检测方法，它提供了一种通用、均质、高通量的筛选方法，通过量化激酶反应过程中产生的 ADP 量来测量激酶活性。检测分两步进行；首先，在激酶反应后，加入等体积的 ADP-Glo™ 试剂以终止激酶反应并消耗剩余的 ATP。其次，加入激酶检测试剂以同时将 ADP 转化为 ATP，并允许使用荧光素酶/荧光素反应测量新合成的 ATP。使用光度计测量产生的光。通过使用 ATP 到 ADP 的转换曲线，可以将发光与 ADP 浓度相关联。本研究评估的 6 个小分子抑制剂均对体外重组 HPK1 激酶呈现较好的抑制活性，IC₅₀ 都在 0.1 μ M 以下(表 1)。与此同时，在同源关系较为接近的激酶如

GCK/TNIK/PDK1 上表现出较好的选择性。这些特性保证了化合物能够在细胞或动物实验中特异性地抑制 HPK1 酶活。

表 1. 小分子抑制剂对体外重组蛋白的抑制活性^a。

化合物	HPK1	GCK	TNIK	PDK1
C1	A	B	C	C
C2	A	B	C	C
C3	B	B	B	D
C4	B	B	B	D
C5	A	A	B	D
C6	A	B	B	D
^a 活性分级: A, IC ₅₀ ≤0.01 μM; B, 0.01 μM < IC ₅₀ ≤0.1 μM; C, 0.1μM<IC ₅₀ ≤1 μM; D, IC ₅₀ > 1 μM				

5 实施例 4. 本发明的化合物恢复 HPK1 抑制的 IFN-β 表达

鉴于研究发现 HPK1 抑制抗病毒 IFN-β 信号通路，因此本发明人探索了 HPK1 小分子抑制剂是否可以恢复 HPK1 抑制的 IFN-β 表达。和上述实验过程一样，在 HEK293 细胞中过表达 HPK1 和 IFN-β Luciferase Reporter 质粒，转染 18 小时后加入 0.5μM 的化合物，24 小时后用 SeV 刺激细胞，12 小时后收集细胞进行 IFN-β Luciferase 活性检查。结果表明化合物 C2\C3\C4 具有较好的活性，其次是化合物 C1 和 C6(图 4)。更进一步，化合物 C2 呈现剂量依赖地恢复 HPK1 抑制的 IFN-β 表达(图 5)。

10

实施例 5. 本发明的化合物的口服最大耐受剂量

本发明人测试了代表化合物在小鼠的口服最大耐受剂量。测试结果表明，单次给药化合物 C1 的口服最大耐受剂量为 337.5 mg/kg(表 2)，化合物 C3 的口服最大耐受剂量为 225 mg/kg(表 3)。

15

表 2. 小分子化合物 C1 小鼠口服急毒测试结果。

剂量(mg/kg, P.O.)	死亡情况	
	雄性小鼠	雌性小鼠
225	0/5	0/5
337.5	0/5	0/5
506.3	2/5	1/5
759.4	4/5	4/5
1139.1	5/5	5/5

表 3. 小分子化合物 C3 小鼠口服急毒测试结果。

剂量(mg/kg, P.O.)	死亡情况	
	雄性小鼠	雌性小鼠
225	0/5	0/5
337.5	1/5	2/5
506.3	3/5	2/5
759.4	3/5	5/5
1139.1	5/5	5/5

实施例 6. 本发明的化合物有效治疗小鼠 MHV 模型

为了评价 HPK1 小分子抑制剂在动物模型上的抗病毒疗效，本发明人使用了小鼠肝炎病毒(Mouse Hepatitis Virus, MHV)感染的 C57 小鼠模型。MHV 是小鼠冠状病毒，容易感染肝脏和神经系统。8 周龄的雌性 C57 小鼠，每组 3 只，采用肝原位注射 4×10^4 pfu 病毒。接种病毒后，对小鼠进行口服给药治疗(10 mg/kg, BID)。病毒感染 3 天后，采用 qPCR 检测肝脏组织中的病毒含量。其中化合物 C1 表现出较为显著的抗病毒疗效，可有效降低小鼠肝脏中的病毒滴度(图 6)。在相同病毒感染 C57 小鼠模型上，一天两次口服不同剂量 C1(5 mg/kg, 20 mg/kg)，对于小鼠肝脏中的病毒滴度(图 7)以及血清中的谷丙转氨酶(图 8)具有呈剂量依赖的抑制效果。

实施例 7. 本发明的化合物有效治疗猫传腹

猫传染性腹膜炎 (Feline Infectious Peritonitis, FIP)，简称猫传腹，是一种发生于猫的致命异常免疫反应，由猫携带的猫冠状病毒发生变异而引起。FIP 目前仍为绝症，发病后死亡时间不定，但极少活过一年时间。虽然该病名称为“腹膜炎”，但 FIP 实际上是一种多系统炎症，并非所有的患猫都一定会表现出腹膜炎的症状。患猫的症状表现通常分为两类：分别为湿性 (wet) FIP 和干性 (dry) FIP，其中湿性 FIP 占全部病例的 70%左右，表现为腹腔胸腔出现积液，异常鼓胀；干性 FIP 患猫症状不一，取决于病毒侵害的器官种类。截至 2011 年，FIP 已位列发达国家宠物猫致死性传染病的第一名。

之前的研究(Ishida et al., Journal of Feline Medicine and Surgery, 2004)发现，重组猫干扰素(recombinant feline interferon, rFeIFN)对于猫传腹有治疗效果。结合我们研究发现，HPK1 抑制剂可以激活 IFN- β 信号通路。因此我们假设：HPK1 抑制剂或许对于猫传腹具有治疗效果。为了验证该假设，我们进行了动物临床试验。三只纳入实验的动物均患有猫传腹，年龄位于 5-12 个月之间，其中 1 只为雌性，2 只雄性(表 4)。

表 4.HPK1 抑制剂抗病毒治疗猫传腹实验入组动物。

实验动物编号	性别	年龄	猫传腹类型(干性或湿性?)
1	雌性	6 个月	湿性
2	雄性	5 个月	湿性
3	雄性	12 个月	湿性

经过化合物 C1 溶液注射给药（一天两次，剂量 1.5 mg/kg）治疗 20 天后，实验动物生理指标全面好转（表 5）：(1)食欲增加从而导致体重增加;(2)精神状态好转，从萎靡到活泼好动；(3)腹水消失;(4)白球比增加；(5) 猫血清淀粉样蛋白 A 显著下降。

表 5. 小分子化合物 C1 治疗猫传腹动物前后生理指标变化。

生理指标	动物编号	治疗前	治疗后
体重(kg)	1	1.5	2.15
	2	2.31	2.81
	3	2.9	3.2
白球比	1	0.5	0.7

	2	0.35	0.47
	3	0.4	0.5
	1	NA*	NA
猫血清淀粉样蛋白 A(fSAA,mg/L)	2	70.47	15.14
	3	104.88	17.97
	1	腹水明显	腹水消失
胸腹水情况	2	胸水明显，少量腹水	腹水消失
	3	胸水明显，呼吸困难	胸水变少，呼吸改善
*NA, not available			

由此我们获得结论：HPK1 小分子抑制剂可以有效治疗冠状病毒引发的猫传腹。

结论

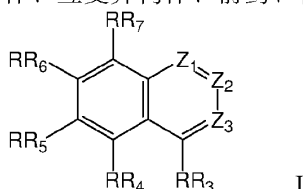
本发明人发现，HPK1 可以显著抑制 IFN-β 信号通路。而依据之前研究发现，HPK1 亦可显著抑制 IFN-γ 信号通路。使用 HPK1 抑制剂可以从 IFN-β 介导的抗病毒作用和 IFN-γ 介导的 T 细胞活化两个维度进行抗感染治疗。因此，HPK1 抑制剂对于所有 IFN-β/IFN-γ 有作用效果的病毒导致的人类或动物疾病具有治疗效果，包括但不限于：乙肝病毒 (Hepatitis B virus)、麻疹病毒 (Measles Virus)、辛德毕斯病毒 (Sindbis Virus)、西尼罗河病毒 (West Nile Virus)、登革病毒 (Dengue Virus)、疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus)、人巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus HCMV)、埃博拉病毒(Ebola Virus)、丙肝病毒 (HCV)、流感病毒 (Influenza A Virus)、严重急性呼吸综合征病毒 (SARS-CoV)、寨卡病毒 (Zika Virus)、艾滋病毒 (HIV)、猫传腹病毒(Feline Infectious Peritonitis Virus)、小鼠肝炎病毒 (Mouse Hepatitis Virus)、犬冠状病毒(Canine Coronavirus)、猫杯状病毒(Feline Calicivirus)、猫白血病病毒(Feline Leukemia Virus)、猫艾滋病毒 (Feline Immunodeficiency Virus)、猫泛白血球减少症病毒 (Feline Panleukopenia Virus)、鸡传染性支气管炎病毒(Avian Infectious Bronchitis Virus)、猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible Gastroenteritis Virus)、猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus)、猪血凝性脑脊髓炎病毒 (Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus)、牛冠状病毒(Bovine Coronavirus)等。HPK1 抑制剂有望作为一种新型的广谱抗病毒疗法，用于上述病毒引发疾病的治疗。

20

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. HPK1 抑制剂在制备治疗或预防干扰素相关疾病，或提高免疫力的药物中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述干扰素相关疾病是病毒感染。
- 5 3. 如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，HPK1 抑制剂是式 I 所示化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、互变异构体、前药、代谢物或衍生物，



式中，Z₁ 选自 N 或 C-RR₁；

Z₂ 和 Z₃ 分别选自 N 或 C-RR₂，其中 Z₂ 和 Z₃ 不相同；

- 10 RR₁ 选自氢、卤素、氰基、羟基、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷基、取代或未取代的 C₃₋₆ 环烷基、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷氧基、取代或未取代的氨基或取代或未取代的酰氨基；

RR₂ 选自取代或未取代的羟基、取代或未取代的氨基、或取代或未取代的巯基；

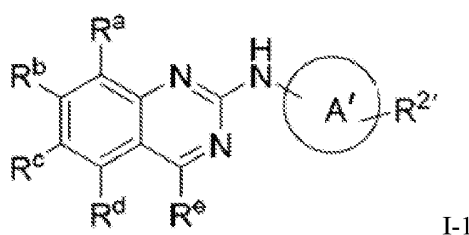
RR₃ 选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷基、取代或未取代的 C₃₋₈ 环烷基、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷氧基、取代或未经取代的氨基或取代或未取代的酰氨基；

- 15 RR₄、RR₅、RR₆、RR₇ 分别独立选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷基、取代或未取代的 C₃₋₈ 环烷基、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷氧基、取代或未经取代的氨基、取代或未取代的酰氨基、取代或未取代的 C₅₋₁₀ 杂芳基或 RR₈-Z₄；

RR₈ 选自取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环基或取代或未取代的羟基；

- 20 Z₄ 选自 -O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、羰基、羰基氨基或氨基羰基。

4. 如权利要求 3 所述的应用，其特征在于，式 I 所示化合物是下式 I-1 所示的化合物：



式中，R^a、R^b、R^c、R^d 之一为 R^{1'}-X'，其余各自独立地选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷基、取代或未取代的 C₃₋₈ 环烷基或取代或未取代的 C₁₋₆ 烷氧基；

- 25 R^e 选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C₁₋₆ 烷基、取代或未取代的 C₃₋₈ 环烷基、或取代或未取代的 C₁₋₆ 烷氧基；

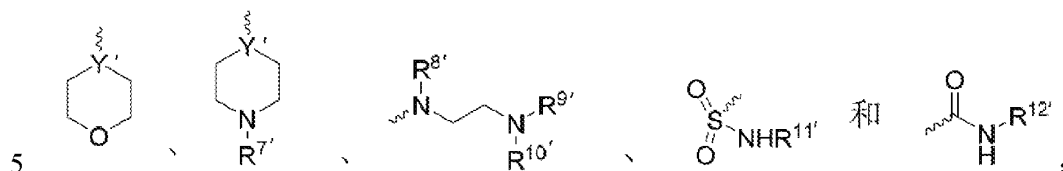
X' 选自 -O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、羰基、羰基氨基或氨基羰基；

R^{1'} 为取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环基或者 R^{14'}·O-(CH₂)_m，其中 m 为

0、1、2、3、4 或 5, $R^{14'}$ 为取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基;

A' 环为取代或未取代的芳基(优选取代或未取代的苯基)或取代或未取代的 5-6 元杂芳基, 其中, 所述杂芳基具有 1-4 个选自 O、S 或 N 的杂原子;

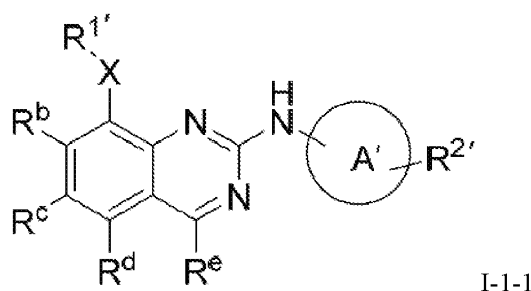
$R^{2'}$ 选自以下取代基:



其中 Y' 为 C 或者 N, $R^{7'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{8'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{9'}$ 和 $R^{10'}$ 独立地为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{11'}$ 为 H、取代或未取代的氨基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{12'}$ 为取代或未取代的 4-6 元杂环基。

10

5. 如权利要求 4 所述的应用, 其特征在于, 式 I-1 所示化合物如式 I-1-1 所示,



式中, R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 各自独立地选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基;

15

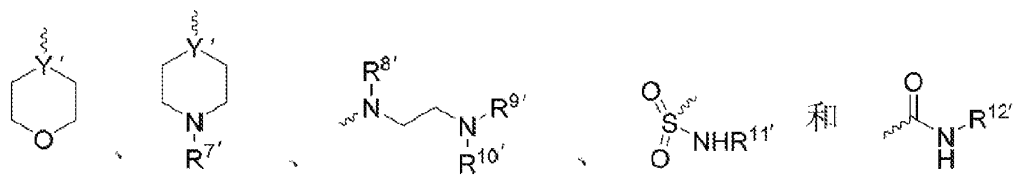
X' 选自 -O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、羰基、羰基氨基或氨基羰基;

$R^{1'}$ 为取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环基或者 $R^{14'}-O-(CH_2)_m-$, 其中 m 为 0、1、2、3、4 或 5, $R^{14'}$ 为取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基;

A' 环为取代或未取代的芳基(优选取代或未取代的苯基)或取代或未取代的 5-6 元杂芳基, 其中, 所述杂芳基具有 1-4 个选自 O、S 或 N 的杂原子;

20

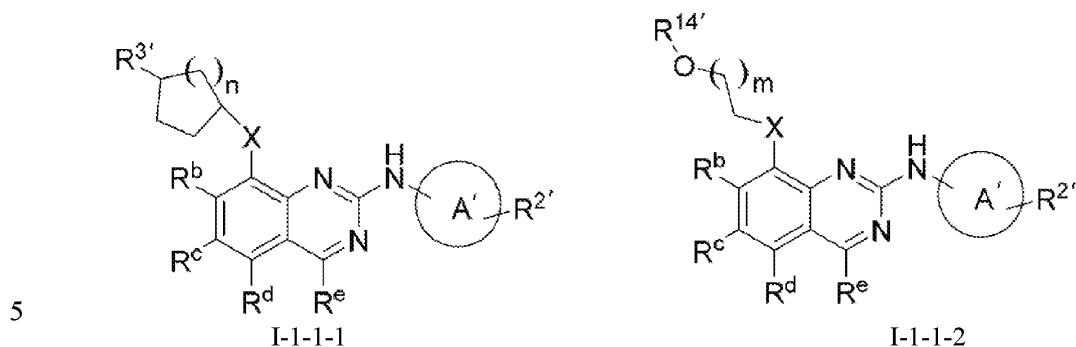
$R^{2'}$ 选自以下取代基:



其中 Y' 为 C 或者 N, $R^{7'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{8'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{9'}$ 和 $R^{10'}$ 独立地为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{11'}$ 为 H、取代或未取代的氨基

基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{12'}$ 为取代或未取代的 4-6 元杂环基。

6. 如权利要求 5 所述的应用, 其特征在于, 式 I-1 所示化合物如式 I-1-1-1 或 I-1-1-2 所示,



式中, R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 各自独立地选自 H、羟基、卤素、氰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基或取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基;

X 选自 -O-、-NH-、-S-、-SO-、-SO₂-、羰基、羰基氨基或氨基羰基;

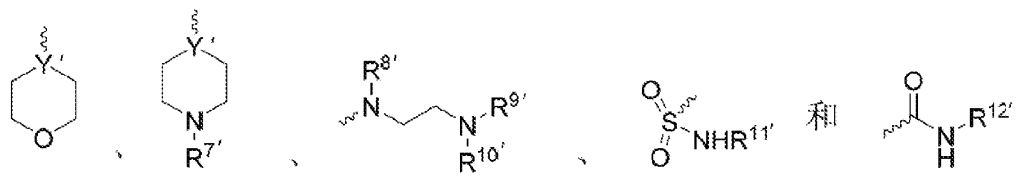
10 n 为 1、2、3 或 4,

m 为 0、1、2、3、4 或 5,

$R^{14'}$ 为取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基;

A' 环为取代或未取代的芳基(优选取代或未取代的苯基)或取代或未取代的 5-6 元杂芳基, 其中, 所述杂芳基具有 1-4 个选自 O、S 或 N 的杂原子;

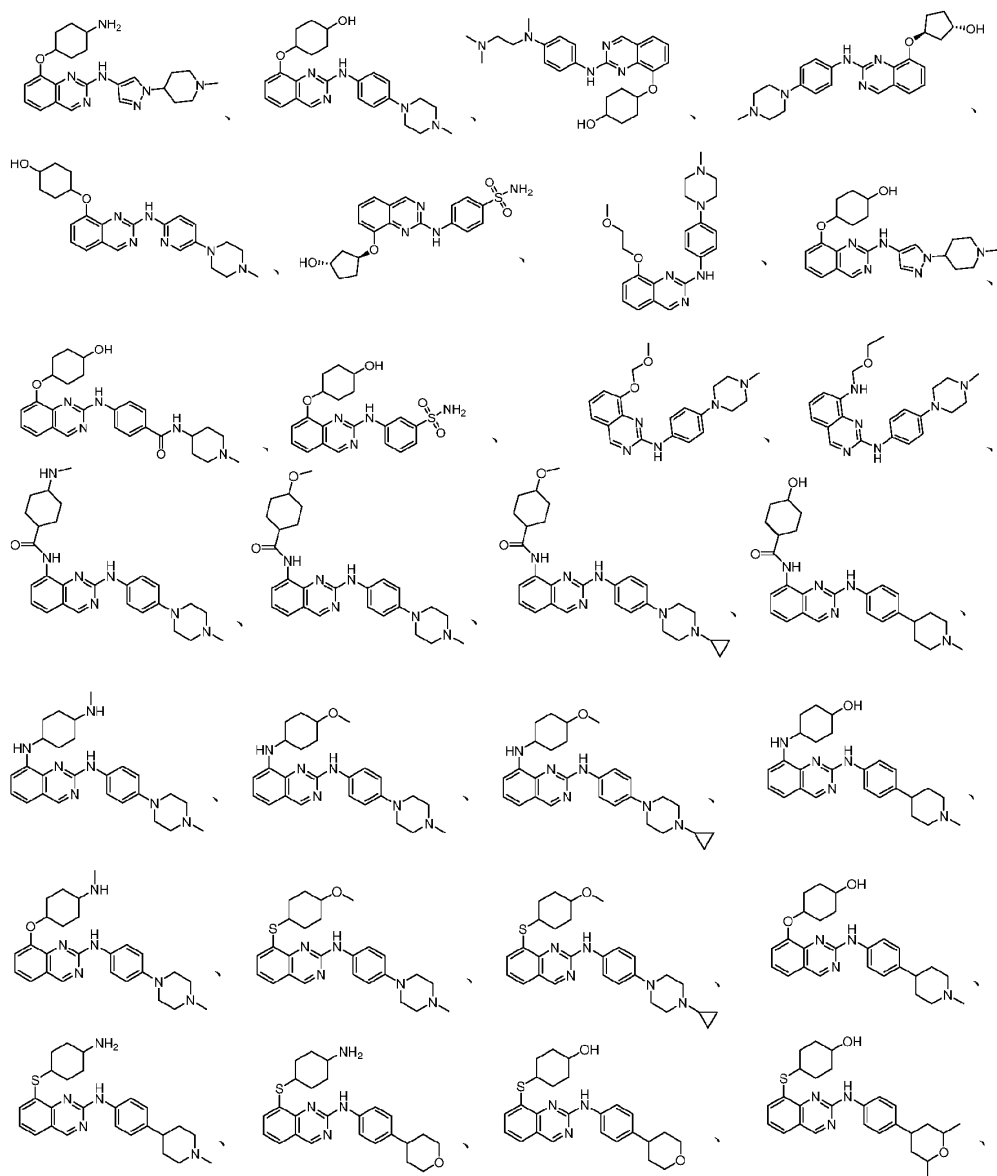
15 $R^{2'}$ 选自以下取代基:

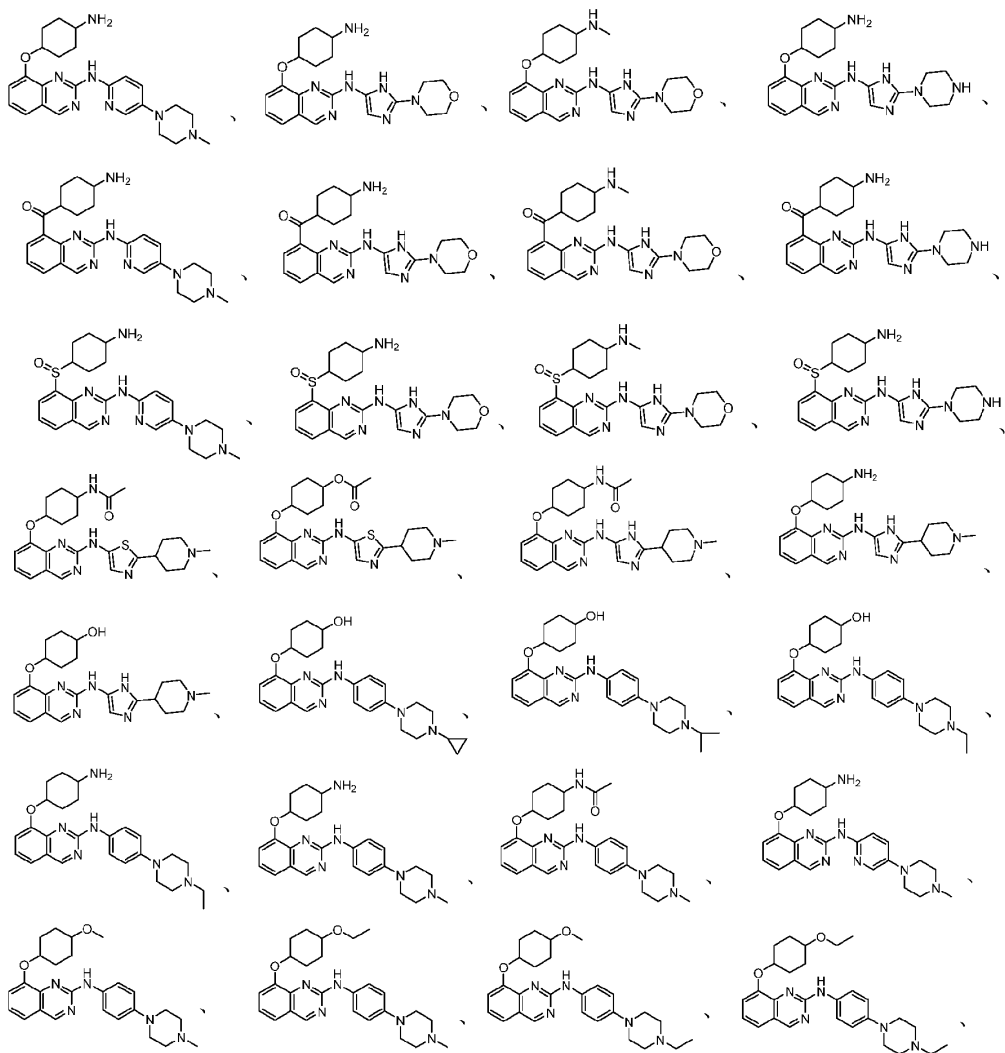


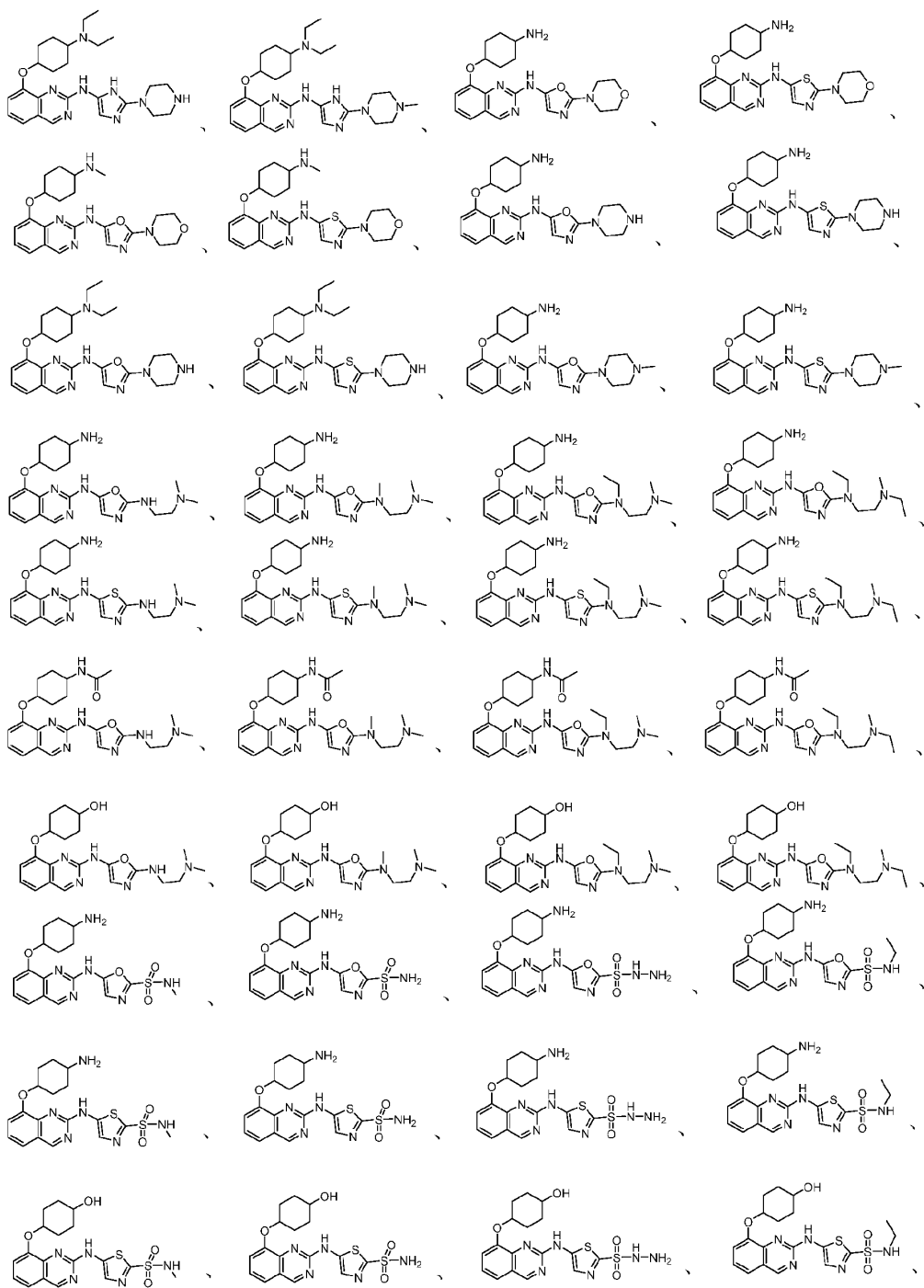
其中 Y' 为 C 或者 N, $R^{7'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{8'}$ 为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{9'}$ 和 $R^{10'}$ 独立地为 H、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{11'}$ 为 H、取代或未取代的氨基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基或取代或未取代的 C_{3-8} 环烷基, $R^{12'}$ 为取代或未取代的 4-6 元杂环基。

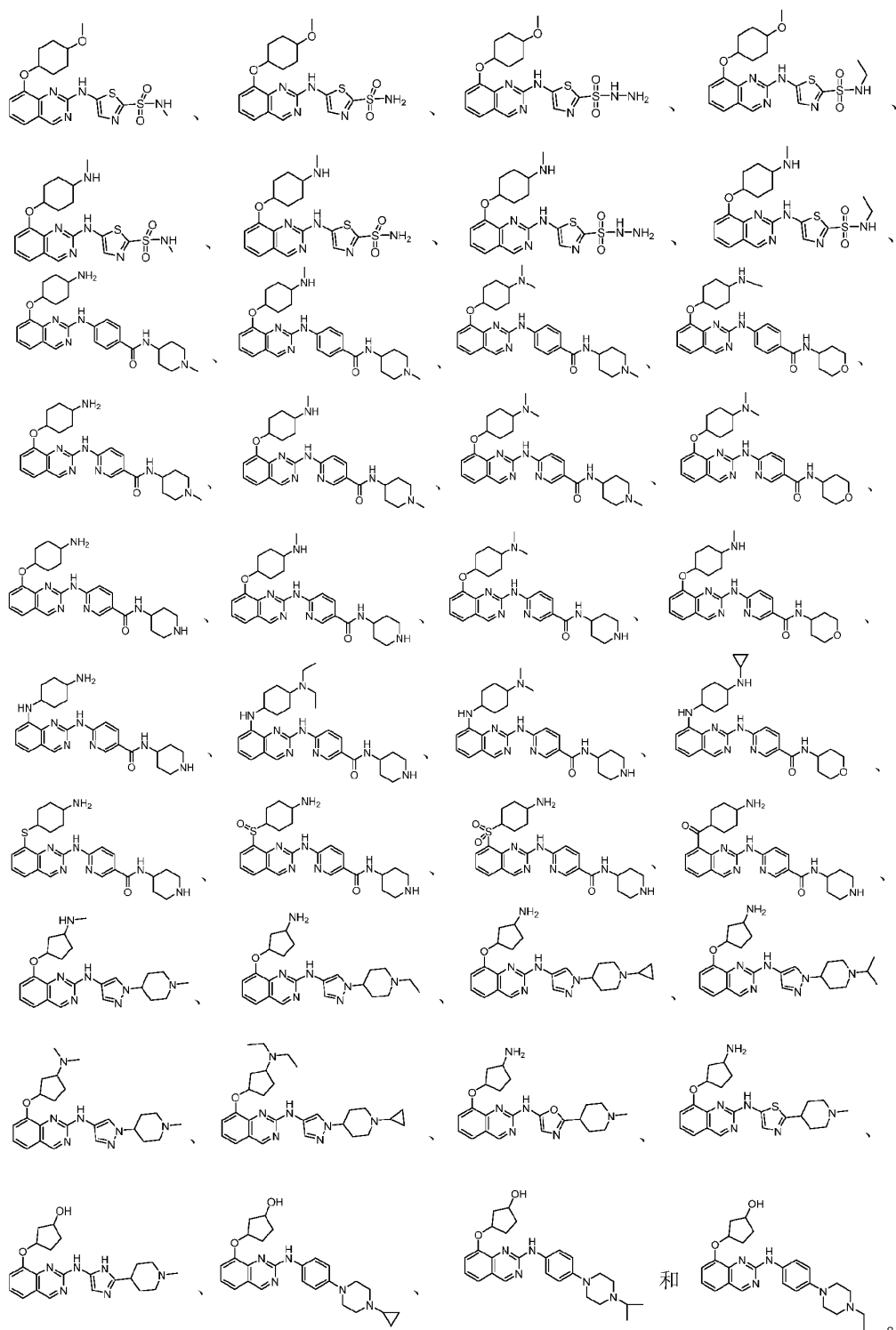
20

7. 如权利要求 3-6 中任一项所述的应用, 其特征在于, 所述化合物选自下组:

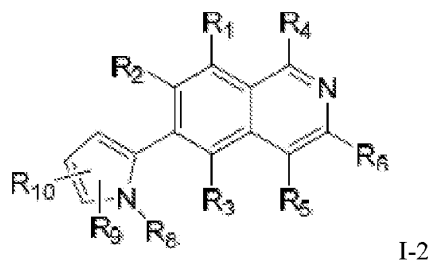








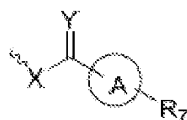
8. 如权利要求 3 所述的应用, 其特征在于, 式 I 所示化合物是下式 I-2 所示的化合物:



式中，

- R₁、R₂、R₃、R₄和R₅各自独立地选自：氢、卤素、氰基、羟基、取代或未取代的C₁₋₆烷基、取代或未取代的C₃₋₆环烷基、取代或未取代的C₁₋₆烷氧基、取代或未取代的氨基或取代或未取代的酰氨基，且R₁和R₂不为氢；

R₆为：

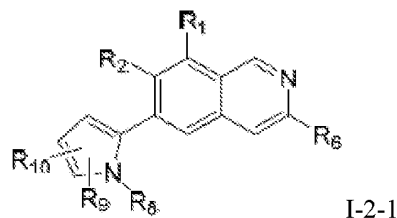


- X为O或者NH或者S，Y为O或者NH或者S，A环为取代或未取代的C₃₋₆环烷基或者取代或未取代的C₆₋₁₀芳基或者取代或未取代的C₅₋₁₀杂芳基，所述杂芳基是指含有一个或者多个N、O或者S杂原子的芳基，R₇为各类环上的单或者多取代，包括卤素、氰基、羟基、氨基、酰胺基、支链的或直链的C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆杂环基、C₆₋₁₀芳基、C₅₋₁₀杂芳基或-C(O)R'，所述R'为C₃₋₆杂环基、C₆₋₁₀芳基或者C₅₋₁₀杂芳基，所述C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基、C₂₋₆炔基、C₃₋₆杂环基、C₆₋₁₀芳基和C₅₋₁₀杂芳基还包含各类单或者多取代，包括氢、羟基、卤素、氰基、氨基、-CHF₂、-CF₃、-CH₃、-CH₂CH₂OH或-CONH₂；或者，
- R₇与A环一起形成取代或未取代的稠环基、桥环基、杂桥环基、螺环基或杂螺环基；

R₈、R₉和R₁₀各自独立地选自：

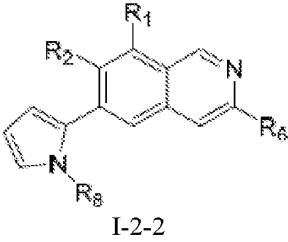
- i. 氢、羟基、卤素、氰基、氨基、二(C₁₋₆烷基)氨基、单(C₁₋₆烷基)氨基或C₁₋₆烷氧基；
- ii. 支链的或直链的C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯基或C₂₋₆炔基，所述烷基、烯基和炔基还包含各类单或者多取代，包括氢、羟基、卤素、氰基、氨基、-CHF₂、-CF₃、二(C₁₋₆烷基)氨基、单(C₁₋₆烷基)氨基、C₃₋₆环烷基或C₁₋₆烷氧基；
- iii. C₃₋₆环烷基、C₃₋₆杂环基、C₆₋₁₀芳基或C₅₋₁₀杂芳基，所述环烷基、杂环基、芳基或杂芳基包含各类单或者多取代，包括氢、C₁₋₆烷基、羟基、卤素、氰基、氨基、-CHF₂或-CF₃。

9. 如权利要求8所述的应用，其特征在于，式I-2所示化合物如式I-2-1所示：



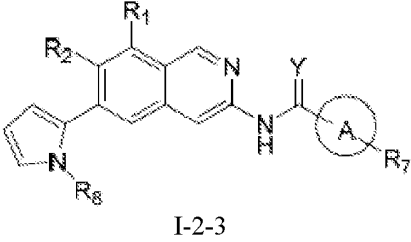
- 式中，R₁、R₂、R₆、R₈、R₉和R₁₀各自如权利要求6定义。

10. 如权利要求 8 所述的应用，其特征在于，式 I-2 所示化合物如式 I-2-2 所示：



式中，R₁、R₂、R₆ 和 R₈ 各自如权利要求 8 定义。

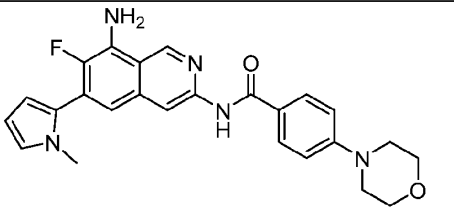
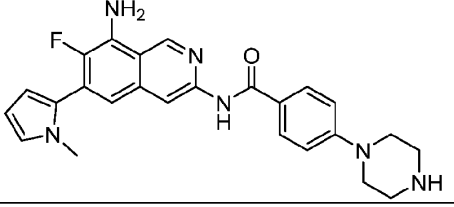
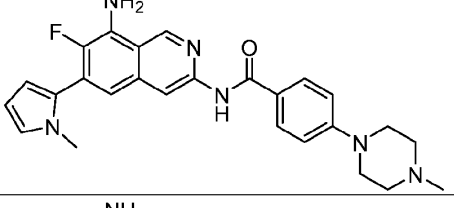
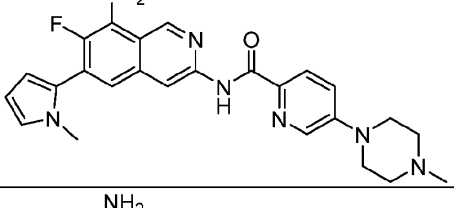
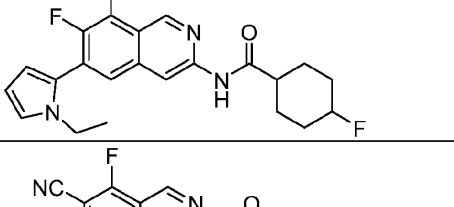
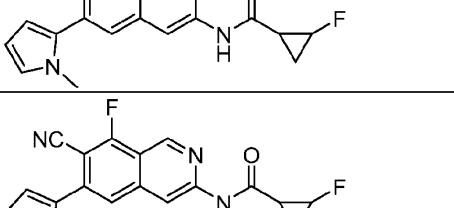
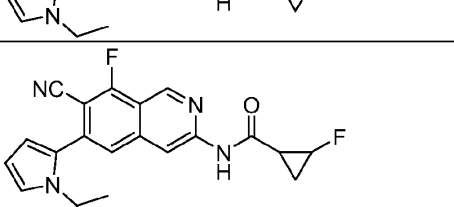
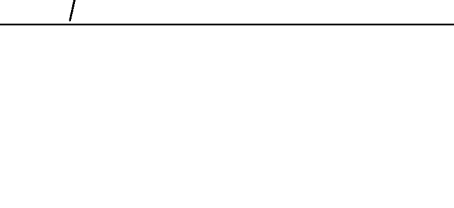
5 11. 如权利要求 8 所述的应用，其特征在于，式 I-2 所示化合物如式 I-2-3 所示：

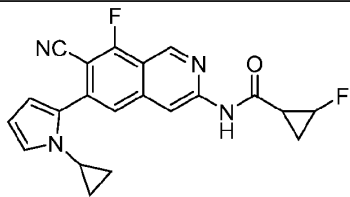
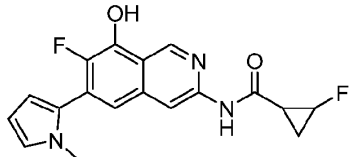
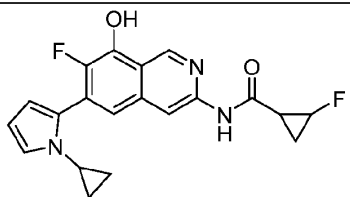
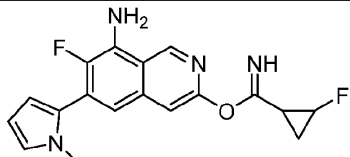
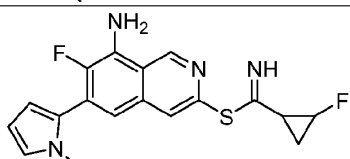
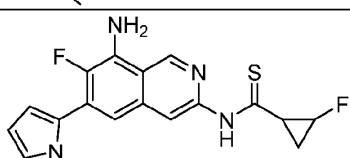
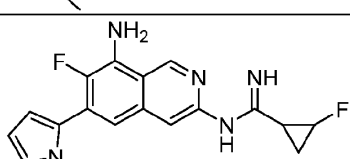
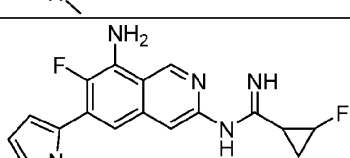


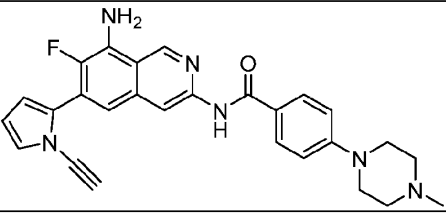
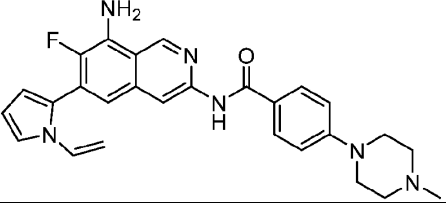
式中，R₁、R₂、R₈ 和 A 环各自如权利要求 8 定义。

12. 根据权利要求 8-11 中任一项所述的应用，所述化合物选自：

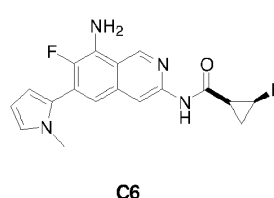
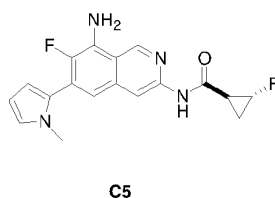
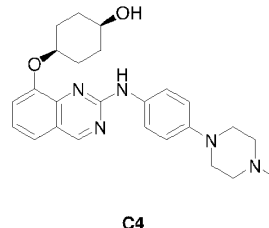
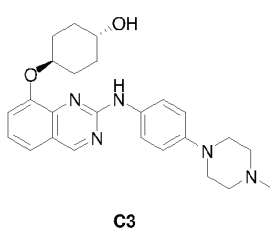
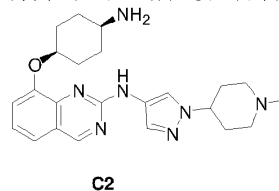
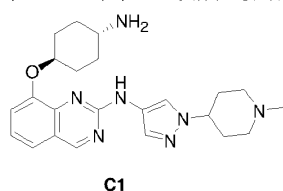
编号	化合物结构	名称
1		N-（8-氨基-7-氟-6-（1-甲基-1H-吡咯-2-基）异喹啉-3-基）-2-氟环丙烷-1-羧酰胺
2		N-（8-氨基-6-（1-乙基-1H-吡咯-2-基）-7-氟异喹啉-3-基）-2-氟环丙烷-1-羧酰胺
3		N-（8-氨基-7-氟-6-（1-异丙基-1H-吡咯-2-基）异喹啉-3-基）-2-氟环丙烷-1-羧酰胺
4		N-（8-氨基-7-氟-6-（1-乙烯基-1H-吡咯-2-基）异喹啉-3-基）-2-氟环丙烷-1-羧酰胺

5		N- (8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -4-吗啉代苯甲酰胺
6		N- (8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -4- (哌嗪-1-基) 苯甲酰胺
7		N- (8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -4- (4-甲基哌嗪-1-基) 苯甲酰胺
8		N- (8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -5- (4-甲基哌嗪-1-基) 吡啶啉酰胺
9		N- (8-氨基-6- (1-乙基-1H-吡咯-2-基) -7-氟异喹啉-3-基) -4-氟环己烷-1-甲酰胺
10		N- (7-氰基-8-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺
11		N- (7-氰基-6- (1-乙基-1H-吡咯-2-基) -8-氟异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺
12		N- (7-氰基-8-氟-6- (1-异丙基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺

13		N- (7-氰基-6- (1-环丙基-1H-吡咯-2-基)-8-氟异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-羧酰胺
14		2-氟-N- (7-氟-8-羟基-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) 环丙烷-1-羧酰胺
15		N- (6- (1-环丙基-1H-吡咯-2-基) -7-氟-8-羟基异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰胺
16		8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基 2-氟环丙烷-1-氨基甲酸酯
17		8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基 2-氟环丙烷-1-碳酰亚胺硫代酸酯
18		N- (8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-碳硫酰胺
19		N- (8-氨基-7-氟-6- (1-甲基-1H-吡咯-2-基) 异喹啉-3-基) -2-氟环丙烷-1-羧酰亚胺
20		N- (8-氨基-6- (1-环丙基-1H-吡咯-2-基)-7-氟异喹啉-3-基)-2-氟环丙烷-1-羧酰亚胺

21		N-(8-氨基-6-(1-乙炔基-1H-吡咯-2-基)-7-氟异喹啉-3-基)-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯甲酰胺
22		N-(8-氨基-7-氟-6-(1-乙烯基-1H-吡咯-2-基)异喹啉-3-基)-4-(4-甲基哌嗪-1-基)苯甲酰胺。

13. 如权利要求 1-12 中任一项所述的应用, 其特征在于, 所述化合物是



14. 如权利要求 2-13 中任一项所述的应用, 其特征在于, 所述病毒选自乙肝病毒 (Hepatitis B virus)、麻疹病毒 (Measles Virus)、辛德毕斯病毒 (Sindbis Virus)、西尼罗河病毒 (West Nile Virus)、登革病毒 (Dengue Virus)、疱疹病毒 (Herpes Simplex Virus)、人巨细胞病毒 (Human Cytomegalovirus HCMV)、埃博拉病毒 (Ebola Virus)、丙肝病毒 (HCV)、流感病毒 (Influenza A Virus)、严重急性呼吸综合征病毒 (SARS-CoV)、寨卡病毒 (Zika Virus)、艾滋病毒 (HIV)、猫传腹病毒 (Feline Infectious Peritonitis Virus)、小鼠肝炎病毒 (Mouse Hepatitis Virus)、犬冠状病毒 (Canine Coronavirus)、猫杯状病毒 (Feline Calicivirus)、猫白血病毒 (Feline Leukemia Virus)、猫艾滋病毒 (Feline Immunodeficiency Virus)、猫泛白血球减少症病毒 (Feline Panleukopenia Virus)、鸡传染性支气管炎病毒 (Avian Infectious

Bronchitis Virus)、猪传染性胃肠炎病毒(Transmissible Gastroenteritis Virus)、猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus)、猪血凝性脑脊髓炎病毒(Porcine Hemagglutinating Encephalomyelitis Virus)、牛冠状病毒(Bovine Coronavirus)等;优选猫传腹病毒(Feline Infectious Peritonitis Virus)、小鼠肝炎病毒(Mouse Hepatitis Virus)、疱疹病毒、严重急性呼吸综合征病毒、寨卡病毒、犬冠状病毒、猫杯状病毒、鸡传染性支气管炎病毒、猪流行性腹泻病毒。

15. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求 1-13 中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物、立体异构体、互变异构体、前药、代谢物或衍生物和一种或多种其它抗病毒药物,以及任选的药学上可接受的赋形剂。