



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111565726 A

(43)申请公布日 2020.08.21

(21)申请号 201880081664.1

(72)发明人 T·徐 许枞 刘丹阳 范洁清

(22)申请日 2018.10.25

潘延芳 T·R·李 X·陈

(66)本国优先权数据

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

PCT/CN2017/107962 2017.10.27 CN

代理人 封新琴

PCT/CN2018/083153 2018.04.16 CN

PCT/CN2018/100871 2018.08.16 CN

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/708(2006.01)

2020.06.17

A61K 31/7076(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 31/7072(2006.01)

PCT/CN2018/111885 2018.10.25

A61K 31/7068(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/080898 EN 2019.05.02

A61P 37/04(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

(71)申请人 上海药苑生物科技有限公司

地址 200437 上海市虹口区邯郸路43号7层  
701

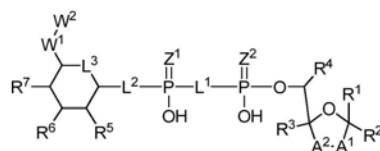
权利要求书14页 说明书116页 附图25页

(54)发明名称

通过激活 α 蛋白激酶1调节免疫应答的组合物和方法

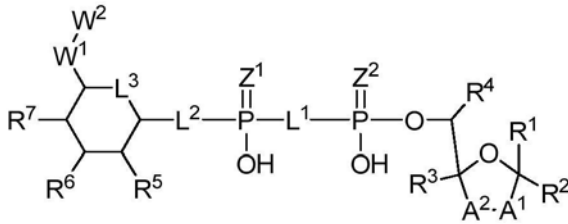
(57)摘要

本公开文本提供了组合物和方法,所述组合物和方法涉及激活 α-激酶1(ALPK1)以调节免疫应答以及治疗或预防癌症、感染、炎症及相关疾病和障碍以及增强对靶抗原的免疫应答。本公开文本还提供了作为 α 蛋白激酶1(ALPK1)激动剂的式(I)的杂环化合物及其激活ALPK1、调节免疫应答以及治疗诸如癌症的疾病的用途,其中A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、W<sup>1</sup>、W<sup>2</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>是本文中定义的。



(I)

1. 一种由式 (I) 表示的化合物:



(I)

和/或其立体异构体、互变异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐,其中:

A<sup>1</sup>和A<sup>2</sup>独立地选自O、S和-C(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)-,其中R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>独立地选自H、D、-OH、N<sub>3</sub>、-CN、卤素、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烯氧基和经取代或未经取代的芳烷氧基,其中任选的取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基;A<sup>1</sup>或A<sup>2</sup>中的至少一个是-C(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>);其中A<sup>1</sup>中的R<sup>8</sup>或R<sup>9</sup>可以与A<sup>2</sup>中的R<sup>8</sup>或R<sup>9</sup>环化以形成C3-C6环烷基和含有3至9个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基,各自任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基取代;

L<sup>1</sup>和L<sup>2</sup>独立地选自O、CH<sub>2</sub>、CHF和CF<sub>2</sub>;

L<sup>3</sup>是O、S或CH<sub>2</sub>;

Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>独立地选自O和S;

W<sup>1</sup>是-C(R<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-,其中R<sup>10</sup>和R<sup>11</sup>独立地选自H、D、-OH、卤素、和选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4-卤代烷氧基、C1-C4烯氧基、芳烷氧基和R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-的任选经取代的基团,其中R<sup>12</sup>选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烯氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基;其中R<sup>10</sup>和R<sup>11</sup>的任选取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基;

W<sup>2</sup>是H或任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C3烷氧基、C1-C3卤代烷基、C1-C3卤代烷氧基、C1-C3烯氧基和R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-的取代基取代的C1-C3烷基,其中R<sup>12</sup>是C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基;

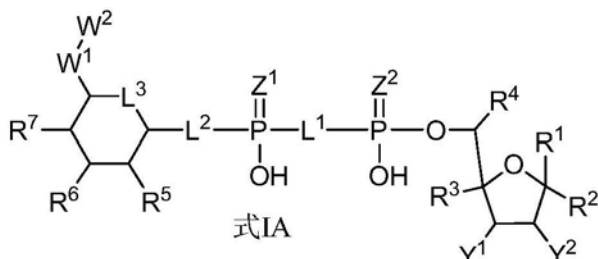
R<sup>1</sup>是C6-C10芳基或含有5至10个环原子并且具有1-4个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基,其中R<sup>1</sup>任选地被1-3个选自D、卤素、-OH、=O、CN、NH<sub>2</sub>、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷基胺、C1-C4二烷基胺和(R<sup>13</sup>R<sup>14</sup>)NCO-的取代基取代,其中R<sup>13</sup>和R<sup>14</sup>独立地选自H、C1-C4烷基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基;

R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>独立地选自H、D、卤素、C1-C4烷基和C1-C4卤代烷基;

R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>选自H、D、卤素和-OH、R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-,其中R<sup>12</sup>选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烯氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原

子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基；其中R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>的相邻基团中的任意两个可以环化以形成含有5至9个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基，各自任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基取代。

2. 根据权利要求1所述的化合物，其为式IA的化合物，和/或其立体异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐，



其中：

Y<sup>1</sup>和Y<sup>2</sup>独立地选自H、D、-OH、N<sub>3</sub>、-CN、卤素和选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烯氧基和芳烷氧基的任选经取代的基团；其中任选的取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基；

R<sup>1</sup>-R<sup>7</sup>、L<sup>1</sup>-L<sup>3</sup>、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、W<sup>1</sup>和W<sup>2</sup>是权利要求1中定义的。

3. 根据权利要求2所述的化合物，其中

Y<sup>1</sup>和Y<sup>2</sup>独立地选自H、D、-OH、卤素、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基和C1-C4烯氧基；

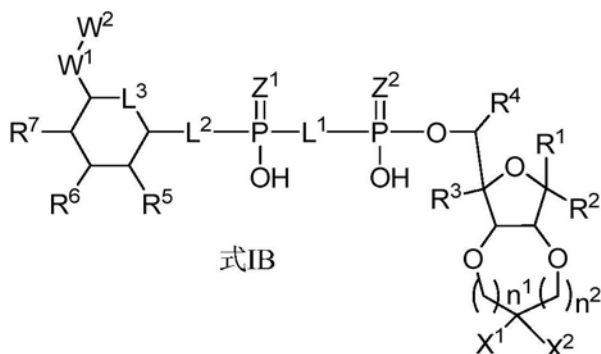
R<sup>1</sup>-R<sup>7</sup>、L<sup>1</sup>-L<sup>3</sup>、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、W<sup>1</sup>和W<sup>2</sup>是权利要求1中定义的。

4. 根据权利要求2所述的化合物，其中

Y<sup>1</sup>和Y<sup>2</sup>独立地选自-OH、卤素、C1-C4烷基和C1-C4烷酰氧基；

R<sup>1</sup>-R<sup>7</sup>、L<sup>1</sup>-L<sup>3</sup>、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、W<sup>1</sup>和W<sup>2</sup>是权利要求1中定义的。

5. 根据权利要求1所述的化合物，其为式IB的化合物，和/或其立体异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐，



其中：

n<sup>1</sup>和n<sup>2</sup>各自是独立地选自0-2的整数；

X<sup>1</sup>和X<sup>2</sup>独立地选自H、D、-OH、N<sub>3</sub>、-CN、卤素和选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烯氧基和芳烷氧基的任选经取代的基团；其中任选的取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基；

$R^1$ - $R^7$ 、 $L^1$ - $L^3$ 、 $Z^1$ 、 $Z^2$ 、 $W^1$ 和 $W^2$ 是权利要求1中定义的。

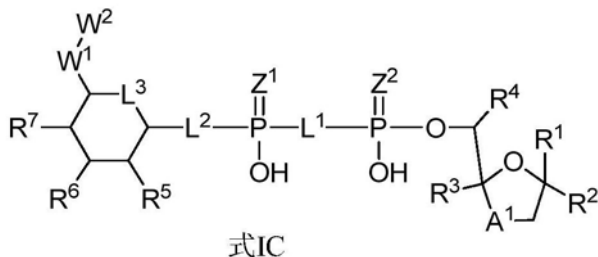
6. 根据权利要求5所述的化合物,其中 $n^1$ 和 $n^2$ 各自是0。

7. 根据权利要求5或权利要求6所述的化合物,其中

$X^1$ 和 $X^2$ 独立地选自H、D、和C1-C4烷基;

$R^1$ - $R^7$ 、 $L^1$ - $L^3$ 、 $Z^1$ 、 $Z^2$ 、 $W^1$ 和 $W^2$ 是权利要求1中定义的。

8. 根据权利要求1所述的化合物,其为式IC的化合物,和/或其立体异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐,



其中:

$A^1$ 是-C( $R^{10}R^{11}$ )-、O或S;

$R^1$ - $R^9$ 、 $L^1$ - $L^3$ 、 $Z^1$ 、 $Z^2$ 、 $W^1$ 和 $W^2$ 是式I中定义的。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的化合物,其中 $R^2$ 、 $R^3$ 、和 $R^4$ 各自是H。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的化合物,其中 $R^5$ 、 $R^6$ 、和 $R^7$ 各自独立地选自-OH、和C1-C4烷酰氧基。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的化合物,其中 $L^3$ 是O。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的化合物,其中 $L^2$ 是O。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的化合物,其中 $L^1$ 是O或S。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的化合物,其中 $W^1$ 是-C( $R^{10}R^{11}$ )-,其中 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 独立地选自H、D、-OH、卤素、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4-卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烯氧基和 $R^{12}CO_2$ -,其中 $R^{12}$ 选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷酰氧基和C1-C4烯氧基。

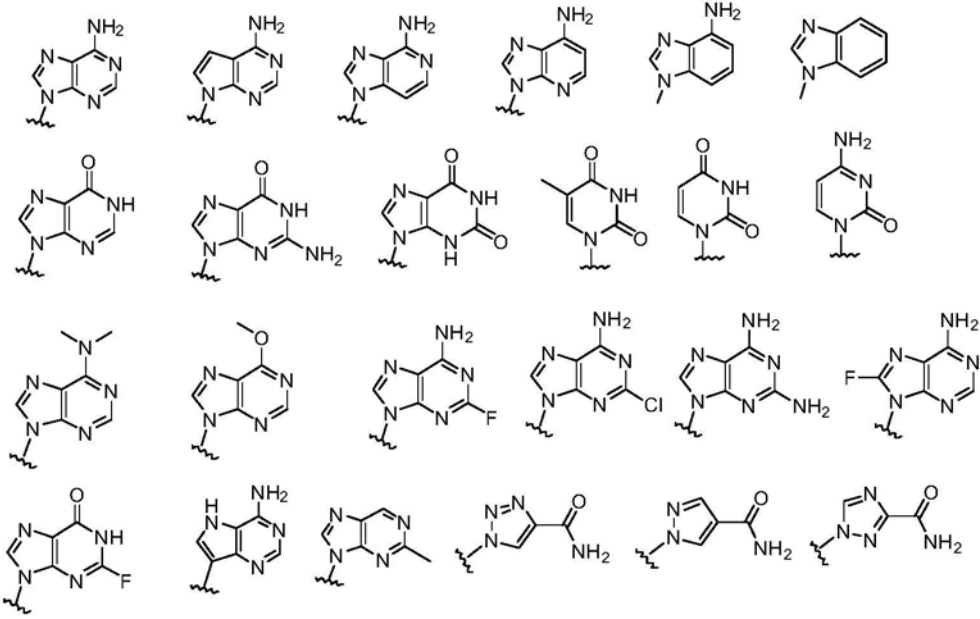
15. 根据权利要求1至13中任一项所述的化合物,其中 $W^1$ 是-C( $R^{10}R^{11}$ )-,其中 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 独立地选自H、D、-OH、卤素和C1-C4烷酰氧基。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中 $W^2$ 是任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O和C1-C3烷氧基、C1-C3卤代烷基、C1-C3卤代烷氧基、C1-C3烯氧基和 $R^{12}CO_2$ -的取代基取代的C1-C3烷基,其中 $R^{12}$ 是C1-C烷基、C1-C4烷氧基和C1-C4烷基氨基。

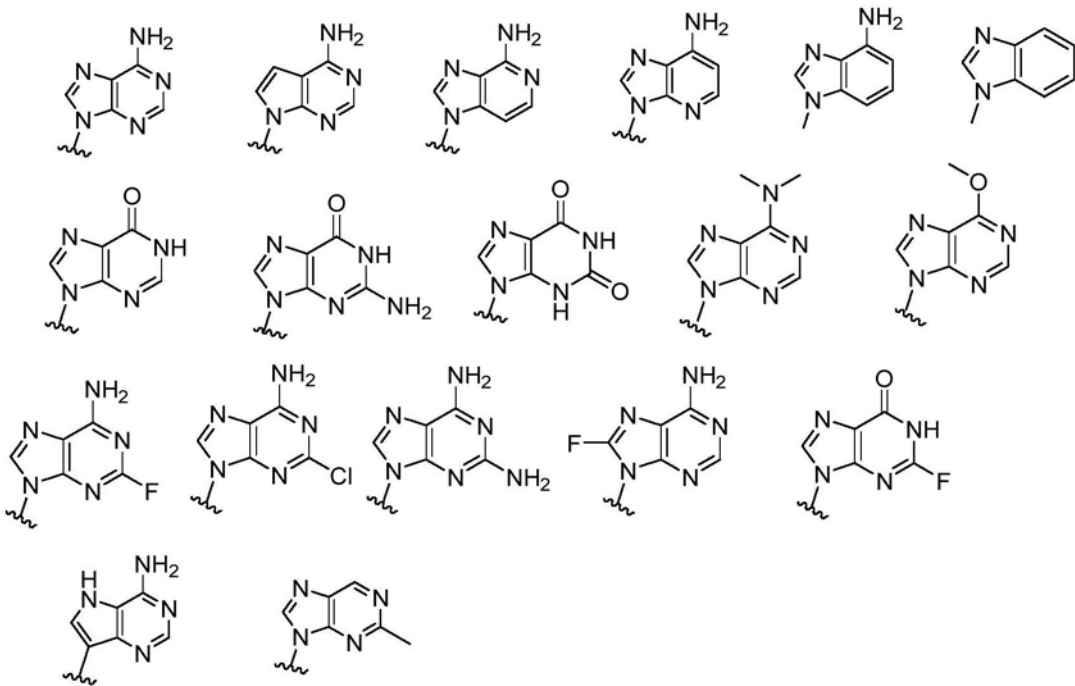
17. 根据权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中 $W^2$ 是任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH和 $R^{12}CO_2$ -的取代基取代的C1-C3烷基,其中 $R^{12}$ 是C1-C3烷基。

18. 根据权利要求1至15中任一项所述的化合物,其中 $W^2$ 是任选地被1个选自-OH和 $R^{12}CO_2$ -的取代基取代的C1烷基,其中 $R^{12}$ 是C1-C3烷基。

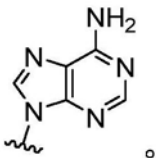
19. 根据权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中 $R^1$ 选自



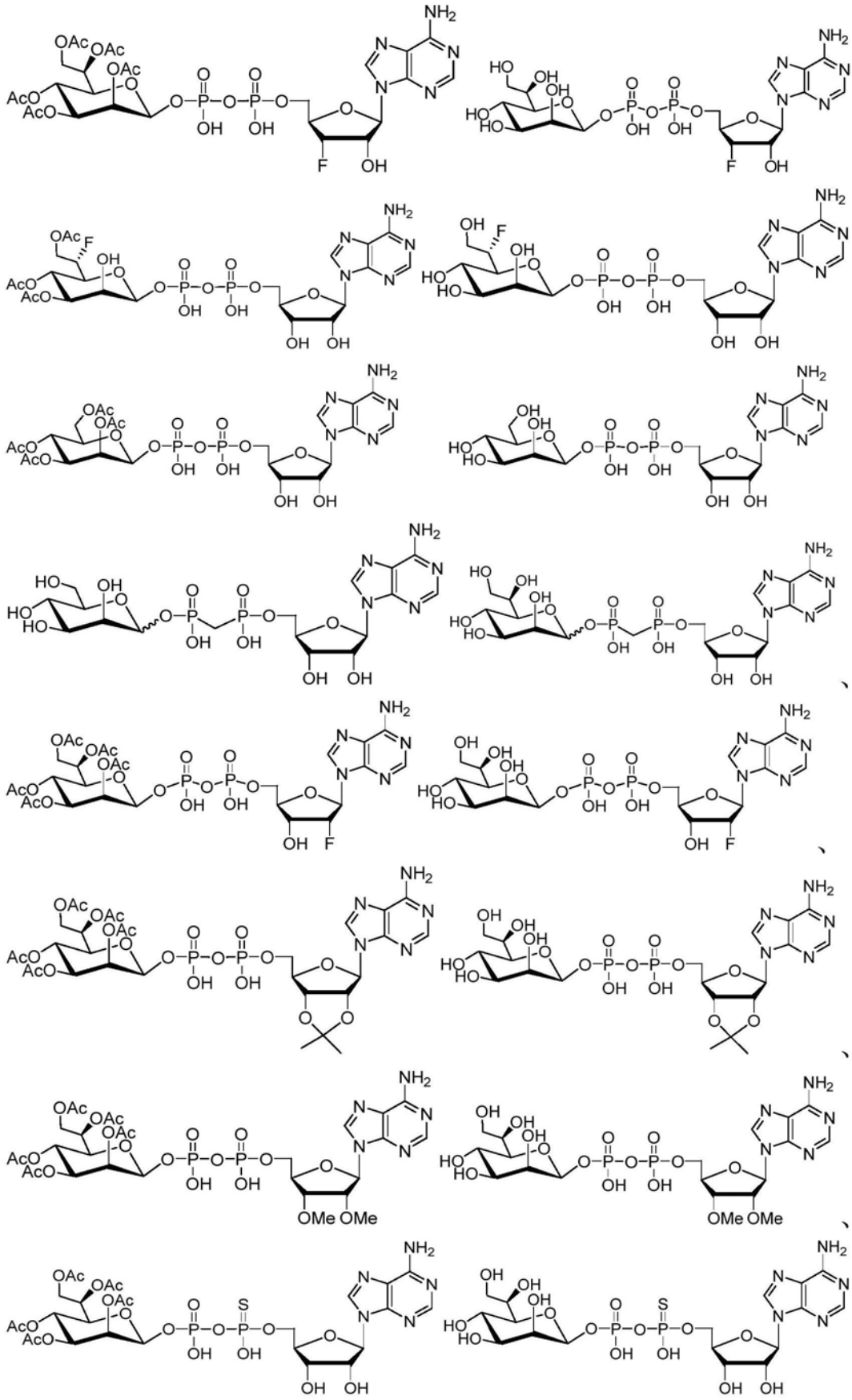
20. 根据权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中R<sup>1</sup>选自

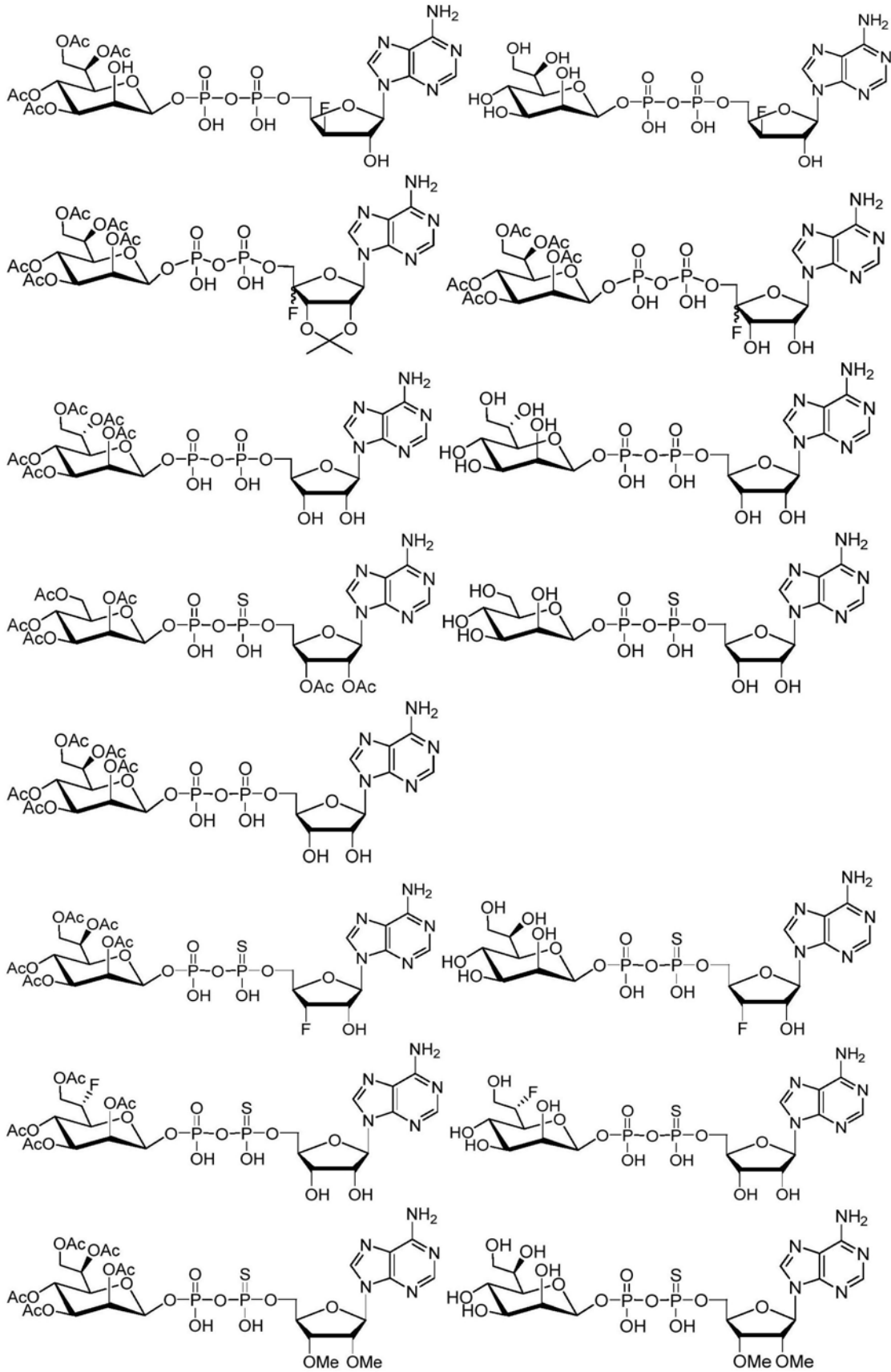


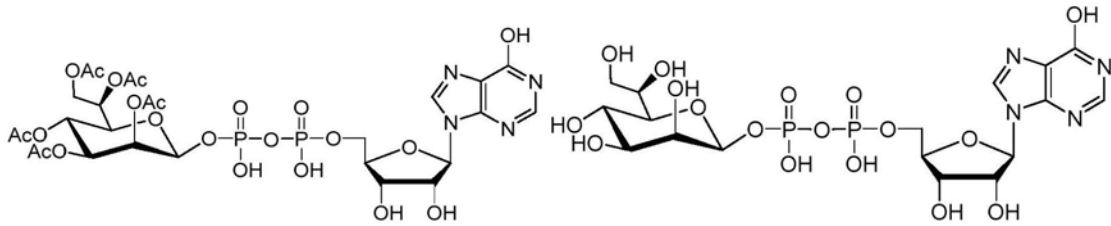
21. 根据权利要求1至18中任一项所述的化合物,其中R<sup>1</sup>是



22. 根据权利要求1所述的化合物和/或其立体异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐,其中所述化合物选自:







23. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和药学上可接受的载体。

24. 一种用于激活ALPK1的方法,所述方法包括给予有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐。

25. 一种用于调节需要这种治疗的受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐;或向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。

26. 一种用于治疗需要这种治疗的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者给予有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐;或向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。

27. 一种用于增强受试者对靶抗原的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐;或向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。

28. 一种用于治疗可通过激活受试者细胞中的NFkB、p38、和JNK细胞信号传导通路的治疗而改善的疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给予有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐;或向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。

29. 一种用于治疗或预防有需要的受试者的由选自细菌、病毒、或寄生虫的感染原引起的疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给予有效量的根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐;或向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。

30. 根据权利要求25所述的方法,其中调节免疫应答选自先天免疫的激活和适应性免疫的激活。

31. 根据权利要求26所述的方法,其中所述癌症选自软组织肉瘤、乳腺癌、头颈癌、黑色素瘤、宫颈癌、膀胱癌、血液系统恶性肿瘤、胶质母细胞瘤、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、肾癌、肺癌、梅克尔细胞癌、小肠癌、甲状腺癌、急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、胃癌、胃肠道间质瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、肝癌、白血病、淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、脑癌、和多发性骨髓瘤。

32. 根据权利要求27所述的方法,其中所述靶抗原是选自腺病毒、乙型柯萨奇病毒、巨细胞病毒、东部马脑炎病毒、埃博拉病毒、肠病毒71、EB病毒、乙型流感嗜血杆菌(Hib)、丙型肝炎病毒(HCV)、疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类乳头瘤病毒(HPV)、钩虫、马尔堡病毒、诺如病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、轮状病毒、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、水痘、西尼罗病毒、鼠疫耶尔森杆菌(*Yersinia pestis*)、和寨卡病毒的感染原的抗原。

33. 根据权利要求27所述的方法,其中所述ALPK1激动剂、所述编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或所述ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体充当用于治疗或预防炭疽、龋齿、美洲锥虫病、登革热、白喉、埃立克体病、甲型或乙型肝炎、疱疹、季节性流感、日本脑炎、麻风病、莱姆病、疟疾、麻疹、腮腺炎、包括脑膜炎和败血病的脑膜炎球菌病、盘尾丝虫河盲症、疫咳(百日咳)、肺炎球菌病、脊髓灰质炎、狂犬病、风疹、血吸虫病、严重急性呼吸综合征(SARS)、带状疱疹、天花、梅毒、破伤风、肺结核、兔热病、蜱传脑炎病毒、伤寒热、锥虫病、黄热病、或内脏利什曼病的疫苗的疫苗佐剂。

34. 根据权利要求28所述的方法,其中所述疾病或障碍选自肺结核、脑膜炎、肺炎、溃疡、脓毒症、鼻炎、哮喘、过敏、COPD、炎性肠病、关节炎、肥胖症、辐射诱导的炎症、银屑病、特应性皮炎、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、阿尔茨海默氏病、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性甲状腺炎(格雷夫病)、多发性硬化症、强直性脊柱炎大疱性疾病、光化性角化病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、斑秃、和由所述丙型肝炎病毒(HCV)、所述乙型肝炎病毒(HBV)或所述人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的疾病和障碍。

35. 根据权利要求29所述的方法,其中所述感染原是细菌。

36. 根据权利要求29所述的方法,其中所述感染原是病毒。

37. 根据权利要求29所述的方法,其中所述感染原是寄生虫。

38. 根据权利要求35所述的方法,其中所述细菌是革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述革兰氏阴性细菌选自鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、伴放线杆菌(*Aggregatobacter actinomycetemcomitans*)、杆菌状巴尔通体(*Bartonella bacilliformis*)、汉氏巴尔通体(*Bartonella henselae*)、五日热巴尔通体(*Bartonella quintana*)、双歧杆菌疏螺旋体(*Bifidobacterium Borrelia*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、布鲁氏菌属物种(*Brucella sp*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、人心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)、胎儿弯曲杆菌(*Campylobacter fetus*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumonia*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、蓝藻细菌(*Cyanobacteria*)、侵蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、大肠杆菌0157、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、嗜沫嗜血杆菌(*Haemophilus aphrophilus*)、杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、金格杆菌(*Kingella kingae*)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumonia*)、军团杆菌(*Legionella bacteria*)、嗜肺军团菌血清1型(*Legionella pneumophila serogroup*

1)、钩端螺旋体属(*Leptospira*)、摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、粘化变形杆菌(*Proteus myxofaciens*)、雷氏普罗威登斯菌(*Providencia rettgeri*)、产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens*)、斯氏普罗威登斯菌(*Providencia stuartii*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、少动假单胞菌(*Pseudomonas paucimobilis*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、食酸假单胞菌(*Pseudomonas acidovorans*)、立克次体属(*Rickettsiae*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi types A,B typhus*)、都柏林沙门氏菌(*Salmonella dublin*)、亚利桑那沙门氏菌(*Salmonella arizonae*)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、痢疾志贺氏菌(*Schigella dysenteriae*)、福氏志贺氏菌(*Schigella flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*Schigella boydii*)、宋内志贺氏菌(*Schigella sonnei*)、密螺旋体属(*Treponema*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、霍氏弧菌(*Vibrio hollisae*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和鼠疫耶尔森杆菌(*Yersinia pestis*)。

40. 根据权利要求38所述的方法,其中所述革兰氏阳性细菌选自放线菌属(*Actinomycetes*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、白喉棒状杆菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、单核细胞增生利斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、麻风分枝杆菌(*Mycobacterium leprae*)、结核分支杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、支原体属(*Mycoplasma*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、丙酸菌属(*Propionibacterium*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎双球菌(*Pneumococci*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(*vancomycin resistant Staphylococcus aureus*) (MRSA)、耐万古霉素金黄色葡萄球菌(*vancomycin resistant Staphylococcus aureus*) (VRSA)、路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*)、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、和突变链球菌(*Streptococcus mutants*)。

41. 根据权利要求36所述的方法,其中所述病毒选自埃博拉病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯性疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类乳头瘤病毒(HPV-6、HPV-11)、人类SARS冠状病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、麻疹病毒、狂犬病病毒、脊髓灰质炎病毒、SARS冠状病毒、和黄热病病毒。

42. 根据权利要求37所述的方法,其中所述寄生虫选自棘阿米巴属物种(*Acanthamoeba* spp)、美洲锥虫病(*American trypanosomiasis*)、狒狒巴拉姆希阿米巴(*Balamuthia*

mandnillanis)、分歧巴贝虫 (*Babesia divergenes*)、双芽巴贝虫 (*Babesia bigemina*)、马巴贝西虫 (*Babesia equi*)、微小巴贝西虫 (*Babesia microfti*)、邓肯巴贝西虫 (*Babesia duncani*)、结肠小袋绦虫 (*Balantidium coli*)、芽囊原虫属物种 (*Blastocystis spp*)、隐孢子虫属物种 (*Cryptosporidium spp*)、环孢子虫 (*Cyclospora cayetanensis*)、脆弱双核阿米巴 (*Dientamoeba fragilis*)、阔节裂头绦虫 (*Diphyllobothrium latum*)、亚马逊利什曼原虫 (*Leishmania amazonensis*)、福氏纳格里阿米巴原虫 (*Naegleria fowderi*)、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫柯氏亚种 (*Plasmodium ovale curtisi*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、西伯氏鼻孢子虫 (*Rhinosporidium seeberi*)、牛-人肉孢子虫 (*Sarcocystis bovi hominis*)、猪人肉孢子虫 (*Sarcocystis suis hominis*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、阴道滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、和多头绦虫 (*Taenia multiceps*)。

43. 根据权利要求25-42中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者给予一种或多种另外的治疗剂或免疫调节剂及其组合。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述一种或多种另外的治疗剂选自抗微生物剂,诸如抗细菌剂、抗病毒剂或抗寄生虫剂,抗癌剂,或用于治疗肺结核、脑膜炎、肺炎、溃疡、脓毒症、鼻炎、哮喘、过敏、COPD、炎性肠病、关节炎、肥胖症、辐射诱导的炎症、银屑病、特应性皮炎、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、阿尔茨海默氏病、系统性红斑狼疮 (SLE)、自身免疫性甲状腺炎 (格雷夫病)、多发性硬化症、和强直性脊柱炎大疱性疾病的治疗剂。

45. 根据权利要求43所述的方法,其中所述一种或多种另外的免疫调节剂选自免疫检查点调节因子的抑制剂或拮抗剂,疫苗、优选针对免疫检查点调节因子的疫苗,免疫刺激分子,免疫共刺激分子的激动剂,重组蛋白,和T细胞、优选嵌合抗原受体T (CAR-T) 细胞。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述免疫检查点调节因子选自程序化细胞死亡1 (PD-1) 受体 (CD279)、PD-1 (例如,PD-L1) 的配体、细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA4)、肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (可替代地, TNFRSF9、4-1BB) 和4-1BB配体、肿瘤坏死因子受体超家族成员4 (可替代地, TNFRSF4、OX40) 和OX40配体、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR)、肿瘤坏死因子受体超家族成员7 (可替代地, TNFRSF7、分化簇27、CD27)、TNFRSF25和TNF样配体1A (TL1A)、TNF受体超家族成员5 (可替代地, TNFRSF5、CD40) 和CD40配体、疱疹病毒进入介体 (HVEM)-肿瘤坏死因子配体超家族成员14 (可替代地, TNFSF14、LIGHT)-淋巴毒素 $\alpha$  (LTA)、疱疹病毒进入介体- (HVEM)-B-和T-淋巴细胞弱化因子 (BTLA)-CD160 (可替代地, TNFSF14)、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、T细胞免疫球蛋白及粘蛋白结构域分子-3 (TIM3)、唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素 (SIGLEC)、诱导T细胞共刺激因子 (ICOS) 和ICOS配体、B7-H3 (B7家族,可替代地CD276)、含有V-set结构域的T细胞激活抑制因子1 (VTCN1,可替代地B7-H4)、含有V型免疫球蛋白结构域的T细胞激活抑制因子 (VISTA)、人内源性逆转录病毒-H长末端重复关联蛋白2 (HHLA2)-跨膜和免疫球蛋白结构域2 (TMIGD2)、嗜乳脂蛋白、自然杀伤细胞受体2B4 (可替代地, NKR2B4、CD244) 和B细胞膜蛋白 (CD48)、具有免疫球蛋白 (Ig) 和免疫受体酪氨酸基抑制基序结构域 (TIGIT) 的T细胞免疫受体及脊髓灰质炎病毒受体 (PVR) 家族成员、杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)、免疫球蛋白样转录物 (ILT) 和白细胞免疫球蛋白样受体 (LIR)、自然杀伤细胞2族蛋白成员D (NKG2D) 和自然杀伤细胞2族蛋白成员A

(NKG2A)、主要组织相容性复合体(MHC) I类多肽相关序列A(MICA)和MHC I类多肽相关序列B(MICB)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、集落刺激因子1受体(CSF1R)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、转化生长因子 $\beta$ (TGFB)、腺苷-外核苷酸酶三磷酸二磷酸水解酶1(CD39)-5'-核苷酸酶(CD73)、C-X-C基序趋化因子受体4(CXCR4)和C-X-C基序趋化因子配体12(CXCL12)、磷脂酰丝氨酸、信号调节蛋白 $\alpha$ (SIRPA)和整合素相关蛋白(CD47)、血管内皮生长因子(VEGF)、和神经菌毛素。

47. 根据权利要求45所述的方法,其中所述一种或多种另外的免疫调节剂是疫苗。

48. 根据权利要求47所述的方法,在用于治疗癌症的方法中,其中所述疫苗是针对肿瘤抗原的疫苗。

49. 根据权利要求48所述的方法,其中所述肿瘤抗原选自糖蛋白100(gp100)、粘蛋白1(MUC1)、和黑色素瘤相关抗原3(MAGEA3)。

50. 根据权利要求45所述的方法,其中所述一种或多种另外的免疫调节剂是T细胞,优选嵌合抗原受体T细胞。

51. 根据权利要求45所述的方法,其中所述一种或多种另外的免疫调节剂是重组蛋白,优选选自粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素7(IL-7)、IL-12、IL-15、IL-18、和IL-21。

52. 根据权利要求25-51中任一项所述的方法,其中所述组合物包含选自以下的ALPK1激动剂:D-甘油- $\beta$ -D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP),D-甘油- $\beta$ -D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP),L-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP),及其前药、类似物和衍生物。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或其衍生物,所述衍生物选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种。

54. 根据权利要求52所述的方法,其中所述ALPK1激动剂是HMP-1bP。

55. 根据权利要求25-51中任一项所述的方法,其中所述组合物包含(i)编码GmhA、GmhB、和HIIdE中的每一种的一种或多种多核苷酸,使得所述多核苷酸在哺乳动物细胞中表达足以将胞质D-景天庚酮糖-7-P转化为H1b-ADP,(ii)编码ALPK1的多核苷酸,(iii)编码ALPK1的组成性活性突变体的多核苷酸,(iv)ALPK1蛋白或(v)ALPK1蛋白的组成性活性突变体。

56. 根据权利要求55所述的方法,其中所述组合物包含(i)编码GmhA、GmhB、和HIIdE中的每一种的一种或多种多核苷酸,使得所述多核苷酸在哺乳动物细胞中表达足以将胞质D-景天庚酮糖-7-P转化为H1b-ADP,(ii)编码ALPK1的多核苷酸,或(iii)编码ALPK1的组成性活性突变体的多核苷酸。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述组合物适于使用病毒或非病毒基因递送系统给予所述受试者。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述组合物适于使用病毒基因递送系统给予所述受试者。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中所述组合物进一步包含病毒颗粒。

60. 根据权利要求57所述的方法,其中所述组合物适于使用非病毒基因递送系统给予

所述受试者。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述组合物进一步包含脂质体颗粒、纳米微粒、微环、微载体、和聚合物载体中的一种或多种。

62. 根据权利要求60所述的方法,其中所述非病毒基因递送系统包括基因编辑技术。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述基因编辑技术利用大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)、或CRISPR/Cas-9。

64. 一种用于治疗需要这种治疗的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂的组合物,所述ALPK1激动剂选自HBP, HMP-1bP, H1b-ADP和H1b-ADP-6L,及其前药、类似物和衍生物。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或其衍生物,所述衍生物选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种。

66. 根据权利要求64或65所述的方法,其进一步包括向所述受试者给予一种或多种另外的治疗剂或免疫调节剂及其组合。

67. 根据权利要求66所述的方法,其中所述一种或多种另外的治疗剂或免疫调节剂选自免疫检查点调节因子的抑制剂或拮抗剂,疫苗、优选针对免疫检查点调节因子的疫苗,免疫刺激分子,免疫共刺激分子的激动剂,重组蛋白,和T细胞、优选嵌合抗原受体T(CAR-T)细胞。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述免疫检查点调节因子选自程序化细胞死亡1(PD-1)受体(CD279)、PD-1(例如,PD-L1)的配体、细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、肿瘤坏死因子受体超家族成员9(可替代地, TNFRSF9、4-1BB)和4-1BB配体、肿瘤坏死因子受体超家族成员4(可替代地, TNFRSF4、OX40)和OX40配体、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、肿瘤坏死因子受体超家族成员7(可替代地, TNFRSF7、分化簇27、CD27)、TNFRSF25和TNF样配体1A(TL1A)、TNF受体超家族成员5(可替代地, TNFRSF5、CD40)和CD40配体、疱疹病毒进入介体(HVEM)-肿瘤坏死因子配体超家族成员14(可替代地, TNFSF14、LIGHT)-淋巴毒素 $\alpha$ (LTA)、疱疹病毒进入介体(HVEM)-B-和T-淋巴细胞弱化因子(BTLA)-CD160(可替代地, TNFSF14)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、T细胞免疫球蛋白及粘蛋白结构域分子-3(TIM3)、唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(SIGLEC)、诱导T细胞共刺激因子(ICOS)和ICOS配体、B7-H3(B7家族,可替代地CD276)、含有V-set结构域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1,可替代地B7-H4)、含有V型免疫球蛋白结构域的T细胞激活抑制因子(VISTA)、人内源性逆转录病毒-H长末端重复关联蛋白2(HHLA2)-跨膜和免疫球蛋白结构域2(TMIGD2)、嗜乳脂蛋白、自然杀伤细胞受体2B4(可替代地, NKR2B4、CD244)和B细胞膜蛋白(CD48)、具有免疫球蛋白(Ig)和免疫受体酪氨酸基抑制基序结构域(TIGIT)的T细胞免疫受体及脊髓灰质炎病毒受体(PVR)家族成员、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、免疫球蛋白样转录物(ILT)和白细胞免疫球蛋白样受体(LIR)、自然杀伤细胞2族蛋白成员D(NKG2D)和自然杀伤细胞2族蛋白成员A(NKG2A)、主要组织相容性复合体(MHC) I类多肽相关序列A(MICA)和MHC I类多肽相关序列B(MICB)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、集落刺激因子1受体(CSF1R)、吡嗪胺2,3-双加氧酶(IDO)、转化生长因子 $\beta$ (TGFB)、腺苷-外核苷酸酶三磷酸二磷酸水解酶1(CD39)-5'-核苷酸酶(CD73)、C-X-C基序趋化因子受体4(CXCR4)和C-X-C基序趋化因子配体12(CXCL12)、磷脂

酰丝氨酸、信号调节蛋白 $\alpha$  (SIRPA) 和整合素相关蛋白 (CD47)、血管内皮生长因子 (VEGF)、和神经菌毛素。

69. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述一种或多种另外的治疗剂或免疫调节剂是PD-1/PD-L1抑制剂。

70. 根据权利要求69所述的方法, 其中所述PD-1/PD-L1抑制剂选自纳武单抗、派姆单抗、匹迪单抗 (pidilizumab)、BMS-936559、阿特朱单抗、度伐单抗、和阿利库单抗。

71. 根据权利要求64-70中任一项所述的方法, 其中所述癌症选自晚期黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌、膀胱癌、霍奇金淋巴瘤、肝癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、非霍奇金淋巴瘤、前列腺癌、头颈癌、甲状腺癌、脑癌、急性骨髓性白血病 (AML)、梅克尔细胞癌、多发性骨髓瘤、宫颈癌、和肉瘤。

72. 一种用于治疗需要这种治疗的受试者的癌症的方法, 所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂的组合物, 所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L, H1b-ADP, 或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物, 和选自免疫检查点调节因子的抑制剂或拮抗剂、免疫刺激分子、和免疫共刺激分子的激动剂中的一种或多种的免疫调节剂。

73. 根据权利要求72所述的方法, 其中所述免疫检查点调节因子的抑制剂或拮抗剂是PD-1/PD-L1抑制剂。

74. 根据权利要求73所述的方法, 其中所述PD-1/PD-L1抑制剂选自纳武单抗、派姆单抗、匹迪单抗、BMS-936559、阿特朱单抗、度伐单抗、和阿利库单抗。

75. 根据权利要求72所述的方法, 其中所述免疫调节剂选自干扰素 $\alpha$  (INF $\alpha$ )、干扰素基因刺激因子 (“STING”) 激动剂、TLR激动剂 (例如, 雷西莫特)、和抗OX40 (CD134) 激动剂抗体。

76. 根据权利要求75所述的方法, 其中免疫调节剂是免疫共刺激分子的激动剂。

77. 根据权利要求76所述的方法, 其中所述免疫共刺激分子的激动剂是抗OX40 (CD134) 激动剂抗体。

78. 根据权利要求72-77中任一项所述的方法, 其中所述ALPK1激动剂是H1b-ADP或其衍生物。

79. 一种用于治疗需要这种治疗的受试者的肝脏疾病或障碍的方法, 所述方法包括向所述受试者给予低剂量的H1b-ADP或其衍生物。

80. 根据权利要求79所述的方法, 其中所述肝脏疾病或障碍选自肝癌、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、和由所述丙型肝炎病毒 (HCV) 或所述乙型肝炎病毒 (HBV) 感染引起的疾病或障碍。

81. 一种治疗癌症的方法, 向所述需要这种治疗的受试者给予包含产生H1b-ADP或H1b-ADP-6L的细菌的组合物。

82. 根据权利要求81所述的方法, 其中所述组合物经由瘤内注射给予。

83. 根据权利要求25-82中任一项所述的方法, 其中所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物, 所述方法进一步包括给予有效抑制所述ALPK1激动剂的细胞内降解的磷酸酶抑制剂。

84. 根据权利要求25-83中任一项所述的方法, 其中所述受试者是脊椎动物。

85. 根据权利要求25-83中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

86. 一种疫苗组合物或疫苗佐剂组合物,其包含根据权利要求1至22中任一项所述的化合物或药学上可接受的盐。

87. 一种药物组合物、疫苗组合物、或疫苗佐剂组合物,其包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自HBP、HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP,或选自HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP。

88. 一种药物组合物、疫苗组合物、或疫苗佐剂组合物,其包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L, H1b-ADP, 或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物。

89. 一种选择能够调节哺乳动物受试者的免疫应答的化合物的方法,所述方法包括在ATP的存在下以及单独但同时不存在ATP的情况下使ALPK1与测试化合物接触,然后进行测定以检测ALPK1磷酸化和/或ALPK1信号传导的一个或多个下游靶标的激活。

90. 根据权利要求89所述的方法,其中ALPK1与所述测试化合物的接触是在无细胞系统中或在细胞系统中进行的。

91. 根据权利要求89所述的方法,其中检测ALPK1磷酸化和/或ALPK1信号传导的一个或多个下游靶标的激活的所述测定包括基于辐射测量的激酶测定、基于荧光的激酶测定、基于时间分辨荧光能量转移(TR-FRET)的测定、基于 $\alpha$ -技术的测定、酶联免疫吸附测定、发光检测、基于迁移率变动的激酶测定、基于蛋白质印迹的激酶测定、和配体激酶结合测定。

## 通过激活 $\alpha$ 蛋白激酶1调节免疫应答的组合物和方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于通过激活 $\alpha$ 蛋白激酶1 (ALPK1) 进行的疗法的组合物和方法。

### 背景技术

[0002] 关于炎症反应机制的研究已经鉴定出充当必需的信号传导组分的各种蛋白激酶。蛋白激酶的缺陷通常与人类炎症性疾病、癌症和糖尿病的发病机理相关。

[0003]  $\alpha$ -酶是独特的蛋白激酶超家族, 显示出与典型的蛋白激酶的序列相似性很小。已鉴定出总共六个 $\alpha$ 激酶成员, 包括 $\alpha$ -蛋白激酶1 (ALPK1)、ALPK2、ALPK3、细长因子-2激酶 (eEF2K)、和瞬时受体电位阳离子通道M6和M7 (TRPM6和TRPM7) (Ryazanov AG等人, *Curr Biol* 1999 9(2):R43-45; Ryazanov AG等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 94(10):4884-4889)。

[0004] ALPK1被鉴定为上皮细胞中含有筏 (raft) 的蔗糖异构酶 (SI) 囊泡的新组分 (Heinet M等人, *J. Biol. Chem.* 2005 280(27):25637-43)。已显示ALPK1将肌球蛋白1磷酸化并且在细胞外转运至顶端质膜中起重要作用。在小鼠中转座子插入的ALPK1纯合子失活性突变导致运动协调缺陷, 这可以通过过表达全长ALPK1来补救 (Chen M等人, *BMC Neurosci.* 2011 12:1)。

[0005] 若干项遗传相关性研究揭示了痛风风险中有ALPK1, 尽管并非所有已鉴定的多态性都能在所有群体中复制 (Wang SJ等人, *J. Mol. Med.* 2011 89:1241-51; Ko AM等人, *J. Intl. Epidemiol.* 2013 42:466-474; Chiba T等人, *Human Cell* 2015 28:1-4)。其他遗传相关性研究将ALPK1关联为慢性肾脏疾病、心肌梗塞和糖尿病的风险因素 (Yamada Y等人 *J Med Genet* 2013 50:410-418; Fujimaki T等人, *Biomed Report* 2014 2:127-131; Shimotaka S等人, *Biomed Report* 1 2013 940-44; Yamada Y等人, *Biomed. Report* 2015 DOI:10.3892/br.2015.439)。

[0006] 小鼠中ALPK1的过表达导致较低的睾丸素水平以及促炎细胞因子IL-1 $\beta$ 和TGF- $\beta$ 的产生增加, 表明ALPK1与睾丸素之间的平衡可能在睾丸素介导的促炎细胞因子的抑制中起作用 (Kuo TM等人, *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015 154:150-158)。

[0007] 还已揭示ALPK1激活在包括肺癌、结直肠癌和乳腺癌的癌症中起作用 (Liao HF等人 *Scientific Reports* 2016 6:27350; Strietz J等人, *Oncotarget* 2016 1-16)。

[0008] 最近的研究已揭示出ALPK1是由某些细菌激活的先天免疫应答的重要调节因子。例如, 通过ALPK1响应于福氏志贺氏菌 (*S. flexneri*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、和脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitides*) 感染而促进TIFA寡聚和白细胞介素8 (IL-8) 的表达, 表明它是针对细菌的先天免疫的关键调节因子 (Milivojevic M等人, *PLoS Pathog* 2017 13(2):e1006224)。Zimmerman等人描述了由幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 类型IV分泌系统触发的ALPK1和TIFA依赖性先天免疫应答。(Zimmermann S等人, *Cell Reports* 2017 20(10):2384-95)。这两项研究均表明细菌代谢物庚糖-1,7-双磷酸 (HBP) 激活TIFA依赖性先天免疫。

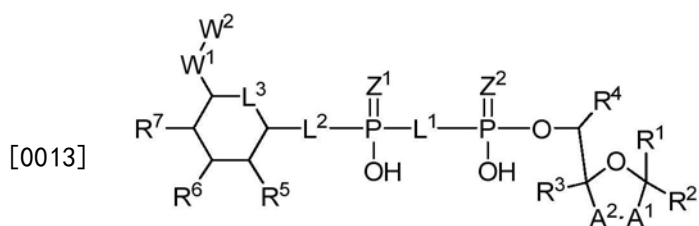
[0009] 存在其临床表现是由炎症和各种感染引起的许多疾病、障碍和病症。需要用于调节靶组织中的炎症以治疗此类疾病、障碍和病症的新方法。本公开文本解决了这种需要。

### 发明内容

[0010] 本发明部分地基于以下发现：某些细菌代谢物(包括D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(庚糖1,7双磷酸或“HBP”)以及D-甘油-β-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP)、L-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP))和本文描述的由式IA、IB、或IC表示的其衍生物诱导下游信号传导的ALPK1依赖性激活,包括诸如IL-8和TNFα的促炎细胞因子的表达增加。从目前关于ALPK1及其在通过细菌代谢物激活先天免疫中的作用所知的,HMP-1bP、其下游产物H1b-ADP-6L并且特别是H1b-ADP的生物活性是出乎意料的。本公开文本还提供了由H1b-ADP和H1b-ADP衍生物产生的抗肿瘤活性的证据并且证明H1b-ADP与免疫检查点抑制剂和免疫调节剂(包括抗PD-L1和抗PD-1抗体、抗CTLA4抗体、和抗CD4抗体)的共给予具有协同抗肿瘤作用。本公开文本还显示H1b-ADP与免疫调节剂(包括干扰素α(INFα)、干扰素基因刺激因子(“STING”)激动剂、和TLR激动剂(雷西莫特)中的每一种)的共给予具有协同抗肿瘤作用。

[0011] 因此,本公开文本提供了组合物和方法,所述组合物和方法涉及调节免疫应答,治疗癌症,增强对靶抗原的免疫应答,治疗可通过激活NFκB、p38、和JNK细胞信号传导通路的治疗而改善的疾病或障碍,以及通过激活ALPK1治疗或预防由感染原引起的疾病或障碍。在某些实施方案中,ALPK1激活通过给予ALPK1激动剂实现,所述ALPK1激动剂选自HBP、HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP,优选HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP,并且最优选H1b-ADP-6L和H1b-ADP,或本文描述的由式IA、IB、或IC表示的其衍生物。在一些实施方案中,本公开文本提供了调节受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的ALPK1激动剂中的任何一种的组合物。

[0012] 本发明公开了作为ALPK1激动剂的新型杂环化合物。所述化合物由式(I)表示:



(I)

[0014] 其中A<sup>1</sup>、A<sup>2</sup>、L<sup>1</sup>、L<sup>2</sup>、L<sup>3</sup>、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、W<sup>1</sup>、W<sup>2</sup>、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>是如本文定义的。在本公开文本的范围中还包括式I的化合物的立体异构体、互变异构体、稳定同位素、前药、和药理学上可接受的盐。

[0015] A<sup>1</sup>和A<sup>2</sup>独立地选自O、S和-C(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)-,其中R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>独立地选自H、D、-OH、N<sub>3</sub>、-CN、卤素、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烷酰氧基和经取代或未经取代的芳烷氧基,其中任选的取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基;A<sup>1</sup>或A<sup>2</sup>中的至少一个是-C(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>);其中A<sup>1</sup>中的R<sup>8</sup>或R<sup>9</sup>可以与A<sup>2</sup>中的R<sup>8</sup>或R<sup>9</sup>环化以形成C3-C6环烷基和含有3至9个环成员并且具有1-3个选自N、O

和S的杂原子作为环成员的环杂烷基,各自任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基取代;

[0016]  $L^1$ 和 $L^2$ 独立地选自O、CH<sub>2</sub>、CHF和CF<sub>2</sub>;

[0017]  $L^3$ 是O、S、CH<sub>2</sub>或CH(OH);

[0018]  $Z^1$ 和 $Z^2$ 独立地选自O和S;

[0019]  $W^1$ 是-C(R<sup>10</sup>R<sup>11</sup>)-,其中R<sup>10</sup>和R<sup>11</sup>独立地选自H、D、-OH、卤素、和选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4-卤代烷氧基、C1-C4烯氧基、芳烷氧基和R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-的任选经取代的基团,其中R<sup>12</sup>选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烯氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基;其中R<sup>10</sup>和R<sup>11</sup>的任选取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基;

[0020]  $W^2$ 是H或任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C3烷氧基、C1-C3卤代烷基、C1-C3卤代烷氧基、C1-C3烯氧基和R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-的取代基取代的C1-C3烷基,其中R<sup>12</sup>是C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基。

[0021]  $R^1$ 是含有5至10个环原子并且具有1-4个选自N、O和S的杂原子作为环成员的C6-C10芳基或杂芳基,其中 $R^1$ 任选地被1-3个选自D、卤素、-OH、=O、CN、NH<sub>2</sub>、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷基胺、C1-C4二烷基胺和(R<sup>13</sup>R<sup>14</sup>)NCO-的取代基取代,其中R<sup>13</sup>和R<sup>14</sup>独立地选自H、C1-C4烷基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基;

[0022]  $R^2$ 、 $R^3$ 和 $R^4$ 独立地选自H、D、卤素、C1-C4烷基和C1-C4卤代烷基;

[0023]  $R^5$ 、 $R^6$ 和 $R^7$ 选自H、D、卤素和-OH、R<sup>12</sup>CO<sub>2</sub>-,其中R<sup>12</sup>选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烯氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有4至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基;其中R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>和R<sup>7</sup>的相邻基团中的任意两个可以环化以形成含有5至9个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基,各自任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基取代。在实施方案中,本公开文本提供了一种用于调节需要这种治疗的受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂(包括本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的ALPK1激动剂)、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。在实施方案中,所述用于调节免疫应答的方法选自先天免疫的激活和适应性免疫的激活。

[0024] 在实施方案中,本公开文本提供了一种用于治疗需要这种治疗的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂(包括本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的ALPK1激动剂)、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。在实施方案中,所述组合物包含ALPK1

激动剂,所述ALPK1激动剂选自本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的化合物,或选自HBP、HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP,优选HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP,并且最优选H1b-ADP-6L和H1b-ADP。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自化合物1-3、9-17、19、20-22、和26-32中的任何一种。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是化合物15。在实施方案中,所述癌症选自软组织肉瘤、乳腺癌、头颈癌、黑色素瘤、宫颈癌、膀胱癌、血液系统恶性肿瘤、胶质母细胞瘤、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、肾癌、肺癌、梅克尔细胞癌、小肠癌、甲状腺癌、急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、胃癌、胃肠道间质瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、肝癌、白血病、淋巴瘤、T细胞淋巴瘤、脑癌、和多发性骨髓瘤。在实施方案中,所述癌症选自乳腺癌、头颈癌、黑色素瘤、肾癌、肺癌、梅克尔细胞癌、和淋巴瘤。

[0025] 在实施方案中,本公开文本提供了一种用于增强受试者对靶抗原的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂(包括本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的ALPK1激动剂)、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种作为起增强对所述抗原的免疫应答的作用的疫苗或免疫佐剂的组合物。在实施方案中,所述靶抗原是选自腺病毒、乙型柯萨奇病毒、巨细胞病毒、东部马脑炎病毒、埃博拉病毒、肠病毒71、EB病毒、乙型流感嗜血杆菌(Hib)、丙型肝炎病毒(HCV)、疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类乳头瘤病毒(HPV)、钩虫、马尔堡病毒、诺如病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、轮状病毒、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、水痘、西尼罗病毒、鼠疫耶尔森杆菌(*Yersinia pestis*)、和寨卡病毒的感染原的抗原。在实施方案中,所述ALPK1激动剂(包括本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的ALPK1激动剂)、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体充当用于治疗或预防炭疽、龋齿、美洲锥虫病、登革热、白喉、埃立克体病、甲型或乙型肝炎、疱疹、季节性流感、日本脑炎、麻风病、莱姆病、疟疾、麻疹、腮腺炎、包括脑膜炎和败血病的脑膜炎球菌病、盘尾丝虫河盲症、疫咳(百日咳)、肺炎球菌病、小儿麻痹症、狂犬病、风疹、血吸虫病、严重急性呼吸综合征(SARS)、带状疱疹、天花、梅毒、破伤风、肺结核、兔热病、蜱传脑炎病毒、伤寒热、锥虫病、黄热病、或内脏利什曼病的疫苗的疫苗佐剂。

[0026] 在实施方案中,本公开文本提供了一种用于治疗可通过激活受试者细胞中的NFkB、p38、和JNK细胞信号传导通路的治疗而改善的疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。在实施方案中,所述疾病或障碍选自肺结核、脑膜炎、肺炎、溃疡、脓毒症、鼻炎、哮喘、过敏、COPD、炎性肠病、关节炎、肥胖症、辐射诱导的炎症、银屑病、特应性皮炎、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、阿尔茨海默氏病、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性甲状腺炎(格雷夫病)、多发性硬化症、强直性脊柱炎大疱性疾病、和由所述丙型肝炎病毒(HCV)、所述乙型肝炎病毒(HBV)或所述人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的疾病和障碍。

[0027] 在实施方案中,本公开文本提供了一种用于治疗或预防有需要的受试者的由选自细菌、病毒、或寄生虫的感染原引起的疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给予

包含ALPK1激动剂(包括本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的ALPK1激动剂)、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。在实施方案中,所述感染原是细菌。在实施方案中,所述感染原是病毒。在实施方案中,所述感染原是寄生虫。在实施方案中,所述细菌是革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌。在实施方案中,所述革兰氏阴性细菌选自鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、伴放线杆菌(*Aggregatobacter actinomycetemcomitans*)、杆菌状巴尔通体(*Bartonella bacilliformis*)、汉氏巴尔通体(*Bartonella henselae*)、五日热巴尔通体(*Bartonella quintana*)、双歧杆菌疏螺旋体(*Bifidobacterium Borrelia*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、布鲁氏菌属物种(*Brucella sp*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、人心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)、胎儿弯曲杆菌(*Campylobacter fetus*)、肺炎衣原体(*Chlamydia pneumonia*)、沙眼衣原体(*Chlamydia trachomatis*)、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)、蓝藻细菌(*Cyanobacteria*)、侵蚀艾肯菌(*Eikenella corrodens*)、肠杆菌(*Enterobacter*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、大肠杆菌0157、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)、具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)、嗜沫嗜血杆菌(*Haemophilus aphrophilus*)、杜克雷嗜血杆菌(*Haemophilus ducreyi*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、金格杆菌(*Kingella kingae*)、肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumonia*)、军团杆菌(*Legionella bacteria*)、嗜肺军团菌血清1型(*Legionella pneumophila serogroup 1*)、钩端螺旋体属(*Leptospira*)、摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)、淋病奈瑟氏菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、粘化变形杆菌(*Proteus myxofaciens*)、雷氏普罗威登斯菌(*Providencia rettgeri*)、产碱普罗威登斯菌(*Providencia alcalifaciens*)、斯氏普罗威登斯菌(*Providencia stuartii*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、少动假单胞菌(*Pseudomonas paucimobilis*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、食酸假单胞菌(*Pseudomonas acidovorans*)、立克次体属(*Rickettsia*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi types A,B typhus*)、都柏林沙门氏菌(*Salmonella dublin*)、亚利桑那沙门氏菌(*Salmonella arizonae*)、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella choleraesuis*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺氏菌(*Shigella boydii*)、宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*)、密螺旋体属(*Treponema*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、霍氏弧菌(*Vibrio hollisae*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和鼠疫耶尔森杆菌(*Yersinia pestis*)。在实施方案中,所述革兰氏阳性细菌选自放线菌属(*Actinomycetes*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、破伤

风梭菌 (*Clostridium tetani*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、尿肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、支原体属 (*Mycoplasma*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、丙酸菌属 (*Propionibacterium*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎双球菌 (*Pneumococci*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA)、耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*) (VRSA)、路邓葡萄球菌 (*Staphylococcus lugdunensis*)、腐生葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、和突变链球菌 (*Streptococcus mutants*)。在实施方案中,所述病毒选自埃博拉病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯性疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒 (HIV)、人类乳头瘤病毒 (HPV-6、HPV-11)、人类SARS冠状病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、麻疹病毒、狂犬病病毒、脊髓灰质炎病毒、SARS冠状病毒、和黄热病病毒。在实施方案中,所述寄生虫选自棘阿米巴属物种 (*Acanthamoeba* spp)、美洲锥虫病 (American trypanosomiasis)、狒狒巴拉姆希阿米巴 (*Balamuthia mandrillensis*)、分歧巴贝虫 (*Babesia divergens*)、双芽巴贝虫 (*Babesia bigemina*)、马巴贝西虫 (*Babesia equi*)、微小巴贝西虫 (*Babesia microti*)、邓肯巴贝西虫 (*Babesia duncani*)、结肠小袋绦虫 (*Balantidium coli*)、芽囊原虫属物种 (*Blastocystis* spp)、隐孢子虫属物种 (*Cryptosporidium* spp)、环孢子虫 (*Cyclospora cayentanensis*)、脆弱双核阿米巴 (*Dientamoeba fragilis*)、阔节裂头绦虫 (*Diphyllobothrium latum*)、亚马逊利什曼原虫 (*Leishmania amazonensis*)、福氏纳格里阿米巴原虫 (*Naegleria fowleri*)、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫柯氏亚种 (*Plasmodium ovale curtisi*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、西伯氏鼻孢子虫 (*Rhinosporidium seeberi*)、牛-人肉孢子虫 (*Sarcocystis bovis*)、猪人肉孢子虫 (*Sarcocystis suis*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、阴道滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、和多头绦虫 (*Taenia multiceps*)。

[0028] 在任何前述方法的实施方案中,所述方法可以进一步包括向所述受试者给予一种或多种另外的治疗剂或免疫调节剂及其组合。在实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂选自抗微生物剂,诸如抗细菌剂、抗病毒剂或抗寄生虫剂,抗癌剂,或用于治疗肺结核、脑膜炎、肺炎、溃疡、脓毒症、鼻炎、哮喘、过敏、COPD、炎性肠病、关节炎、肥胖症、辐射诱导的炎症、银屑病、特应性皮炎、非酒精性脂肪性肝炎 (NASH)、阿尔茨海默氏病、系统性红斑狼疮 (SLE)、自身免疫性甲状腺炎 (格雷夫病)、多发性硬化症、和强直性脊柱炎大疱性疾病的的治疗剂。

[0029] 在用于治疗癌症的方法的实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂是免疫调节剂。在实施方案中,所述免疫调节剂选自免疫检查点调节因子的抑制剂或拮抗剂、免疫刺激

分子、和免疫共刺激分子的激动剂中的一种或多种。在实施方案中,所述免疫检查点调节因子的抑制剂或拮抗剂是PD-1/PD-L1抑制剂。在实施方案中,所述PD-1/PD-L1抑制剂选自纳武单抗、派姆单抗、匹迪单抗 (pidilizumab)、BMS-936559、阿特朱单抗、度伐单抗、和阿利库单抗。在实施方案中,所述免疫调节剂选自干扰素 $\alpha$  (INF $\alpha$ )、干扰素基因刺激因子(“STING”)激动剂、TLR激动剂(例如,雷西莫特)、和抗OX40 (CD134) 激动剂抗体。在实施方案中,所述免疫共刺激分子的激动剂是抗OX40 (CD134) 激动剂抗体。在实施方案中,所述癌症选自晚期黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌、膀胱癌、霍奇金淋巴瘤、肝癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、非霍奇金淋巴瘤、前列腺癌、头颈癌、甲状腺癌、脑癌、急性骨髓性白血病 (AML)、梅克尔细胞癌、多发性骨髓瘤、宫颈癌、和肉瘤。

[0030] 在实施方案中,所述一种或多种另外的免疫调节剂是免疫检查点调节因子的抑制剂或拮抗剂、或针对免疫检查点调节因子的疫苗。在实施方案中,所述一种或多种另外的免疫调节剂是免疫检查点调节因子(诸如共刺激分子)的激动剂,例如OX40 (CD134) 的激动剂。在实施方案中,所述免疫检查点调节因子选自程序化细胞死亡1 (PD-1) 受体 (CD279)、PD-1 (例如,PD-L1) 的配体、细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4 (CTLA4)、肿瘤坏死因子受体超家族成员9 (可替代地, TNFRSF9、4-1BB) 和4-1BB配体、肿瘤坏死因子受体超家族成员4 (可替代地, TNFRSF4、OX40) 和OX40配体、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白 (GITR)、肿瘤坏死因子受体超家族成员7 (可替代地, TNFRSF7、分化簇27、CD27)、TNFRSF25和TNF样配体1A (TL1A)、TNF受体超家族成员5 (可替代地, TNFRSF5、CD40) 和CD40配体、疱疹病毒进入介体 (HVEM)-肿瘤坏死因子配体超家族成员14 (可替代地, TNFSF14、LIGHT)-淋巴毒素 $\alpha$  (LTA)、疱疹病毒进入介体- (HVEM)-B-和T-淋巴细胞弱化因子 (BTLA)-CD160 (可替代地, TNFSF14)、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、T细胞免疫球蛋白及粘蛋白结构域分子-3 (TIM3)、唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素 (SIGLEC)、诱导T细胞共刺激因子 (ICOS) 和ICOS配体、B7-H3 (B7家族, 可替代地 CD276)、含有V-set结构域的T细胞激活抑制因子1 (VTCN1, 可替代地B7-H4)、含有V型免疫球蛋白结构域的T细胞激活抑制因子 (VISTA)、人内源性逆转录病毒-H长末端重复关联蛋白2 (HHLA2)-跨膜和免疫球蛋白结构域2 (TMIGD2)、嗜乳脂蛋白、自然杀伤细胞受体2B4 (可替代地, NKR2B4、CD244) 和B细胞膜蛋白 (CD48)、具有免疫球蛋白 (Ig) 和免疫受体酪氨酸抑制基序结构域 (TIGIT) 的T细胞免疫受体及脊髓灰质炎病毒受体 (PVR) 家族成员、杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)、免疫球蛋白样转录物 (ILT) 和白细胞免疫球蛋白样受体 (LIR)、自然杀伤细胞2族蛋白成员D (NKG2D) 和自然杀伤细胞2族蛋白成员A (NKG2A)、主要组织相容性复合体 (MHC) I类多肽相关序列A (MICA) 和MHC I类多肽相关序列B (MICB)、自然杀伤细胞受体2B4 (CD244)、集落刺激因子1受体 (CSF1R)、吡哆胺2,3-双加氧酶 (IDO)、转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ )、腺苷-外核苷酸酶三磷酸二磷酸水解酶1 (CD39)-5'-核苷酸酶 (CD73)、C-X-C基序趋化因子受体4 (CXCR4) 和C-X-C基序趋化因子配体12 (CXCL12)、磷脂酰丝氨酸、信号调节蛋白 $\alpha$  (SIRPA) 和整合素相关蛋白 (CD47)、血管内皮生长因子 (VEGF)、和神经菌毛素。

[0031] 在实施方案中,所述一种或多种另外的免疫调节剂是疫苗。

[0032] 在用于治疗癌症的方法的实施方案中,所述疫苗是针对肿瘤抗原的疫苗。在实施方案中,所述肿瘤抗原选自糖蛋白100 (gp100)、粘蛋白1 (MUC1)、和黑色素瘤相关抗原3 (MAGEA3)。

[0033] 在实施方案中,所述一种或多种另外的免疫调节剂是T细胞,优选嵌合抗原受体T

细胞。在实施方案中,所述一种或多种另外的免疫调节剂是重组蛋白,优选选自粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素7(IL-7)、IL-12、IL-15、IL-18、和IL-21。

[0034] 在任何前述方法的实施方案中,所述组合物可以包含本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的ALPK1激动剂,或选自D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP)及其前药、类似物和衍生物的ALPK1激动剂。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是HBP。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自化合物1-3、9-17、19、20-22、和26-32中的任何一种。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是化合物15。

[0035] 在实施方案中,所述ALPK1激动剂是HBP的前药。在实施方案中,所述前药包含保护基团,所述保护基团选自羰氧基甲基、环水杨基、环状1-芳基-1,3-丙烷基酯、芳氧基磷酰胺或磷酰胺、和甲基芳基卤代烷基酰胺。在实施方案中,所述前药是式3a、3b、3c、3d、或3e的化合物。在实施方案中,所述前药选自表1的化合物。

[0036] 在任何前述方法的实施方案中,所述组合物可以包含编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体。在实施方案中,所述组合物包含编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体。在实施方案中,所述组合物适于使用病毒或非病毒基因递送系统给予所述受试者。在实施方案中,所述组合物适于使用病毒基因递送系统给予所述受试者。在实施方案中,所述组合物进一步包含病毒颗粒。在实施方案中,所述组合物适于使用非病毒基因递送系统给予所述受试者。在实施方案中,所述组合物进一步包含脂质体颗粒、纳米微粒、微环、微载体、和聚合物载体中的一种或多种。在实施方案中,所述非病毒基因递送系统包括基因编辑技术。在实施方案中,所述基因编辑技术利用大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)、或CRISPR/Cas-9。

[0037] 在实施方案中,本公开文本提供了一种用于治疗需要这种治疗的受试者的肝脏疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给予低剂量的H1b-ADP、或其衍生物。在实施方案中,所述低剂量在从1纳克至1毫克/千克体重(1ng/kg至1mg/kg)、优选1微克至100微克/千克体重(1ug/kg至100ug/kg)的范围内。在实施方案中,所述肝脏疾病或障碍选自肝癌、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、和由所述丙型肝炎病毒(HCV)或所述乙型肝炎病毒(HBV)感染引起的疾病或障碍。

[0038] 在实施方案中,本公开文本提供了一种用于治疗癌症的方法,所述方法包括向所述需要这种治疗的受试者给予包含产生H1b-ADP或H1b-ADP-6L的细菌的组合物。在实施方案中,所述组合物经由瘤内注射给予。

[0039] 在任何前述方法的实施方案中,受试者可以是脊椎动物。在实施方案中,受试者是人类。

[0040] 本公开文本还提供了一种包含ALPK1激动剂的疫苗组合物或疫苗佐剂组合物和一种包含ALPK1激动剂和载体的药物组合物。在这些组合物的实施方案中,所述ALPK1激动剂是本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的化合物,HBP,或其前药、类似物、或衍生物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自化合物1-3、9-17、19、20-22、和26-32中的任何一种。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是化合物15。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是HBP的前药。在实施方案中,所述前药包含保护基团,所述保护基团选自羰氧基甲基、环水杨基、环状1-芳基-1,3-丙烷基酯、芳氧基磷酰胺或磷酰胺、和甲基芳基卤代烷基酰胺。在实施方案中,所述前

药是式3a、3b、3c、3d、或3e的化合物。在实施方案中,所述前药选自表1的化合物。

[0041] 本公开文本还提供了选择能够调节哺乳动物受试者的免疫应答的化合物的方法,所述方法包括在ATP的存在下以及单独但同时不存在ATP的情况下使ALPK1与测试化合物接触,然后进行测定以检测ALPK1磷酸化和/或ALPK1信号传导的一个或多个下游靶标的激活。在实施方案中,ALPK1与所述测试化合物的所述接触是在无细胞系统中或在细胞系统中进行的。在实施方案中,检测ALPK1磷酸化和/或ALPK1信号传导的一个或多个下游靶标的激活的所述测定包括基于辐射测量的激酶测定、基于荧光的激酶测定、基于时间分辨荧光能量转移(TR-FRET)的测定、基于 $\alpha$ -技术的测定、酶联免疫吸附测定、发光检测、基于迁移率变动的激酶测定、基于蛋白质印迹(Western)的激酶测定、和配体激酶结合测定。

[0042] 根据本文描述的任何方法,所述ALPK1激动剂可以选自本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的化合物,D-甘油-b-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP),D-甘油-b-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP),L-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP(H1b-ADP),以及任何前述分子的前药、类似物和衍生物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自HMP-1bP、H1b-ADP、和H1b-ADP-6L。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP或H1b-ADP-6L以及如本文描述的其衍生物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自化合物1-3、9-17、19、20-22、和26-32中的任何一种。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是化合物15。

[0043] 在实施方案中,本公开文本提供了一种疫苗组合物或疫苗佐剂组合物,其包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的化合物,HBP,HMP-1bP,H1b-ADP,和H1b-ADP-6L。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自HMP-1bP、H1b-ADP、和H1b-ADP-6L。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP或H1b-ADP-6L以及如本文描述的其衍生物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的化合物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自化合物1-3、9-17、19、20-22、和26-32中的任何一种。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是化合物15。

[0044] 在实施方案中,本公开文本提供了一种药物组合物,其包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的化合物,HBP,HMP-1bP,H1b-ADP,和H1b-ADP-6L。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自HMP-1bP、H1b-ADP、和H1b-ADP-6L。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP或H1b-ADP-6L以及如本文描述的其衍生物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的化合物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自化合物1-3、9-17、19、20-22、和26-32中的任何一种。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是化合物15。

[0045] 在实施方案中,本公开文本提供了一种治疗需要这种治疗的受试者的癌症的方法,其包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂的组合物,所述ALPK1激动剂选自本文描述的由式I、IA、IB、或IC表示的化合物,HBP,HMP-1bP,H1b-ADP和H1b-ADP-6L。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自HMP-1bP、H1b-ADP、和H1b-ADP-6L。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP或H1b-ADP-6L以及如本文描述的其衍生物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自化合物1-3、9-17、19、20-22、和26-32中的任何一种。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是化合物15。在实施方案中,所述方法进一步包括

向所述受试者给予PD-1/PD-L1抑制剂或免疫共刺激分子的激动剂。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP并且所述PD-1/PD-L1抑制剂选自纳武单抗、派姆单抗、匹迪单抗、BMS-936559、阿特朱单抗、度伐单抗、和阿利库单抗。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP并且所述免疫共刺激分子的激动剂是抗OX40 (CD134) 激动剂抗体。根据前述方法,所述受试者可以是人类受试者并且所述癌症可以是如上文描述的癌症。在实施方案中,所述癌症是实体瘤。在实施方案中,所述癌症是难治的。

[0046] 本公开文本进一步提供了一种用于疗法的组合物,所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP)、D-甘油-β-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP)、L-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP),及其前药、类似物和衍生物;或所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物。

[0047] 本公开文本还提供了一种组合物,其用于调节需要这种治疗的受试者的免疫应答的方法,所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP),D-甘油-β-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP),L-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP),及其前药、类似物和衍生物;或所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物。

[0048] 本公开文本还提供了一种组合物,其用于治疗需要这种治疗的受试者的癌症的方法,所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP),D-甘油-β-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP),L-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP),及其前药、类似物和衍生物;或所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物。

[0049] 本公开文本还提供了一种组合物,其用于增强需要这种治疗的受试者的免疫应答的方法,所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP),D-甘油-β-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP),L-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP),及其前药、类似物和衍生物;或所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物。

[0050] 本公开文本还提供了一种组合物,其用于治疗可通过激活需要这种治疗的受试者的细胞中的NFκB、p38、和JNK细胞信号传导通路的治疗而改善的疾病或障碍的方法,所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP),D-甘油-β-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP),L-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP),及其前药、类似物和衍生物;或所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物。

[0051] 本公开文本还提供了一种用于治疗或预防有需要的受试者的由选自细菌、病毒、或寄生虫的感染原引起的疾病或障碍的组合物,所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1

激动剂选自D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(HBP),D-甘油-β-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP),L-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP-6L)和D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP),及其前药、类似物和衍生物;或所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物。

[0052] 本公开文本还提供了一种组合物,其用于治疗需要这种治疗的受试者的癌症的方法,所述组合物包含ALPK1激动剂,所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L、H1b-ADP、或选自根据权利要求1至22中任一项所述的化合物和表1的化合物1-33中的任何一种的其衍生物,并且所述方法包括所述ALPK1激动剂与免疫调节剂的组合疗法,所述免疫调节剂选自免疫检查点调节因子的抑制剂或拮抗剂、免疫刺激分子、和免疫共刺激分子的激动剂中的一种或多种。

[0053] 本公开文本还提供了一种组合物,其用于治疗需要这种治疗的受试者的肝脏疾病或障碍的方法,所述组合物包含低剂量的H1b-ADP或其衍生物,其中所述肝脏疾病或障碍任选地选自肝癌、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、和由所述丙型肝炎病毒(HCV)或所述乙型肝炎病毒(HBV)的感染引起的疾病或障碍。

[0054] 本公开文本还提供了一种组合物,其用于治疗癌症的方法,所述组合物包含产生H1b-ADP或H1b-ADP-6L的细菌,其中所述组合物任选地适于瘤内注射。

#### 附图说明

[0055] 图1A-B:ALPK1同种型1(A)和同种型2(B)的蛋白质序列。

[0056] 图2A-B:IL-8(A)和TNFα(B)mRNA表达均通过HBP(化学合成)以ALPK1依赖性方式增加。

[0057] 图3A-B:IL-8(A)和TNFα(B)mRNA表达均通过HMP-1bP(化学合成)以ALPK1依赖性方式增加。

[0058] 图4A-B:IL-8(A)和TNFα(B)mRNA表达均通过H1b-ADP(化学合成)以ALPK1依赖性方式增加。

[0059] 图5A-B:HBP、HMP-1bP、和H1b-ADP均诱导IL-8(A)和TNFα(B)mRNA表达。

[0060] 图6:显示在化学合成的HBP、HMP-1bP、和H1b-ADP的存在下与ALPK1的结合的热位移测定(仅H1b-ADP结合)。

[0061] 图7:显示在化学合成的HBP、HMP-1bP、和H1b-ADP的存在下ALPK1底物TIFA的磷酸化的无细胞激酶测定(TIFA仅在H1b-ADP的存在下被磷酸化)。

[0062] 图8:在H1b-ADP(化学合成)的存在下ALPK1的自磷酸化的无细胞激酶测定。

[0063] 图9:在H1b-ADP(化学合成)的存在下IκB的ALPK1依赖性磷酸化的无细胞激酶测定。

[0064] 图10:显示在化学合成的H1b-ADP和H1b-ADP-6L的存在下ALPK1底物TIFA的磷酸化的无细胞激酶测定。

[0065] 图11:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP而不是HMP-1bP抑制肿瘤生长。

[0066] 图12:瘤内注射H1b-ADP导致细胞因子和PD-1、PD-L1的表达增加。

- [0067] 图13A-B:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP和抗PD-1抗体(RMP1-14)协同抑制被注射的肿瘤(A)和远处肿瘤(B)的肿瘤生长。
- [0068] 图14:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP和抗PD-1抗体(OX40)协同抑制肿瘤生长。
- [0069] 图15:在HBP+从HIde突变体大肠杆菌纯化的HIde(左)或HBP+从野生型大肠杆菌纯化的HIde(右)的存在下ALPK1依赖性TIFA磷酸化的体外激酶反应后磷酸-TIFA的蛋白质印迹分析。
- [0070] 图16A-B:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP和抗PD-L1抗体协同抑制被注射的肿瘤(A)和远处肿瘤(B)的肿瘤生长。
- [0071] 图17A-B:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP和IFN- $\alpha$ 协同抑制被注射的肿瘤(A)和远处肿瘤(B)的肿瘤生长。
- [0072] 图18:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP和抗CTLA-4抗体协同抑制肿瘤生长。成对的p值通过T检验确定并且通过右侧的条示出,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。
- [0073] 图19:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP和STING激动剂c-di-AM(PS)2协同抑制肿瘤生长。成对的p值通过T检验确定并且通过右侧的条示出,\* $p < 0.05$ ,\*\* $p < 0.01$ ,\*\*\* $p < 0.001$ 。
- [0074] 图20:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP和抗CD4抗体协同抑制肿瘤生长。
- [0075] 图21:在小鼠CT26异种移植模型中,瘤内注射H1b-ADP和TLR激动剂雷西莫特协同抑制肿瘤生长。
- [0076] 图22:胎牛血清、人血清和小鼠血清在诱导HEK293细胞中的IL8分泌中降低H1b-ADP的活性。
- [0077] 图23:Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>保护H1b-ADP免受由胎牛血清导致的降解。
- [0078] 图24:Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>保护H1b-ADP免受由胎牛血清导致的降解并且保留其诱导HEK293细胞中的IL8分泌的活性。
- [0079] 图25:AMP保护H1b-ADP免受由胎牛血清导致的降解并且保留其诱导HEK293细胞中的IL8分泌的活性。
- [0080] 图26:式I的化合物(1、2、9-12)通过激活ALPK1来激活HEK293细胞中的IL8分泌。在无FBS的情况下培养HEK293细胞。
- [0081] 图27A-B:在无FBS(A)的情况下以及在10%FBS(B)细胞的情况下,式I的化合物(3、15、19、20)通过激活ALPK1来激活HEK293中的IL8分泌。化合物15抵抗FBS降解。
- [0082] 图28A-B:在无FBS(A)的情况下以及在10%FBS(B)的情况下,式I的化合物(5、13、14、17、21、22)激活ALPK1,如通过HEK293细胞中的IL8分泌增加所证明。
- [0083] 图29A-B:在无FBS(A)的情况下以及在10%FBS(B)的情况下,式I的化合物(16、26-32)激活ALPK1,如通过HEK293细胞中的IL8分泌增加所证明。
- [0084] 图30:在CT26同基因小鼠肿瘤模型中,式I的化合物(1、2)抑制肿瘤生长。
- [0085] 图31:非常低浓度的H1b-ADP可以激活骨髓来源的小鼠巨噬细胞。
- [0086] 图32A-B:化合物1以低至2nmol(1.2 $\mu$ g)的剂量激活肝组织(A)中的炎症反应以及

以200nmol的剂量激活肺组织(B)中的炎性反应。

[0087] 图33:细菌H1b-ADP-生物合成途径的示意图。

### 具体实施方式

[0088] 本公开文本提供了组合物和方法,所述组合物和方法涉及用合适的激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体治疗性地激活ALPK1。

[0089] 定义

[0090] 如本文所用,术语“ALPK1”可以指人ALPK1基因的两个剪接变体同种型1或同种型2之一。各同种型共享相同的激酶结构域。对于参考,人ALPK1基因由Entrez基因ID 80216鉴定。

[0091] 如本文所用,术语“ALPK1的激活”是指ALPK1激酶活性的激活。在实施方案中,本公开文本提供了通过提供ALPK1激动剂激活ALPK1的方法,所述ALPK1激动剂可以是例如ALPK1激活配体,诸如HBP,或其前药、类似物或衍生物。用于制造合成HBP的方法是已知的,例如,如在Inuki S等人Organic Letter 2017 19(12):3079-82中所描述。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自HMP-1bP和H1b-ADP及其前药、类似物或衍生物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP,或其前药、类似物或衍生物。在一些实施方案中,本公开文本提供了通过提供由式I、IA、IB、或IC表示的ALPK1激动剂激活ALPK1的方法。

[0092] 如本文所用,术语“烷基”是指具有所指示数目的碳原子的直链或支链的饱和脂族基团。烷基可以包含任何数目的碳,诸如C1-2、C1-3、C1-4、C1-5、C1-6、C1-7、C1-8、C1-9、C1-10、C2-3、C2-4、C2-5、C2-6、C3-4、C3-5、C3-6、C4-5、C4-6和C5-6。例如,C1-6烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、异戊基、己基等。烷基也可以指具有最多20个碳原子的烷基,诸如但不限于庚基、辛基、壬基、癸基等。烷基可以是经取代或未经取代的。在一些实施方案中,烷基是被1-2个取代基取代的。作为非限制性例子,合适的取代基包括卤素和羟基。

[0093] 如本文所用,“烯基”是指具有至少2个碳原子和至少一个双键的直链或支链烃。烯基可以包含任何数目的碳,诸如C<sub>2</sub>、C<sub>2-3</sub>、C<sub>2-4</sub>、C<sub>2-5</sub>、C<sub>2-6</sub>、C<sub>2-7</sub>、C<sub>2-8</sub>、C<sub>2-9</sub>、C<sub>2-10</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>3-4</sub>、C<sub>3-5</sub>、C<sub>3-6</sub>、C<sub>4</sub>、C<sub>4-5</sub>、C<sub>4-6</sub>、C<sub>5</sub>、C<sub>5-6</sub>、和C<sub>6</sub>。烯基可以具有任何合适数目的双键,包括但不限于1、2、3、4、5或更多个。烯基可以是经取代或未经取代的。

[0094] 如本文所用,术语“亚烷基”是指具有所指示数目的碳原子并且连接至少两个其他基团的直链或支链的饱和脂族基团,即二价烃基。与亚烷基连接的两个部分可以连接至亚烷基的相同原子或不同原子。例如,直链亚烷基可以是-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-的二价基团,其中n是1、2、3、4、5或6。代表性亚烷基包括但不限于亚甲基、亚乙基、亚丙基、异亚丙基、亚丁基、异亚丁基、仲亚丁基、亚戊基和亚己基。亚烷基可以是经取代或未经取代的。在一些实施方案中,亚烷基是被1-2个取代基取代的。作为非限制性例子,合适的取代基包括卤素和羟基。

[0095] 如本文所用,术语“烷氧基(alkoxy或alkoxy1)”是指具有氧原子的烷基,所述氧原子将所述烷基连接至附接点:烷基-O-。至于烷基,烷氧基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C1-6。烷氧基包括例如甲氧基、乙氧基、丙氧基、异丙氧基、丁氧基、2-丁氧基、异丁氧基、仲丁氧基、叔丁氧基、戊氧基、己氧基等。烷氧基可以是经取代或未经取代的。

[0096] 如本文所用,术语“烯氧基(alkenyloxy或alkenyloxy1)”是指具有氧原子的如上所定义的烯基,所述氧原子将烯基连接至附接点:烯基-0-。烯氧基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C1-6。烯氧基可以进一步被其中描述的各种取代基取代。烯氧基可以是经取代或未经取代的。

[0097] 如本文所用,术语“烷基胺”或“烷基氨基”是指具有氮原子的烷基,所述氮原子将所述烷基连接至附接点:烷基-N-。至于烷基,烷基胺可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C1-6。

[0098] 如本文所用,术语“卤素”是指氟、氯、溴和碘。

[0099] 如本文所用,术语“卤代烷基”是指其中一些或全部氢原子被卤素原子替代的如上所定义的烷基。至于烷基,卤代烷基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C1-6。例如,卤代烷基包括三氟甲基、氟甲基等。

[0100] 如本文所用,术语“卤代烷氧基(haloalkoxy1或haloalkoxy)”是指其中一些或全部氢原子被卤素原子取代的如上所定义的烷氧基。至于烷基,卤代烷氧基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C1-6。烷氧基可以被1、2、3或更多个卤素取代。

[0101] 如本文所用,术语“烷酰基”是指具有羰基的烷基,所述羰基将烷基连接至附接点:烷基-C(O)-。至于烷基,烷酰基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C1-4。例如,烷酰基包括乙酰基、丙酰基、丁酰基等。

[0102] 如本文所用,术语“烷酰氧基”是指具有氧原子的烷酰基,所述氧原子将烷酰基连接至附接点:烷基-C(O)-0-。至于烷基,烷酰氧基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C1-4。示例性烷酰氧基包括乙酰氧基、丙酰氧基、丁酰氧基等。

[0103] 如本文所用,术语“氧代”是指通过双键(=O)连接至附接点的氧原子。

[0104] 如本文所用,术语“芳基”是指具有任何合适数目的环原子和任何合适数目的环的芳族环系。芳基可以包含任何合适数目的环原子,诸如6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个环原子以及从6至10、6至12、或6至14个环成员。芳基可以是单环的,稠合以形成双环或三环基团,或通过键连接以形成联芳基。代表性芳基包括苯基、萘基和联苯基。其他芳基包括具有亚甲基连接基团的苜基。一些芳基具有从6至12个环成员,诸如苯基、萘基或联苯基。其他芳基具有从6至10个环成员,诸如苯基或萘基。一些其他的芳基具有6个环成员,诸如苯基。芳基可以是经取代或未经取代的。在一些实施方案中,芳基是被1-2个取代基取代的。作为非限制性例子,合适的取代基包括卤素、羟基、-NO<sub>2</sub>、C1-8烷基、C1-8烷氧基。

[0105] 如本文所用,术语“芳烷氧基”是指具有烷基和氧原子的如上所定义的芳基,所述氧原子将芳基连接至附接点:芳基-烷基-0-。至于烷基,芳烷氧基可以具有任何合适数目的碳原子,诸如C1-4。

[0106] 如本文所用,术语“杂芳基”是指单环或稠合双环芳族环组件,其含有5至12个环原子,其中从1至5个环原子是杂原子,诸如N、O或S。其他杂原子也可以是有用的,包括但不限于B、Al、Si和P。杂原子也可以被氧化,诸如但不限于-S(O)-和-S(O)<sub>2</sub>-。杂芳基可以包括任何数目的环原子,诸如3至6、4至6、5至6、3至8、4至8、5至8、6至8、3至9、3至10、3至11、或3至12个环成员。杂芳基中可以包含任何合适数目的杂原子,诸如1、2、3、4、或5、或1至2、1至3、1至4、1至5、2至3、2至4、2至5、3至4、或3至5。杂芳基可以具有从5至9个环成员和从1至4个杂原子、或从5至9个环成员和从1至3个杂原子、或从5至6个环成员和从1至4个杂原子、或从5

至6个环成员和从1至3个杂原子。杂芳基可以包括诸如吡咯、吡啶、咪唑、吡唑、三唑、四唑、吡嗪、嘧啶、哒嗪、三嗪(1,2,3-、1,2,4-和1,3,5-异构体)、嘌呤。杂芳基也可以稠合至芳族环系,诸如苯基环,以形成包括但不限于以下的成员:苯并吡咯,诸如吲哚和异吲哚;苯并吡啶,诸如喹啉和异喹啉、苯并吡嗪(喹喔啉)、苯并嘧啶(喹唑啉);苯并哒嗪,诸如酞嗪和噌啉;苯并噻吩;和苯并呋喃。其他杂芳基包括通过键连接的杂芳基环,诸如联吡啶。杂芳基可以是经取代或未经取代的。

[0107] 如本文所用,“环烷基”是指含有从3至8个环原子或所指示数目的原子的饱和环组件。环烷基可以包含任何数目的碳,诸如C<sub>3-6</sub>、C<sub>4-6</sub>、C<sub>5-6</sub>、C<sub>3-8</sub>、C<sub>4-8</sub>、C<sub>5-8</sub>、C<sub>6-8</sub>。环烷基环包括例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、和环辛基。环烷基可以是经取代或未经取代的。

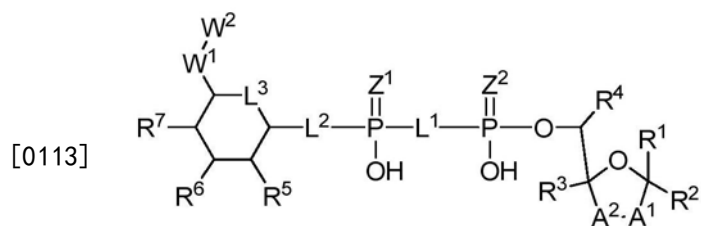
[0108] 如本文所用,“环杂烷基”是指具有从3至12个环成员和从1至4个N、O和S的杂原子的饱和环系。其他杂原子也可以是有用的,包括但不限于B、Al、Si和P。杂原子也可以被氧化,诸如但不限于-S(O)-和-S(O)<sub>2</sub>。杂环烷基可以包括任何数目的环原子,诸如3至6、4至6、5至6、3至8、4至8、5至8、6至8、3至9、3至10、3至11、或3至12个环成员。杂环烷基中可以包含任何合适数目的杂原子,诸如1、2、3、或4,或1至2、1至3、1至4、2至3、2至4、或3至4个。杂环烷基可以包括诸如以下的基团:氮杂环丙烷、氮杂环丁烷、吡咯烷、哌啶、氮杂环庚烷、氮杂环辛烷、奎宁环、吡唑烷、咪唑烷、哌嗪(1,2-、1,3-和1,4-异构体)、环氧乙烷、四氢呋喃、噁烷(四氢吡喃)、氧杂环庚烷、硫杂环戊烷(四氢噻吩)、硫杂环己烷(四氢噻喃)、噁唑烷、异噁唑烷、噻唑烷、异噻唑烷、二氧戊环、二硫杂环戊烷、吗啉等。杂环烷基可以是未经取代的或经取代的。例如,杂环烷基尤其可以被C<sub>1-6</sub>烷基或氧代(=O)取代。

[0109] 本发明的某些化合物具有不对称碳原子(光学中心)或双键;外消旋体、非对映异构体、几何异构体、区域异构体和单独的异构体(例如,单独的对映异构体)均旨在涵盖在本发明的范围内。在一些实施方案中,本发明的化合物是基本上不含其他形式的特定对映异构体、异头物、或非对映异构体。

[0110] 如本文所用,术语“基本上不含”是指10%或更少量的另一种形式,优选8%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、或更少量的另一种形式。在一些实施方案中,异构体是立体异构体。

[0111] 实施方案的详细描述

[0112] 在一些实施方案中,本公开文本提供了一种由式(I)表示的ALPK1激动剂



(I)

[0114] 和/或其立体异构体、互变异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐,其中:

[0115] A<sup>1</sup>和A<sup>2</sup>独立地选自O、S和-C(R<sup>8</sup>R<sup>9</sup>)-,其中R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>独立地选自H、D、-OH、N<sub>3</sub>、-CN、卤素、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>卤代烷基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>卤代烷氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷酰氧基、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烯氧基和经取代或未经取代的芳烷氧基,其中任选的取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、

C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基； $A^1$ 或 $A^2$ 中的至少一个是 $-C(R^8R^9)$ ；其中 $A^1$ 中的 $R^8$ 或 $R^9$ 可以与 $A^2$ 中的 $R^8$ 或 $R^9$ 环化以形成C3-C6环烷基和含有3至9个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基，各自任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基取代；

[0116]  $L^1$ 和 $L^2$ 独立地选自O、CH<sub>2</sub>、CHF和CF<sub>2</sub>；

[0117]  $L^3$ 是O、S、CH<sub>2</sub>或CH(OH)；

[0118]  $Z^1$ 和 $Z^2$ 独立地选自O和S；

[0119]  $W^1$ 是 $-C(R^{10}R^{11})-$ ，其中 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 独立地选自H、D、-OH、卤素、和选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4-卤代烷氧基、C1-C4烯氧基、芳烷氧基和 $R^{12}CO_2-$ 的任选经取代的基团，其中 $R^{12}$ 选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烯氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基；其中 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 的任选取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基；

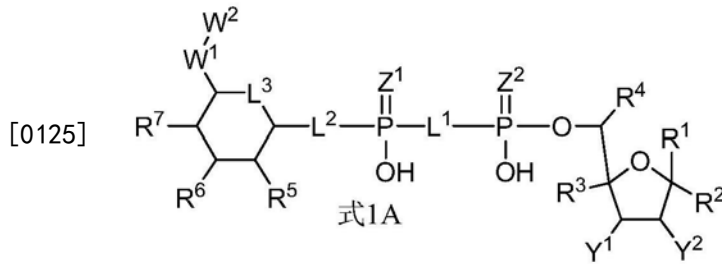
[0120]  $W^2$ 是H或任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C3烷氧基、C1-C3卤代烷基、C1-C3卤代烷氧基、C1-C3烯氧基和 $R^{12}CO_2-$ 的取代基取代的C1-C3烷基，其中 $R^{12}$ 是C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基；

[0121]  $R^1$ 是含有5至10个环原子并且具有1-4个选自N、O和S的杂原子作为环成员的C6-C10芳基或杂芳基，其中 $R^1$ 任选地被1-3个选自D、卤素、-OH、=O、CN、NH<sub>2</sub>、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷基胺、C1-C4二烷基胺和 $(R^{13}R^{14})NCO-$ 的取代基取代，其中 $R^{13}$ 和 $R^{14}$ 独立地选自H、C1-C4烷基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基；

[0122]  $R^2$ 、 $R^3$ 和 $R^4$ 独立地选自H、D、卤素、C1-C4烷基和C1-C4卤代烷基；

[0123]  $R^5$ 、 $R^6$ 和 $R^7$ 选自H、D、卤素和-OH、 $R^{12}CO_2-$ ，其中 $R^{12}$ 选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烯氧基、C1-C4烷基氨基、C3-C6环烷基、含有3至6个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基、C6-C10芳基、和含有5至10个环原子并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的杂芳基；其中 $R^5$ 、 $R^6$ 和 $R^7$ 的相邻基团中的任意两个可以环化以形成含有5至9个环成员并且具有1-3个选自N、O和S的杂原子作为环成员的环杂烷基，各自任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基取代。

[0124] 在一些实施方案中，式I的化合物由式IA的化合物和/或其立体异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐表示



[0126] 其中：

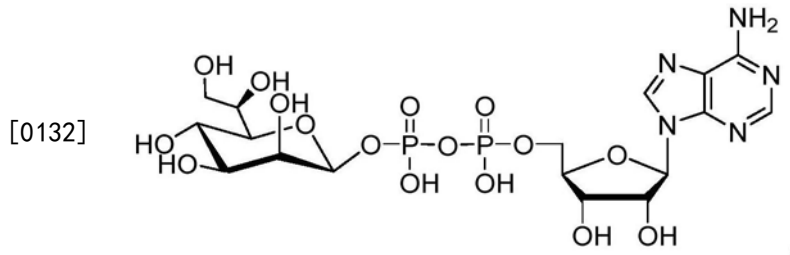
[0127] Y<sup>1</sup>和Y<sup>2</sup>独立地选自H、D、-OH、N<sub>3</sub>、-CN、卤素和选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烯氧基和芳烷氧基的任选经取代的基团；其中任选的取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基；并且

[0128] R<sup>1</sup>-R<sup>7</sup>、L<sup>1</sup>-L<sup>3</sup>、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、W<sup>1</sup>和W<sup>2</sup>是上面定义的。

[0129] 在一些实施方案中，式IA的化合物中的Y<sup>1</sup>和Y<sup>2</sup>独立地选自H、D、-OH、卤素、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、和C1-C4烯氧基；并且R<sup>1</sup>-R<sup>7</sup>、L<sup>1</sup>-L<sup>3</sup>、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、W<sup>1</sup>和W<sup>2</sup>是如上所定义的。

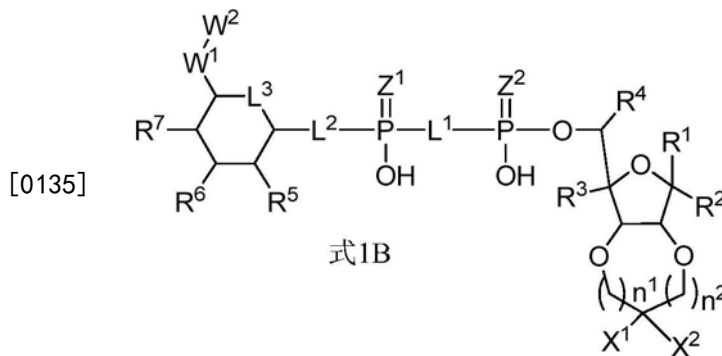
[0130] 在一些实施方案中，式IA的化合物中的Y<sup>1</sup>和Y<sup>2</sup>独立地选自-OH、卤素、C1-C4烷基、和C1-C4烷酰氧基；并且R<sup>1</sup>-R<sup>7</sup>、L<sup>1</sup>-L<sup>3</sup>、Z<sup>1</sup>、Z<sup>2</sup>、W<sup>1</sup>和W<sup>2</sup>是上面定义的。

[0131] 在一些实施方案中，式I或式IA的化合物不包括下面示出的化合物D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP（在本文中也称为H1b-ADP或H1b-D-ADP）：



[0133] 或其非对映异构体L-甘油-D-甘露-庚糖-11ββ-ADP（在本文中也称为H1b-ADP-6L或H1b-L-ADP）。

[0134] 在一些实施方案中，式I的化合物由式IB的化合物和/或其立体异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐表示



[0136] 其中：

[0137] n<sup>1</sup>和n<sup>2</sup>各自是独立地选自0-2的整数；

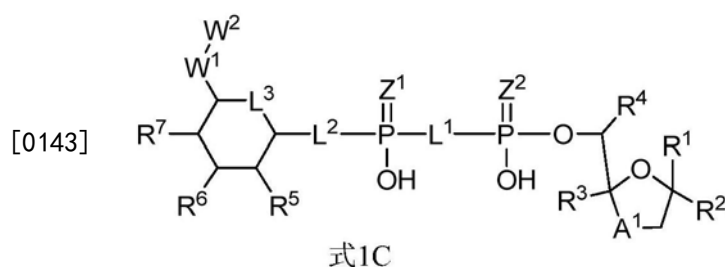
[0138]  $X^1$ 和 $X^2$ 独立地选自H、D、-OH、 $N_3$ 、-CN、卤素和选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烯氧基和芳烷氧基的任选经取代的基团，其中任选的取代基是1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C4烷基和C1-C4烷氧基的取代基；并且

[0139]  $R^1$ - $R^7$ 、 $L^1$ - $L^3$ 、 $Z^1$ 、 $Z^2$ 、 $W^1$ 和 $W^2$ 是上面定义的。

[0140] 在一些实施方案中，式IB的 $n^1$ 和 $n^2$ 各自是0。

[0141] 在一些实施方案中，式IB的 $X^1$ 和 $X^2$ 独立地选自H、D、C1-C4烷氧基和C1-C4烷基；并且 $R^1$ - $R^7$ 、 $L^1$ - $L^3$ 、 $Z^1$ 、 $Z^2$ 、 $W^1$ 和 $W^2$ 是上面定义的。

[0142] 在一些实施方案中，式I的化合物由式IC的化合物和/或其立体异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐表示



[0144] 其中：

[0145]  $A^1$ 是-C( $R^{10}R^{11}$ )-、O或S；

[0146]  $R^1$ - $R^9$ 、 $L^1$ - $L^3$ 、 $Z^1$ 、 $Z^2$ 、 $W^1$ 和 $W^2$ 是上面定义的。

[0147] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $R^2$ 、 $R^3$ 、和 $R^4$ 各自是H。

[0148] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $R^5$ 、 $R^6$ 、和 $R^7$ 各自独立地选自-OH、和C1-C4烷酰氧基-。

[0149] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $L^3$ 是O。

[0150] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $L^2$ 是O。

[0151] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $L^1$ 是O或S。

[0152] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $W^1$ 是-C( $R^{10}R^{11}$ )-，其中 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 独立地选自H、D、-OH、卤素、C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4卤代烷基、C1-C4-卤代烷氧基、C1-C4烷酰氧基、C1-C4烯氧基、 $R^{12}CO_2^-$ ，其中 $R^{12}$ 选自C1-C4烷基、C1-C4烷氧基、C1-C4烷酰氧基和C1-C4烯氧基。

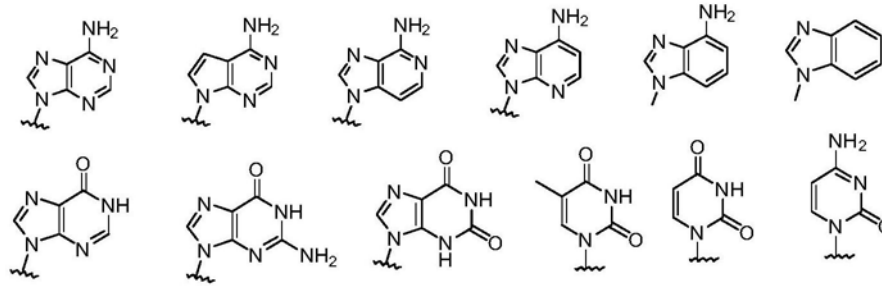
[0153] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $W^1$ 是-C( $R^{10}R^{11}$ )-，其中 $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 独立地选自H、D、-OH、卤素和C1-C4烷酰氧基。

[0154] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $W^2$ 是任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH、=O、C1-C3烷氧基、C1-C3卤代烷基、C1-C3卤代烷氧基、C1-C3烯氧基和 $R^{12}CO_2^-$ 的取代基取代的C1-C3烷基，其中 $R^{12}$ 是C1-C4烷基、C1-C4烷氧基和C1-C4烷基氨基。

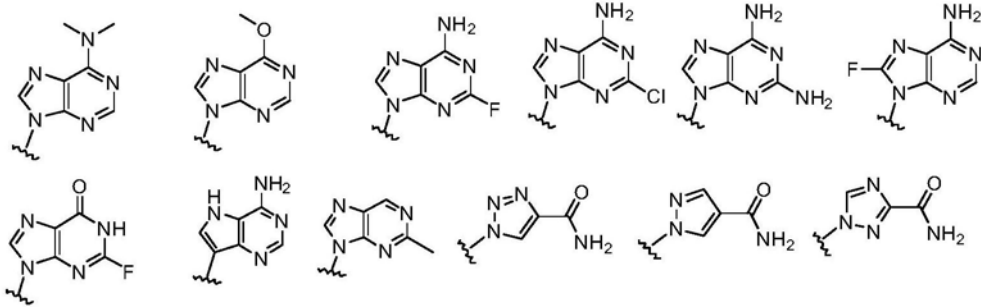
[0155] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $W^2$ 是任选地被1-3个独立地选自D、卤素、-OH和 $R^{12}CO_2^-$ 的取代基取代的C1-C3烷基，其中 $R^{12}$ 是C1-C3烷基。

[0156] 在一些实施方案中，式I、IA、IB、和IC中的 $W^2$ 是任选地被1个选自-OH和 $R^{12}CO_2^-$ 的取代基取代的C1烷基，其中 $R^{12}$ 是C1-C3烷基。

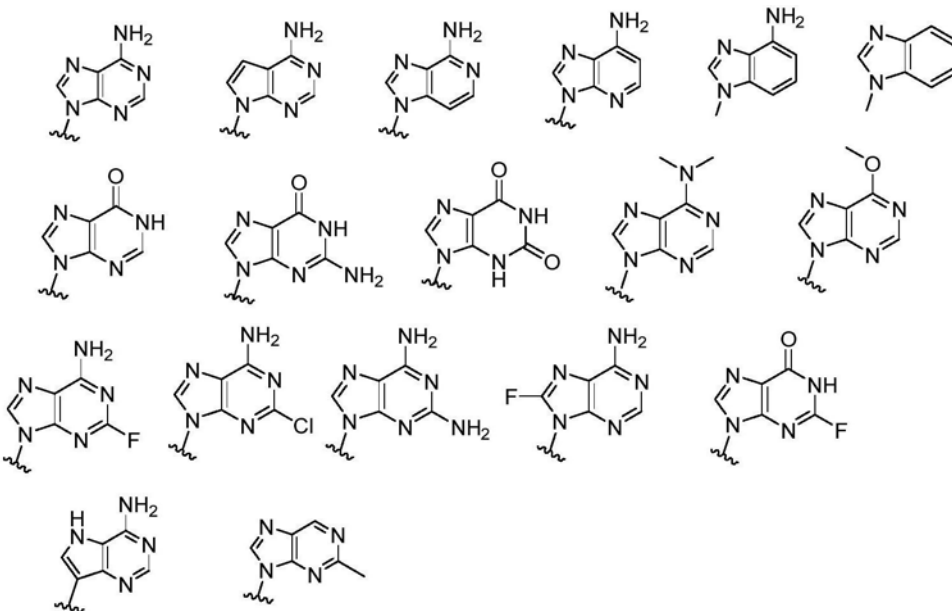
[0157] 在一些实施方案中，式I、IA、IB和IC中的 $R^1$ 是



[0158]

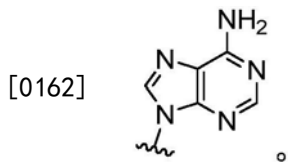


[0159] 在一些实施方案中,式I、IA、IB和IC中的R<sup>1</sup>是



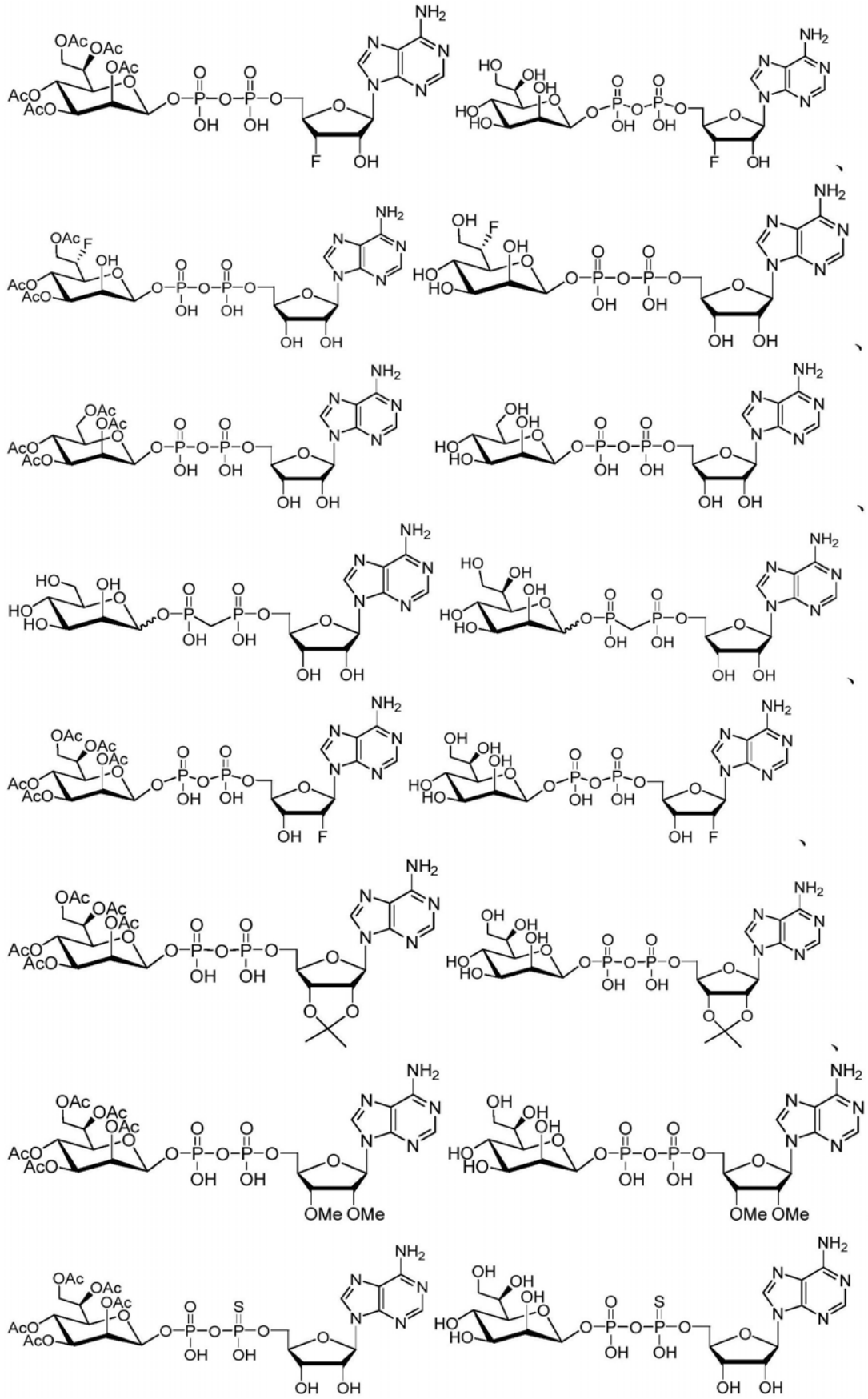
[0160]

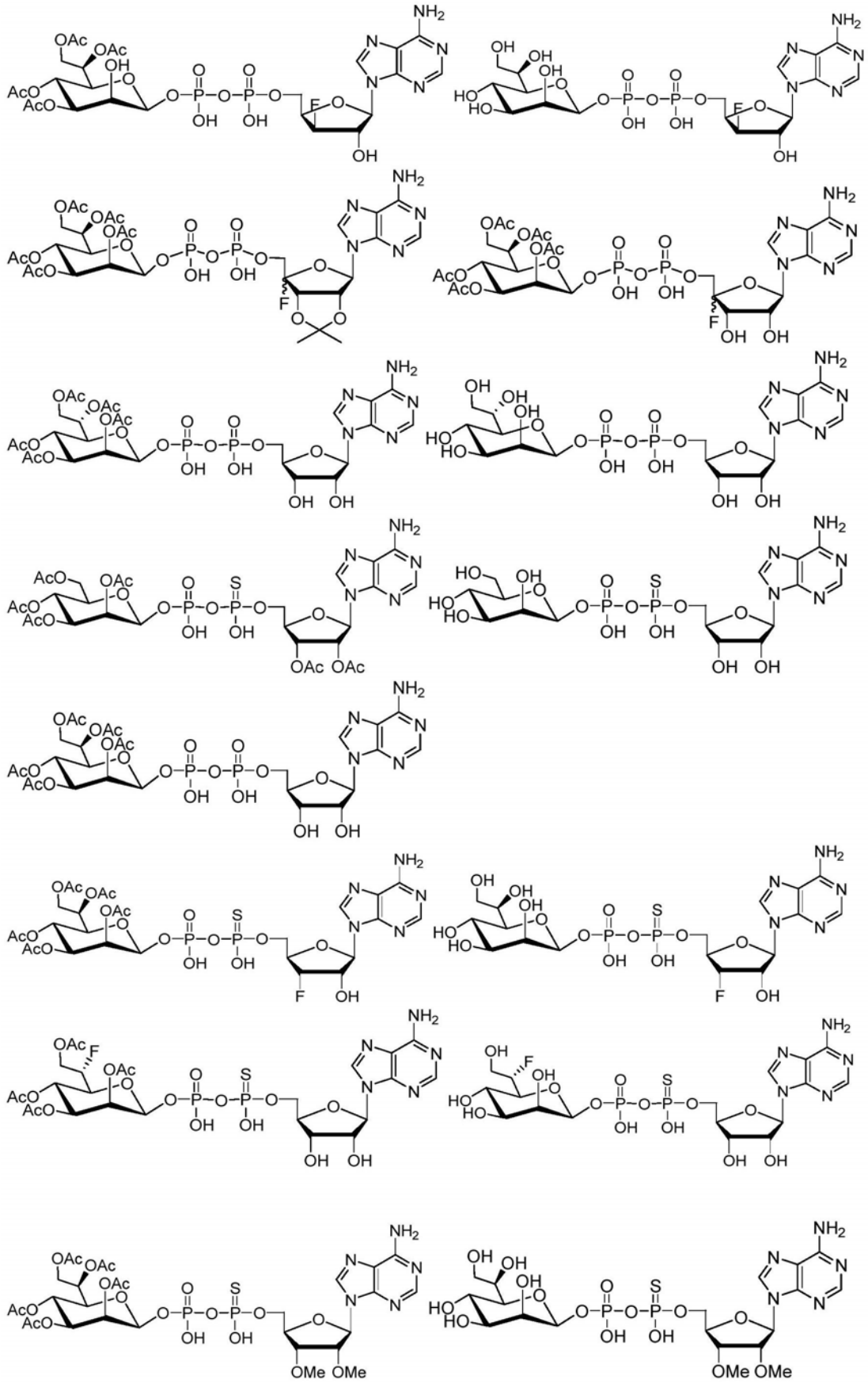
[0161] 在一些实施方案中,式I、IA、IB和IC中的R<sup>1</sup>是

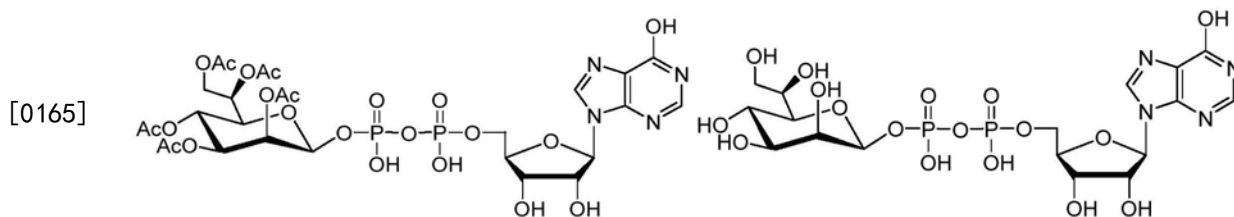


[0162]

[0163] 在一些实施方案中,式I的化合物是







[0166] 和/或其立体异构体、稳定同位素、前药或药学上可接受的盐：

[0167] 在一些实施方案中，式I的化合物是在本申请的实施例中描述的化合物。

[0168] 可以使用方案I、II、III和IV中描述的通用方法以及示例性实施方案中描述的技术来制备本公开文本的化合物。

[0169] 在实施方案中，本公开文本提供了呈有机小分子形式的ALPK1激动剂，诸如D-甘油-β-D-甘露-庚糖1,7-双磷酸(庚糖1,7双磷酸或“HBP”)，D-甘油-β-D-甘露-庚糖-1-磷酸(HMP-1bP)，D-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP)，和L-甘油-D-甘露-庚糖-1β-ADP(H1b-ADP-6L)，及其前药、类似物或衍生物；或呈生物大分子形式的ALPK1激动剂，诸如蛋白质(例如，ALPK1本身、或激活ALPK1激酶活性的ALPK1定向抗体或其Fc片段)或多核苷酸(例如，编码ALPK1的多核苷酸)。

[0170] 在实施方案中，本公开文本提供了通过给予ALPK1激动剂治疗癌症的方法，所述ALPK1激动剂选自HBP、HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP，优选HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP，并且最优选H1b-ADP-6L和H1b-ADP。在所述治疗癌症的方法的进一步实施方案中，本公开文本提供了一种组合疗法，其包括给予选自H1b-ADP-6L和H1b-ADP的ALPK1激动剂以及选自检查点抑制剂(诸如抗PD-1/PD-L1抗体)和免疫共刺激分子的激动剂(诸如抗OX40(CD134)激动剂抗体)的免疫检查点调节剂。不受任何具体理论的束缚，诸位发明人提出，H1b-ADP和类似分子(诸如H1b-ADP-6L)可以促进肿瘤浸润抗原呈递细胞(APC)的抗原呈递功能以及肿瘤特异性T细胞增殖与分化。此外，这些分子还可以通过增加肿瘤细胞中的PD-L1表达来加强肿瘤特异性CD8<sup>+</sup>T细胞向肿瘤的募集。

[0171] 在其他实施方案中，本公开文本提供了通过以重组蛋白形式或以编码ALPK1的多核苷酸的形式或以包含重组ALPK1蛋白或编码它的多核苷酸的组合物的形式将ALPK1给予受试者或者将ALPK1引入细胞(例如受试者的细胞或组织)中来激活ALPK1的方法。编码ALPK1的多核苷酸当置于适当的调控序列(例如启动子序列)的控制下时转录并且翻译成ALPK1蛋白的多核苷酸。此类多核苷酸可以包括来自原核或真核DNA的序列，或合成DNA序列，以及任何前述的组合

[0172] 优选地，所给予或引入的ALPK1是组成性活性ALPK1(或编码它的多核苷酸)。术语“组成性活性”是指其激酶活性在不存在配体的情况下具有活性的ALPK1蛋白。在实施方案中，组成性活性ALPK1在其N-末端结构域中携带激活突变，其促进不依赖配体的寡聚和激酶激活。

[0173] 编码ALPK1的多核苷酸可以呈适用于将基因转移到活细胞中的核酸载体或其他媒介物的形式。质粒是常见类型的核酸载体，其是能够独立于染色体DNA复制的染色体外DNA分子。质粒可以是单链或双链的并且通常是圆形的。其他有用的媒介物可以包括DNA或RNA微环和微载体。微环通过使用位点特异性重组从亲本质粒中缺失大多数细菌DNA来形成。所得圆形DNA分子含有待转移的所希望的基因序列(例如ALPK1序列)以及仅少量的细菌DNA。

微载体相似,除了它们包含短的整合序列。用于基因转移的这些和其他合适的非病毒DNA载体描述于例如Hardee等人,“Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy”, Genes 2017 8:65。

[0174] 用于ALPK1的基因转移的其他合适核酸载体可以包括例如病毒载体,诸如腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、和慢病毒载体。

[0175] 可以使用合适的技术将编码ALPK1的核酸载体引入靶细胞中,所述合适的技术例如病毒递送系统,直接注射(诸如使用基因枪),或非病毒递送系统,包括例如脂质体、纳米颗粒、聚合物、电穿孔、细胞挤压、声纳穿孔、光学转染、穿刺转染(impalefection)和流体动力学递送。示例性非病毒递送系统及其用途描述于例如Jones等人,“Contemporary approaches for nonviral gene therapy,”Discov.Med.2015;19:447-454。

[0176] 根据在本文描述的方法的任何实施方案,ALPK1可以以合适的配制品(包括例如呈病毒颗粒、脂质体颗粒、纳米颗粒的形式)、作为与聚合物载体的复合物(包括例如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚鸟氨酸、鱼精蛋白、精胺、亚精胺和腐胺)来给予。脂质体颗粒可以用于递送呈各种形式的ALPK1,包括DNA、RNA和质粒形式。在实施方案中,ALPK1多核苷酸可以在不存在另一种颗粒或载体的情况下作为质粒DNA来给予。

[0177] 在实施方案中,使用基因编辑技术将编码ALPK1的多核苷酸或其活性突变体插入细胞中。基因编辑技术包括基于大范围核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)和CRISPR/Cas-9的那些。

[0178] 在实施方案中,本公开文本提供了调节受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。

[0179] 在实施方案中,本公开文本提供了增强受试者对靶抗原的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。在实施方案中,靶抗原可以是感染原的抗原,诸如细菌抗原、病毒抗原、或寄生虫的抗原。在实施方案中,抗原是肿瘤抗原。根据这些实施方案中的任何一个,如本文描述的ALPK1激动剂、多核苷酸、或蛋白质可以用作用于治疗或预防由感染原引起的疾病或障碍、或用于治疗癌症、或用于治疗可用疫苗组合物治疗的另一种疾病或障碍(包括例如阿尔茨海默氏病)的疫苗组合物的佐剂。在实施方案中,抗原选自治疗阿尔茨海默氏病的淀粉样蛋白。在实施方案中,抗原选自治疗癌症的糖蛋白100(gp100)、粘蛋白1(MUC1)、和黑色素瘤相关抗原3(MAGEA3)。在实施方案中,癌症选自乳腺癌、卵巢癌、或前列腺癌。在实施方案中,癌症是HTLV-1T-嗜淋巴细胞白血病。

[0180] 在实施方案中,癌症是黑色素瘤,并且如本文描述的ALPK1激动剂、多核苷酸、或蛋白可以用作Talimogene laherparepvec(T-VEC)治疗的佐剂,或可以用于与T-VEC的组合法方案中。

[0181] 在用于治疗或预防传染病的实施方案中,如本文描述的ALPK1激动剂、多核苷酸、或蛋白质可以用作用于治疗或预防炭疽、龋齿、美洲锥虫病、登革热、白喉、埃立克体病、甲型或乙型肝炎、疱疹、季节性流感、日本脑炎、麻风病、莱姆病、疟疾、麻疹、腮腺炎、包括脑膜炎和败血病的脑膜炎球菌病、盘尾丝虫河盲症、疫咳(百日咳)、肺炎球菌病、小儿麻痹症、狂

犬病、风疹、血吸虫病、严重急性呼吸综合征 (SARS)、带状疱疹、天花、梅毒、破伤风、肺结核、兔热病、蜱传脑炎病毒、伤寒热、锥虫病、黄热病、和内脏利什曼病的疫苗组合物的佐剂。

[0182] 在用于治疗或预防传染病的实施方案中,如本文描述的ALPK1激动剂、多核苷酸、或蛋白质可以用作用于治疗或预防由以下引起的疾病或障碍的疫苗组合物的佐剂:腺病毒、乙型柯萨奇病毒、巨细胞病毒、东部马脑炎病毒、埃博拉病毒、肠病毒71、EB病毒、乙型流感嗜血杆菌(Hib)、丙型肝炎病毒(HCV)、疱疹病毒、人类免疫缺陷病毒(HIV)、人类乳头瘤病毒(HPV)、钩虫、马尔堡病毒、诺如病毒、呼吸道合胞病毒(RSV)、轮状病毒、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、化脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、水痘、西尼罗病毒、鼠疫耶尔森杆菌(*Yersinia pestis*)、和寨卡病毒的感染原的抗原。

[0183] 根据任何前述实施方案,所述方法可以包括给予疫苗组合物或佐剂,其包含以下中的任何一种:ALPK1激动剂,优选选自HBP、HMP-1bP、H1b-ADP-6L和H1b-ADP,或选自HMP-1bP、H1b-ADP-6L和H1b-ADP的ALPK1激动剂,并且最优选选自H1b-ADP-6L和H1b-ADP的ALPK1激动剂,编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体,或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体。

[0184] 在实施方案中,本公开文本提供了治疗可通过激活受试者细胞中的NFkB、p38、和JNK细胞信号传导通路的治疗而改善的疾病或障碍的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。在实施方案中,所述疾病或障碍是由细菌感染、病毒感染或寄生虫感染引起的,如下文更详细描述,并且包括例如由丙型肝炎病毒(HCV)、乙型肝炎病毒(HBV)和人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的疾病和障碍。在实施方案中,所述疾病或障碍选自肺结核、脑膜炎、肺炎、溃疡、和脓毒症。在实施方案中,所述疾病或障碍选自鼻炎、哮喘、过敏、COPD、炎症肠病、关节炎、肥胖症、辐射诱导的炎症、银屑病、特应性皮炎、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、阿尔茨海默氏病、系统性红斑狼疮(SLE)、自身免疫性甲状腺炎(格雷夫病)、多发性硬化症、强直性脊柱炎和大疱性疾病。在实施方案中,所述疾病或障碍选自光化性角化病、溃疡性结肠炎、克罗恩病、和斑秃。

[0185] 在实施方案中,本公开文本提供了治疗或预防有需要的受试者的细菌感染、病毒感染或寄生虫感染的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。

[0186] 在实施方案中,所述方法是治疗或预防细菌感染的方法。在实施方案中,所述细菌感染是由革兰氏阴性细菌或革兰氏阳性细菌引起的。在实施方案中,所述细菌是选自以下的革兰氏阴性细菌:鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、伴放线杆菌(*Aggregatobacter actinomycetemcomitans*)、杆菌状巴尔通体(*Bartonella bacilliformis*)、汉氏巴尔通体(*Bartonella henselae*)、五日热巴尔通体(*Bartonella quintana*)、双歧杆菌疏螺旋体(*Bifidobacterium Borrelia*)、百日咳博德特氏菌(*Bordetella pertussis*)、布鲁氏菌属物种(*Brucella sp*)、洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)、类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、人心杆菌(*Cardiobacterium hominis*)、胎儿弯曲杆菌

(*Campylobacter fetus*)、肺炎衣原体 (*Chlamydia pneumonia*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、艰难梭菌 (*Clostridium difficile*)、蓝藻细菌 (*Cyanobacteria*)、侵蚀艾肯菌 (*Eikenella corrodens*)、肠杆菌 (*Enterobacter*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、大肠杆菌0157、土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*)、嗜沫嗜血杆菌 (*Haemophilus aphrophilus*)、杜克雷嗜血杆菌 (*Haemophilus ducreyi*)、副流感嗜血杆菌 (*Haemophilus parainfluenzae*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、金格杆菌 (*Kingella kingae*)、肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumonia*)、军团杆菌 (*Legionella bacteria*)、嗜肺军团菌血清1型 (*Legionella pneumophila serogroup 1*)、钩端螺旋体属 (*Leptospira*)、摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*)、淋病奈瑟氏菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、粘化变形杆菌 (*Proteus myxofaciens*)、雷氏普罗威登斯菌 (*Providencia rettgeri*)、产碱普罗威登斯菌 (*Providencia alcalifaciens*)、斯氏普罗威登斯菌 (*Providencia stuartii*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、少动假单胞菌 (*Pseudomonas paucimobilis*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、食酸假单胞菌 (*Pseudomonas acidovorans*)、立克次体属 (*Rickettsiae*)、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、甲型副伤寒沙门氏菌、乙型副伤寒沙门氏菌、都柏林沙门氏菌 (*Salmonella dublin*)、亚利桑那沙门氏菌 (*Salmonella arizonae*)、猪霍乱沙门氏菌 (*Salmonella choleraesuis*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*)、福氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、鲍氏志贺氏菌 (*Shigella boydii*)、宋内志贺氏菌 (*Shigella sonnei*)、密螺旋体属 (*Treponema*)、嗜麦芽窄食单胞菌 (*Stenotrophomonas maltophilia*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*)、拟态弧菌 (*Vibrio mimicus*)、溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*)、霍氏弧菌 (*Vibrio hollisae*)、副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌 (*Vibrio vulnificus*) 和鼠疫耶尔森杆菌 (*Yersinia pestis*)。

[0187] 在实施方案中，所述细菌是选自以下的革兰氏阳性细菌：放线菌属 (*Actinomycetes*)、炭疽杆菌 (*Bacillus anthracis*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、破伤风梭菌 (*Clostridium tetani*)、白喉棒状杆菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、红斑丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、单核细胞增生利斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、麻风分枝杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、支原体属 (*Mycoplasma*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、丙酸菌属 (*Propionibacterium*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、肺炎双球菌 (*Pneumococci*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*) (MRSA)、耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*) (VRSA)、路邓葡萄球菌 (*Staphylococcus lugdunensis*)、腐生葡

葡萄球菌 (*Staphylococcus saprophyticus*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumonia*)、化脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*)、和突变链球菌 (*Streptococcus mutants*)。

[0188] 在实施方案中,所述方法是治疗或预防病毒感染的方法。在实施方案中,所述病毒感染是由病毒引起的,所述病毒选自腺相关病毒 (Adeno-associated virus)、爱知病毒 (Aichi virus)、 $\alpha$ 病毒、沙状病毒 (Arena virus)、虫媒病毒 (Arbovirus)、澳大利亚蝙蝠狂犬病病毒 (Australian bat lyssavirus)、BK多瘤病毒 (BK polyomavirus)、版纳病毒 (Banna virus)、双rna病毒 (Birnavirus)、玻那病毒 (Bornavirus)、布尼亚维拉病毒 (bunyamwera virus)、拉克罗斯布尼亚病毒 (Bunyavirus La Crosse)、北美野兔布尼亚病毒 (Bunyavirus snowshoe hare)、萼状病毒 (Valicivirus)、猴疱疹病毒 (Cercopithecine herpesvirus)、金迪普拉病毒 (Chandipura virus)、基孔肯雅病毒 (Chikungunya virus)、Cosavirus A、牛痘病毒 (Coxsackievirus)、克里米亚-刚果出血热病毒 (Crimean-Congo hemorrhagic fever virus)、登革病毒 (Dengue virus)、多里病毒 (Dhori virus)、道格比病毒 (Dugbe virus)、杜文黑基病毒 (Devenhage virus)、东部马脑炎病毒 (Eastern equine encephalitis virus)、埃博拉病毒 (Ebola virus)、艾柯病毒 (Echovirus)、脑心肌炎病毒 (Encephalomyocarditis virus)、EB病毒 (Epstein-Barr virus)、欧洲蝙蝠狂犬病毒 (European bat lyssavirus)、黄病毒 (Flavivirus)、GB病毒/庚型肝炎病毒、汉坦病毒 (Hantaan virus)、亨德拉病毒 (Hendra virus)、肝dna病毒 (hepadnavirus)、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、单纯性疱疹病毒、马痘病毒 (horsepox virus)、人腺病毒、人星状病毒、人冠状病毒、人巨细胞病毒、人肠病毒68,70、人疱疹病毒1、人疱疹病毒2、人疱疹病毒6、人疱疹病毒7、人疱疹病毒8、人类免疫缺陷病毒 (HIV)、人类乳突病毒 (HPV-6、HPV-11)、人泡沫逆转录病毒 (human spumaretrovirus)、人T-嗜淋巴细胞病毒、人环曲病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、伊斯法罕病毒 (Isfaha virus)、JC多瘤病毒、日本脑炎病毒、Junin沙状病毒、卡波济氏肉瘤 (Kaposi's sarcoma) (HHV-8)、KI多瘤病毒、昆津病毒 (Kunjin virus)、兔头蝙蝠病毒 (Lagos bat virus)、维多利亚湖马尔堡病毒 (Lake Vitoria marbugvirus)、兰加特病毒 (Langat virus)、拉沙病毒 (Lassa virus)、LMC病毒、洛兹达雷病毒 (Lordsdale virus)、跳跃病病毒 (Louping ill virus)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (Lymphocytic choriomeningitis virus)、马秋博病毒 (Machupovirus)、巴马森林病毒 (Marmath forest virus)、马雅罗病毒 (Mayaro virus)、MERS冠状病毒、麻疹病毒 (Measles virus)、门戈脑心肌炎病毒 (Mengo encephalomyocarditis virus)、梅克尔细胞多瘤病毒 (Merkel cell polyomavirus)、传染性软疣 (molluscum contagiosum)、细小病毒B19、莫科拉病毒 (Mokola virus)、腮腺炎病毒 (Mumps virus)、墨累谷脑炎病毒 (Murray valley encephalitis virus)、纽约病毒、尼帕病毒 (Nipha virus)、诺沃克病毒 (Norwalk virus)、ONN病毒 (O'nyong-hyong virus)、羊口疮病毒 (Orf virus)、奥罗普切病毒 (Oropouche virus)、正粘病毒 (Orthomyxovirus)、副流感病毒、副粘病毒 (paramyxovirus)、细小病毒、Phchinde病毒、小rna病毒 (picomavirus)、脊髓灰质炎病毒、多瘤病毒、痘病毒、庞塔托鲁白蛉热病毒 (Punta toro phlebovirus)、普马拉病毒 (Puumala virus)、鲤鱼弹状病毒 (rabdovirus)、狂犬病病毒 (Rabies virus)、呼吸道肠道病毒 (reovirus)、鼻病毒 (rhinovirus)、呼吸道合胞体病毒 (respiratory syncytial virus)、裂谷热病毒 (Rift valley fever virus)、

Rosa病毒A、罗斯河病毒 (Ross river virus)、轮状病毒A、轮状病毒B、轮状病毒C、风疹病毒 (Rubella virus)、鹭山病毒 (Sagiyama virus)、Salivirus A、白蛉热西西里病毒 (Sandfly fever sicillian virus)、札幌病毒 (Sapporo virus)、塞姆利基森林病毒 (Semliki forest virus)、汉城病毒 (Seoul virus)、猴泡沫病毒 (Simian foamy virus)、猴病毒 (Simian virus) 5、辛德毕斯病毒 (Sindbis virus)、南安普敦病毒 (Southampton virus)、圣路易斯脑炎病毒 (St. louis encephalitis virus)、蜱传波瓦森病毒 (Tick-borne powassan virus)、囊膜病毒 (togavirus)、细环病毒 (Torque virus)、托斯卡纳病毒 (Toscana virus)、尤库尼米病毒 (Uukuniemi virus)、痘苗病毒 (Vaccina virus)、水痘-带状疱疹病毒 (Varicella-zoster virus)、天花病毒 (Variola virus)、委内瑞拉马脑炎病毒 (Venezuelan equine encephalitis virus)、水泡性口腔炎病毒 (Vesicular stomatitis virus)、西方马脑炎病毒 (Western equine encephalitis virus)、UU多瘤病毒、西尼罗病毒 (West Nile virus)、雅巴猴肿瘤病毒 (Yaba monkey tumor virus)、雅巴样疾病病毒 (Yaba-like disease virus)、黄热病病毒 (Yellow fever virus)、和寨卡病毒 (Zika virus)。

[0189] 在实施方案中,所述方法是治疗或预防寄生虫感染的方法。在实施方案中,所述寄生虫感染是由选自以下的寄生虫引起的:棘阿米巴属物种 (*Acanthamoeba* spp)、美洲锥虫病 (American trypanosomiasis)、狒狒巴拉姆希阿米巴 (*Balamuthia mandrillanis*)、分歧巴贝虫 (*Babesia divergens*)、双芽巴贝虫 (*Babesia bigemina*)、马巴贝西虫 (*Babesia equi*)、微小巴贝西虫 (*Babesia microfti*)、邓肯巴贝西虫 (*Babesia duncani*)、结肠小袋袋虫 (*Balantidium coli*)、芽囊原虫属物种 (*Blastocystis* spp)、隐孢子虫属物种 (*Cryptosporidium* spp)、环孢子虫 (*Cyclospora cayetanensis*)、脆弱双核阿米巴 (*Dientamoeba fragilis*)、阔节裂头绦虫 (*Diphyllobothrium latum*)、亚马逊利什曼原虫 (*Leishmania amazonensis*)、福氏纳格里阿米巴原虫 (*Naegleria fowderi*)、恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、间日疟原虫 (*Plasmodium vivax*)、卵形疟原虫柯氏亚种 (*Plasmodium ovale curtisi*)、三日疟原虫 (*Plasmodium malariae*)、西伯氏鼻孢子虫 (*Rhinosporidium seeberi*)、牛-人肉孢子虫 (*Sarcocystis bovi-hominis*)、猪人肉孢子虫 (*Sarcocystis suis-hominis*)、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*)、阴道滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*)、和多头绦虫 (*Taenia multiceps*)。

[0190] 在实施方案中,本公开文本提供了治疗受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者给予包含ALPK1激动剂、编码ALPK1的多核苷酸或其组成性活性突变体、或ALPK1蛋白或所述蛋白的组成性活性突变体中的任何一种的组合物。在用于治疗癌症的方法的实施方案中,所述ALPK1激动剂选自HBP、HMP-1bP、H1b-ADP-6L和H1b-ADP,优选选自HMP-1bP、H1b-ADP-6L、和H1b-ADP,并且最优选是选自H1b-ADP-6L和H1b-ADP及其前药、类似物或衍生物的ALPK1激动剂。在用于治疗癌症的方法的某些实施方案中,所述ALPK1激动剂是HMP-1bP、H1b-ADP-6L或H1b-ADP或其前药、类似物或衍生物。在所述用于治疗癌症的方法的进一步实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP-6L或H1b-ADP或其前药、类似物或衍生物。在实施方案中,所述癌症选自软组织肉瘤、乳腺癌、头颈癌、黑色素瘤、宫颈癌、膀胱癌、血液系统恶性肿瘤、胶质母细胞瘤、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌、肾癌、肺癌、梅克尔细胞癌、小

肠癌、甲状腺癌、急性骨髓性白血病(AML)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、胃癌、胃肠道间质瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、肝癌、白血病、淋巴瘤、T细胞淋巴瘤。

[0191] 在本文描述的任何方法的实施方案中,所述ALPK1激动剂,优选选自H1b-ADP-6L和H1b-ADP,可以与一种或多种另外的治疗剂或免疫调节剂组合(包括例如与疫苗或疫苗佐剂组合)来给予。在实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂是免疫检查点分子的抑制剂或拮抗剂或针对免疫检查点分子的疫苗,所述免疫检查点分子包括例如程序化细胞死亡1(PD-1)受体(CD279)、PD-1(例如,PD-L1)的配体、细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)、肿瘤坏死因子受体超家族成员9(可替代地,TNFRSF9、4-1BB)和4-1BB配体、肿瘤坏死因子受体超家族成员4(可替代地,TNFRSF4、OX40)和OX40配体、糖皮质激素诱导的TNFR相关蛋白(GITR)、肿瘤坏死因子受体超家族成员7(可替代地,TNFRSF7、分化簇27、CD27)、TNFRSF25和TNF样配体1A(TL1A)、TNF受体超家族成员5(可替代地,TNFRSF5、CD40)和CD40配体、疱疹病毒进入介体(HVEM)-肿瘤坏死因子配体超家族成员14(可替代地,TNFSF14、LIGHT)-淋巴毒素 $\alpha$ (LTA)、疱疹病毒进入介体-(HVEM)-B-和T-淋巴细胞弱化因子(BTLA)-CD160(可替代地,TNFSF14)、淋巴细胞激活基因3(LAG3)、T细胞免疫球蛋白及粘蛋白结构域分子-3(TIM3)、唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素(SIGLEC)、诱导T细胞共刺激因子(ICOS)和ICOS配体、B7-H3(B7家族,可替代地CD276)、含有V-set结构域的T细胞激活抑制因子1(VTCN1,可替代地B7-H4)、含有V型免疫球蛋白结构域的T细胞激活抑制因子(VISTA)、人内源性逆转录病毒-H长末端重复关联蛋白2(HHLA2)-跨膜和免疫球蛋白结构域2(TMIGD2)、嗜乳脂蛋白、自然杀伤细胞受体2B4(可替代地,NKR2B4、CD244)和B细胞膜蛋白(CD48)、具有免疫球蛋白(Ig)和免疫受体酪氨酸基抑制基序结构域(TIGIT)的T细胞免疫受体及脊髓灰质炎病毒受体(PVR)家族成员、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)、免疫球蛋白样转录物(ILT)和白细胞免疫球蛋白样受体(LIR)、自然杀伤细胞2族蛋白成员D(NKG2D)和自然杀伤细胞2族蛋白成员A(NKG2A)、主要组织相容性复合体(MHC)I类多肽相关序列A(MICA)和MHC I类多肽相关序列B(MICB)、自然杀伤细胞受体2B4(CD244)、集落刺激因子1受体(CSF1R)、吡啶胺2,3-双加氧酶(IDO)、转化生长因子 $\beta$ (TGFB)、腺苷-外核苷酸酶三磷酸二磷酸水解酶1(CD39)-5'-核苷酸酶(CD73)、C-X-C基序趋化因子受体4(CXCR4)和C-X-C基序趋化因子配体12(CXCL12)、磷脂酰丝氨酸、信号调节蛋白 $\alpha$ (SIRPA)和整合素相关蛋白(CD47)、血管内皮生长因子(VEGF)、和神经菌毛素。

[0192] 在本文描述的任何方法的实施方案中,所述ALPK1激动剂可以与检查点抑制剂或免疫共刺激分子的激动剂(诸如抗OX40(CD134)激动剂抗体)组合来给予。在实施方案中,所述检查点抑制剂是PD-1/PD-L1抑制剂,诸如抗PD1抗体或抗PD-L1抗体,并且所述ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L和H1b-ADP及其前药、类似物或衍生物。

[0193] 在实施方案中,所述ALPK1激动剂可以与一种或多种免疫调节剂组合来给予。在实施方案中,所述免疫调节剂可以是疫苗。在实施方案中,所述疫苗是如上描述的针对感染原的疫苗。在实施方案中,所述疫苗是癌症疫苗。在实施方案中,所述癌症疫苗靶向肿瘤抗原,所述肿瘤抗原选自糖蛋白100(gp100)、粘蛋白1(MUC1)、和黑色素瘤相关抗原3(MAGEA3)。

[0194] 在实施方案中,所述一种或多种免疫调节剂可以是重组蛋白,例如粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)、白介素7(IL-7)、IL-12、IL-15、IL-18、或IL-21。

[0195] 在癌症的治疗的实施方案中,所述ALPK1激动剂可以与T细胞疗法(诸如嵌合抗原受体(CAR)T细胞疗法)组合来给予,

[0196] 在用于治疗癌症的方法的实施方案中,所述ALPK1激动剂可以与PD-1/PD-L1抑制剂或免疫共刺激分子的激动剂(诸如抗OX40(CD134)激动剂抗体)组合来给予。在实施方案中,与PD-1/PD-L1抑制剂或免疫共刺激分子的激动剂组合给予的ALPK1激动剂选自H1b-ADP-6L和H1b-ADP。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP,或其前药、类似物或衍生物。在实施方案中,所述癌症选自晚期黑色素瘤、非小细胞肺癌、肾细胞癌、膀胱癌、肝癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、非霍奇金淋巴瘤、前列腺癌、头颈癌、甲状腺癌、脑癌、急性骨髓性白血病(AML)、梅克尔细胞癌、多发性骨髓瘤、宫颈癌、和肉瘤,并且所述方法进一步包括向所述受试者给予PD-1/PD-L1抑制剂或免疫共刺激分子的激动剂。

[0197] 在用于调节免疫应答或用于治疗或预防细菌感染、病毒感染或寄生虫感染的方法的实施方案中,所述一种或多种另外的治疗剂可以是免疫调节剂,例如免疫检查点分子的抑制剂或拮抗剂。此类分子通常充当免疫系统的关键调节因子,例如作为免疫应答的共刺激因子。

[0198] 在实施方案中,本公开文本还提供了一种疫苗组合物或疫苗佐剂,其包含ALPK1激动剂。本文描述的疫苗组合物可以进一步包含一种或多种佐剂。

[0199] 在实施方案中,本公开文本还提供了一种药物组合物,其包含ALPK1激动剂。在实施方案中,所述ALPK1激动剂可以呈有机小分子的形式,诸如HBP,或呈生物大分子的形式,诸如蛋白质(例如,ALPK1本身、或激活ALPK1激酶活性的ALPK1定向抗体或其Fc片段)或多核苷酸(例如,编码ALPK1的多核苷酸),如上所讨论的。在实施方案中,所述ALPK1激动剂选自HMP-1bP和H1b-ADP及其前药、类似物或衍生物。在实施方案中,所述ALPK1激动剂是H1b-ADP,或其前药、类似物或衍生物。

[0200] 在实施方案中,本公开文本还提供了通过测量测试化合物对ALPK1自磷酸化和/或ALPK1信号传导的下游靶标的激活的作用来选择能够调节免疫应答的化合物的方法,所述方法包括在ATP的存在下以及单独地在不存在ATP的情况下使ALPK1与测试化合物接触,然后进行测定以检测ALPK1自磷酸化和/或ALPK1信号传导的一个或多个下游靶标的激活。在实施方案中,ALPK1与所述测试化合物的所述接触是在无细胞系统中或在基于细胞的系统中进行的。

[0201] 在本文描述的方法的上下文中,术语“治疗”可以指减轻或稳定与所治疗的疾病、障碍或症状相关的一种或多种症状。术语“治疗”还可以涵盖疾病、障碍或病症的管理,是指受试者从疗法中获得的有益效果,但所述疗法不导致潜在疾病、障碍或病症的治愈。在本公开文本的上下文中,术语“预防”是指预防疾病、障碍或病症的一种或多种症状的复发、发展、进展或发作。

[0202] 在其中将治疗有效量的化合物或组合物给予受试者的实施方案中,所述治疗有效量是足以实现所希望的治疗结果(例如所治疗的疾病、障碍或病症的一种或多种症状的减轻或稳定)的量或者在预防的上下文中足以实现所述疾病、障碍或病症的一种或多种症状的复发、发展、进展或发作的预防的量。

[0203] 在实施方案中,治疗有效量是与标准疗法相比实现至少等效治疗作用所需的量。标准疗法的一个例子是FDA批准的指示用于治疗相同疾病、障碍或病症的药物。

[0204] 在本文描述的任何方法的上下文中,受试者优选是人类,但可以是非人类脊椎动物。在其他实施方案中,非人类脊椎动物可以是例如狗、猫、啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、兔)、马、牛、绵羊、山羊、鸡、鸭或任何其他非人类脊椎动物。

[0205] 在实施方案中,人类受试者选自成年人类、儿科人类或老年人类,如医学从业者所理解的那些术语,例如如U.S. Food and Drug Administration所定义的。

[0206] 在实施方案中,本公开文本提供了一种包含ALPK1激动剂的组合物,或一种包含编码ALPK1的多核苷酸的组合物,或一种包含ALPK1蛋白和一种或多种赋形剂或载体、优选药学上可接受的赋形剂或载体的组合物。如在此所用,短语“药学上可接受”是指在合理的医学判断的范围内适用于与人类和动物的组织接触而无过多毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理益处/风险比相称的那些化合物、材料、组合物、载体和/或剂型。用于制备药物组合物的赋形剂通常是已知在给予人体或动物体时是安全且无毒的赋形剂。药学上可接受的赋形剂的例子包括但不限于无菌液体、水、缓冲盐水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)、油、清洁剂、悬浮剂、碳水化合物(例如,葡萄糖、乳糖、蔗糖或右旋糖酐)、抗氧化剂(例如,抗坏血酸或谷胱甘肽)、螯合剂、低分子量蛋白质、以及任何前述的合适混合物。组合物中使用的特定赋形剂将取决于各种因素,包括所配制的化合物的化学稳定性和溶解度以及预期的给予途径。

[0207] 药物组合物可以以散装或单位剂型提供。为了易于给予和剂量的均匀性,以单位剂型配制药物组合物是尤其有利的。术语“单位剂型”是指适合作为待治疗受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算与所需药物载体联合产生所希望的治疗作用的预定量的活性化合物。单位剂型可以是安瓿、小瓶、栓剂、糖衣丸、片剂、胶囊、IV袋、或气雾剂吸入器上的单个泵。

[0208] 在治疗应用中,剂量可以变化,取决于活性化合物的化学和物理特性以及受试者的临床特征(包括例如年龄、体重和副发病变)。通常,剂量应为治疗有效量。药物组合物的有效量是提供了客观可鉴定的改善的量,如临床医师或其他合格的观察者所指出的。例如,缓解障碍、疾病或病症的症状。

[0209] 药物组合物可以采取用于通过任何所希望的途径(例如肺、吸入、鼻内、口服、经颊、舌下、肠胃外、皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内、胸膜内、鞘内、透皮、透粘膜、直肠等)给予的任何合适的形式(例如,液体、气雾剂、溶液、吸入剂、雾剂、喷雾剂;或固体、粉末、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、贴剂等)。在实施方案中,药物组合物呈口服可接受的剂型形式,包括但不限于胶囊,片剂,颊形式,糖锭剂,锭剂,和呈乳液、水性混悬剂、分散体或溶液形式的口服液。胶囊可以含有赋形剂,诸如惰性填充剂和/或稀释剂,包括淀粉(例如,玉米、马铃薯或木薯淀粉)、糖、人工甜味剂、粉末状纤维素(诸如结晶和微晶纤维素)、粉、明胶、树胶等。在用于口服使用的片剂的情况下,通常使用的载体包括乳糖和玉米淀粉。还可以添加润滑剂,诸如硬脂酸镁。

[0210] 在实施方案中,药物组合物呈片剂的形式。片剂可以包含单位剂量的本文描述的化合物以及惰性稀释剂或载体,诸如糖或糖醇,例如乳糖、蔗糖、山梨糖醇或甘露糖醇。片剂可以进一步包含非糖衍生的稀释剂,诸如碳酸钠,磷酸钙,碳酸钙,或纤维素或其衍生物,诸如甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素,以及淀粉,诸如玉米淀粉。片剂可以进一步包含粘合剂和制粒剂,诸如聚乙烯吡咯烷酮、崩解剂(例如,可溶胀的交联聚合物,诸如交联

的羧甲基纤维素)、润滑剂(例如硬脂酸酯)、防腐剂(例如对羟基苯甲酸酯)、抗氧化剂(例如丁基化羟基甲苯)、缓冲剂(例如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂)、和泡腾剂(诸如柠檬酸盐/碳酸氢盐混合物)。片剂可以是包衣片剂。包衣可以是保护膜包衣(例如蜡或清漆)或设计用于控制活性化合物的释放(例如延迟释放(在摄入后的预定滞后时间后释放活性物)或在胃肠道的特定位置处释放)的包衣。后者可以例如使用肠溶膜包衣(诸如以商标名Eudragit®出售的那些)来实现。

[0211] 片剂配制品可以通过常规压缩、湿法制粒或干法制粒方法制造,并且利用药学上可接受的稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、表面改性剂(包括表面活性剂)、悬浮剂或稳定剂,包括但不限于硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、月桂基硫酸钠、微晶纤维素、羧甲基纤维素钙、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、藻酸、阿拉伯胶、黄原胶、柠檬酸钠、复合硅酸盐、碳酸钙、甘氨酸、糊精、蔗糖、山梨糖醇、磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、高岭土、甘露醇、氯化钠、滑石、干淀粉和糖粉。优选的表面改性剂包括非离子表面改性剂和阴离子表面改性剂。表面改性剂的代表性例子包括但不限于泊洛沙姆188、苯扎氯铵、硬脂酸钙、鲸蜡硬脂醇、聚西托醇(cetomacrogol)乳化蜡、脱水山梨醇酯、胶体二氧化硅、磷酸盐、十二烷基硫酸钠、硅酸铝镁、和三乙醇胺。

[0212] 在实施方案中,药物组合物呈硬或软明胶胶囊的形式。根据此配制品,本发明的化合物可以呈固体、半固体或液体形式。

[0213] 在实施方案中,药物组合物呈适用于肠胃外给予的无菌水溶液或分散体的形式。如本文所用的术语肠胃外包括皮下、皮内、静脉内、肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内、以及颅内注射或输注技术。

[0214] 在实施方案中,药物组合物呈适用于通过直接注射或通过添加至用于静脉内输注的无菌输注液中给予的无菌水溶液或分散体的形式,并且包含溶剂或分散介质,其含有水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)、其合适的混合物、或一种或多种植物油。溶液或悬浮液可以借助助溶剂或表面活性剂在水中制备。合适的表面活性剂的例子包括聚乙二醇(PEG)-脂肪酸和PEG-脂肪酸单酯和二酯、PEG甘油酯、醇-油酯交换产物、聚甘油脂肪酸、丙二醇脂肪酸酯、固醇和固醇衍生物、聚乙二醇脱水山梨醇脂肪酸酯、聚乙二醇烷基醚、糖及其衍生物、聚乙二醇烷基酚、聚氧乙烯-聚氧丙烯(POE-POP)嵌段共聚物、脱水山梨醇脂肪酸酯、离子表面活性剂、脂溶性维生素及其盐、水溶性维生素及其两亲性衍生物、氨基酸及其盐、以及有机酸及其酯和酸酐。分散体也可以例如在甘油、液体聚乙二醇及其在油中的混合物中制备。

[0215] 在实施方案中,本文描述的化合物或组合物可以作为单一疗法或辅助疗法来给予。在实施方案中,本文描述的化合物或组合物可以单独给予或与一种或多种另外的治疗剂(即,另外的API)或疗法(例如作为包括例如饮食和运动方面)的治疗方案的一部分组合来给予。在实施方案中,本文描述的方法包括给予ALPK1激动剂作为主要疗法。在其他实施方案中,ALPK1激动剂的给予是辅助疗法。在任何一种情况下,本发明的方法均考虑将ALPK1激动剂与一种或多种另外的治疗剂和/或疗法组合来给予以治疗或预防本文描述的疾病、障碍或病症。术语“一种疗法”和“多种疗法”是指可用于预防、治疗、管理或减轻疾病障碍、或病症或者其一种或多种症状的任何方法、方案和/或药剂。

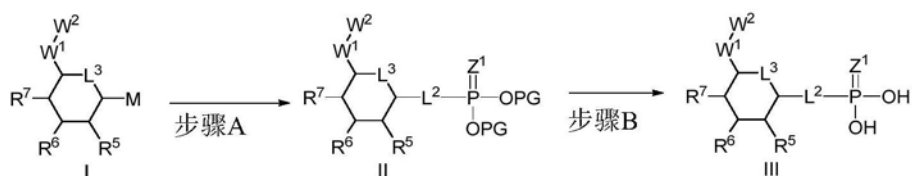
[0216] 本公开文本还提供了用于本文描述的方法的包含药物组合物的包装和试剂盒。所述试剂盒可以包含一个或多个选自瓶、小瓶、安瓿、泡罩包装和注射器的容器。所述试剂盒

可以进一步包含一个或多个使用说明书、一个或多个注射器、一个或多个施用器、或适用于重构本文描述的化合物或组合物的无菌溶液。

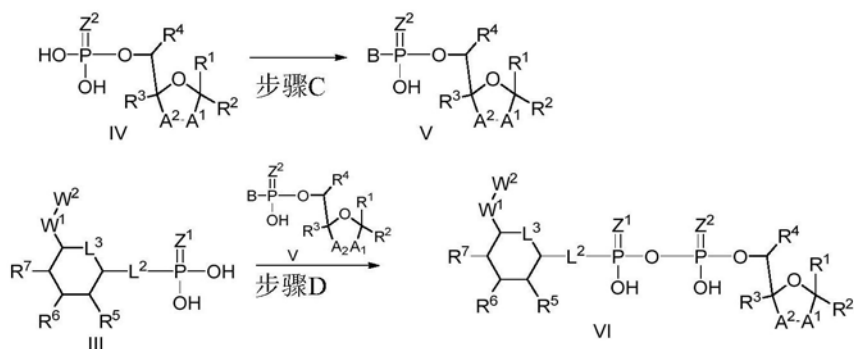
[0217] 式I的化合物和示例性化合物的制备

[0218] 其中L<sup>1</sup>是O(化合物VI)的式I的化合物可以通过如方案1所展示的通用合成方法制造。化合物II(“PG”是指保护基团)可以通过化合物I(当M是OH时)在碱性条件下与受保护的磷酸氯或在光延(Mitsunobu)反应条件下与适当的受保护的磷酸酯来获得。化合物II可以作为α异构体和β异构体的混合物获得,所述混合物可以在硅胶色谱法上分离。在1-4atm的H<sub>2</sub>下通过Pd/C或PtO<sub>2</sub>催化将化合物II的β异构体脱保护以给出化合物III。通过DCC在适当的溶液(诸如t-BuOH/H<sub>2</sub>O)中将化合物IV与吗啉或另一种合适的碱偶联以给出化合物V。在室温下在适当的溶剂(诸如吡啶)中用适当的催化剂(诸如四唑)将化合物III和化合物V偶联24-72h提供化合物VI。

[0219] 方案I

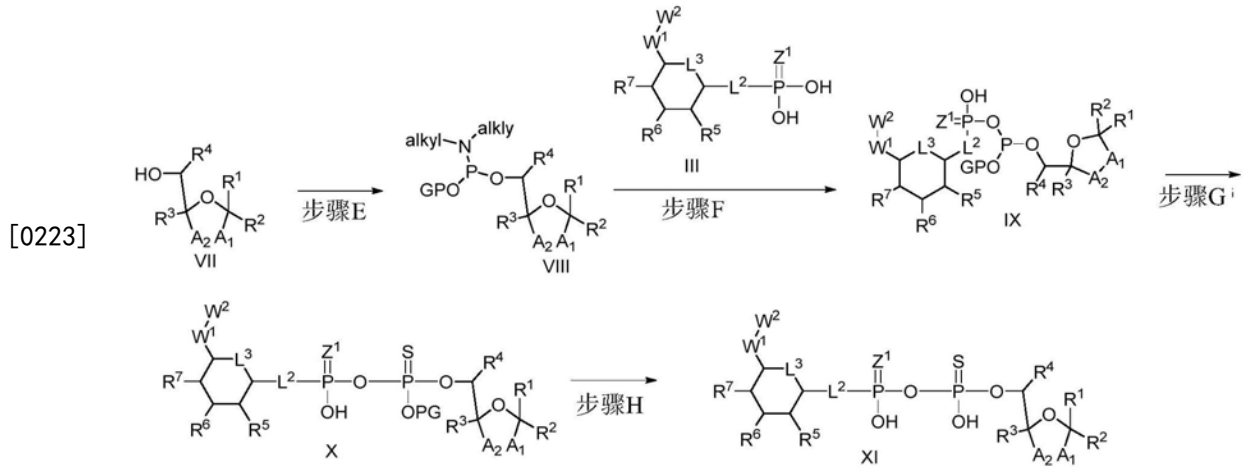


[0220]



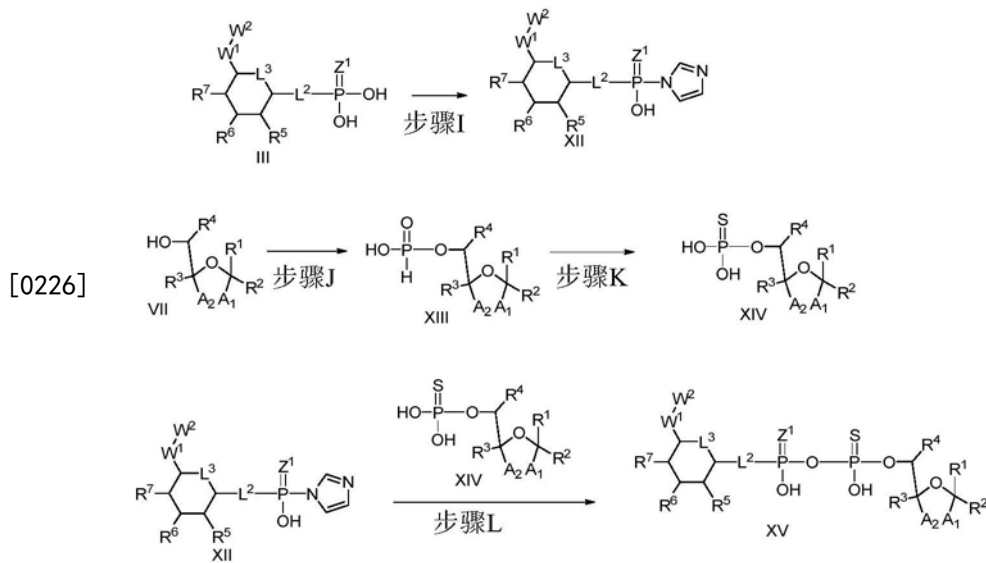
[0221] 可以如方案II所展示合成其中Z<sup>2</sup>是S(L<sup>1</sup>是O,化合物XI)的式I的化合物。可以通过在合适的溶剂(如二氯甲烷)中并且在从-10°C至25°C范围内的温度下使化合物VII与受保护的二烷基亚磷酰胺反应获得化合物VIII(“PG”是指保护基团)。可以在合适的溶剂(如DMF)中在惰性气体系统中在低于25°C的温度下完成VIII与III的偶联以给出化合物IX,将其用硫原位氧化以提供化合物X。将化合物X脱保护给出最终化合物XI。

[0222] 方案II



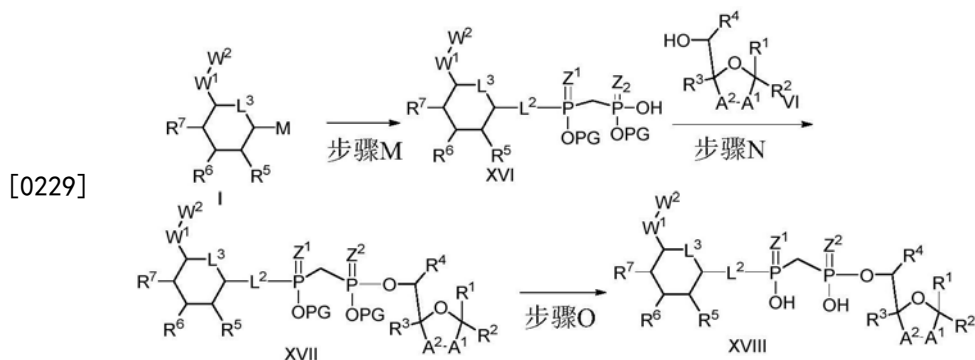
[0224] 可以通过可替代地如方案III中所展示的方法来合成其中 $Z^2$ 是S( $L^1$ 是O, 化合物XV)的式I的化合物。可以通过在 $10^\circ\text{C}$ 至 $40^\circ\text{C}$ 下在合适的溶剂(如DMF)中在惰性气体系统下形成咪唑盐将化合物III活化。将化合物VII通过与苯氧基膦酰氧基苯反应而引入磷酸酯。在 $0^\circ\text{C}$ - $10^\circ\text{C}$ 下用硫氧化后,可以获得化合物XIV。化合物XII和XIV在温和条件下(如 $0^\circ\text{C}$ - $40^\circ\text{C}$ ) 在合适的溶剂(如DMF)中在惰性气体系统中用路易斯酸的催化剂进行化合物XII与XIV的偶联提供最终化合物XV。

[0225] 方案III



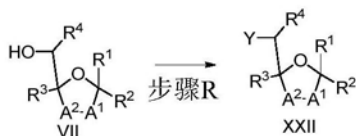
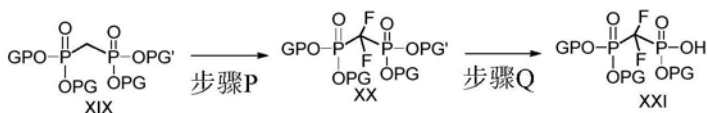
[0227] 其中 $L^1$ 是 $\text{CH}_2$ (化合物XVIII)的式I的化合物可以通过如方案IV所展示的通用合成方法制造。化合物I(当M是OH时)与受保护的二磷酸甲酯在 $30^\circ\text{C}$ - $50^\circ\text{C}$ 下进行光延反应2-4h提供化合物XVI(“PG”是指保护基团)。在类似条件下,化合物XVI经受与化合物VI的第二光延反应给出化合物XVII。化合物X的脱保护反应提供最终化合物XVIII。

[0228] 方案IV

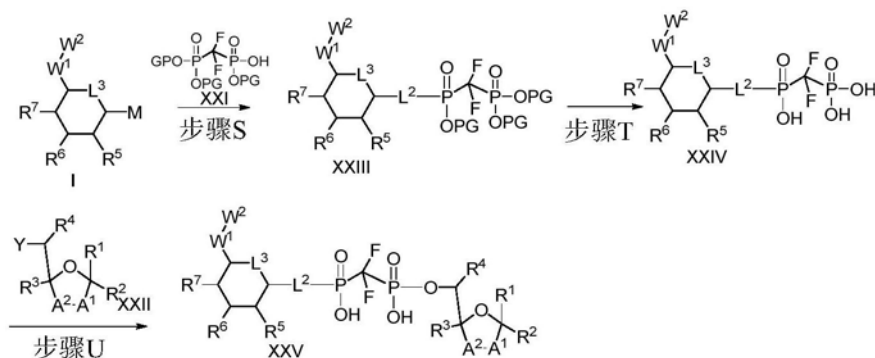


[0230] 其中L<sup>1</sup>是CF<sub>2</sub> (化合物XXV) 的式I的化合物可以通过如方案V所展示的通用合成方法制造。通过使用N-氟苯磺酰亚胺 (NFSI) 在碱性NaH条件下在合适的溶剂中从-20℃至0℃的低反应温度开始将化合物XIX (“PG”是指保护基团) 转化为受保护的二磷酸二氟甲酯化合物XX。选择性除去化合物XX中的保护基团之一产生化合物XXI。通过将羟基转化为离去基团, 诸如OT、OM或卤素, 将化合物VII转化为化合物XXII。化合物I (当M是OH时) 与化合物XXI在30℃-50℃下进行光延反应2-4h产生化合物XXIII。将化合物XXIII脱保护产生化合物XXIV。在诸如CH<sub>3</sub>CN的合适溶剂中用碱Bu<sub>4</sub>N将化合物XXIV与化合物XXII偶联产生最终化合物XXV。

[0231] 方案V



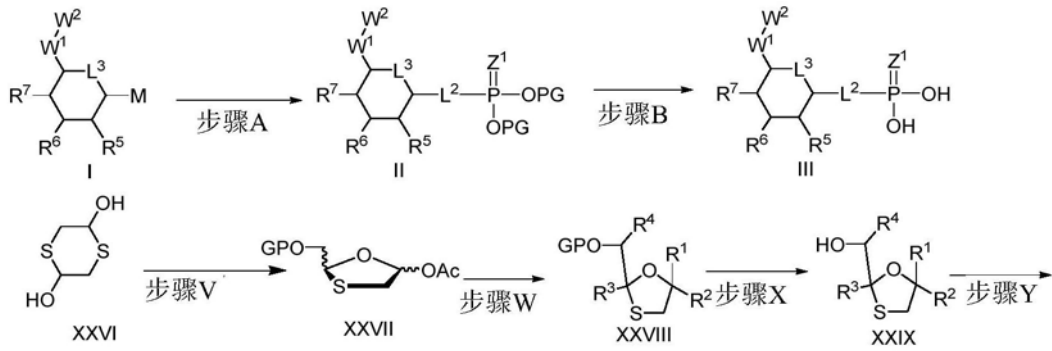
[0232]



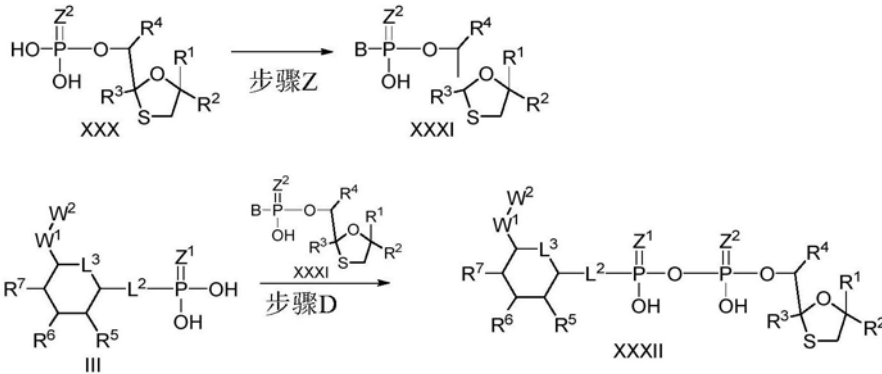
[0233] 其中A<sup>1</sup>是S (化合物XXXII) 的式IC的化合物可以通过如方案VI所展示的通用合成方法制造。化合物XXVI与类似于苯甲酸2-氧代乙酯的受保护的2-羟基乙醛在合适的溶剂中反应产生呈两种异构体的混合物的化合物XXVII (“PG”是指保护基团)。可替代地, 在有机碱 (例如, 三乙胺)、乙酸苯酯、经表面活性剂处理的枯草杆菌蛋白酶 (STS) 和Carlsberg的存在下在合适的溶剂 (诸如THF) 中使化合物XXVI与苯甲酸2-氧代乙酯反应产生呈R构型的化合物XXVII。使用CAL B代替STS可以产生呈S构型的化合物XXVII (参考: Hu, L等人 Chem. Commun., 2013, 49, 10376-10378)。在合适的溶剂溶液中使化合物XXVII与SnCl<sub>4</sub>反应产生化合物XXVIII。将化合物XXVIII脱保护产生化合物XXIX。可以通过在合适的溶剂中使化合物XXIX与POCl<sub>3</sub>和吡啶反应来完成其磷酸化以产生化合物XXX。将化合物XXX转化为最

终化合物XXXII的剩余反应可以通过与如方案I中描述的不同反应程序进行。

[0234] 方案VI



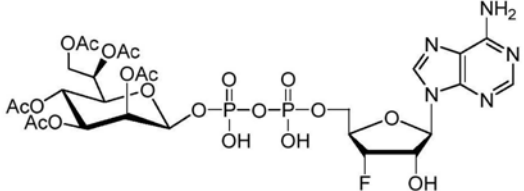
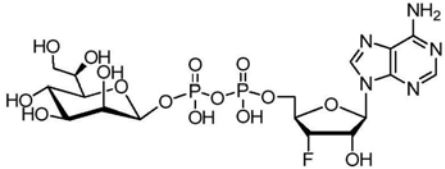
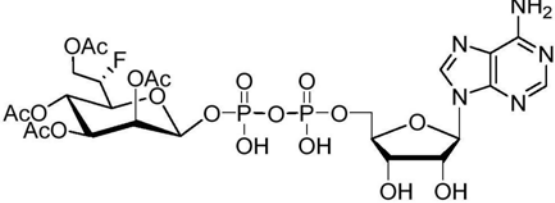
[0235]

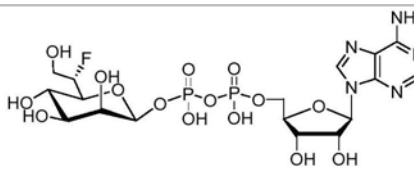
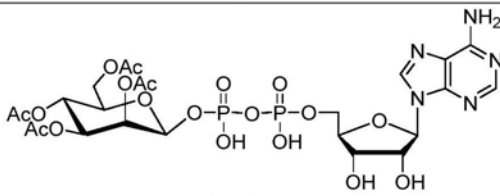
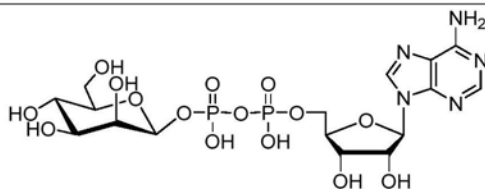
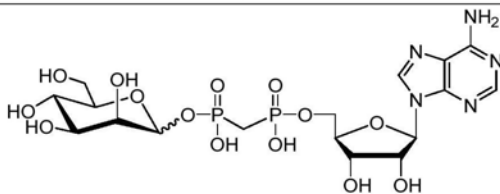
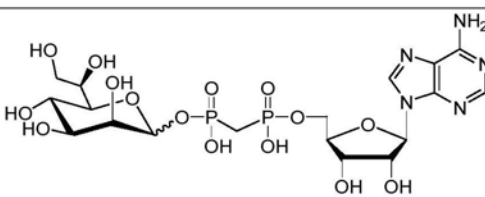
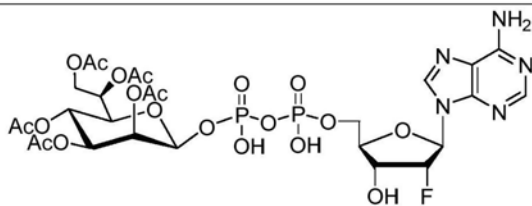


[0236] 表1列出了根据如本文描述的的程序制备的示例性化合物。

[0237] 表1: 示例性的式I的化合物

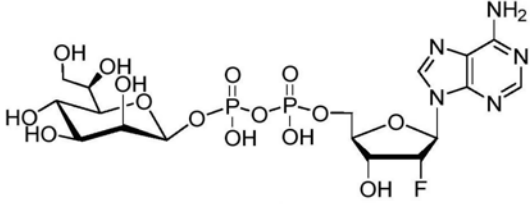
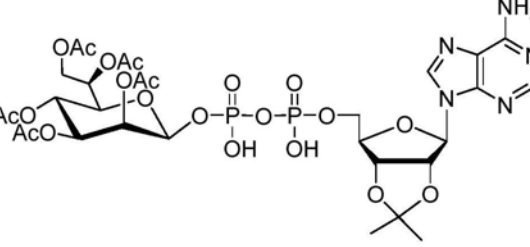
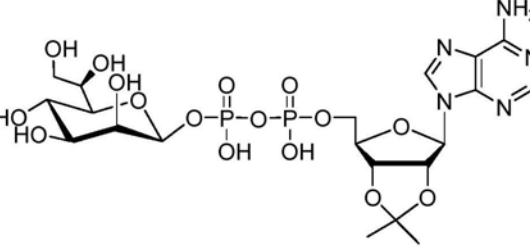
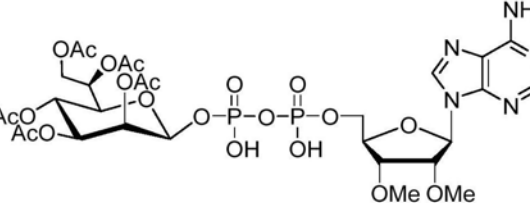
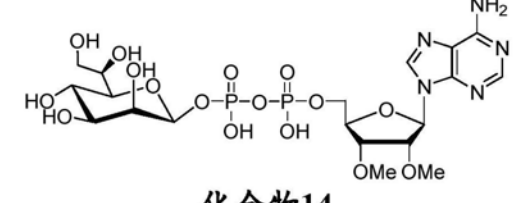
[0238]

结构	化合物名称
 <p>化合物1</p>	<p>((2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p>化合物2</p>	<p>腺苷-3'-氟-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯</p>
 <p>化合物3</p>	<p>(2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸</p>

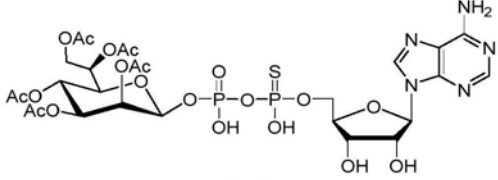
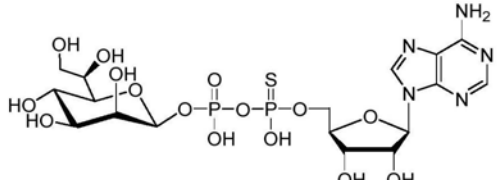
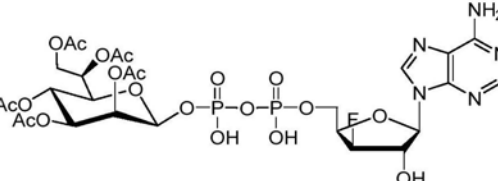
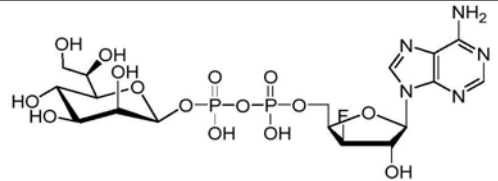
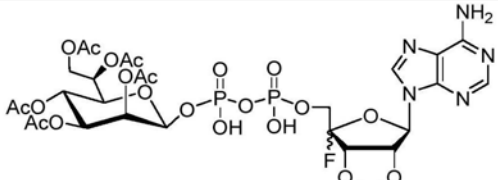
	<p>基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p>化合物4</p>	<p>腺苷-5'-(L-甘油-β-D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基)二磷酸酯</p>
 <p>化合物5</p>	<p>(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(乙酰氧基甲 基)-6-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p>化合物6</p>	<p>腺苷-5'-(β-D-甘露-庚吡喃糖基)二磷酸酯</p>
 <p>化合物7</p>	<p>(3S,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基氢(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)甲基)磷酸酯</p>
 <p>化合物8</p>	<p>(3S,4S,5S,6R)-6-((R)-1,2-二羟基乙基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基氢(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)甲基)磷酸酯</p>
 <p>化合物9</p>	<p>2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>

[0239]

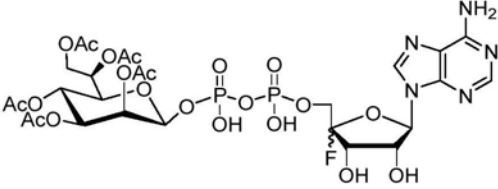
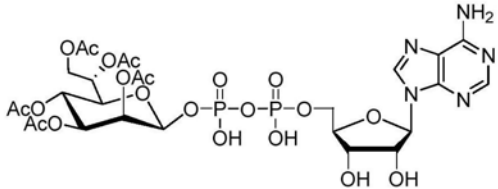
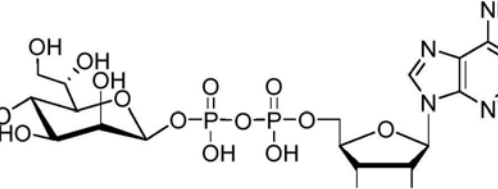
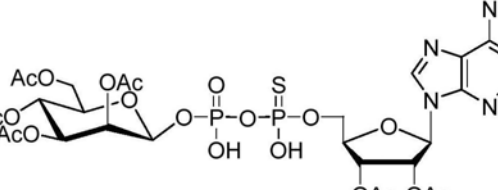
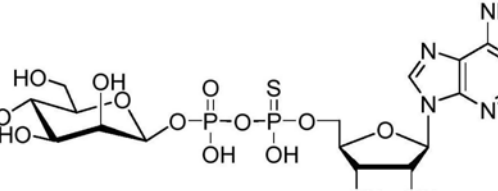
[0240]

 <p style="text-align: center;"><b>化合物10</b></p>	腺苷-2'-氟-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯
 <p style="text-align: center;"><b>化合物11</b></p>	(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢咪唑并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯
 <p style="text-align: center;"><b>化合物12</b></p>	((3aR,4R,6R,6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢咪唑并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲醇(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯
 <p style="text-align: center;"><b>化合物13</b></p>	(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二甲氧基四氢咪唑-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯
 <p style="text-align: center;"><b>化合物14</b></p>	腺苷-2'3'-二甲氧基-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯

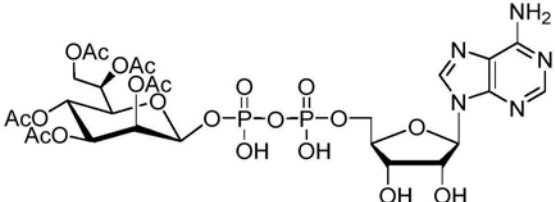
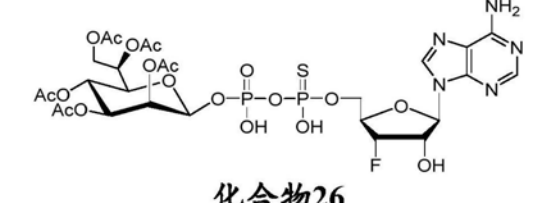
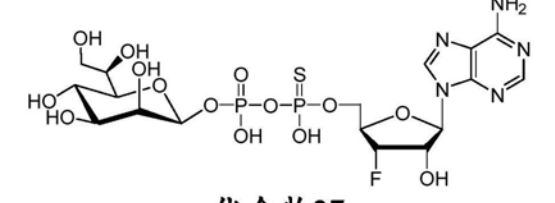
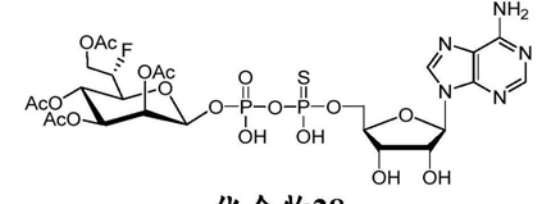
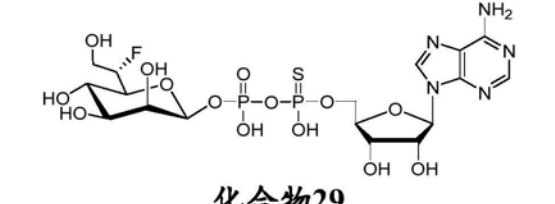
[0241]

 <p style="text-align: center;"><b>化合物15</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物16</b></p>	<p>腺苷-5'-(D-甘油-β-D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基)(羟基)硫代磷酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物17</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3R,4S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物18</b></p>	<p>3'-(s)-氟-腺苷-5'-(D-甘油-β-D-甘露-庚吡喃糖基)二磷酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物19</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>

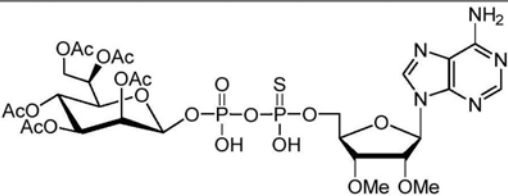
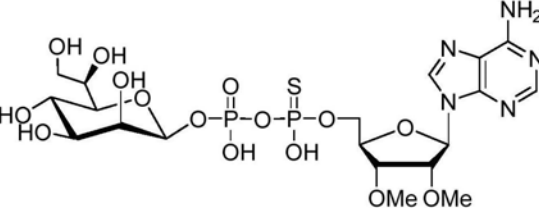
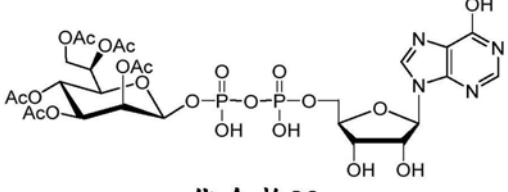
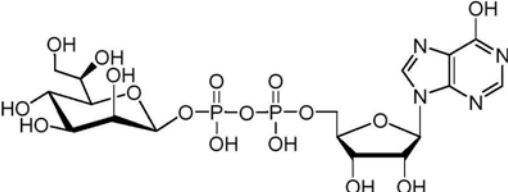
[0242]

 <p style="text-align: center;"><b>化合物20</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2S,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2-氟-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物21</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((S)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物22</b></p>	<p>腺苷-5'-(L-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物23</b></p>	<p>(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(((((((2R,3R,4R,5R)-3,4-二乙酰氧基-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物24</b></p>	<p>腺苷-(5'-甘露糖-吡喃糖基)(羟基)硫代磷酸氧基磷酸酯</p>

[0243]

 <p style="text-align: center;"><b>化合物25</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物26</b></p>	<p>2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物27</b></p>	<p>腺苷-3'-氟-5'-(D-甘油-β-D-甘露-庚吡喃糖基)(羟基)硫代磷酸氧基磷酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物28</b></p>	<p>(2S,3S,4S,5S,6S)-2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>化合物29</b></p>	<p>腺苷-5'-(L-甘油-β-D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基)(羟基)硫代磷酸氧基磷酸酯</p>

[0244]

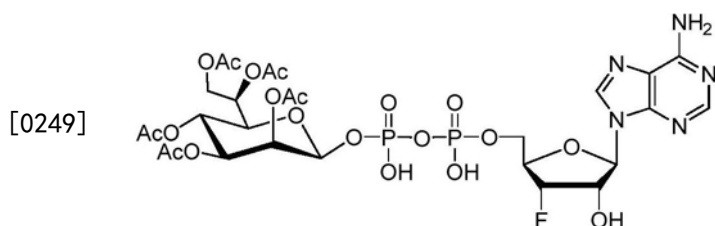
 <p style="text-align: center;"><b>化合物30</b></p>	(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二甲氧基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯
 <p style="text-align: center;"><b>化合物31</b></p>	腺苷-2'3'-二甲氧基-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)(羟基)硫代磷酰氧基磷酸酯
 <p style="text-align: center;"><b>化合物32</b></p>	(2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-(((((((2R,3S,4R,5R)-3,4-二羟基-5-(6-羟基-9H-嘌呤-9-基)四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯
 <p style="text-align: center;"><b>化合物33</b></p>	肌苷-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯

[0245] 代表性的式(I)的化合物的合成:

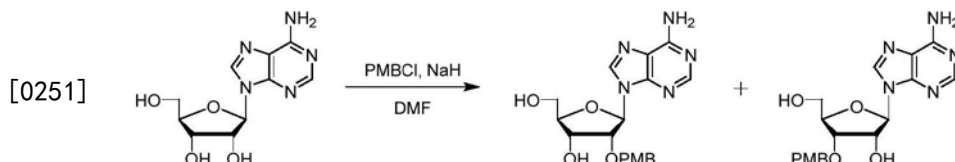
[0246] 所有水分敏感性反应均在Ar下使用注射器-隔膜帽技术进行。在硅胶60F254板(Qindao, 0.25mm厚度)上进行分析型薄层色谱法(TLC)。使用Varian-400光谱仪记录<sup>1</sup>H-NMR光谱,并且将化学位移报告为相对于内部四甲基硅烷或氘代溶剂的残余质子的(ppm)值。使用Varian-400光谱仪记录<sup>13</sup>C-NMR光谱,并且将化学位移报告为相对于内部四甲基硅烷或氘代溶剂的残余质子的δ(ppm)值。使用Varian-400光谱仪记录<sup>31</sup>P-NMR光谱,并且将化学位移报告为相对于外部85%磷酸的δ(ppm)值。<sup>1</sup>H-NMR光谱列表如下:化学位移、多重性(br=宽, s=单峰, d=双重峰, t=三重峰, q=四重峰, m=多重峰)、质子数目、和一个或多个偶合常数。

[0247] 化合物1

[0248] (2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

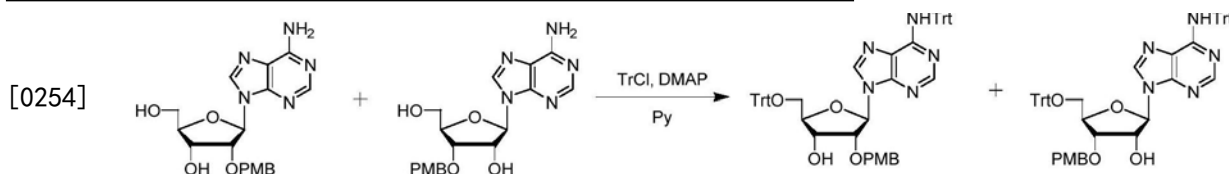


[0250] 步骤1. 化合物 (2R, 3R, 4R, 5R) -5- (6-氨基-9H-嘌呤-9-基) -2- (羟基甲基) -4- ((4-甲氧基苄基) 氧基) 四氢呋喃-3-醇的制备



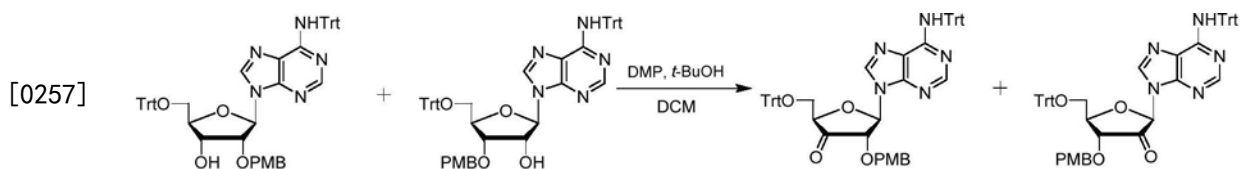
[0252] 将腺苷 (40g, 149.6mmol) 在 DMF (500mL) 中的悬浮液冷却至  $-5^{\circ}\text{C}$ 。将 NaH (8.0g, 200.0mmol, 60% 纯度) 添加到混合物中并且将混合物在  $-5^{\circ}\text{C}$  下搅拌 1h。然后在这样的温度下将 PMB-Cl (23.0mL, 168.8mmol) 在 1h 期间逐滴添加到混合物中。添加后, 将反应在  $15^{\circ}\text{C}$  下搅拌 12h。将反应在减压下浓缩以除去溶剂。将  $\text{H}_2\text{O}$  (50mL) 和 EA (100mL) 添加到残余物中并且将有机层分离。将有机层用盐水 (50mL) 洗涤, 经无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤并且在减压下浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (DCM/MeOH: 20/1 至 10/1) 以得到呈白色固体的所希望的化合物和异构体的混合物 (27g, 产率: 46.1%), 将其不经进一步分离而用于下一步骤。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.38-8.29 (m, 1H), 8.15-8.06 (m, 1H), 7.39-7.30 (m, 2H), 7.11-6.91 (m, 2H), 6.88-6.69 (m, 2H), 6.08-5.90 (m, 1H), 5.58-5.44 (m, 1H), 5.29 (d,  $J=5.3\text{Hz}$ , 1H), 4.71-4.50 (m, 2H), 4.40-3.99 (m, 3H), 3.76-3.68 (m, 3H), 3.68-3.63 (m, 1H), 3.60-3.47 (m, 1H)。

[0253] 步骤2. 化合物 (2R, 3R, 4R, 5R) -4- ((4-甲氧基苄基) 氧基) -5- (6- (三苯甲基氨基) -9H-嘌呤-9-基) -2- ((三苯甲氧基) 甲基) 四氢呋喃-3-醇的制备



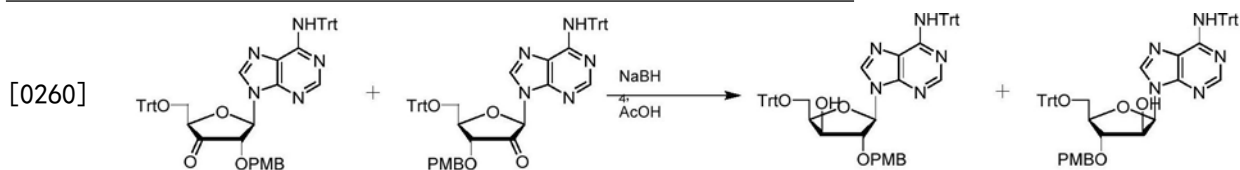
[0255] 向以上步骤1的产物及其异构体的混合物 (10g, 25.8mmol) 在吡啶 (20mL) 中的溶液中添加 DMAP (2.5g, 20.7mmol) 和  $\text{TrtCl}$  (16.4g, 59.0mmol)。然后将反应在  $80^{\circ}\text{C}$  下搅拌 4h。将  $\text{HCl}$  (1N, 20mL) 和 EA (50mL) 添加到混合物中并且将有机层分离。将有机层用  $\text{HCl}$  (1N, 20mL x 3)、盐水 (100mL) 洗涤, 经无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 过滤并且在减压下浓缩。将粗产物通过硅胶色谱法纯化 (PE/EA: 20/1 至 1/1) 以得到呈白色固体的所希望的产物及其异构体的混合物 (总共 18g, 产率: 77.2%), 将其不经进一步分离而用于下一步骤。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.40-8.27 (m, 1H), 7.86-7.77 (m, 1H), 7.57-7.46 (m, 1H), 7.37-7.31 (m, 11H), 7.30-7.16 (m, 22H), 6.88-6.74 (m, 2H), 6.16-5.91 (m, 1H), 5.70-5.30 (m, 1H), 5.01-4.44 (m, 1H), 4.53-4.23 (m, 1H), 4.19-4.08 (m, 1H), 3.72-3.66 (m, 3H), 3.30-3.07 (m, 2H)。

[0256] 步骤3. 化合物 (2R, 4S, 5R) -4- ((4-甲氧基苄基) 氧基) -5- (6- (三苯甲基氨基) -9H-嘌呤-9-基) -2- ((三苯甲氧基) 甲基) 二氢呋喃-3 (2H) -酮的制备



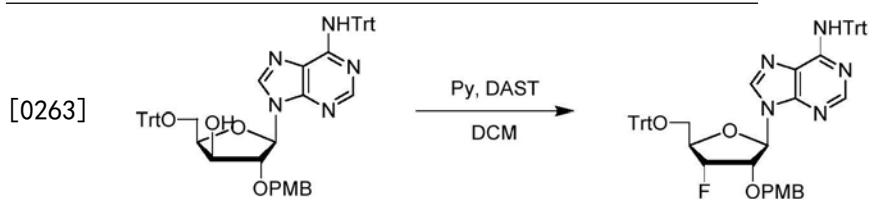
[0258] 向来自以上步骤2的产物及其异构体的混合物 (2.6g, 2.98mmol) 在DCM (30mL) 中的溶液中添加DMP (2.54g, 5.99mmol) 和t-BuOH (503.9mg, 6.80mmol, 650.17 $\mu$ L)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌4h。将反应混合物用DCM (100mL) 稀释, 用饱和Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/饱和NaHCO<sub>3</sub> (1/1, 700mL) 淬灭。将有机层分离并且将水层用DCM (100mL x 3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (300mL) 洗涤, 经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且浓缩以给出残余物。获得呈浅黄色固体的所希望的产物和异构体 (2.79g, 粗品), 将其不经进一步纯化而用于下一步骤。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 870.4。

[0259] 步骤4. 化合物 (2R, 3S, 4R, 5R) -4-((4-甲氧基苄基) 氧基) -5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基) -2-((三苯甲氧基) 甲基) 四氢呋喃-3-醇的制备



[0261] 将NaBH<sub>4</sub> (565.3mg, 14.94mmol) 在CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (25mL) 中的溶液在15 $^{\circ}$ C下搅拌10min, 并且然后添加以上步骤3的产物及其异构体的混合物 (2g, 2.30mmol)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌20h。将反应混合物用EtOH (50mL x 2) 蒸发, 并且然后分配在DCM (40mL x 3) 与H<sub>2</sub>O (50mL) 之间, 将有机层用饱和NaHCO<sub>3</sub> (60mL)、盐水 (60mL) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且浓缩以给出残余物。将两种异构体的产物通过快速硅胶色谱法分离 (PE:EA=1:0至2:1)。获得呈白色固体的所希望的产物 (824mg, 产率: 40.8%)。并且获得呈白色固体的异构体 (203mg, 产率: 10%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 872.4。所希望的产物: <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.85 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.44-7.09 (m, 32H), 7.03 (s, 1H), 6.85 (d, J=8.6Hz, 2H), 5.73 (s, 1H), 4.63 (d, J=11.2Hz, 1H), 4.44 (d, J=11.2Hz, 1H), 4.32 (s, 1H), 4.28-4.16 (m, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.56-3.44 (m, 2H)。

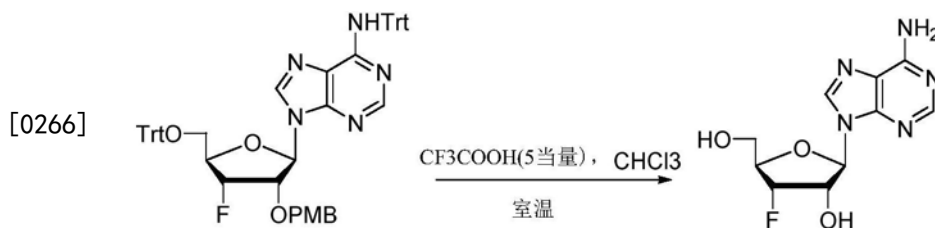
[0262] 步骤5. 9-((2R, 3S, 4R, 5R) -4-氟-3-((4-甲氧基苄基) 氧基) -5-((三苯甲氧基) 甲基) 四氢呋喃-2-基) -N-三苯甲基-9H-嘌呤-6-胺的制备



[0264] 向以上步骤4的起始产物 (824mg, 944.94 $\mu$ mol) 在DCM (20mL) 中的溶液中添加吡啶 (747.4mg, 9.45mmol, 762.70 $\mu$ L) 和DAST (913.9mg, 5.67mmol, 749.08 $\mu$ L)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌16h。将反应混合物用DCM (20mL) 稀释, 用饱和NaHCO<sub>3</sub> (40mL)、水 (40mL)、盐水 (40mL) 洗涤, 经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且浓缩以给出残余物。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化 (PE:EA=1:0至2:1)。获得呈无色油状物的所希望的产物 (218mg, 产率: 23.7%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 874.4 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.91 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.42-7.15 (m, 30H), 7.09 (br d, J=8.6Hz, 2H), 6.99-6.93 (m, 1H), 6.74 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.07 (d, J=7.6Hz, 1H), 5.18-

4.89 (m, 2H), 4.60-4.48 (m, 2H), 4.48-4.36 (m, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.48 (dd,  $J=4.6, 10.5\text{Hz}$ , 1H), 3.30 (dd,  $J=4.2, 10.5\text{Hz}$ , 1H)。

[0265] 步骤6. (2R, 3R, 4R, 5R) -2-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-(羟基甲基) 四氢呋喃-3-醇的制备



[0267] 在室温下向以上步骤5的产物 (1.2g, 1.37mmol) 在CHCl<sub>3</sub>中的搅拌溶液中添加TFA (0.51mL, 5当量)。将溶液在此温度下搅拌2h。将溶液在减压下浓缩以给出呈油状残余物的所希望的产物 (360mg, 1.34mmol), 将其不经进一步纯化而用于下一步骤。

[0268] 步骤7. (2R, 3R, 4S, 5R) -2-(6-乙酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-5-(((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-氟四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



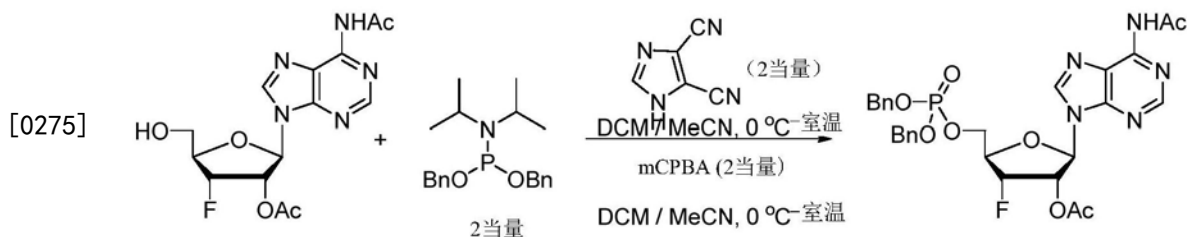
[0270] 在室温下向以上步骤6的产物 (360mg, 1.34mmol) 在吡啶 (10mL) 中的搅拌溶液中添加DMAP (16mg, 0.134mmol)。将溶液加热至50°C。在此温度下添加TBDPSCI (734mg, 2.68mmol) 并且将反应在此温度下搅拌过夜。LC-MS显示没有剩余SM。向溶液中逐滴添加Ac<sub>2</sub>O (633μL, 6.7mmol)。在此温度下搅拌5h后, LC-MS显示形成所希望的化合物。将反应分配在DCM与水之间。将合并的提取物用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤, 并且经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。将滤液在减压下浓缩以给出呈油状残余物的所希望的产物 (792mg, 1.34mmol), 将其不经进一步纯化而用于下一步骤。

[0271] 步骤8. (2R, 3R, 4S, 5R) -2-(6-乙酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-(羟基甲基) 四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



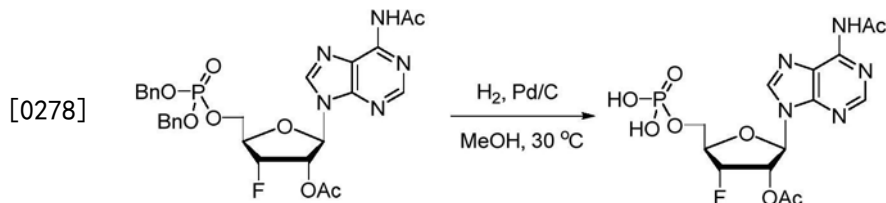
[0273] 在室温下向以上步骤7的产物 (792mg, 1.34mmol) 在THF (10mL) 中的搅拌溶液中添加TBAF (在THF中1M, 2.00mL, 2.00mmol)。搅拌过夜后, 将反应用饱和NH<sub>4</sub>Cl淬灭。将反应分配在DCM与水之间。将合并的提取物用盐水洗涤并且经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。将滤液在减压下浓缩以给出油状残余物, 将其通过快速色谱法在硅胶上用DCM/MeOH (20:1) 洗脱来纯化以给出呈无色油状物的所希望的产物 (254mg, 0.72mmol)。

[0274] 步骤9. (2R, 3R, 4S, 5R) -2-(6-乙酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-5-(2-(双(苄氧基)磷酰基)乙基)-4-氟四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



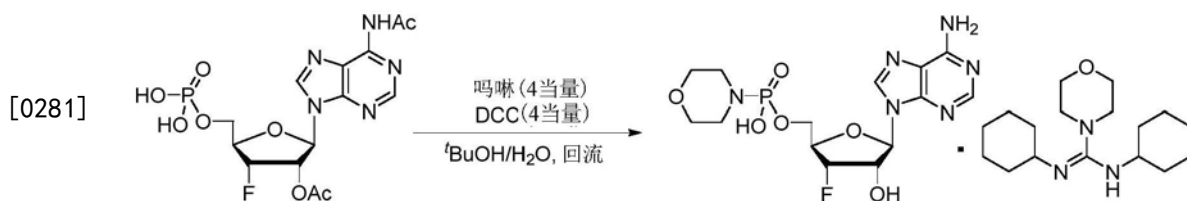
[0276] 在氮气气氛下向25mL圆形烧瓶中装入以上步骤8的产物(254mg, 0.72mmol)和1H-咪唑-4,5-二甲腈(170mg, 1.44mmol)。添加干DCM和MeCN (DCM:MeCN=5:1, v/v)。将所得溶液在冰-水浴中冷却并且添加二苄基二异丙基亚磷酰胺(497mg, 1.44mmol)。将反应温热至室温后, 将其搅拌另外1-2h。将反应再次在冰-水浴中冷却并且直接添加mCPBA(291mg, 1.44mmol)。将其温热至室温后, 添加饱和NaHCO<sub>3</sub>(水溶液)以将反应淬灭并且分离有机相。将水相用DCM萃取两次。将合并的提取物用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤, 并且经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。将滤液在减压下浓缩以给出油状残余物, 将其通过硅胶快速色谱法用DCM/MeOH(30:1)洗脱来纯化以给出所希望的产物(441mg, 0.72mmol)。

[0277] 步骤10. (2R, 3R, 4S, 5R)-2-(6-乙酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-5-((磷酰氧基)甲基)四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



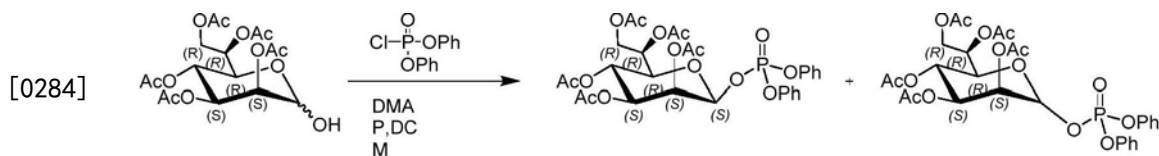
[0279] 在室温下在H<sub>2</sub>下将以上步骤9的产物(441mg, 0.72mmol)和Pd/C(132mg)在MeOH(4mL)中的混合物搅拌。搅拌过夜后, 将混合物用MeOH通过具有0.45μm孔径的Advantec PTFE膜过滤器过滤。将滤液在减压下浓缩以得到所希望的产物(233mg, 0.54mmol), 将其不经进一步纯化而用于下一步骤。

[0280] 步骤11. ((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基)甲基氢吗啉代磷酸酯的咖啡因DCC盐的制备



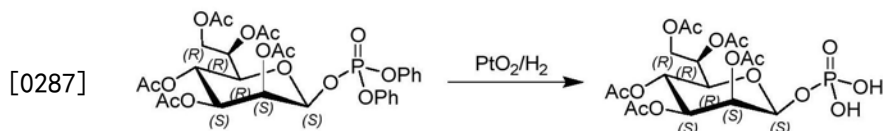
[0282] 向DCC(445mg, 2.16mmol)在叔丁醇(5mL)中的溶液中逐滴添加以上步骤10的产物(233mg, 0.54mmol)在t-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1, 10mL)的混合物中的回流溶液和纯化吗啉(188mg, 2.16mmol)。添加在约3h内完成, 并且将混合物回流过夜直到TLC显示反应完成。将混合物冷却至室温。将滤液蒸发直到t-BuOH被大部分除去, 并且将剩余的水相用醚萃取三次。然后将澄清的水溶液通过冷冻干燥蒸发至干燥以给出所希望的产物, 将其不经进一步纯化而用于下一步骤。

[0283] 步骤12. (2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-((二苄氧基磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



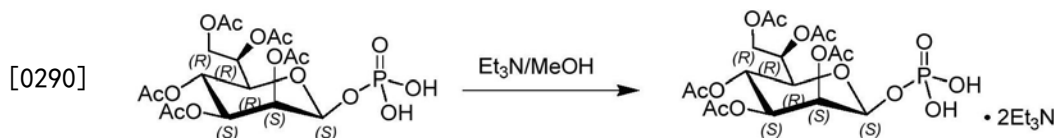
[0285] 向(2R,3R,4S,5S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-羟基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯(400mg,1当量;Shinsuke Inuki等人Org.Lett.2017,19:3079-3082;Alla Zamyatina等人,Carbohydrate Research,2003,338:2571-2589)和DMAP(265.1mg,2.17mmol,2.28当量)在DCM(10mL)中的溶液中,在1h期间通过注射器添加二苯基磷酰氯(600.7mg,2.35当量)在DCM(10mL)中的溶液。然后将反应在25℃下搅拌2h。通过TLC部分地检测剩余起始材料(PE:EA=2:1,3次)。添加DMAP(1.2g)并且然后将二苯基磷酰氯(0.6g)在DCM(15mL)中的溶液逐滴添加到体系中并且然后在25℃下搅拌2h。将反应用DCM(20mL)稀释,用饱和NaHCO<sub>3</sub>(30mL)和盐水(30mL)洗涤。将有机相浓缩以给出残余物。将残余物通过硅胶柱色谱法纯化(PE:EA=10:1至1:1)以给出异构体(α构象70mg,产率:11.3%)和所希望的产物(β构象,400mg,产率:64.4%),均呈无色油状物。β构象:<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ7.42-7.12(m,10H),5.70-5.61(m,1H),5.44(br d,J=1.2Hz,1H),5.32-5.21(m,2H),5.12-5.03(m,1H),4.44-4.35(m,1H),4.24-4.15(m,1H),3.92-3.83(m,1H),2.15-1.94(m,15H)。α构象:<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ7.42-7.30(m,4H),7.29-7.15(m,6H),5.85(br d,J=6.4Hz,1H),5.41-5.26(m,3H),5.19-5.11(m,1H),4.37(dd,J=3.7,12.0Hz,1H),4.29-4.17(m,2H),2.23-1.96(m,15H)。

[0286] 步骤13. 2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-(磷酰氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0288] 溶液由在EtOAc(4mL)中的以上步骤12的产物(400mg,1当量)组成,并且将EtOH(4mL)与PtO<sub>2</sub>(69.60mg,0.5当量)混合并且在1atm H<sub>2</sub>气氛下在25℃下搅拌16h。过滤并且将滤液浓缩以给出残余物。获得呈无色油状物的所希望的产物(300mg,97.81%产率)。产品足够纯,以直接用于下一步骤。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,甲醇-d<sub>4</sub>) δ5.52-5.44(m,2H),5.25-5.18(m,3H),4.44(dd,J=3.4,12.0Hz,1H),4.27(dd,J=7.2,12.1Hz,1H),4.01-3.95(m,1H),2.15(s,3H),2.10-2.02(m,9H),1.98-1.94(m,3H)。

[0289] 步骤14. 2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-(磷酰氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯三乙基铵盐的制备



[0291] 将以上步骤13的产物(300mg,1当量)和Et<sub>3</sub>N(0.2mL,2.40当量)在MeOH(5mL)中的溶液在25℃下搅拌1.5h。在减压下除去溶剂以给出呈白色固体的所希望的产物的三乙基铵盐(340mg,产率:80.69%,含2Et<sub>3</sub>N)。将产物直接用于下一步骤。

[0292] 步骤15. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-

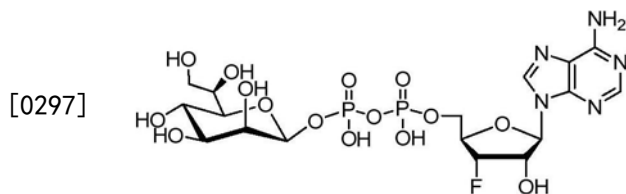
基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-(R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



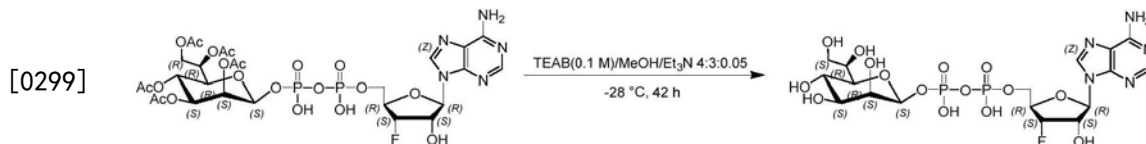
[0294] 将以上步骤14的产物(200mg, 1当量)和以上步骤9的产物化合物的吗啡DCC盐(357.17mg, 3当量, DCC-吗啡)的混合物用干吡啶(5mL x 3)干燥。然后将残余物溶解在吡啶(3mL)中, 添加1H-四唑(99.68mg, 5当量)并且在25°C下搅拌32h。将反应浓缩以给出残余物, 将其通过硅胶柱色谱法纯化(CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O:H<sub>2</sub>O=1:0:0:0至50:50:1:1)以给出粗产物(300mg), 将其通过制备型HPLC纯化(柱:Waters Xbridge 150\*255μ, 条件:水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN, 3%至33%)以给出一部分呈白色固体的较不纯的所希望的产物(15mg, 产率:3.9%, 61.6%纯度)和呈白色固体的纯的所希望的产物(18mg, 产率:7.16%, 94.1%纯度)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 832.4。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 8.71 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 6.11 (d, J=7.6Hz, 1H), 5.61-5.56 (br. s, 2H), 5.34 (br. d, J=4.2Hz, 0.5H), 5.25-5.15 (m, 3.5H), 4.61-4.50 (m, 1H), 4.45-4.41 (m, 1H), 4.31-4.21 (m, 3H), 3.95-3.90 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.08-2.02 (m, 6H), 1.99 (s, 3H), 1.91 (s, 3H)。

[0295] 化合物2

[0296] 腺苷-3'-氟-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯



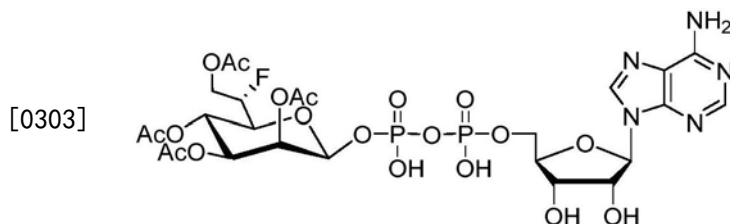
[0298] 步骤1. 腺苷-3'-氟-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯的制备



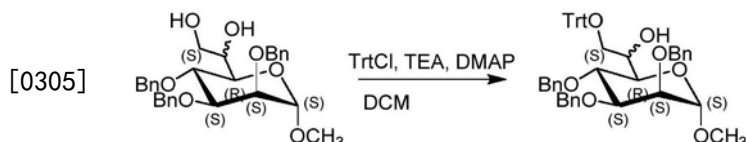
[0300] 将以上化合物1的制备中的步骤15的产物化合物(15.0mg, 1当量)溶解在3mL由(TEAB(0.1M):MeOH:Et<sub>3</sub>N=4:3:0.05)组成的溶剂中并且在-28°C下搅拌42h。然后将反应通过冷冻干燥器冻干以给出白色固体。将所得固体顺序地通过制备型HPLC(RP-C18, 用三乙基乙酸铵缓冲液(pH 6.8)/2%乙腈等度洗脱)和G25 Sephadex色谱法用蒸馏H<sub>2</sub>O洗脱而纯化以给出所希望的化合物(6.1mg, 产率:54.4%)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup>: 619.8。

[0301] 化合物3

[0302] (2S, 3S, 4S, 5S, 6S)-2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-(((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

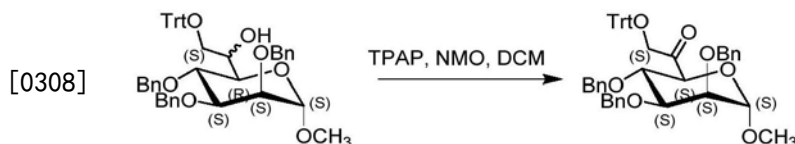


[0304] 步骤1. 化合物1-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-三(苄氧基)-6-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-(三苯甲氧基)乙-1-醇的制备



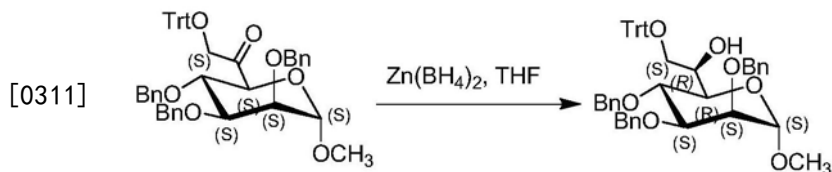
[0306] 向化合物1-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-三(苄氧基)-6-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基)乙-1,2-二醇(17.4g,35.2mmol;Tiehai Li等人,(2014) Bioorg.Med.Chem.22:1139-1147;Shinsuke Inuki等人,Org.Lett.(2017),19:3079-3082)、TEA(7.1g,70.4mmol,9.8mL)和DMAP(2.2g,17.6mmol)在DCM(200mL)中的溶液中添加TrtCl(19.6g,70.4mmol)。将混合物在50℃下搅拌20h。将反应混合物通过H<sub>2</sub>O(100mL)淬灭并且然后分离。将水层用DCM(60mL x 2)萃取。将合并的有机层用盐水(150mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且浓缩以给出残余物。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化(PE:EA=1:0至1:1)。获得呈浅黄色油状物的所希望的化合物(24.6g,产率:95%,93%纯度)。MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:782.4。

[0307] 步骤2. 化合物1-((2S,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-三(苄氧基)-6-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-(三苯甲氧基)乙-1-酮的制备



[0309] 将从以上步骤1获得的产物(24.6g,33.4mmol)、NMO(19.6g,166.9mmol,17.6mL)和4A分子筛(24g,33.4mmol)在DCM(250mL)中的混合物在25℃下搅拌0.5h。然后在0℃下添加TPAP(1.17g,3.34mmol)。将混合物在25℃下搅拌4h。将混合物过滤并且用DCM(50mL x 3)洗涤。将滤液在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化(PE:EA=1:0至4:1)。获得呈淡黄色油状物的所希望的产物(21.7g,产率:85.6%)。MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:757.3。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>):δ7.45-7.25(m,30H),4.72-4.52(m,6H),4.20-4.07(m,4H),3.99(s,2H),3.68-3.67(m,1H),3.22(s,3H)。

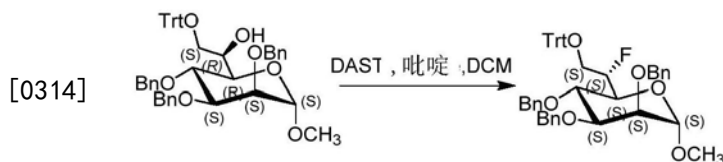
[0310] 步骤3. (R)-1-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-三(苄氧基)-6-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-(三苯甲氧基)乙-1-醇的制备



[0312] 在0℃下向从以上步骤2获得的产物(21.7g,29.5mmol)在THF(200mL)中的溶液中逐滴添加Zn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(0.5M,66.7mL)持续0.5h。将反应小心地用H<sub>2</sub>O(50mL)淬灭。将有机层用乙

酸乙酯 (150mL x 3) 萃取。将有机层经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并且在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化 (PE:EA=1:0至7:1)。获得呈无色油状物所希望的化合物 (19.5g, 产率: 88.27%, 98.5%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 759.3。

[0313] 步骤4. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5S, 6S) -3, 4, 5-三(苄氧基)-2-((S)-1-氟-2-(三苯甲氧基)乙基)-6-甲氧基四氢-2H-吡喃的制备



[0315] 在0℃下向以上步骤3的产物化合物 (9.5g, 12.9mmol) 在DCM (100mL) 中的混合物中添加DAST (10.4g, 64.5mmol, 8.5mL) 和吡啶 (10.2g, 128.9mmol, 10.4mL)。将混合物在25℃下搅拌16h。将反应小心地用饱和 $\text{NaHCO}_3$  (100mL) 淬灭。将混合物用DCM (100mL x 3) 萃取。将合并的有机层用2N HCl (150mL) 洗涤, 经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并且在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化 (PE:EA=1:0至12:1)。获得呈淡黄色油状物的所希望的化合物 (4.2g, 产率: 44.1%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 7.38-7.18 (m, 30H), 4.92-4.61 (m, 2H), 4.53-4.51 (m, 6H), 4.06-4.02 (m, 1H), 3.77-3.75 (m, 1H), 3.65-3.51 (m, 3H), 3.14-3.06 (m, 1H), 2.96 (s, 3H)。

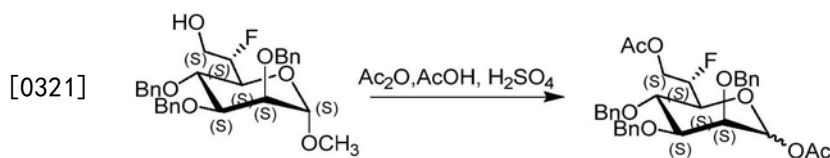
[0316] 步骤5. 化合物 (S)-2-氟-2-((2S, 3S, 4S, 5S, 6S)-3, 4, 5-三(苄氧基)-6-甲氧基四氢-2H-吡喃-2-基)乙-1-醇的制备



[0318] 向以上步骤4的产物化合物 (5.8g, 7.9mmol) 在DCM (60mL) 中的溶液中添加TFA (13.9g, 121.6mmol, 9mL)。将混合物在25℃下搅拌1h。向混合物中添加饱和 $\text{NaHCO}_3$  (150mL)。将混合物用DCM (100mL x 3) 萃取。将合并的有机层经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并且在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化 (PE:EA=10:1至1:1)。获得呈无色油状物的所希望的化合物 (3.2g, 产率: 79.7%, 96.2%纯化)。

[0319] MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 519.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$ 7.35-7.28 (m, 15H), 4.99-4.96 (m, 2H), 4.73-4.65 (m, 4H), 4.60 (s, 2H), 4.14-4.10 (m, 3H), 3.77-3.76 (m, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.60-3.57 (m, 1H), 3.27 (s, 3H)。<sup>19</sup>F NMR  $\delta$ -207.84。

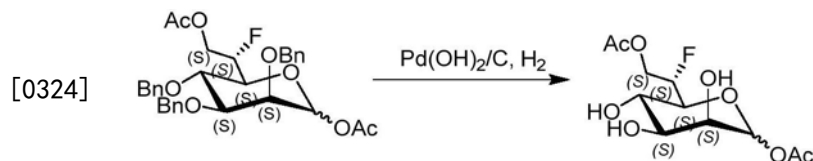
[0320] 步骤6. 化合物 (3S, 4S, 5S, 6S) -6-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-3, 4, 5-三(苄氧基)四氢-2H-吡喃-2-基乙酸酯的制备



[0322] 向以上步骤5的产物化合物 (3.2g, 6.5mmol) 在HOAc (15mL) 和 $\text{Ac}_2\text{O}$  (15mL) 中的溶液中添加 $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2.8g, 27.6mmol, 1.5mL, 98%纯化)。将混合物在25℃下搅拌1h。在0℃下将反应用甲醇 (15mL) 淬灭。在真空下除去大部分溶剂。添加30mL饱和 $\text{NaHCO}_3$ 并且将混合物用乙酸

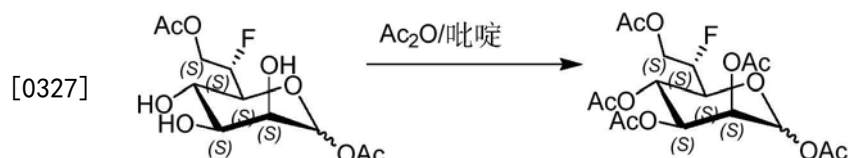
乙酯 (50mL x 3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (50mL) 洗涤, 经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并且在真空下浓缩。获得呈淡黄色油状物的所希望的化合物 (3.9g, 粗品), 将其直接用于下一步骤。

[0323] 步骤7. 化合物 (3S, 4S, 5S, 6S) -6-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-3, 4, 5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基乙酸酯的制备



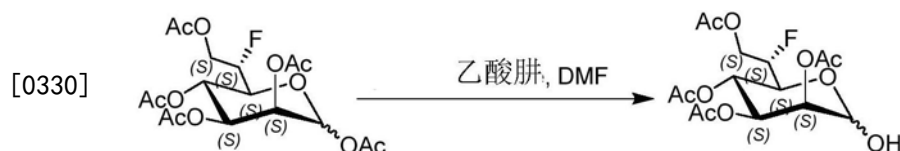
[0325] 在25°C下向以上步骤6的产物化合物 (3.9g, 6.9mmol) 在甲醇 (20mL)、THF (10mL)、 $\text{H}_2\text{O}$  (2mL) 和 $\text{HOAc}$  (0.5mL) 中的混合物中添加 $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$  (0.6g, 20% 纯化)。将混合物在25°C下在氢气 (50psi) 下搅拌32h。将混合物通过硅藻土过滤并且用甲醇 (50mL x 3) 洗涤。收集滤液并且将其在真空下浓缩。获得呈淡黄色油状物的所希望的化合物 (2.5g, 粗品), 将其直接用于下一步骤。

[0326] 步骤8. 化合物 (3S, 4S, 5S, 6S) -6-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基) 四氢-2H-吡喃-2, 3, 4, 5-四基四乙酸酯的制备



[0328] 向以上步骤7的产物化合物 (2.5g, 8.4mmol) 在吡啶 (20mL) 中的溶液中添加 $\text{Ac}_2\text{O}$  (4.3g, 42.2mmol, 4.0mL) 和 $\text{DMAP}$  (515.5mg, 4.2mmol)。将混合物在25°C下搅拌0.5h。将反应用甲醇 (15mL) 淬灭。在真空下除去大部分吡啶。将1N  $\text{HCl}$  (20mL) 添加到残余物中。将残余物用乙酸乙酯 (30mL x 3) 萃取。将合并的有机层用2N  $\text{HCl}$  (30mL) 洗涤, 经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并且在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化 (PE:EA=10:1至3:2)。获得呈无色油状物的所希望的化合物 (1.6g, 产率: 44.6%)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 445.0。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  6.07 (s, 1H), 5.54-5.49 (m, 1H), 5.34-5.31 (m, 1H), 5.24-5.22 (m, 1H), 4.70-4.56 (m, 1H), 4.38-4.24 (m, 2H), 3.98-3.89 (m, 1H), 2.16 (d, J=6.4Hz, 6H), 2.06 (d, J=6.0Hz, 6H), 1.99 (s, 3H)。

[0329] 步骤9. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5S) -2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-羟基四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备

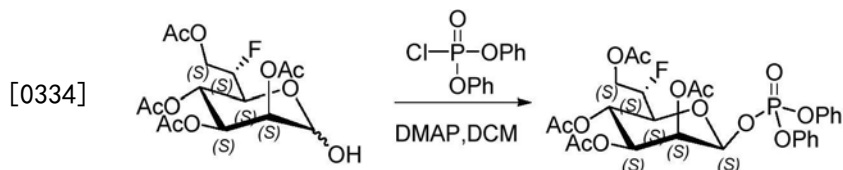


[0331] 向步骤8的产物化合物 (1.6g, 3.8mmol) 在DMF (15mL) 中的溶液中添加乙酸酐 (520.1mg, 5.7mmol)。将混合物在25°C下搅拌20min。将反应用 $\text{H}_2\text{O}$  (15mL) 淬灭。将混合物用乙酸乙酯 (20mL x 3) 萃取。将合并的有机层用 $\text{H}_2\text{O}$  (20mL x 3) 洗涤, 经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并且在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化 (PE:EA=10:1至1:1)。获得呈无色油状物的所希望的化合物 (860mg, 产率: 60.1%)。

[0332]  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.52-5.47 (m, 1H), 5.42-5.39 (m, 1H), 5.26-5.25 (m, 2H),

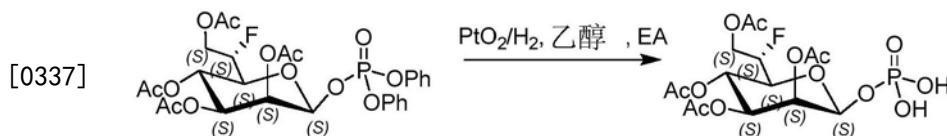
4.75-4.60 (m, 1H), 4.39-4.31 (m, 2H), 4.14-4.05 (m, 1H), 2.15 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.99 (s, 3H)。

[0333] 步骤10. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5S, 6S) -2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-((二苯氧基磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



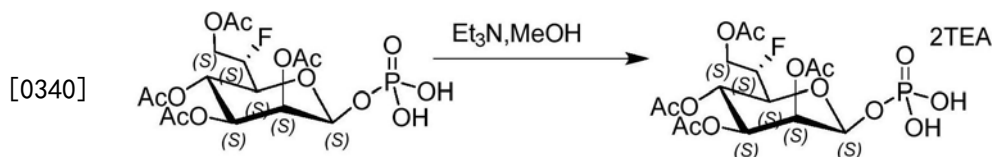
[0335] 在25℃下在3.5h内将在DCM (50mL) 中的[氯(苯氧基)磷酰基]氧基苯 (2.1g, 7.7mmol, 1.6mL) 逐滴添加到以上步骤9的产物化合物 (970mg, 2.6mmol) 和DMAP (1.6g, 12.8mmol) 在DCM (50mL) 中的溶液中。将混合物在25℃下搅拌16h。将反应用饱和 $\text{NaHCO}_3$  (50mL) 淬灭。将混合物用DCM (80mL x 3) 萃取。将合并的有机层经 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 干燥并且在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化 (PE:EA = 10:1至3:2)。获得呈无色油状物的所希望的化合物 (1.21g, 产率:77.5%, 100%纯化)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 658.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.35-7.13 (m, 10H), 5.54 (d, J=6.8Hz, 1H), 5.50-5.46 (m, 2H), 5.07-5.04 (m, 1H), 4.72-4.57 (m, 1H), 4.30-4.26 (m, 1H), 4.23-4.19 (m, 1H), 3.74-3.65 (m, 1H), 2.10 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.98 (s, 3H)。<sup>19</sup>F NMR  $\delta$ -205.5。

[0336] 步骤11. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5S, 6S) -2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-(磷酰氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



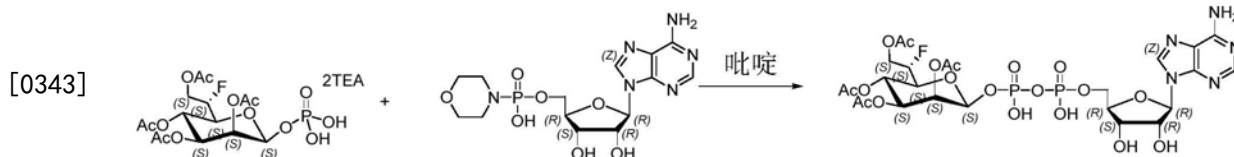
[0338] 向以上步骤10的产物化合物 (600mg, 979.6 $\mu$ mol) 在乙醇 (10mL) 和乙酸乙酯 (10mL) 中的混合物中添加 $\text{PtO}_2$  (150mg)。将混合物在25℃下在氢气 (15psi) 下搅拌20h。将反应混合物通过硅藻土过滤并且用甲醇 (20mL x 4) 洗涤。收集滤液并且将其在真空下浓缩。获得呈白色固体的所希望的化合物 (450mg, 粗品)。将化合物直接用于下一步骤。

[0339] 步骤12. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5S, 6S) -2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-(磷酰氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯三乙胺盐的制备



[0341] 将步骤11的产物化合物 (980mg, 2.1mmol) 溶解在甲醇 (10mL) 中。将TEA (646.3mg, 6.4mmol, 889 $\mu$ L) 添加到混合物中并且将混合物在25℃下搅拌0.5h。将混合物在真空下浓缩。获得呈淡黄色泡沫的所希望的盐 (950mg, 产率:96.9%)。将化合物直接用于下一步骤。

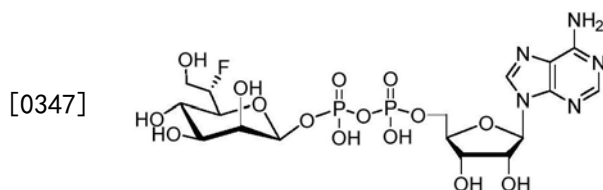
[0342] 步骤13. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5S, 6S) -2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-(((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0344] 将以上步骤12的产物化合物(300mg, 651.8 $\mu$ mol, TEA盐)和化合物AMP-吗啉(morpholidate) (4'-吗啉-N' N'-二环己基甲脒鎓盐) (693.9mg, 977.6 $\mu$ mol)用吡啶(4mL)脱水两次。然后添加1H-四唑(228.3mg, 3.3mmol, 289.0 $\mu$ L)并且将残余物溶解在吡啶(5mL)中。将混合物在25 $^{\circ}$ C下在氮气下搅拌40h。将混合物在真空下浓缩。将残余物溶解在甲醇(30mL)中。将混合物过滤并且弃去固体。将滤液在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化(DCM:甲醇:NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O=20:1:0.05至1:1:0.05)以得到240mg呈无色油状物的粗产物。将粗化合物通过制备型HPLC纯化(中性条件,柱:Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ;流动相:[水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:0%-30%,10min)。获得呈白色固体的所希望的化合物(75.1mg,产率:14.5%,99.2%纯度)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>:790.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ 8.60 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.08 (d, J=6.8Hz, 1H), 5.57-5.55 (m, 2H), 5.36-5.21 (m, 2H), 4.74-4.72 (m, 1H), 4.64-4.37 (m, 4H), 4.23-4.22 (m, 3H), 3.86-3.78 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 2.01 (s, 3H), 1.91 (s, 3H)。

[0345] 化合物4

[0346] 腺苷-5'-(L-甘油- $\beta$ -D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基)二磷酸酯

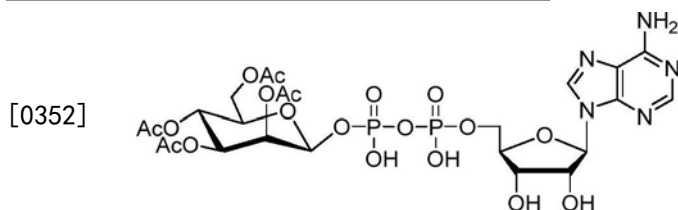


[0348] 步骤1. 化合物腺苷-5'-(L-甘油- $\beta$ -D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基)二磷酸酯的制备

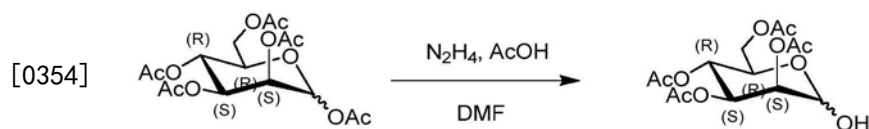
[0349] 将以上化合物3的制备中的步骤13的产物化合物(24mg, 30.4 $\mu$ mol, 1当量)溶解在TEAB/MeOH/TEA (0.3mL, v/v/v=1/1/1)中。将混合物在-28 $^{\circ}$ C下搅拌48h。将反应用CH<sub>3</sub>CN (2mL)稀释并且冻干。获得呈白色固体的所希望的化合物(15.3mg, 产率61.1%, 2Et<sub>3</sub>N)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ 8.34 (s, 1H), 8.08-8.07 (m, 1H), 5.97-5.96 (m, 1H), 5.05 (d, J=9.6Hz, 1H), 4.61-4.58 (m, 2H), 4.37-4.35 (m, 1H), 4.23-4.22 (m, 1H), 4.07-4.04 (m, 2H), 3.92-3.91 (m, 1H), 3.83-3.60 (m, 3H), 3.53-3.50 (m, 1H), 3.25 (dd, J=10.4Hz, 26.8Hz, 1H), 3.05-3.00 (m, 12H), 1.09 (t, J=7.6Hz, 18H)。

[0350] 化合物5

[0351] (2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

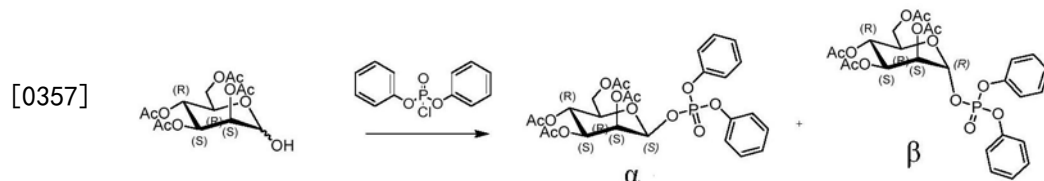


[0353] 步骤1. (2R,3R,4S,5S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-羟基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



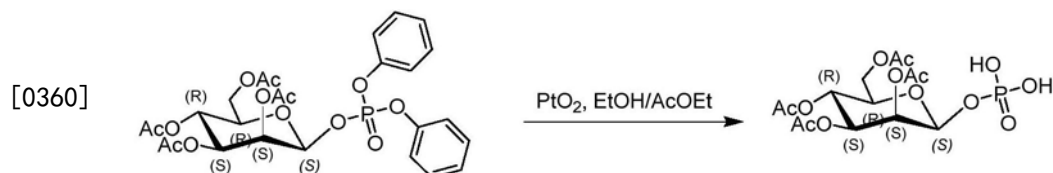
[0355] 在0℃下将AcOH (6.92g, 115.28mmol, 6.59mL, 1.5当量) 添加到NH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (5.60mL, 115.28mmol) 在DMF (60mL) 中的溶液中并且搅拌0.5h。将(3S,4S,5R,6R)-6-(乙酰氧基甲基)四氢-2H-吡喃-2,3,4,5-四基四乙酸酯(30g, 76.86mmol) 添加到体系中并且在25℃下搅拌1.5h。将反应用H<sub>2</sub>O (200mL) 稀释并且用EtOAc (150mL x 3) 萃取。将有机相合并并且用盐水 (150mL x 3) 洗涤, 浓缩以给出残余物。将残余物通过硅胶柱色谱法纯化 (PE:EA=1:0至1:1) 以给出呈无色油状物的所希望的化合物 (26g, 产率:97.1%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.45-5.20 (m, 3H), 4.30-4.10 (m, 4H), 2.20-2.00 (m, 12H)。

[0356] 步骤2. (2R,3R,4S,5S,6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-((二苯氧基磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0358] 向以上步骤1的产物 (864.4mg, 2.48mmol) 和DMAP (3.03g, 24.82mmol) 在DCM (10mL) 中的混合物中逐滴添加二苯基磷酰氯 (5g, 18.61mmol) 在DCM (40mL) 中的溶液并且在25℃下搅拌16h。将反应用DCM (50mL) 稀释, 用饱和NaHCO<sub>3</sub> (50mL) 和盐水 (50mL) 洗涤, 浓缩以给出残余物。将残余物通过硅胶柱色谱法纯化 (PE:EA=1:0至1:1) 以给出α构型化合物 (750mg, 产率:52.1%) 和所希望的β构型化合物 (380mg, 产率:26.4%) 并且两者均作为黄色油状物获得。α构型化合物:<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.42-7.11 (m, 10H), 5.59 (dd, J=1.1, 7.2Hz, 1H), 5.48 (d, J=2.9Hz, 1H), 5.25 (t, J=9.7Hz, 1H), 5.07 (dd, J=3.4, 9.8Hz, 1H), 4.27 (dd, J=5.6, 12.2Hz, 1H), 4.17-4.08 (m, 1H), 3.84-3.74 (m, 1H), 2.16-1.95 (m, 12H)。β构型化合物:<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.43-7.14 (m, 11H), 5.87 (dd, J=1.6, 6.7Hz, 1H), 5.42-5.26 (m, 3H), 4.25-4.02 (m, 3H), 3.92 (dd, J=2.1, 12.3Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.08-1.94 (m, 9H)。

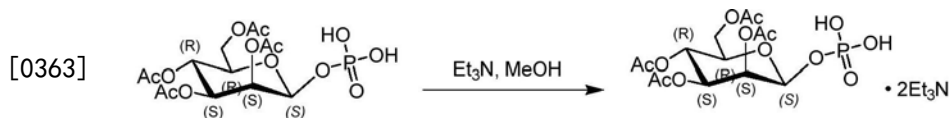
[0359] 步骤3. 化合物(2R,3R,4S,5S,6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(磷酰氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0361] 将以上步骤2的产物化合物 (400mg, 689.09μmol) 和PtO<sub>2</sub> (15.65mg, 68.91μmol) 在EtOAc (4mL) 和EtOH (4mL) 中的混合物在25℃下在H<sub>2</sub>气氛 (1atm) 搅拌16h。将反应混合物过滤并且将滤饼用EtOAc/EtOH (5mL/5mL) 洗涤。将滤液浓缩以给出呈无色油状物的目标化合物 (300mg, 粗品)。将粗产物直接用于下一步骤。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 5.54-5.48 (m, 2H), 5.27-5.22 (m, 2H), 4.38-4.31 (m, 1H), 4.17 (dd, J=2.5, 12.5Hz, 1H), 3.97-3.90 (m, 1H),

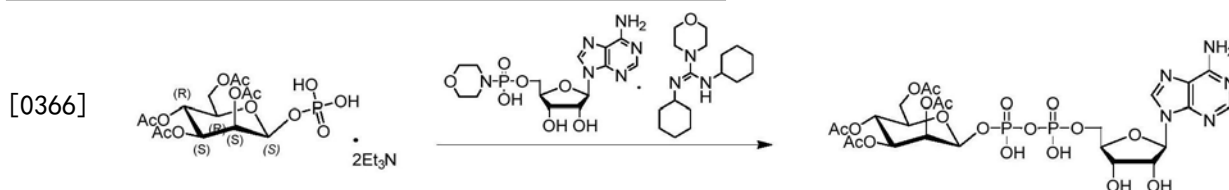
2.19 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07-2.05 (m, 3H), 1.98 (s, 3H)。

[0362] 步骤4. (2R, 3R, 4S, 5S, 6S) -2-(十六烷氧基甲基)-6-(磷酸氧基)四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯二三乙基铵盐的制备



[0364] 将以上产物化合物3 (300mg, 700.47 $\mu$ mol) 和Et<sub>3</sub>N (0.2mL, 1.40mmol) 在MeOH (10mL) 中的混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌2h。除去溶剂以给出呈无色油状物的三乙基铵盐 (450mg, 粗品, 含2Et<sub>3</sub>N)。将粗产物直接用于下一步骤。

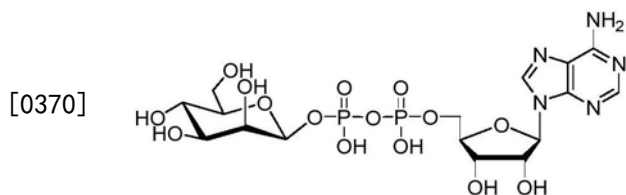
[0365] 步骤5. (2R, 3R, 4S, 5S, 6S) -2-(乙酰氧基甲基)-6-(((((((2R, 3S, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3, 4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 磷酸基) 氧基) (羟基) 磷酸基) 氧基) 四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备



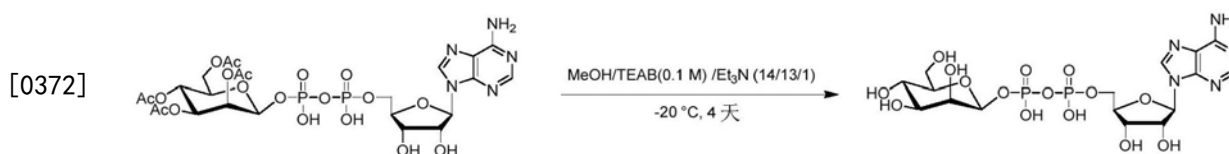
[0367] 将以上步骤4的产物 (56.44mg, 135.57 $\mu$ mol) 和化合物AMP-吗啉 (4'-吗啉-N' N' -二环己基甲脒鎓盐) (50mg, 70.4 $\mu$ mol) 的混合物用干吡啶 (5mL x 3) 干燥。然后将混合物用吡啶 (1mL) 溶解, 添加1H-四唑 (16.66mg, 237.84 $\mu$ mol) 并且在25 $^{\circ}$ C下搅拌16h。除去溶剂以给出残余物, 将其通过制备型HPLC纯化 (柱: Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ , 流动相: 水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) -CAN, B%: 5%至25%。梯度时间 (min): 7, 100%B保留时间 (min): 0.5。流速 (mL/min): 25) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (5.5mg, 产率: 2.7%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 758.2。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.43 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 6.05 (d, J=5.8Hz, 1H), 5.43 (d, J=2.5Hz, 1H), 5.37 (d, J=9.5Hz, 1H), 5.06-4.96 (m, 2H), 4.64-4.58 (m, 2H), 4.42-4.37 (m, 1H), 4.31-4.25 (m, 1H), 4.19 (dd, J=3.1, 12.7Hz, 1H), 4.14-4.07 (m, 2H), 3.94 (dd, J=2.0, 12.5Hz, 1H), 3.58 (br d, J=9.0Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.96 (d, J=10.3Hz, 6H), 1.88 (s, 3H)。

[0368] 化合物6

[0369] 腺苷5'-( $\beta$ -D-甘露-庚吡喃糖基)二磷酸酯



[0371] 步骤1. 腺苷5'-( $\beta$ -D-甘露-庚吡喃糖基)二磷酸酯的制备

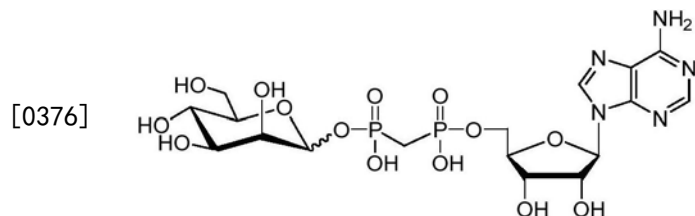


[0373] 将以上化合物5的制备中的步骤5的产物化合物 (2.5mg, 3.30 $\mu$ mol) 溶解在0.3mL溶液 (其由TEAB (0.1M) /MeOH/TEA (13/14/1) 组成) 中并且在-20 $^{\circ}$ C下搅拌4天。将反应冻干以给

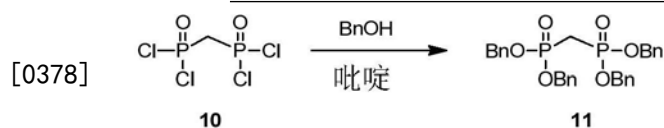
出呈白色固体的所希望的化合物(0.9mg,产率:17.5%,呈Et<sub>3</sub>N盐)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup>: 587.8。

[0374] 化合物7

[0375] (3S,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基氢((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)甲基)磷酸酯

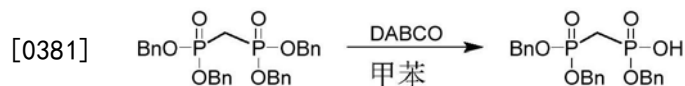


[0377] 步骤1. 四苄基亚甲基双(磷酸酯)的制备



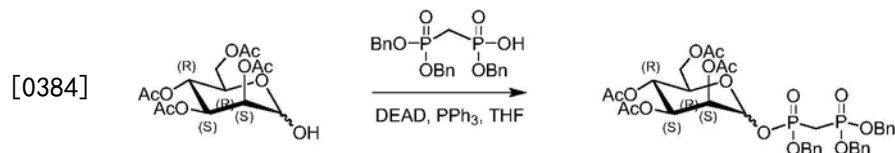
[0379] 在0℃下将干苯甲醇(6.2g,57.3mmol,6.0mL)和干吡啶(4.2g,52.5mmol,4.2mL)的混合物通过注射器泵经30min添加到亚甲基双(二氯磷)(3.45g,13.8mmol)在干甲苯(10mL)中的悬浮液中。添加完成后,允许反应达到20℃并且搅拌另外3h。反应完成后,通过过滤除去固体并且将其用甲苯(2x 20mL)洗涤两次。将滤液用2M NaOH(2x 15mL)和水(15mL)洗涤两次,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过硅胶柱纯化(PE:EA=1:0至1:1)以给出呈无色油状物的所希望的化合物(3g,产率:40.5%,99.9%纯度)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ7.31(s,20H),4.96-5.09(m,8H),2.44-2.59(m,2H)。

[0380] 步骤2. 苄基氢((双(苄氧基)磷酸基)甲基)磷酸酯的制备



[0382] 将DABCO(627mg,5.59mmol,615μL)添加到四苄基亚甲基双(磷酸酯)(以上步骤1的产物)(3g,5.59mmol)在甲苯(50mL)中的溶液中。将所得混合物在110℃下搅拌3h。在真空下除去挥发物并且将残余物用HCl水溶液(37%,1.2mL)逐滴处理。将混合物用EtOAc(20mL)萃取并且将有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并且在减压下蒸发以给出呈黄色油状物的所希望的化合物(2.2g,粗品)。将产物直接用于下一步骤。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ7.27-7.36(m,15H),4.99-5.10(m,6H),2.51-2.64(m,2H)

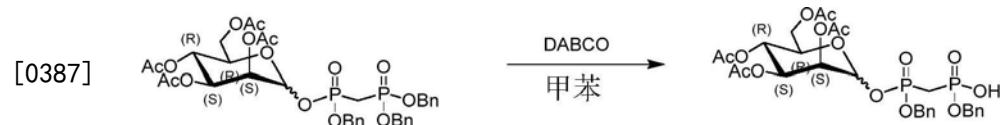
[0383] 步骤3. (2R,3R,4S,5S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(((苄氧基)((双(苄氧基)磷酸基)甲基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0385] 将PPh<sub>3</sub>(360.0mg,1.4mmol)和DEAD(239.5mg,1.4mmol,250μL)顺序地添加到以上步骤2的产物(200mg,448.1μmol)和(2R,3R,4S,5S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-羟基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯(225mg,574.9μmol)在THF(5mL)中的溶液中。将所得混合物在40℃

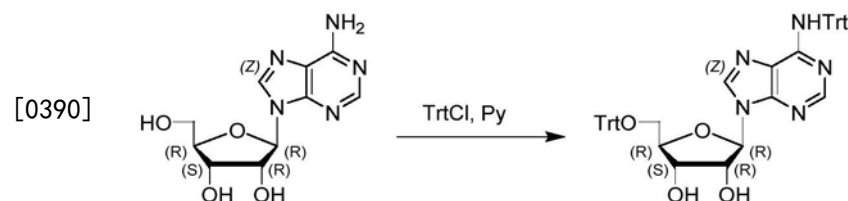
下搅拌2h。反应完成后,将混合物在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过制备型HPLC纯化(柱:Boston Green ODS 150\*30 5 $\mu$ ;流动相:[水(0.075%TFA)-ACN];B%:55%-75%,9min)以给出呈白色固体的所希望的化合物(130mg,产率:36.6%,98.0%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>:799.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 7.20-7.33 (m, 15H), 4.86-5.76 (m, 10H), 3.50-4.29 (m, 3H), 2.40-2.62 (m, 2H), 1.88-2.09 (m, 12H)。

[0386] 步骤4. (2R,3R,4S,5S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(((苄氧基)((苄氧基)(羟基)磷酸基)甲基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



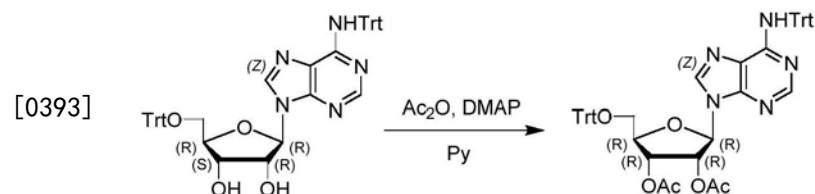
[0388] 将DABCO (40.0mg, 356.6 $\mu$ mol, 39.2 $\mu$ L) 添加到以上步骤3的产物 (250mg, 321.9 $\mu$ mol) 在甲苯 (6mL) 中的溶液中。将所得混合物在120 $^{\circ}$ C下搅拌2h。反应完成后,在真空下除去溶剂并且将残余物溶解在EtOAc (20mL) 中并且用1N HCl水溶液 (10mL) 洗涤。将水相用EtOAc (20mL) 萃取并且将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下蒸发以给出呈黄色浓浆的所希望的化合物 (220mg, 粗品)。将产物直接用于下一步骤。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>:686.9

[0389] 步骤5. (2R,3R,4S,5R)-2-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)-5-((三苯甲氧基)甲基)四氢呋喃-3,4-二醇的制备



[0391] 向腺嘌呤在吡啶 (100mL) 中的溶液中添加TrtCl (38.5g, 138.0mmol) 和DMAP (5.9g, 48.6mmol)。将混合物在80 $^{\circ}$ C下搅拌20h。将反应混合物浓缩以给出残余物。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化 (PE:EA=1:0至0:1, EA:MeOH=1:0至20:1) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (25.9g, 产率:53.5%)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>-</sup>:752.3。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 8.08 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.44-7.03 (m, 30H), 6.67 (br s, 1H), 5.89 (d, J=6.4Hz, 1H), 4.78 (br t, J=5.7Hz, 1H), 4.44 (br s, 1H), 4.30 (br d, J=4.4Hz, 1H), 3.49 (dd, J=3.4, 10.5Hz, 1H), 3.18 (dd, J=2.9, 10.8Hz, 1H)。

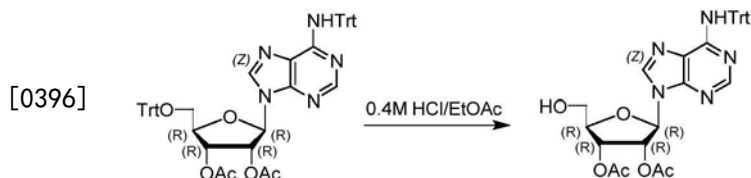
[0392] 步骤6. (2R,3R,4R,5R)-2-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)-5-((三苯甲氧基)甲基)四氢呋喃-3,4-二基二乙酸酯的制备



[0394] 将Ac<sub>2</sub>O (545.0mg, 5.34mmol, 500 $\mu$ L) 和DMAP (52mg, 425.6 $\mu$ mol) 添加到以上步骤5的产物 (1.6g, 2.13mmol) 在吡啶 (5mL) 中的溶液中。将所得混合物在15 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C下搅拌24h。反应完成后,通过添加MeOH (2mL) 将反应淬灭;将混合物在减压下浓缩。将残余物溶解在乙酸乙酯 (30mL) 中并且用1N HCl水溶液 (20mL) 洗涤。将有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下

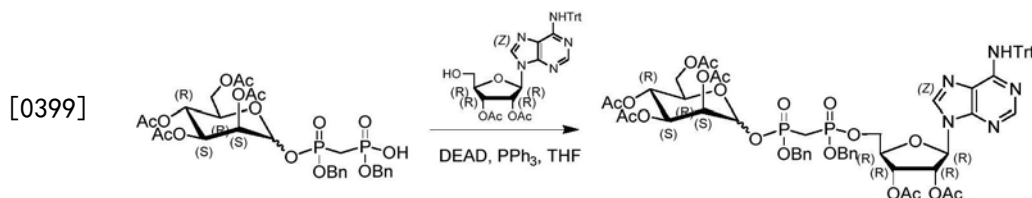
浓缩以给出粗产物,将其通过硅胶柱纯化(PE:EA=1:0至1:1)以得到呈白色泡沫的所希望的化合物(1.43g,产率:77.0%产率,95.8%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>:836.4。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 8.39 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.21-7.35 (m, 30H), 6.22 (d, J=5.4Hz, 1H), 6.12-6.17 (m, 1H), 5.68 (t, J=5.4Hz, 1H), 4.26 (q, J=4.4Hz, 1H), 3.28 (d, J=4.2Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 2.03 (s, 3H)。

[0395] 步骤7. (2R,3R,4R,5R)-2-(羟基甲基)-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-3,4-二基二乙酸酯的制备



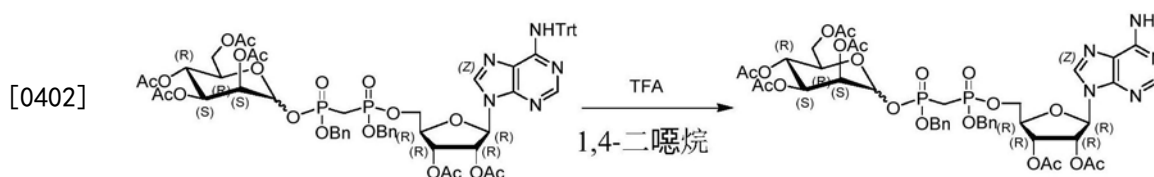
[0397] 向以上步骤6的产物(1.9g,2.3mmol)在EtOAc(76.5mL)中的溶液中添加HCl/EtOAc(4M,8.50mL)并且将反应混合物在15°C下搅拌2h。反应完成后,用Et<sub>3</sub>N将pH调节至7并且将反应混合物在减压下浓缩。将残余物溶解在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(10mL)中并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>(5mL)和盐水(5mL)洗涤。将有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过硅胶色谱法纯化(PE:EA=1:0至1:1)以得到呈白色固体的所希望的化合物(735mg,产率:49.6%,91%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>:594.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 8.50 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.39-7.16 (m, 9H), 6.21 (d, J=6.8Hz, 1H), 6.02-5.88 (m, 1H), 5.65-5.34 (m, 2H), 4.26-4.12 (m, 1H), 3.76-3.50 (m, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.99 (s, 3H)。

[0398] 步骤8. 2R,3R,4S,5S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(((苄氧基) (((苄氧基) ((2R,3R,4R,5R)-3,4-二乙酰氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲氧基)磷酸基)甲基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



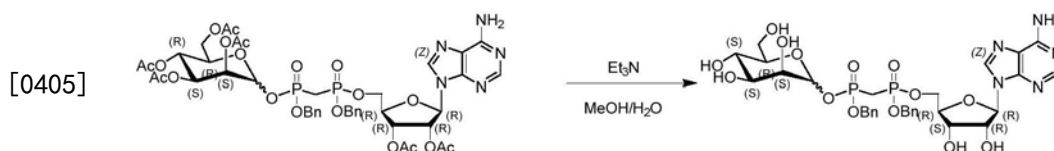
[0400] 将PPh<sub>3</sub>(221.7mg,845.1 $\mu$ mol)和DEAD(145.6mg,836.1 $\mu$ mol,152.0 $\mu$ L)顺序地添加到以上步骤4的产物(190mg,276.7 $\mu$ mol)和以上步骤7的产物(171.0mg,288.1 $\mu$ mol)在THF(3mL)中的溶液中。将所得混合物在40°C下搅拌2h。反应完成后,将混合物在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过制备型HPLC纯化(柱:Boston Green ODS 150\*30 5 $\mu$ ;流动相:[水(0.075%TFA)-ACN];B%:70%-80%,9min)以给出呈白色固体的所希望的化合物(120mg,产率:28.2%产率,82.0%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>:1262.3。

[0401] 步骤9. (2R,3R,4S,5S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(((苄氧基) (((苄氧基) ((2R,3R,4R,5R)-3,4-二乙酰氧基-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲氧基)磷酸基)甲基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



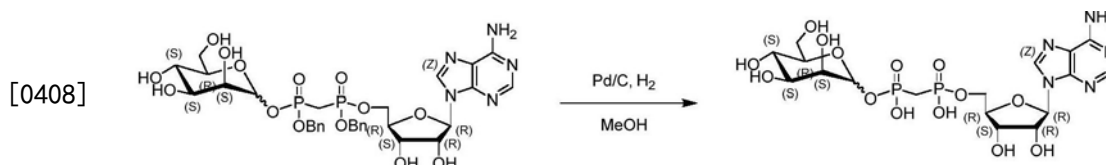
[0403] 将TFA (616.0mg, 5.4mmol, 400.0μL)添加到以上步骤8的产物 (120mg, 95.1μmol) 在1,4-二噁烷 (1.6mL) 中的溶液中。将混合物在25℃下搅拌3h。反应完成后,将混合物用EA (30mL) 稀释,并且用饱和NaHCO<sub>3</sub> (20mL x2) 洗涤,将有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下浓缩以得到呈黄色浓浆的所希望的化合物 (110mg, 粗品),将其直接用于下一步骤。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 1020.5

[0404] 步骤10. ((3S,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基) (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基) (苄氧基) 磷酰基) 甲基) 磷酸苄酯的制备



[0406] 将以上步骤9的产物 (30mg, 29.4μmol) 在MeOH (1.4mL)、Et<sub>3</sub>N (0.6mL) 和H<sub>2</sub>O (0.2mL) 中的溶液在25℃下搅拌1h。反应完成后,将反应在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过制备型HPLC纯化(柱: Boston Green ODS 150\*30 5μ; 流动相: [水 (0.075% TFA) -ACN]; B%: 24%-44%, 9min) 以得到呈白色固体的所希望的化合物 (8mg, 产率: 35.4% 产率, 99.9% 纯度)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup>: 517.1/604.2。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>) δ 8.71 (br s, 1H), 8.24 (br s, 1H), 7.27-7.32 (m, 10H), 6.04 (d, J=4.4Hz, 1H), 5.26-5.31 (m, 1H), 4.99-5.16 (m, 6H), 4.91-4.92 (m, 1H), 4.49-4.64 (m, 1H), 4.37-4.44 (m, 1H), 4.26-4.36 (m, 1H), 4.16-4.26 (m, 2H), 3.60-3.94 (m, 3H), 2.56-2.76 (m, 2H)。

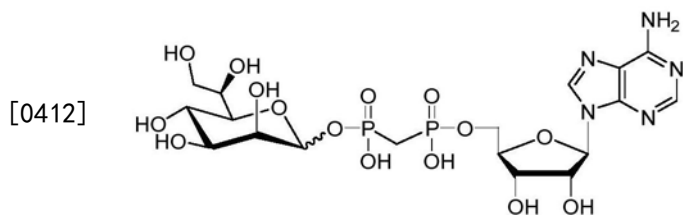
[0407] 步骤11. ((3S,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基氢) (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基) (羟基) 磷酰基) 甲基) 磷酸酯的制备



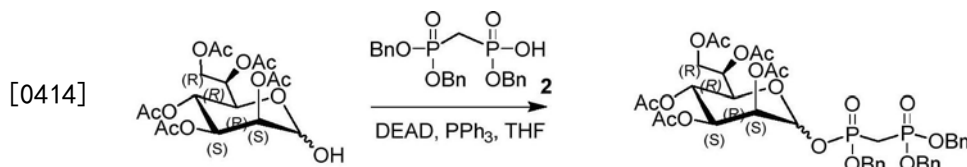
[0409] 在N<sub>2</sub>下向以上步骤10的苄基产物 (6mg, 7.8μmol) 在MeOH (2mL) 中的溶液中添加干Pd/C (10mg, 10% 纯度)。将悬浮液在真空下脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫若干次。将混合物在H<sub>2</sub> (15psi) 下在25℃下搅拌2h。反应完成后,将混合物过滤,并且将滤液在减压下浓缩以给出呈白色固体的所希望的化合物 (4mg)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup>: 337.0120/424.0460; MS (ESI) m/z (M+H)<sup>-</sup>: 426.0591。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.38 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 5.97 (d, J=5.87Hz, 1H), 5.14 (d, J=1.00Hz, 1H), 4.79-4.91 (m, 1H), 4.38-4.44 (m, 1H), 4.17-4.28 (m, 2H), 3.97-4.05 (m, 2H), 3.60-3.74 (m, 5H), 1.99-2.04 (m, 2H)。

[0410] 化合物8

[0411] ((3S,4S,5S,6R)-6-((R)-1,2-二羟基乙基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基氢) (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基) (羟基) 磷酰基) 甲基) 磷酸酯

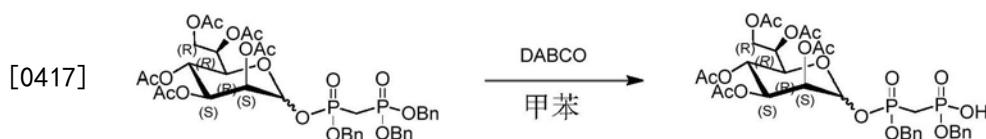


[0413] 步骤1. (3S,4S,5R,6R)-2-(((苄氧基)((双(苄氧基)磷酰基)甲基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



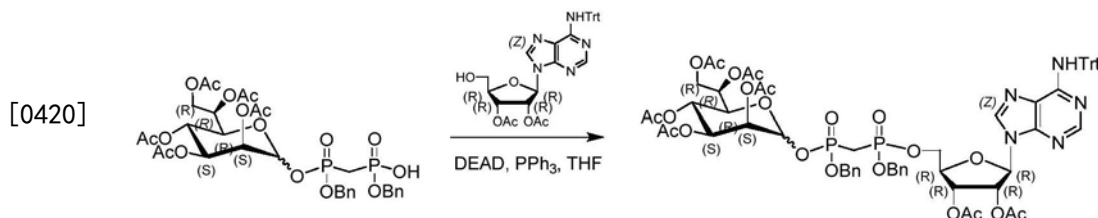
[0415] 将PPh<sub>3</sub> (540.0mg, 2.1mmol) 和DEAD (367.9mg, 2.1mmol, 384.0μL) 顺序地添加到以上化合物7的制备中的步骤2的产物 (300mg, 672.1μmol) 和 (2R,3R,4S,5S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-羟基四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯 (300.0mg, 713.7μmol) 在THF (10mL) 中的溶液中。将所得混合物在40℃下搅拌2h。反应完成后,将混合物在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过制备型HPLC纯化(柱:Boston Green ODS 150\*30 5μ;流动相:[水(0.075%TFA)-ACN];B%:58%-74%,8min)以得到呈白色固体的所希望的化合物(188mg, 产率:28.6%产率,87.0%纯度)。MS (ESI) m/z (M+Na)<sup>+</sup>:871.5

[0416] 步骤2. (3S,4S,5R,6R)-2-(((苄氧基)((苄氧基)羟基)磷酰基)甲基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0418] 将DABCO (36.4mg, 324.0μmol) 添加到以上步骤1的产物 (250mg, 294.6μmol) 在甲苯 (6mL) 中的溶液中。将所得混合物在120℃下搅拌2h。反应完成后,在真空下除去溶剂并且将残余物溶解在EtOAc (20mL) 中并且用1N HCl水溶液 (10mL) 洗涤。将水相用EtOAc (20mL) 萃取并且将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下蒸发以给出呈黄色浓浆的所希望的化合物 (220mg, 粗品)。将粗产物直接用于下一步骤。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>:759.5

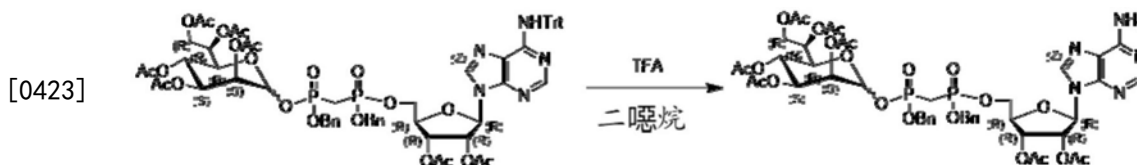
[0419] 步骤3. 3S,4S,5R,6R)-2-(((苄氧基)((苄氧基)((2R,3R,4R,5R)-3,4-二乙酰氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢咪喃-2-基)甲氧基)磷酰基)甲基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0421] 将PPh<sub>3</sub> (210.0mg, 800.6μmol) 和DEAD (143.7mg, 825.1μmol, 150.0μL) 顺序地添加到以上化合物7的制备中的步骤7的产物 (172.2mg, 290.0μmol) 和以上步骤2的产物 (200mg, 263.6μmol) 在THF (5mL) 中的溶液中。将所得混合物在40℃下搅拌2h。反应完成后,将混合物

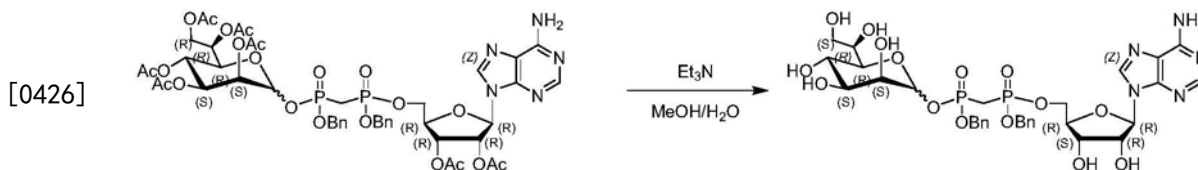
在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过制备型HPLC纯化(柱:Boston Green ODS 150\*30 5u;流动相:[水(0.075%TFA)-ACN];B%:71%-85%,9min)以得到呈白色固体的所希望的化合物(117mg,产率:29.9%,90.0%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>:1334.3

[0422] 步骤4. (3S,4S,5R,6R)-2-(((苄氧基) (((苄氧基) (((2R,3R,4R,5R)-3,4-二乙酰氧基-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基) 四氢呋喃-2-基) 甲氧基) 磷酰基) 甲基) 磷酰基) 氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



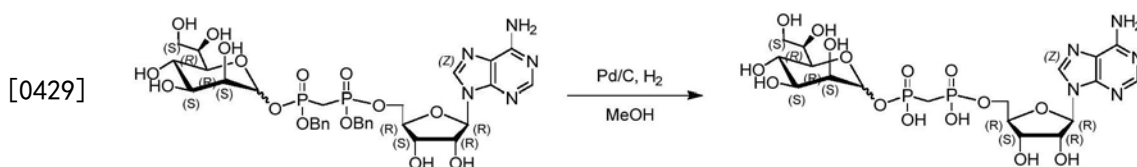
[0424] 将TFA(1.23g,10.8mmol,800μL)添加到以上步骤3的产物(113mg,84.7μmol)在二噁烷(1.2mL)中的溶液中。将混合物在40℃下搅拌1.5h。反应完成后,将混合物用EA(30mL)稀释,并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>(20mL x 2)洗涤,将有机相经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下浓缩以得到呈白色固体的所希望的化合物(110mg,粗品)。将粗产物直接用于下一步骤。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>:1092.2

[0425] 步骤5. ((3S,4S,5S,6R)-6-((R)-1,2-二羟基乙基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基) (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (苄氧基) 磷酰基) 甲基) 磷酸苄酯的制备



[0427] 将以上步骤4的产物(105mg,96.2μmol)在MeOH(3.5mL)、Et<sub>3</sub>N(0.5mL)和H<sub>2</sub>O(0.5mL)中的溶液在25℃下搅拌1h。反应完成后,将混合物在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过制备型HPLC纯化(柱:Boston Green ODS 150\*30 5u;流动相:[水(0.075%TFA)-ACN];B%:30%-50%,7.5min)以得到呈白色固体的所希望的化合物(16mg,20.0μmol,产率:20.7%,99.4%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>:547.1/604.1

[0428] 步骤6. (3S,4S,5S,6R)-6-((R)-1,2-二羟基乙基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基氢 (((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 磷酰基) 甲基) 磷酸酯的制备

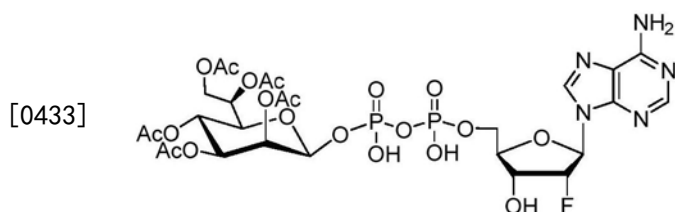


[0430] 在N<sub>2</sub>下向以上步骤5的产物(14mg,17.6μmol)在MeOH(2.5mL)中的溶液中添加干Pd/C(20mg,10%纯度)。将悬浮液在真空下脱气并且用H<sub>2</sub>吹扫若干次。将混合物在H<sub>2</sub>(15psi)下在25℃下搅拌2h。反应完成后,将混合物过滤,并且将滤液在减压下浓缩以给出呈白色固体的所希望的化合物(10mg,16.2μmol)。MS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>:366.4/423.8

[0431] 化合物9

[0432] 2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-羟基四氢呋喃-2-

基) 甲氧基) (羟基) 磷酸基) 氧基) (羟基) 磷酸基) 氧基) -6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

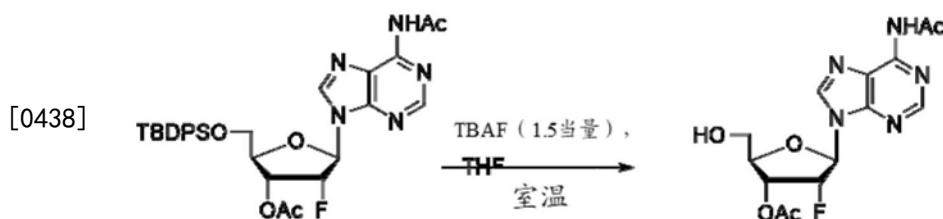


[0434] 步骤1. (2R,3R,4R,5R)-5-(6-乙酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-2-(((叔丁基二苯基甲硅烷基)氧基)甲基)-4-氟四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



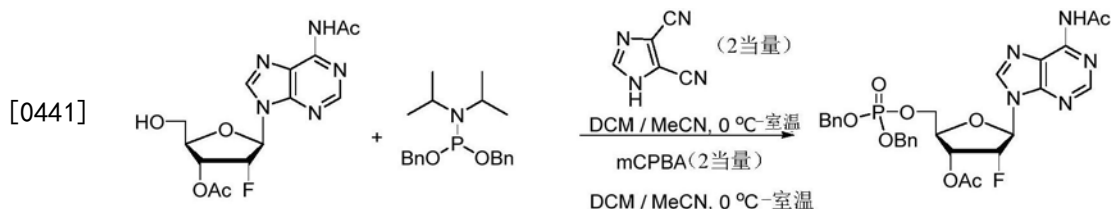
[0436] 在室温下向 (2R,3R,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2-((羟基甲基)四氢呋喃-3-醇)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2-((羟基甲基)四氢呋喃-3-醇) (389mg, 1.44mmol) 在吡啶 (3mL) 中的搅拌溶液中添加 DMAP (18mg, 0.14mmol)。将溶液加热至 50°C。在此温度下添加 TBDPSCI (594mg, 2.16mmol) 并且将反应在此温度下搅拌过夜。LC-MS 显示没有剩余 SM。向溶液中逐滴添加 Ac<sub>2</sub>O (642μL, 6.85mmol)。在此温度下搅拌 5h 后, LC-MS 显示形成所希望的化合物。将反应分配在 DCM 与水之间。将合并的提取物用 H<sub>2</sub>O 和盐水洗涤, 并且经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。将滤液在减压下浓缩以给出呈白色泡沫的所希望的化合物 (531mg, 0.90mmol)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 592。

[0437] 步骤2. (2R,3S,4S,5R)-5-(6-乙酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2-((羟基甲基)四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



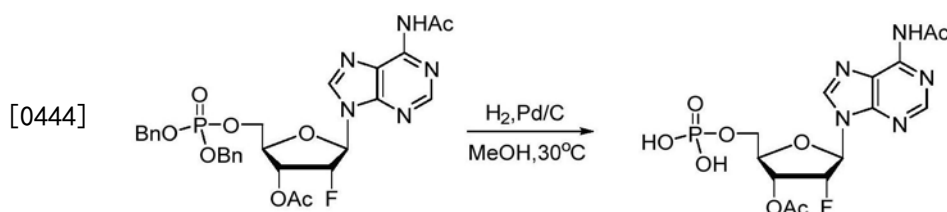
[0439] 在室温下向以上步骤1的产物化合物 (531mg, 0.90mmol) 在 THF (4mL) 中的搅拌溶液中添加 TBAF (在 THF 中 1M, 1.4mL, 1.35mmol)。搅拌过夜后, 将反应用饱和 NH<sub>4</sub>Cl 淬灭。将反应分配在 DCM 与水之间。将合并的提取物用盐水洗涤并且经 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥。将滤液在减压下浓缩以给出油状残余物, 将其通过快速色谱法在硅胶上用 DCM/MeOH (20:1) 洗脱而纯化以给出呈白色泡沫的所希望的化合物 (96mg, 0.27mmol)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 354。

[0440] 步骤3. (2R,3R,4R,5R)-5-(6-乙酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-2-(((双(苄氧基)磷酸基)氧基)甲基)-4-氟四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



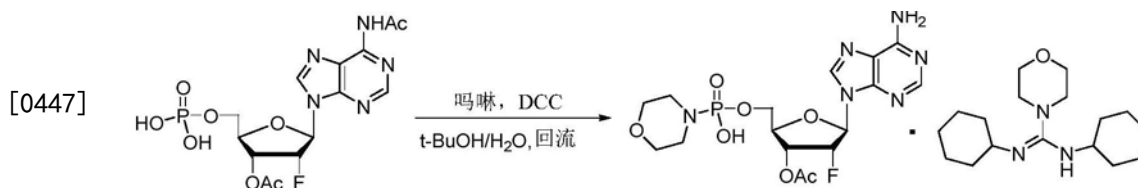
[0442] 在氮气气氛下向25mL圆形烧瓶中装入来自以上步骤2的产物化合物(96mg, 0.27mmol)和1H-咪唑-4,5-二甲腈(64mg, 0.54mmol)。添加干DCM和MeCN(DCM:MeCN=5:1, v/v)。将所得溶液在冰-水浴中冷却并且添加二苄基二异丙基亚磷酰胺(188mg, 0.54mmol)。将反应温热至室温后,将其搅拌另外2h。将反应再次在冰-水浴中冷却并且直接添加mCPBA(110mg, 0.54mmol)。将其温热至室温后,LC-MS指示形成作为主要产物的所希望的化合物。添加饱和NaHCO<sub>3</sub>(水溶液)以将反应淬灭并且分离有机相。将水相用DCM萃取两次。将合并的提取物用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤,并且经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥。将滤液在减压下浓缩以给出油状物,将其通过硅胶快速色谱法纯化以给出所希望的所希望的化合物(126mg, 0.21mmol)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 612。

[0443] 步骤4. (2R, 3S, 4S, 5R) -5-(6-乙酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2-((磷酰氧基)甲基)四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



[0445] 在室温下在H<sub>2</sub>下将以上步骤3的产物化合物(126mg, 0.21mmol)和Pd/C(132mg)在MeOH(4mL)中的混合物搅拌。搅拌过夜后,将混合物用MeOH通过具有0.45μm孔径的Advantec PTFE膜过滤器过滤。将滤液在减压下浓缩以得到所希望的化合物(90mg, 0.21mmol)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 434。

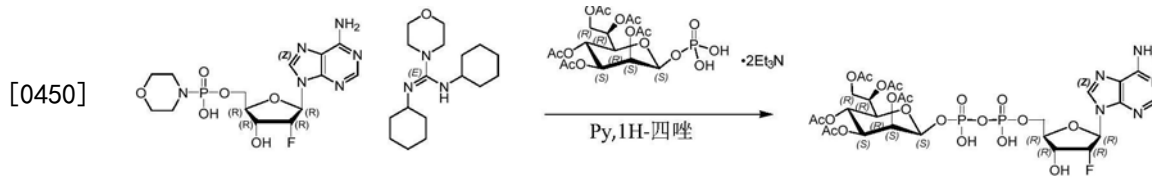
[0446] 步骤5. 吗啡DCC盐(2R, 3R, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2-(((羟基(吗啉代)磷酰基)氧基)甲基)四氢呋喃-3-基乙酸酯的制备



[0448] 将DCC(173mg, 0.84mmol)在叔丁醇(5mL)中的溶液逐滴添加到以上步骤4的产物化合物(90mg, 0.21mmol)在t-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)(10mL)的混合物中的回流溶液和纯化吗啉(113mg, 1.30mmol)中。添加在3h内完成,并且将混合物回流过夜直到TLC显示反应完成。将混合物冷却至室温。将滤液蒸发直到t-BuOH被大部分除去,并且将剩余的水相用醚萃取三次。然后将澄清的水溶液通过冷冻干燥蒸发至干燥以给出呈DCC盐的所希望的化合物(133mg, 90%产物)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 419。

[0449] 步骤6. (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3R, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-3-羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-

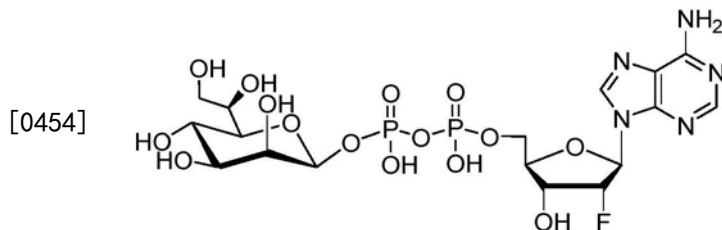
## 1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



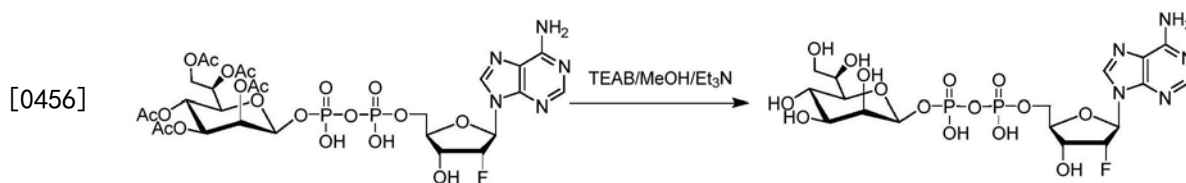
[0451] 使以上步骤5的产物化合物 (152mg, 213 $\mu$ mol) 和以上化合物1的制备中的步骤14的产物化合物 (100mg, 142 $\mu$ mol) 混合物经受用无水吡啶 (3mL x 3) 的共沸脱水。然后将溶剂溶解在吡啶 (2mL) 中, 并且添加2H-四唑 (49.84mg, 711.52 $\mu$ mol)。将反应混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌3天。在减压下除去溶剂。并且将残余物通过硅胶柱色谱法纯化 (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O=1:0:0:0至50:50:1) 以给出粗产物 (200mg), 将其通过制备型HPLC纯化 (柱:Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ , 水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN, 0%至30%) 以得到呈淡黄色固体的标题化合物 (35mg, 28.2%产率, 95.2%纯度)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 832.2。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>)  $\delta$  8.60 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 6.36-6.26 (m, 1H), 5.62-5.52 (m, 2H), 5.38-5.33 (m, 0.5H), 5.24-5.21 (m, 0.5H), 5.20-5.15 (m, 3H), 4.72-4.63 (m, 1H), 4.46-4.38 (m, 2H), 4.32-4.20 (m, 3H), 3.94-3.89 (m, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.90 (s, 3H)。

[0452] 化合物10

[0453] 腺苷-2'-氟-5'-(D-甘油- $\beta$ -D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯



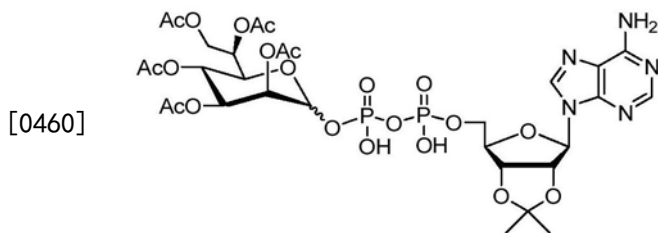
[0455] 步骤1. 腺苷-2'-氟-5'-(D-甘油- $\beta$ -D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯的制备



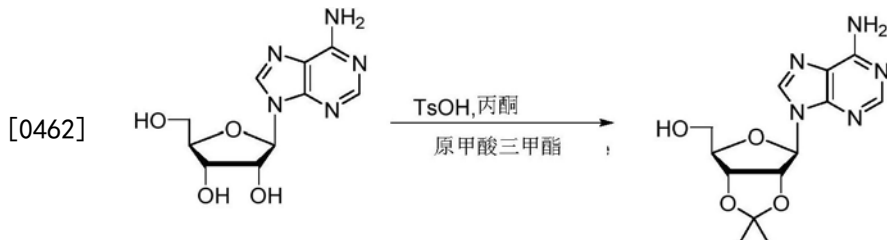
[0457] 将在3mL溶剂 (由TEAB (0.1M, 16.00mL)、MeOH (12mL) 和Et<sub>3</sub>N (145mg, 1.44mmol, 200 $\mu$ L) 组成) 中的以上化合物9的制备中的步骤6的产物化合物 (10mg, 12.0 $\mu$ mol) 在-28 $^{\circ}$ C下搅拌40h。反应完成后, 将混合物在冷冻干燥器上直接冻干以得到呈淡黄色固体的所希望的化合物 (7mg, 产率: 38.5%, 54.5%纯度, 呈2Et<sub>3</sub>N盐)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup>: 619.8。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.28 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 6.30-6.24 (m, 1H), 5.36-5.30 (m, 1H), 5.23-5.17 (m, 1H), 5.06-5.00 (m, 1H), 4.56-4.51 (m, 3H), 4.47-4.42 (m, 1H), 4.2-4.18 (m, 2H), 4.14-4.04 (m, 3H), 3.85-3.80 (m, 1H)。

[0458] 化合物11

[0459] (2S, 3S, 4S, 5R, 6R)-2-(((((((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

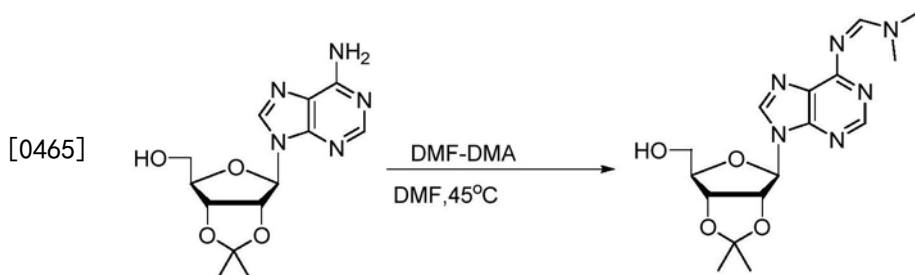


[0461] 步骤1. ((3aS,4R,6R,6aS)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲醇的制备



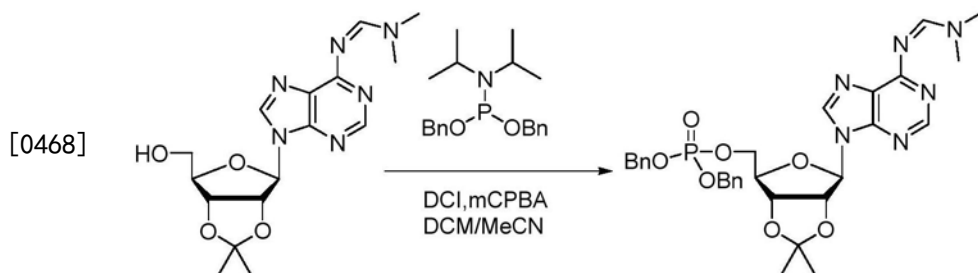
[0463] 将腺苷(2.5g,9.36mmol)悬浮在含有对甲苯磺酸一水合物(8g,42.1mmol)的干燥丙酮(100mL)中。然后在环境温度下在剧烈搅拌下经1h的时间段添加原甲酸三甲酯(6.6mL,60.8mmol)以给出澄清溶液并且然后过一会儿形成白色固体。将混合物搅拌过夜。用饱和碳酸钾水溶液调节混合物pH=8。滤出沉淀物,将滤液蒸发并且将残余物用EA萃取。将合并的有机相用饱和碳酸钾水溶液和水洗涤,干燥并且浓缩。将粗品磨碎(PE:EA=10:1)以得到所希望的化合物(2.6g,8.47mmol)。MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:308。

[0464] 步骤2. (Z)-N'-((3aS,4R,6R,6aS)-6-(羟基甲基)-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)-9H-嘌呤-6-基)-N,N-二甲基甲脒的制备



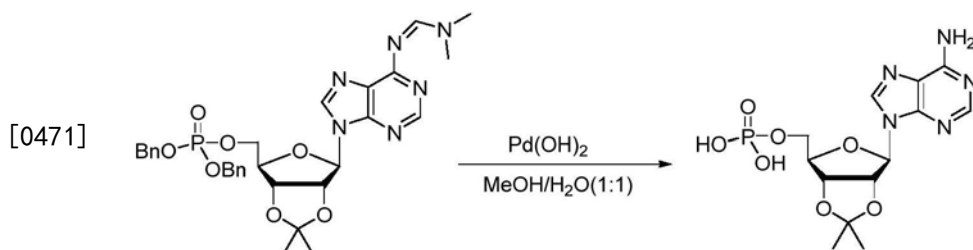
[0466] 在室温下向以上步骤1的产物化合物(1g,3.26mmol)在DMF(2mL)中的搅拌溶液中添加DMF-DMA(1.64mL,12.04mmol)。将溶液加热至45°C持续1h。LC-MS显示形成所希望的化合物。然后真空除去溶剂,并且将残余物用DCM吸收,用盐水洗涤,经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且蒸发至干燥。将干燥的产物通过硅胶快速色谱法纯化以给出所希望的化合物(750mg,2.07mmol)。MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:363。

[0467] 步骤3. (((3aS,4R,6R,6aS)-6-(6-(((Z)-((二甲基氨基)亚甲基)氨基)-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基)磷酸二苄酯的制备



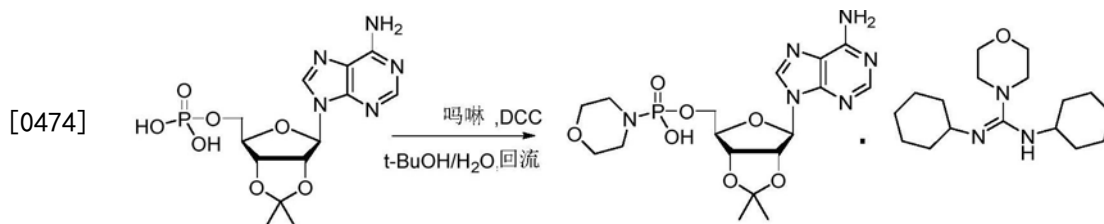
[0469] 在0℃下向以上步骤2的产物化合物(400mg, 1.10mmol)在DCM/MeCN(6mL)中的搅拌溶液中添加DCI(260mg, 2.20mmol)、mCPBA(447mg, 2.20mmol)和二苄基二异丙基亚磷酰胺(760mg, 2.20mmol)。然后将反应在室温下搅拌过夜。LC-MS显示反应完成。将反应混合物浓缩,将残余物通过快速色谱法在硅胶上用DCM/MeOH(30:1)洗脱而纯化以给出呈无色胶状物的所希望的化合物(609mg, 0.98mmol)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 623。

[0470] 步骤4. ((3aS, 4R, 6R, 6aS)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基二氢磷酸酯的制备



[0472] 将以上步骤3的产物化合物(609mg, 0.98mmol)和Pd(OH)<sub>2</sub>(200mg)在MeOH/H<sub>2</sub>O(10mL)中的混合物在室温下在H<sub>2</sub>下搅拌。搅拌过夜后,将混合物用MeOH通过具有0.45μm孔径的Advantec PTFE膜过滤器过滤。将滤液在减压下浓缩以得到所希望的化合物(383mg, 0.99mmol)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 388。

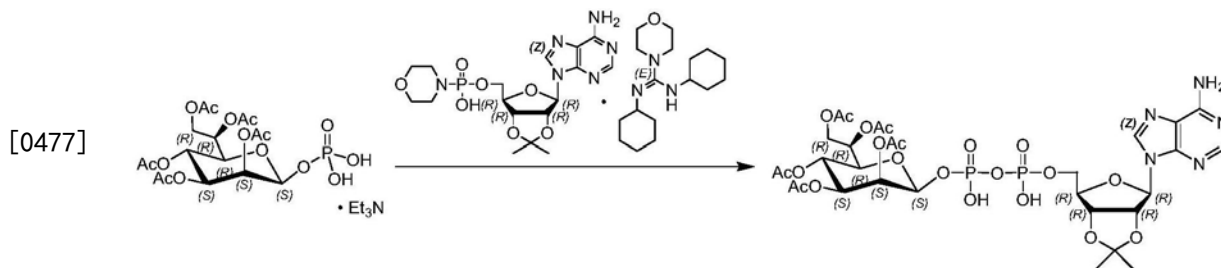
[0473] 步骤5. ((3aS, 4R, 6R, 6aS)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基二氢磷酸酯的喹啉DCC盐的制备



[0475] 将DCC(825mg, 4.00mmol)在叔丁醇(20mL)中的溶液逐滴添加到以上步骤4的产物化合物(383mg, 0.99mmol)在t-BuOH/H<sub>2</sub>O(1:1)(20mL)的混合物中的回流溶液和纯化喹啉(384mg, 4.00mmol)中。添加在约3h内完成,并且将混合物回流过夜直到TLC显示反应完成。将混合物冷却至室温。将滤液蒸发直到t-BuOH被大部分除去,并且将剩余的水相用醚萃取三次。然后将澄清的水溶液通过冷冻干燥蒸发至干燥以给出所希望的产物。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 457。

[0476] 步骤6. (2S, 3S, 4S, 5R, 6R)-2-(((((((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙

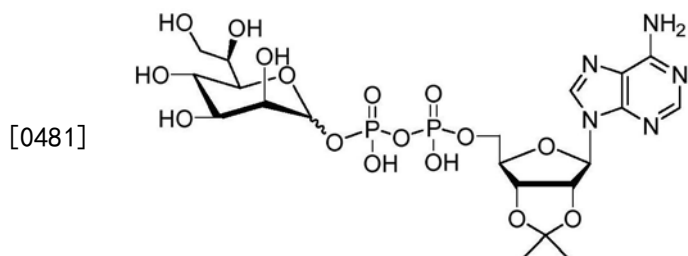
## 酸酯的制备



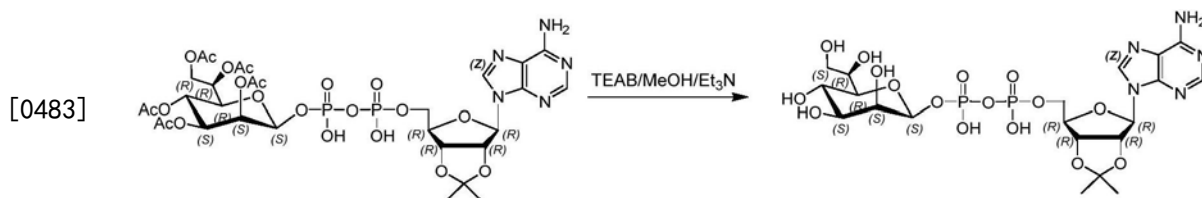
[0478] 将以上化合物1的制备中的步骤14的产物化合物 (200mg, 284.61 $\mu$ mol, 呈2Et<sub>3</sub>N) 和以上步骤5的产物化合物 (389.68mg, 853.82 $\mu$ mol) 的混合物用干吡啶 (“Py”) (5mL x 3) 干燥。然后将残余物溶解在吡啶 (5mL) 中并且与1H-四唑 (99.69mg, 1.42mmol) 混合, 在25 $^{\circ}$ C下搅拌72h。除去溶剂以给出残余物, 将其通过硅胶柱色谱法纯化 (DCM:MeOH:NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O 1:0:0至30:50:1) 以给出不纯的产物 (200mg), 将其通过制备型HPLC纯化 (柱:Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ , 条件:水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN, 3%至33%) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (50mg, 产率:19.6%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 870.3。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>)  $\delta$  8.59 (s, 1H), 8.21 (s, 1H), 6.22 (d, J=3.4Hz, 1H), 5.58-5.52 (m, 2H), 5.27 (dd, J=3.3, 6.0Hz, 1H), 5.22-5.14 (m, 4H), 4.53 (br s, 1H), 4.41 (dd, J=3.4, 12.0Hz, 1H), 4.27-4.13 (m, 3H), 3.91 (dd, J=2.9, 9.8Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.03 (d, J=3.7Hz, 6H), 1.99 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.39 (s, 3H)。

[0479] 化合物12

[0480] ((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基) 甲醇 (D-甘油- $\beta$ -D-甘露庚吡喃糖基) 二磷酸酯



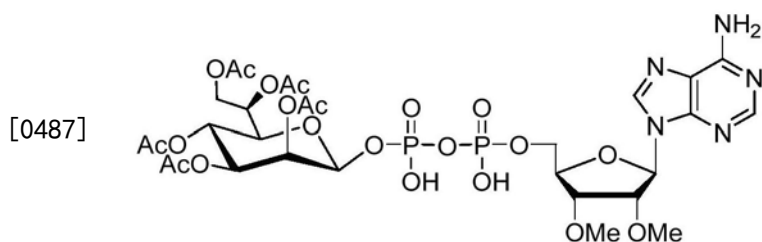
[0482] 步骤1. ((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基) 甲醇 (D-甘油- $\beta$ -D-甘露庚吡喃糖基) 二磷酸酯的制备



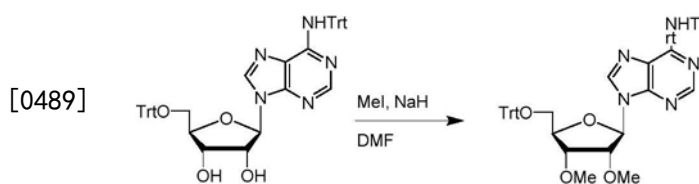
[0484] 将以上化合物11的制备中的步骤6的产物化合物 (10mg, 11.50 $\mu$ mol) 溶解在2mL由TEAB (8mL)、MeOH (6mL) 和Et<sub>3</sub>N (0.1mL) 组成的混合溶剂中。将获得的溶液在-28 $^{\circ}$ C下搅拌46h。将反应在冷冻干燥器上冻干。获得呈白色固体的所希望的化合物 (9mg, 产率:70.84%, 呈2.6Et<sub>3</sub>N盐)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup>: 657.9。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.28 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 6.13 (d, J=3.2Hz, 1H), 5.23 (br d, J=3.4Hz, 1H), 5.13-4.97 (m, 2H), 4.01 (br s, 2H), 3.92-3.78 (m, 1H), 3.66-3.42 (m, 4H), 3.33-3.23 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 1.29 (s, 3H)。

[0485] 化合物13

[0486] (2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3R,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二甲氧基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

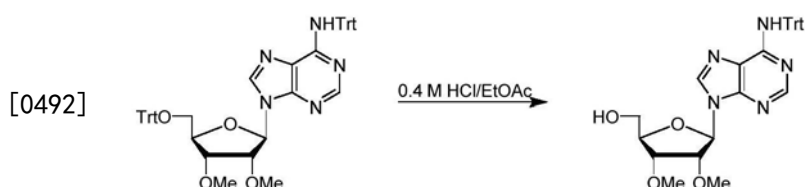


[0488] 步骤1.9-((2R,3R,4R,5R)-3,4-二甲氧基-5-((三苯甲氧基)甲基)四氢呋喃-2-基)-N-三苯甲基-9H-嘌呤-6-胺的制备



[0490] 向以上化合物7的制备中的步骤5的产物(20g, 18.62mmol)在DMF(100mL)中的溶液中添加NaH(1.71g, 42.83mmol, 60%),在0℃下搅拌30min后,在0℃下添加CH<sub>3</sub>I(7.85g, 55.31mmol, 3.44mL)。将混合物在25℃下搅拌4h。将反应混合物用0℃的H<sub>2</sub>O(200mL)淬灭,用EA(100mL x 3)萃取,将合并的有机层用盐水(200mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且浓缩以给出残余物。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化(PE:EA=1:0至2:1)。获得呈白色固体的所希望的化合物(7.3g, 产率:39.57%)。MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:780.3。

[0491] 步骤2.((2R,3R,4R,5R)-3,4-二甲氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲醇的制备



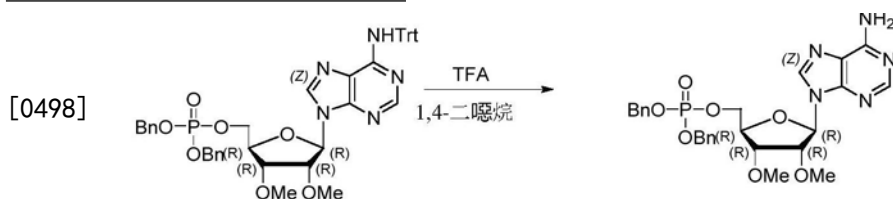
[0493] 向以上步骤1的产物(3.81g, 3.85mmol)在EtOAc(126mL)中的溶液中添加HCl/EtOAc(4M, 14mL)。将反应混合物在20℃下搅拌0.5h。用Et<sub>3</sub>N(5mL)将pH调节至7并且将反应混合物在减压下浓缩。将残余物溶解在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(30mL)中并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>(20mL x 3)和盐水(20mL x 2)洗涤。将有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下浓缩。将粗产物通过硅胶柱纯化(PE:EA=1:0至1:1,然后PE:EA=0:1)以给出呈白色固体的所希望的化合物(1.23g, 2.25mmol, 58.62%产率)MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:538.3。

[0494] 步骤3.(((2R,3R,4R,5R)-3,4-二甲氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲基)磷酸二苄酯的制备



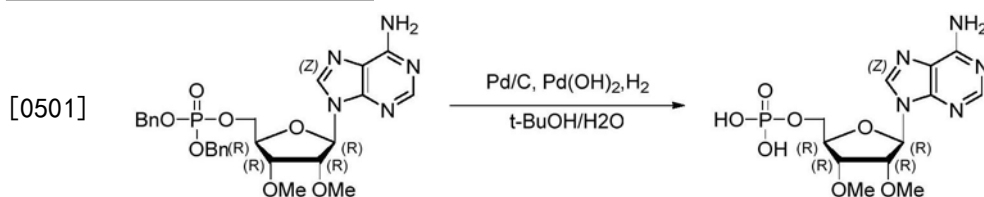
[0496] 在0℃下在氮气下向以上步骤2的产物(2.03g, 3.78mmol)和1H-咪唑-4,5-二甲腈(892mg, 7.55mmol, 2当量)在DCM(40mL)和CH<sub>3</sub>CN(8mL)中混合物中添加二苄基二异丙基亚磷酸酰胺(2.61g, 7.55mmol, 2.53mL)。将混合物在0℃下搅拌5min, 然后将其温热至25℃并且在25℃下搅拌1h。将混合物冷却至0℃并且在0℃下分批添加m-CPBA(1.63g, 7.55mmol, 80%纯度)。添加后, 将混合物在25℃下搅拌0.25h。添加35mL饱和NaHCO<sub>3</sub>并且将混合物用DCM(40mL x 3)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并且在真空下浓缩。将残余物通过硅胶色谱法纯化(200-300目, 20%-55%乙酸乙酯/石油醚梯度的洗脱液)。获得呈无色胶状物的所希望的化合物(2.54g, 产率: 79.92%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 798.2。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.00-7.98 (m, 2H), 7.33-7.25 (m, 25H), 6.97 (s, 1H), 6.03-6.02 (m, 1H), 5.07-5.01 (m, 4H), 4.51 (t, J = 4.4Hz, 1H), 4.31-4.24 (m, 3H), 4.00-3.97 (m, 1H), 3.37 (s, 3H), 3.35 (s, 3H)。

[0497] 步骤4. ((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二甲氧基四氢呋喃-2-基)甲基二苄基磷酸酯的制备



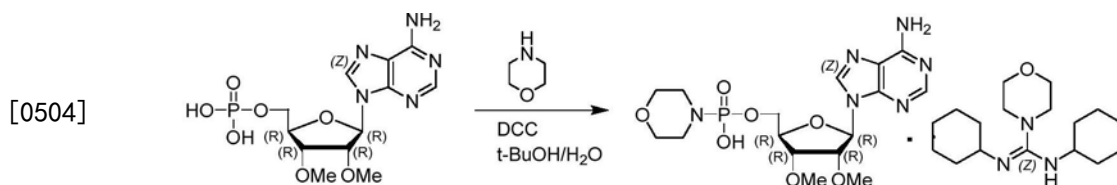
[0499] 将以上步骤3的产物(2.54g, 3.18mmol)溶解在二噁烷(15mL)中。添加TFA(5mL, 67.53mmol)并且将混合物在40℃下搅拌6h。将饱和NaHCO<sub>3</sub>(-50mL)添加到混合物中直到pH = 8。将混合物用乙酸乙酯(50mL x 4)萃取。将合并的有机层经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并且在真空下浓缩。将残余物通过快速硅胶色谱法纯化(ISCO®; 4g SepaFlash®二氧化硅快速柱, 0-10%甲醇/乙酸乙酯梯度的洗脱液, 在35mL/min下)。获得呈无色油状物的所希望的化合物(1.75g, 产率: 98.95%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 556.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.30 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.34-7.31 (m, 10H), 6.08-6.02 (m, 2H), 5.07-5.02 (m, 4H), 4.48-4.20 (m, 5H), 4.00-3.97 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.38 (s, 3H)。

[0500] 步骤5. ((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二甲氧基四氢呋喃-2-基)甲基二氢磷酸酯的制备



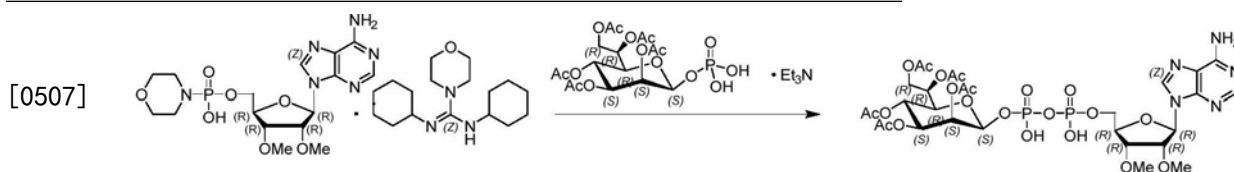
[0502] 将以上步骤4的产物的混合物(500mg, 900.0μmol)溶解在t-BuOH(20mL)和H<sub>2</sub>O(20mL)中, 添加Pd/C(100mg, 10%纯度)和Pd(OH)<sub>2</sub>(126mg, 89.72μmol, 10%纯度)并且将混合物在H<sub>2</sub>气氛(50psi)下在25℃下搅拌16h。过滤并且将滤液浓缩以给出呈无色油状物的所希望的化合物(400mg, 粗品)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.56 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 6.14 (d, J = 6.4Hz, 1H), 4.60-4.50 (m, 1H), 4.35-4.25 (m, 1H), 4.20-4.10 (m, 1H), 4.09-3.95 (m, 2H), 3.49 (s, 3H), 3.39 (s, 3H)。

[0503] 步骤6. ((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二甲氧基四氢呋喃-2-基)甲基氢吗啉代磷酸酯的制备



[0505] 将在t-BuOH (12mL) 中的DCC (836mg, 4.05mmol) 逐滴添加到以上步骤5的产物 (380mg, 1.01mmol) 和吗啉 (353mg, 4.05mmol) 在H<sub>2</sub>O (12mL) 和t-BuOH (12mL) 中的回流溶液 (110℃) 中。将混合物在110℃下搅拌12h。将溶液冷却至室温。滤出固体。收集滤液并且在真空中除去有机溶剂。收集剩余的水相, 并且将其用MTBE (10mL x 3) 洗涤。收集水相并且将其在真空中浓缩以得到呈淡黄色粘性油状物的所希望的化合物 (440mg, 粗品), 将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。

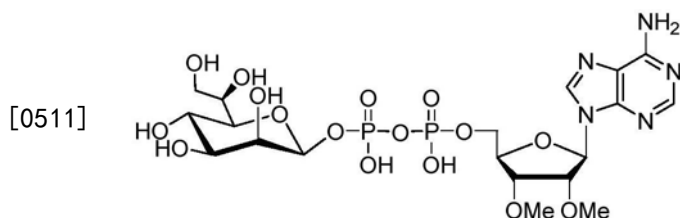
[0506] 步骤7. (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3R, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二甲氧基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) -6-((R) -1,2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



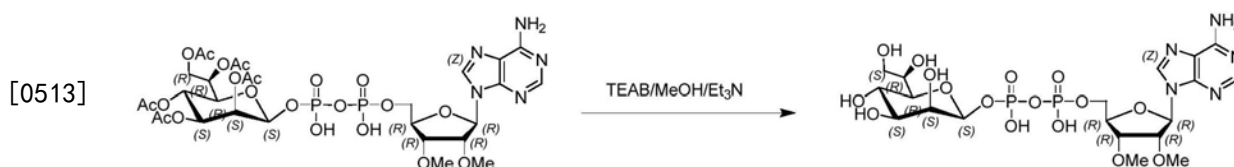
[0508] 将以上化合物1的制备中的步骤14的产物 (130mg, 309.3μmol) 和以上步骤6的产物 (390mg, 878.3μmol) 单独地用吡啶 (4mL x 3) 干燥。将残余物重新溶解在吡啶 (4mL) 中并且添加1H-四唑 (108mg, 1.55mmol)。将溶液在30℃下搅拌12h。在真空中除去溶剂。将残余物重新溶解在MeOH (10mL) 中。将溶液过滤。收集滤液并且将其浓缩。将残余物通过柱纯化 (DCM: (MeOH: NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O = 50:1) = 1:1) 以得到粗产物 (80mg), 将其通过制备型HPLC再纯化 (柱: Waters Xbridge 150\*25 5u; 流动相: [水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) - ACN]; B%: 0%-30%, 10min) 以得到呈白色固体的所希望的化合物 (30mg, 产率11.21%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 858.4。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.65 (s, 1H), 8.24 (s, 1H), 6.15-6.12 (m, 1H), 5.60-5.56 (m, 2H), 5.22-5.17 (m, 3H), 4.55-4.12 (m, 7H), 3.92-3.89 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.44 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.98 (s, 3H), 1.88 (s, 3H)。

[0509] 化合物14

[0510] 腺苷-2' 3' -二甲氧基-5' - (D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基) 二磷酸酯



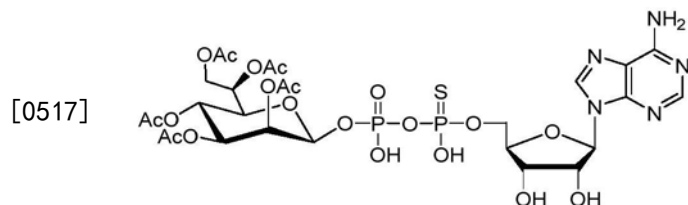
[0512] 步骤1. 腺苷-2' 3' -二甲氧基-5' - (D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基) 二磷酸酯的制备



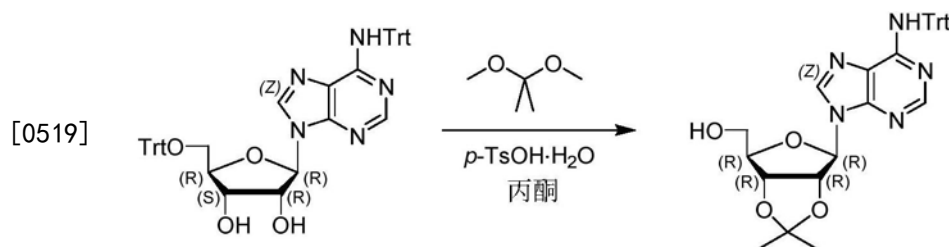
[0514] 将以上化合物13的制备中的步骤7的产物(8.4mg, 9.79 $\mu$ mol)在4mL缓冲液(TEAB(12mL):MeOH(9mL):TEA(0.15mL))中的溶液保持在-20 $^{\circ}$ C持续24h。将溶液在冻干下干燥以给出呈白色粘性固体的所希望的化合物(8mg, 产率:65.85%)。MS(ESI) m/z (M-H)<sup>+</sup>:645.9。

[0515] 化合物15

[0516] (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3S, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

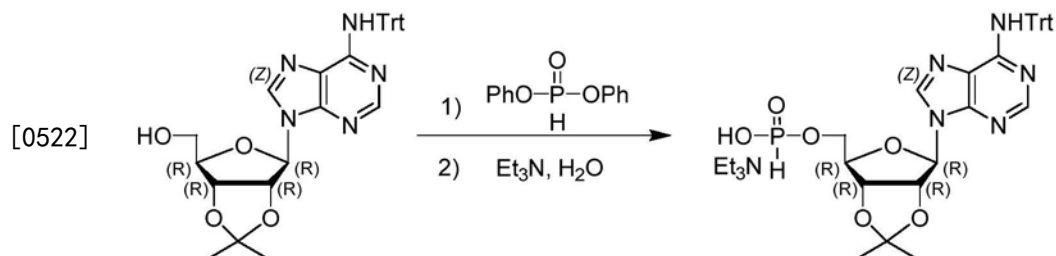


[0518] 步骤1. 化合物((3aR, 4R, 6R, 6aR) -2,2-二甲基-6-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲醇的制备



[0520] 向以上化合物7的制备中的步骤5的产物(37.4g, 49.8mmol)和2,2-二甲氧基丙烷(51.8g, 497mmol, 61.0mL)在丙酮(100mL)中的溶液中添加p-TsOH.H<sub>2</sub>O(11.4g, 59.7mmol)。将混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌16h。反应完成后,将混合物冷却至0 $^{\circ}$ C并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>(300mL)淬灭。将反应混合物用EA(200mL x 3)萃取,将合并的有机层用盐水(200mL)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且浓缩以给出残余物,将其通过硅胶柱纯化(PE:EA=1:0至2:3)以给出呈白色固体的所希望的化合物(9.96g, 产率:35.57%)。MS(ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>=550.1。<sup>1</sup>H NMR(400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$ 8.44(s, 1H), 7.92(s, 1H), 7.52(s, 1H), 7.34-7.18(m, 15H), 6.12(d, J=2.9Hz, 1H), 5.34(dd, J=2.8, 6.2Hz, 1H), 5.14(t, J=5.5Hz, 1H), 4.93(dd, J=2.7, 6.1Hz, 1H), 4.25-4.15(m, 1H), 3.60-3.42(m, 2H), 1.52(s, 3H), 1.30(s, 3H)。

[0521] 步骤2. 化合物((3aR, 4R, 6R, 6aR) -2,2-二甲基-6-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基氢磷酸酯三乙胺盐的制备

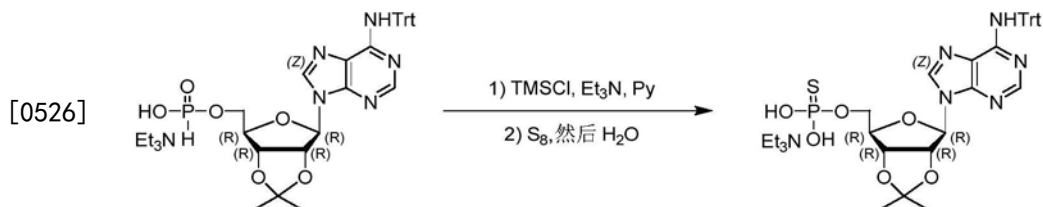


[0523] 将苯氧基膦酰氧基苯(3.41g, 14.6mmol)添加到以上步骤1的产物(2g, 3.64mmol)在吡啶(20mL)中的溶液中。将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌2h。然后添加Et<sub>3</sub>N(2.21g, 21.8mmol, 3.04mL)和H<sub>2</sub>O(786.9mg, 43.7mmol)。将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌0.5h。反应完成

后,将混合物直接在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过硅胶柱纯化(DCM:MeOH=1:0至10:1,添加0.5%Et<sub>3</sub>N)以给出呈黄色浓浆的所希望的化合物(2g,2.55mmol,70.0%产率,78%纯度)。

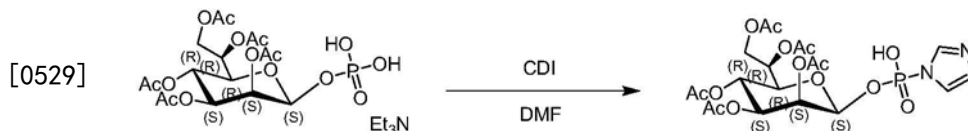
[0524] MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 614.1

[0525] 步骤3.0-(((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-二甲基-6-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基)硫代磷酸酯三乙胺盐的制备



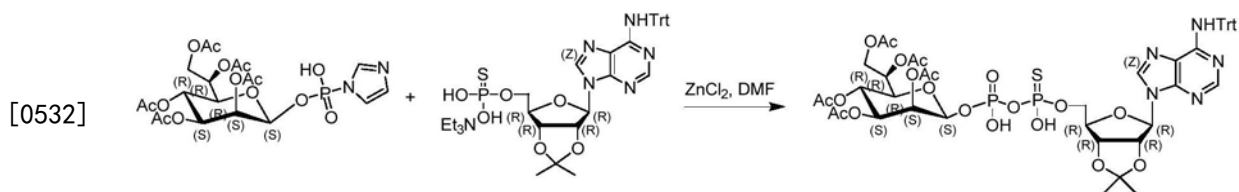
[0527] 在N<sub>2</sub>气氛下向以上步骤2的产物(1.5g,2.40mmol)在吡啶(6mL)和Et<sub>3</sub>N(6mL)中的溶液中经15min逐滴添加TMSCl(2.4mL,19.1mmol)。将混合物在0℃下搅拌1h,并且然后添加S(730mg,22.7mmol)。将混合物在0℃下搅拌另外45min。反应完成后,将反应用H<sub>2</sub>O(10mL)淬灭并且将混合物在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过硅胶色谱法(DCM:MeOH=20:1至10:1)和制备型HPLC(柱:Boston Prime C18 150\*30mm 5um;流动相:[水(0.05%氢氧化铵v/v)-ACN];B%:15%-45%,9min)纯化以得到呈白色固体的所希望的化合物(700mg,产率44.4%,86%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 646.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO)  $\delta$  8.71 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.39-7.12 (m, 15H), 6.12 (d, J=3.3Hz, 1H), 5.28 (dd, J=3.3, 5.8Hz, 1H), 5.07 (d, J=5.8Hz, 1H), 4.39 (br s, 1H), 3.95-3.84 (m, 1H), 3.73 (td, J=5.6, 10.9Hz, 1H), 1.56-1.48 (s, 3H), 1.31 (s, 3H)。

[0528] 步骤4. (2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-((羟基(1H-咪唑-1-基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0530] 在N<sub>2</sub>气氛下将CDI(945mg,5.83mmol)添加到以上化合物1的制备中的步骤14的产物化合物(350mg,0.58mmol)在无水DMF(15mL)中的溶液中。将所得混合物在25℃下搅拌3h。反应完成后,添加MeOH(0.2mL)以将反应淬灭,将混合物在减压下浓缩以给出所希望的粗产物(1g,粗品),将其直接用于下一步骤。

[0531] 步骤5. 化合物(2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-(((((((3aR,4R,6R,6aR)-2,2-二甲基-6-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备

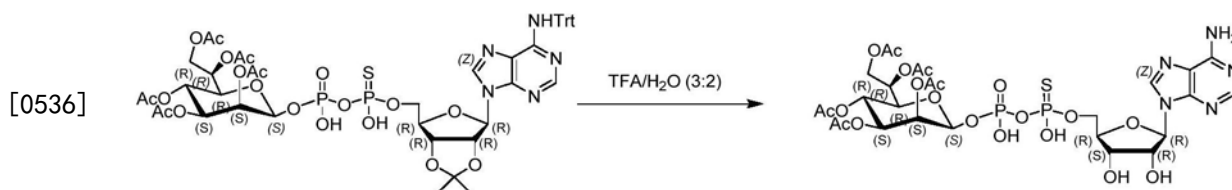


[0533] 在N<sub>2</sub>气氛下将ZnCl<sub>2</sub>(1g,7.34mmol)添加到来自以上步骤4的产物(320mg,

0.58mmol) 和来自以上步骤3的产物 (500mg, 0.67mmol) 在无水DMF (15mL) 中的溶液中。将所得混合物在25℃下搅拌16h。反应完成后, 将混合物在减压下浓缩以给出粗产物, 将其通过硅胶柱纯化 (DCM:MeOH=10:1, 添加0.5%Et<sub>3</sub>N) 以给出呈淡黄色固体的所希望的化合物 (600mg, 粗品), 将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。

[0534] MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 1128.6。

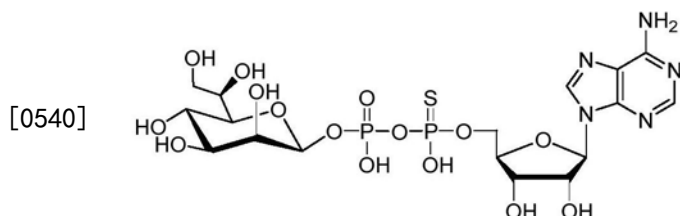
[0535] 步骤6. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3S, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3, 4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 硫代磷酰基) 氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) -6-((R) -1, 2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备



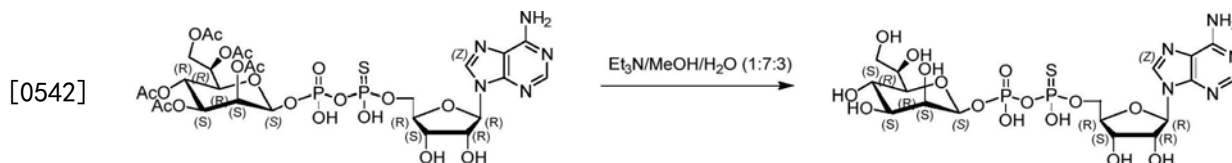
[0537] 将TFA (0.3mL, 4.05mmol) 添加到以上步骤5的产物化合物 (200mg, 粗品) 在H<sub>2</sub>O (2mL) 中的溶液中。将混合物在25℃下搅拌0.5h。反应完成后, 通过添加Et<sub>3</sub>N将反应调节至pH=7。将混合物在减压下浓缩以给出粗产物, 将其通过制备型HPLC纯化 (柱: Waters Xbridge 150\*25 5u; 流动相: [水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) -ACN]; B%: 0%-30%, 10min) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (18.6mg, 99%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 846.3。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>)  $\delta$ =8.78 (s, 0.5H), 8.71 (s, 0.5H), 8.21 (s, 1H), 6.13 (dd, J=2.0, 6.0Hz, 1H), 5.76-5.60 (m, 2H), 5.26-5.16 (m, 3H), 4.74-4.68 (m, 1H), 4.53-4.42 (m, 2H), 4.37-4.21 (m, 4H), 4.01-3.89 (m, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.10-2.06 (m, 6H), 2.04 (s, 1.5H), 2.02 (s, 1.5H), 1.96 (s, 3H)

[0538] 化合物16

[0539] 腺苷-5'-(D-甘油- $\beta$ -D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基) 硫代磷酰氧基磷酸酯



[0541] 步骤1. 腺苷-5'-(D-甘油- $\beta$ -D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基) (羟基) 硫代磷酰氧基磷酸酯的制备

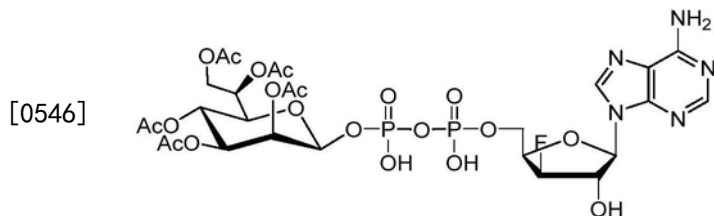


[0543] 将以上描述的化合物15的制备中的步骤6的产物化合物 (4mg, 4.73 $\mu$ mol) 在7:3:1比率的MeOH/水/Et<sub>3</sub>N (2mL) 中的溶液在25℃下搅拌5h。反应完成后, 将混合物浓缩并且从水中冻干以给出呈白色固体的所希望的化合物 (3.2mg, 产率: 80.6%, 2Et<sub>3</sub>N盐)。MS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>+</sup>: 634.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ 8.46 (s, 0.5H), 8.43 (s, 0.5H), 8.08 (s, 0.5H), 8.06 (s, 0.5H), 5.96 (dd, J=5.9, 10.0Hz, 1H), 5.38-5.28 (m, 0.5H), 5.13-5.03 (m, 0.5H), 4.45-4.31

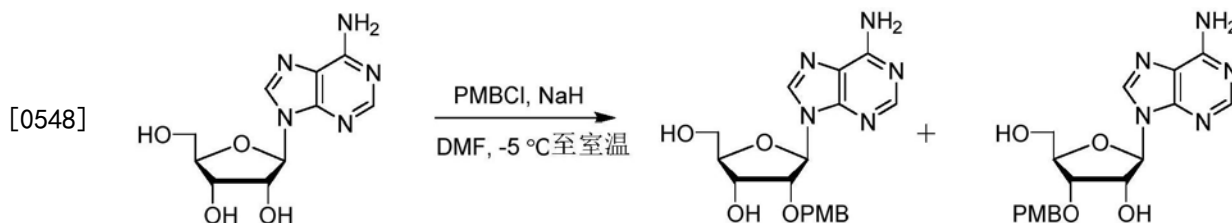
(m, 2H), 4.23 (d, J=11.0Hz, 1H), 4.14-4.03 (m, 1H), 3.96-3.87 (m, 2H), 3.85-3.76 (m, 1H), 3.66-3.47 (m, 4H), 3.34-3.24 (m, 1H), 3.02 (q, J=7.3Hz, 12H), 1.09 (t, J=7.3Hz, 18H)。

[0544] 化合物17

[0545] (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3R, 4S, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

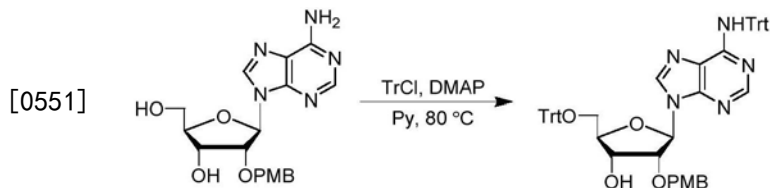


[0547] 步骤1. 化合物 (2R, 3R, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基) -2-(羟基甲基) -4-((4-甲氧基苄基) 氧基) 四氢呋喃-3-醇和 (2R, 3R, 4S, 5R) -2-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基) -5-(羟基甲基) -4-((4-甲氧基苄基) 氧基) 四氢呋喃-3-醇的制备



[0549] 将腺苷 (25g, 93.55mmol) 在 DMF (900mL) 中的悬浮液冷却至 -5°C。将 NaH (4.86g, 121.61mmol, 60% 纯度) 添加到溶液中。将混合物在 -5°C 下进一步搅拌 1h。将 PMBCl (17.58g, 112.26mmol, 15.29mL) 在 1h 期间逐滴添加到悬浮液中。添加完成后, 让反应达到 25°C, 并且搅拌 16h。将 40mL 饱和 NaHCO<sub>3</sub> 溶液在 0°C 下添加到混合物中并且在室温下搅拌 10min。滤出固体并且将滤液在减压下浓缩以给出残余物。将残余物通过快速色谱柱纯化 (用在 DCM 中的 0-2% MeOH 洗脱)。获得呈白色固体的化合物 (2R, 3R, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基) -2-(羟基甲基) -4-((4-甲氧基苄基) 氧基) 四氢呋喃-3-醇 (22g, 59.70mmol, 63.8% 产率, 96.37% 纯度)。获得呈白色固体的所希望的两种异构体的混合物 (12g)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.29 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 7.35 (s, 2H), 7.04 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.70 (d, J=8.4Hz, 2H), 6.01 (d, J=6.4Hz, 1H), 5.47 (dd, J=4.4, 7.2Hz, 1H), 5.29 (d, J=4.8Hz, 1H), 4.65-4.42 (m, 2H), 4.39-4.20 (m, 2H), 4.00 (q, J=2.8Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.71-3.61 (m, 1H), 3.58-3.47 (m, 1H)。

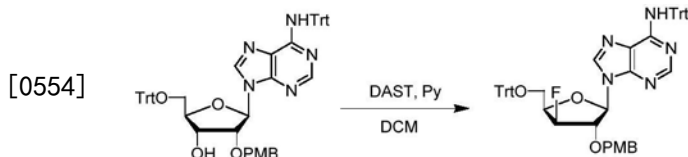
[0550] 步骤2. 化合物 (2R, 3R, 4R, 5R) -4-((4-甲氧基苄基) 氧基) -5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基) -2-((三苯甲氧基) 甲基) 四氢呋喃-3-醇的制备



[0552] 将以上步骤1的产物化合物 (15.00g, 38.72mmol) 用吡啶 (10mL x 2) 共蒸发两次并且溶解在吡啶 (300mL) 中。添加 TrtCl (26.99g, 96.80mmol) 和 DMAP (3.78g, 30.98mmol)。将混

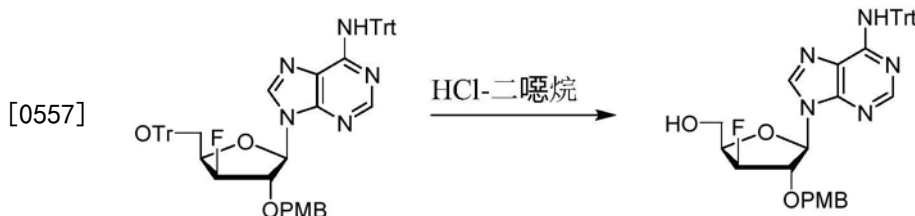
合物在80℃下在N<sub>2</sub>下搅拌15h。将混合物用EA (800mL) 稀释并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液 (200mL x 2) 和盐水 (200mL x 2) 洗涤。将有机层经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且在减压下浓缩以给出残余物。将残余物通过快速柱色谱法纯化 (用在PE中的0-40%EA洗脱)。获得呈白色固体的所希望的化合物 (22.6g, 66.9%产率)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup> = 872.4

[0553] 步骤3. 化合物9-((2R,3S,4S,5R)-4-氟-3-((4-甲氧基苄基)氧基)-5-((三苯甲氧基)甲基)四氢呋喃-2-基)-N-三苯甲基-9H-嘌呤-6-胺的制备



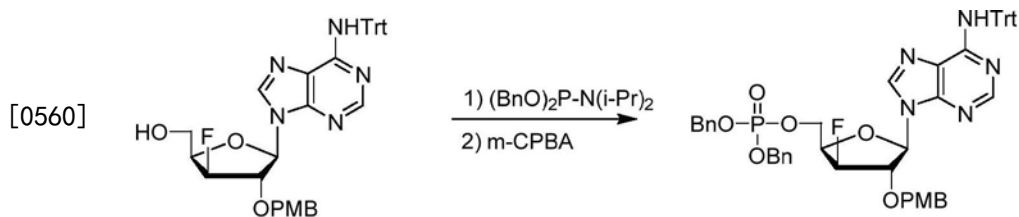
[0555] 向以上步骤2的产物化合物 (5g, 5.73mmol) 在DCM (50mL) 中的溶液中添加DAST (3.85mL, 29.1mmol) 和吡啶 (4.6mL, 57.2mmol)。将混合物在20℃下搅拌12h。将反应用饱和NaHCO<sub>3</sub> (30mL) 淬灭并且将有机层分离。将水层用DCM (50mL x 2) 萃取, 将合并的有机层用HCl (50mL)、盐水 (50mL) 洗涤, 经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且在减压下浓缩。将残余物通过硅胶柱色谱法纯化 (PE/EA: 20/1至2/1) 以得到呈黄色固体的所希望的化合物 (2.1g, 产率42.0%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 874.4 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.99 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.44-7.18 (m, 32H), 6.84 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.16-6.10 (m, 1H), 5.50-5.28 (m, 1H), 4.81-4.70 (m, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.57-4.43 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.42-3.37 (m, 1H), 3.31-3.24 (m, 1H)。

[0556] 步骤4. 化合物((2R,3S,4S,5R)-3-氟-4-((4-甲氧基苄基)氧基)-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲醇的制备



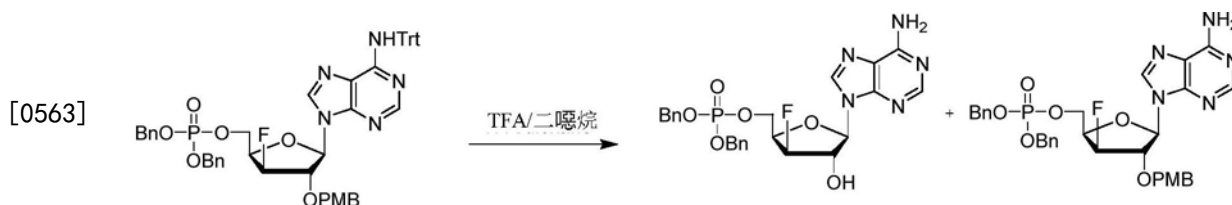
[0558] 将以上步骤3的产物化合物 (2.7g, 3.09mmol) 在HCl/二噁烷 (20mL) 中的溶液在28℃下搅拌4h。将反应混合物用饱和NaHCO<sub>3</sub>中和直到pH=7, 并且然后将其用EtOAc (50mL x 3) 萃取。将合并的有机层用盐水 (50mL) 洗涤, 经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且在减压下浓缩以给出残余物, 将其通过硅胶柱色谱法纯化 (PE:EA=20:1至3:1)。获得呈黄色固体的所希望的化合物 (3g, 产率: 76.9%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup> = 631.2, 632.2。 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.20 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.37-7.18 (m, 17H), 6.90-6.83 (m, 2H), 6.12-6.05 (m, 1H), 5.41-5.25 (m, 1H), 5.10-5.05 (m, 1H), 4.81-4.74 (m, 1H), 4.70-4.62 (m, 2H), 4.34-4.22 (m, 1H), 3.81-3.73 (m, 1H), 3.72 (s, 3H)。

[0559] 步骤5. 化合物(((2R,3S,4S,5R)-3-氟-4-((4-甲氧基苄基)氧基)-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲基)磷酸二苄酯的制备



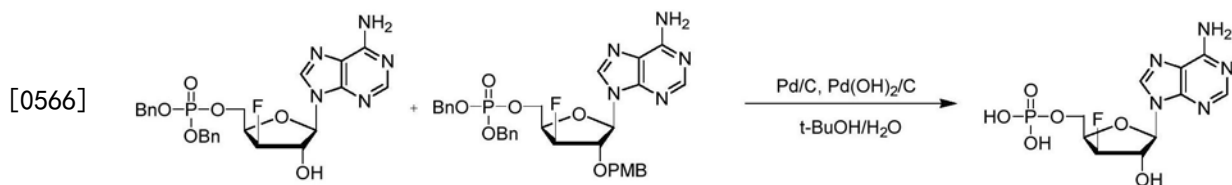
[0561] 在0℃下向以上步骤4的产物化合物(1.5g, 2.37mmol)和1H-咪唑-4,5-二甲腈(560mg, 4.75mmol)在 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (20mL)和 $\text{CH}_3\text{CN}$ (4mL)中的溶液中添加 $(\text{BnO})_2\text{P-N}(\text{i-Pr})_2$ (1.64g, 4.75mmol)。将混合物在0℃下搅拌10min并且然后温热至25℃。将所得混合物搅拌另外1h并且再次冷却至0℃。直接添加*m*-CPBA(1.02g, 4.75mmol, 80%纯度),然后将反应温热至25℃并且在25℃下搅拌16h。将反应用DCM(20mL)稀释,用饱和 $\text{NaHCO}_3$ (30mL x 2)和盐水(30mL)洗涤。将有机相浓缩以给出粗产物。将粗产物通过硅胶柱色谱法纯化(PE:EA=1:0至1:1)。获得呈黄色油状物的所希望的化合物(2.2g, 产率:81.0%产率, 78%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 892.3。

[0562] 步骤6. 化合物((2R, 3R, 4S, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基)甲基二苄基磷酸酯和((2R, 3S, 4S, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-((4-甲氧基苄基)氧基)四氢呋喃-2-基)甲基二苄基磷酸酯的制备



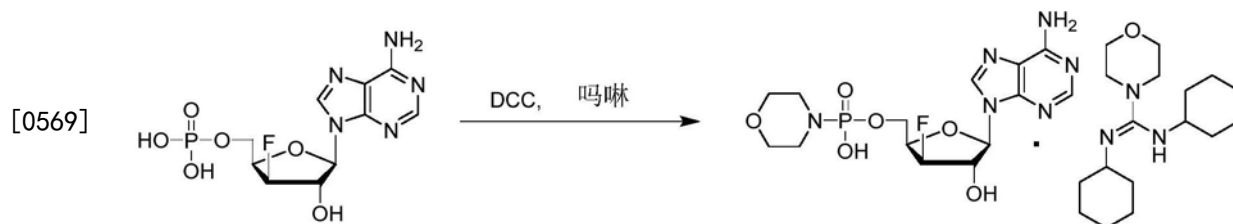
[0564] 将以上步骤5的产物化合物(2.2g, 2.47mmol)和TFA(562mg, 4.93mmol, 365 $\mu\text{L}$ )在DCM(18mL)中的溶液在25℃-30℃下搅拌4h。将反应用饱和 $\text{NaHCO}_3$ (40mL)调节至pH约8-9并且用DCM(50mL x 2)萃取。将合并的有机相用盐水(50mL)洗涤并且浓缩以给出粗产物。将粗产物通过硅胶柱色谱法纯化(PE:EA=1:0至0:1)。获得呈黄色油状物的两种化合物(1.1g, 产率:76.7%)的混合物,将其不经进一步纯化而用于进一步的步骤。MS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}^+$ ): 530.1, 650.1。

[0565] 步骤7. 化合物((2R, 3R, 4S, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基)甲基二氢磷酸酯的制备



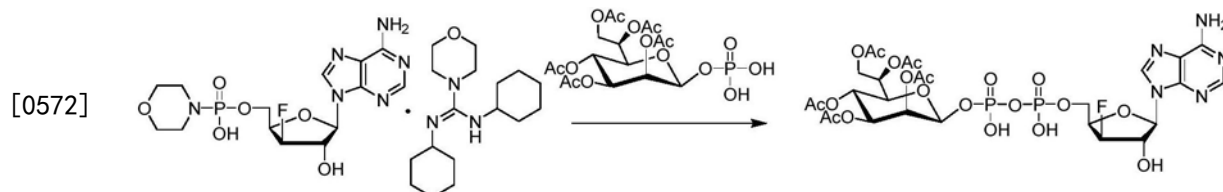
[0567] 向以上步骤6的产物化合物(1.1g, 1.69mmol)在 $t\text{-BuOH}$ (15mL)和 $\text{H}_2\text{O}$ (15mL)中的混合物中添加 $\text{Pd/C}$ (0.2g)和 $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (0.2g)。将混合物在25℃下在氢气气氛(50psi)下搅拌36h。将混合物过滤并且将滤液在减压下浓缩以给出粗品。将粗品不经进一步纯化而用于下一步骤。获得呈灰色固体的所希望的化合物(0.45g, 粗品)。 $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.17 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.34 (br s, 2H), 5.96 (d,  $J=2.4\text{Hz}$ , 1H), 5.34-4.95 (m, 1H), 4.76 (br d,  $J=15.6\text{Hz}$ , 1H), 4.63-4.42 (m, 1H), 4.20-3.93 (m, 2H)。

[0568] 步骤8. ((2R,3R,4S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基)甲基氢吗啉代磷酸酯(4'-吗啉-N,N'-二环己基甲脒鎓盐)



[0570] 将在t-BuOH(4mL)中的DCC(354.50mg,1.72mmol,347.5 $\mu$ L)经15min的时间段逐滴添加到以上步骤7的产物化合物(150mg,430 $\mu$ mol)和吗啉(150mg,1.72mmol)在H<sub>2</sub>O(4mL)和t-BuOH(4mL)中的回流(110 $^{\circ}$ C)溶液中。将混合物在100 $^{\circ}$ C下在N<sub>2</sub>下搅拌12h。将溶液过滤。收集滤液并且将其浓缩。将残余物用H<sub>2</sub>O(30mL)稀释,用TBME(20mL x 2)洗涤。收集水相并且将其在真空中浓缩。获得呈黄色油状物的所希望的化合物(290mg,粗品),将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,D<sub>2</sub>O)  $\delta$ 8.11(s,1H),8.05(s,1H),6.01-5.98(m,1H),5.22-5.07(m,1H),4.80-4.73(m,1H),4.55-4.48(m,1H),4.09-4.02(m,1H),4.00-3.92(m,1H),3.44-3.39(m,4H),2.85-2.80(m,4H)。<sup>31</sup>P NMR $\delta$ 7.5。

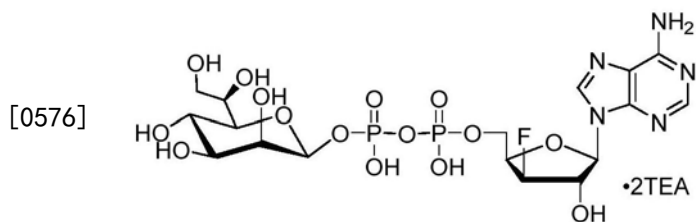
[0571] 步骤9.化合物(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3R,4S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



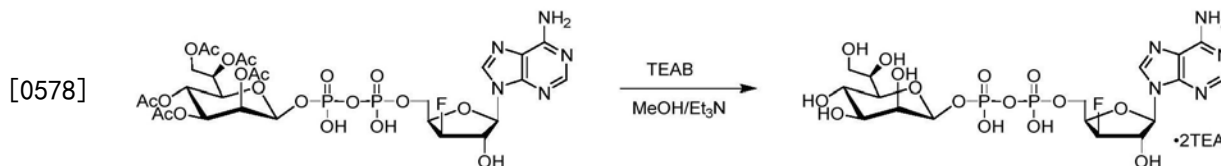
[0573] 将以上步骤8的产物化合物(150mg,299.79 $\mu$ mol)和以上化合物1的制备中的步骤14的产物化合物(290mg,693.25 $\mu$ mol)用吡啶(3mL x 3)干燥。将残余物重新溶解在吡啶(5mL)中,并且添加1H-四唑(105.01mg,1.50mmol,132.92 $\mu$ L)。将溶液在30 $^{\circ}$ C下搅拌20h。在真空中除去挥发物。将残余物溶解在MeOH(5mL)中并且过滤。收集滤液。将溶液通过柱纯化(DCM:MeOH:NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O=50:1)=1.2:1)以给出粗产物(120mg)。将粗产物通过制备型HPLC纯化(柱:Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ;流动相:[水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:0%-30%,12min)以得到呈白色固体的所希望的化合物(46.9mg,纯化:90.6%,18%产率)。MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:832.2。<sup>1</sup>H NMR(400MHz,CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ 8.25(s,1H),8.19(s,1H),6.12(s,1H),5.60-5.50(m,2H),5.25-5.09(m,4H),4.80-4.71(m,1H),4.69-4.62(m,1H),4.47-4.31(m,3H),4.27-4.18(m,1H),3.92-3.88(m,1H),2.12(s,3H),2.03(s,3H),2.02(s,3H),1.98(s,3H),1.92(s,3H)。MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>=832.2。

[0574] 化合物18

[0575] 3'-(s)-氟-腺苷-5'-(D-甘油- $\beta$ -D-甘露-庚吡喃糖基)二磷酸酯



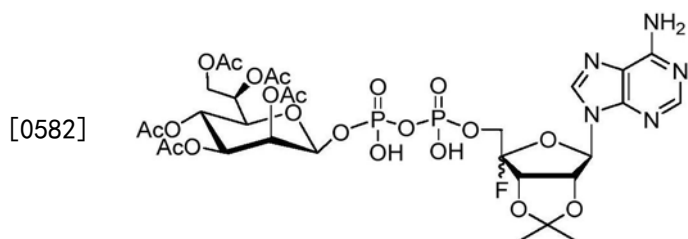
[0577] 步骤1. 化合物3'-(s)-氟-腺苷-5'-(D-甘油-β-D-甘露-庚吡喃糖基)二磷酸酯的制备



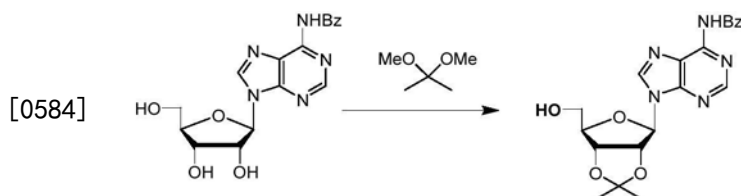
[0579] 将以上化合物17的制备中的步骤9的产物化合物(6mg, 7.22μmol)在4mL由(MeOH(9mL)、TEA(0.15mL)和TEAB(12mL))组成的溶液中的溶液保持在-20℃持续36h。将溶液冷冻干燥。获得呈白色固体的所希望的化合物(4mg, 6.44μmol)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>+</sup>: 620.2。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.13 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 6.03-5.99 (m, 1H), 5.22-5.21 (m, 1H), 5.08-4.96 (m, 3H), 4.27-4.10 (m, 2H), 4.00-3.95 (m, 1H), 3.90-3.85 (m, 1H), 3.82-3.75 (m, 1H), 3.56-3.38 (m, 3H), 3.26-3.17 (m, 1H), 2.97-2.86 (m, 15H), 1.12-0.97 (m, 23H)。

[0580] 化合物19

[0581] (2S, 3S, 4S, 5R, 6R)-2-(((((((3aS, 4S, 6R, 6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯



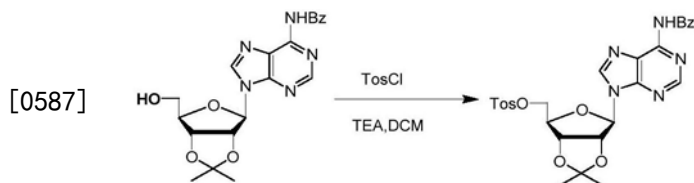
[0583] 步骤1. N-(9-((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(羟基甲基)-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)-9H-嘌呤-6-基)苯甲酰胺的制备



[0585] 将N-(9-((2R, 3R, 4S, 5R)-3,4-二羟基-5-(羟基甲基)四氢呋喃-2-基)-9H-嘌呤-6-基)苯甲酰胺(23.0g, 61.9mmol)和2,2-二甲氧基丙烷(64.5g, 619.3mmol)溶解在丙酮(400mL)中。然后添加p-TsOH.H<sub>2</sub>O(12.8g, 74.3mmol)。将反应混合物在25℃下搅拌4h。反应完成后,反应混合物冷却至0℃并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液(200mL)淬灭。将反应混合物用乙酸乙酯(250mL)稀释并且将乳状水层用乙酸乙酯(250mL x 2)萃取。将合并的有机层用盐水

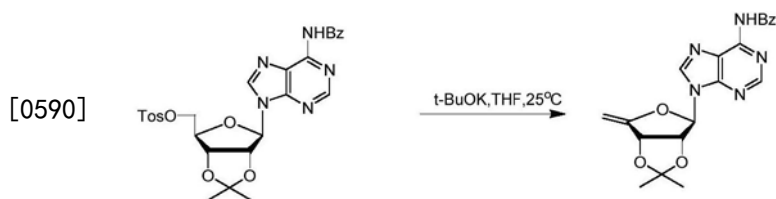
(250mL) 洗涤, 干燥, 在真空中浓缩以给出呈淡黄色固体的所希望的化合物 (25.0g, 粗品)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.19 (br, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 8.03-7.99 (m, 2H), 7.64-7.60 (m, 1H), 7.54-7.50 (m, 2H), 6.25-6.24 (m, 1H), 5.41 (dd, J=6.4Hz, 2.4Hz, 1H), 5.11 (t, J=5.2Hz, 1H), 4.99-4.97 (m, 1H), 4.26-4.23 (m, 1H), 3.56-3.50 (m, 2H), 1.54 (s, 3H), 1.32 (s, 3H)。

[0586] 步骤2. ((3aR, 4R, 6R, 6aR)-6-(6-苯甲酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基4-甲基苯磺酸酯的制备



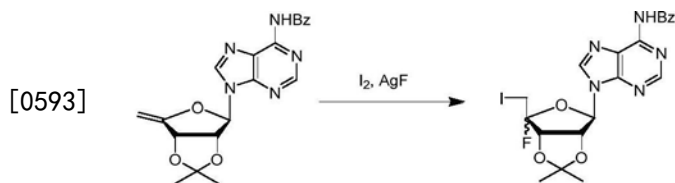
[0588] 在0℃下将在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mL) 中的TosCl (15.0g, 79.0mmol) 添加到以上步骤1中获得的化合物 (25.0g, 60.7mmol)、DMAP (1.4g, 12.1mmol) 和TEA (12.3g, 121.5mmol) 在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250mL) 中的溶液中。将反应混合物在25℃下搅拌6h。反应完成后, 将反应混合物冷却至0℃并且用饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液 (200mL) 淬灭。将反应混合物用乙酸乙酯 (200mL) 稀释并且将乳状水层用乙酸乙酯 (200mL x 2) 萃取。将合并的有机层用盐水 (200mL) 洗涤, 干燥, 在真空中浓缩以给出粗产物, 将其通过硅胶柱纯化 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0至0:1) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (35.0g, 产率: 76.7%, 75.3%纯度)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 566.0。

[0589] 步骤3. N-(9-((3aR, 4R, 6aS)-2,2-二甲基-6-亚甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)-9H-嘌呤-6-基) 苯甲酰胺的制备



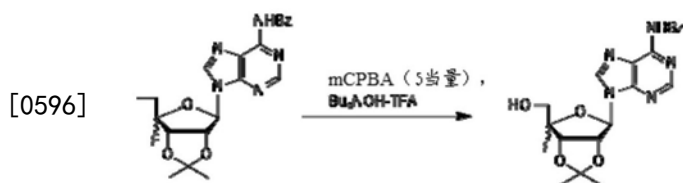
[0591] 将t-BuOK (15.7g, 139mmol) 添加到以上步骤2的产物化合物 (35.0g, 46.6mmol) 在THF (400mL) 中的溶液中。将所得混合物在25℃下搅拌2h。将反应混合物添加到NH<sub>4</sub>Cl水溶液 (200mL) 中并且用乙酸乙酯 (200mL x 2) 萃取。将有机相干燥 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 并且在真空中浓缩以给出粗产物。将粗产物通过硅胶柱纯化 (石油醚: 乙酸乙酯=1:0至0:1) 以给出呈淡黄色固体的所希望的化合物 (9.7g, 52.9%产率)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.24 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.02-8.00 (m, 2H), 7.64-7.60 (m, 1H), 7.54-7.50 (m, 2H), 6.58 (s, 1H), 5.63-5.61 (m, 1H), 5.43-5.41 (m, 1H), 4.46 (s, 1H), 4.38-4.37 (m, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.35 (s, 3H)。

[0592] 步骤4. 化合物N-(9-((3aR, 4R, 6R, 6aS)-6-氟-6-(碘甲基)-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)-9H-嘌呤-6-基) 苯甲酰胺的两种异构体的制备



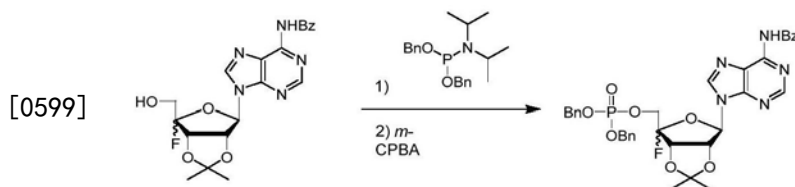
[0594] 在-20℃下将I<sub>2</sub> (18.0g, 71.1mmol) 顺序地添加到以上步骤3的产物化合物 (7g, 17.7mmol) 在CH<sub>3</sub>CN (300mL) 中的溶液中。然后添加AgF (2.26g, 17.7mmol) 在CH<sub>3</sub>CN (300mL) 中的溶液。将混合物在-20℃至-25℃下搅拌16h。将反应混合物过滤并且在减压下浓缩, 然后添加乙酸乙酯 (300mL) 并且用碳酸氢钠水溶液 (100mL) 洗涤, 将有机相用盐水 (100mL) 洗涤, 用无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且在真空中浓缩。将粗产物通过硅胶柱纯化 (石油醚: 乙酸乙酯= 1:0至0:1) 以给出呈淡黄色固体的所希望的化合物的两种异构体的混合物 (4.00g, 产率: 40.4% 产率, 97.1% 纯度)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 540.0。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.25 (br, 1H), 8.78-8.75 (m, 1H), 8.64-8.52 (m, 1H), 8.03-8.01 (m, 2H), 7.66-7.61 (m, 1H), 7.55-7.51 (m, 2H), 6.66-6.53 (m, 1H), 5.88-5.86 (m, 0.5H), 5.44-5.37 (m, 1H), 5.29-5.26 (m, 0.5H), 3.65-3.48 (m, 2H), 1.55 (s, 1.5H), 1.52 (s, 1.5H), 1.37 (s, 1.5H), 1.32 (s, 1.5H)。

[0595] 步骤5. N-(9-((3aR, 4R, 6S, 6aS)-6-氟-6-(羟基甲基)-2,2-二甲基四氢咪唑并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)-9H-嘌呤-6-基) 苯甲酰胺的两种异构体的制备



[0597] 将TFA (3.80g, 33.3mmol) 和四(正丁基)氢氧化铵 (5.19g, 19.9mmol) 添加到从以上步骤4获得的两种异构体的混合物 (3.70g, 6.66mmol) 在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80mL) 中的溶液中, 然而在25℃下添加m-CPBA (6.76g, 33.3mmol, 85% 纯化)。将混合物在25℃下搅拌16h。将反应混合物用饱和Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>溶液 (20mL) 和饱和NaHCO<sub>3</sub>溶液 (20mL) 洗涤。将有机层经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 并且在低压力下浓缩。将粗产物通过硅胶柱纯化 (石油醚: 乙酸乙酯= 1:0至0:1) 以给出呈淡黄色固体的所希望的两种异构体的混合物 (1.20g, 产率: 39.8%, 94.9% 纯度)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 430.0。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 11.23 (br. s, 1H), 8.79-8.73 (m, 1H), 8.62 (s, 0.3H), 8.54-8.48 (m, 0.7H), 8.05-7.98 (m, 2H), 7.65-7.59 (m, 1H), 7.56-7.49 (m, 2H), 6.63 (s, 0.3H), 6.48 (s, 0.7H), 5.81-5.75 (m, 1H), 5.41-5.32 (m, 1H), 5.21-5.14 (m, 1H), 3.80-3.54 (m, 2H), 1.52 (s, 1H), 1.50 (s, 2H), 1.36 (s, 2H), 1.32 (s, 1H)。

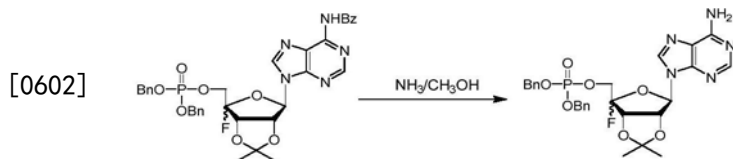
[0598] 步骤6. ((3aS, 4S, 6R, 6aR)-6-(6-苯甲酰胺基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2,2-二甲基四氢咪唑并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基) 甲基二苄基磷酸酯的两种异构体的制备



[0600] 在0℃下向从以上步骤5中获得的两种异构体 (850mg, 1.98mmol) 和1H-咪唑-4,5-二甲腈 (467mg, 3.96mmol) 在CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mL) 和CH<sub>3</sub>CN (17mL) 中的混合物中添加N-二苄氧基磷酸基-N-异丙基-丙-2-胺 (1.37g, 3.96mmol)。将反应混合物搅拌10min并且然后温热至25℃。将所得混合物搅拌另外2h并且再次冷却至0℃。直接添加m-CPBA (803mg, 3.96mmol, 85% 纯度), 并且将反应缓慢温热至25℃并且搅拌2h。将反应用饱和NaHCO<sub>3</sub> (50mL) 淬灭并且将有机相分离。将水相用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50mL x 2) 萃取。将合并的有机相经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且

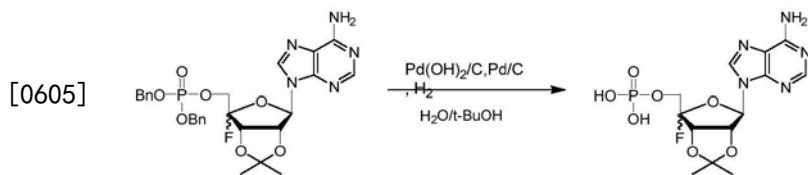
在减压下浓缩。将粗产物通过硅胶柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:0至0:1)以给出呈淡黄色固体的所希望的两种异构体(1.10g,产率:73.2%,90.8%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 690.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  11.25 (br. s, 1H), 8.75 (s, 0.7H), 8.64 (s, 0.3H), 8.61 (s, 0.3H), 8.54 (s, 0.7H), 8.01 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.66-7.58 (m, 1H), 7.56-7.48 (m, 2H), 7.36-7.24 (m, 10H), 6.73 (s, 0.3H), 6.57 (s, 0.7H), 5.85 (d, J=5.6Hz, 0.7H), 5.51-5.42 (m, 0.3H), 5.41-5.37 (m, 0.3H), 5.30 (t, J=6.0Hz, 0.7H), 5.05-4.94 (m, 4H), 4.37-4.14 (m, 2H), 1.51 (s, 1H), 1.46 (s, 2H), 1.34 (s, 2H), 1.32 (s, 1H)。

[0601] 步骤7. ((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基二苄基磷酸酯的两种异构体的制备



[0603] 将从以上步骤6获得的两种异构体(1.10g,1.45mmol)溶解在NH<sub>3</sub>/MeOH(20mL,7M)中。将反应混合物在25℃下搅拌16h。将反应混合物在减压下浓缩以得到粗产物,将其通过硅胶柱纯化(石油醚:乙酸乙酯=1:0至0:1,然后CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH=10:2)以给出呈淡黄色固体的所希望的异构体(710mg,产率:77.5%,92.7%纯化)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>=586.1。

[0604] 步骤8. ((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基二氢磷酸酯的两种异构体的制备



[0606] 将从以上步骤7中获得的两种异构体(600mg,1.02mmol)在t-BuOH(20mL)和H<sub>2</sub>O(20mL)中的混合物与Pd(OH)<sub>2</sub>(300mg,427.23 $\mu$ mol,20%)和Pd/C(50mg,1.02mmol,10%)混合,然后将反应混合物在25℃下在N<sub>2</sub>气氛(45psi)下搅拌16h。过滤并且将滤液浓缩以给出呈淡黄色固体的所希望的异构体(200mg,粗品)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.26-8.17 (m, 2H), 6.59-6.46 (m, 1H), 5.68 (d, J=8.0Hz, 1H), 5.57-5.45 (m, J=11.7Hz, 1H), 5.37-5.30 (m, 1H), 4.21-4.06 (m, 2H), 1.80-1.52 (m, 3H), 1.49-1.35 (m, 3H)。

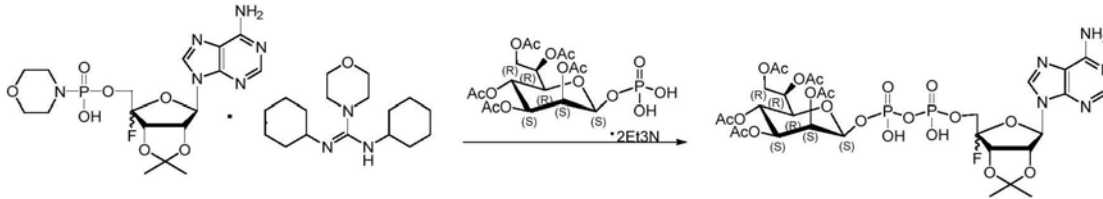
[0607] 步骤9. ((3aS,4S,6R,6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2,2-二甲基四氢咪喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲基氢吗啉代膦酸酯DCC吗啉盐的制备



[0609] 在80℃-90℃下将DCC(407mg,1.97mmol)在t-BuOH(10mL)中的溶液逐滴添加到从以上步骤8中获得的两种异构体(200mg,493 $\mu$ mol)和吗啉(171mg,1.97mmol)在H<sub>2</sub>O(10mL)和t-BuOH(10mL)中的溶液中。在N<sub>2</sub>下将溶液在80℃-90℃下搅拌16h。将反应冷却至室温并且除去溶剂以给出残余物。将残余物溶解在H<sub>2</sub>O(10mL)中并且用TBME(10mL x 2)萃取,将水相

在减压下浓缩以给出呈淡黄色固体的所希望的异构体 (310mg, 粗品)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.41-8.17 (m, 2H), 6.70-6.50 (m, 1H), 5.81-5.68 (m, 1H), 5.62-5.46 (m, 1H), 5.42-5.28 (m, 1H), 4.34-4.09 (m, 1H), 4.07-4.00 (m, 1H), 3.88-3.74 (m, 5H), 3.73-3.55 (m, 2H), 3.51-3.22 (m, 8H), 3.07-3.02 (m, 1H), 2.96-2.91 (m, 1H), 2.87-2.78 (m, 2H), 1.90 (br s, 4H), 1.81-1.70 (m, 4H), 1.68-1.57 (m, 5H), 1.51-1.44 (m, 3H), 1.39-1.26 (m, 8H), 1.19-1.08 (m, 2H)。

[0610] 步骤10. (2S, 3S, 4S, 5R, 6R)-2-(((((((3aS, 6R, 6aR)-6-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-氟-2,2-二甲基四氢呋喃并[3,4-d][1,3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的两种异构体的制备



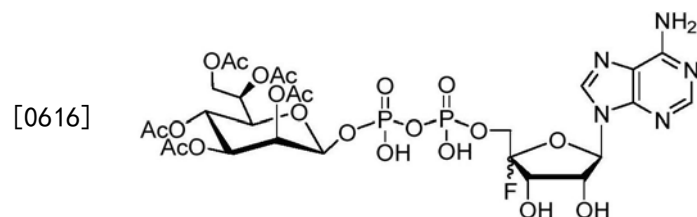
[0611] 将从以上步骤9中获得的两种异构体 (310mg, 403μmol) 和以上化合物1的制备中的来自步骤14的产物 (226mg, 322μmol) 经干吡啶 (10mL x 3) 干燥。将混合物用吡啶 (15mL) 溶解。添加1H-四唑 (94.2mg, 1.35mmol) 并且在25℃下搅拌72h。除去溶剂以给出残余物。将残余物通过硅胶柱色谱法纯化 (DCM:MeOH (包含2%NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O) = 1:0至1:1) 以给出呈白色固体的所希望的粗产物 (170mg, 粗品)。将粗产物 (60mg) 通过制备型HPLC纯化 (柱:Waters Xbridge 150\*25 5u; 流动相:[水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%:0%-35%, 10min) 以给出异构体1 (17mg) 和异构体2 (7mg)。

[0612] 异构体1:<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.24-8.11 (m, 2H), 6.46 (s, 1H), 5.41 (dd, J=11.7, 6.6Hz, 1H), 5.35-5.23 (m, 2H), 5.19 (d, J=6.4Hz, 1H), 5.09-4.85 (m, 3H), 4.26-3.97 (m, 3H), 3.91 (dd, J=12.1, 7.2Hz, 1H), 3.77 (br d, J=9.8Hz, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.91 (s, 3H), 1.89 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 1.47 (s, 3H), 1.25 (s, 3H)

[0613] 异构体2:<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.24-8.07 (m, 2H), 6.50-6.36 (m, 1H), 5.57 (d, J=5.6Hz, 1H), 5.47-5.24 (m, 2H), 5.23-5.13 (m, 1H), 5.09-4.85 (m, 4H), 4.24-4.10 (m, 2H), 4.03 (dd, J=12.0, 7.1Hz, 1H), 3.80 (dd, J=10.0, 2.7Hz, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.84 (s, 3H), 1.77 (s, 3H), 1.44 (s, 3H), 1.27 (s, 3H)

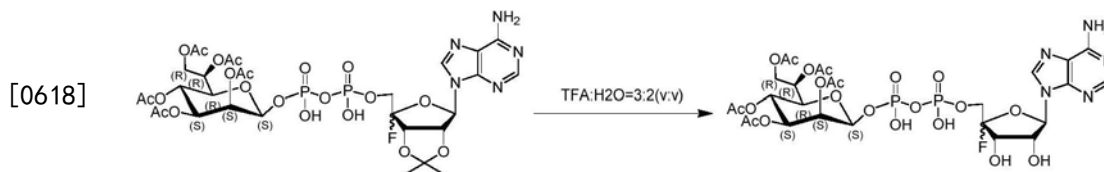
[0614] 化合物20

[0615] (2S, 3S, 4S, 5R, 6R)-2-(((((((2S, 3S, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2-氟-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯



[0617] 步骤1. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5R, 6R)-2-(((((((3S, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-2-氟-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯

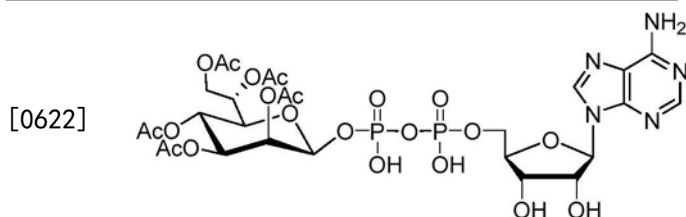
## 6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



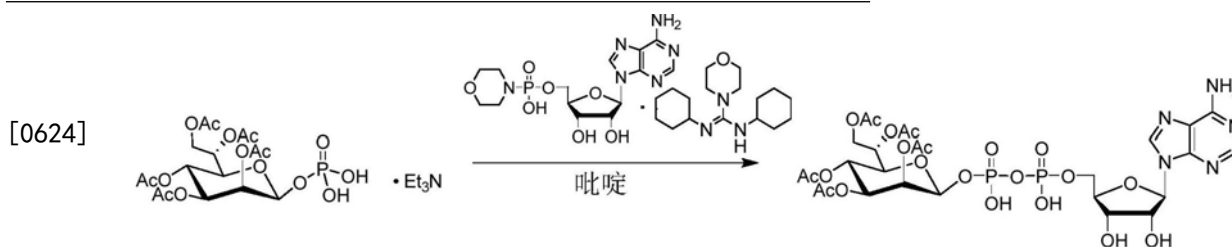
[0619] 将以上化合物19的制备中从步骤10中获得的两种异构体(80.0mg, 90.1 $\mu$ mol)在TFA(0.6mL)和H<sub>2</sub>O(0.4mL)中的溶液在25 $^{\circ}$ C下搅拌0.5h。将混合物用Et<sub>3</sub>N调节至pH=7并且浓缩以给出粗产物。将粗产物通过制备型HPLC纯化(柱:Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ;流动相:[水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:0%-35%, 9min)以给出一种异构体(10mg, 11.8 $\mu$ mol, 13.1%产率)MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 848.2 <sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>)  $\delta$  8.37 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 6.26 (br s, 1H), 5.55-5.37 (m, 2H), 5.08 (br s, 3H), 4.86-4.70 (m, 1H), 4.44 (d, J=5.8Hz, 1H), 4.32 (br d, J=12.0Hz, 1H), 4.23-4.04 (m, 3H), 3.84 (br s, 1H), 3.22-3.16 (m, 7H), 2.01 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.88 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.72 (s, 3H). <sup>19</sup>F $\delta$ -123.7, <sup>31</sup>P $\delta$ -13.22和-15.21。

[0620] 化合物21

[0621] (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3S, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((S)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯



[0623] 步骤1. (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3S, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((S)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备

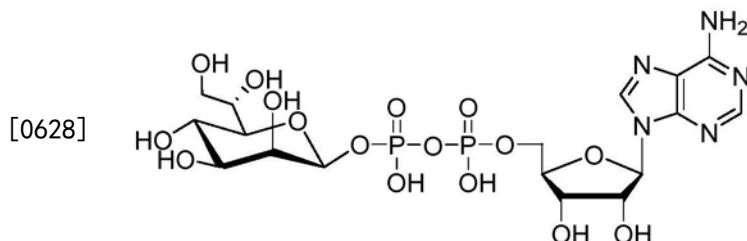


[0625] 将化合物(2R, 3R, 4S, 5S, 6S) -2-((S)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-(磷酰氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯三甲胺盐(200mg, 399.72 $\mu$ mol; Inuki等人Org. Lett. 2017, 19, 3079-3082; Zamyatina等人Carbohydrate Research (2003), 338:2571-2589)和化合物AMP-吗啉(4'-吗啉-N,N'-二环己基甲脒鎓盐)(360mg, 864.71 $\mu$ mol)的混合物在吡啶(5mL x 3)中干燥。然后将残余物溶解在吡啶(5mL)中。添加1H-四唑(100mg, 1.43mmol)。将溶液在30 $^{\circ}$ C下搅拌24h。在真空中除去溶剂。将残余物溶解在MeOH(5mL)中。滤出固体。收集滤液并且将其浓缩。将残余物通过柱纯化(DCM: (MeOH: NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O 50:1) = 1:0-1:1.2)以给出粗产物, 将其通过制备型HPLC再纯化(柱:Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ;流动相:[水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-

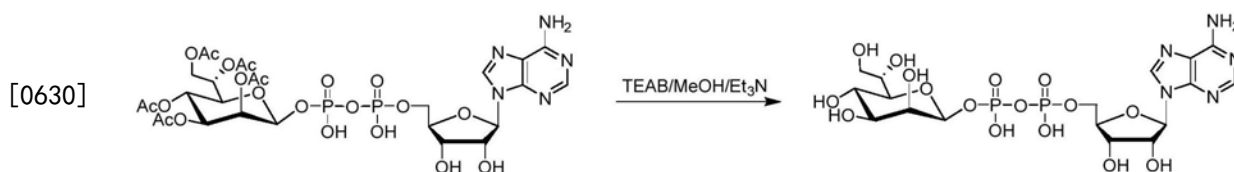
ACN]; B%: 0%–35%, 10min) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (68mg, 产率: 20.24%)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 830.2。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.59 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.08 (d, J=5.2Hz, 1H), 5.62–5.57 (m, 1H), 5.55–5.47 (m, 1H), 5.28–5.22 (m, 1H), 5.19–5.12 (m, 2H), 4.65–4.57 (m, 1H), 4.49–4.39 (m, 2H), 4.33–4.15 (m, 4H), 3.94–3.84 (m, 1H), 2.14 (s, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.89 (s, 3H)。

[0626] 化合物22

[0627] 腺苷-5'-(L-甘油- $\beta$ -D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯



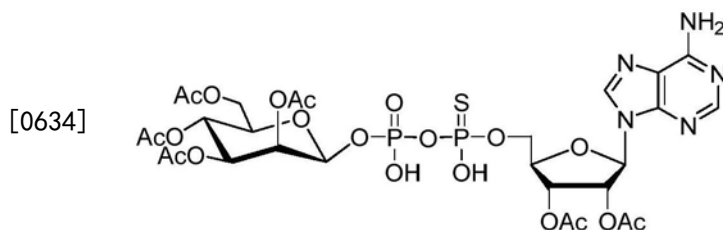
[0629] 步骤1. 腺苷-5'-(L-甘油- $\beta$ -D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯的制备



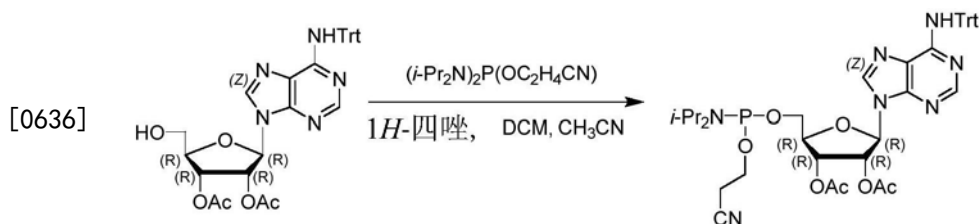
[0631] 将在2mL (0.1M TEAB (8mL)、MeOH (6mL) 和 TEA (0.1mL) 中的以上化合物21的制备中的步骤1的产物化合物 (14.4mg, 17.36 $\mu$ mol) 在-20 $^{\circ}$ C下搅拌56h。将溶液在真空中冷冻干燥以给出呈白色粘性固体的作为三甲胺盐的所希望的化合物 (8mg, 产率: 30.51%)。MS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>+</sup>: 617.9。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.30 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 6.00–5.92 (m, 1H), 5.04–4.99 (m, 1H), 4.58–4.54 (m, 1H), 4.25–4.33 (m, 1H), 4.23–4.15 (m, 1H), 4.09–3.97 (m, 3H), 3.91–3.85 (m, 1H), 3.76–3.67 (m, 1H), 3.55–3.42 (m, 3H), 3.17–3.10 (m, 1H), 3.00–2.94 (m, 14H), 1.08–1.03 (m, 22H)。

[0632] 化合物23

[0633] (2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-(((((((2R, 3R, 4R, 5R)-3, 4-二乙酰氧基-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯

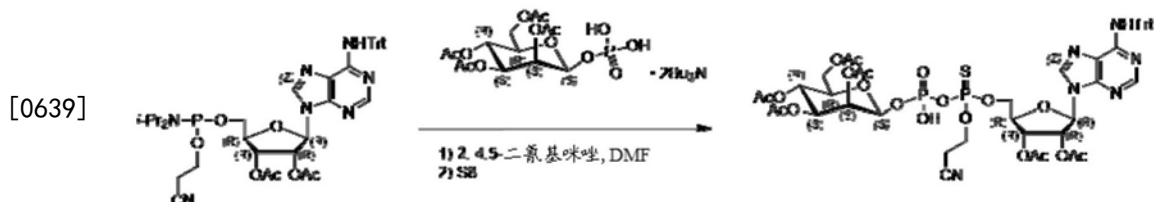


[0635] 步骤1. ((2-氰基乙氧基) (((2R, 3R, 4R, 5R)-3, 4-二乙酰氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲氧基)磷烷基)二丙胺的制备



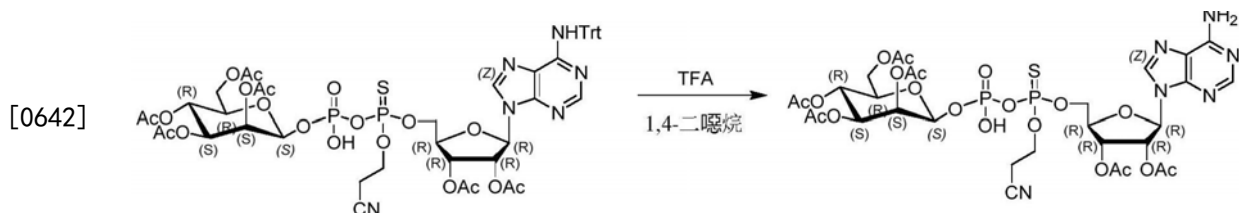
[0637] 在 $N_2$ 气氛下在 $0^\circ C$ 下将在 $CH_3CN$  (1.5mL) 中的1H-四唑 (71mg, 1.01mmol) 逐滴添加到以上化合物7的制备中的步骤7的化合物 (300mg, 0.51mmol) 和3-双(二异丙基氨基) 磷烷基氧基丙腈 (304mg, 1.01mmol, 320 $\mu$ L) 在DCM (7.5mL) 中的溶液中。将所得混合物在 $25^\circ C$ 下搅拌2h。反应完成后, 将混合物过滤并且在减压下浓缩以给出粗产物, 将其通过硅胶柱纯化 (PE: EA=1:0至1:1) 以给出呈无色油状物的所希望的化合物 (80mg, 产率: 19.0%, 89%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 711.1 (水解物质)。

[0638] 步骤2. (2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-((((2-氰基乙氧基) (((2R, 3R, 4R, 5R)-3, 4-二乙酰氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基) 四氢咪喃-2-基) 甲氧基) 硫代磷酰基) 氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) 四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备



[0640] 在 $N_2$ 气氛下将4, 5-二氰基咪唑 (24mg, 203 $\mu$ mol) 添加到以上步骤1的产物化合物 (80mg, 0.10mmol) 和化合物5的制备中的步骤4的产物化合物 (121mg, 151 $\mu$ mol) 在DMF (3mL) 中的溶液中。将所得混合物在 $25^\circ C$ 下搅拌1h。然后添加 (5mg, 151 $\mu$ mol)。将所得混合物在 $25^\circ C$ 下搅拌另外0.5h。反应完成后, 将混合物直接通过制备型HPLC纯化 (柱: Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ; 流动相: [水 (10mM  $NH_4HCO_3$ )-ACN]; B%: 38%-64.25%, 7min) 以得到呈白色固体的所希望的化合物 (23mg, 产率: 15.8%, 80%纯度)。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 1153.5。

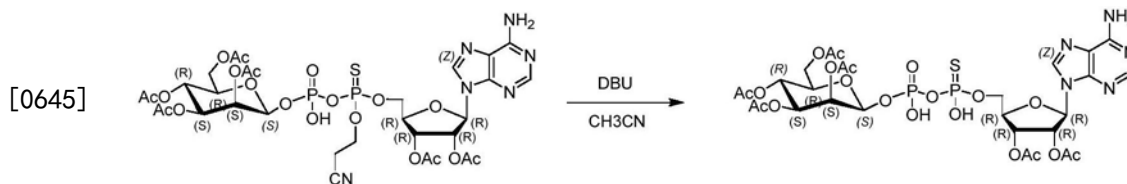
[0641] 步骤3. 化合物 (2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-((((2-氰基乙氧基) (((2R, 3R, 4R, 5R)-3, 4-二乙酰氧基-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基) 四氢咪喃-2-基) 甲氧基) 硫代磷酰基) 氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) 四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备



[0643] 将TFA (616mg, 5.40mmol, 0.4mL) 添加到以上步骤2的产物化合物 (5mg, 4.34 $\mu$ mol) 在二噁烷 (0.6mL) 中的溶液中。将所得混合物在 $40^\circ C$ 下搅拌2h。反应完成后, 将混合物用乙酸乙酯 (10mL) 稀释, 并且用饱和 $NaHCO_3$  (10mL) 洗涤。将有机相经无水 $Na_2SO_4$ 干燥, 过滤并且在减压下浓缩以给出呈淡黄色浓浆的化合物G-3 (6mg, 粗品), 将其直接用于下一步骤。MS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>: 909.9。

[0644] 步骤4. 化合物 (2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-(乙酰氧基甲基)-6-((((((((2R, 3R, 4R, 5R)-3, 4-二乙酰氧基-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基) 四氢咪喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 硫代磷酰基)

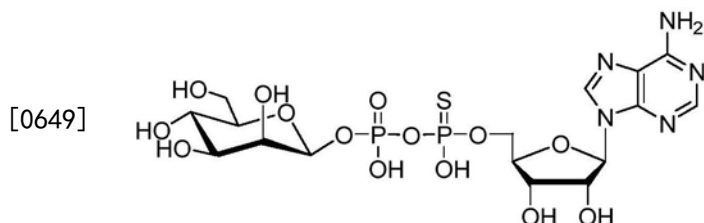
氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) 四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



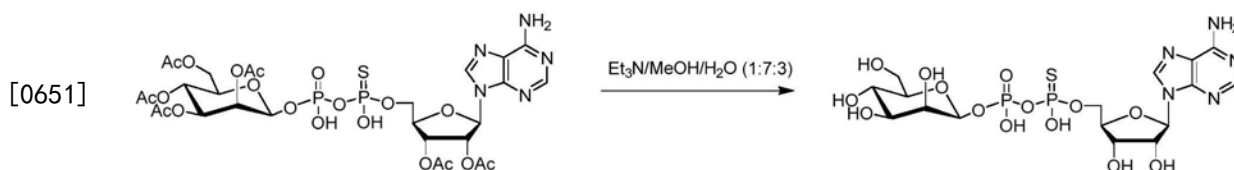
[0646] 将DBU (3.30mg, 21.7 $\mu$ mol, 3.3 $\mu$ L) 添加到以上步骤3的化合物 (5mg, 4.34 $\mu$ mol) 在CH<sub>3</sub>CN (0.5mL) 中的溶液中。将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌0.5h。反应完成后,将混合物用乙酸乙酯 (10mL) 稀释,并且用1N HCl (10mL) 洗涤。将有机相经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并且在减压下浓缩以给出呈淡黄色浓浆的所希望的粗化合物 (7mg), 将其通过制备型HPLC纯化 (柱: Boston Green ODS 150\*30 5 $\mu$ ; 流动相: [水 (0.075% TFA) -ACN]; B%: 30% -50%, 7.5min) 以得到所希望的化合物。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 858.5。

[0647] 化合物24

腺苷-(5'-(甘露糖-吡喃糖基) (羟基) 硫代磷酰氧基磷酸酯



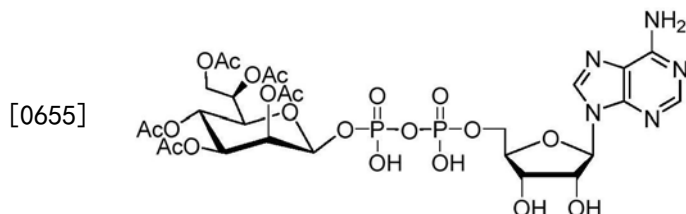
步骤1. 腺苷-(5'-(甘露糖-吡喃糖基) (羟基) 硫代磷酰氧基磷酸酯的制备



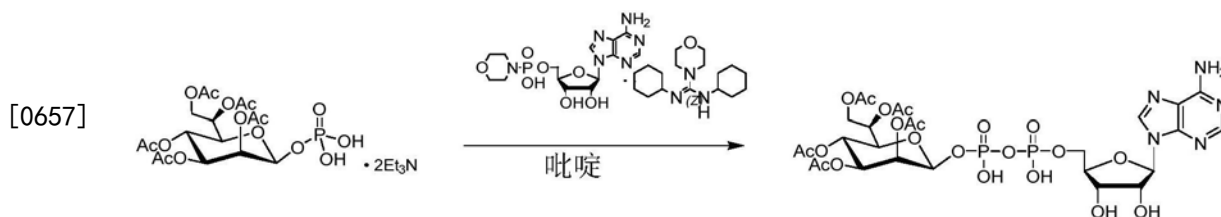
[0652] 将以上化合物23的制备中的步骤4的产物化合物的溶液溶解在7:3:1比率的MeOH/水/Et<sub>3</sub>N溶液中,在25 $^{\circ}$ C下搅拌10h。反应完成后,将混合物浓缩并且从水中冻干以给出所希望的化合物。

[0653] 化合物25

(2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯



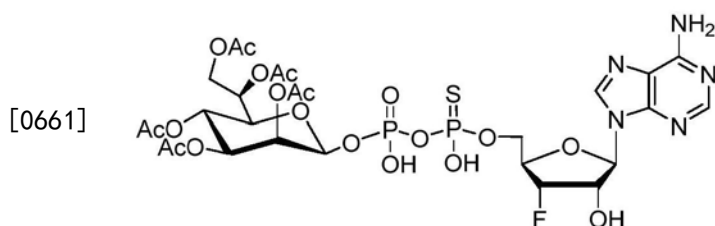
[0656] 步骤1. (2S,3S,4S,5R,6R)-2-(((((((2R,3S,4R,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



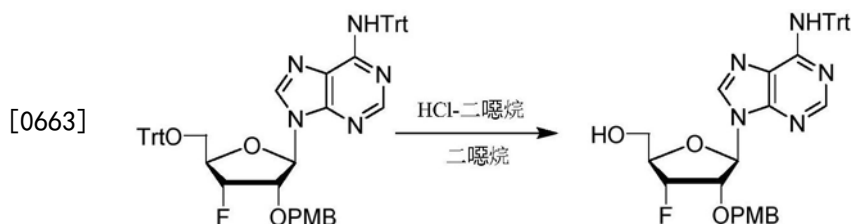
[0658] 将以上化合物1的制备中的步骤14的产物化合物 (220mg, 439.70 $\mu$ mol) 和AMP-吗啉 (4'-吗啉-N,N'-二环己基甲脒鎓盐) (549.2mg, 1.32mmol) 的混合物在吡啶 (5mL x 3) 中干燥。然后将残余物重新溶解在吡啶 (5mL) 中, 并且添加1H-四唑 (154.01mg, 2.20mmol)。将溶液在30 $^{\circ}$ C下搅拌48h。在真空中除去溶剂。将残余物溶解在MeOH (10mL) 中。滤出固体。收集滤液并且将其浓缩。将残余物通过柱纯化 (DCM: (MeOH:NH<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O = 50:1) = 1:0-1.2:1) 以给出粗产物 (140mg), 将其通过制备型HPLC柱: Waters Xbridge 150\*25 5 $\mu$ ; 流动相: [水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) - ACN]; B%: 0%-35%, 10min) 再纯化以得到呈白色固体的所希望的化合物 (50mg, 产率13.6%)。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, 甲醇-d<sub>4</sub>)  $\delta$  8.58 (s, 1H), 8.18 (s, 1H), 6.07 (d, J=5.2Hz, 1H), 5.53-5.56 (br. s, 2H), 5.16-5.22 (m, 3H), 4.60-4.63 (m, 1H), 4.40-4.46 (m, 2H), 4.19-4.24 (m, 4H), 3.87-3.89 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.04 2.03 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.92 (s, 3H)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 830.4。

[0659] 化合物26

[0660] (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3S, 4S, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 硫代磷酰基) 氧基) (羟基) 磷酰基) 氧基) -6-((R)-1, 2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯



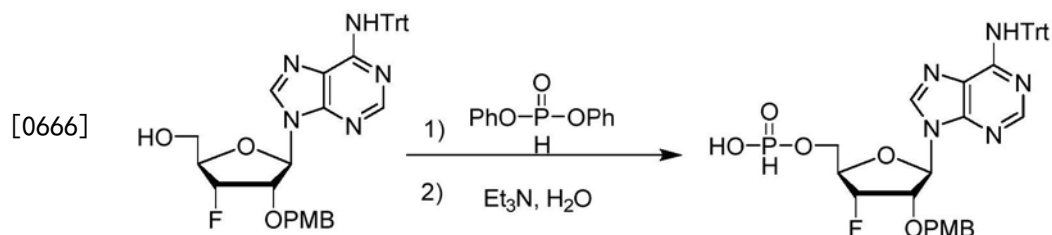
[0662] 步骤1. 化合物 ((2R, 3R, 4S, 5R) -3-氟-4-((4-甲氧基苄基) 氧基) -5-(6-(三苯甲基氨基) -9H-嘌呤-9-基) 四氢呋喃-2-基) 甲醇的制备



[0664] 向实施例1中步骤5的产物化合物 (4.1g, 4.6mmol) 在二噁烷 (100mL) 中的混合物中逐滴添加HCl-二噁烷 (4M, 10mL)。将混合物在26 $^{\circ}$ C下搅拌30min。反应完成后, 将混合物用EA (500mL) 稀释并且用饱和NaHCO<sub>3</sub> (100mL x 3) 和盐水 (100mL x 3) 洗涤。将有机层经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥, 过滤并且在减压下浓缩以给出残余物。将残余物通过柱色谱法纯化 (PE:EA = 1:0至1:1) 以得到呈白色固体的所希望的化合物 (1.8g, 产率: 60.7%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 646.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.42 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.34-7.19 (m, 15H), 7.03 (d, J=8.6Hz, 2H), 6.74 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.06 (d, J=8.1Hz, 1H), 5.58-5.52 (m, 1H), 5.46-5.22

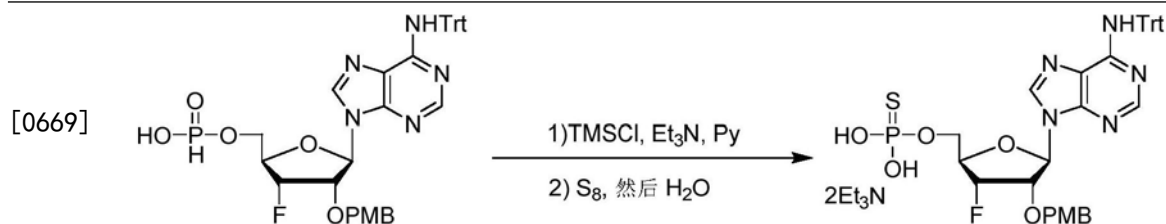
(m, 1H), 4.98-4.89 (m, 1H), 4.57-4.26 (m, 4H), 3.70 (s, 3H), 3.63-3.60 (m, 2H)。

[0665] 步骤2. 化合物((2R, 3R, 4S, 5R)-3-氟-4-((4-甲氧基苄基)氧基)-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲基氢磷酸酯的制备



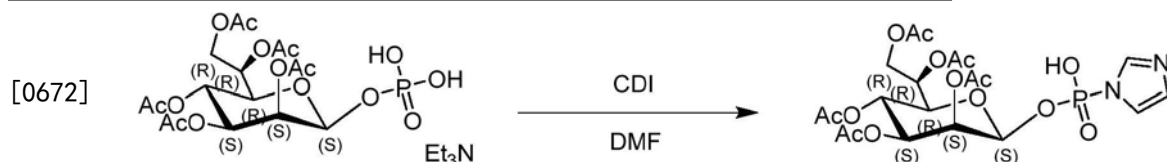
[0667] 向以上步骤1的产物化合物(1.8g, 2.8mmol)在吡啶(6mL)中的溶液中添加苯氧基磷酰氧基苯(1.65mL, 8.6mmol)。将混合物在25℃下搅拌2h。然后将TEA(1.45g, 14.37mmol, 2mL)和H<sub>2</sub>O(515μL, 28.5mmol)添加到混合物中。将混合物在25℃下搅拌另外0.5h。反应完成后,将混合物在减压下浓缩。将粗产物通过硅胶柱色谱法纯化(DCM:MeOH=20:1至10:1,添加0.5%Et<sub>3</sub>N)以得到呈淡黄色固体的所希望的化合物(2g, 产率:90%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 696.2。

[0668] 步骤3. 化合物0-(((2R, 3R, 4S, 5R)-3-氟-4-((4-甲氧基苄基)氧基)-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲基)0,0-二氢硫代磷酸酯三乙胺盐的制备



[0670] 在N<sub>2</sub>气氛下向以上步骤2的产物化合物(2g, 2.8mmol)在吡啶(5mL)和Et<sub>3</sub>N(5mL)中的溶液中经15min逐滴添加TMSCl(1.82mL, 14.3mmol)。将混合物在0℃下搅拌1h,并且然后添加硫(555mg, 17.3mmol)。将混合物在0℃下搅拌另外45min。反应完成后,将反应用H<sub>2</sub>O(10mL)淬灭并且将混合物在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过硅胶色谱法纯化(DCM:MeOH=20:1至10:1,添加0.5%Et<sub>3</sub>N)以得到呈黄色浓浆的所希望的化合物(900mg, 产率43%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 728.3。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.60 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.37-7.23 (m, 15H), 7.08 (d, J=8.5Hz, 2H), 6.75 (d, J=8.8Hz, 2H), 6.05 (d, J=8.0Hz, 1H), 5.60-5.35 (m, 1H), 5.14-4.96 (m, 1H), 4.63-4.34 (m, 3H), 4.11-3.82 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.12-2.89 (m, 12H), 1.19 (t, J=7.3Hz, 18H)。

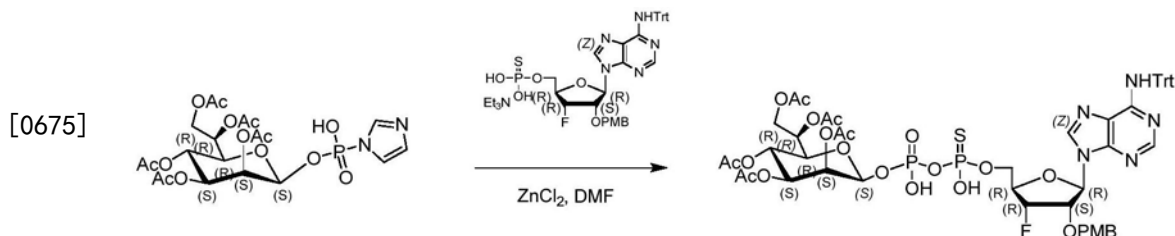
[0671] 步骤4. 化合物(2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-((羟基(1H-咪唑-1-基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0673] 在N<sub>2</sub>气氛下将CDI(943mg, 5.8mmol)添加到实施例1中步骤14的产物化合物(350mg, 581.8μmol, Et<sub>3</sub>N)在无水DMF(15mL)中的溶液中。将所得混合物在25℃下搅拌3h。反应完成后,添加MeOH(0.28mL)以将反应淬灭,将混合物在减压下浓缩以给出所希望的化合

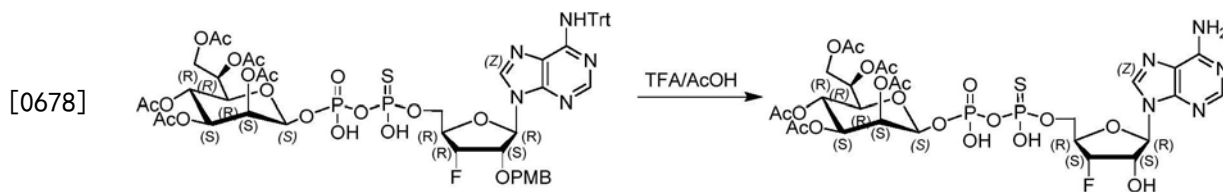
物(1g,粗品),将其直接用于下一步骤。

[0674] 步骤5. 化合物(2R,3R,4S,5S,6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-((((((2R,3R,4S,5R)-3-氟-4-((4-甲氧基苄基)氧基)-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0676] 在N<sub>2</sub>气氛下将ZnCl<sub>2</sub>(1.1g,8.2mmol)添加到以上步骤4的产物化合物(380mg,690.4 μmol)和以上步骤3的产物化合物(580mg,699.7 μmol)在无水DMF(10mL)中的溶液中。将所得混合物在25℃下搅拌16h。反应完成后,将混合物在减压下浓缩以给出粗产物,将其通过硅胶柱纯化(DCM:MeOH=10:1,添加0.5%Et<sub>3</sub>N)以给出呈白色固体的所希望的化合物(350mg,产率:40%)。MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:1210.5

[0677] 步骤6. 化合物(2S,3S,4S,5R,6R)-2-((((((2R,3S,4S,5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3-氟-4-羟基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备

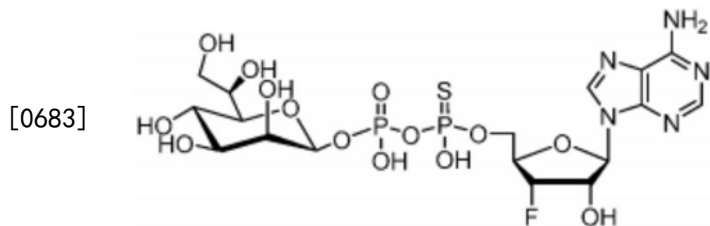


[0679] 将以上步骤5的产物化合物(350mg,289 μmol)在DCM(1mL)和TFA(0.2mL,2.7mmol)中的溶液在25℃下搅拌3h。反应完成后,通过添加Et<sub>3</sub>N将混合物调节至pH=7。将反应在减压下浓缩。将产物通过制备型HPLC纯化(水(10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN];B%:0%-30%,10min)以得到呈白色固体的所希望的化合物(70mg,产率39.9%)。

[0680] MS(ESI)m/z(M+H)<sup>+</sup>:848.2 <sup>1</sup>H NMR(400MHz,MeOD) δ8.83(s,0.5H),8.75(s,0.5H),8.20(s,1H),6.27-6.06(m,1H),5.76-5.61(m,2H),5.30-5.16(m,3H),5.09-4.93(m,2H),4.60-4.12(m,5H),3.97-3.95(m,1H),2.15(s,1.5H),2.14(s,1.5H),2.08-2.04(m,6H),2.02(s,1.5H),2.00(s,1.5H),1.95(s,1.5H),1.94(s,1.5H)。

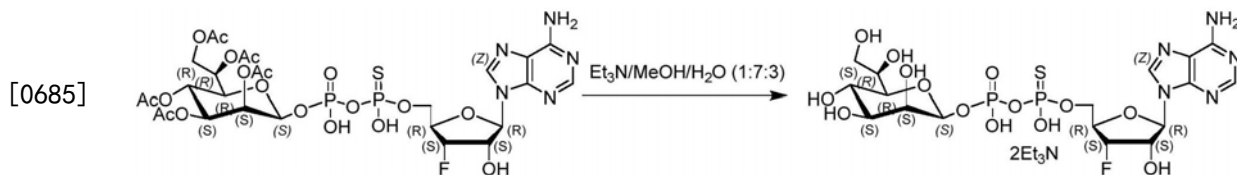
[0681] 化合物27

[0682] 腺苷-3'-氟---5'-(D-甘油-β-D-甘露-庚吡喃糖基)(羟基)硫代磷酰氧基磷酸酯



[0684] 步骤1. 腺苷-3'-氟-5'-(D-甘油-β-D-甘露-庚吡喃糖基)(羟基)硫代磷酰氧基磷

## 酸酯

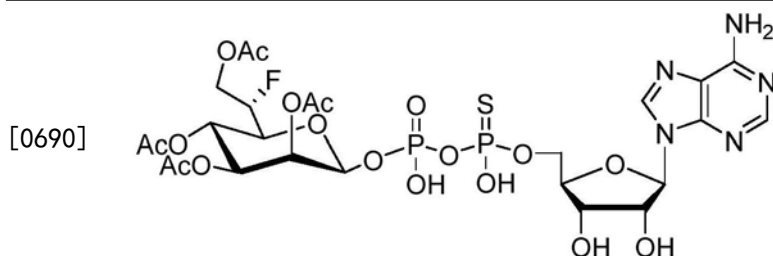


[0686] 将在MeOH/水/Et<sub>3</sub>N (7:3:1, 1.1mL) 溶液中的实施例26中步骤6的产物化合物 (10mg, 11.8μmol) 在20℃下搅拌5h。反应完成后, 将混合物浓缩并且从水中冻干以给出呈白色固体的作为三甲胺盐的所希望的化合物 (8mg, 产率91.8%)。

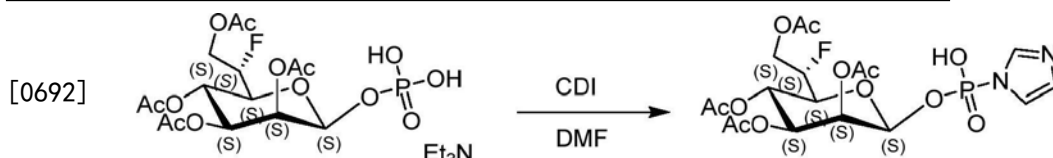
[0687] MS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>: 636.0. <sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8.67–8.49 (m, 1H), 8.15 (s, 1H), 6.16–6.02 (m, 1H), 5.45–5.18 (m, 1H), 4.97–4.82 (m, 1H), 4.32–4.18 (m, 1H), 4.15–3.87 (m, 4H), 3.75–3.53 (m, 5H), 3.44–3.35 (m, 1H), 2.97 (q, J=7.2Hz, 12H), 1.12 (t, J=7.2Hz, 18H)。

[0688] 化合物28

[0689] (2S, 3S, 4S, 5S, 6S)-2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3, 4-二羟基四氢咪喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯

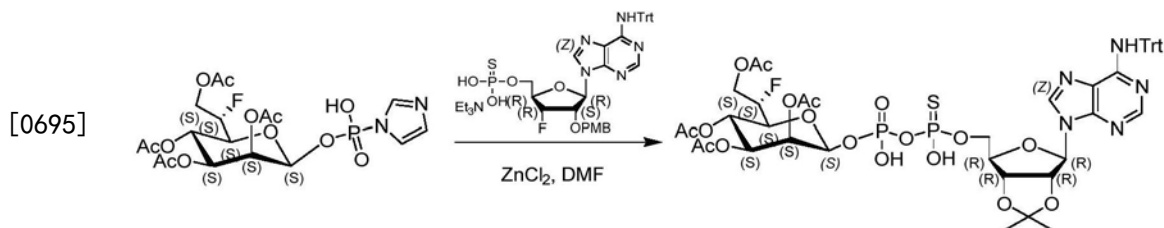


[0691] 步骤1. 化合物(2S, 3S, 4S, 5S, 6S)-2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-((羟基(1H-咪唑-1-基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备



[0693] 向实施例3中步骤12的产物化合物 (420mg, 748.01μmol, Et<sub>3</sub>N) 在DMF (8mL) 中混合物中添加CDI (1.2g, 7.5mmol)。将混合物在25℃下搅拌4h。反应完成后, 添加MeOH (0.3mL) 以将反应淬灭, 将混合物在减压下浓缩以给出所希望的化合物 (1.3g, 粗品), 将其直接用于下一步骤。

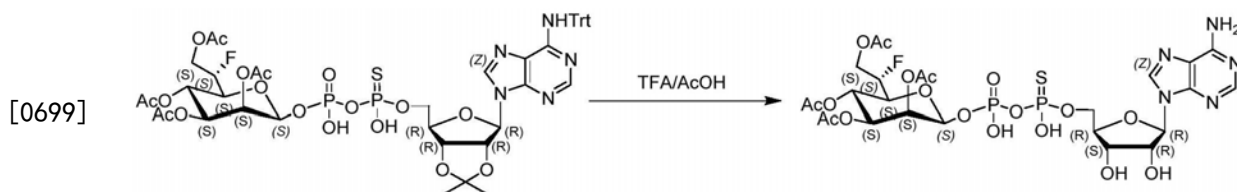
[0694] 步骤2. 化合物(2S, 3S, 4S, 5S, 6S)-2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-((((((((3aR, 4R, 6R, 6aR)-2, 2-二甲基-6-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢咪喃并[3, 4-d][1, 3]间二氧杂环戊烯-4-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备



[0696] 在N<sub>2</sub>气氛下将ZnCl<sub>2</sub> (1.2g, 8.5mmol) 添加到以上步骤1的产物化合物 (1.3g, 2.6mmol) 和实施例26中步骤3的产物化合物 (530mg, 709μmol, Et<sub>3</sub>N) 在无水的DMF (10mL) 中的溶液中。将所得混合物在25℃下搅拌16h。反应完成后, 将混合物在减压下浓缩以给出粗产物, 将其通过硅胶柱纯化 (DCM:MeOH=20:1, 添加1%Et<sub>3</sub>N) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (380mg, 产率:47.5%)。

[0697] MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 1088.7。

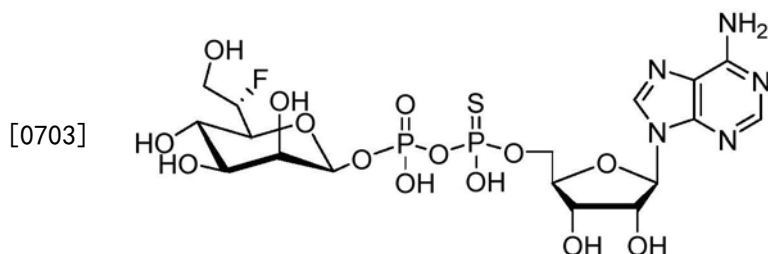
[0698] 步骤3. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5S, 6S) -2-((S)-2-乙酰氧基-1-氟乙基)-6-((((((2R, 3S, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3, 4-二羟基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 硫代磷酸酰基) 氧基) (羟基) 磷酸酰基) 氧基) 四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备



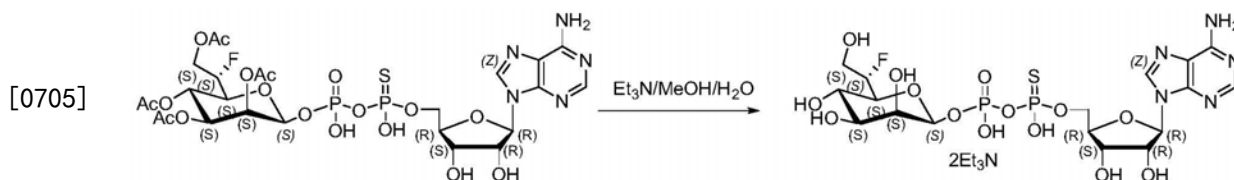
[0700] 将TFA (0.6mL, 8.10mmol) 添加到以上步骤2中获得的化合物 (370mg, 340.1μmol) 在H<sub>2</sub>O (0.4mL) 中的溶液中。将混合物在25℃下搅拌1.5h。反应完成后, 通过添加Et<sub>3</sub>N将反应调节至pH=7。将混合物在减压下浓缩以给出粗产物, 将其通过制备型HPLC纯化 (柱: Waters Xbridge 150\*25 5μ; 流动相: [水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 0%-30%, 10min) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (44.5mg, 产率: 16.0%, 98.5%纯度)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 806.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.68 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 6.11-6.09 (m, 1H), 5.72-5.57 (m, 2H), 5.37-5.32 (m, 1H), 5.22-5.20 (m, 1H), 4.77-4.73 (m, 1H), 4.69-4.60 (m, 2H), 4.52-4.45 (m, 2H), 4.26-4.24 (m, 3H), 3.91-3.83 (m, 1H), 2.13 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.92 (s, 3H)。

[0701] 化合物29

[0702] 腺苷-5'-(L-甘油-β-D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基) (羟基) 硫代磷酸酰基磷酸酯



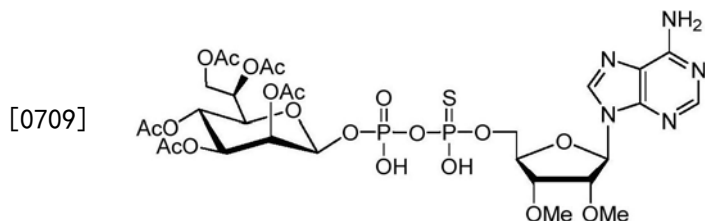
[0704] 步骤1. 化合物腺苷-5'-(L-甘油-β-D-甘露-6-氟-庚吡喃糖基) (羟基) 硫代磷酸酰基磷酸酯的制备



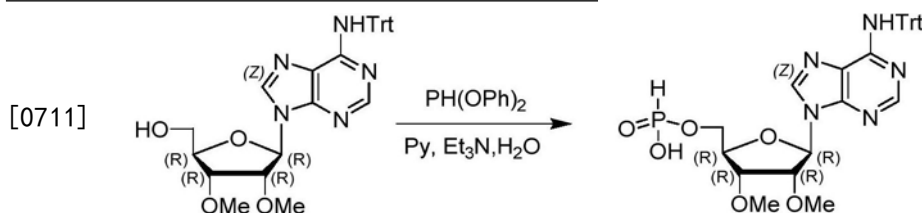
[0706] 将实施例28中步骤3的产物化合物 (16.1mg, 10.0 $\mu$ mol) 在MeOH/水/Et<sub>3</sub>N (7:3:1, 2mL) 溶液中的溶液在25 $^{\circ}$ C下搅拌3.5h。反应完成后, 将混合物浓缩并且从水中冻干以给出呈白色无定形固体的所希望的化合物 (14.3mg, 产率: 85.2%, 2Et<sub>3</sub>N)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>+</sup>: 636.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.47 (s, 0.3H), 8.43 (s, 0.7H), 8.07 (s, 0.7H), 8.06 (s, 0.3H), 5.98-5.95 (m, 1H), 5.41-5.11 (m, 1H), 4.86-4.73 (m, 1H), 4.39-4.37 (m, 1H), 4.26-4.24 (m, 1H), 4.12-4.10 (m, 2H), 4.00-3.94 (m, 1H), 3.83-3.64 (m, 4H), 3.54-3.51 (m, 1H), 3.33-3.21 (m, 1H), 3.02 (q, J=7.2Hz, 12H), 1.10 (t, J=7.2Hz, 18H)。

[0707] 化合物30

[0708] (2S, 3S, 4S, 5R, 6R) -2-(((((((2R, 3R, 4R, 5R) -5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3, 4-二甲氧基四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 硫代磷酸基) 氧基) (羟基) 磷酸基) 氧基) -6-((R)-1, 2-二乙酰氧基乙基) 四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯

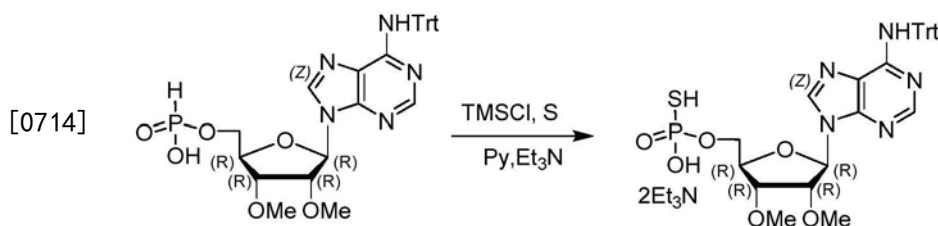


[0710] 步骤1. 化合物 ((2R, 3R, 4R, 5R) -3, 4-二甲氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基) 四氢呋喃-2-基) 甲基氢磷酸酯的制备



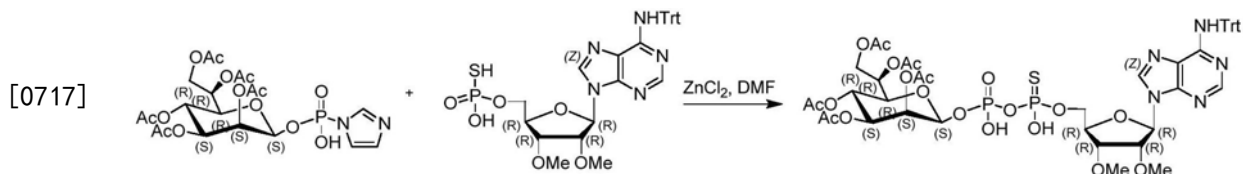
[0712] 将PH(OPh)<sub>2</sub> (1.35g, 5.75mmol) 添加到实施例13中步骤2的产物化合物 (1g, 1.86mmol) 在吡啶 (10mL) 中的溶液中。将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌2h。然后添加Et<sub>3</sub>N (1.33mL, 9.52mmol) 和H<sub>2</sub>O (0.37mL, 20.42mmol)。将所得混合物在25 $^{\circ}$ C下搅拌0.5h。除去溶剂以给出粗产物, 将其通过硅胶色谱法纯化 (DCM:MeOH=1:0至10:1, 添加0.5%Et<sub>3</sub>N) 以给出呈淡黄色固体的所希望的化合物 (1.5g, 产率: 94.7%, Et<sub>3</sub>N)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 602.1。

[0713] 步骤2. 化合物 0-(((2R, 3R, 4R, 5R) -3, 4-二甲氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基) 四氢呋喃-2-基) 甲基) 0, S-二氢硫代磷酸酯的制备



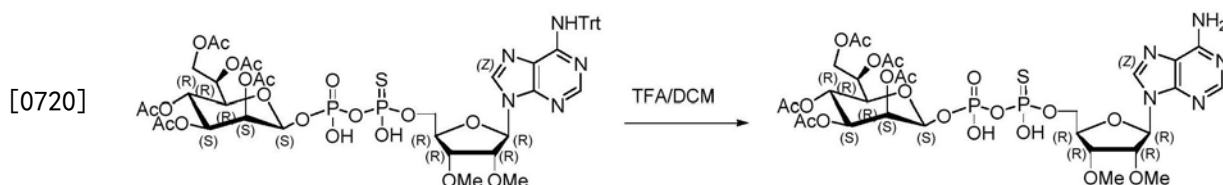
[0715] 将TMSCl (2.00mL, 15.7mmol) 添加到以上步骤1的产物化合物 (1.3g, 1.85mmol, Et<sub>3</sub>N) 在吡啶 (15mL) 和Et<sub>3</sub>N (15mL) 中的溶液中。将混合物在25℃下搅拌0.5h并且然后添加硫酸 (758mg, 23.6mmol)。将所得混合物搅拌另外1h。并且然后添加H<sub>2</sub>O (3.79mL, 210mmol)。将混合物搅拌另外0.5h。将反应过滤并且将滤液浓缩以给出粗产物, 将其通过硅胶色谱柱纯化 (DCM:MeOH=1:0至10:1, 添加0.5%Et<sub>3</sub>N)。获得呈黄色油状物的所希望的化合物 (400mg, 产率:33.1%, 2Et<sub>3</sub>N)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>:634.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ8.37 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.40-7.35 (m, 2H), 7.34-7.27 (m, 8H), 7.23-7.15 (m, 5H), 6.14-6.05 (m, 1H), 4.49-4.42 (m, 1H), 4.37-4.28 (m, 2H), 4.24-4.10 (m, 2H), 3.45-3.41 (m, 6H), 3.03 (q, J=7.2Hz, 12H), 1.27 (t, J=7.2Hz, 18H)。

[0716] 步骤3. 化合物 (2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)-6-((((((2R, 3R, 4R, 5R)-3,4-二甲氧基-5-(6-(三苯甲基氨基)-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



[0718] 将ZnCl<sub>2</sub> (516mg, 3.79mmol) 添加到实施例26中步骤4的产物化合物 (191mg, 293μmol, Et<sub>3</sub>N) 和以上步骤2的产物化合物 (400mg, 315μmol) 在DMF (10mL) 中的溶液中。将混合物在Ar气氛下在25℃下搅拌24h。除去溶剂以给出粗产物。将残余物通过硅胶色谱柱纯化 (DCM:MeOH=1:0至10:1, 添加1%Et<sub>3</sub>N)。获得呈无色油状物的所希望的化合物 (400mg, 产率:95.4%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>:1116.5。

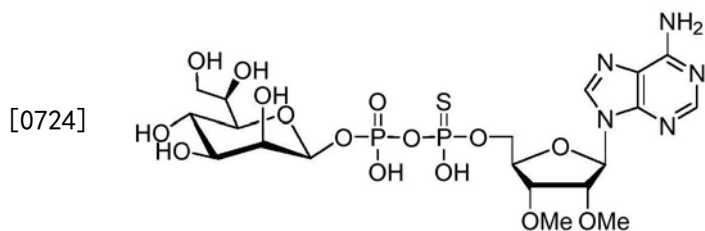
[0719] 步骤4. 化合物 (2S, 3S, 4S, 5R, 6R)-2-((((((2R, 3R, 4R, 5R)-5-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-3,4-二甲氧基四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)硫代磷酰基)氧基)(羟基)磷酰基)氧基)-6-((R)-1,2-二乙酰氧基乙基)四氢-2H-吡喃-3,4,5-三基三乙酸酯的制备



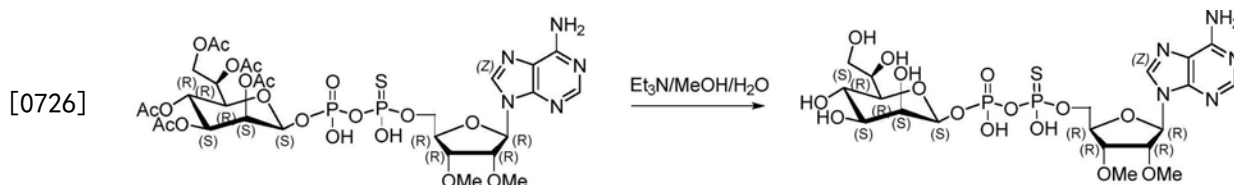
[0721] 将以上步骤3的产物化合物 (400mg, 358μmol) 与TFA (1mL) 在DCM (5mL) 中混合物在25℃下搅拌1h。反应完成后, 用Et<sub>3</sub>N将混合物调节至pH=7, 除去溶剂并且将残余物通过制备型HPLC纯化 (Waters Xbridge 150\*255u, 水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-CH<sub>3</sub>CN, 0-30%) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (20mg, 产率:6.4%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>:874.2。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ8.77 (s, 0.4H), 8.71 (s, 0.6H), 8.17 (s, 1H), 6.18-6.12 (m, 1H), 5.76-5.59 (m, 2H), 5.21-5.13 (m, 3H), 4.61-4.53 (m, 2H), 4.45-4.32 (m, 3H), 4.27-4.20 (m, 2H), 3.95-3.90 (m, 1H), 3.51 (s, 3H), 3.42 (s, 1.4H), 3.41 (s, 1.6H), 2.11 (s, 3H), 2.06-2.02 (m, 6H), 1.99 (s, 1.6H), 1.97 (s, 1.4H), 1.91 (s, 3H)。

[0722] 化合物31

[0723] 腺苷-2' 3'-二甲氧基-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)(羟基)硫代磷酰氧基磷酸酯



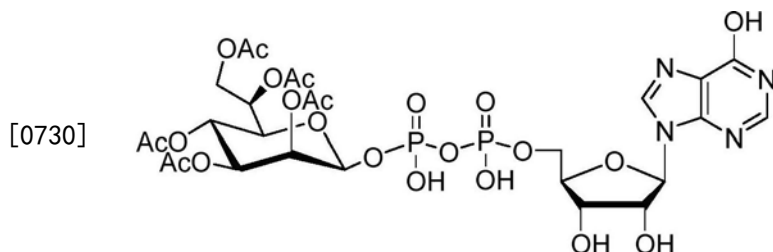
[0725] 步骤1. 化合物腺苷-2' 3' -二甲氧基-5' - (D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基) (羟基) 硫代磷酸酯的制备



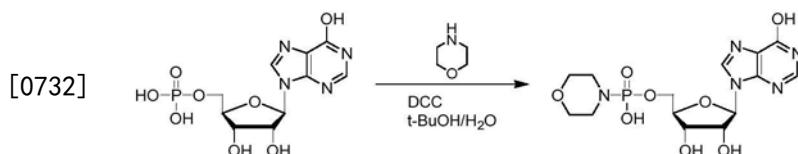
[0727] 将实施例30中步骤4的产物化合物 (8mg, 9.16 $\mu$ mol) 在MeOH (0.7mL)、H<sub>2</sub>O (0.3mL) 和 Et<sub>3</sub>N (0.1mL) 中的混合物在15 $^{\circ}$ C-20 $^{\circ}$ C下搅拌3h。然后将溶液在冷冻干燥器上冻干。获得呈白色固体的所希望的化合物 (6mg, 产率: 76%, 2Et<sub>3</sub>N)。MS (ESI) m/z (M-H)<sup>-</sup> = 662.1。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.47 (s, 0.4H), 8.45 (s, 0.6H), 8.10 (s, 1H), 6.02 (d, J = 6.0Hz, 1H), 5.13-5.05 (m, 1H), 4.50-4.42 (m, 2H), 4.40-4.36 (m, 1H), 4.28-4.19 (m, 1H), 4.20-4.10 (m, 2H), 4.00-3.92 (m, 1H), 3.85-3.80 (m, 1H), 3.59-3.55 (m, 2H), 3.52-3.41 (m, 2H), 3.36 (s, 3H), 3.27 (s, 3H), 3.02 (q, J = 7.3Hz, 12H), 1.10 (t, J = 7.3Hz, 18H)。

[0728] 化合物32

[0729] (2R, 3R, 4S, 5S, 6S) -2-((R)-1, 2-二乙酰氧基乙基)-6-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-3, 4-二羟基-5-(6-羟基-9H-嘌呤-9-基) 四氢呋喃-2-基) 甲氧基) (羟基) 磷酸基) 氧基) (羟基) 磷酸基) 氧基) 四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯



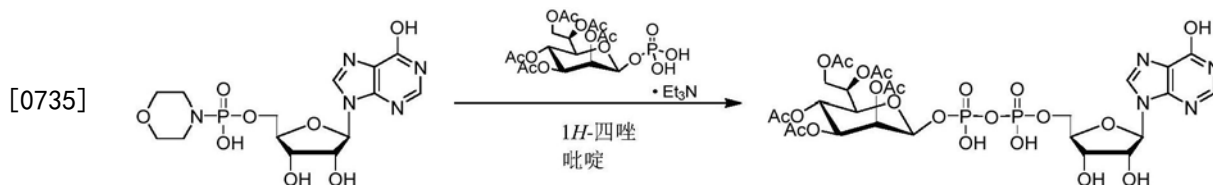
[0731] 步骤1. 化合物 ((2R, 3S, 4R, 5R)-3, 4-二羟基-5-(6-羟基-9H-嘌呤-9-基) 四氢呋喃-2-基) 甲基氢吗啉代磷酸酯的制备



[0733] 在N<sub>2</sub>下将在t-BuOH (6mL) 中的DCC (1.19g, 5.74mmol) 添加到化合物 ((2R, 3S, 4R, 5R)-3, 4-二羟基-5-(6-羟基-9H-嘌呤-9-基) 四氢呋喃-2-基) 甲基二氢磷酸酯 (500mg, 1.44mmol) 和吗啉 (500mg, 5.74mmol) 在t-BuOH (6mL) 和H<sub>2</sub>O (6mL) 中的回流溶液 (110 $^{\circ}$ C) 中。在N<sub>2</sub>下将溶液在110 $^{\circ}$ C下搅拌12h。混合物完成后, 将溶液冷却至20 $^{\circ}$ C, 并且滤出固体。收集滤液, 并且在真空下除去有机溶剂。将残余物用H<sub>2</sub>O (10mL) 稀释, 用TBME (20mL x 3) 洗涤。收

集水相并且将其在真空中浓缩以给出作为DCC盐 (810mg, 粗品) 并且呈淡黄色油状物的所希望的化合物, 将其不经进一步纯化而直接用于下一步骤。

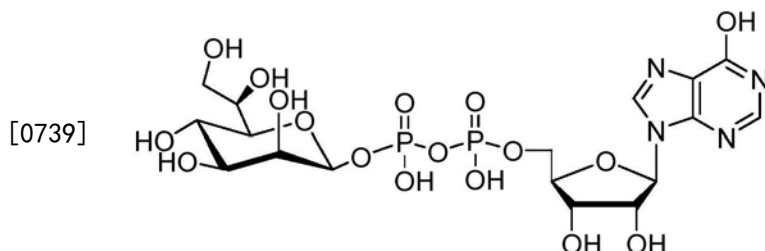
[0734] 步骤2. 化合物(2R, 3R, 4S, 5S, 6S)-2-((R)-1, 2-二乙酰氧基乙基)-6-((((((2R, 3S, 4R, 5R)-3, 4-二羟基-5-(6-羟基-9H-嘌呤-9-基)四氢呋喃-2-基)甲氧基)(羟基)磷酸基)氧基)(羟基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-3, 4, 5-三基三乙酸酯的制备



[0736] 将以上步骤1的产物化合物 (250mg, 500umol) 和实施例14中步骤14的产物化合物 (810mg, 1.94mmol) 用吡啶 (5mL x 3) 干燥。将残余物溶解在无水吡啶 (5mL) 中, 并且添加1H-四唑 (175mg, 2.50mmol)。将溶液在20℃下搅拌12h。然后将溶液温热至30℃并且继续搅拌12h。在真空中除去溶剂。将残余物溶解在EtOH (20mL) 中。滤出固体。收集滤液并且在真空中浓缩。将残余物通过硅胶柱纯化 (DCM: (MeOH:NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O=50:1)=1:0至1:1.2) 以给出粗产物 (80mg), 将其通过制备型HPLC再纯化 (柱: Waters Xbridge 150\*25 5u; 流动相: [水 (10mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)-ACN]; B%: 0%-30%, 10min) 以给出呈白色固体的所希望的化合物 (20mg, 产率: 4.82%)。MS (ESI) m/z (M+H)<sup>+</sup>: 831.4。<sup>1</sup>H NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.53 (s, 1H), 8.06 (s, 1H), 6.07 (d, J=5.4Hz, 1H), 5.48-5.47 (m, 1H), 5.34-5.32 (m, 1H), 5.22-5.19 (m, 3H), 4.66-4.58 (m, 1H), 4.47-4.43 (m, 2H), 4.25-4.19 (m, 4H), 3.89-3.88 (m, 1H), 2.12 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.92-1.90 (m, 3H)。

[0737] 化合物33

[0738] 肌苷-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯

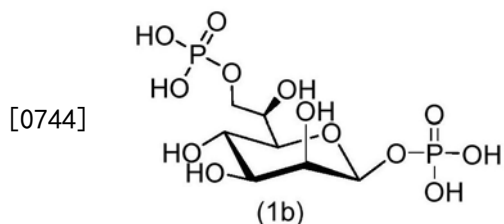


[0740] 步骤1. 化合物肌苷-5'-(D-甘油-β-D-甘露庚吡喃糖基)二磷酸酯的制备

[0741] 将在2mL (0.1M TEAB (8mL)、MeOH (6mL) 和TEA (0.1mL) 中的以上实施例32中步骤2的产物化合物在-20℃下搅拌2天。将溶液在真空中冷冻干燥以给出呈三甲胺盐的所希望的化合物。

[0742] HBP的前药

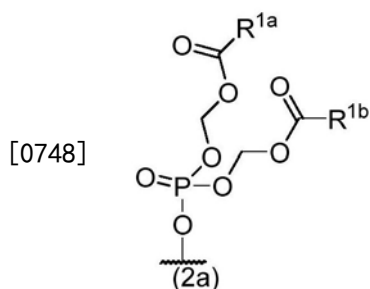
[0743] 下式1b所示的HBP的亲水性非常大, 使分子难以穿透细胞膜到达ALPK1, ALPK1是胞质蛋白。



[0745] 因此,本公开文本提供了适于使得能够穿透质膜的各种HBP前药。在实施方案中,前药包含在HBP的一个或多个磷酸酯部分上的一个或多个生物不稳定的保护基团。在实施方案中,所述一个或多个生物不稳定的保护基团经由酯键连接到所述HBP的一个或多个磷酸酯部分。可以这种方式附接的示例性保护基团包括例如羧基甲基(例如,POM、POC)、环水杨基(例如,环Sal)、环状1-芳基-1,3-丙烷基酯(例如,HepDirect)、芳氧基氨基酸磷酰胺或膦酰胺(例如,ProTide)、和甲基芳基卤代烷基酰胺。进一步的例子包括S-酰基-2-硫代乙基(SATE)、S-[ (2-羟基乙基) 亚硫基]-2-硫代乙基(DTE)、烷氧基烷基(例如,HDP、ODE)、氨基酸磷酰胺或膦酰胺单酯、双(氨基酸)磷酰胺或膦酰胺、和二磷酸酯或三磷酸酯。

[0746] 类型I:羧基甲基

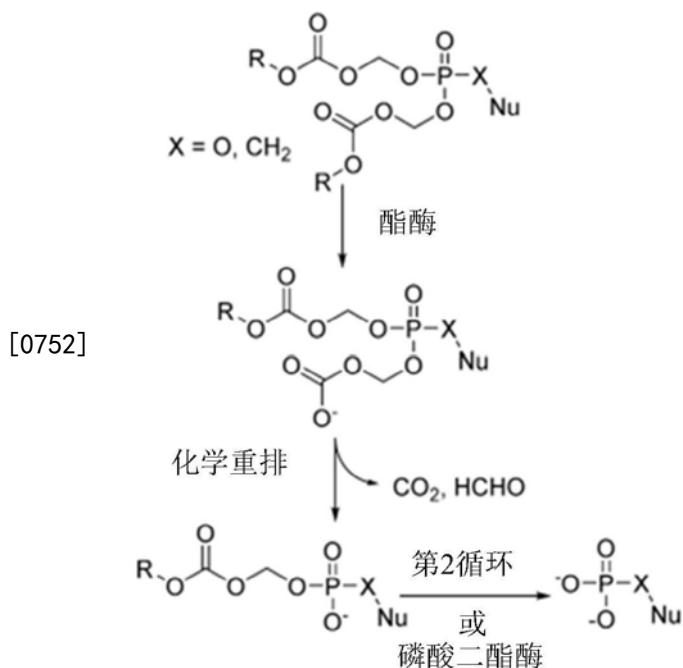
[0747] 羧基甲基是一类磷酸酯保护基团。在一些实施方案中,羧基甲基保护基团具有通式2a



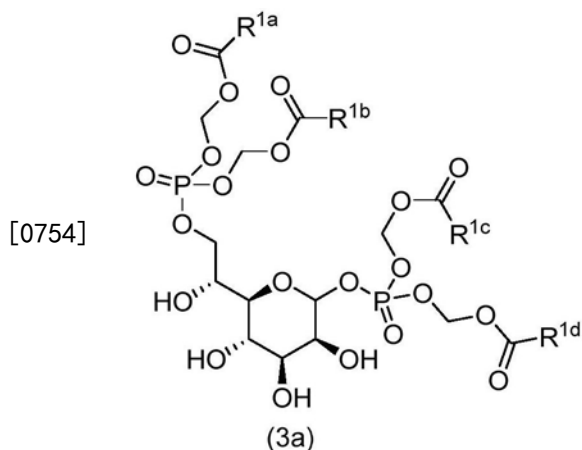
[0749] 其中R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>各自独立地是C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>1-12</sub>烷氧基,并且波浪线指示与分子其余部分的附接点。在一些实施方案中,R<sup>1a</sup>和R<sup>1b</sup>各自独立地是C<sub>1-8</sub>烷基或C<sub>1-8</sub>烷氧基。

[0750] 不受任何特定理论的束缚,据信受羧基甲基部分保护的磷酸酯基团通过以下方案I中描述的一系列化学转化在体内脱保护。

[0751] 方案I



[0753] 在一些实施方案中, HBP的前药具有式3a

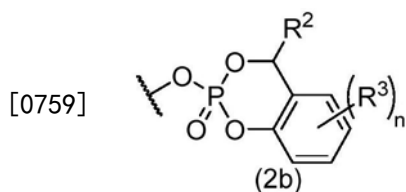


[0755] 其中R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>1c</sup>、和R<sup>1d</sup>各自独立地是C<sub>1-12</sub>烷基或C<sub>1-12</sub>烷氧基。在一些实施方案中, R<sup>1a</sup>、R<sup>1b</sup>、R<sup>1c</sup>、和R<sup>1d</sup>各自独立地是C<sub>1-8</sub>烷基或C<sub>1-8</sub>烷氧基。

[0756] 可以使用在Hwang, Y.和Cole, P.A. *Organic Letters* 2004, 6, 1555; Inuki, S.等人, Fujimoto, Y. *Organic Letters* 2017, 19, 3079或类似文献中描述的方法来制备HBP的羰氧基甲基前药。

[0757] 类型II: 环水杨基 (环Sa1)

[0758] 环水杨基 (环Sa1) 是一类磷酸酯保护基团。在一些实施方案中, 环Sa1保护基团具有通式2b

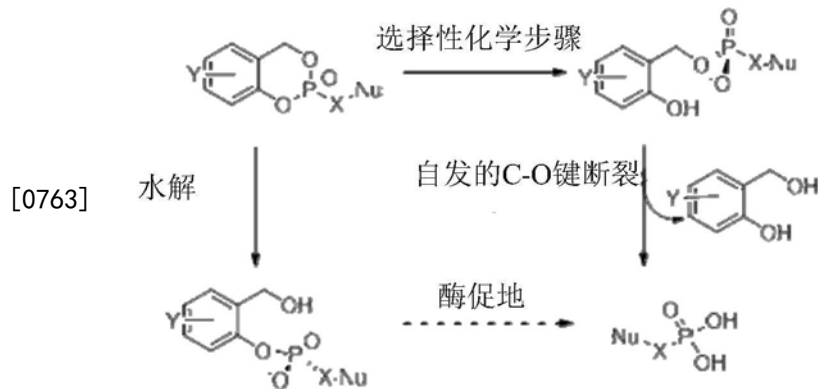


[0760] 其中R<sup>2</sup>是H、C<sub>1-8</sub>烷基、或卤素; R<sup>3</sup>是H、C<sub>1-8</sub>烷基、或卤素; 下标n是从1至3的整数; 并且

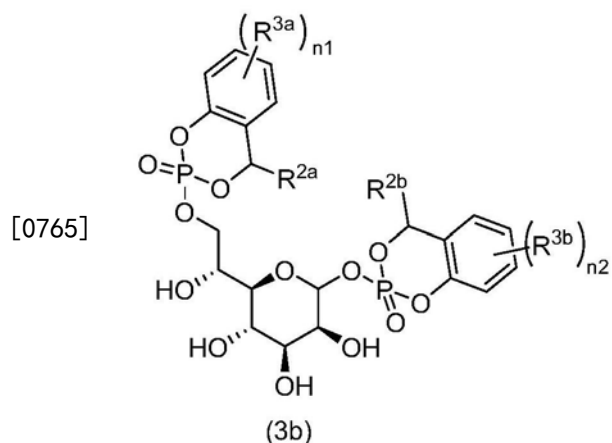
波浪线指示与分子其余部分的附接点。在一些实施方案中,  $R^2$  是H或C<sub>1-8</sub>烷基。在一些实施方案中,  $R^3$  是C<sub>1-8</sub>烷基。在一些实施方案中, 下标n是1。

[0761] 不受任何特定理论的束缚, 据信受一个或多个环Sa1部分保护的磷酸酯基团经由以下方案II中描述的一种或多种途径在体内脱保护。

[0762] 方案II



[0764] 在一些实施方案中, HBP的前药具有式3b

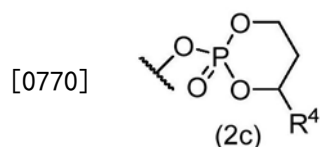


[0766] 其中 $R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 各自独立地是H、C<sub>1-8</sub>烷基、或卤素;  $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 各自独立地是H、C<sub>1-8</sub>烷基、或卤素; 并且下标n1和n2各自独立地是从1至3的整数。在一些实施方案中,  $R^{2a}$ 和 $R^{2b}$ 各自独立地是H或C<sub>1-8</sub>烷基。在一些实施方案中,  $R^{3a}$ 和 $R^{3b}$ 各自独立地是C<sub>1-8</sub>烷基。在一些实施方案中, 下标n1和n2各自是1。

[0767] 可以使用在Spáilová, P. 等人, ChemMedChem 2010, 5, 1386; Inuki, S. 等人, Organic Letters 2017, 19, 3079或类似文献中描述的方法来制备HBP的环Sa1前药。

[0768] 类型III: 环状1-芳基-1,3-丙烷基酯 (HepDirect)

[0769] 环状1-芳基-1,3-丙烷基酯 (HepDirects) 是一类磷酸酯保护基团。在一些实施方案中, HepDirect保护基团具有通式2c

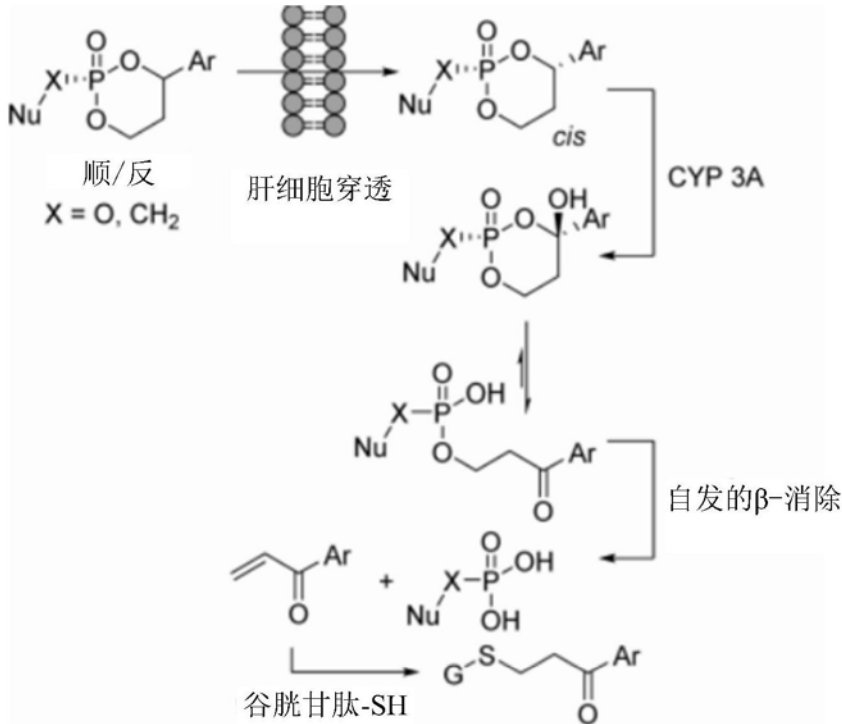


[0771] 其中 $R^4$ 是芳基或5或6元杂芳基, 其中所述杂芳基具有1-3个选自O、N、和S的杂原子环顶点; 并且波浪线指示与分子其余部分的附接点。在一些实施方案中,  $R^4$ 是芳基或6元杂

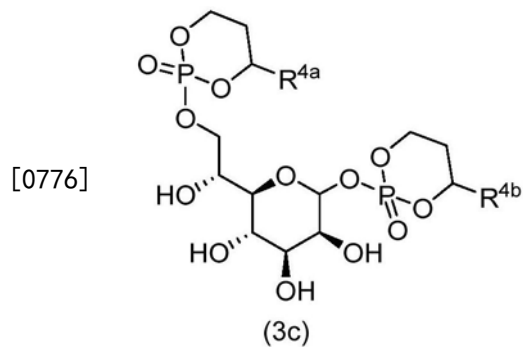
芳基。在一些实施方案中，R<sup>4</sup>是苯基或吡啶基。

[0772] 不受任何特定理论的束缚，据信受HepDirect部分保护的磷酸酯基团经由以下方案III中描述的途径在体内脱保护。

[0773] 方案III



[0775] 在一些实施方案中，HBP的前药具有式3c

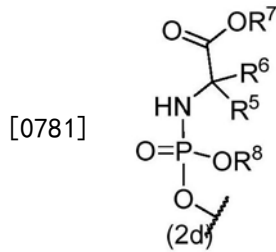


[0777] 其中R<sup>4a</sup>和R<sup>4b</sup>各自独立地是芳基或5或6元杂芳基，所述杂芳基具有1-3个选自O、N、和S的杂原子环顶点。在一些实施方案中，R<sup>4a</sup>和R<sup>4b</sup>各自独立地是芳基或6元杂芳基。在一些实施方案中，R<sup>4a</sup>和R<sup>4b</sup>各自独立地是苯基或吡啶基。

[0778] 可以使用在Reddy, K.R.等人, Tetrahedron Letters 2005, 46, 4321; Inuki, S.等人, Organic Letters 2017, 19, 3079或类似文献中描述的方法来制备HBP的HepDirect前药。

[0779] 类型IV: 芳氧基氨基酸酰胺 (Protide)

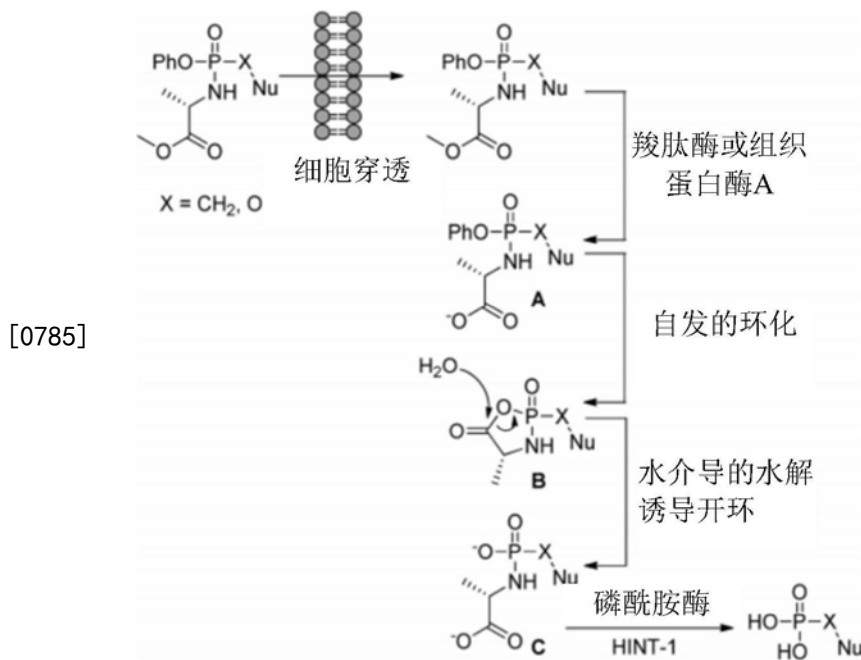
[0780] 芳氧基氨基酸酰胺 (Protide) 是一类磷酸酯保护基团。在一些实施方案中，protide保护基团具有通式2d



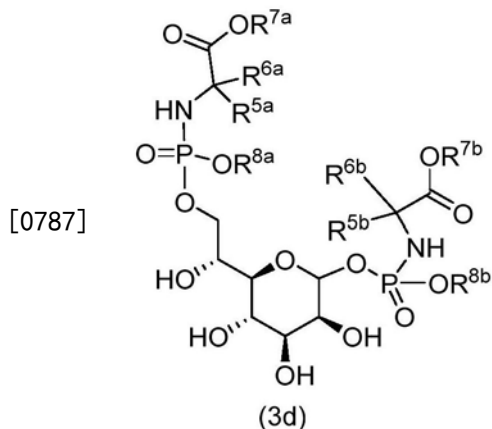
[0782] 其中 $R^5$ 和 $R^6$ 各自独立地是H或 $C_{1-8}$ 烷基; $R^7$ 是 $C_{1-8}$ 烷基; $R^8$ 是芳基;并且波浪线指示与分子其余部分的附接点。在一些实施方案中, $R^7$ 是甲基或异丙基。在一些实施方案中, $R^8$ 是苯基。

[0783] 不受任何特定理论的束缚,据信受Protide部分保护的磷酸酯基团经由以下方案IV中描述的途径在体内脱保护。

[0784] 方案IV



[0786] 在一些实施方案中,HBP的前药具有式3d

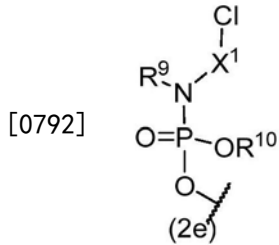


[0788] 其中 $R^{5a}$ 、 $R^{5b}$ 、 $R^{6a}$ 、和 $R^6$ 各自独立地是H或 $C_{1-8}$ 烷基; $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 各自独立地是 $C_{1-8}$ 烷基; $R^{8a}$ 和 $R^{8b}$ 各自独立地是芳基。在一些实施方案中, $R^{7a}$ 和 $R^{7b}$ 各自独立地是甲基或异丙基。在一些实施方案中, $R^{8a}$ 和 $R^{8b}$ 各自是苯基。

[0789] 可以使用在van Boom, J.H.等人, Tetrahedron 1975, 31, 2953; Inoue, J.-i.和Fujimoto, Y. Organic Letters 2017, 19, 3079或类似文献中描述的方法来制备HBP的Protide前药。

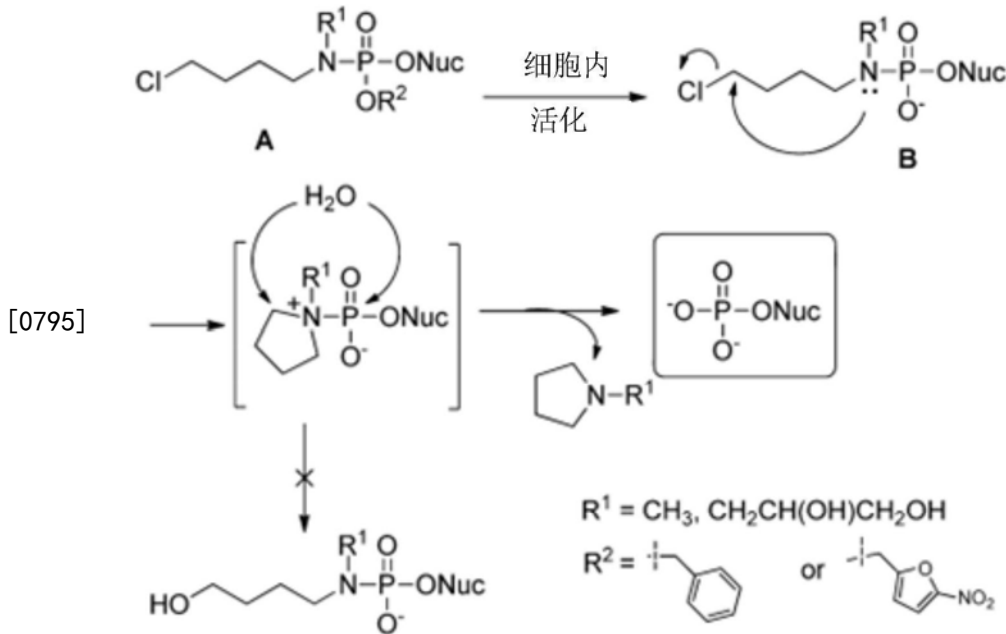
[0790] 类型V: 甲基芳基卤代烷基酰胺

[0791] 甲基芳基卤代烷基酰胺是一类磷酸酯保护基团。在一些实施方案中, 甲基芳基卤代烷基酰胺保护基团具有通式2e

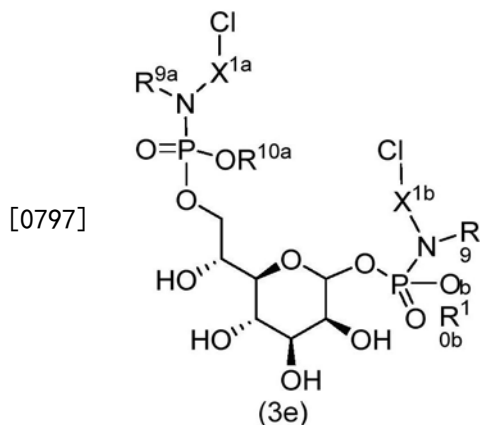


[0793] 其中R<sup>9</sup>是C<sub>1-8</sub>烷基; X<sup>1</sup>是C<sub>3-5</sub>亚烷基; 并且R<sup>10</sup>是芳基、杂芳基、芳基C<sub>1-4</sub>亚烷基、或杂芳基C<sub>1-4</sub>亚烷基, 所述杂芳基是具有1-3个选自O、N、和S的杂原子环顶点的5或6元环。在一些实施方案中, R<sup>9</sup>是C<sub>1-4</sub>烷基。在一些实施方案中, X<sup>1</sup>是C<sub>4</sub>亚烷基。在一些实施方案中, R<sup>10</sup>是芳基或芳基C<sub>1-4</sub>亚烷基。在一些实施方案中, R<sup>10</sup>是苯基。在一些实施方案中, R<sup>10</sup>是苄基。

[0794] 不受任何特定理论的束缚, 据信受甲基芳基卤代烷基酰胺部分保护的磷酸酯基团通过以下方案V中描述的一系列化学转化在体内脱保护。应当理解, 针对R<sup>9</sup>和R<sup>10</sup>所定义的基团是示例性的并且不旨在是限制性的。



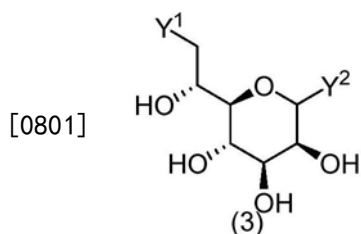
[0796] 在一些实施方案中, HBP的前药具有式3e



[0798] 其中 $R^{9a}$ 和 $R^{9b}$ 各自独立地是 $C_{1-8}$ 烷基； $X^{1a}$ 和 $X^{1b}$ 各自独立地是 $C_{3-5}$ 亚烷基；并且 $R^{10a}$ 和 $R^{10b}$ 各自独立地是芳基、杂芳基、芳基 $C_{1-4}$ 亚烷基、或杂芳基 $C_{1-4}$ 亚烷基，所述杂芳基是具有1-3个选自O、N、和S的杂原子环顶点的5或6元环。在一些实施方案中， $R^{9a}$ 和 $R^{9b}$ 各自独立地是 $C_{1-4}$ 烷基。在一些实施方案中， $X^{1a}$ 和 $X^{1b}$ 各自独立地是 $C_4$ 亚烷基。在一些实施方案中， $R^{10a}$ 和 $R^{10b}$ 各自独立地是芳基或芳基 $C_{1-4}$ 亚烷基。在一些实施方案中， $R^{10a}$ 和 $R^{10b}$ 各自独立地是苯基。在一些实施方案中， $R^{10a}$ 和 $R^{10b}$ 各自独立地是苄基。

[0799] 可以使用在Wu, W.等人, Journal of Medicinal Chemistry 2007, 50, 3743; Inoue, J.-i.和Fujimoto, Y. Organic Letters 2017, 19, 3079或类似文献中描述的方法来制备HBP的甲基芳基卤代烷基酰胺前药。

[0800] 本领域技术人员将认识到，HBP的两个磷酸酯部分各自可以独立地使用上面描述的方法用类型I至类型V的保护基团中的任何一种保护。因此，在一些实施方案中，HBP的前药由式3表示



[0802] 其中 $Y^1$ 和 $Y^2$ 各自独立地是磷酸酯、式2a、式2b、式2c、式2d、或式2e，条件是 $Y^1$ 和 $Y^2$ 不均为磷酸酯。

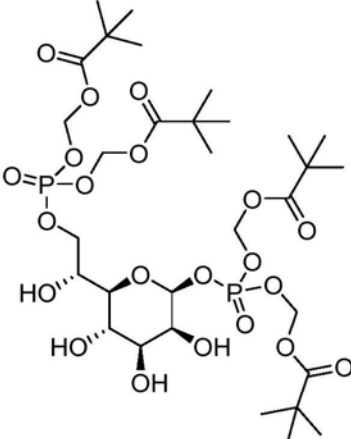
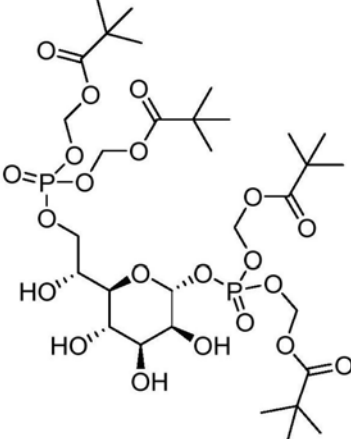
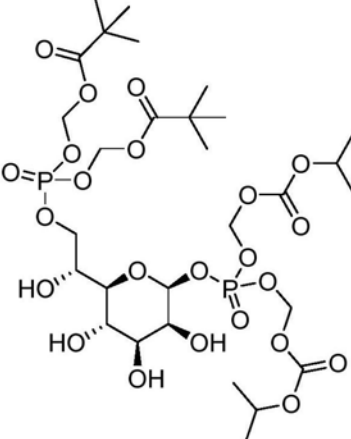
[0803] 在一些实施方案中，HBP的前药是表1的化合物

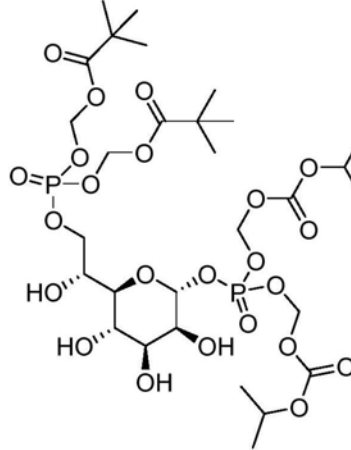
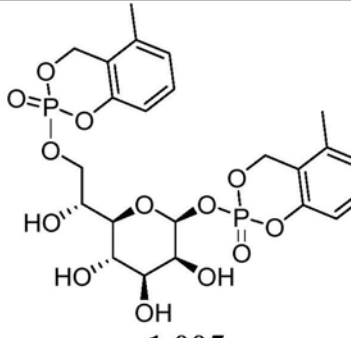
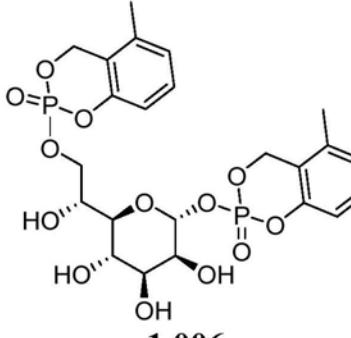
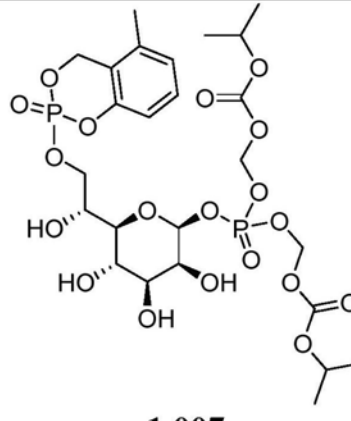
[0804] 表1

[0805]

化合物	化学名称
-----	------

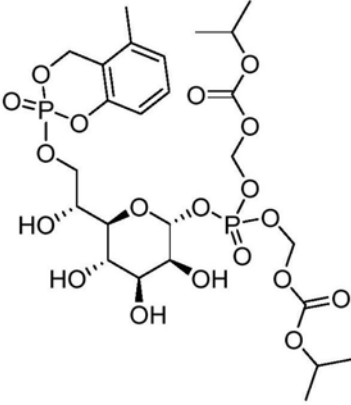
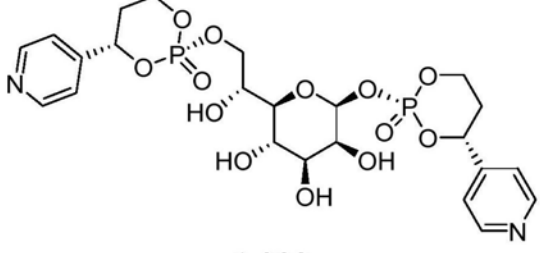
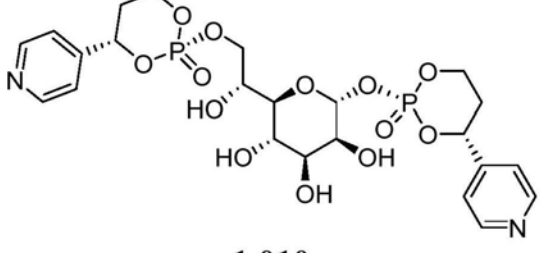
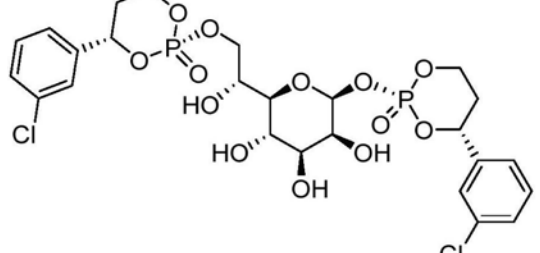
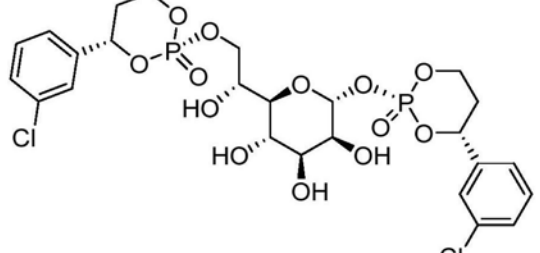
[0806]

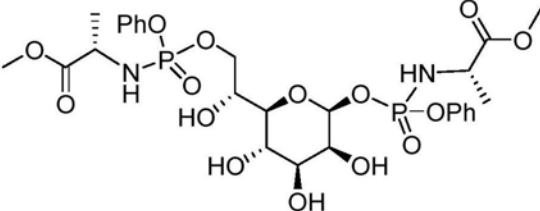
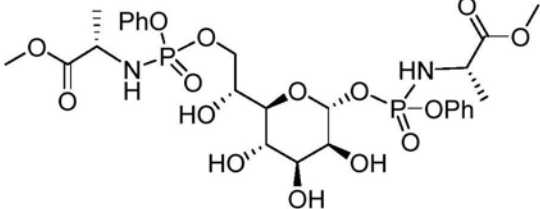
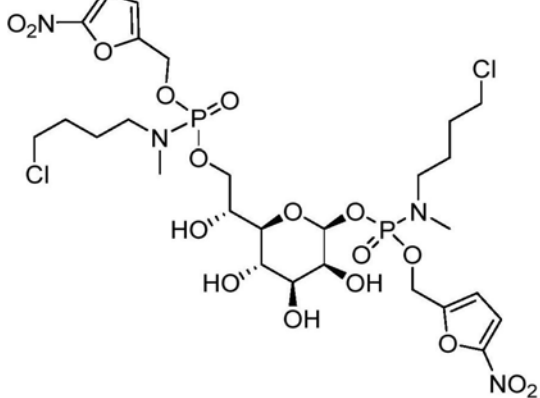
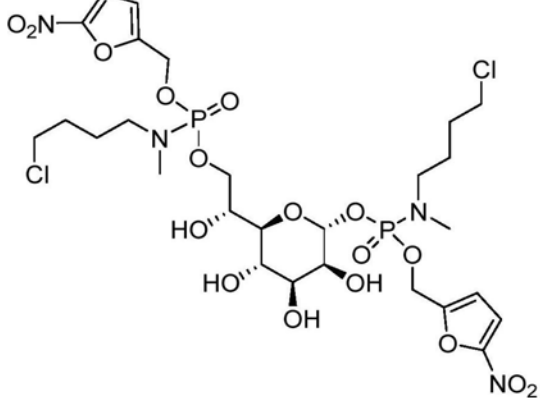
 <p style="text-align: center;"><b>1.001</b></p>	<p>(R)-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-6-((双(特戊酰氧基甲氧基)磷酰基)氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-羟基乙基双(特戊酰氧基甲基)磷酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.002</b></p>	<p>(R)-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-6-((双(特戊酰氧基甲氧基)磷酰基)氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-羟基乙基双(特戊酰氧基甲基)磷酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.003</b></p>	<p>(R)-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-6-((双(甲基异丙基碳酸酯)甲基磷酰基)氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-羟基乙基双(特戊酰氧基甲基)磷酸酯</p>

 <p style="text-align: center;"><b>1.004</b></p>	<p>(R)-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-6-((双(甲基异丙基碳酸酯)甲基磷酰基)氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-羟基乙基双(特戊酰氧基甲基)磷酸酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.005</b></p>	<p>2-((2R)-2-羟基-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-三羟基-6-((5-甲基-2-氧化-4H-苯并[d][1,3,2]二氧磷杂苯-2-基)氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)乙氧基)-5-甲基-4H-苯并[d][1,3,2]二氧磷杂苯-2-氧化物</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.006</b></p>	<p>2-((2R)-2-羟基-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-((5-甲基-2-氧化-4H-苯并[d][1,3,2]二氧磷杂苯-2-基)氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)乙氧基)-5-甲基-4H-苯并[d][1,3,2]二氧磷杂苯-2-氧化物</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.007</b></p>	<p>2-((2R)-2-羟基-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-三羟基-6-((双(甲基异丙基碳酸酯)甲基磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)乙氧基)-5-甲基-4H-苯并[d][1,3,2]二氧磷杂苯-2-氧化物</p>

[0807]

[0808]

 <p style="text-align: center;"><b>1.008</b></p>	<p>2-((2R)-2-羟基 -2-((2R,3S,4S,5S,6R)3,4,5-三羟基 -6-((双(甲基异丙基碳酸酯)甲基 磷酰基)氧基)四氢-2H-吡喃-2- 基)乙氧基)-5-甲基-4H-苯并 [d][1,3,2]二氧磷杂苯2-氧化物</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.009</b></p>	<p>(2R,4S)-2-((R)-2-羟基 -2-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-三羟 基-6-(((2R,4R)-2-氧化-4-(吡啶-4- 基)-1,3,2-二氧磷杂环己烷-2-基) 氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)乙氧 基)-4-(吡啶-4-基)-1,3,2-二氧磷杂 环己烷2-氧化物</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.010</b></p>	<p>(2R,4S)-2-((R)-2-羟基 -2-((2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟 基-6-(((2R,4R)-2-氧化-4-(吡啶-4- 基)-1,3,2-二氧磷杂环己烷-2-基) 氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)乙氧 基)-4-(吡啶-4-基)-1,3,2-二氧磷杂 环己烷2-氧化物</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.011</b></p>	<p>(2R,4R)-4-(3-氯苯 基)-2-(((2S,3S,4S,5S,6R)-6-((R)-2 -(((2R,4S)-4-(3-氯苯基)-2-氧化 -1,3,2-二氧磷杂环己烷-2-基)氧 基)-1-羟基乙基)-3,4,5-三羟基四 氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-1,3,2-二 氧磷杂环己烷2-氧化物</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.012</b></p>	<p>(2R,4R)-4-(3-氯苯 基)-2-(((2R,3S,4S,5S,6R)-6-((R)-2 -(((2R,4S)-4-(3-氯苯基)-2-氧化 -1,3,2-二氧磷杂环己烷-2-基)氧 基)-1-羟基乙基)-3,4,5-三羟基四 氢-2H-吡喃-2-基)氧基)-1,3,2-二 氧磷杂环己烷2-氧化物</p>

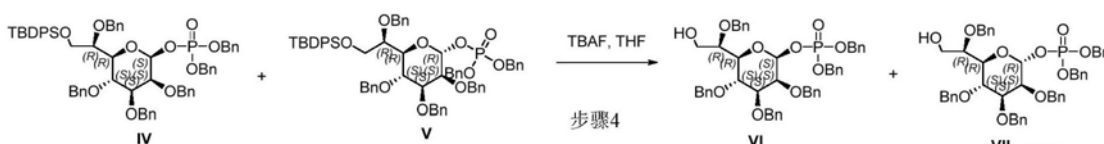
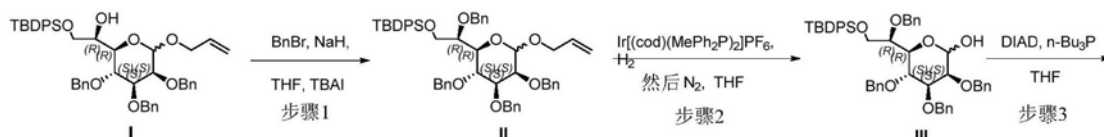
 <p style="text-align: center;"><b>1.013</b></p>	<p>(((2R)-2-羟基 -2-((2R,3S,4S,5S,6S)-3,4,5-三羟基-6-((((S)-1-甲氧基-1-氧代丙-2-基)氨基)(苯氧基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)乙氧基)(苯氧基)磷酸基)-L-丙氨酸甲酯</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.014</b></p>	<p>(((2R)-2-羟基 -2-((2R,3S,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-((((S)-1-甲氧基-1-氧代丙-2-基)氨基)(苯氧基)磷酸基)氧基)四氢-2H-吡喃-2-基)乙氧基)(苯氧基)磷酸基)-L-丙氨酸甲酯</p>
<p>[0809]</p>  <p style="text-align: center;"><b>1.015</b></p>	<p>(2R)-2-((2R,3S,4S,5S,6S)-6-(((4-氯丁基)(甲基)氨基)((5-硝基咪唑-2-基)甲氧基)磷酸基)氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-羟基乙基((5-硝基咪唑-2-基)甲基)(4-氯丁基)(甲基)磷酸胺</p>
 <p style="text-align: center;"><b>1.016</b></p>	<p>(2R)-2-((2R,3S,4S,5S,6R)-6-(((4-氯丁基)(甲基)氨基)((5-硝基咪唑-2-基)甲氧基)磷酸基)氧基)-3,4,5-三羟基四氢-2H-吡喃-2-基)-2-羟基乙基((5-硝基咪唑-2-基)甲基)(4-氯丁基)(甲基)磷酸胺</p>

[0810] H1b-ADP和HMP-1bP的合成

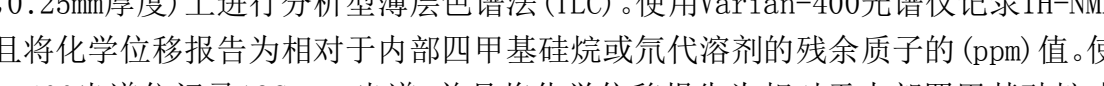
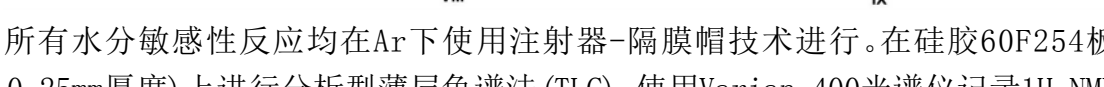
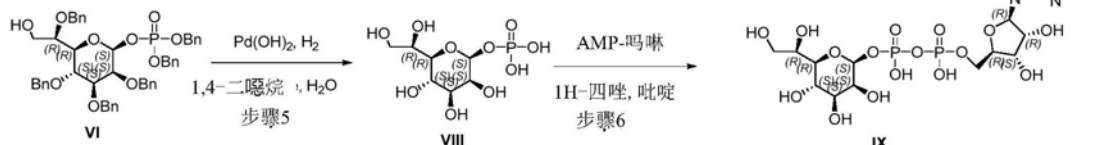
[0811] D-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP (“H1b-ADP”, 化合物IX) 和D-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -P (HMP-1bP, 化合物VIII)

[0812] 从根据Inuki等人, *Organic Letters* (2017), 19:3079-3082合成的化合物I进行H1b-ADP的合成。根据Zamyatina等人, *Angewandte Chemie, Int'l Ed.* (2000), 39 (22): 4150-4153合成以下化合物IX。

## [0813] 合成方案

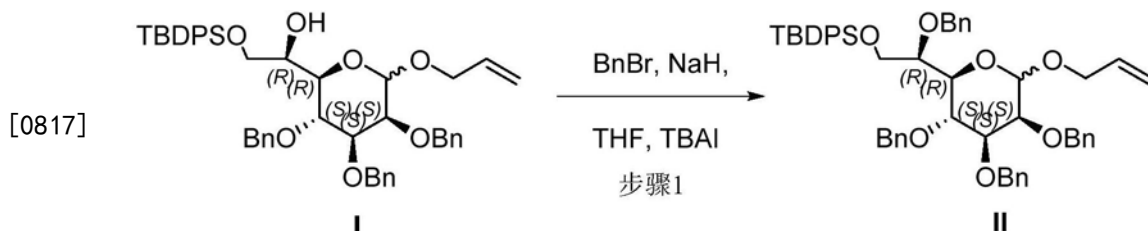


## [0814]



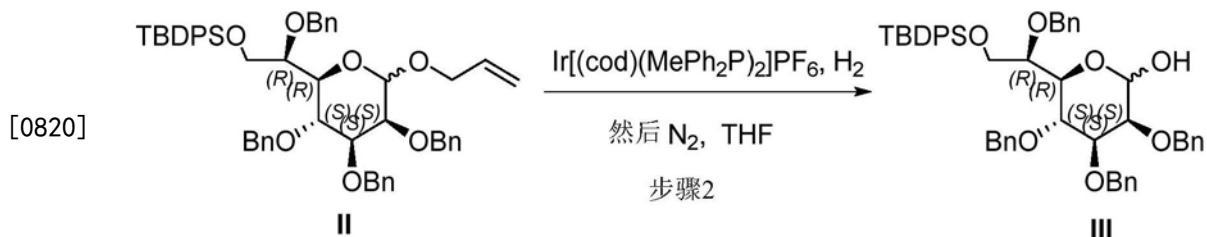
[0815] 所有水分敏感性反应均在Ar下使用注射器-隔膜帽技术进行。在硅胶60F254板(Qindao, 0.25mm厚度)上进行分析型薄层色谱法(TLC)。使用Varian-400光谱仪记录<sup>1</sup>H-NMR光谱, 并且将化学位移报告为相对于内部四甲基硅烷或氘代溶剂的残余质子的(ppm)值。使用Varian-400光谱仪记录<sup>13</sup>C-NMR光谱, 并且将化学位移报告为相对于内部四甲基硅烷或氘代溶剂的残余质子的δ(ppm)值。使用Varian-400光谱仪记录<sup>31</sup>P-NMR光谱, 并且将化学位移报告为相对于外部85%磷酸的δ(ppm)值。<sup>1</sup>H-NMR光谱列表如下: 化学位移、多重性(br=宽, s=单峰, d=双重峰, t=三重峰, q=四重峰, m=多重峰)、质子数目、和一个或多个偶合常数。

## [0816] 步骤1. 化合物II的合成:



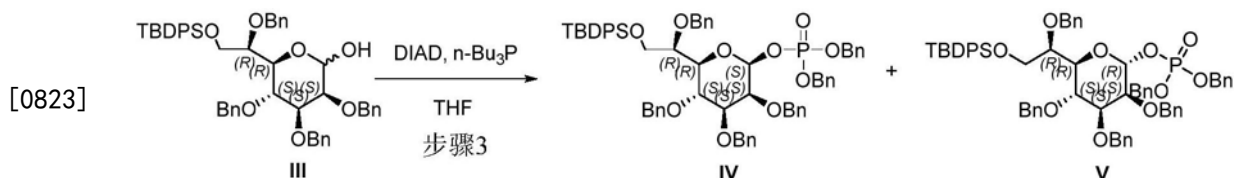
[0818] 在0℃下向化合物I (17.93g, 23.65mmol)、TBAI (0.9g, 2.365mmol) 和BnBr (7.1mL, 59.14mmol) 在DMF (270mL) 中的搅拌混合物中添加NaH (60%油分散体, 2.4g, 59.14mmol)。搅拌过夜后, 将反应用H<sub>2</sub>O淬灭。将全部混合物用PE/EtOAc (1:9) 萃取。将萃取物用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤, 并且经MgSO<sub>4</sub>干燥。将滤液在减压下浓缩以给出油状残余物, 将其通过快速色谱法在硅胶上用PE-EtOAc (5:1) 纯化以给出呈无色油状物的化合物II (6.3407g, 32%产率) <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) δ (ppm): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) 1.04 (s, 9H); 3.75-3.77 (m, 1H); 3.84-3.96 (m, 5H); 2.44-2.47 (d, 1H); 4.05-4.14 (m, 3H); 4.56-4.86 (m, 8H); 5.10-5.21 (m, 2H); 5.79-5.84 (m, 1H); 7.02-7.05 (m, 2H), 7.16-7.38 (m, 24H); 7.60-7.67 (m, 4H)

## [0819] 步骤2. 化合物III的合成:



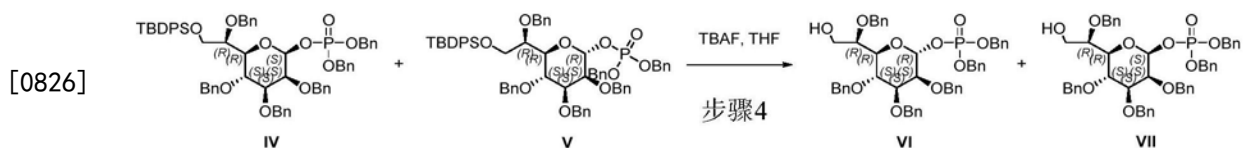
[0821] 将  $Ir[(cod)(MePh_2P)_2]PF_6$  (210mg, 253mmol) 在 THF (35mL) 中的溶液在室温下在 1atm 下在  $H_2$  气氛下搅拌直到产生淡黄色溶液, 然后向溶液中鼓入  $N_2$  以除去任何残余的氢气。在室温下将所得 Ir 催化剂溶液添加到化合物 II (1.0741g, 1.27mmol) 在 THF (35mL) 中的搅拌溶液中。在此温度下搅拌 6h, 在室温下将  $H_2O$  (22mL) 和  $I_2$  (650mg, 2.56mmol) 添加到中搅拌混合物中。在此温度下搅拌 1h 后, 将反应用饱和  $Na_2S_2O_3$  淬灭。将全部混合物用 EtOAc 萃取。将萃取物用饱和  $NaHCO_3$  洗涤并且经  $MgSO_4$  干燥。将滤液在减压下浓缩以给出油状残余物, 将其通过快速色谱法在硅胶上用 PE-EtOAc (1:1) 纯化以给出呈无色油状物的化合物 III (0.68g, 66.3% 产率)。 $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400MHz)  $\delta$  (ppm): 1.03 (s, 9H), 3.72 (s, 1H); 3.93~4.05 (m, 6H); 4.23~4.45 (m, 1H); 4.55~4.80 (m, 7H); 5.13 (br, 1H); 7.02~7.07 (m, 2H); 7.21~7.37 (m, 24H); 7.62~7.68 (m, 4H)。

[0822] 步骤3. 化合物IV和V的合成:



[0824] 在室温下向化合物 III (680mg, 0.842mmol)、磷酸二苄酯 (702mg, 2.53mmol)、 $n-Bu_3P$  (0.51g, 2.53mmol) 和  $MS5 \text{ \AA}$  (500mg) 在  $CH_2Cl_2$  (20mL) 中的搅拌混合物中添加  $Et_3N$  (0.71mL, 5.06mmol)。在此温度下搅拌 30min 后, 在室温下添加 DIAD (0.51g, 2.53mmol)。搅拌过夜后, 将混合物在减压下浓缩以给出油状残余物。将粗产物通过快速色谱法在硅胶上用 PE-EtOAc (7:3) 纯化以给出化合物 IV 和 V (0.966g, 100%) 的混合物, 将其直接用于下一步骤。

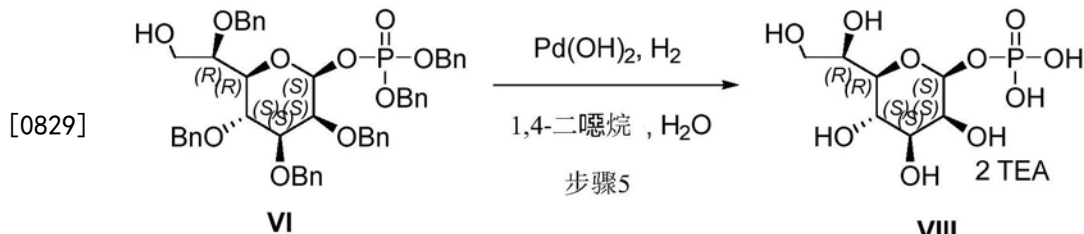
[0825] 步骤4. 化合物VI和VII的合成:



[0827] 在室温下向化合物 IV 和 V (0.966g, 0.904mmol) 的混合物在 THF (20mL) 中的搅拌溶液中添加 TBAF (在 THF 中 1M, 1.4mL, 1.4mmol)。搅拌过夜后, 将反应用饱和  $NH_4Cl$  淬灭。将全部混合物用 EtOAc 萃取。将萃取物用饱和  $NaHCO_3$  洗涤并且经  $MgSO_4$  干燥。将滤液在减压下浓缩以给出油状残余物, 将其通过快速色谱法用石油/EtOAc (3:1) 纯化以给出呈无色油状物的化合物 VI (169.7mg, 22.6%) 和化合物 VII (225mg, 30%)。化合物 VI:  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400MHz)  $\delta$  (ppm): 3.52~3.54 (m, 1H); 3.67~3.73 (m, 2H), 3.84~3.87 (dd, 1H); 3.97~3.99 (m, 1H); 4.04~4.07 (m, 1H); 4.47~4.50 (m, 1H); 4.58~4.60 (m, 1H); 4.71~4.74 (m, 1H); 4.87~4.89 (m, 1H); 4.93~5.03 (m, 9H); 5.70~5.72 (dd, 1H); 7.19~7.33 (m, 30H)。  $^{31}P$  NMR ( $CDCl_3$ ,

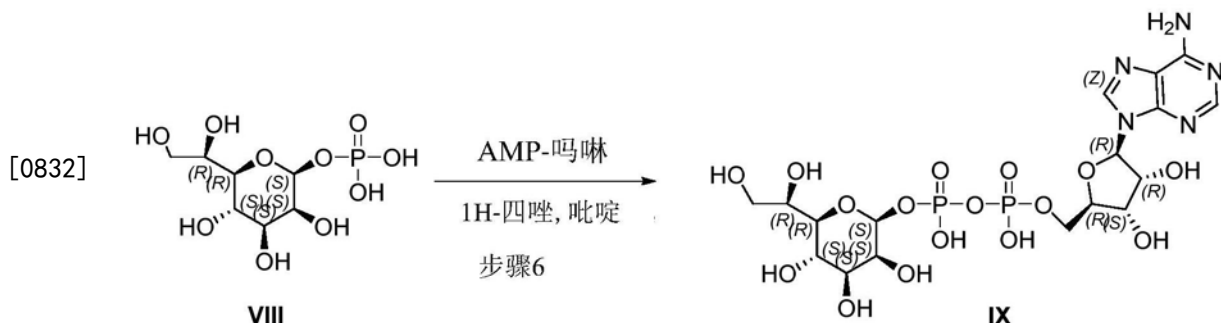
400MHz)  $\delta$ -2.60。化合物VII:  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$ 3.56~3.59 (dd, 1H); 3.65~3.68 (m, 2H); 3.81~3.84 (m, 2H); 4.02~4.07 (m, 1H); 4.52~4.56 (m, 1H); 4.59~4.61 (m, 1H); 4.68~4.78 (m, 3H); 4.86~4.88 (m, 1H); 4.95~5.11 (m, 7H); 5.24~5.26 (d, 1H); 7.18~7.39 (m, 30H).  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$ -2.50

[0828] 步骤5. 化合物VIII (D-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -P) 的合成:



[0830] 将在1,4-二噁烷/ $\text{H}_2\text{O}$  (5mL, 4:1) 中的化合物VI (105mg, 0.126mmol) 和20%w/w Pd(OH)<sub>2</sub>/C (21mg, 0.03mmol) 的混合物在室温下在 $\text{H}_2$  (1atm) 下搅拌2天。将混合物通过具有0.5m孔径的Advantech PTFE膜过滤器用 $\text{H}_2\text{O}$ 过滤。将滤液冷却至0 $^\circ\text{C}$ 并且添加TEA (53 $\mu\text{L}$ , 0.378mmol) 并且在此温度下搅拌3h。将所得混合物冻干以给出呈白色固体的化合物VIII  $\cdot$  2Et<sub>3</sub>N (74.3mg, 定量)。

[0831] 步骤6. 化合物IX (D-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP) 的合成:



[0833] 将化合物VIII (28.6mg, 0.058mmol) 溶解在无水吡啶中并且在真空下浓缩。将这种共沸重复三次以除去残余水。将AMP-吗啉 (97mg, 0.233mmol) 和1H-四唑 (32mg, 0.453mmol) 添加到干燥的化合物VIII中。添加无水吡啶 (2mL), 并且将混合物在 $\text{N}_2$ 气氛下搅拌78h。浓缩后, 将残余物沉淀并且用乙酸乙酯洗涤。将所得固体通过制备型HPLC (RP-C18) 纯化 (使用作为流动相的在水 (溶剂A) 和乙腈 (溶剂B) 中的10mM  $\text{NH}_4\text{COOCH}_3$  以及作为洗脱液的梯度5%~85% (溶剂B) 经3分钟, 然后85%~95% (溶剂B) 经0.5分钟并且保持在95%持续1分钟, 以0.4ml/min的流速; 柱: HSS T3 1.8 $\mu\text{m}$ , 2.1\*100mm, 柱40C) 以给出化合物IX和化合物VIII的混合物。将混合物在Sephadex G-15柱上再次纯化以给出呈白色固体的化合物IX (3.5mg, 10%)。  $^1\text{H}$  NMR和  $^{31}\text{P}$  NMR数据与文献中报道的数据一致。

[0834] 通过以下非限制性实施例进一步描述和举例说明本发明。

[0835] HBP是细菌ADP庚糖生物合成途径中的代谢中间体。通过HI<sub>d</sub>A酶或HI<sub>d</sub>E酶的激酶结构域 (取决于细菌菌株) 从D-甘油-D-甘露-庚糖-7-磷酸酯生成HBP, 并且通过细菌酶GmhB将其转化为D-甘油- $\beta$ -D-甘露-庚糖-1-磷酸酯 (HMP-1bP)。进而通过细菌酶HI<sub>d</sub>C或在一些细菌细胞中通过HI<sub>d</sub>E的ADP转移酶结构域将HMP-1bP转化为D-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP (H1b-ADP)。然后通过HI<sub>d</sub>D (GmhD) 将H1b-ADP转化为L-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP (H1b-ADP-6L)。

对于途径和相关酶的示意图,参见图16。

[0836] 其他人员已使用遗传方法敲除在此生物合成途径中HBP上游和下游两者的各种酶,以明晰HBP在诱导先天免疫应答中的作用,特别是当其涉及经由ALPK1-TIFA-TRAF6感染诱导的NF $\kappa$ B激活时。参见例如Gaudet等人, *Science* 348:1251 2015; Milivojevic等人, *PLoS Pathogens* 13 (2) e1006224 2017; 和Zimmermann等人, *Cell Reports* 20:2384 2017。Gaudet的结论是, NF $\kappa$ B激活“直接归因于HBP的存在”, 因为“在大肠杆菌或脑膜炎奈瑟氏菌中HBP上游的ADP-庚糖途径的破坏消除了NF- $\kappa$ B激活。”Gaudet, 在第1252页。Milivojevic利用了缺失HidE基因的鼠伤寒沙门氏菌细胞并且显示无法合成HBP的这些细胞无法诱导在受感染的细胞和旁观者细胞两者中IL-8的产生, 而缺乏在HBP、GmhB或WaaC的下游起作用的酶的细胞诱导了强的IL-8表达。Milivojevic, 在第12页。

[0837] 鉴于这项先前工作指出HBP作为诱导先天免疫的关键分子, 我们令人惊讶地发现除HBP之外的分子, 诸如HMP-1bP和H1b-ADP, 使用化学合成的HBP、HMP-1bP、和H1b-ADP也能够诱导以ALPK1依赖性方式在细胞中的IL-8和TNF $\alpha$ mRNA表达 (实施例1)。此外, 并且甚至更令人惊讶地, 我们发现, 在此测定中, H1b-ADP在诱导细胞因子表达方面比HBP或HMP-1bP更有效。我们还出乎意料地发现, 在热位移测定中化学合成的HBP不能与ALPK1结合 (实施例2), 并且化学合成的HBP进一步不能诱导ALPK1自磷酸化 (实施例3)。相反, 我们出乎意料地发现, 在这些测定中, 只有H1b-ADP能够与ALPK1结合并且诱导其自磷酸化。在进一步的实验中, 我们发现, H1b-ADP能够经由I $\kappa$ B的磷酸化来激活ALPK1依赖性NF $\kappa$ B通路信号传导 (实施例4)。另外, 我们发现, H1b-ADP-6L也能够激活其下游底物TIFA的ALPK1依赖性磷酸化 (实施例5)。最后, 在鼠类肿瘤模型中, 我们发现, H1b-ADP而不是HBP或HMP-1bP具有有效的抗肿瘤活性 (实施例7和实施例8) 并且此活性协同地加强了检查点抑制剂 (抗PD-1抗体) 和免疫共刺激分子的激动剂 (抗OX40激动剂抗体) 两者的抗肿瘤活性。

[0838] 总之, 本文提供的的数据指示, 除HBP之外的细菌代谢物, 即HMP-1bP、H1b-ADP和H1b-ADP-6L, 也可以诱导与诱导先天免疫有关的ALPK1依赖性信号传导, 并且这些分子中的至少一种, H1b-ADP, 在单独的和与其他免疫调节剂组合的两种情况下进一步具有令人惊讶且出乎意料的抗肿瘤活性。尽管这种分子已被认为是TLR-9激动剂 (Nagata等人的US 20100016250, Kyowa Hakko Kirin Co.), 并且在此基础上提出其通常可用于治疗过敏症、肿瘤、感染性疾病以及作为免疫刺激剂, 本结果第一个证明了其在ALPK1依赖性信号传导中的活性并且也第一个证明了在动物模型中的抗肿瘤活性。

[0839] 实施例

[0840] 实施例1: 化学合成的HBP、HMP-1bP和H1b-ADP各自诱导以ALPK1依赖性方式在293HEK细胞中的IL-8和TNF $\alpha$ mRNA表达

[0841] 为了测试HBP、HMP-1bP和H1b-ADP是否能够诱导以ALPK1依赖性方式的细胞因子表达, 我们使用ALPK1定向的小干扰RNA (siRNA) 以沉默HEK293细胞中的ALPK1表达。根据制造商的方案 (Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMax<sup>TM</sup>, Invitrogen 13778075) 将细胞接种 ( $1 \times 10^4$  细胞/孔) 到96孔板中并且用对照siRNA或ALPK1定向的siRNA转染。培养2天后, 将 (1) HBP (500uM、100uM、20uM, 图2A-2B), (2) HMP-1bP (500uM、100uM, 图3A-3B), (3) H1b-ADP (100nM、20nM、4nM、0.8nM, 图4A-4B) 添加到培养基中并且在4小时后收获细胞。分离总RNA (TRIzol<sup>TM</sup>, ThermoFisher), 并且合成cDNA (PrimeScript<sup>TM</sup> RT试剂盒 (Takara) 并且根据制造商的方案

使用QuantStudio™ 7Flex实时PCR系统(ThermoFisher)进行扩增(AceQ™ qPCR SYBR™ Green Master Mix, Vazyme Biotech)。IL-8和TNF $\alpha$ mRNA表达均以ALPK1依赖性方式增加,如通过在ALPK1定向的siRNA的存在下两种细胞因子的表达增加所证明。这些结果表明,HBP、HMP-1bP和H1b-ADP各自通过ALPK1激活IL-8和TNF $\alpha$ 基因表达。

[0842] 令人惊讶地,在此测定中,H1b-ADP比其他分子显著更有效。如图5所示,H1b-ADP在纳摩尔浓度(10nM)下均诱导IL-8和TNF $\alpha$ mRNA表达,而HBP或HMP-1bP需要100 $\mu$ M。这是令人惊讶的,如上所讨论,两组的先前报告显示,HBP而不是其下游代谢物(包括HMP-1bP和H1b-ADP)负责通过ALPK1-TIFA途径诱导IL-8(Gaudet等人,Science 348:1251 2015; Milivojevic等人,PLOS Pathogens 13(2)e1006224 2017)。

[0843] 实施例2:H1b-ADP而不是HBP或HMP-1bP与ALPK1结合

[0844] 热位移测定被广泛用于确定分子与感兴趣的蛋白质的结合。所述测定基于蛋白质变性所需的热能的增加,其中另一种分子与所述蛋白质结合。SYPRO Orange是用于检测热位移的荧光化合物。SYPRO Orange与蛋白质的疏水性表面结合,并且水会强烈淬灭其荧光。当蛋白质解折叠时,暴露的疏水性表面会结合染料,导致荧光增加。当另一种分子与蛋白质结合时,观察到蛋白质解折叠所需的温度升高。

[0845] 这种测定系统用于确定化学合成的HBP、HMP-1bP和H1b-ADP是否直接与ALPK1结合。图6示出了在不存在或存在1 $\mu$ M、5 $\mu$ M、25 $\mu$ M或125 $\mu$ M的HBP、HMP-1bP和H1b-ADP中的每一种的情况下孵育的ALPK1(7 $\mu$ M与1000x SYPRO Orange混合)的热位移。HBP或HMP-1bP均不能诱导热位移。只有H1b-ADP在所测试的三种最高浓度5 $\mu$ M、25 $\mu$ M和125 $\mu$ M中的每一种下引起大于1度的位移。这些结果指示,H1b-ADP而不是HBP或HMP-1bP能够直接与ALPK1结合。

[0846] 我们先前在此测定中使用从其前体D-甘油-D-甘露-庚糖-7-P(HMP)通过酶催化在体外产生的HBP发现HBP结合ALPK1。在那些研究中,用于体外产生HBP的酶是糖激酶HI $\alpha$ ,所述糖激酶HI $\alpha$ 是从野生型大肠杆菌细胞中纯化的。如下文在下面的实施例9中所讨论的,我们现在认为纯化的HI $\alpha$ 酶被另外的酶(推测是Gmh $\beta$ 和H1 $\delta$ E)污染,所述另外的酶在那些较早的测定中将至少一些HBP转化为H1b-ADP。

[0847] 实施例3:H1b-ADP而不是HBP或HMP-1bP诱导ALPK1自磷酸化

[0848] ALPK1激活导致其自磷酸化。因此,我们接下来的疑问是H1b-ADP与ALPK1的结合是否足以诱导ALPK1自磷酸化。根据标准方案进行磷酸化测定。简而言之,将ALPK1在含ATP和化学合成的HBP、HMP-1bP或H1b-ADP的测定缓冲液(20 $\mu$ l,25mM HEPES pH 7.5、50mM KCl、0.1mM EDTA、0.1mM EGTA、2mM DTT、1.5mM CaCl $_2$ 、10mM MgCl $_2$ )中孵育(2nM,25 $^{\circ}$ C,1h),然后进行变性凝胶电泳以及用抗磷酸苏氨酸抗体(CST)进行蛋白质印迹分析以检测ALPK1的自磷酸化。如图7所示,仅在H1b-ADP(10nM、1nM和0.2nM)的存在下检测到ALPK1的磷酸化,指示了H1b-ADP而不是HBP或HMP-1bP诱导ALPK1的ATP依赖性自磷酸化和激活。在此测定中使用的HBP和HMP-1bP的浓度范围(1nM、10nM、100nM)比针对H1b-ADP使用的浓度高10倍。

[0849] 我们先前在此测定中使用从其前体D-甘油-D-甘露-庚糖-7-P(HMP)通过酶催化在体外产生的HBP发现HBP能够诱导ALPK1自磷酸化。在那些研究中,用于体外产生HBP的酶是糖激酶HI $\alpha$ ,所述糖激酶HI $\alpha$ 是从野生型大肠杆菌细胞中纯化的。如在下面的实施例9中所讨论的,我们现在认为纯化的HI $\alpha$ 酶被另外的酶污染,所述另外的酶在那些较早的测定中将至少一些HBP转化为H1b-ADP。

[0850] 实施例4:H1b-ADP诱导I $\kappa$ B的ALPK1依赖性磷酸化

[0851] NF $\kappa$ B RelA (p65) 是必须从细胞质易位到细胞核的转录因子,在细胞核中它与许多靶基因的启动子区域相互作用以调节其转录。NF $\kappa$ B RelA的靶基因包括例如炎性细胞因子,诸如IL-8、TNF $\alpha$ 、CXCL1和CXCL3。为了使p65的核易位发生,必须首先降解其所在的细胞质复合物。此过程是由I $\kappa$ B的磷酸化和随后的激活引发的。因此,I $\kappa$ B磷酸化可以用作NF $\kappa$ B激活的标志。

[0852] 接下来,我们使用I $\kappa$ B的磷酸化作为这种活性的标志来测试H1b-ADP诱导的ALPK1自磷酸化是否有效激活NF $\kappa$ B。根据标准方案进行磷酸化测定,并且通过凝胶电泳以及使用检测磷酸化的I $\kappa$ B的抗体的蛋白质印迹(Western blotting)来检测磷酸化的蛋白质。简而言之,以20 $\mu$ l体积在25 $^{\circ}$ C下在含有2nM ALPK1和H1b-ADP(多少)同时含或不含ATP或者单独的ALPK1或单独的H1b-ADP(均在ATP的存在下)的测定缓冲液(25mM HEPES pH 7.5、50mM KCl、0.1mM EDTA、0.1mM EGTA、2mM DTT、1.5mM CaCl<sub>2</sub>、10mM MgCl<sub>2</sub>)中进行测定。孵育1小时后,将反应加载到变性凝胶上进行蛋白质电泳,并且使用p-I $\kappa$ B抗体(Abcam)进行蛋白质印迹以检测I $\kappa$ B的磷酸化。

[0853] 如图9所示,仅在ATP的存在下在ALPK1和H1b-ADP两者的存在下才检测到I $\kappa$ B磷酸化。这些结果指示,HBP诱导的ALPK1自磷酸化激活了NF $\kappa$ B途径。

[0854] 实施例5:H1b-ADP-6L诱导TIFA的ALPK1依赖性磷酸化

[0855] L-甘油-D-甘露-庚糖-1 $\beta$ -ADP (H1b-ADP-6L) 是在与HBP、HMP-1bP和H1b-ADP相同的生物合成途径中的另一种细菌代谢物。它是从H1b-ADP通过细菌HI $\delta$ D (GmhD) 酶的作用形成的。我们的疑问是在结构上与H1b-ADP非常相似的这种分子是否具有ALPK1生物活性。

[0856] 我们用H1b-ADP和H1b-ADP-6L以及ALPK1蛋白(2nM)和TIFA蛋白(1.6 $\mu$ M)在含有50 $\mu$ M ATP的激酶缓冲液中进行了体外激酶测定。通过变性凝胶电泳,然后使用抗磷酸苏氨酸抗体进行蛋白质印迹来分析TIFA磷酸化。以2nM、0.4nM、80pM、16pM、和3pM添加H1b-ADP或H1b-ADP-6L。如图10所示,H1b-ADP-6L以与H1b-ADP类似的方式激活ALPK1依赖性信号传导。

[0857] 实施例6:H1b-ADP(而不是HMP-1bP)瘤内注射减缓肿瘤生长并且诱导肿瘤组织中的炎性基因过表达

[0858] 我们使用CT26肿瘤异种移植模型来测试H1b-ADP的抗癌活性。将肿瘤细胞( $2 \times 10^5$ 个/100 $\mu$ L CT26细胞)皮下接种到BALB/c小鼠的右侧腹。在第6天,将肿瘤直径已达到3-5mm的小鼠随机化并且分为三组(每组n=8):对照、HMP-1bP(580 $\mu$ g)和H1b-ADP(1.2 $\mu$ g)。在接种后第6、8、10、12和14天,使用20 $\mu$ L的总体积进行注射。使用公式( $L \times W^2$ )/2每2天从卡尺测量的肿瘤尺寸计算肿瘤体积,其中L是较长的测量值。如图11所示,在此模型系统中,H1b-ADP而不是HMP-1bP降低了肿瘤的生长,指示H1b-ADP能够引发有效抑制肿瘤生长的抗肿瘤免疫应答。

[0859] 我们接下来的疑问是H1b-ADP是否引起肿瘤内促炎细胞因子的增加。将肿瘤细胞( $2 \times 10^5$ 个/100 $\mu$ L CT26细胞)皮下接种到BALB/c小鼠的右侧腹。在接种后第7天,瘤内注射(20 $\mu$ L) 2.5 $\mu$ g (n=2)、250ng (n=2)、50ng (n=2) H1b-ADP或对照(n=2)。注射后4小时,解剖并且收获肿瘤问题。分离总RNA(TRIzol<sup>TM</sup>, ThermoFisher),并且合成cDNA(PrimeScript<sup>TM</sup> RT试剂盒, Takara)并且根据制造商的方案使用QuantStudio<sup>TM</sup> 7Flex实时PCR系统(ThermoFisher)进行扩增(AceQ<sup>TM</sup> qPCR SYBR<sup>TM</sup> Green Master Mix, Vazyme Biotech)。

[0860] 结果在图12中示出。在此实验中,炎性细胞因子IL-1b、Tnfa、Ifn  $\gamma$  和IL-6以及趋化因子Cxc11的mRNA表达在H1b-ADP注射后增加,指示了在肿瘤中激活了炎症。在H1b-ADP注射后,细胞毒性T细胞标志物CD8、辅助T细胞标志物CD4、调节T细胞标志物Foxp3和Th1细胞标志物T-bet的mRNA表达增加,指示了在注射H1b-ADP的肿瘤中细胞毒性T、辅助T细胞、调节T细胞和Th1细胞的数目增加。在注射H1b-ADP的肿瘤中PD-1和PD-L1的表达增加,表明将抗PD-1或抗PD-L1疗法与H1b-ADP注射组合可以在减缓肿瘤生长方面具有协同作用。

[0861] 实施例7:H1b-ADP和抗PD-1抗体协同作用以抑制肿瘤生长

[0862] 靶向B7免疫球蛋白超家族分子(CTLA-4、PD-1和PD-L1)的拮抗抗体代表免疫检查点抑制方法,所述方法已在各种类型的癌症中产生了抗肿瘤免疫和临床反应。然而,许多患者对基于这些抗体的单一疗法无反应,并且许多其他患者在疗法后复发。因此,需要共疗法来解决对免疫检查点抑制剂疗法的主要和次要抗性。

[0863] 为了测试H1b-ADP是否可以通过检查点抑制剂强化抗肿瘤反应,我们测试了与抗PD1抗体共给予的作用。将肿瘤细胞( $2 \times 10^5$ 个/100 $\mu$ L CT26细胞)皮下接种到BALB/c小鼠的左侧腹和右侧腹。在第7天,将肿瘤直径已达到5mm的小鼠随机化并且分(每组n=8)为以下四组:抗PD1抗体;大鼠IgG;H1b-ADP+大鼠IgG;H1b-ADP+抗PD1抗体。我们利用RMP1-14作为抗PD1抗体(10mg/kg),并且利用大鼠IgG 2a(2A3)作为对照IgG。在接种后第6、10、12和17天以200 $\mu$ L的体积腹膜内给予抗PD-1抗体和对照IgG中的每一种。在第6、8、10、12和15天以20 $\mu$ L的体积瘤内注射了H1b-ADP(6.2 $\mu$ g)。使用公式( $L \times W^2$ )/2每2天从卡尺测量的肿瘤尺寸计算肿瘤体积,其中L是较长的测量值。注射肿瘤的结果在图13A中示出,并且远处肿瘤的结果在图13B中示出。在此实验中,单独给予H1b-ADP或抗PD1抗体显著抑制了肿瘤生长并且达到相似的程度。H1b-ADP和抗PD1抗体的组合不仅抑制肿瘤生长,而且还导致若干肿瘤的消失。这些结果指示,H1b-ADP和检查点抑制剂(诸如抗PD1抗体)的组合有效抑制体内肿瘤细胞的生长并且甚至抑制活力。

[0864] 实施例8:H1b-ADP和抗OX40激动剂抗体协同作用以抑制肿瘤生长

[0865] 接下来,我们使用抗OX40(CD134)激动剂抗体进行类似的实验。OX40(CD134)是由激活的免疫细胞表达的肿瘤坏死因子受体超家族共刺激受体分子。如上所述,需要共疗法来解决对检查点抑制剂疗法的主要和次要抗性,并且一种方法是给予免疫共刺激剂,诸如抗OX40激动剂抗体。

[0866] 如上进行实验,除了以下变化。在第7天,将肿瘤直径已达到5mm的小鼠随机化并且分为以下四组:抗OX40抗体;大鼠IgG;H1b-ADP+大鼠IgG;H1b-ADP+抗OX40抗体。我们利用BE0031作为抗OX40抗体,并且利用大鼠IgG 2a(2A3)作为对照IgG。在接种后第7、9和11天以20 $\mu$ L的体积瘤内给予BE0031(2 $\mu$ g)、大鼠IgG(2 $\mu$ g)和/或H1b-ADP(6.2 $\mu$ g)。结果在图14中示出。

[0867] 实施例9:从野生型大肠杆菌纯化的HI<sub>d</sub>A酶显然被其他细菌酶污染

[0868] 我们先前在热位移测定中使用从其前体D-甘油-D-甘露-庚糖-7-磷酸酯通过酶催化体外产生的HBP发现,HBP能够与ALPK1结合。在那些研究中,用于体外产生HBP的酶是糖激酶HI<sub>d</sub>A,所述糖激酶HI<sub>d</sub>A是从用HI<sub>d</sub>A表达质粒转染的野生型大肠杆菌细胞纯化的糖激酶HI<sub>d</sub>A。大肠杆菌细胞不表达HI<sub>d</sub>A或HI<sub>d</sub>C酶,并且取而代之地表达HI<sub>d</sub>E,HI<sub>d</sub>E是含有激酶结构域和ADP转移酶结构域的融合蛋白。HI<sub>d</sub>E的这两个结构域分别与HI<sub>d</sub>A的激酶结构域和HI<sub>d</sub>C

的ADP转移酶结构域同源。在使用相同的体外产生的HBP的相关研究中,我们显示了HBP激活ALPK1自磷酸化和在ALPK1下游的I $\kappa$ B磷酸化。

[0869] 我们现在认为,在那些实验中使用的纯化的HI $\delta$ A酶被大肠杆菌酶(诸如HI $\delta$ E)污染,所述大肠杆菌酶将至少一些HBP转化为H1b-ADP。先前的关于HI $\delta$ A酶的结构-功能活性的报告表明,HI $\delta$ A酶和HI $\delta$ E酶的激酶结构域可以二聚化,从而导致其共纯化。Lee T.W.等人, J. Med. Chem. 2013 56: 1405-17。因此,很可能一些大肠杆菌HI $\delta$ E与在我们先前的研究中使用的重组HI $\delta$ A共纯化。我们进一步推测, GmhB和HI $\delta$ A也可以形成复合物,使得GmhB也可以与重组HI $\delta$ A共纯化。在那些先前的研究中,这样的被大肠杆菌GmhB和HI $\delta$ E的污染将导致至少一些体外产生的HBP转化为H1b-ADP。

[0870] 为了对此进行测试,我们在从含有未激活的HI $\delta$ E的大肠杆菌纯化的HBP或HI $\delta$ A的存在下或在从在之前的实验中使用的相同的HI $\delta$ E野生型大肠杆菌纯化的HBP和HI $\delta$ A的存在下进行了用于ALPK1依赖性TIFA磷酸化的体外激酶反应。结果在图15中示出。如上所描述通过变性凝胶电泳然后蛋白质印迹分析检测磷酸化的TIFA(三种浓度,1%、0.2%和0.4%)。仅在使用从野生型大肠杆菌纯化的HI $\delta$ A的测定中检测到磷酸化的TIFA,而在使用从HI $\delta$ E突变体大肠杆菌细胞纯化的HI $\delta$ A的那些测定中未检测到。

[0871] 为了避免由于污染性细菌酶而导致的用体外产生的HBP获得的异常结果,我们在上面的实施例1-8和下面的实施例10-18中使用了化学合成的糖分子。

[0872] 实施例10: H1b-ADP和抗PD-L1抗体协同作用以抑制肿瘤生长

[0873] 如抗PD-1的组合实验进行实验,除了以下变化。在第7天,将肿瘤直径已达到5mm的小鼠随机化并且分为以下四组:抗PD-L1抗体;大鼠IgG;H1b-ADP+大鼠IgG;H1b-ADP+抗PD-L1抗体。我们利用BP0101(BioxCe11)作为抗PD-L1抗体,并且利用大鼠IgG 2a(2A3)作为对照IgG。在接种后第7、9、11和15天以200 $\mu$ L的体积腹膜内给予抗PD-L1抗体(200 $\mu$ g)和对照IgG(200 $\mu$ g)中的每一种。在接种后第7、9、11、13、15天以20 $\mu$ L体积瘤内给予H1b-ADP(6.2 $\mu$ g)。注射肿瘤的结果在图16A中示出,并且远处肿瘤的结果在图16B中示出。这些结果指示,H1b-ADP和检查点抑制剂(诸如抗PD-L1抗体)的组合有效抑制体内肿瘤细胞的生长并且甚至抑制活力。

[0874] 实施例11: H1b-ADP和IFN $\alpha$ 协同作用以抑制肿瘤生长

[0875] 如抗PD-1的组合实验进行实验,除了以下变化。在第8天,将肿瘤直径已达到5mm的小鼠随机化并且分为以下四组:IFN $\alpha$ (752803, BioLegend);PBS;H1b-ADP;H1b-ADP+IFN $\alpha$ 。在接种后第8、10和12天以20 $\mu$ L的体积瘤内给予IFN $\alpha$ (0.1 $\mu$ g)和H1b-ADP(6.2 $\mu$ g)中的每一种。注射肿瘤的结果在图17A中示出,并且远处肿瘤的结果在图17B中示出。这些结果指示,H1b-ADP和干扰素途径或JAK-STAT途径激活因子(诸如IFN $\alpha$ )的组合有效抑制体内肿瘤细胞的生长并且甚至抑制活力。

[0876] 实施例12: H1b-ADP和抗CTLA-4抗体协同作用以抑制肿瘤生长

[0877] 如抗PD1的组合实验进行实验,除了以下变化。在第6天,将肿瘤直径已达到5mm的小鼠随机化并且分为以下四组:抗CTLA-4抗体;大鼠IgG;H1b-ADP+大鼠IgG;H1b-ADP+抗CTLA-4抗体。我们利用9D9(BioxCe11)作为抗CTLA-4抗体,并且利用大鼠IgG 2b同种型(单独的MPC-11, BE0086, BioXCe11)作为对照IgG。在接种后第6和9天以200 $\mu$ L的体积腹膜内给予抗CTLA-4抗体(25 $\mu$ g)和对照IgG(25 $\mu$ g)中的每一种。在接种后第6、7、9、11天以20 $\mu$ L体积

瘤内给予H1b-ADP (6.2 $\mu$ g)。结果在图18中示出。这些结果指示,H1b-ADP和检查点抑制剂或缺失T-reg细胞(诸如抗CTLA-4抗体)的组合有效抑制体内肿瘤细胞的生长并且甚至抑制活力。

[0878] 实施例13:H1b-ADP和STING激动剂协同作用以抑制肿瘤生长

[0879] 如抗PD1的组合实验进行实验,除了以下变化。在第6天,将肿瘤直径已达到5mm的小鼠随机化并且分为以下四组:c-di-AM (PS) 2;PBS;H1b-ADP;H1b-ADP+c-di-AM (PS) 2。我们利用c-di-AM (PS) 2作为STING激动剂。在接种后第6、7和9天以20 $\mu$ L的体积瘤内给予c-di-AM (PS) 2 (1 $\mu$ g) 和H1b-ADP (6.2 $\mu$ g) 中的每一种。结果在图19中示出。这些结果指示,H1b-ADP与STING激动剂和先天免疫激动剂(诸如c-di-AM (PS) 2) 的组合有效抑制体内肿瘤细胞的生长并且甚至抑制活力。

[0880] 实施例14:H1b-ADP和抗CD4抗体协同作用以抑制肿瘤生长

[0881] 如抗PD-1的组合实验进行实验,除了以下变化。在第6天,将肿瘤直径已达到5mm的小鼠随机化并且分为以下四组:抗CD4抗体(单独的GK1.5, BE0003-1, BioXcell);大鼠IgG;H1b-ADP+大鼠IgG;H1b-ADP+抗CD4抗体。在接种后第3、4和8天以200 $\mu$ L的体积腹膜内给予抗CD4抗体 (200 $\mu$ g) 和对照IgG (200 $\mu$ g) 中的每一种。在接种后第6、8、10、12、14天以20 $\mu$ L体积瘤内给予H1b-ADP (6.2 $\mu$ g)。结果在图20中示出。这些结果指示,H1b-ADP与CD4或T-reg缺失抗体的组合有效抑制体内肿瘤细胞的生长并且甚至抑制活力。

[0882] 实施例15:H1b-ADP和TLR激动剂协同作用以抑制肿瘤生长

[0883] 如抗PD-1的组合实验进行实验,除了以下变化。在第6天,将肿瘤直径已达到5mm的小鼠随机化并且分为以下四组:雷西莫特;PBS;H1b-ADP;H1b-ADP+雷西莫特。在接种后第6、8、11天以20 $\mu$ L的体积瘤内给予雷西莫特 (10 $\mu$ g) 和H1b-ADP (6.2 $\mu$ g)。结果在图21中示出。这些结果指示,H1b-ADP与TLR激动剂的组合有效抑制体内肿瘤细胞的生长并且甚至抑制活力。结果在图21中示出。

[0884] 实施例16:H1b-ADP被血清中的磷酸酶降解并且可以受磷酸酶抑制剂和AMP保护

[0885] 当用胎牛血清、人血清或小鼠血清培养细胞时,H1b-ADP的激活HEK293细胞中的ALPK1的活性大大降低(图22),表明动物血清中的组分可以中和H1b-ADP的活性。为了检查H1b-ADP是否被化学转化为非活性形式,我们将H1b-ADP与FBS一起孵育并且使用LC-MS分析产物。我们发现,随着孵育时间的增加,H1b-ADP的量下降,并且在UV 254nm下具有相似吸收强度的新材料增加。使用标准物质确定所述材料为AMP,表明H1b-ADP中的P-O-P磷酸酐键被血清中的酶水解。FBS含有110-352 $\mu$ U/ml碱性磷酸酶。碱性磷酸酶是广泛使用的脱磷酸试剂,所述脱磷酸试剂能够水解多种多样的分子(包括醇、胺、焦磷酸酯、和苯酚)中的磷酸酯。磷酸酶(诸如碱性磷酸酶)可能是H1b-ADP水解的原因。在与FBS一起孵育之前,我们将H1b-ADP与磷酸酶抑制剂原钒酸钠( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )预混合。1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 处理有效抑制了H1b-ADP水解(图23),指示其降解需要血清中的磷酸酶活性。为了确定单独的磷酸酶是否足以水解H1b-ADP,我们将H1b-ADP与牛碱性磷酸酶一起孵育并且发现磷酸酶活性被增加量的 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 阻断。我们注意到随着孵育时间的流逝,血清中的H1b-ADP水解减慢,表明磷酸酶活性逐渐下调。我们猜测水解产物AMP的累积可以抑制磷酸酶的活性。在血清孵育之前用AMP预处理H1b-ADP可以抑制磷酸酶活性,并且所述抑制是AMP剂量依赖性的。因此,在基于细胞的测定中,向含有FBS的培养基中添加 $\text{Na}_3\text{VO}_4$ (图24)或AMP(图25)可以恢复H1b-ADP的活性,证实了FBS中的磷

酸酶负责抑制H1b-ADP的活性。

[0886] 实施例17:H1b-ADP衍生物化合物体外激活ALPK1

[0887] 如本文描述制备许多H1b-ADP衍生物化合物,并且体外测试作为ALPK1激动剂的生物活性。在这些实验中,将所述化合物的连续稀释液添加到含(图27B、图28B、图29B)或不含(图26、图27A、图28A、图29A)10%FBS的HEK293细胞的组织培养基中,如附图中所指示。4小时后,收集细胞上清液,并且使用IL8 ELISA (BD) 作为ALPK1激活的指标来分析IL8的浓度。

[0888] H1b-ADP衍生物化合物1-3、9-17、19、20-22、26-32证明了ALPK1激活活性。在所测试的化合物中,化合物15还显示出对血清降解出乎意料的抗性(比较图27A和图27B)。

[0889] 实施例18:H1b-ADP衍生物化合物抑制肿瘤生长

[0890] 我们使用CT26肿瘤异种移植模型来测试H1b-ADP衍生物化合物1和2的抗癌活性。将肿瘤细胞( $2 \times 10^5$ 个/100uL CT26细胞)皮下接种到BALB/c小鼠的右侧腹。在第7天,将肿瘤直径已达到3-5mm的小鼠随机化并且分为三组(每组n=9):对照、化合物1(50nmol)和化合物2(50nmol)。在接种后第7、9和11天,使用20uL的总体积进行注射。使用公式 $(L \times W^2) / 2$ 每2天从卡尺测量的肿瘤尺寸计算肿瘤体积,其中L是较长的测量值。如图30所示,在此模型系统中,化合物1和2降低了肿瘤的生长,指示H1b-ADP衍生物能够引发有效抑制肿瘤生长的抗肿瘤免疫应答。

[0891] 实施例19:H1b-ADP可以以极低的浓度激活巨噬细胞

[0892] 在这些实验中,将小鼠骨髓来源的巨噬细胞用0.4nM或2nM H1b-ADP处理2.5小时并且收获以通过qPCR进行Cxc11的mRNA表达分析。Cxc11mRNA表达呈现为相对于未处理对照的倍数变化,并且显示出剂量依赖性反应(图31)。这些结果表明驻居在组织内的巨噬细胞可以利用细胞外H1b-ADP来监测局部感染。因此,非常低剂量的H1b-ADP或其激动剂可以用于加强或增强局部组织中的免疫应答。

[0893] 在另外的实验中,将化合物1以2、10、50和200nmol的浓度皮下注射到7周龄C57小鼠中。3小时后收获组织,并且提取RNA。进行定量PCR(qPCR)以确定小鼠肝(图32A)和肺(图32B)组织中的组织表达水平Cxc11、Cxc111、IL1b和IL6。在肺组织中测定另外的趋化因子和细胞因子。数据显示,肝组织对这种H1b-ADP衍生物对炎性趋化因子和细胞因子的激活非常敏感。这些结果进一步表明,用如本文描述的ALPK1激动剂治疗肝脏疾病和障碍可以用非常低剂量的H1b-ADP及其衍生物(诸如化合物1)来实现。例如,从这些数据可以预期,在1纳克至1毫克/千克体重(1ng/kg至1mg/kg)、优选1微克至100微克/千克体重(1ug/kg至100ug/kg)范围内的剂量可以用于治疗肝脏疾病和障碍。

[0894] 大肠杆菌H1b-ADP生物合成途径在图33中示出。

[0895] 本领域的技术人员仅使用常规实验就将认识到或能够确定如本文描述的本发明的具体实施方案的许多等效方案。此类等效方案旨在被以下权利要求涵盖。

[0896] 将本文引用的所用参考文献通过引用以其整体并且出于所有目的并入本文,其程度如同具体地或单独地指示将每个单独的出版物或专利或专利申请出于所有目的通过引用以其整体并入。

[0897] 本发明的范围不受本文描述的具体实施例的限制。确实,除了本文描述的内容以外,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言也将从以上描述和附图中而变得显而易见。此类修改旨在落入所附权利要求的范围内。

**ALPK1 同种型 1**

MNNQKVVAVL	LQECKQVLDQ	LLLEAPDVSE	EDKSEDQRQR	ALLPSELRTL	IQEAKEMKWP	60
FVPEKWQYKQ	AVGPEDKTNL	KDVIGAGLQQ	LLASLRASIL	ARDCAAAAAI	VFLVDRFLYG	120
LDVSGKLLQV	AKGLHKLQPA	TPIAPQVVIR	QARISVNSGK	LLKAEYILSS	LISNNGATGT	180
WLYRNESDKV	LVQSVCIQIR	GQILQKLG MW	YEAAELIWAS	IVGYLALPQP	DKKGLSTSLG	240
ILADIFVSMS	KNDYEKFKNN	PQINLSLLKE	FDHLLSAAE	ACKLAAAFSA	YTPLFVLTA V	300
NIRGTCLLSY	SSSNDCPPPEL	KNLHLCEAKE	AFEIGLLTKR	DDEPVTGKQE	LHSFVKA AFG	360
LTTVHRR LHG	ETGTVHAASQ	LCKEAMGKLY	NFSTSSRSQD	REALSQEVMS	VIAQVKEHLQ	420
VQSFSNVDDR	SYVPESFECR	LDKLILHGQG	DFQKILD TYS	QHHTSVCEVF	ESDCGN NKNE	480
QKDAKTGVCI	TALKTEIKNI	DTVSTTQEK P	HCQRDTGISS	SLMGKNVQRE	LRRGGR RNWT	540
HSDAFRVSLD	QDVETETEPS	DYSNGEGAVF	NKSLSGSQT S	SAWSNLSGFS	SSASWEEVNY	600
HVDDRSARKE	PGKEHLVDTQ	CSTALSEELE	NDREGRAMHS	LHSQLHDLSL	QEPNNDNLEP	660
SQNQPQQOMP	LTPFSPHNTP	GIFLAPGAGL	LEGAPEGIQE	VRNMGPRNTS	AHSRPSYRSA	720
SWSSDSGRPK	NMGTHPSVQK	EEAFEIIVEF	PETNCDVKDR	QGKEQGEEIS	ERGAGPTFKA	780
SPSWVDPEGE	TAESTEDAPL	DFHRVLHNSL	GNISMLPCSS	FTPNWPVQNP	DSRKSGGPVA	840
EQGIDPDAST	VDEEGQLLDS	MDVPCTNGHG	SHRLCILRQP	PGQRAETPNS	SVSGNILFPV	900
LSEDCTTTEE	GNQPGNMLNC	SQNSSSSSVW	WLKSPAFSSG	SSEGDS PWSY	LNSSGSSWVS	960
LPGKMRKEIL	EARTLQPDDF	EKLLAGVRHD	WLFQRLNTG	VFKPSQLHRA	HSALLLKYSK	1020
KSELWTAQET	IVYLG DYLTV	KKKGRQRNAF	WVHHLHQEEI	LGRYVGKDYK	EQKGLWHHFT	1080
DVERQMTAQH	YVTEFNKRLY	EQNIPTQIFY	IPSTILLILE	DKTIKGCISV	EPYILGEFVK	1140
LSNNTKVVK T	EYKATEYGLA	YGHFSYEFSN	HRDVVVDLQG	WVTGNGKGLI	YLTDPQIHSV	1200
DQKVFTTNFG	KRGIFYFFNN	QHVECNEICH	RLSLTRPSME	KPCT		

图1A

**ALPK1 同种型 2**

MCRKRTRART	SAAEASLRAS	ILARDCAAAA	AIVFLVDRFL	YGLDVSGKLL	QVAKGLHKLQ	60
PATPIAPQVV	IRQARISVNS	GKLLKAEYIL	SSLISNNGAT	GTWLYRNESD	KVLVQSVCIQ	120
IRGQILQKLG	MWYEAAELIW	ASIVGYIALP	QPDKKGLSTS	LGILADIFVS	MSKNDYEKFK	180
NNPQINLSLL	KEFDHLLLSA	AEACKLAAAF	SAYTPLFVLT	AVNIRGTCLL	SYSSSNDCPP	240
ELKNLHLCEA	KEAFEIGLLT	KRDDEPVTGK	QELHSFVKAA	FGLTTVHRRL	HGETGTVHAA	300
SQLCKEAMGK	LYNFSTSSRS	QDREALSQEV	MSVIAQVKEH	LQVQSFSNVD	DRSYVPESFE	360
CRLDKLILHG	QGDFQKILDT	YSQHHTSVCE	VFESDCGNK	NEQKDAKTGV	CITALKTEIK	420
NIDTVSTTQE	KPHCQRDTGI	SSSLMGKNVQ	RELRGGRRN	WTHSDAFRVS	LDQDVETETE	480
PSDYSNGEGA	VFNKSLSGSQ	TSSAWSNLG	FSSASWEEV	NYHVDDRSAR	KEPGKEHLVD	540
TQCSTALSEE	LENDREGRAM	HSLHSQLHDL	SLQEPNNDNL	EPSQNQPQQQ	MPLTPFSPHN	600
TPGIFLAPGA	GLLEGAPEGI	QEVNMGPRN	TAHSRPSYR	SASWSSDSGR	PKNMGTHPSV	660
QKEEAFEIIV	EFPETNCDVK	DRQGKEQGEE	ISERGAGPTF	KASPSWVDPE	GETAESTEDA	720
PLDFHRVLHN	SLGNISMLPC	SSF'PNWPVQ	NPDSRKSGGP	VAEQGIDPDA	STVDEEGQLL	780
DSMDVPCTNG	HGSHRLCILR	QPPGQRAETP	NSSVSGNILF	PVLSEDC'TTT	EEGNQPGNML	840
NCSQNSSSSS	VWWLKSPAFS	SGSSEGDSPW	SYLNSSGSSW	VSLPGKMRKE	ILEARTLQPD	900
DFEKLLAGVR	HDWLFQRLN	TGVFKPSQLH	RAHSALLKY	SKKSELWTAQ	ETIVYLG DYL	960
TVKKKGRQRN	AFWVHHLHQE	EILGRYVGKD	YKEQKGLWHH	FTDVERQMTA	QHYVTEFNKR	1020
LYEQNIPTQI	FYIPSTILLI	LEDKTIKCI	SVEPYILGEF	VKLSNNTKVV	KTEYKATEYG	1080
LAYGHF'SYEF	SNHRDVVVDL	QGWTGNGKG	LIYLTDPQIH	SVDQKVFTTN	FGKRGIFYFF	1140
NNQHVECNEI	CHRSLTRPS	MEKPCT				

图1B

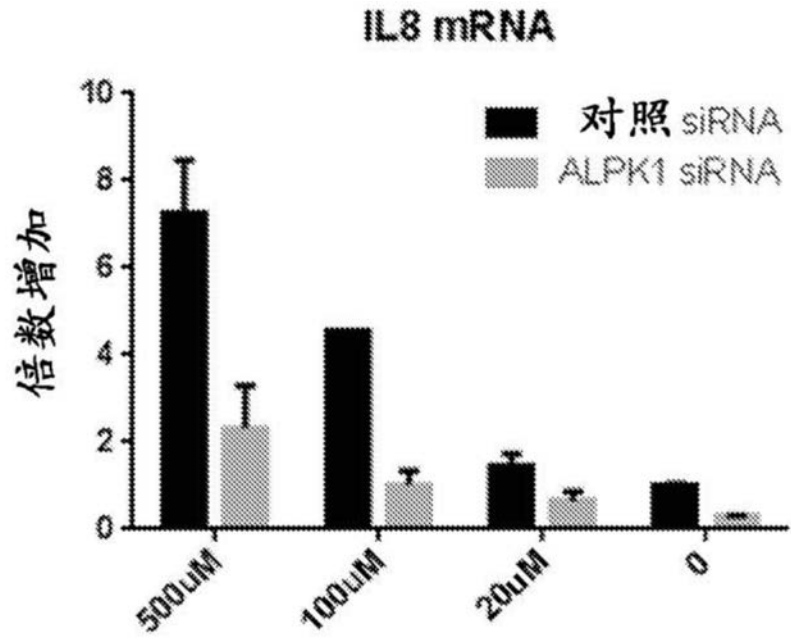


图2A

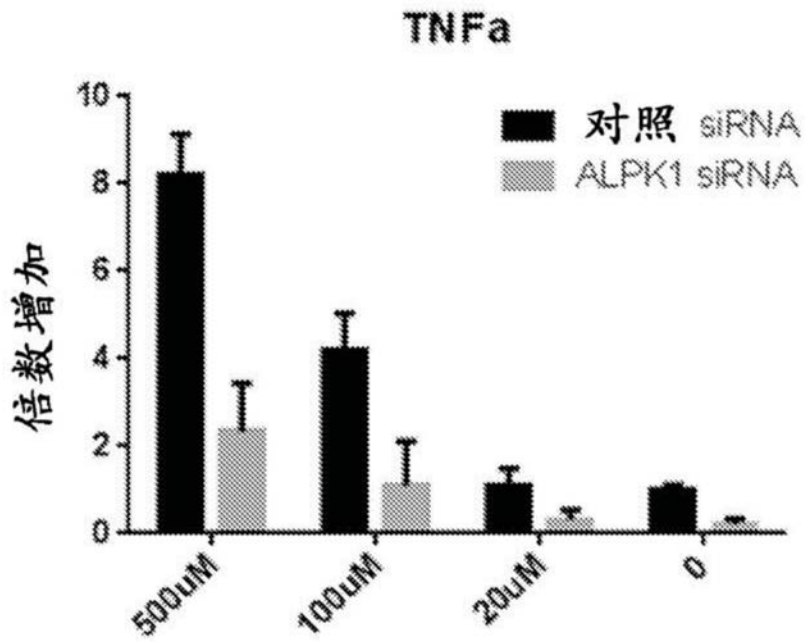


图2B

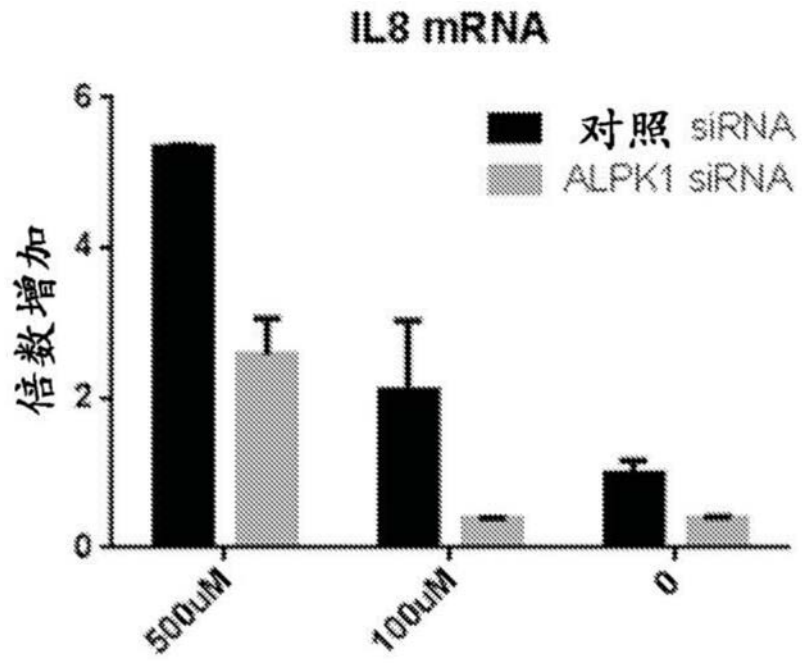


图3A

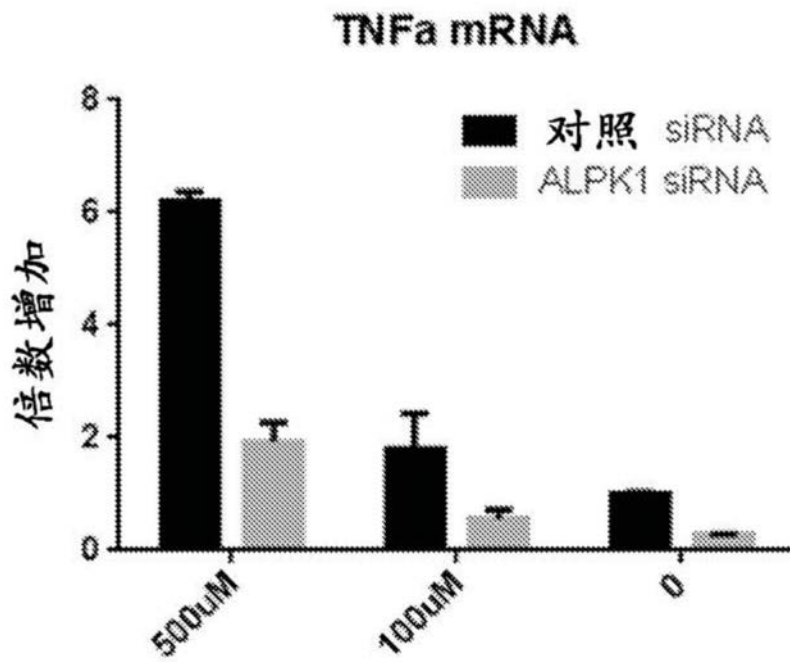


图3B

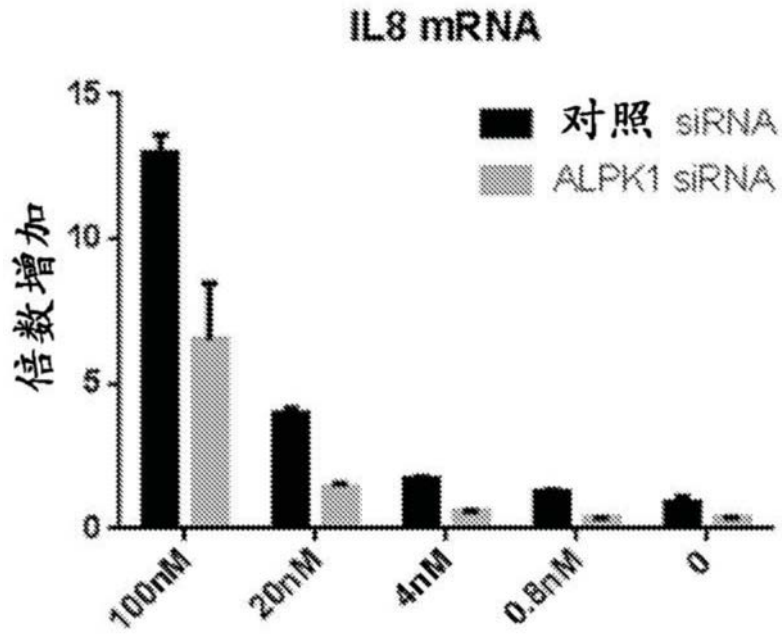


图4A

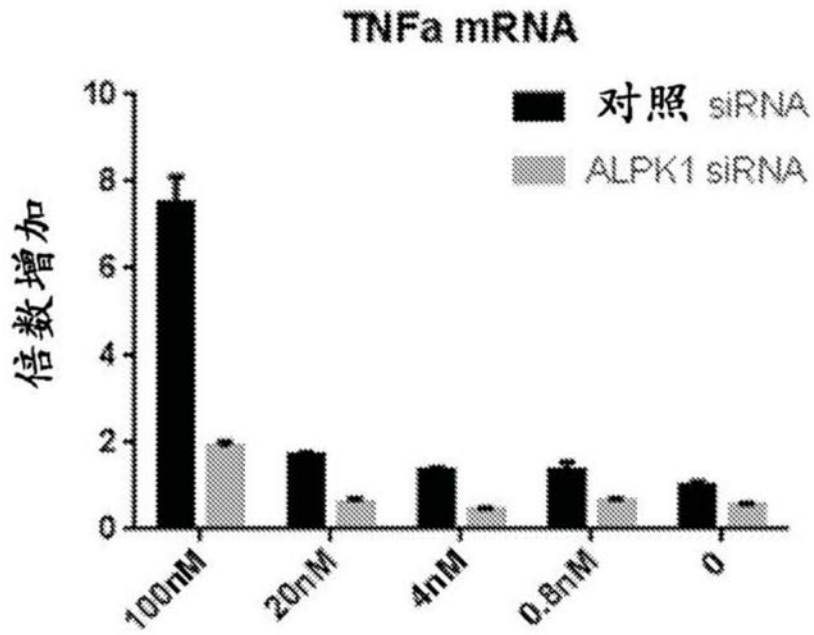


图4B

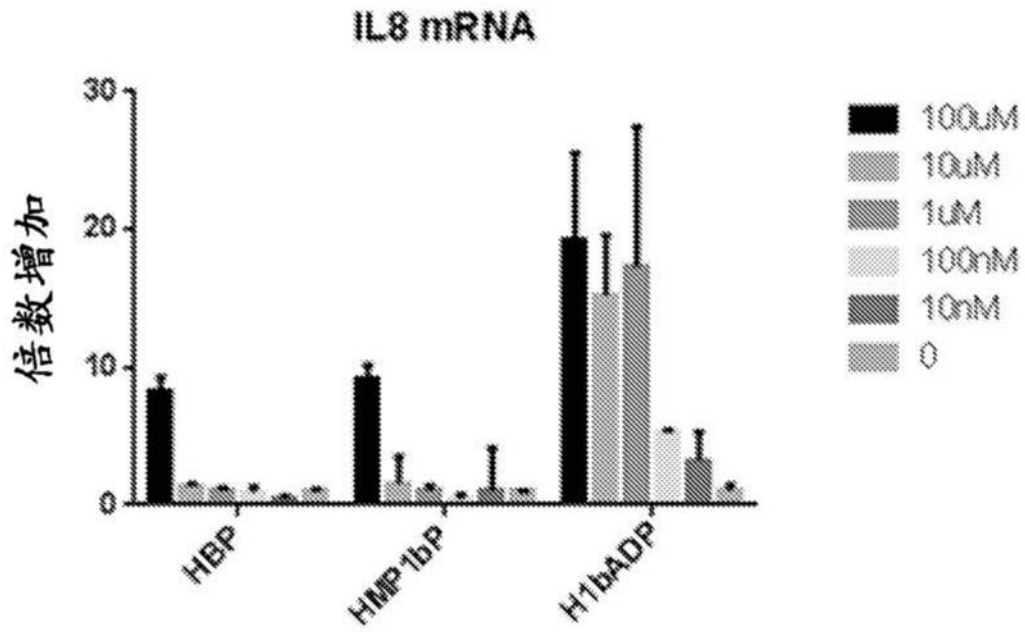


图5A

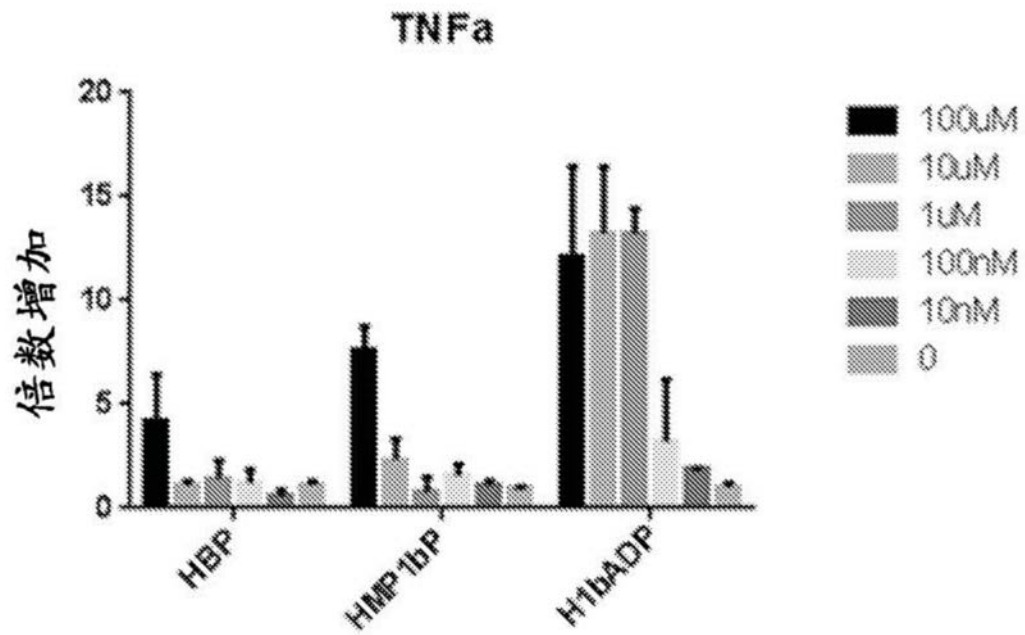


图5B

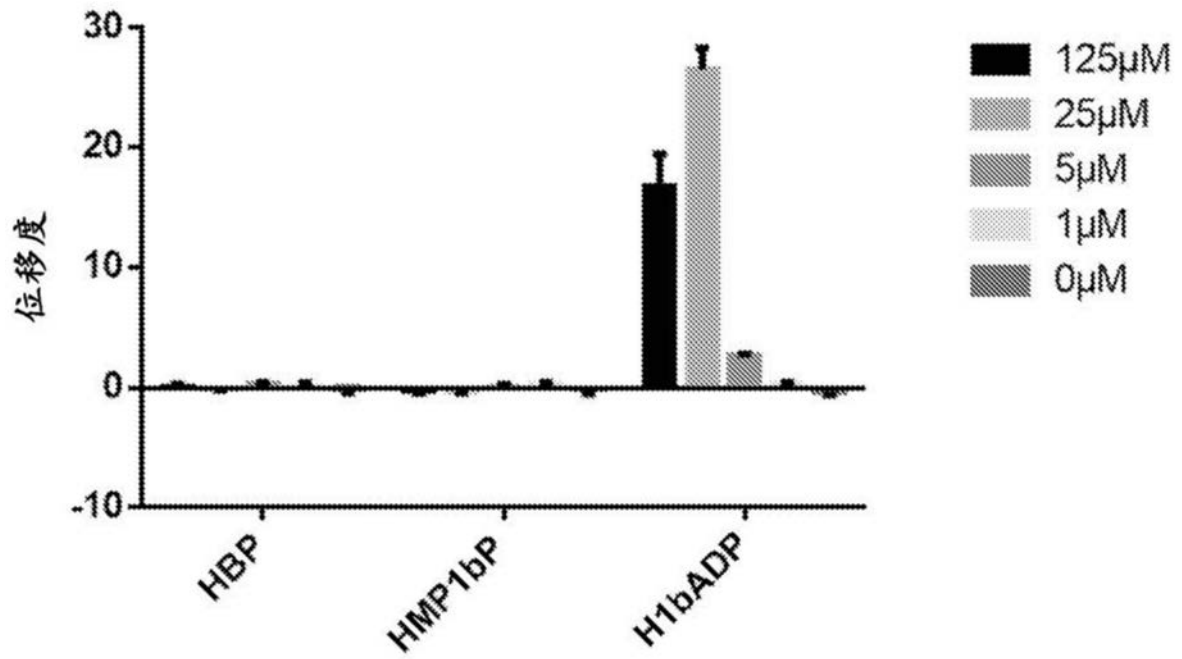


图6

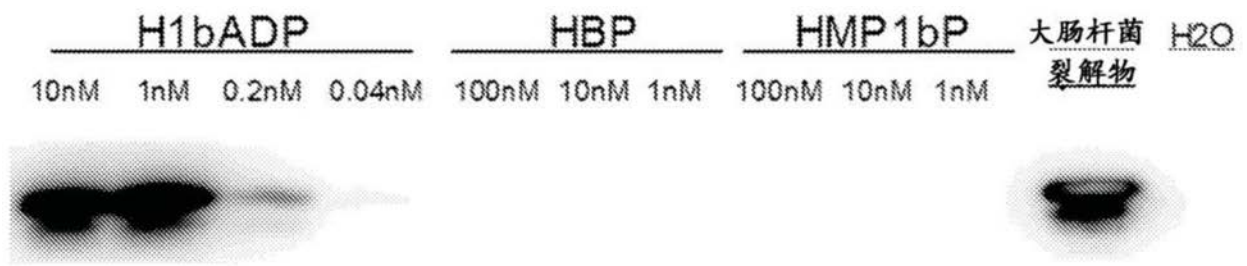


图7

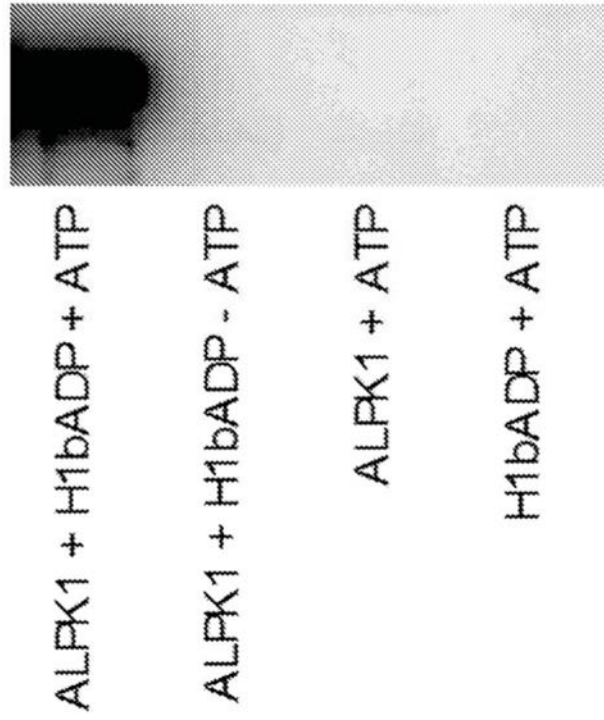


图8

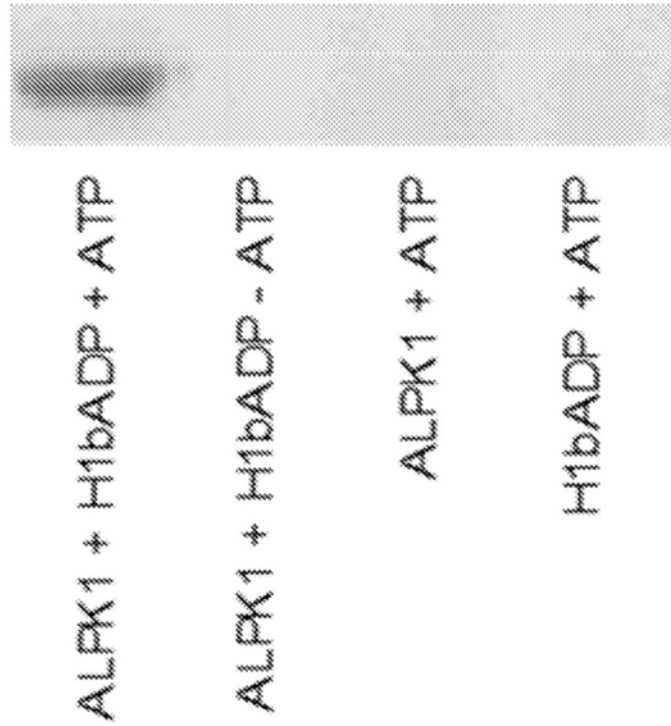


图9

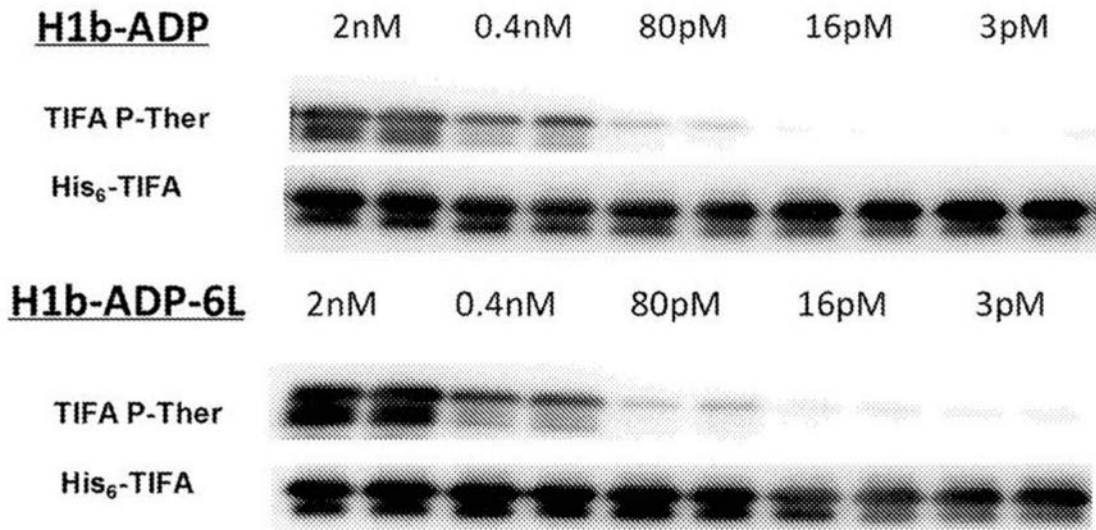


图10

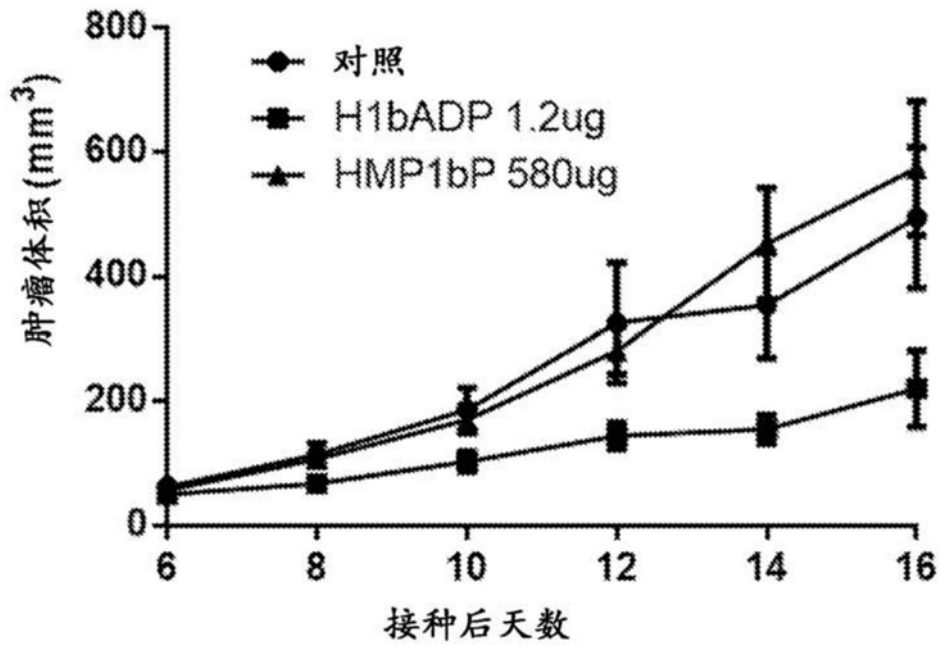


图11

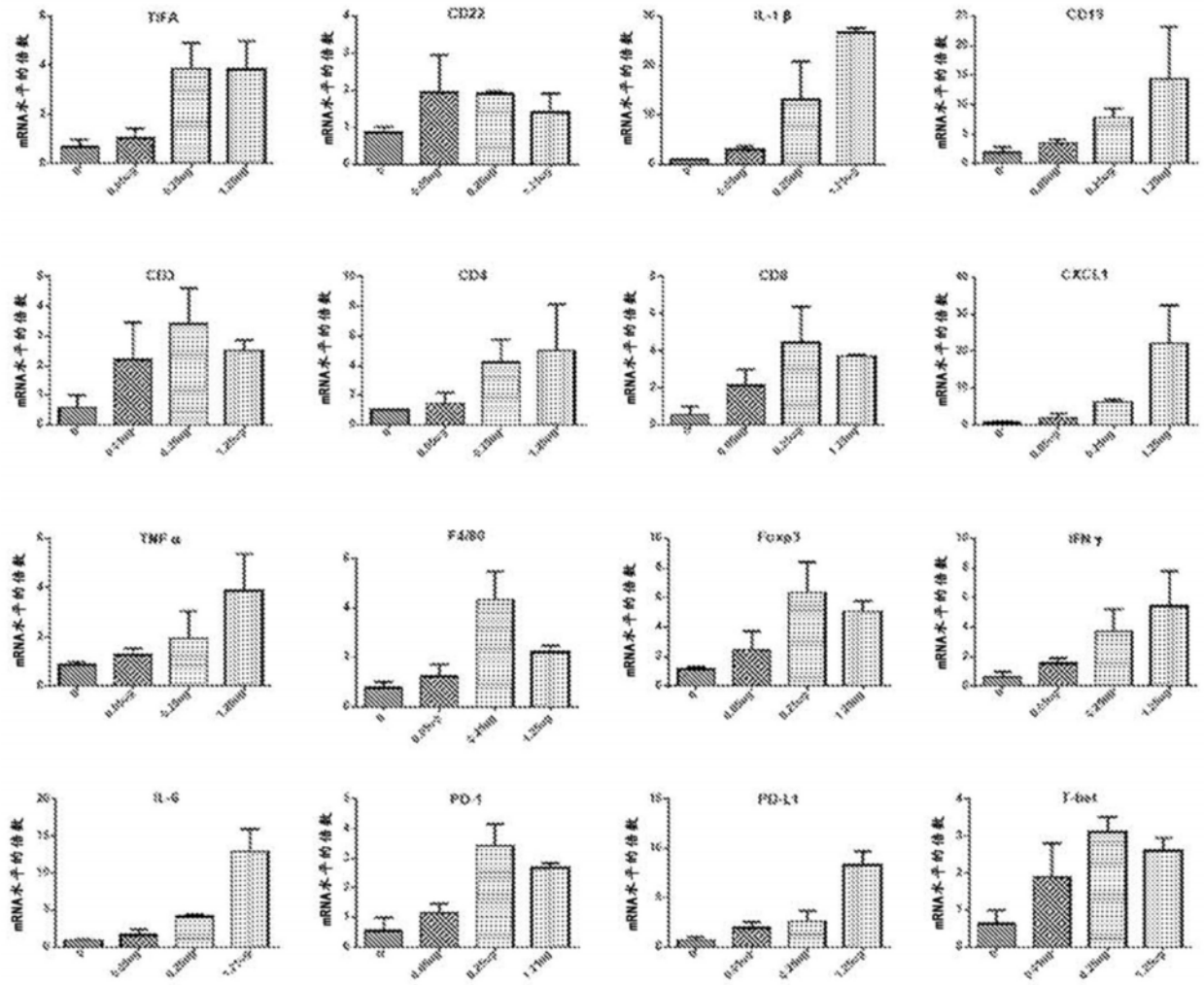


图12

### CT26 注射肿瘤

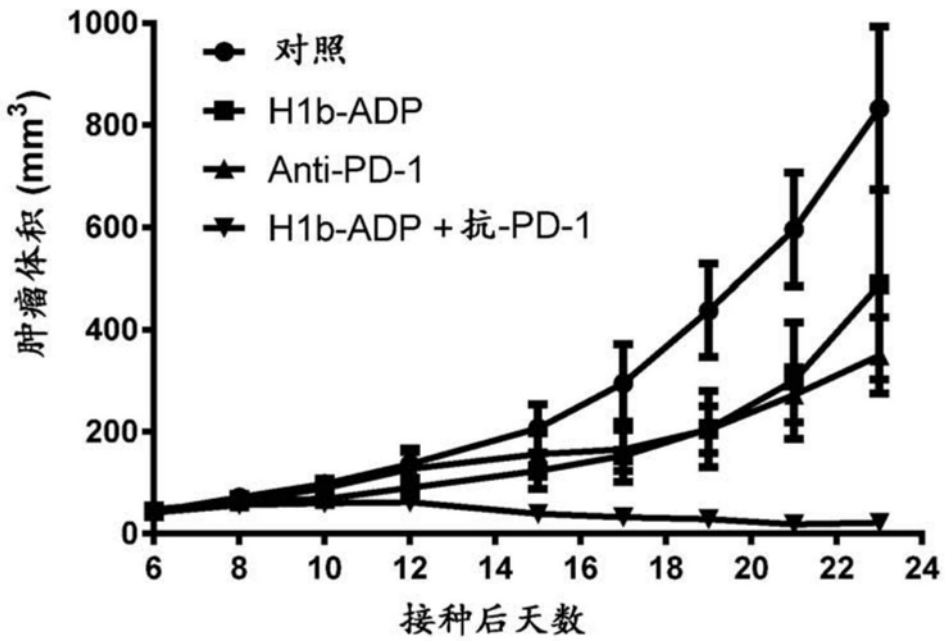


图13A

### CT26 远处肿瘤

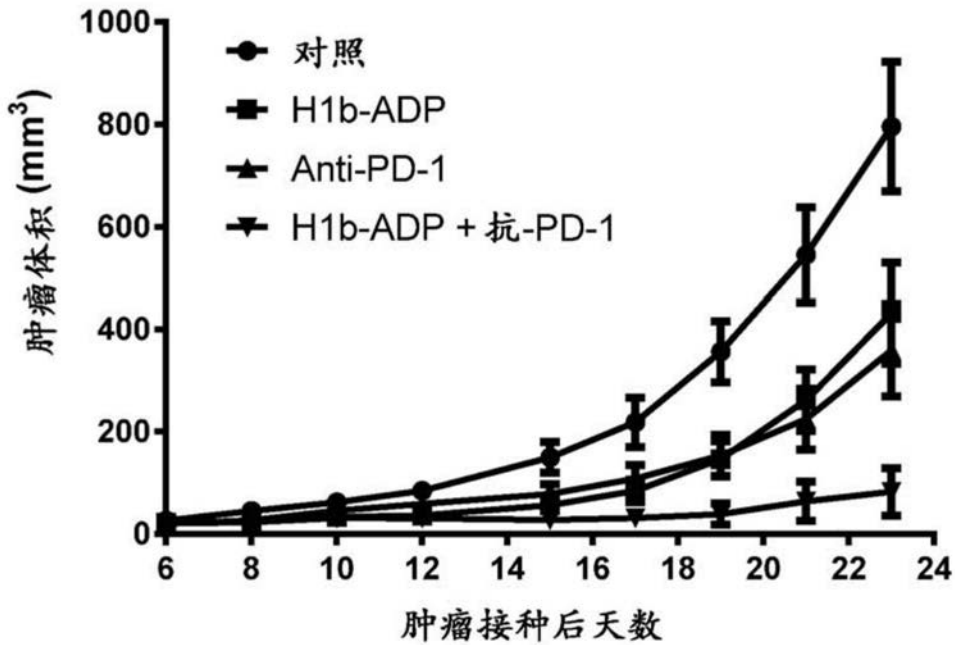


图13B

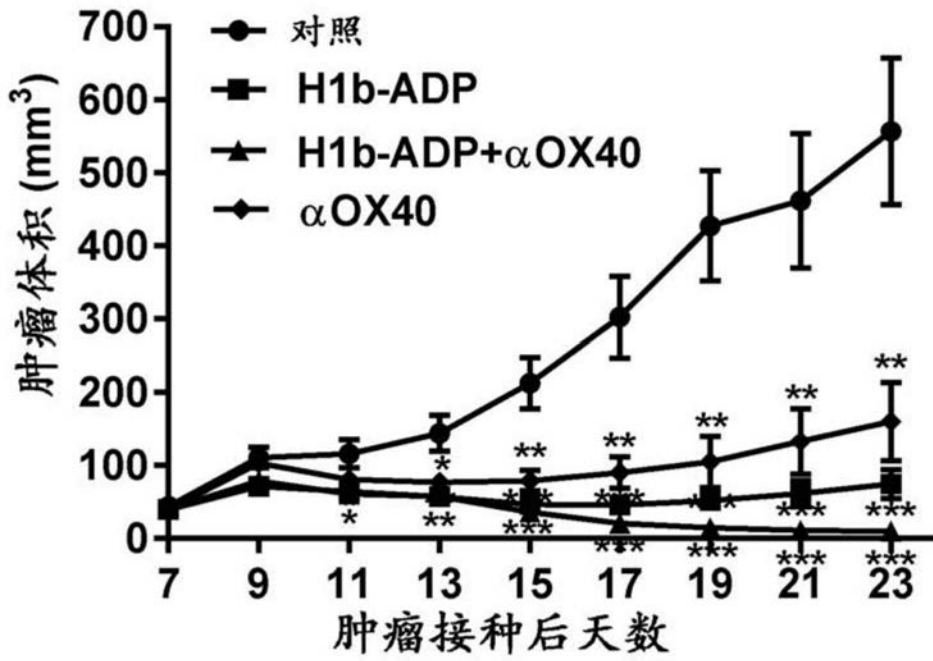


图14

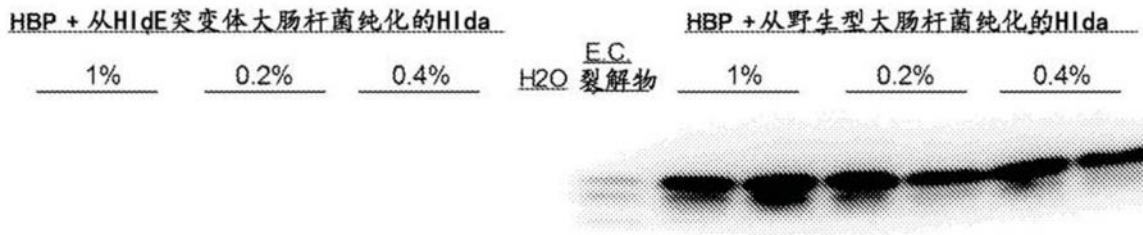


图15

### CT26 注射肿瘤

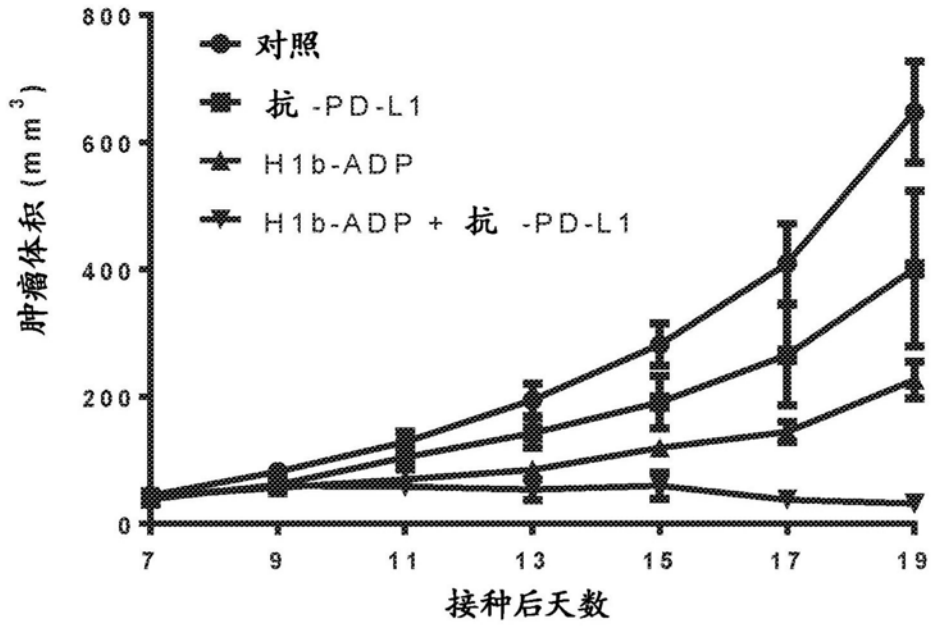


图16A

### CT26 远处肿瘤

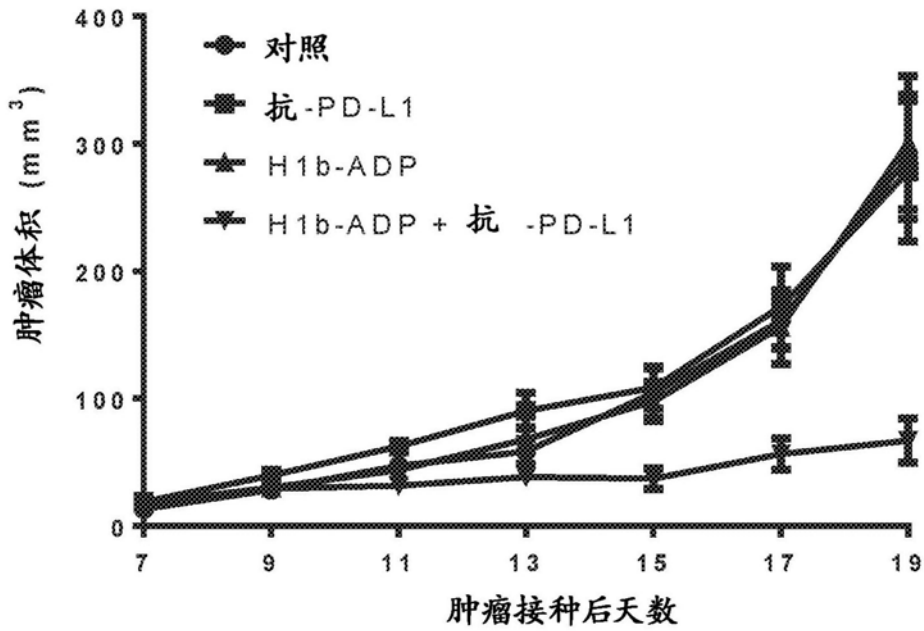


图16B

### CT26 注射肿瘤

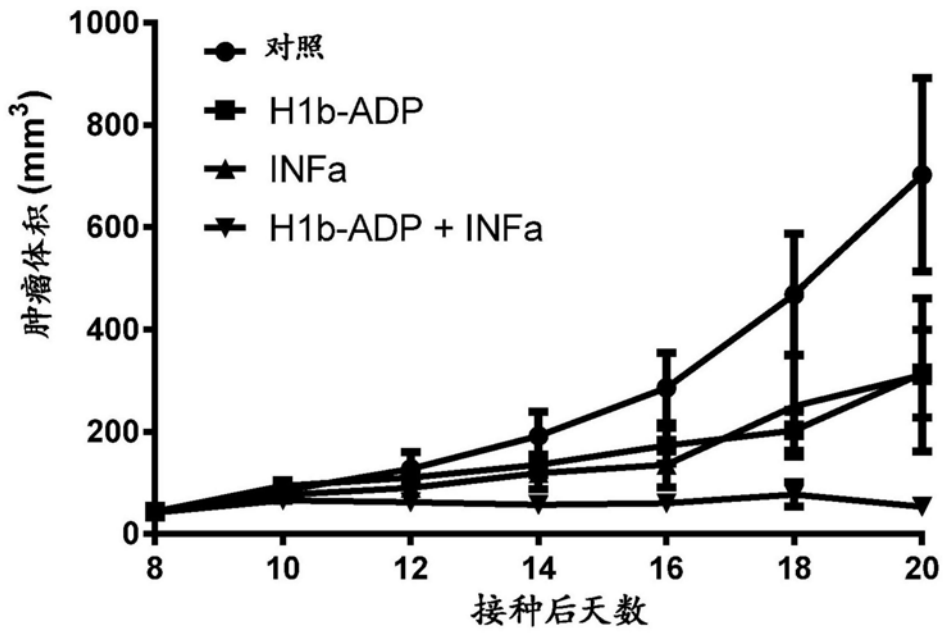


图17A

### CT26 远处肿瘤

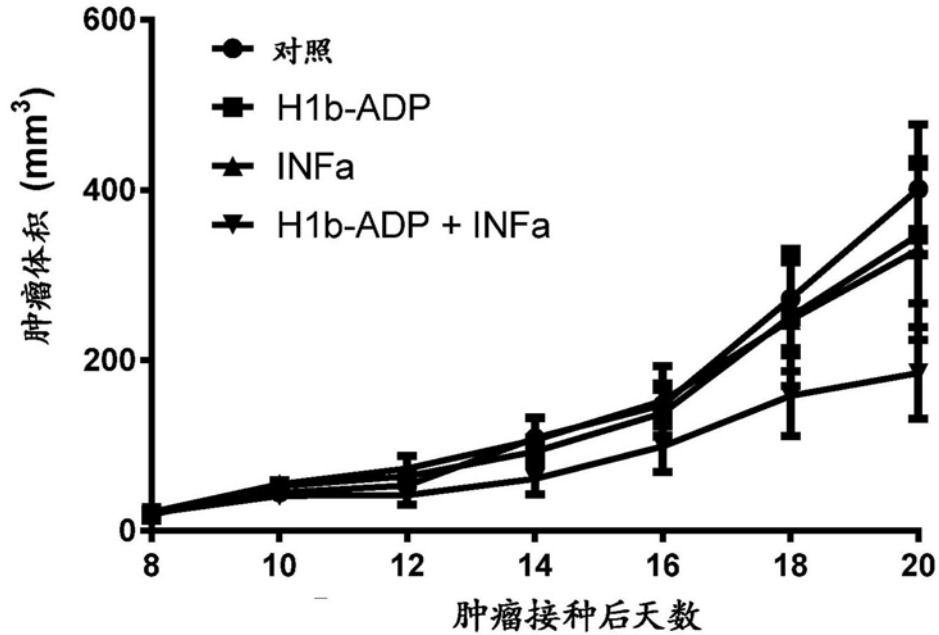


图17B

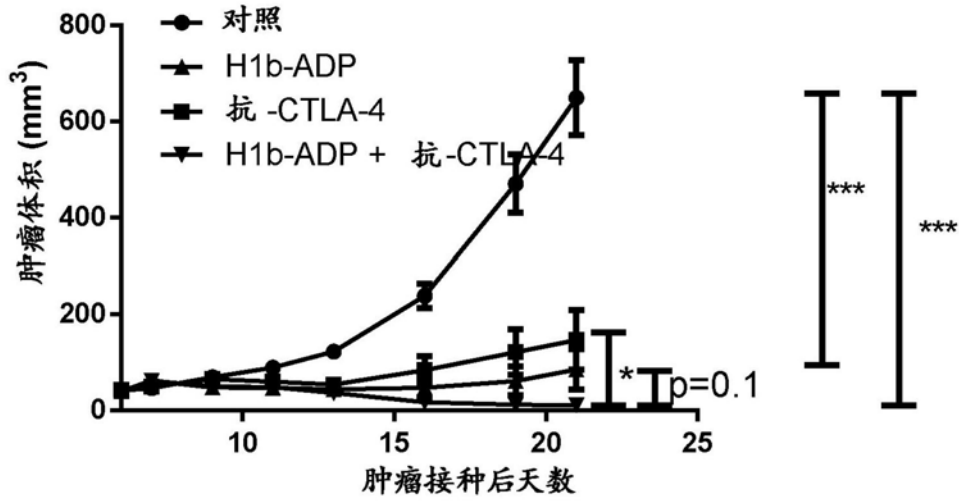


图18

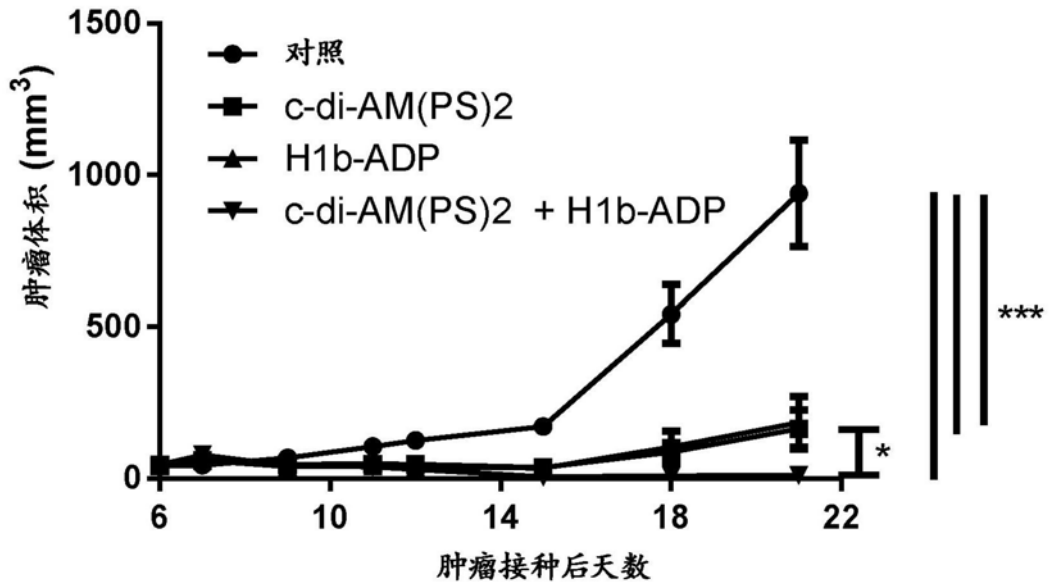


图19

### CT26 注射肿瘤

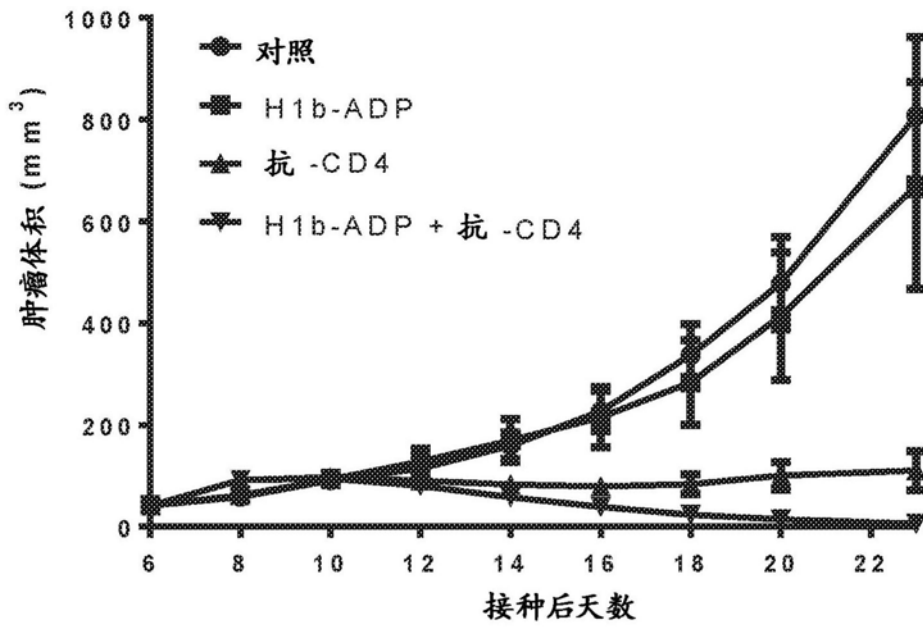


图20

### CT26 注射肿瘤

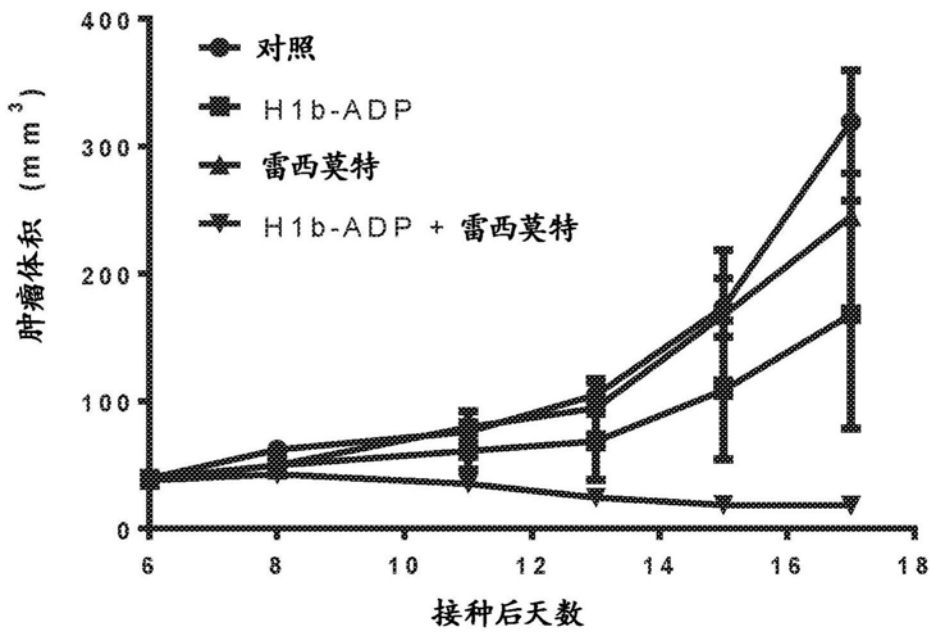


图21

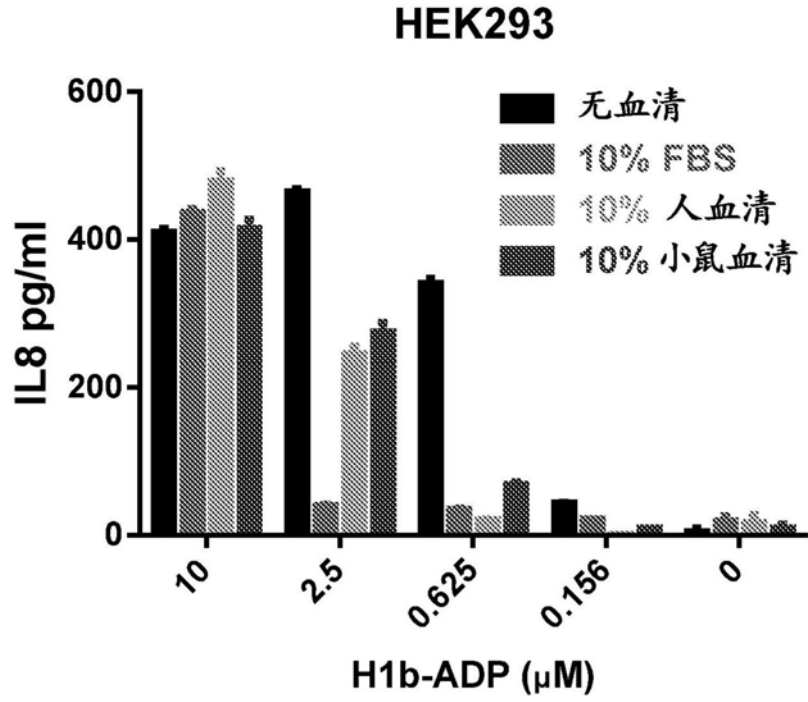


图22

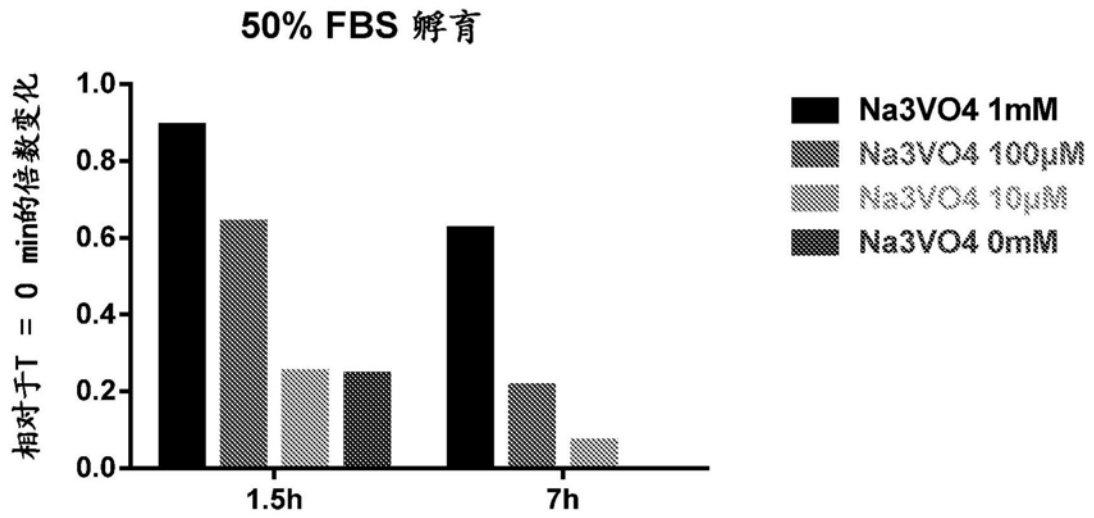


图23

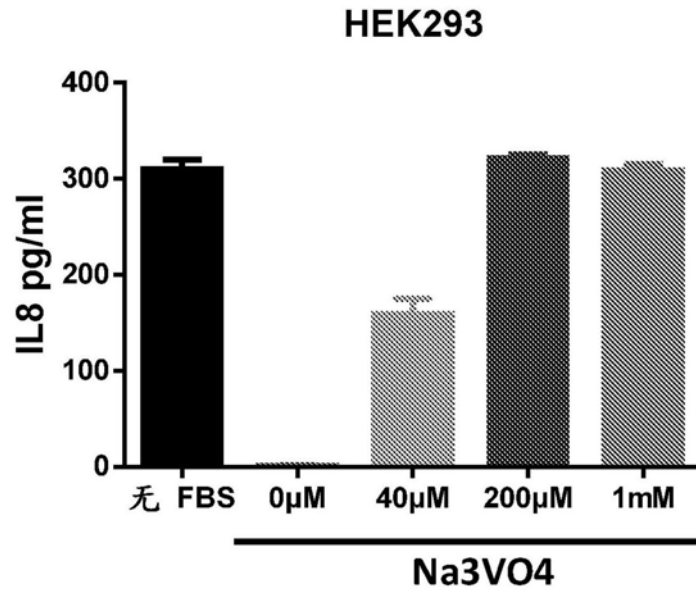


图24

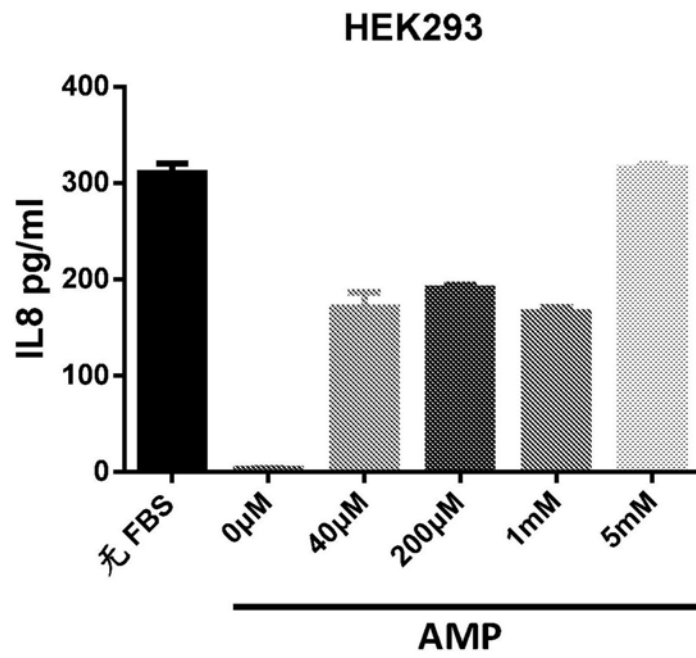


图25

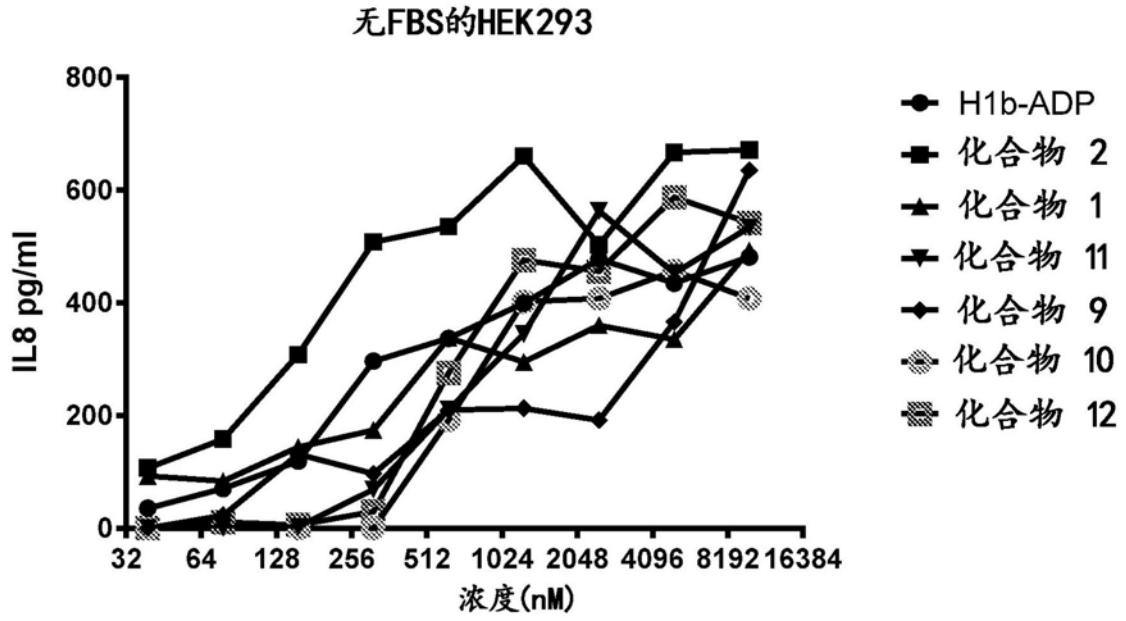


图26

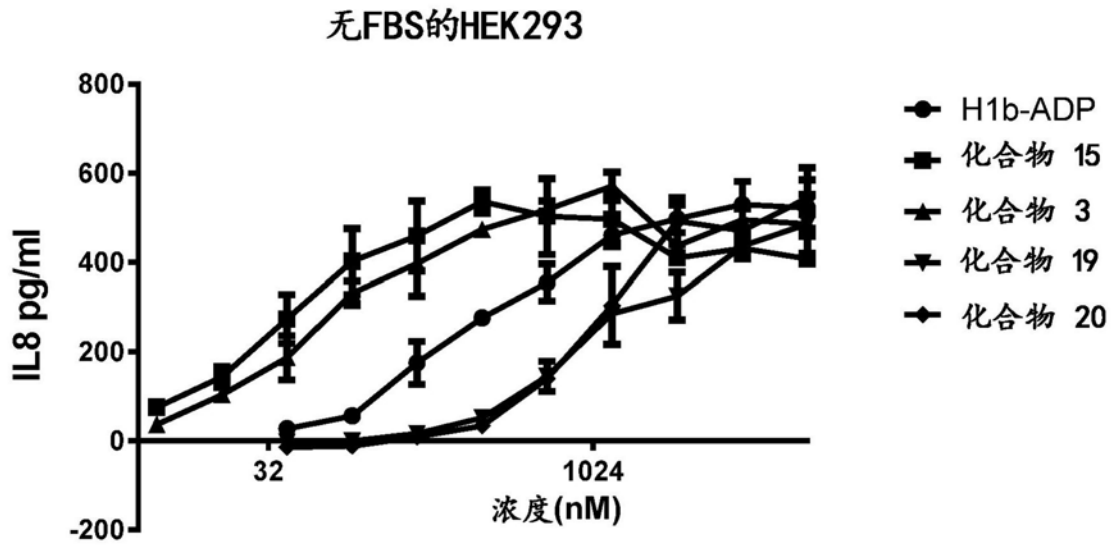


图27A

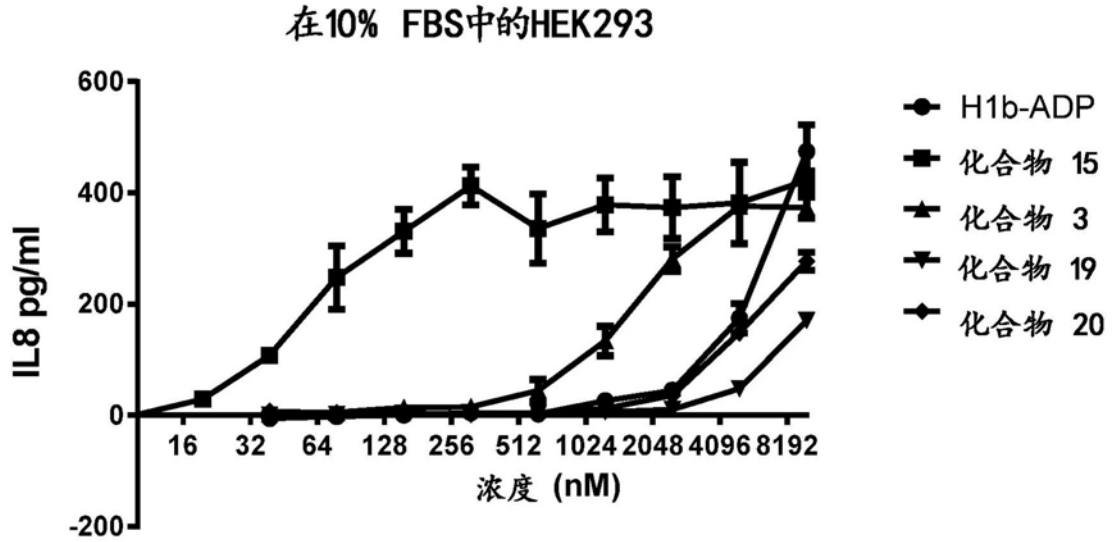


图27B

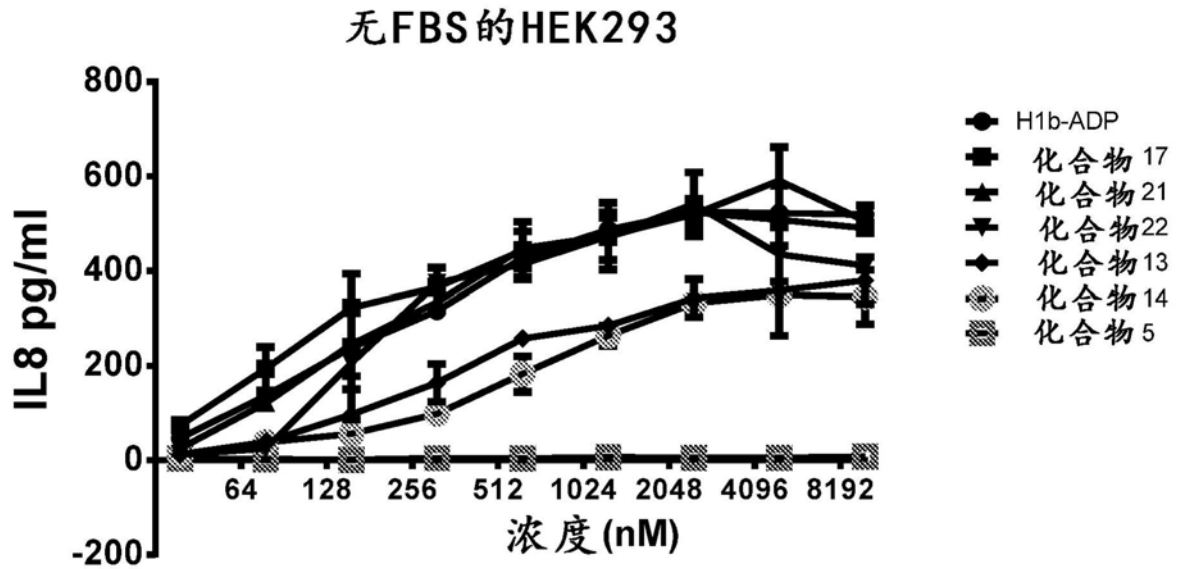


图28A

### 在10% FBS中的HEK293

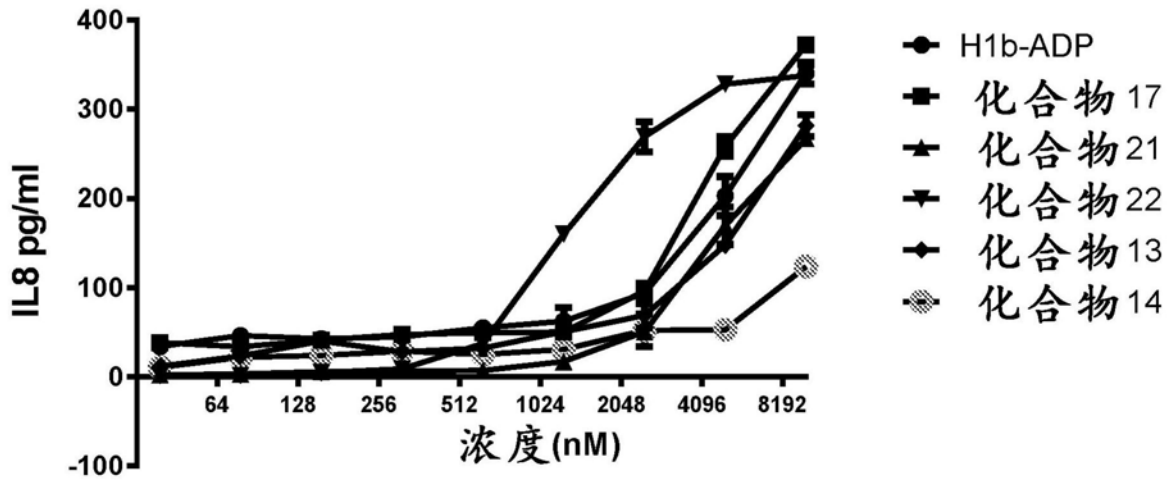


图28B

### 无FBS的HEK293

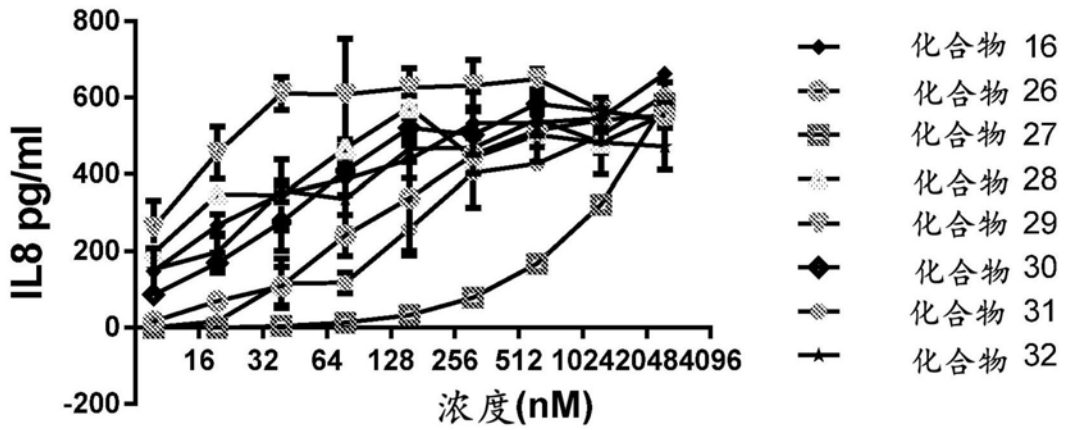


图29A

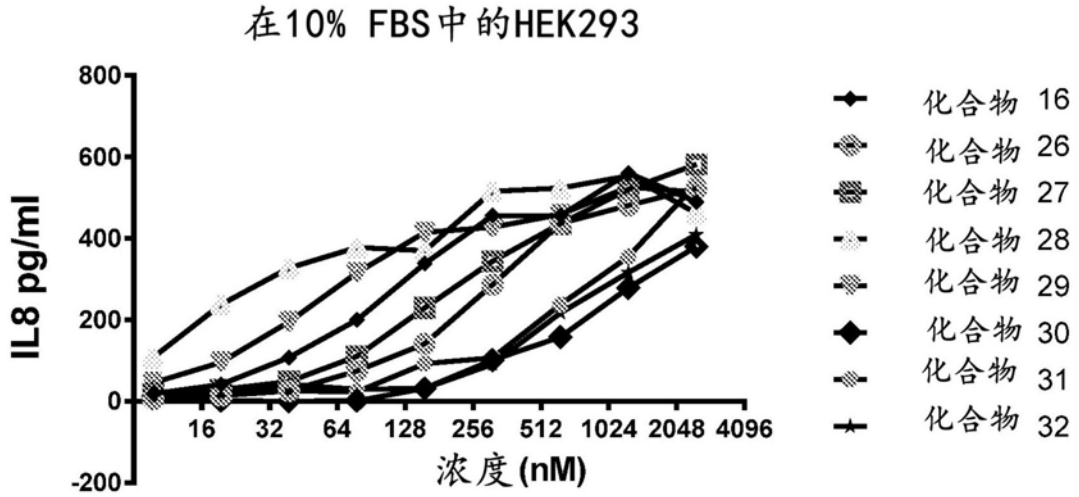


图29B

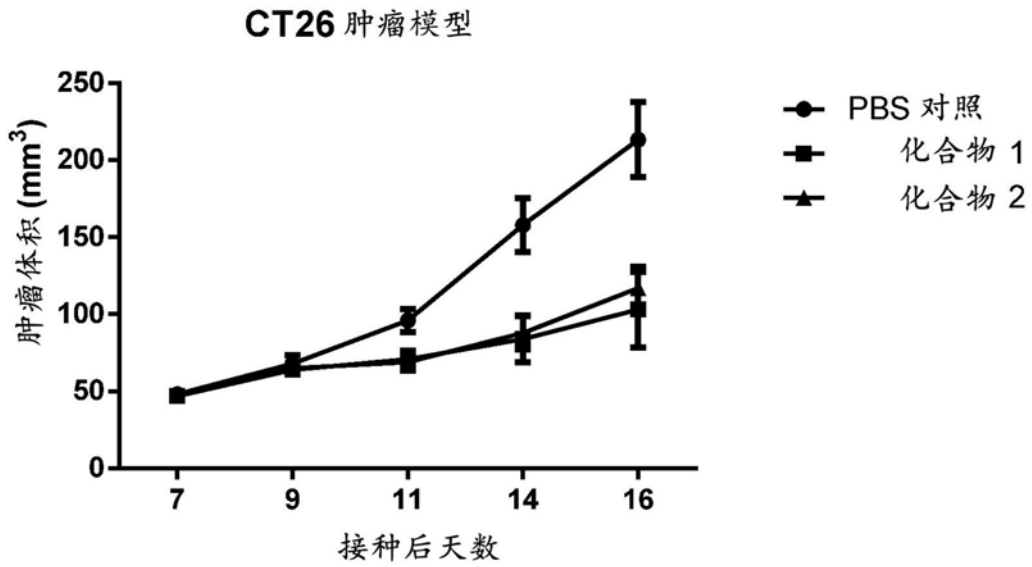


图30

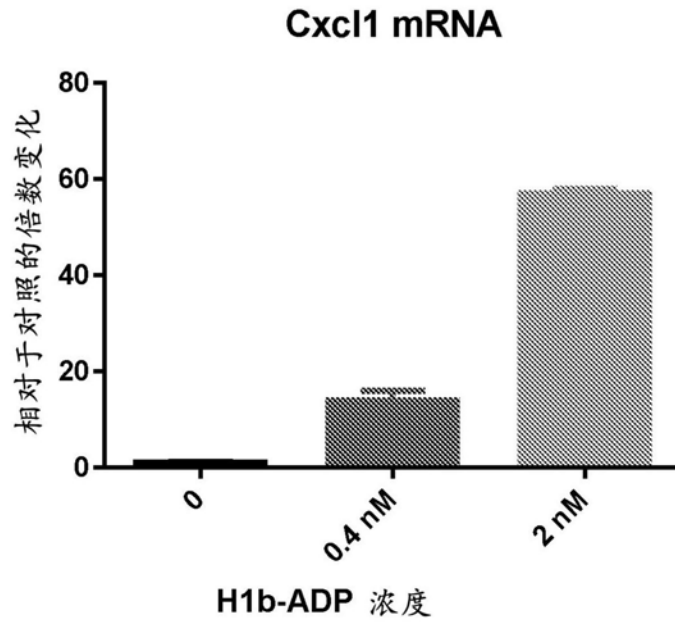


图31

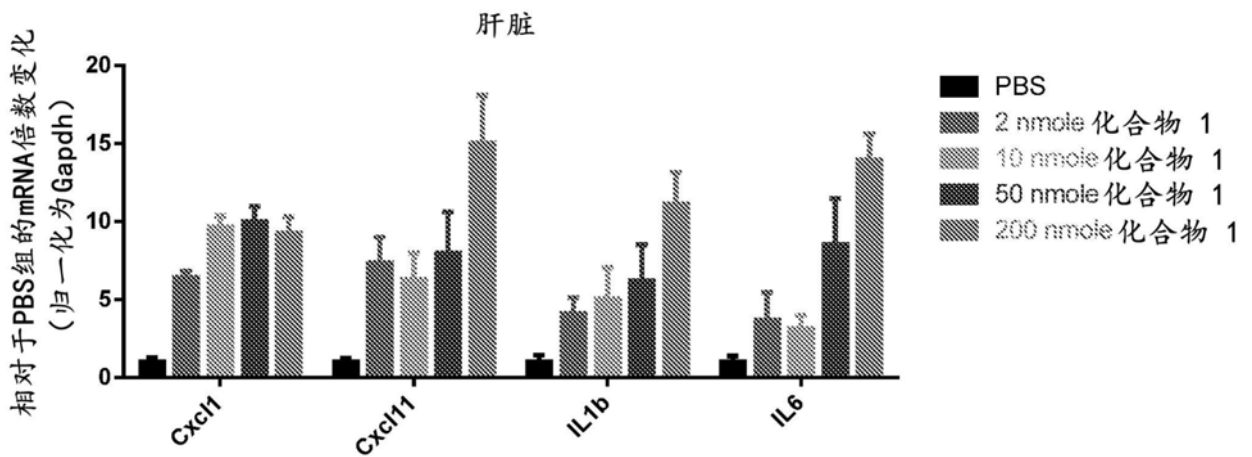


图32A

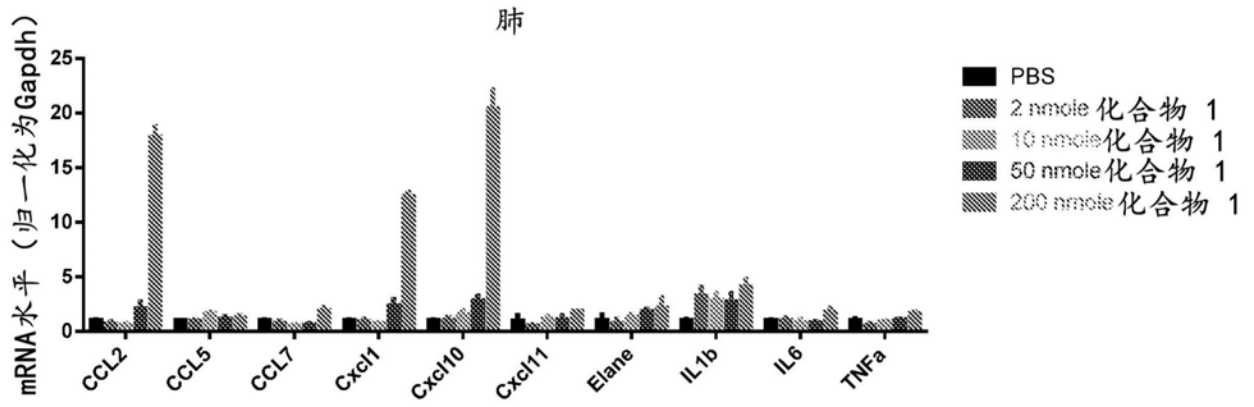


图32B

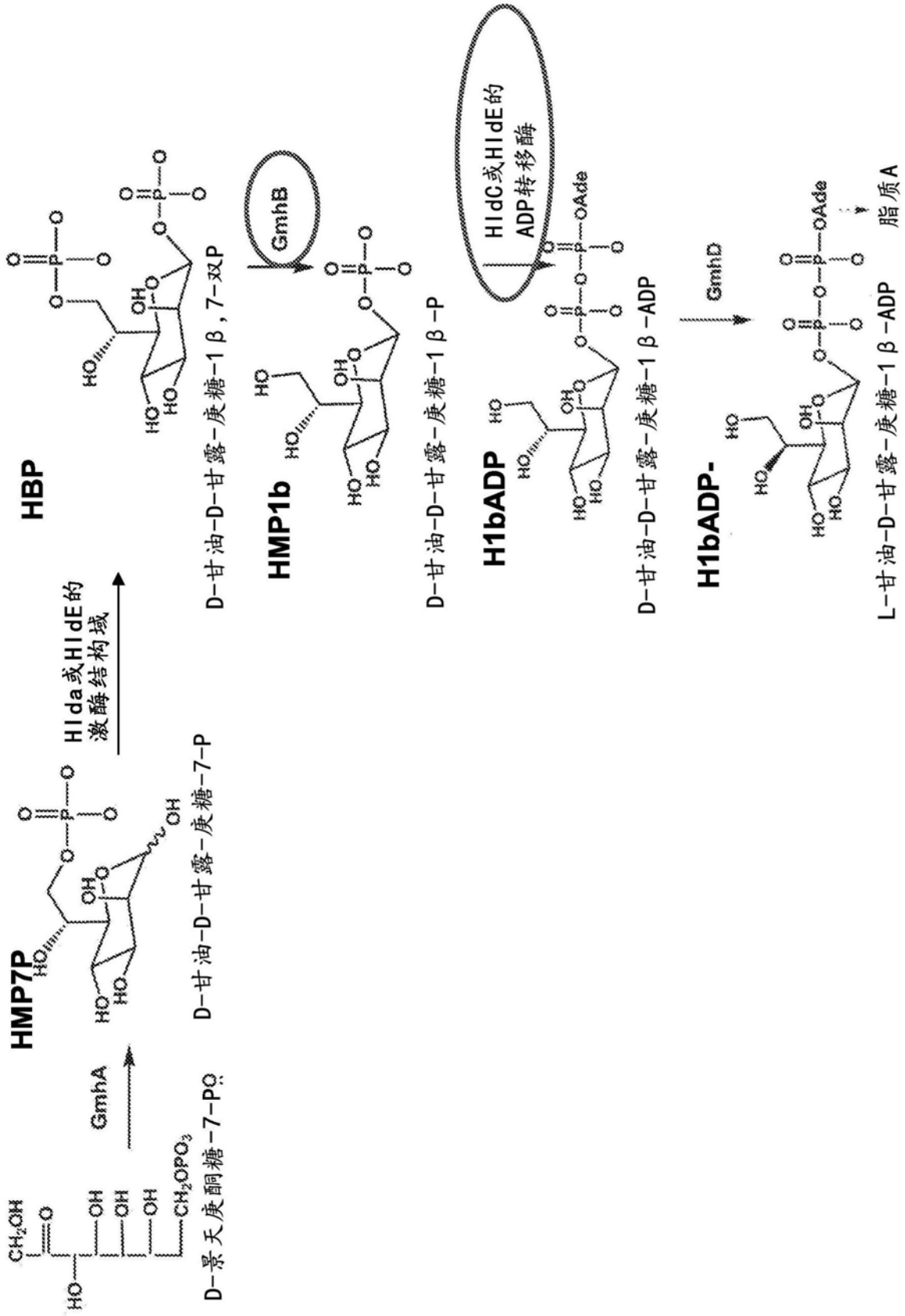


图33