

吡唑并嘧啶类 PI3K γ/δ 抑制剂的合成及抗肿瘤活性研究

邓茂青^{1,2}, 邹凤鸣^{1,3}, 齐紫平^{1,3}, 王纯^{1,2}, 龙凯丽^{1,2}, 刘青旺^{1,3}, 王傲莉^{1,3},
刘静^{1,2,3*}, 梁小飞^{1,2,3*}

(1. 中国科学院, 合肥物质科学研究院健康与医学技术研究所, 安徽 合肥 230031; 2. 中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026; 3. 中国科学院合肥肿瘤医院, 安徽 合肥 230031)

摘要: PI3K γ 和 PI3K δ 在免疫系统中有重要的调控作用, 靶向这两个亚型有助于重塑肿瘤微环境。PI3K γ 和 PI3K δ 是肿瘤免疫治疗的潜在靶点, 本研究在前期工作的基础上, 设计合成了 16 个新型吡唑并嘧啶类化合物并发现了 PI3K γ/δ 双重抑制剂 **16I**。体外研究表明, 化合物 **16I** 在蛋白和细胞水平具有良好的活性和选择性。在蛋白层次 **16I** 对 PI3K γ 和 PI3K δ 的抑制活性分别为 0.11 和 0.79 nmol·L⁻¹; 在细胞层次 **16I** 抑制 PI3K Akt S473 的磷酸化, 对 PI3K γ 和 PI3K δ 的抑制活性分别为 3 和 7 nmol·L⁻¹。体内研究表明, 在 Sprague-Dawley (SD) 大鼠上, 化合物 **16I** 具有良好的药代动力学性质。在 MC38 同种移植小鼠模型上, 化合物 **16I** 能够激活小鼠的免疫系统, 并显著抑制肿瘤生长。动物实验得到了中国科学院合肥物质科学研究院动物伦理委员会的批准 (批准号: DWLL-2000-06)。同时, 人类 ether-a-go-go 相关基因 (human ether-a-go-go-related gene, hERG) 实验表明 **16I** 没有明显的潜在心脏毒性。本研究为深入了解 PI3K γ/δ 的病理和生理功能提供了工具分子, 为靶向 PI3K γ/δ 的小分子免疫治疗药物的研发提供了苗头化合物。

关键词: PI3K γ ; PI3K δ ; 肿瘤微环境; 吡唑并嘧啶; 抗肿瘤

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)07-2041-12

Synthesis and anti-tumor activity of pyrazole pyrimidine PI3K γ/δ inhibitors

DENG Mao-qing^{1,2}, ZOU Feng-ming^{1,3}, QI Zi-ping^{1,3}, WANG Chun^{1,2}, LONG Kai-li^{1,2},
LIU Qing-wang^{1,3}, WANG Ao-li^{1,3}, LIU Jing^{1,2,3*}, LIANG Xiao-fei^{1,2,3*}

(1. Institute of Health and Medical Technology, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China; 2. University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China; 3. Hefei Cancer Hospital, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: PI3K γ and PI3K δ have important regulatory roles in the immune system, and targeting these two subtypes helps to reshape the tumor microenvironment. PI3K γ and PI3K δ are potential targets for tumor immunotherapy. In this study, a series of new pyrazolopyrimidine derivatives were designed and synthesized on the basis of our previously reported PI3K inhibitors, resulting in the discovery of compound **16I** as a potent and selective PI3K γ/δ dual inhibitor. Compound **16I** demonstrated strong biochemical potencies against PI3K γ and PI3K δ with IC₅₀ values of 0.11 and 0.79 nmol·L⁻¹. In cell-based assays, it potently inhibited the PI3K γ and PI3K δ mediated Akt S473 phosphorylation with EC₅₀ values of 3 and 7 nmol·L⁻¹. *In vivo*, compound **16I** exhibited acceptable pharmacokinetic properties in Sprague-Dawley (SD) rats and suppressed the tumor growth in a MC38 syngeneic mouse

收稿日期: 2024-02-03; 修回日期: 2024-03-14.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82173671, 82373723, 81872745); 安徽省自然科学基金项目 (2108085J42); 安徽省重点研究与开发计划项目 (2023s07020018).

*通讯作者 E-mail: jingliu@hmf.ac.cn; xiaofeilang@hmf.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0112

model. The animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences (approval number: DWLL-2000-06). In addition, no appreciable human ether-a-go-go-related gene (hERG) inhibition was observed for compound **16l** even at $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. These results suggested that compound **16l** might be a potential research tool for studying the PI3K γ/δ mediated signaling pathways.

Key words: PI3K γ ; PI3K δ ; tumor microenvironment; pyrazolo pyrimidine; anti-tumor

磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3Ks) 属于脂质激酶家族, 是 PI3K/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶标 (mTOR) 信号通路的关键调节分子, 与人类癌症的发生发展密切相关^[1,2]。PI3K 能够使磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 (PIP2) 上的 3'-羟基磷酸化形成磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (PIP3)。PIP3 是第二信使, 可以继续激活 Akt 等下游一系列信号通路^[3]。根据底物差异和序列同源性 PI3K 分为三类 (I、II 和 III 类), 共八种亚型。人们对 I 类 PI3K 的研究最为深入, 根据调控模式的差异, I 类 PI3K 进一步分为 I A 类 (PI3K α 、PI3K β 和 PI3K δ) 和 I B 类 (PI3K γ)^[4]。PI3K α 在细胞中普遍表达, 是胰岛素信号的关键调节分子^[5]。PI3K 抑制剂在临床上出现的高血糖、高胰岛素血症等不良反应与抑制 PI3K α 有关^[6]。PI3K δ 主要在造血细胞和免疫细胞中表达, 是 B 细胞和 T 细胞功能的关键调节因子。PI3K δ 介导肿瘤内 T 细胞的活化, 抑制 PI3K δ 能够发挥免疫激活作用^[7,8]。PI3K γ 主要在 T 淋巴细胞和白细胞中表达, 是控制肿瘤微环境中巨噬细胞极化转换的关键分子^[9]。抑制 PI3K γ 能够调节肿瘤微环境, 促进抗肿瘤免疫的激活, 从而使肿瘤消退^[10,11]。PI3K γ 和 PI3K δ 对肿瘤微环境的形成都有着重要作用, 联合抑制 PI3K γ 和 PI3K δ 可能比单独抑制任何一种亚型更加有效^[12,13]。

IPI-145 在 2018 年被美国 FDA 批准用于治疗复发/难治性慢性淋巴细胞白血病、小淋巴细胞淋巴瘤以及滤泡性淋巴瘤, 是目前唯一一款上市的 PI3K γ/δ 双重抑制剂, 其对 PI3K γ 和 PI3K δ 的抑制活性 (IC_{50}) 分别为 27 和 $2.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[14] (图 1)。BR-101801 是由 Boryung 公司研发的一款 PI3K γ/δ 抑制剂, 目前正在进行适应症为 B 细胞慢性淋巴细胞白血病、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤的 I 期临床研究^[15]。此外, 还有多种 PI3K γ 和 PI3K δ 的小分子抑制剂正处于临床前或药物发现研究阶段。

研究表明, IPI-145 在临床使用中出现了严重腹泻、肝毒性、结肠炎和肺部炎症等不良反应^[16]。因此, 在临床治疗中仍然需要高效和安全的 PI3K 抑制剂。前期研究发现, 吡唑并嘧啶类化合物 **14a** 对 PI3K γ 和 PI3K δ 具有较强的抑制活性 (IC_{50} 值分别为 0.62 和 $4.63 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但同时其对 PI3K α 也具有较弱的活性

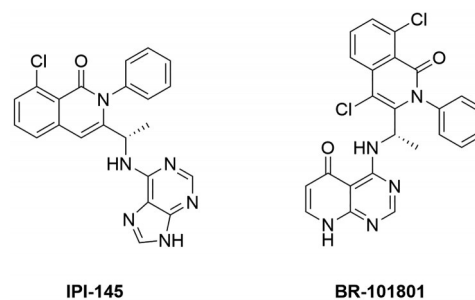


Figure 1 Structures of representative PI3K γ/δ dual inhibitors

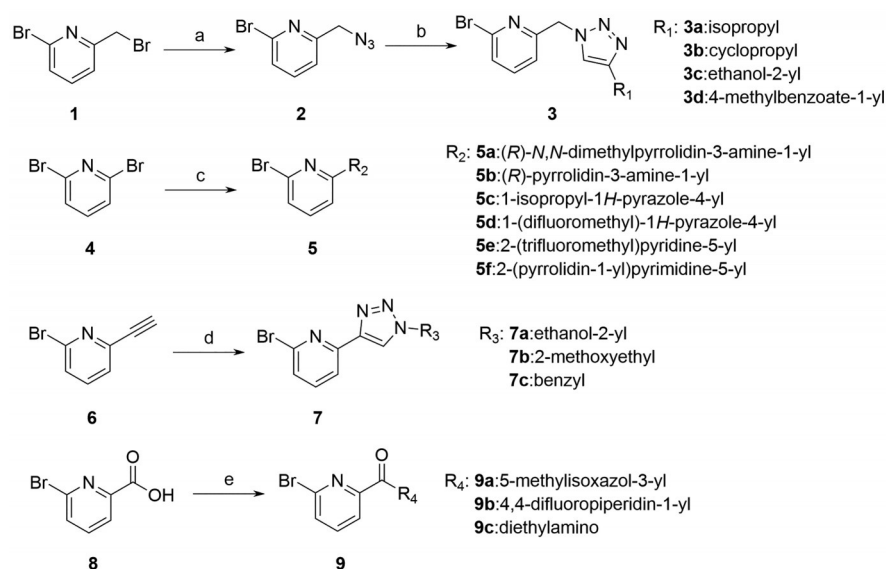
(IC_{50} 值为 $36.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[17]。**14a** 的结构由吡唑并嘧啶母核、二甲氧基取代的吡啶基和邻位氨基取代的吡啶基构成。邻位氨基取代的吡啶基靠近 PI3K 激酶 ATP 结合口袋的疏水区域 II, 该位置对于选择性 PI3K 抑制剂的研发至关重要^[18]。因此, 本研究在 **14a** 的结构基础上, 主要针对吡啶基侧链的邻位进行结构优化, 旨在为靶向 PI3K γ/δ 的肿瘤免疫治疗药物研发提供苗头化合物。

结果与讨论

1 抑制剂合成

各中间体的合成如路线 1 所示。2-溴-6-溴甲基吡啶通过亲电取代反应与 NaN_3 反应生成中间体 **2**; 中间体 **2** 通过点击化学与炔基化合物反应生成中间体 **3**。中间体 **5** 是由 2,6-二溴吡啶与硼酸酯发生 Suzuki-Miyaura 偶联反应得到。中间体 **7** 是由 2-溴-6-乙炔基吡啶与叠氮化合物通过点击化学反应生成。中间体 **9** 是由 6-溴-2-吡啶甲酸 **8** 与胺类化合物通过酰胺化缩合生成。

目标化合物 **16a**~**16p** 的合成参考已报道路线^[17] (路线 2)。以 1*H*-吡唑-3,5-二胺 (**10**) 为起始原料, 与 1,3-二甲基脲嘧啶环化生成 2-氨基吡唑[1,5-*a*]嘧啶-5(4*H*)-酮 (**11**)。化合物 **11** 经乙酸酐保护后得到化合物 **12**, **12** 与 POCl_3 进行氯化反应得到 *N*-(5-氯吡唑[1,5-*a*]嘧啶-2-基)乙酰胺 (**13**), **13** 用 $4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸的乙酸乙酯溶液脱乙酰基得到 5-氯吡唑[1,5-*a*]嘧啶-2-胺 (**14**)。化合物 **14** 经 Suzuki-Miyaura 偶联反应得到 5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑[1,5-*a*]嘧啶-2-胺 (**15**)。15 与中间体



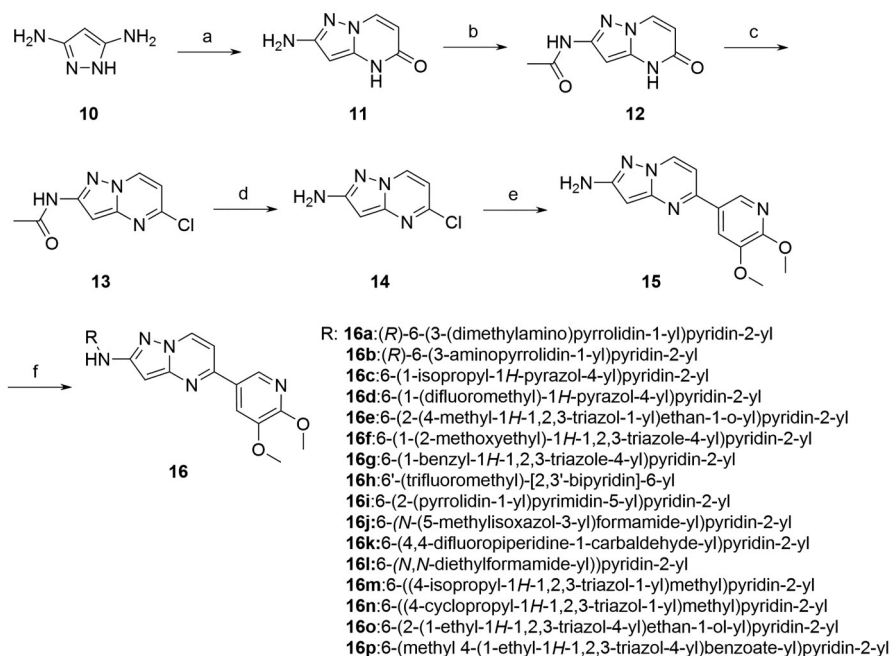
Scheme 1 Synthesis of intermediates **3**, **5**, **7**, **9**. Reagents and conditions: (a) NaN₃, DMF, rt, 3 h; (b) alkyne, CuSO₄, sodium ascorbate, *tert*-butanol, H₂O, rt, 8 h; (c) amine, NaH, DMF, rt, 2 h or borate ester, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, dioxane/H₂O, 90 °C; (d) azide, CuSO₄, sodium ascorbate, *tert*-butanol, H₂O, rt, 8 h; (e) amine, HATU, DIPEA, THF, rt, 3 h

3、**5**、**7**、**9**经 Buchwald-Hartwig 交叉偶联反应得到目标化合物 **16**。目标化合物经 ¹H NMR、¹³C NMR 和 ESI-MS 确证其结构。

2 生物活性研究

在前期研究中,当这系列化合物吡啶基侧链的邻位引入不同取代基时,获得的化合物大都对 PI3K δ 具

有较强的抑制活性,而对 PI3K α 和 PI3K γ 的抑制活性变化显著。因此,本研究在初步评价中首先通过 ADP-Glo 激酶检测试剂盒考察了新合成的化合物 **16a**~**16p** 对于 PI3K α 和 PI3K γ 亚型的抑制活性(表 1)。在化合物 **14a** 的吡啶邻位引入取代的吡咯烷基后,化合物 **16a**、**16b** 对 PI3K α 和 PI3K γ 的抑制活性明显下降。在化合物



Scheme 2 Synthesis of compounds **16a**–**16p**. Reagents and conditions: (a) 1,3-dimethylpyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione, NaOEt, EtOH, 80 °C, 14 h; (b) (Ac)₂O, rt, 14 h; (c) POCl₃, 80 °C, 3 h; (d) 4 mol·L⁻¹ HCl in EtOAc, MeOH, rt, 24 h; (e) 2,3-dimethoxy-5-(4,4,5,5-tetra-methyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)pyridine, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, dioxane/H₂O, 90 °C, 3 h; (f) intermediates **3** or **5** or **7** or **9**, Pd(PPh₃)₄, Cs₂CO₃, xantphos, dioxane, 120 °C, 3 h

14a的吡啶邻位引入取代的五元杂环,比如取代的吡唑(**16c**、**16d**)和三氮唑(**16e**、**16f**),对于PI3K α 的抑制活性有所提升,但对PI3K γ 的抑制活性有所减弱。当三氮唑上有较大的基团时(**16g**),会导致其对PI3K α 和PI3K γ 的抑制活性大幅降低。此外,在化合物**14a**的吡啶邻位引入取代的六元杂环(**16h**、**16i**)也会导致对PI3K α 和PI3K γ 的抑制活性大幅降低。这说明PI3K与小分子结合部位的空间大小有限,尽管该结合部位的空间能较好地容纳五元杂环,但是当取代基过长或过大时会影响对PI3K的抑制活性。在化合物**14a**的吡啶邻位引入较大的酰胺基团(**16j**、**16k**)会明显降低新化合物对PI3K α 和PI3K γ 的抑制活性,但在引入链状酰胺时,化合物**16l**对PI3K γ 的抑制活性和对PI3K α 的选择性均有显著提升。在取代的三氮唑与吡啶之间延长一个亚甲基后获得化合物**16m**~**16p**,它们对PI3K γ 的抑制活性变化与化合物**16e**~**16g**基本一致。

在上述化合物中,**16l**对PI3K γ 具有较强的抑制活

性($IC_{50} = 0.11 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),同时对PI3K α 表现出一定的选择性($IC_{50} = 46.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。因此,又进一步检测了**16l**对PI3K δ 和PI3K β 亚型的抑制活性,得到的 IC_{50} 值分别为0.79和26.14 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,说明在蛋白水平**16l**对PI3K δ 有较强的活性,并且对PI3K β 也有一定的选择性。

接下来,在一系列PI3K亚型特异性的细胞上分别检测了化合物**16l**对于PI3K α 、 β 、 γ 和 δ 四种亚型的抑制活性(图2)。在RAW264.7细胞中,**16l**能够显著抑制PI3K γ 介导的Akt S473的磷酸化,并且其在Raji细胞中能够显著抑制PI3K δ 介导的Akt S473的磷酸化。在SK-OV-3细胞中,**16l**对PI3K α 介导的Akt S473磷酸化具有中等抑制活性。而在786-O细胞中,**16l**对PI3K β 介导的Akt S473磷酸化具有较弱的抑制作用。这些研究结果表明,在细胞水平,化合物**16l**对于PI3K γ 和PI3K δ 亚型具有显著的抑制活性,同时对PI3K α 和PI3K β 亚型具有较好的选择性。

Table 1 Inhibitory activity of compounds **16a**–**16p** against PI3K α and PI3K γ

Compd.	R	$IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$		Compd.	R	$IC_{50}/\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	
		PI3K α	PI3K γ			PI3K α	PI3K γ
14a		36.9 ± 4.3	0.62 ± 0.01	16i		90.0 ± 8.7	58.9 ± 3.2
16a		148.6 ± 66.8	61.6 ± 14.9	16j		106.0 ± 16.3	23.7 ± 2.1
16b		255.0 ± 46.7	83.6 ± 1.7	16k		59.2 ± 12.4	35.4 ± 2.6
16c		18.2 ± 1.4	10.7 ± 23.6	16l		46.4 ± 7.1	0.11 ± 0.00
16d		43.3 ± 3.2	4.92 ± 2.4	16m		1.5 ± 0.1	3.1 ± 0.3
16e		14.9 ± 0.3	14.3 ± 0.3	16n		21.2 ± 2.5	27.3 ± 2.1
16f		10.5 ± 0.2	8.4 ± 0.8	16o		8.8 ± 0.1	10.5 ± 0.4
16g		572.0 ± 272.0	218.0 ± 191.0	16p		132.0 ± 27.1	280.0 ± 11.1
16h		373.0 ± 31.3	118.0 ± 2.6				

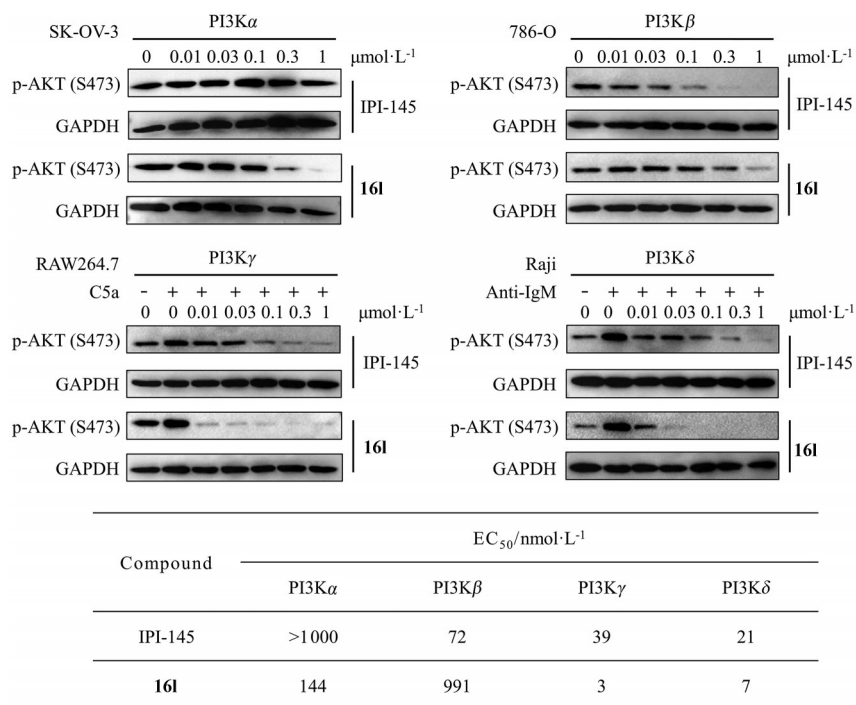


Figure 2 Inhibitory activity of **16I** against class I PI3K isoforms in cellular assays

3 化合物 **16I** 的结合模式研究

为了解化合物 **16I** 与 PI3K γ 和 PI3K δ 间的相互作用, 分子对接被用来探索 **16I** 与 PI3K γ (PDB: 6C1S) 和 PI3K δ (PDB: 6EZ6) 的结合模式 (图 3)。分析结果显示, **16I** 位于 PI3K 的 ATP 结合口袋内, 吡唑并嘧啶母核与 PI3K γ 的主链原子 Val882 形成氢键相互作用 (图 3A) (在 PI3K δ 中为 Val828, 图 3B), 二甲氧基取代的嘧啶上的甲氧基与 PI3K γ 的 Lys833 的侧链形成氢键 (图 3A) (在 PI3K δ 中为 Lys779, 图 3B), 另一侧嘧啶基延伸到溶剂暴露区, 羰基与 PI3K γ 的 Lys890 侧链形成氢键结合 (图 3A) (在 PI3K δ 中为 Asn836, 图 3B)。这些相互作用是保持化合物 **16I** 对 PI3K γ 和 PI3K δ 抑制活性的主要因素。

4 化合物 **16I** 的药代动力学性质和心脏安全性研究

在随后的实验中, SD 大鼠被随机分为两组, 每组 3 只, 采用单剂量单次给药方案, 一组将化合物 **16I** 以 1 mg·kg⁻¹ 剂量进行静脉注射给药, 另一组以 10 mg·kg⁻¹ 剂量进行灌胃给药, 检测化合物 **16I** 的药代动力学参数。研究结果显示, 在 10 mg·kg⁻¹ 的剂量下通过口服给药时, **16I** 表现出较低的体内清除率 (CL)、适当的半衰期 ($t_{1/2}$)、较好的血浆暴露 (AUC_{0-∞}), 以及良好的口服生物利用度 (F) (表 2)。这些数据初步表明, 化合物 **16I** 具有良好的药代动力学性质, 适宜通过口服给药的方式进行后续的体内药效研究。

另外, hERG 电生理膜片钳测试的结果显示, **16I** 对

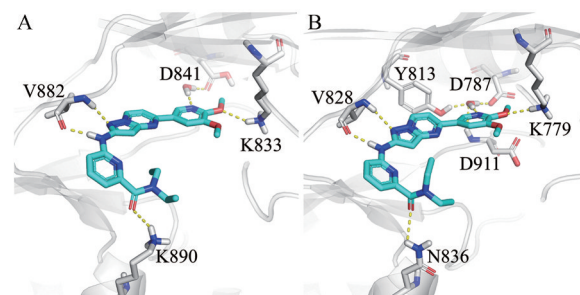


Figure 3 Putative models of **16I** bound to (A) PI3K γ (PDB: 6C1S) and (B) PI3K δ (PDB: 6EZ6). Compound **16I** is labeled in color by atoms (carbon in cyan, nitrogen in blue, oxygen in red, and hydrogen in gray). The key amino acid residues for binding are labeled as follows: nitrogen in blue, oxygen in red, and hydrogen in gray. Hydrogen bonds are indicated by yellow dashed lines to key amino acid residues. The key amino acids are shown as sticks

Table 2 Pharmacokinetic parameters of **16I** in SD rats. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Parameter	i.v. (1 mg·kg ⁻¹)	po (10 mg·kg ⁻¹)
C_{\max} /ng·mL ⁻¹	1 060 ± 17	996 ± 361
t_{\max} /h	0.03 ± 0.00	0.83 ± 0.29
AUC _{0-∞} /h·ng·mL ⁻¹	567 ± 76	4 465 ± 1 822
$t_{1/2}$ /h	0.51 ± 0.08	3.56 ± 1.58
CL /mL·h ⁻¹ ·kg ⁻¹	1 784 ± 223	2 620 ± 1 399
V_z /L·kg ⁻¹	1.3 ± 0.15	12.78 ± 6.05
F /%	-	78.7 ± 32.1

hERG 钾通道没有明显的抑制作用 (IC₅₀ > 30 μmol·L⁻¹), 意味着该化合物没有明显的潜在心脏毒性。

5 化合物 16I 的体内药效评价

基于化合物 16I 良好的体外活性以及药代动力学性质,进一步在 MC38 同种移植小鼠模型上分别采用 1 和 3 mg·kg⁻¹ 的给药剂量口服连续给药 30 天,然后评价 16I 的体内抗肿瘤药效(图 4)。实验结果显示,不同给药剂量下小鼠的体重没有明显降低,说明化合物 16I 具有较好的安全性(图 4A)。当化合物 16I 在 1 mg·kg⁻¹ 剂量下连续给药 30 天,对肿瘤生长的抑制率(tumor growth inhibition, TGI) 为 43.1%,而在 3 mg·kg⁻¹ 剂量下 16I 的 TGI 可达到 84.4%,表明 16I 能够以剂量依赖性的方式抑制肿瘤生长(图 4B、C)。同时,为了验证 16I 对体内免疫微环境的作用,选取了小鼠脾脏组织样本通过细胞流式的方法进行检测,结果表明 16I 在不同剂量下均可以激活脾脏中总 T 细胞、CD8⁺ T 细胞(CTL 细胞)和 NK 细胞(图 4D)。此外,在 MC38 同种移植小鼠模型上采用 25 mg·kg⁻¹ 的口服给药剂量,以连续给药 30 天后停药再接种的方式评价了 16I 对免疫系统的影响。在该实验中,停药后观察到肿瘤持续消退的现象,对于肿瘤完全消退的小鼠进行二次接种后发现,与进行首次接种的正常小鼠相比,其肿瘤生长明显受到抑制,说明化合物 16I 给药激活的免疫系统具有免疫记忆功能(图 4E)。

6 小结

PI3K γ 和 PI3K δ 影响肿瘤微环境的塑造,是肿瘤免疫治疗的新靶点。本研究对化合物 14a 的吡啶基邻位取代基进行结构优化,通过构效关系分析,发现吡啶并嘧啶类化合物 16I 对 PI3K γ 和 PI3K δ 具有较强的抑制

活性,其 IC₅₀ 分别为 0.11 和 0.79 nmol·L⁻¹。在 RAW264.7 和 Raji 细胞中,16I 能够分别显著抑制 PI3K γ 和 PI3K δ 介导的 Akt S473 的磷酸化。在 SD 大鼠上的研究结果表明,16I 具有良好的药代动力学性质。此外,16I 以剂量依赖性的方式抑制 MC38 同种移植小鼠模型中的肿瘤生长。以上研究结果说明,化合物 16I 是一种新型 PI3K γ/δ 双重抑制剂,可以为肿瘤免疫治疗小分子药物的研发提供苗头化合物。

实验部分

N,N-二甲基甲酰胺(0HEEAE3A)、氯化钠(9LDDGR)、四氢呋喃(02RX1RTH)、二氧六环(99XQRTNU)、4,5-双二苯基膦-9,9-二甲基氧杂蒽(ZMR8RRKX) 购于萨恩化学技术(上海)有限公司;维生素 C 钠(LE70R25)、四三苯基膦钼(LJ40X18)、*N,N*-二异丙基乙胺(LD60W14) 购于百灵威科技有限公司;2,6-二溴吡啶(K0HTKG38-WF3A)、6-溴-2-吡啶甲酸(BKV217)、HATU(EKY383)、1,3-二甲基嘧啶-2,4(1*H*,3*H*)-二酮(BNY865) 购于上海毕得医药科技股份有限公司;乙酸乙酯(20200617)、甲醇(20201207)、二氯甲烷(20201123)、无水硫酸钠(20200721)、碳酸铯(20200117)、无水乙醇(20200910)、乙酸酐(20200809)、无水碳酸钾(20201008) 购于天津市永大化学试剂有限公司;叔丁醇(20180501JN) 购于上海润捷化学试剂有限公司;乙醇钠(C13309631) 购于上海麦克林生化科技有限公司;2-溴-6-溴甲基吡啶(批号:20201219)、叠氮化钠(20210302)、三氯氧磷(20210105)、五水硫酸

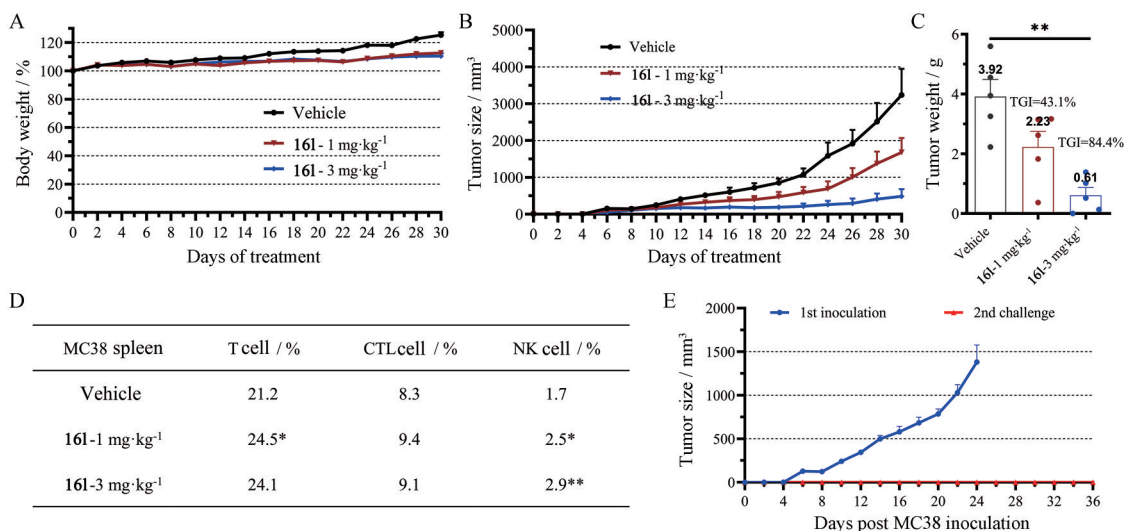


Figure 4 *In vivo* anti-tumor efficacy of compound 16I in a MC38 syngeneic mouse model. A: Body weight change in mice for each daily dosing group of 16I. Initial body weight was set as 100%. B: Tumor size measurements of the mice with 16I treatment. C: Comparison of the final tumor weight in each group. D: Content of T cells, CTL cells, and NK cells in the spleen. E: Changes in tumor size after single inoculation and reinoculation after tumor regression. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs vehicle group

铜 (20201104)、1*H*-吡啶-3,5-二胺 (20201205) 购于安徽邦之丽化工有限责任公司; 硅胶购于青岛海洋化工有限公司; ADP-Glo 激酶检测试剂盒 (0000490667)、PI3K α (0000505380)、PI3K β (0000257468)、PI3K δ (0000318068)、PI3K γ (0000505382) 蛋白、底物 PI3:PS (0000494068) 购于美国 Promega 公司; 蛋白酶抑制剂 cocktail (KN129530) 购于陶素公司; RIPA 裂解液 (23096351) 购于 Biosharp 公司; NC 膜 (0000202633) 购于德国 Millipore 公司; ECL 免疫印迹检测试剂盒 (S8321120) 购于全式金公司; 肝素钠注射液 (52208113) 购于江苏万邦生化医药集团有限公司; FITTC-NKp46 (2048914)、PE-CD19 (1172984)、PerCP-Cy5.5-CD8a (1076177)、APC-CD3 (1165670) 抗体购于美国 BD 公司; RPMI-1640 培养基 (20230713)、DMEM 高糖培养基 (20231110)、青链霉素双抗溶液 (20231109) 购于江苏凯基生物技术股份有限公司; 三(羟甲基)氨基甲烷 (G910BA0004)、甘氨酸 (JB27BA0054)、十二烷基硫酸钠 (I908BA0006)、吐温-20 (F419BA0004) 购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 胎牛血清 FBS (1827594) 购于苏州依科赛生物科技股份有限公司; 快速凝胶试剂盒 (037911200) 购于美国 Epizyme 公司。

核磁共振波谱仪 (Bruker 500 MHz NMR, 美国 Bruker 公司); 质谱仪 (Agilent 6224 TOF, 美国 Agilent 公司); 旋转蒸发仪 (OSB-2200, 日本 EYELA 公司); 磁力加热搅拌器 (RCT basic, 德国 IKA 公司); 流式细胞仪 (cytoflex)、高速低温离心机 (Allegra X-12), 美国 Beckman Coulter 公司; 恒温 CO₂ 细胞培养箱 (Heracell™ 150i, 美国 Thermo Scientific 公司); Vortex 涡旋混匀仪 (MV-100, 武汉塞维尔生物科技有限公司); 低速台式离心机 (CTL-420, 湖南湘立科学仪器有限公司)。

1 化合物的合成

1.1 2-(叠氮甲基)-6-溴吡啶 (2) 将 2-溴-6-溴甲基吡啶 (500 mg, 2.0 mmol, 1.0 equiv) 溶解 DMF (2 mL) 中, 然后加入叠氮化钠 (155.4 mg, 2.4 mmol, 1.2 equiv), 反应在室温下搅拌 3 h。反应结束后, 反应体系加入 30 mL 水, 然后用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取。合并有机层, 并用水 (30 mL)、饱和食盐溶液 (30 mL) 洗涤。有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥、过滤、浓缩后得粗品。粗品用硅胶柱纯化, 洗脱剂为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度为 0~5%。经提纯后产品是白色固体, 收率为 94.0%。

1.2 2-溴-6-((4-环丙基-1*H*-1,2,3-三唑-1-基)甲基)吡啶 (3a) 将中间体 2 (100 mg, 0.47 mmol, 1.0 equiv) 溶解于叔丁醇/水 (1 mL/2 mL) 中, 依次加入 3-甲基-1-丁炔 (38.1 mg, 0.56 mmol, 1.2 equiv)、五水硫酸铜 (1.2 mg, 0.004 7 mmol, 0.01 equiv)、维生素 C 钠 (4.5 mg,

0.023 mmol, 0.05 equiv), 反应在室温下搅拌 8 h。反应结束后, 反应体系加入 30 mL 水, 然后用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取。合并有机层, 并用水 (30 mL)、饱和食盐溶液 (30 mL) 洗涤。有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥、过滤、浓缩后得粗品。粗品用硅胶柱纯化, 洗脱剂为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度为 0~3%。经提纯后产品是淡黄色固体, 收率为 65.2%。

化合物 3b~3d 按照化合物 3a 的合成方法进行合成。

1.3 (R)-1-(6-溴吡啶-2-基)-*N,N*-二甲基吡咯烷-3-胺 (5a) 将 2,6-二溴吡啶 (100 mg, 0.42 mmol, 1.0 equiv) 溶解于 DMF (5 mL) 中, 在 0 °C 下依次加入 (*R*)-*N,N*-二甲基吡咯烷-3-胺 (57.1 mg, 0.5 mmol, 1.2 equiv)、氯化钠 (12 mg, 0.5 mmol, 1.2 equiv), 反应在室温下搅拌 2 h。反应结束后, 反应体系加入 20 mL 水, 然后用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取。合并有机层, 并用水 (30 mL)、饱和食盐溶液 (30 mL) 洗涤。有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥、过滤、浓缩后得粗品。粗品用硅胶柱纯化, 洗脱剂为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度为 0~3%。经提纯后产品是白色固体, 收率为 72.4%。

化合物 5b~5f 按照化合物 5a 的合成方法进行合成。

1.4 2-(4-(6-溴吡啶-2-基)-1*H*-1,2,3-三唑-1-基)乙烷-1-醇 (7a) 将 2-溴-6-乙炔基吡啶 (100 mg, 0.55 mmol, 1.0 equiv) 溶解于叔丁醇/水 (1 mL/2 mL) 中, 依次加入 2-叠氨基乙醇 (57.5 mg, 0.66 mmol, 1.2 equiv)、五水硫酸铜 (1.4 mg, 0.005 5 mmol, 0.01 equiv)、维生素 C 钠 (5.5 mg, 0.028 mmol, 0.05 equiv), 反应在室温下搅拌 8 h。反应结束后, 反应体系加入 20 mL 水, 然后用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取。合并有机层, 并用水 (30 mL)、饱和食盐溶液 (30 mL) 洗涤。有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥、过滤、浓缩后得粗品。粗品用硅胶柱纯化, 洗脱剂为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度为 0~3%。经提纯后产品是白色固体, 收率为 68.1%。

化合物 7b、7c 按照化合物 7a 的合成方法进行合成。

1.5 6-溴-*N*-(5-甲基异恶唑-3-基)吡啶酰胺 (9a) 将 6-溴-2-吡啶甲酸 (100 mg, 0.5 mmol, 1.0 equiv) 溶解于 THF (2 mL) 中, 加入 HATU (228 mg, 0.6 mmol, 1.2 equiv)、DIPEA (174 μ L, 1.0 mmol, 2.0 equiv)。随后, 在室温条件下加入 3-氨基-5-甲基异恶唑 (58.9 mg, 0.6 mmol, 1.2 equiv) 反应 3 h。反应结束后, 反应体系加入 20 mL 水, 然后用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取。合并有机层, 并用水 (30 mL)、饱和食盐溶液 (30 mL) 洗涤。有机层用无水 Na₂SO₄ 干燥、过滤、浓缩后得粗品。粗品用硅胶柱纯化, 洗脱剂为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度

为0~3%。经提纯后产品是白色固体, 收率为90.5%。

化合物**9b**、**9c**按照化合物**9a**的合成方法进行合成。

1.6 2-氨基吡唑并[1,5-a]嘧啶-5(4H)-酮 (11) 将1*H*-吡唑-3,5-二胺 (20 g, 203.8 mmol, 1.0 equiv) 溶解于无水乙醇 (560 mL) 中, 依次加入1,3-二甲氧嘧啶-2,4(1*H*, 3*H*)-二酮 (57.1 g, 407.7 mmol, 2.0 equiv)、乙醇钠 (44 g, 815.4 mmol, 4.0 equiv)。在氩气保护下, 反应体系加热到80 °C反应14 h后冷却至室温。反应体系经减压过滤收集析出的固体, 固体用少量无水乙醇洗涤, 并干燥后得到淡黄色固体, 收率61.1%。

1.7 *N*-(5-氧代-4,5-二氢吡唑[1,5-a]嘧啶-2-基)乙酰胺 (12) 将化合物**11** (18.7 g, 124.5 mmol, 1.0 equiv) 逐渐溶解于乙酸酐 (160 mL) 中, 室温搅拌14 h。反应结束, 反应体系浓缩、干燥得到呈微黄色固体粗产物, 收率90.7%。

1.8 *N*-(5-氯吡唑并[1,5-a]嘧啶-2-基)乙酰胺 (13) 0 °C下, 将化合物**12** (21.7 g, 112.9 mmol, 1.0 equiv) 缓慢溶于POCl₃ (120 mL) 中, 反应液加热到80 °C反应1 h。反应液冷却至室温后经减压蒸馏除去POCl₃得初产物。在搅拌下, 将初产物加入冰水中, 然后缓慢加入K₂CO₃ (固体颗粒) 直至pH为8。混合物经减压过滤, 收集滤饼得粗产品。粗产品用减压硅胶柱层析进行纯化, 洗脱剂为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度为0~5%, 得到淡黄色固体产品, 收率40.8%。

1.9 5-氯吡唑[1,5-a]嘧啶-2-胺 (14) 将化合物**13** (9.7 g, 46.0 mmol, 1.0 equiv) 溶解于甲醇 (20 mL) 中, 接着加入盐酸/乙酸乙酯溶液 (4 mol·L⁻¹, 40 mL), 所得反应液在室温下搅拌24 h。反应结束后, 反应体系经减压浓缩, 然后加入饱和NaHCO₃溶液调节pH至8。混合液用乙酸乙酯 (3×50 mL) 萃取。合并有机层, 并用水 (50 mL)、饱和食盐溶液 (50 mL) 洗涤。有机层用无水Na₂SO₄干燥、过滤、浓缩后得粗品。粗品用硅胶柱纯化, 洗脱剂为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度为0~3%。经提纯后产品是黄色固体, 收率89.2%。

1.10 5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-2-胺 (15) 将化合物**14** (6.9 g, 40.9 mmol, 1.0 equiv) 溶解于1,4-二氧六环/水 (84 mL/21 mL) 中, 依次加入2,3-二甲氧基-5-(4,4,5,5-四甲基-1,3,2-二氧杂硼烷-2-基)吡啶 (13.0 g, 49.1 mmol, 1.2 equiv)、Pd(PPh₃)₄ (1.9 g, 1.6 mmol, 0.04 equiv) 和K₂CO₃ (11.3 g, 81.8 mmol, 2.0 equiv)。在氩气保护下, 反应液于90 °C反应3 h。反应结束后, 反应体系加入100 mL水, 然后用乙酸乙酯 (3×50 mL) 萃取。合并有机层, 并用水 (50 mL)、饱和食盐溶液 (50 mL) 洗涤。有机层用无水Na₂SO₄干燥、过滤、浓缩后得粗品。粗品用硅胶柱纯化, 洗脱剂

为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度为0~3%。经提纯后产品是黄色固体, 收率77.5%。

1.11 (*R*)-5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-*N*-(6-(3-(二甲氨基吡咯烷-1-基)吡啶-2-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-2-胺 (16a) 将化合物**15** (50 mg, 0.18 mmol, 1.0 equiv) 溶解于1,4-二氧六环 (2 mL) 中, 依次加入**5a** (24.3 mg, 0.09 mmol, 0.5 equiv)、Pd(PPh₃)₄ (21.3 mg, 0.018 mmol, 0.1 equiv)、xantphos (10.7 mg, 0.018 mmol, 0.1 equiv)、Cs₂CO₃ (120.1 mg, 0.36 mmol, 2.0 equiv)。在氩气保护下, 反应混合物加热到120 °C反应3 h。反应结束后, 反应体系加入20 mL水, 然后用乙酸乙酯 (3×30 mL) 萃取。合并有机层, 并用水 (30 mL)、饱和食盐溶液 (30 mL) 洗涤。有机层用无水Na₂SO₄干燥、过滤、浓缩后得粗品。粗品用硅胶柱纯化, 洗脱剂为甲醇/二氯甲烷, 洗脱梯度为0~3%。经提纯后产品是淡黄色固体, 收率为59.0%。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.64 (s, 1H), 8.92 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 6.54 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.94 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.81~3.78 (m, 1H), 3.72~3.69 (m, 1H), 3.48~3.42 (m, 3H), 2.56 (s, 6H), 2.35~2.31 (m, 1H), 2.16~2.12 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 156.22, 155.95, 155.66, 153.45, 152.93, 148.43, 144.30, 139.00, 136.56, 135.05, 127.49, 115.93, 103.38, 98.36, 97.34, 84.79, 70.24, 64.76, 56.06, 53.97, 46.03, 42.64, 28.16. HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₂₈N₈O₂, 461.241 3; found, 461.241 5。

化合物**16b**~**16p**按照化合物**16a**的合成方法进行合成。

1.12 (*R*)-*N*-(6-(3-氨基吡咯烷-1-基)吡啶-2-基)-5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-2-胺 (16b) 淡黄色固体, 收率为10.1%。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.62 (s, 1H), 8.92 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.53 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.43 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.88 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.77~3.73 (m, 1H), 3.70~3.66 (m, 1H), 3.62~3.58 (m, 1H), 3.50~3.44 (m, 2H), 2.24~2.16 (m, 1H), 1.96~1.88 (m, 1H), 1.23 (s, 2H). HRMS (ESI, *m/z*): [M+H]⁺ calcd for C₂₂H₂₄N₈O₂, 433.210 0; found, 433.210 4。

1.13 5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-*N*-(6-(1-异丙基-1*H*-吡唑-4-基)吡啶-2-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-2-胺 (16c) 淡黄色固体, 收率为32.1%。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.90 (s, 1H), 8.96 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.56 (d, *J* =

2.0 Hz, 1H), 8.32 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.64 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.20 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 4.63~4.55 (m, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 1.49 (d, $J = 6.6$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.81, 155.74, 154.31, 153.21, 150.52, 148.45, 144.34, 138.60, 137.11, 136.65, 135.20, 127.46, 126.58, 123.16, 115.96, 111.25, 108.34, 103.54, 84.81, 56.11, 53.96, 53.64, 23.13. HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_8\text{O}_2$, 457.210 0; found, 457.210 2。

1.14 *N*-(6-(1-(二氟甲基)-1*H*-吡啶-4-基)吡啶-2-基)-5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡啶[1,5-*a*]嘧啶-2-胺 (16d) 淡黄色固体, 收率为26.9%。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.03 (s, 1H), 8.99 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.56 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.37 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.93 (t, $J = 58.9$ Hz, 1H), 7.70 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.73, 155.54, 154.52, 153.24, 148.64, 148.45, 144.33, 141.19, 138.85, 136.68, 135.25, 127.64, 127.45, 125.88, 115.98, 112.09, 110.75 (t, $J = 248.2$ Hz), 109.82, 103.74, 84.88, 56.14, 53.97. HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_2$, 465.159 9; found, 465.160 3。

1.15 2-(4-(6-((5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡啶[1,5-*a*]嘧啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)-1*H*-1,2,3-三唑-1-基)乙烷-1-醇 (16e) 白色固体, 收率为16.5%。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.05 (s, 1H), 8.98 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.75 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.06 (s, 1H), 5.13 (t, $J = 5.3$ Hz, 1H), 4.54 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.86 (q, $J = 5.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.75, 155.59, 154.55, 153.22, 148.70, 148.47, 147.66, 144.34, 138.83, 136.70, 135.25, 127.49, 123.88, 116.09, 111.47, 110.35, 103.75, 84.99, 60.43, 56.17, 53.99, 52.81. HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_9\text{O}_3$, 460.184 6; found, 460.185 0。

1.16 5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-*N*-(6-(1-(2-甲氧基乙基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)吡啶-2-基)吡啶[1,5-*a*]嘧啶-2-胺 (16f) 淡黄色固体, 收率为20.6%。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.08 (s, 1H), 8.98 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.55 (s, 1H), 8.00 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.75 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H),

7.50 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.28 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.08 (s, 1H), 4.69 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.83 (t, $J = 5.3$ Hz, 2H), 3.34 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.75, 155.56, 154.56, 153.19, 148.54, 148.49, 147.85, 144.34, 138.83, 136.69, 135.23, 127.49, 123.79, 116.00, 111.43, 110.44, 103.76, 85.06, 70.73, 58.47, 56.10, 53.98, 49.85. HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_9\text{O}_3$, 474.200 2; found, 474.200 6。

1.17 *N*-(6-(1-苄基-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)吡啶-2-基)-5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡啶[1,5-*a*]嘧啶-2-胺 (16g) 淡黄色固体, 收率为8.6%。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.06 (s, 1H), 8.98 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.57 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.74 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.55 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.42~7.39 (m, 4H), 7.37~7.33 (m, 1H), 7.28 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.04 (s, 1H), 5.75 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.95 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.76, 155.55, 154.57, 153.21, 148.46, 148.44, 148.11, 144.35, 138.85, 136.73, 136.61, 135.28, 129.27, 128.63, 128.44, 127.49, 123.58, 116.08, 111.57, 110.53, 103.77, 85.03, 56.15, 54.00, 53.41. HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{N}_9\text{O}_2$, 506.205 3; found, 506.205 4。

1.18 5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-*N*-(6'-(三氟甲基)-[2,3'-联吡啶]-6-基)吡啶[1,5-*a*]嘧啶-2-胺 (16h) 淡黄色固体, 收率为20.9%。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.24 (s, 1H), 9.01 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.94 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 1.6$ Hz, 2H), 8.40 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.88 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.58~7.56 (m, 2H), 6.92 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.76, 155.28, 154.73, 153.36, 151.50, 150.61, 148.59, 148.41, 147.86 (q, $J = 34.0$ Hz), 144.30, 139.46, 136.64, 135.32, 127.32, 124.35, 122.29 (q, $J = 274.7$ Hz), 117.79, 115.88, 113.58, 112.85, 103.75, 84.90, 55.97, 53.95. HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{F}_3\text{N}_7\text{O}_2$, 494.155 2; found, 494.155 6。

1.19 5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-*N*-(6-(2-(吡咯烷-1-基)嘧啶-5-基)吡啶-2-基)吡啶[1,5-*a*]嘧啶-2-胺 (16i) 黄色固体, 收率为31.8%。 ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.03 (s, 1H), 9.05 (s, 2H), 8.97 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.68 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.59~3.57 (m, 4H), 1.20~1.96 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 160.23,

156.46, 155.77, 155.49, 154.50, 153.34, 151.73, 148.52, 144.37, 138.92, 136.72, 135.23, 127.51, 120.78, 116.04, 110.24, 109.40, 103.85, 84.84, 56.22, 53.98, 47.03, 25.46. HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{26}H_{25}N_9O_2$, 496.220 9; found, 496.221 3.

1.20 6-((5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-2-基)氨基)-*N*-(5-甲基异恶唑-3-基)吡啶酰胺 (16j) 淡黄色固体, 收率为5.8%。 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.80 (s, 1H), 10.27 (s, 1H), 9.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.96~7.93 (m, 1H), 7.80 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.59 (dd, $J = 7.2, 4.2$ Hz, 2H), 6.84 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 2.45 (s, 3H). HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{20}N_8O_4$, 473.168 6; found, 473.168 9.

1.21 (4,4-二氟吡啶-1-基)(6-((5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)甲酮 (16k) 黄色固体, 收率为20.4%。 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.14 (s, 1H), 8.97 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.54 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.79 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.53~7.50 (m, 2H), 7.06 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.80 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.80 (s, 2H), 3.56 (s, 2H), 2.10~2.08 (m, 4H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 167.61, 155.80, 155.33, 153.72, 153.40, 152.18, 148.36, 144.35, 139.05, 136.68, 135.37, 127.35, 123.20 (t, $J = 241.9$ Hz) 115.93, 114.36, 112.01, 103.75, 85.00, 56.05, 53.97, 43.83, 38.96. HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{23}F_2N_7O_3$, 496.190 9; found, 496.191 2.

1.22 6-((5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-2-基)氨基)-*N,N*-二乙基吡啶酰胺 (16l) 淡黄色固体, 收率为30.5%。 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.11 (s, 1H), 8.98 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.98 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.76 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.54~7.50 (m, 2H), 6.89 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.48 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.27 (q, $J = 6.8$ Hz, 2H), 1.18 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.07 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 168.51, 155.78, 155.48, 153.85, 153.74, 153.44, 148.35, 144.34, 138.91, 136.69, 135.39, 127.36, 115.95, 113.26, 111.19, 103.69, 84.75, 56.11, 53.96, 42.80, 39.29, 14.68, 13.33. HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{25}N_7O_3$, 448.209 7; found, 448.209 5.

1.23 5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)-*N*-(6-((4-异丙基-1*H*-1,2,3-三唑-1-基)甲基)吡啶-2-基)吡唑[1,5-a]嘧啶-2-胺 (16m) 淡黄色固体, 收率为38.0%。 1H NMR (500 MHz,

DMSO- d_6) δ 10.09 (s, 1H), 8.93 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.99 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.66 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.17 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.75 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.64 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.12~3.04 (m, $J = 6.9$ Hz, 1H), 1.30 (d, $J = 6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.73, 155.24, 154.52, 153.88, 153.63, 152.96, 148.39, 144.32, 138.82, 136.65, 135.06, 127.46, 122.04, 115.80, 113.30, 110.58, 103.65, 85.28, 56.04, 54.57, 53.98, 25.82, 22.96. HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{25}N_9O_2$, 472.220 9; found, 472.221 2.

1.24 *N*-(6-((4-环丙基-1*H*-1,2,3-三唑-1-基)甲基)吡啶-2-基)-5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑[1,5-a]嘧啶-2-胺 (16n) 白色固体, 收率为11.5%。 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.04 (s, 1H), 8.94 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.56 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.01 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.65 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.53 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.19 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.69 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.58 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.94 (s, 3H), 2.01~1.95 (m, 1H), 0.90~0.86 (m, 2H), 0.82~0.78 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 155.77, 155.31, 154.48, 153.87, 153.08, 149.57, 148.41, 144.36, 138.90, 136.68, 135.17, 127.49, 122.03, 115.89, 113.34, 110.54, 103.69, 85.24, 56.07, 54.72, 54.00, 8.13, 7.09. HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{24}H_{23}N_9O_2$, 470.205 3; found, 470.205 6.

1.25 2-(1-((6-((5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑[1,5-a]嘧啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)甲基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)乙烷-1-醇 (16o) 淡黄色固体, 收率为4.5%。 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.04 (s, 1H), 8.94 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.01 (s, 2H), 7.65 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.18 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.71 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.63 (s, 2H), 4.70 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.68 (q, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.87 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H). HRMS (ESI, m/z): $[M+H]^+$ calcd for $C_{23}H_{23}N_9O_3$, 474.200 2; found, 474.200 3.

1.26 4-(1-((6-((5-(5,6-二甲氧基吡啶-3-基)吡唑[1,5-a]嘧啶-2-基)氨基)吡啶-2-基)甲基)-1*H*-1,2,3-三唑-4-基)苯甲酸甲酯 (16p) 淡黄色固体, 收率为7.7%。 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 10.09 (s, 1H), 8.94 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 8.05~8.03 (m, 2H), 7.96~7.94 (m, 3H), 7.68 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 7.22 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.82 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 5.76 (s, 2H), 3.98 (s,

3H), 3.92 (s, 3H), 3.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 166.32, 155.75, 155.27, 154.57, 153.39, 153.14, 148.37, 145.90, 144.30, 139.00, 136.70, 135.80, 135.19, 130.28, 129.05, 127.40, 125.80, 124.26, 116.04, 113.52, 110.71, 103.77, 85.38, 56.13, 55.01, 53.98, 52.51. HRMS (ESI, m/z): $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_9\text{O}_4$, 564.210 8; found, 564.211 1.

2 生物部分

2.1 PI3K 激酶活性实验 激酶反应体系包含 3 μL PI3K α ($3.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、PI3K β ($3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、PI3K δ ($3.3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 或 PI3K γ ($17.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 3 μL 梯度稀释的化合物 (1:3 比例用 DMSO 稀释), 6 μL 底物 PI3:PS ($0.06 \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 以及 60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP (对于 PI3K β 为 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP, 对于 PI3K γ 为 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP, 对于 PI3K δ 为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ATP)。加入相应量的 ATP 并于室温下反应 1 h, 随后向每个孔中加入 12 μL ADP-Glo 试剂孵育 40 min, 再将 24 μL 激酶检测试剂添加到每个孔中并孵育 30 min 以产生发光信号。该发光信号通过自动平板读取器读取。

2.2 蛋白免疫印迹实验 Raji 和 RAW264.7 细胞接种到六孔板中, 1% FBS 饥饿过夜, DMSO 连续稀释的化合物 **161** ($0.01\sim 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理细胞 2 h, 37 $^\circ\text{C}$ 下用 anti-IgM ($4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 刺激 10 min 或 C5a ($100 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 刺激 5 min。SK-OV-3 和 786-O 细胞接种到六孔板中, 孵育过夜, 后用 DMSO 连续稀释的化合物 **161** ($0.01\sim 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理细胞 2 h。使用加入蛋白酶抑制剂 cocktail 的 RIPA 裂解液裂解细胞样品。超声处理和煮样后, 使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质裂解物, 并转移到 NC 膜上。用含有 0.1% Tween-20 和 5% 脱脂牛奶的 TBS 进行封闭, 然后用抗体孵育。最后, 使用 ECL 免疫印迹检测试剂盒曝光显影。

2.3 药代动力学实验 SD 大鼠 (体重 180~220 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [许可代码: SCXK (浙江) 2019-0001]。实验前, 将动物适应环境一周, 然后禁食 12 h。随机分为两组, 每组 3 只, 采用单剂量单次给药方案。化合物 **161** 静脉注射剂量为 $1 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 灌胃剂量为 $10 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。给药后, 静脉注射组在 2、5、15、30 min, 1、2、4、6、8、12、24 h 采血, 灌胃组在 5、15、30 min, 1、2、4、6、8、12、24 h 采血, 并用肝素钠抗凝。然后将血样以 $8\ 000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速离心 5 min, 取上清 100 μL 置于 1.5 mL 离心管中, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 待处理测定。样品处理方法: 20 μL 内标溶液 ($200 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 咖啡因溶液) 加入 100 μL 血浆样品中, 混合, 然后加入 400 μL 甲醇进行蛋白质沉淀, 涡旋 5 min 后, $14\ 000 \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速离心 10 min, 取 5 μL 上清液用于 LC-MS/MS 分析

测定。

2.4 体内药效实验 六周龄雄性 C57BL/6J 小鼠购自南京集萃药康公司 [许可代码: SCXK (苏) 2018-0008]。小鼠置于中国科学院合肥物质科学研究院实验动物中心 [SYXK (皖) 2019-010] 的 SPF 级环境 IVC 笼盒中饲养, 且其使用严格按照中国科学院合肥物质科学研究院动物伦理规定执行 (批准号: DWLL-2000-06)。

将一百万个处于指数生长期的 MC38 细胞注入小鼠右侧皮下空间, 并于接种后第一天开始给药。化合物 **161** 甲磺酸盐以溶液 (0.25% CMC-Na 溶液) 的形式进行灌胃给药, 给药剂量为 1 和 $3 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 每个给药剂量组的小鼠数量为 5 只。小鼠的体重和肿瘤生长情况每两天测量一次。肿瘤体积按照如下方式进行计算: 肿瘤体积 (mm^3) = $(W^2 \times L)/2$, 将两个测量值中的较小值定义为宽度 (W), 较大值定义为长度 (L)。给药 30 天观察结束后, 分流小鼠脾脏单个核细胞进行流式细胞术的分析, 标记 FITC-NKp46, PE-CD19, PerCP-Cy5.5-CD8a, APC-CD3 检测 T 细胞、CTL 细胞和 NK 细胞比例变化。

MC38 二次接种实验是在 MC38 细胞荷瘤小鼠上灌胃给药 $25 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ **161** 甲磺酸盐 30 天进行治疗, 肿瘤持续减小至完全消退。间隔 3 周后, 在肿瘤消退的小鼠右侧皮下进行二次接种, 同样是一百万个处于指数生长期的 MC38 细胞。对比初次接种 MC38 细胞的小鼠, 观察对比这两种小鼠的肿瘤生长情况, 记录肿瘤的体积变化。

2.5 分子模拟研究 PI3K γ (PDB ID: 6C1S) 和 PI3K δ (PDB ID: 6EZ6) 的晶体结构来源于蛋白质数据库。使用 PyMOL 软件手动去除水分子和原始配体。对接工作由 Autodock (版本 4.2.6) 执行。AutoDockTools 1.5.6 中的 prepare_ligand4.py 和 prepare_receptor4.py 脚本用于准备初始文件, 包括添加电荷和氢原子。设置间距为 0.375 Å 的 $60 \text{Å}\times 60 \text{Å}\times 60 \text{Å}$ 的网格盒以包围整个结合位点。采用拉马克遗传算法 (LGA) 搜索最佳结合姿势。

2.6 hERG 实验 hERG 检测由苏州药明康德新药开发有限公司完成。中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系, CHO-hERG 细胞用于本实验。西沙必利为阳性对照。全细胞膜片钳技术下记录 hERG 电流, 记录温度为室温。膜片钳放大器输出信号通过数模转换以及 2.9 kHz 低通滤波。数据记录用 Patchmaster Pro 软件采集。Origin 曲线拟合计算 IC_{50} 值。

作者贡献: 邓茂青、邹凤鸣、齐紫平、王纯、龙凯丽、刘青

旺和梁小飞完成相关实验研究; 邓茂青完成文章初稿撰写工作; 梁小飞、王傲莉、刘静负责课题规划、实验指导以及文章修改与校对。

利益冲突: 本文作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism [J]. Nat Rev Genet, 2006, 7: 606-619.
- [2] Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review [J]. Ann Med, 2014, 46: 372-383.
- [3] Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities [J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13: 140-156.
- [4] Elmenier FM, Lasheen DS, Abouzid KAM. Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) inhibitors as new weapon to combat cancer [J]. Eur J Med Chem, 2019, 183: 111718.
- [5] Foukas LC, Claret M, Pearce W, et al. Critical role for the p110 α phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation [J]. Nature, 2006, 441: 366-370.
- [6] Paddock MN, Field SJ, Cantley LC. Treating cancer with phosphatidylinositol-3-kinase inhibitors: increasing efficacy and overcoming resistance [J]. J Lipid Res, 2019, 60: 747-752.
- [7] Abu-Eid R, Samara RN, Ozbun L, et al. Selective inhibition of regulatory T cells by targeting the PI3K-Akt pathway [J]. Cancer Immunol Res, 2014, 2: 1080-1089.
- [8] Abu Eid R, Ahmad S, Lin Y, et al. Enhanced therapeutic efficacy and memory of tumor-specific CD8 T cells by *ex vivo* PI3K- δ inhibition [J]. Cancer Res, 2017, 77: 4135-4145.
- [9] Zheng W, Pollard JW. Inhibiting macrophage PI3K γ to enhance immunotherapy [J]. Cell Res, 2016, 26: 1267-1268.
- [10] Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, et al. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression [J]. Nature, 2016, 539: 437-442.
- [11] De Henau O, Rausch M, Winkler D, et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K γ in myeloid cells [J]. Nature, 2016, 539: 443-447.
- [12] Sun P, Meng LH. Emerging roles of class I PI3K inhibitors in modulating tumor microenvironment and immunity [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41: 1395-1402.
- [13] Piddock RE, Loughran N, Marlein CR, et al. PI3K δ and PI3K γ isoforms have distinct functions in regulating pro-tumoural signalling in the multiple myeloma microenvironment [J]. Blood Cancer J, 2017, 7: e539.
- [14] Winkler DG, Faia KL, Dinitto JP, et al. PI3K- δ and PI3K- γ inhibition by IPI-145 abrogates immune responses and suppresses activity in autoimmune and inflammatory disease models [J]. Chem Biol, 2013, 20: 1364-1374.
- [15] Chandrasekaran S, Funk CR, Kleber T, et al. Strategies to overcome failures in T-cell immunotherapies by targeting PI3K- δ and - γ [J]. Front Immunol, 2021, 12: 718621.
- [16] Flinn IW, Hillmen P, Montillo M, et al. The phase 3 DUO trial: duvelisib vs ofatumumab in relapsed and refractory CLL/SLL [J]. Blood, 2018, 132: 2446-2455.
- [17] Liang XF, Deng MQ, Zou FM, et al. Discovery of pyrazolo 1,5-a pyrimidine derivative as a potent and selective PI3K γ/δ dual inhibitor [J]. Eur J Med Chem, 2023, 260: 115768.
- [18] Miller MS, Thompson PE, Gabelli SB. Structural determinants of isoform selectivity in PI3K inhibitors [J]. Biomolecules, 2019, 9: 82.