

PKC θ 小分子抑制剂及其免疫抑制作用的研究进展

周俐斐¹, 赵家文², 侯桂兰¹, 陈峰阳^{2*} (1.浙江省肿瘤医院, 杭州 310022; 2.浙江省医学科学院, 杭州 310013)

摘要: PKC θ 主要大量分布在 T 细胞中, 参与 T 细胞的激活, 还对效应 T 细胞和调节性 T 细胞的分化和功能分别呈现促进和抑制的双向调节作用, 因此被认为是新型选择性免疫抑制剂的理想作用靶点。目前已获得了多种化学结构类型的小分子 PKC θ 抑制剂。本文通过查阅中外文献、专利和临床试验等数据库, 主要对临床试验的、合成的和天然产物来源的 PKC θ 小分子抑制剂及其免疫抑制作用进行了综述, 并对存在的问题进行了探讨。未来的几年里, PKC θ 抑制剂很可能作为新一代免疫抑制剂, 为免疫性疾病患者带来福音。

关键词: PKC θ ; T 细胞; 免疫抑制剂; 小分子化合物; 自身免疫性疾病

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7693(2017)01-0122-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.01.030

Research Progresses of Small-molecule PKC θ Inhibitors and Their Immunosuppressive Effects

ZHOU Lifei¹, ZHAO Jiawen², HOU Guilan¹, CHEN Fengyang^{2*} (1.Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 2.Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: PKC θ , which is expressed predominantly in T cells, it is required for the activation of T cells. PKC θ also positively and negatively regulate effector and regulatory T cells' differentiation and function, respectively. These attributes of PKC θ make it an attractive target for novel selective immunosuppressant. To date, there has been reported several chemical types of small-molecule PKC θ inhibitors. Herein, these synthetic or natural PKC θ inhibitors or those in clinical trial phase are reviewed, and discussed the problems needed to be solved in the development of PKC θ inhibitors. In the coming years, PKC θ inhibitors may be served as new generation of immunosuppressant and benefit patients with immunological disease.

KEY WORDS: PKC θ ; T cells; immunosuppressant; small-molecule compound; autoimmune disease

免疫抑制剂是一类具有抑制机体免疫功能的小分子制剂或大分子生物制剂, 主要用于控制器官移植排斥反应及类风湿性关节炎、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、炎症肠病等各种自身免疫性疾病的治疗。早期的小分子免疫抑制剂主要是糖皮质激素制剂(如泼尼松、地塞米松等)和细胞增殖抑制剂(环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤等), 其主要特点是作用广泛而缺少选择性, 对多种细胞均有杀伤作用, 故治疗指数低, 有效血药浓度范围窄, 不良反应明显。如糖皮质激素能够引起骨质疏松症、糖尿病、青光眼等疾病; 环磷酰胺能导致白细胞减少症、出血性膀胱炎、心脏中毒和秃头症; 硫唑嘌呤能诱发癌症等^[1]。相比之下, 环孢菌素 A(cyclosporine A, CsA)、他克莫司和西罗莫司等免疫抑制剂能选择性地作用于 T 细胞, 而对 B 细胞、粒细胞、巨噬细胞等其他细胞的影响

较小, 从而大大降低了不良反应的发生范围和程度。但是, 这类药物仍然存在多种不良反应, 长期服用会导致机体抗感染能力下降、肾毒性、肝毒性、神经毒性和肿瘤发生率增加, 从而限制了其临床应用^[2]。必须指出, 上述不良反应的发生仍与药物对靶点的低选择性以及这些作用靶点在体内的广泛分布密切相关。因此, 迫切需要开发更加高效、低毒、高选择性的新型小分子免疫抑制剂。

PKC θ 是蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC) 家族成员之一, 在体内分布范围狭窄, 主要大量集中在 T 细胞中^[3], 但不影响 T 细胞的发育和成熟, 而只参与成熟 T 细胞的激活^[4]。PKC θ 是 PKC 家族中唯一能够在抗原特异性信号刺激下, 快速募集至 T 细胞和 APC 接触表面, 并向下游传递信号的激酶^[5]。PKC θ 可通过直接磷酸化 CARMA1、SPAK、Itk 和 Tec 等激酶^[6-8], 引起核转录因子

基金项目: 国家自然科学基金(81302785); 浙江省自然科学基金(LY15H280001)

作者简介: 周俐斐, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)88122425 E-mail: feifei1984_zhou@126.com *通信作者: 陈峰阳, 男, 硕士, 副研究员 Tel: (0571)88215624 E-mail: chenfy_hz@126.com

NFAT、NF κ B 和 AP1 转位入核,与相应启动子结合,从而激活 T 细胞^[5,9]。另外,PKC θ 对 T 细胞的分化及相应的免疫应答具有选择性的调节作用。PKC θ 促进 Th2 和 Th17 细胞的分化及其介导的免疫反应,而 Th1 细胞、CD8⁺ T 细胞及其介导的 CTL 反应和抗体反应则并不完全依赖于 PKC θ ^[10-14]。PKC θ 促进 Th2 和 Th17 细胞的分化与其调节相应的核转录因子 GATA-3 和 STAT3 有关^[13, 15]。与 PKC θ 正向调节上述功能性 Th 细胞的分化和免疫应答不同,PKC θ 对调节性 Treg 细胞的分化和功能呈现反向调节作用^[16]。Ma 等^[17]发现 PKC θ 通过调节 Akt-Foxo1/3A 通路抑制 Treg 细胞的分化。由于 PKC θ 在组织分布和 T 细胞的分化及免疫应答调控中的选择性特点,PKC θ 对机体的生理性和病理性免疫应答反应也呈现选择性的调控作用。PKC $\theta^{-/-}$ 小鼠发育和生殖能力正常^[18],对过敏反应^[19]、自身免疫性疾病^[20]和同种异体免疫排斥反应耐受^[21],但却仍能保留对细菌、病毒和肿瘤的免疫抵抗作用^[22]。因此,PKC θ 近年来被认为是新型选择性免疫抑制剂的理想作用靶点,医药化学家和制药公司也已发现了众多类型的 PKC θ 抑制剂。本文通过查询 Pubmed、Google scholar、Springer、clinicaltrials.gov、中国知网、World intellectual property organization、中国、美国、欧洲、加拿大及日本专利等数据库,对 PKC θ 的小分子抑制剂及其免疫抑制作用进行了文献综述。

1 临床试验的 PKC θ 抑制剂——Sotrastaurin

诺华制药公司的 Sotrastaurin (AEB071)是口服的 PKC 选择性抑制剂,体外能有效抑制 T 细胞的活化和增殖,结构见图 1。但 Sotrastaurin 除了抑制 PKC θ 外($K_i=0.22 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),对其他经典 PKC(α 、 β I 和 β II)和新类型 PKC(δ 、 ϵ 和 η)也具有抑制作用($K_i=0.95\sim 3.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[23]。临床前实验证明 Sotrastaurin 能有效降低大鼠异位心脏移植和短尾猴肾脏移植的存活率^[24]。目前已经完成了 I 期临床的安全性评价试验,正常人群口服 Sotrastaurin 后未发现异常指标,表现出较好的耐受性。Sotrastaurin 亦已进行了 II 期临床治疗肾脏移植、肝脏移植、银屑病和溃疡性结肠炎的试验,结果见表 1。II 期临床试验证实 Sotrastaurin 给药 2 周后,对银屑病严重指数评分最大可降至 69%^[25]。肾脏移植的 II 期临床试验发现 Sotrastaurin 联合 Tacrolimus 治疗 3 个月对排斥反应有较好的抑制

作用;其作用与麦可酚酸比较没有明显差异。临床试验中 Sotrastaurin 没有发现钙调蛋白酶抑制剂表现出的肾毒性、肝毒性、骨髓抑制、糖尿病和高血压等不良反应,但表现出增加心率、胃肠道紊乱,尤其是腹泻等不良反应^[26]。在肝脏移植的 II 期临床试验中,Sotrastaurin 联合他克莫司并没有体现出预期的治疗效果,Sotrastaurin 的肝脏衰竭率和不良反应风险都比麦可酚酸要高^[27]。虽然 Sotrastaurin 在肝脏移植治疗中不理想可能与患者招募数不足(每年每个中心<3 个)和试验机构对 Sotrastaurin 性状不熟悉等原因有关,但临床试验的发起者诺华公司根据多次 II 期临床试验的数据,最终认为与目前临床标准的免疫抑制剂治疗方法相比,Sotrastaurin 只表现出有限的优势。因此,目前已终止了 Sotrastaurin 作为免疫抑制剂研究的所有临床试验和进一步开发^[28]。

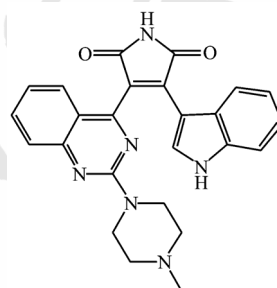


图 1 Sotrastaurin (AEB071)的结构

Fig. 1 The structure of Sotrastaurin (AEB071)

2 合成的 PKC θ 抑制剂

根据 PKC θ 的分子结构,采用分子对接和计算机辅助设计的方法,结合激酶活性和体内外 T 细胞免疫反应的测定实验,目前已经合成了一批活性显著的 PKC θ 抑制剂,结构式见图 2。

2.1 AS2521780

AS2521780(化合物 1)是日本安斯泰来制药公司(Astellas Pharma Inc.)合成的 5-胍基嘧啶类化合物。其抑制重组人 PKC θ 激酶活性的 IC_{50} 值是 $0.48 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,该作用比其他 PKC 亚型高 30 倍,对其他蛋白激酶几乎没有明显的活性,表现出较好的选择性。AS2521780 可显著抑制抗 CD3/CD28 抗体诱导的 T 细胞增殖和 IL-2 产生,抑制佐剂性关节炎大鼠的脚趾肿胀^[29]。AS2521780 在器官移植方面也表现出较好的治疗效果。其单用及联合亚剂量他克莫司或 mycophenolate mofetil 均能显著提高大鼠移植心脏存活率。和亚剂量他克莫司联用后,能明显提高他克莫司的作用,延长短尾

表 1 Sotrastaurin 的临床试验

Tab. 1 Clinical trials of Sotrastaurin(<https://clinicaltrials.gov>)

NCT identifier; Phase	Brief Title	Patient population	Comparator	Status
NCT00416546; I	Safety of AEB071 in Healthy Volunteers and to Compare the Ethnicity, Metabolic, and Safety Effects Between Caucasian and Japanese Healthy Subjects	Healthy (n=96)		Completed
NCT00504543; II	Efficacy, Safety and Tolerability of AEB071 Versus Cyclosporine in the Novo Renal Transplant Recipients	Kidney Transplantation (n=311)	CsA	Completed
NCT00885196; II	A Dose Finding Study of AEB071 Assessing Psoriasis Area and Severity Index in Patients With Plaque Psoriasis	Psoriasis (n=336)	Placebo	Completed
NCT00403416; I, II	Efficacy and Safety of AEB071 Plus Tacrolimus (Converted to Mycophenolic Acid After 3 Months), in Renal Transplant Patients	Kidney Transplantation (n=215)	Mycophenolic Acid	Completed
NCT00820911; II	Efficacy and Safety of AEB071 Versus Cyclosporine in de Novo Renal Transplant Recipients	Kidney Transplantation (n=175)	CsA	Completed
NCT00572585; II	Efficacy, Safety and Tolerability of AEB071 in Patients With Active, Moderate to Severe Ulcerative Colitis	Ulcerative Colitis (n=59)	Placebo	Terminated
NCT00555789; II	24 Month Extension to Efficacy and Safety of AEB071 Plus Tacrolimus (Converted to Mycophenolic Acid After 3 Months) in Renal Transplant Patients(Converted to Mycophenolic Acid After 3 Months) in Renal Transplant Patients	Kidney Transplantation (n=137)	Mycophenolic and tacrolimus	Terminated
NCT00492869; I, II	Efficacy and Safety of AEB071 Versus Tacrolimus in Combination With Mycophenolate Acid Sodium, Basiliximab and Steroids in Preventing Acute Rejection After Kidney Transplantation	Kidney Transplantation (n=124)	Tacrolimus	Completed
NCT01064791; II	Efficacy, Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Sotrastaurin Combined With Tacrolimus vs. a Mycophenolic Acid-tacrolimus Regimen in Renal Transplant Patients	Renal Transplantation (n=298)	Mycophenolic acid	Completed
NCT01128335; II	Efficacy, Safety, Tolerability, Pharmacokinetics of Sotrastaurin-对 tacrolimus vs. Mycophenolic Acid-tacrolimus in de Novo Liver Transplant Patients	Liver Transplantation (n=200)	Mycophenolic acid	Completed

猴移植肾脏的存活率。AS2521780 在短尾猴中没有体现明显的毒性, 因此其有效性和安全性值得进一步的研究和开发^[30]。

2.2 2,4-二氨基-5-硝基-嘧啶衍生物

Cywin 等采用荧光偏振技术筛选发现 2,4-二氨基-5-硝基-嘧啶衍生物(2,4-diamino-5-nitropyrimidines)对 PKC θ 具有选择性抑制作用。其中化合物 2 对 PKC θ 抑制的 IC₅₀ 值是 0.046 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 该作用比 VEGFR1、LYN、IR 和 SYK 等酶活性的抑制作用强近 100 倍。计算机分子对接分析发现化合物 2 能通过嘧啶环上的 1 位 N 原子及 2 位氨基取代基与 ATP 结合位点的 Leu461 残基结合。化合物 2 体外对抗 CD3/CD28 抗体共刺激诱导的 CD4⁺ T 激活具有显著的抑制作用, IC₅₀ 值是 0.084 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在抑制 CYP、肝微粒体稳定性和 Caco-2 细胞渗透性实验中也显示出了较好的体外代谢性质^[31]。

化合物 3 对 PKC θ 抑制的 IC₅₀ 值是 0.7 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究发现, 化合物 3 能显著提高调节性 T 细胞(Treg 细胞)并抑制效应 T 细胞(Teff 细胞)的功能, 抑制 Teff 细胞分泌 IFN- γ 。在

C57BL/10.PL TCR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$ 小鼠的结肠炎模型中, 化合物 3 处理后的 Treg 细胞能显著改善 Teff 细胞引起的结肠炎症状。在另一个实验中发现, 与正常人群相比, 类风湿关节炎患者来源的 Treg 细胞抑制 Teff 细胞分泌 IFN- γ 的能力下降; 但经化合物 3 处理后, Treg 细胞的功能可得到显著修复。以上结果显示化合物 3 在 Treg 细胞介导的获得性免疫疾病的治疗中具有较好的应用前景^[32]。

2.3 5-苯基-3-氰基吡啶衍生物

Boschelli 等发现 5-苯基-3-氰基吡啶衍生物(5-phenyl-3-pyridinecarbonitriles)具有较好的 PKC θ 抑制活性, 其中化合物 4 抑制 PKC θ 、PKC δ 、PKC ϵ 和 PKC η 、PKC β 、PKC ζ 的 IC₅₀ 值分别是 7.4, 51, 54, 450 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 22 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 >100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 Lyn, Lck, MK2, p38, IKK, PDGFR and ROCK1, 的 IC₅₀ 均 >100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明化合物 4 对 PKC θ 具有较好的选择性抑制作用。细胞实验发现化合物 4 能显著抑制 CD3/CD28 共刺激诱导的野生型 T 细胞分泌 IL-2 (IC₅₀=160 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但对来源于 PKC θ 敲除小鼠的 T 细胞分泌 IL-2 作用较弱(IC₅₀>15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。化合物 4 的溶解性和渗透性较好,

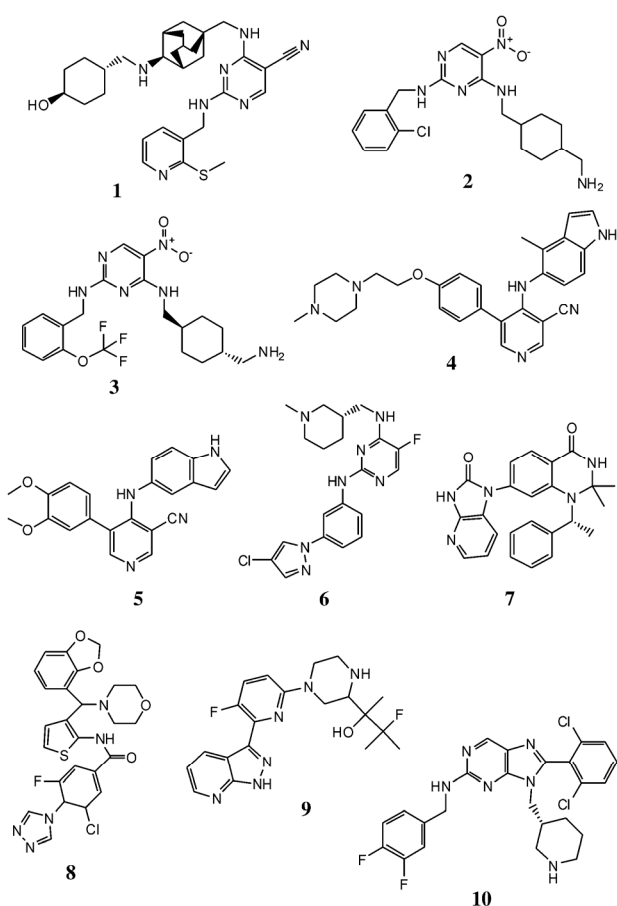


图2 合成的代表性 PKC θ 抑制剂

Fig. 2 Representative synthetic PKC θ inhibitors

但在大小鼠、狗、猴子和人来源的肝微粒体中的稳定性均较差(半衰期 $<15\text{ min}$)^[33]。进一步对5位苯基以乙烯基取代后,活性、选择性、稳定性都略有提高,但并不十分显著^[34]。

2.4 4-芳基-3-氰基吡啶衍生物

Cole 等发现 4-芳基-3-氰基吡啶衍生物(4-Arylamino-3-Pyridinecarbonitrile)具有较好的活性,化合物5可与ATP直接竞争结合PKC θ ,抑制其活性的 IC_{50} 是 $0.07\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,抑制PKC δ 、PKC ϵ 和PKC η 的 IC_{50} 分别是 $0.35, 2.33, 16.35\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对PKC β 和PKC ζ 的 $IC_{50}>50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对其他丝氨酸-苏氨酸激酶(MK2, Plk, Akt, PKA等)的 $IC_{50}>10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,显示出较好的选择性。采用抗CD3/CD28抗体共刺激诱导的T细胞分泌IL-2实验发现,化合物5抑制野生型和PKC θ 敲除小鼠来源T细胞分泌IL-2的 IC_{50} 值分别是 0.058 和 $0.231\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,也体现出较好的选择性,但也说明化合物5可通过脱靶的非PKC θ 抑制机制抑制T细胞的激活^[35]。

2.5 2,4-二氨基-5-氟嘧啶衍生物

Kunikawa 等合成了系列的2,4-二氨基-5-氟嘧啶衍生物(2,4-diamino-5-fluoropyrimidine derivatives),并测定了PKC θ 抑制活性,化合物6抑制PKC θ 的 IC_{50} 值是 $3.0\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物6对钙调蛋白酶抑制剂(CsA和Tacrolimus)的代谢酶CYP3A4几乎没有抑制作用,也不易作为肠道输出泵P-糖蛋白(P-gp)的底物。提示化合物6具有较好的口服生物利用度,并可与钙调蛋白酶抑制剂联合使用^[36]。

2.6 二氢喹啉类化合物

日本武田药业 Katoh 等通过高通量筛选发现1,7-disubstituted-2,2-dimethyl-2,3-dihydro quinazolin-4(1H)-ones 是新型的PKC θ 抑制剂。其后在计算机分子对接指导下进行设计和结构改造,获得的化合物7对PKC θ 具有显著的抑制活性($IC_{50}=0.25\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),与其他30种激酶相比显示出较好的选择性。体外采用抗CD3/CD28抗体诱导的人T细胞激活产生IL-2,测定发现化合物7能浓度依赖性的抑制IL-2的产生($IC_{50}=180\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。100 $\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 口服给药4h后,化合物7在小鼠血浆中的浓度可达到 $2000\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。10 $\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和100 $\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 口服对抗CD3抗体静脉注射诱导的小鼠血浆中IL-2的产生也显示出显著的抑制作用^[37]。

2.7 FL-1507

FL-1507(化合物8)是从70000个化合物中筛选获得的PKC θ 抑制剂,抑制PKC θ 活性的 IC_{50} 值是 $182\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但FL-1507在 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内对PKC α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 均没有明显的抑制作用,表现出较好的选择性。在T细胞中,FL-1507能显著抑制PMA诱导的PKC θ 磷酸化;抑制CD3/CD28诱导的RelA和IL-2表达。在小鼠体内,FL-1507对异体T细胞移植所致的移植抗宿主反应(graft-versus-host disease, GVHD)也表现出较好的抑制作用^[38]。

2.8 三环吡唑并吡啶类化合物

美国福泰制药公司(Vertex pharmaceuticals Inc.)合成的系列三环吡唑并吡啶类化合物(Tri-cyclic pyrazolopyridines)具有较好的PKC抑制活性。代表性化合物9抑制PKC θ 的 $K_i<1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,抑制PKC δ 的 $K_i>1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 而 $<10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,抑制PKC α 的 $K_i>2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 而 $<2.8\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,表现出一定的选择性^[39]。

2.9 嘌呤类化合物

荷兰 N.V. ORGANON 制药公司合成了系列嘌呤类化合物, 从中发现了一批具有选择性 PKC θ 抑制活性的化合物。代表性化合物 **10** 抑制 PKC θ 的 $K_i < 100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑制 PKC δ 的 $K_i > 250 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 抑制 PKC α 的 $K_i > 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。化合物 **10** 于小鼠体内皮下注射 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能显著抑制抗-CD3 抗体诱导的 IL-2 产生^[40]。

3 天然产物来源的 PKC θ 抑制剂

天然产物来源的 PKC θ 抑制剂结构式见图 3。

3.1 Rottlerin

Rottlerin (化合物 **11**) 是来源于锦葵属植物 *Mallotus philippinensis* 的查尔酮类物质, 初始时发现其主要抑制 PKC δ ^[41]。后发现具有较好的 PKC θ 抑制活性^[42]。Springael 等发现 Rottlerin 能抑制抗 CD3/CD28 抗体诱导的人外周血来源 CD4 $^{+}$ 和 CD8 $^{+}$ T 细胞的激活和增殖, 细胞因子 IL-2 产生, 表面分子 CD25 和 CD69 表达, Th1 和 Th2 型细胞因子 IFN- γ 、IL-10 和 IL-13 的 mRNA 表达, 但不影响 Ca^{2+} 内流和 IL-2 诱导的 T 细胞增殖, 表明体外对 T 细胞介导的免疫反应有较好的抑制作用^[43]。

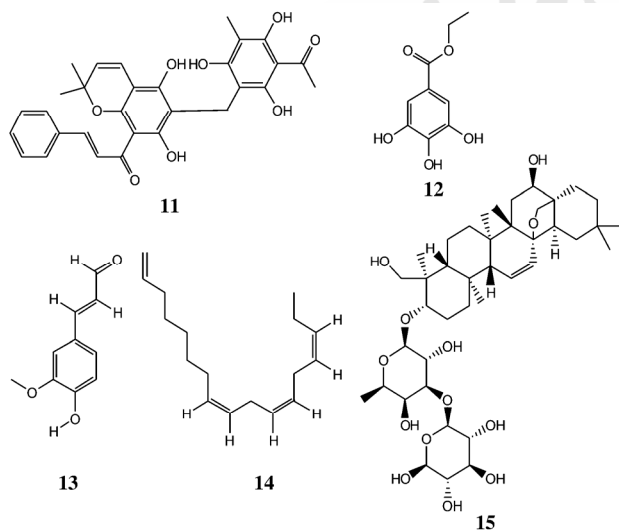


图 3 天然来源的 PKC θ 抑制剂

Fig. 3 Natural PKC θ inhibitors

3.2 没食子酸乙酯

李宗徽等^[44]从龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.) 的雄花中分离的没食子酸乙酯(化合物 **12**)能抑制抗 CD3/CD28 抗体刺激的 T 中 PKC θ 膜转位、细胞因子(IL-2、TNF- α)产生和细胞增殖, 但没有说明没食子酸乙酯是否能直接抑制 PKC θ 的活性。

3.3 4-羟基-3-甲氧基肉桂醛

计算机分子对接分析发现植物来源的 4-羟基-3-甲氧基肉桂醛(化合物 **13**)能通过氢键结合在 PKC θ 、 α 、 ι 的 ATP 结合域。能显著抑制 PKC θ 激酶的活性, 抑制抗 CD3/CD28 抗体或 PMA/离子霉素诱导的 T 细胞中 PKC θ 磷酸化和下游 NFAT、NF κ B 和 MAPK 通路的激活, 抑制 T 细胞增殖和 IL-2 释放^[45]。

3.4 单紫杉烯

单紫杉烯(化合物 **14**)是土木香(*Inula helenium* L.)的主要成分。研究发现单紫杉烯能显著抑制抗 CD3/CD28 抗体或 PMA/离子霉素诱导的 T 细胞中 PKC θ 磷酸化和膜转位, 抑制下游 NFAT、NF κ B 和 MAPK 通路的激活, 抑制 T 细胞增殖和 IL-2 释放和表面分子 CD69 表达^[46]。

3.5 柴胡皂苷 D

从柴胡(*Bupleurum falcatum* L.)中分离的三萜皂苷类化合物柴胡皂苷-D(化合物 **15**)能干扰 ConA 或 PMA 引起的 T 细胞中 PKC θ 的膜转位及下游 I κ B- α 和 JNK 磷酸化, 抑制 IL-2 产生, 抑制 T 细胞活化早晚期表面分子 CD69 和 CD71 的表达^[47]。

3.6 C₂₁ 甾体化合物

C₂₁ 甾体化合物是一类母核含有 21 个碳原子的孕甾烷衍生物。广泛存在于萝藦科、薯蓣科、夹竹桃科、茄科和龙胆科植物中, 尤以萝藦科植物分布最为普遍^[48-50]。其骨架可以分为 4 种类型(I~IV), 见图 4, 以骨架 I 型为基本结构的占绝大多数。课题组前期研究发现来源于萝藦科植物黑鳗藤 *Stephanotis mucronata* (Blanco) Merr. 的系列 C₂₁ 甾体化合物具有显著的免疫抑制活性^[51-54]。其中, 化合物 Stephanthraneline A (STA)在体外能显著抑制抗 CD3/CD28 抗体或 Con A 诱导的 T 细胞激活和增殖, 在体内能显著抑制 T 细胞介导的迟发型超敏反应^[55]。最近研究发现, STA 还能显著抑制 CD4 $^{+}$ T 细胞介导的免疫性肝炎, 降低 CD4 $^{+}$ T 细胞在肝脏组织中的激活和聚集。研究其作用机制发现, STA 并不作用于糖皮质激素受体, 也不诱导激活 T 细胞的凋亡。STA 抑制 T 细胞激活并不依赖于近端 TCR 信号和 Ca^{2+} 信号。进一步深入研究发现, STA 能直接抑制 PKC θ 激酶活性, 抑制 PKC θ 的磷酸化和下游 NFAT、NF κ B 和 MAPK 通路的激活。计算机分子对接分析 STA 可能通过 5 个氢键与 PKC θ ATP 域中的 Lys409、Asn509、

Asp465 和 Asp508 紧密结合, 见图 5^[56]。因此, C₂₁ 甾体化合物也可能是新结构类型的天然 PKC θ 抑制剂。

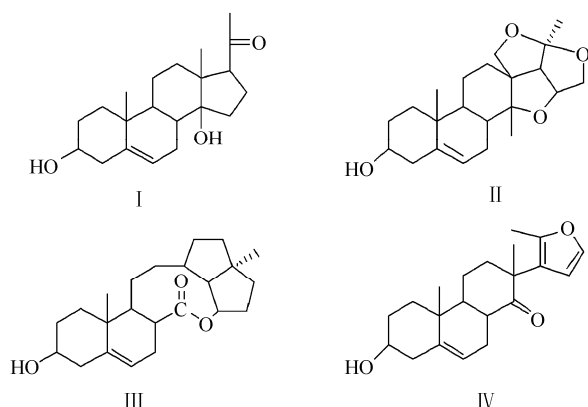


图 4 植物中 C₂₁ 甾体化合物的骨架类型

Fig. 4 Chemical scaffolds of C₂₁ steroids from plants

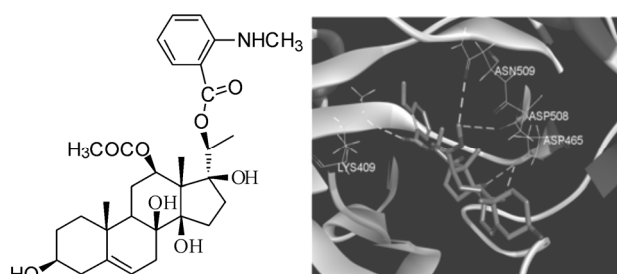


图 5 Stephanthraniline A 及与 PKC θ 的氢键结合方式

Fig. 5 Stephanthraniline A and its binds to PKC θ via five hydrogen bonding interaction

4 讨论与展望

由于 T 细胞在介导各种免疫反应中的重要作用, T 细胞长期以来及将来仍是控制各种免疫性疾病的主要药物靶标。CsA 和他克莫司等钙调蛋白酶抑制剂在临床使用中的不尽人意和不可避免的不良反应使得新型免疫抑制剂的研究逐渐转向非钙调蛋白酶抑制剂^[57]。与钙调蛋白酶、mTOR 等靶蛋白的广泛分布不同, PKC θ 主要大量集中在 T 细胞中, 分布范围相对狭窄。因此, PKC θ 的特异性抑制剂在理论上能避免上述免疫抑制剂引起的肝、肾和神经毒性, 安全性更加理想。这一点也已经在 Sotrastaurin 的临床试验中得到证实。Sotrastaurin 没有发现肾毒性、肝毒性、骨髓抑制、糖尿病和高血压等不良反应^[25-26]。另外, 鉴于 PKC θ 参与 T 细胞激活和分化的重要性, 特别是 PKC θ 促进效应 T 细胞而抑制调节性 T 细胞的双向调节功能, 有理由相信 PKC θ 是目前高效、安全、新型免疫抑制剂研究最为理想的药物靶点之一。

但笔者认为, PKC θ 抑制剂的研究仍有 2 个问题亟待解答: ①目前已较充分掌握 PKC θ 的 C-端催化结构域的空间构象^[58], 但对 N-端调节结构域和中间 V3 铰链区的特征尚不明确, 这也是导致目前大多数合成的 PKC θ 抑制剂都是基于 ATP 结合位点进行设计的原因。但由于 ATP 结合位点在激酶家族中的保守性, 该类化合物的专属性较差, 均不能完全选择性地抑制 PKC θ 。如 Sotrastaurin 除了抑制 PKC θ 外, 对其他经典 PKC(α 、 β I 和 β II) 和新类型 PKC(δ 、 ϵ 和 η) 也具有抑制作用。这也可能是 Sotrastaurin 在临床研究中呈现心率和胃肠道紊乱等不良反应^[26], 最终导致临床试验终止的原因之一。因此, 全面了解 PKC θ 各结构域的空间构象将可能是设计和合成高选择性 PKC θ 抑制剂的重要前提。②虽然研究表明在 T 细胞中, DAG 直接激活 PKC θ , PKC θ 通过磷酸化 CARMA1、SPAK、Itk 和 Tec 等激酶调节下游 NF- κ B、AP-1 和 NFAT 通路^[6-8], 但引起 PKC θ 磷酸化和转位的机制, 及 PKC θ 调节下游通路, 控制 T 细胞激活和分化的确切机制尚未完全明确。目前 PKC θ 抑制剂的研究也大多局限于对 PKC θ 激酶的直接抑制作用, 而对影响 PKC θ 与互作蛋白之间作用的研究甚少。因此, 深入了解 PKC θ 的上下游调节机制将为 PKC θ 抑制剂的研究提供更多的药物作用方式和途径。另外, 目前发现的天然产物来源的 PKC θ 抑制剂相对甚少。天然产物因其结构和活性的多样性, 长期以来一直是新药开发最重要的来源^[59]。根据 2016 年最新的统计, 上市的总共仅有的 14 个免疫抑制剂中, 除去 6 个生物大分子制剂, 剩余的 8 个小分子免疫抑制剂均直接来源于天然产物或由天然产物衍生而来^[60]。因此, 从天然产物中寻找和发现活性显著和高选择性的 PKC θ 抑制剂将令人期待。

总之, PKC θ 为新型免疫抑制剂的研究提供了新的理想药靶。随着化学和生物医药工作者的积极参与, 和众多制药公司的持续大量投入, 相信未来的几年里, PKC θ 抑制剂作为新一代免疫抑制剂必将是免疫性疾病患者的福音。

REFERENCES

- [1] JOLLY E C, WATSON C J E. Modern immunosuppression [J]. Surgery (Oxford), 2011, 29(7): 312-318.
- [2] TOLOU-GHAMARI Z. Nephro and neurotoxicity of calcineurin inhibitors and mechanisms of rejections: A review

- on tacrolimus and cyclosporin in organ transplantation [J]. *J Nephropathol*, 2012, 1(1): 23-30.
- [3] BAIER G, TELFORD D, GIAMPA L, et al. Molecular cloning and characterization of PKC θ , a novel member of the protein kinase C (PKC) gene family expressed predominantly in hematopoietic cells [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(7): 4997-5004.
 - [4] SUN Z, ARENDT C W, ELLMEIER W, et al. PKC-theta is required for TCR-induced NF- κ B activation in mature but not immature T lymphocytes [J]. *Nature*, 2000, 404(6776): 402-407.
 - [5] ZHANG E Y, KONG K F, ALTMAN A, et al. The yin and yang of protein kinase C-theta (PKC θ): a novel drug target for selective immunosuppression [J]. *Adv Pharmacol*, 2013(66): 267-312.
 - [6] WANG D, YOU Y, CASE S M, et al. A requirement for CARMA1 in TCR-induced NF- κ B activation [J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(9): 830-835.
 - [7] LI Y, HU J, VITA R, et al. SPAK kinase is a substrate and target of PKC θ in T cell receptor-induced AP-1 activation pathway [J]. *Embo J*, 2004, 23(5): 1112-1122.
 - [8] ALTMAN A, KAMINSKI S, BUSUTTI V, et al. Positive feedback regulation of PLC γ 1/Ca²⁺ signaling by PKC θ in restimulated T cells via a Tec kinase-dependent pathway [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(7): 2001-2011.
 - [9] KWON M J, WANG R, MA J, et al. PKC- θ is a drug target for prevention of T cell-mediated autoimmunity and allograft rejection [J]. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2010, 10(4): 367-372.
 - [10] MARSLAND B J, SOOS T J, SPATH G, et al. Protein kinase C θ is critical for the development of *in vivo* T helper (Th) 2 cell but not Th1 cell responses [J]. *J Exp Med*, 2004, 200(2): 181-189.
 - [11] SALEK-ARDAKANI S, SO T, HALTEMAN B S, et al. Differential regulation of Th2 and Th1 lung inflammatory responses by protein kinase C θ [J]. *J Immunol*, 2004, 173(10): 6440-6447.
 - [12] ANDERSON K, FITZGERALD M, DUPONT M, et al. Mice deficient in PKC θ demonstrate impaired *in vivo* T cell activation and protection from T cell-mediated inflammatory diseases [J]. *Autoimmunity*, 2006, 39(6): 469-478.
 - [13] KWON M J, MA J, DING Y, et al. Protein kinase C- θ promotes Th17 differentiation via upregulation of Stat3 [J]. *J Immunol*, 2012, 188(12): 5887-5897.
 - [14] BERG-BROWN N N, GRONSKI M A, JONES R G, et al. PKC θ signals activation versus tolerance *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 2004, 199(6): 743-752.
 - [15] STEVENS L, HTUT T M, WHITE D, et al. Involvement of GATA3 in protein kinase C θ -induced Th2 cytokine expression [J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(12): 3305-3314.
 - [16] PHETSOUPHANH C, KELLEHER A D. The role of PKC- θ in CD4⁺ T cells and HIV infection: to the nucleus and back again [J]. *Front Immunol*, 2015, 6(3): 391.
 - [17] MA J, DING Y, FANG X, et al. Protein kinase C- θ inhibits inducible regulatory T cell differentiation via an AKT-Foxo1/3a-dependent pathway [J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5337-5347.
 - [18] PFEIFHOFFER C, KOFLER K, GRUBER T, et al. Protein kinase C θ affects Ca²⁺ mobilization and NFAT cell activation in primary mouse T cells [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(11): 1525-1535.
 - [19] MARSLAND B J, SOOS T J, SPATH G, et al. Protein kinase C θ is critical for the development of *in vivo* T helper (Th)2 cell but not Th1 cell responses [J]. *J Exp Med*, 2004, 200(2): 181-189.
 - [20] TAN S L, ZHAO J, BI C, et al. Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis and impaired IL-17 production in protein kinase C theta-deficient mice [J]. *J Immunol*, 2006, 176(5): 2872-2879.
 - [21] GRUBER T, HERMANN-KLEITER N, PFEIFHOFFER-OBERMAIR C, et al. PKC θ cooperates with PKC α in alloimmune responses of T cells *in vivo* [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(10): 2071-2079.
 - [22] VALENZUELA J O, ICLOZAN C, HOSSAIN M S, et al. PKC θ is required for alloreactivity and GVHD but not for immune responses toward leukemia and infection in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(12): 3774-3786.
 - [23] EVENOU J P, WAGNER J, ZENKE G, et al. The potent protein kinase C-selective inhibitor AEB071 (sotrastaurin) represents a new class of immunosuppressive agents affecting early T-cell activation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(3): 792-801.
 - [24] VINCENTI F, KIRK A D. What's next in the pipeline [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8: 1972-1981.
 - [25] SKVARA H, DAWID M, KLEYN E, et al. The PKC inhibitor AEB071 may be a therapeutic option for psoriasis [J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 3151-3159.
 - [26] RUSS G R, TEDESCO-SILVA H, KUYPERS D R, et al. Efficacy of sotrastaurin plus tacrolimus after denovo kidney transplantation: randomized, phase II trial results [J]. *Am J Transplant*, 2013, 13(7): 1746-1756.
 - [27] PASCHER A, DE SIMONE P, PRATSCHE J, et al. Protein kinase C inhibitor sotrastaurin in de novo liver transplant recipients: a randomized phase II trial [J]. *Am J Transplant*, 2015, 15(5): 1283-1292.
 - [28] TROTTER J F, LEVY G. Sotrastaurin in liver transplantation: has it had a fair trial? [J]. *Am J Transplant*, 2015, 15(5): 1137-1138.
 - [29] FUKAHORI H, CHIDA N, MAEDA M, et al. Effect of AS2521780, a novel PKC θ selective inhibitor, on T cell-mediated immunity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014(745): 217-222.
 - [30] FUKAHORI H, CHIDA N, MAEDA M, et al. Effect of novel PKC θ selective inhibitor AS2521780 on acute rejection in rat and non-human primate models of transplantation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 27(2): 232-237.
 - [31] CYWIN CL, DAHMANN G, PROKOPOWICZ A S, et al. Discovery of potent and selective PKC-theta inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(1): 225-230.
 - [32] MARYANNE B, MICHAEL D, ALEXANDRA Z Z. *Ex-vivo* treatment of immunological disorders with PKC-theta inhibitors: US patent, WO2010/126967 A1 [P]. 2010.
 - [33] BOSCHELLI D H, WANG D, PRASHAD A S, et al. Optimization of 5-phenyl-3-pyridinecarbonitriles as PKC θ inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(13): 3623-3626.
 - [34] NIU C, BOSCHELLI D H, TUMEY L N, et al. First generation 5-vinyl-3-pyridinecarbonitrile PKC θ inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(20): 5829-5832.
 - [35] COLE D C, ASSELIN M, BRENNAN A, et al. Identification, characterization and initial hit-to-lead optimization of a series of 4-arylamino-3-pyridinecarbonitrile as protein kinase C theta (PKC θ) inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(19): 5958-5963.
 - [36] KUNIKAWA S, TANAKA A, MUKOYOSHI K, et al. Optimization of 2,4-diamino-5-fluoropyrimidine derivatives as protein kinase C theta inhibitors with mitigated

- time-dependent drug-drug interactions and P-gp liability [J]. Bioorg Med Chem, 2015, 23(13): 3269-3277.
- [37] KATO T, TAKAI T, YUKAWA T, et al. Discovery and optimization of 1,7-disubstituted-2,2-dimethyl-2,3-dihydroquinazolin-4(1H)-ones as potent and selective PKC θ inhibitors [J]. Bioorg Med Chem, 2016, 24(11): 2466-2475.
- [38] 范国煌. 抑制移植抗宿主病的新型 PKC θ 的小分子抑制剂: 中国 201510471935.2 [P]. 2015.
- [39] JIMENEZ J M, STUDLEY J. Tri-cyclic pyrazolopyridine kinase inhibitors: US patent, WO2010/011772 A2 [P]. 2010.
- [40] NEAGU I, ROUGHTON A, HO K, et al. Purines as PKC- θ inhibitors: US patent, WO2008/051826 A2 [P]. 2006.
- [41] GSCHWENDT M, MÜLLER HJ, KIELBASSA K, et al. Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 199(1): 93-98.
- [42] VILLALBA M, KASIBHATLA S, GENESTIER L, et al. Protein kinase θ cooperates with calcineurin to induce Fas ligand expression during activation-induced T cell death [J]. J Immunol, 1999, 163(11): 5813-5819.
- [43] SPRINGAEL C, THOMAS S, RAHMOUNI S, et al. Rottlerin inhibits human T cell responses [J]. Biochem Pharmacol, 2007, 73(4): 515-525.
- [44] 李宗徽, 郭育琦, 吴岱锦. 龙眼花萃取物及用于免疫调节的应用与制备: 中国, 201110228003.7 [P]. 2011.
- [45] AKBER U, NA B R, KO Y S, et al. Phytocomponent 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldehyde ablates T-cell activation by targeting protein kinase C- θ and its downstream pathways [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 25(1): 130-140.
- [46] NA B R, KIM H R, KWON M S, et al. Aplotaxene blocks T cell activation by modulation of protein kinase C- θ -dependent pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 62: 23-31.
- [47] LEUNG C Y, LIU L, WONG R N, et al. Saikosaponin-d inhibits T cell activation through the modulation of PKC θ , JNK, and NF- κ B transcription factor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(4): 1920-1927.
- [48] XIAO G S, WANG Y B, LEI H, et al. Determination of C₂₁-steroidal-glycoside in Cynanchi Atrati Radix from different areas [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2014, 31(10): 1228-1231.
- [49] HE L W, LU T L, MAO C Q, et al. Chemical constituents and anti-tumor activity of Marsdenia Tenacissima [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2014, 31(7): 821-824.
- [50] ZHANG L, LI X Y, XU S F, et al. Determination of cynanchogenin and caudatin in *Cynanchum otophyllum* Scheid by HPLC under double UV wavelengths [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药), 2014, 31(3): 317-319.
- [51] LI X Y, ZONG S L, CHEN F Y, et al. Three novel immunosuppressive steroidal glycosides from the stems of *Stephanotis mucronata* [J]. Nat Prod Commun, 2012, 7(10): 1269-1270.
- [52] YE Y, CHEN F, SUN H, et al. Two novel immunosuppressive pregnane glycosides from the roots of *Stephanotis mucronata* [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(17): 4586-4591.
- [53] YE Y, CHEN F, SUN H, et al. Stemucronoside K, a novel C(21) steroidal glycoside from *Stephanotis mucronata*, inhibited the cellular and humoral immune response in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2008, 8(9): 1231-1238.
- [54] CHEN F Y, NI Y, YE Y P, et al. Comparison of immunosuppressive activity of Stephanoside E and its aglycone from *Stephanotis mucronata in vitro* [J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10(10): 1153-1160.
- [55] CHEN F Y, NI Y, YE Y P, et al. Stephanthraneline A inhibits the proliferation and activation of T cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 685(1): 186-197.
- [56] CHEN F Y, ZHOU L F, LI X Y, et al. Stephanthraneline A suppressed CD4⁺ T cell-mediated immunological hepatitis through impairing PKC θ function [J]. Eur J Pharmacol, 2016, pii: S0014-2999(16)30383-1.
- [57] WEBBER A B, VINCENTI F. An update on calcineurin inhibitor-free regimens: The need persists, but the landscape has changed [J]. Transplantation, 2016, 100(4): 836-843.
- [58] XU Z B, CHAUDHARY D, OLLAND S, et al. Catalytic domain crystal structure of protein kinase C- θ (PKC θ) [J]. J Biol Chem, 2004, 279(48): 50401-50409.
- [59] LI J W, VEDERAS J C. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier [J]. Science, 2009, 325(5937): 161-165.
- [60] NEWMAN D J, CRAIG G M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014 [J]. J Nat Prod, 2016, 79(3): 629-661.

收稿日期: 2016-06-16