



依加利塞 (Eganelisib) 的抗炎及其 PI3K γ 选择性抑制机制研究*

熊文典^{1,2)**} 贾磊^{1,2)**} 蔡燕飞¹⁾ 陈蕴¹⁾ 金坚^{1)***} 朱景宇^{1)***}

(¹⁾ 江南大学生命科学与健康工程学院, 无锡 214122; (²⁾ 江南大学化学与材料工程学院, 无锡 214122)

摘要 目的 磷脂酰肌醇3激酶 γ (PI3K γ) 在免疫系统的调节中发挥重要作用, 使其成为一个炎症治疗的潜在药物靶点。目前选择性PI3K γ 抑制剂用于治疗炎症的研究较为匮乏, PI3K γ 抑制剂的炎症治疗效果有待进一步揭示。因此, 本课题选择目前已进入临床研究的PI3K γ 抑制剂依加利塞 (Eganelisib) 进行抗炎作用及PI3K γ 选择性机制研究。**方法** 首先通过脂多糖(LPS)诱导RAW264.7细胞, 构建炎症细胞模型检测依加利塞的抗炎作用及机制。随后, 通过联用分子共同特征药效团、受体-配体复合物药效团、分子动力学的计算模拟方法, 在分子水平揭示依加利塞的PI3K γ 选择性作用抑制机制。**结果** 依加利塞可以通过抑制炎症细胞中的PI3K信号通路来抑制细胞炎症因子的释放; 药效团模型揭示氢键及疏水是依加利塞产生PI3K γ 选择性抑制的关键药效团特征; 分子动力学模拟发现了抑制剂与PI3K γ 蛋白选择性结合的关键氨基酸, 包括Val882、Met804、Trp812、Ile963。**结论** 本研究初步验证了依加利塞的抗炎作用, 并在分子水平揭示了抑制剂与PI3K γ 选择性结合机制, 为抗炎PI3K γ 抑制剂的开发提供一定的指导作用。

关键词 PI3K γ 抑制剂, 依加利塞 (IPI-549), 炎症, 药效团, 分子动力学模拟

中图分类号 R979

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0529

炎症 (inflammation), 是机体对外界感染、组织损伤等刺激所产生的, 以维持机体自身内环境稳定和正常生命活动为根本的一种保护性反应^[1]。炎症疾病发病机制复杂, 而且常常表现为慢性炎症, 治疗困难, 从而容易引发其他疾病, 如类风湿性关节炎、银屑病、肺纤维化, 甚至肿瘤^[2]。大量研究已发现炎症反应与胞内多条信号通路的激活相关, 其中磷脂酰肌醇3激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 信号通路备受关注^[3-4]。PI3K是一种胞内脂质磷酸激酶, 根据其结构和底物的特异性可分为I、II、III型, 其中I型PI3K研究最为广泛^[5]。受多种细胞表面受体激活后, I型PI3K可磷酸化靶底物磷酸肌醇 (PIP2) 肌醇环的第3位, 产生脂质第二信使磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸 (PIP3), 进而启动广泛的信号转导级联反应^[6]。其介导的PI3K/Akt信号通路调控着一系列细胞生理活动, 如细胞存活、迁移、分化和增殖等^[7]。I型PI3K是由调节亚基 (p85) 和催化亚基 (p110) 组成的异源二聚体, 根据结构特异性和

调控亚基的差异, 进一步分为IA类和IB类。IA类包括PI3K α 、PI3K β 、PI3K δ , 而IB类仅含有PI3K γ ^[8]。作为唯一的亚型结构, PI3K γ 拥有如下几个显著特征: a. IA型PI3K主要由酪氨酸激酶受体 (receptor tyrosine kinases, RTKs) 激活, 而PI3K γ 主要受G蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 激活^[9-10]; b. PI3K α 和PI3K β 在人体组织中普遍表达, 而PI3K γ 和PI3K δ 主要分布于造血系统, 其中PI3K γ 主要存在于白细胞中, 如中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、T细胞、肥大细胞中^[11]; c. 在受到如GPCR这些细胞表面受体刺激后, PI3K γ 被大量激活从而可以调控

* 国家自然科学基金 (21807049) 和江苏省产学研项目 (BY2020432) 资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

金坚 Tel: 0510-85918219, E-mail: jianjin@jiangnan.edu.cn

朱景宇 Tel: 0510-85918219, E-mail: jingyuzhu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2022-11-12, 接受日期: 2023-01-11

多种免疫细胞功能^[12]；d. PI3K γ 缺陷小鼠模型表明，敲除PI3K γ 不会造成胚胎致死，但会严重影响小鼠的免疫功能^[11, 13]。大量研究表明，PI3K γ 的激活有助于中性粒细胞在感染和炎症部位聚集，从而释放大量的趋化因子、炎症因子及活性氧(ROS)等^[14]。PI3K γ 在其他免疫细胞及其功能中也发挥着重要作用，例如，趋化单核细胞或巨噬细胞在炎症部位的迁移、激活及发育T淋巴细胞等^[11]。此外，在多种小鼠模型中，抑制PI3K γ 可以有效地治疗多种炎症疾病，包括关节炎、红斑狼疮、哮喘、肺部炎症和纤维化等^[15-17]。因此，PI3K γ 因其在免疫系统中的重要作用而成为一个极具潜力的抗炎药物靶点。

目前已有一些选择性PI3K γ 报道，其中依加利塞(Eganelisib, IPI-549)已进入临床实验(图1a)^[18]。IPI-549作为一个肿瘤免疫治疗候选化合物，主要用于治疗尿路上皮癌、乳腺癌、卵巢癌等肿瘤疾病，迄今没有IPI-549用于炎症治疗的报道^[19]。目前已有多篇论文综述了PI3K γ 抑制剂的开发情况，其中用于抗炎作用的PI3K γ 抑制剂报道较少^[16, 20-21]。因此，开发新型的PI3K γ 抑制剂用于炎症治疗具有广阔的应用前景及临床意义。然而，目前几乎所有的PI3K γ 抑制剂都是围绕其ATP结合口袋进行药物设计^[22]，即ATP竞争性抑制剂，由于I型PI3K的高度同源及ATP口袋的保守性，使得开发选择性PI3K γ 抑制剂具有极大的挑战^[23]，因此，研究现有抑制剂的选择性机制将有助于选择性PI3K γ 的开发。本文拟采用IPI-549作为工具药物，使用体外炎症模型评价其抗炎作用，同时利用整合的计算模拟技术研究其PI3K γ 的选择性机制，为抗炎PI3K γ 抑制剂的开发提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 IPI-549对RAW264.7细胞活性的影响

取对数生长期的鼠巨噬细胞RAW264.7(购自中科院细胞库)，每孔5 000个细胞接种至96孔板，置于培养箱中培养(37°C, 5% CO₂)。待细胞贴壁后，加入不同浓度的IPI-549，设置3个复孔，同时设置空白组 and 对照组，作用24 h后使用CCK-8检测细胞活力。

1.2 IPI-549对PI3K信号通路作用评价

将处于对数生长期的RAW264.7细胞铺于6孔板，每孔1.5×10⁶个细胞，加入1 ml无血清的DMEM培养基后置于培养箱中饥饿过夜处理

(37°C, 5% CO₂)。提前加入不同浓度(0.1、0.5、1.0 μmol/L)的IPI-549(0.5% DMSO)处理30 min后，加入500 μg/L脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作用30 min。随后根据RIPA裂解液说明书提取蛋白质，使用BCA试剂盒测定蛋白质浓度并调节至同一浓度水平，加入上样缓冲液(loading buffer)后在水中煮沸5 min使蛋白质充分变性，完成上样液的制备。上样等量的样品，并按照预制胶的说明书进行电泳、转膜、封闭、孵育抗体，其中封闭使用5%脱脂奶粉，一抗为磷酸化Akt(p-Akt-S473, 1:1 000稀释)、总Akt(total-Akt, 1:1 000稀释)抗体，均购置于Cell Signaling Technology公司。最后采用ECL方法显色。

1.3 IPI-549抗炎作用的评价

使用LPS诱导RAW264.7构建炎症模型。将对数生长期的RAW264.7铺于12孔板，每孔40万个细胞，贴壁后，提前30 min加入不同浓度的IPI-549(0.1、0.5、1.0 μmol/L)，后加入LPS 500 μg/L，共同作用24 h。按照TRIzol(购自Thermo Scientific)的官方操作提取RNA，之后按照PrimeScript™ RT Master Mix(Takara)官方操作得到相应的cDNA，最后加入已合成的目的基因引物(上海生工)，使用SYBR™ Select Master Mix(Thermo Scientific)按照说明书进行PCR定量，引物序列见表S1。GAPDH作为内参，使用2^{-ΔΔCt}法进行相对定量分析。

1.4 PI3K γ 蛋白及小分子数据集准备

小分子结构均来自Drew课题组的文献报道^[24]。IPI-549/PI3K γ 复合物晶体结构采自RCSB Protein Data Bank数据库，PDB ID: 6XRL^[24]。IPI-549的三维结构直接取自6XRL，其余小分子结构使用Discovery studio 3.5(DS3.5)软件中Sketching工具绘制，共含有41个小分子结构，其活性数据采用文献报道的IC₅₀值(表S2)。所有小分子使用DS3.5的Minimize Ligands工具进行结构优化：赋予CHARMM力场，采用Smart Minimizer算法进行能量优化。优化后的40个小分子(除去IPI-549)组成抑制剂数据集(Inhibitors dataset)，同时根据抑制剂数据集结构，使用DUD-E在线工具(<http://dude.docking.org/>)生成含有850个小分子的数据库，作为非抑制剂数据集(Decoys dataset)。

1.5 构建基于分子共同特征的药效团模型

采用DS3.5软件中的Common Feature Pharmacophore Generation模块构建基于分子共同

特征的药效团模型 (HipHop)。首先, 从上述的41个抑制剂集中挑选活性最高的6个小分子来构建模型 (表S2中*标识), 设置其Principal值为2, 意为有活性的参考分子。根据DS3.5默认推荐药效团特征 (Features), 选定氢键供体 (D)、氢键受体 (A)、疏水中心 (H)、正电离子中心 (PI)、芳香环中心 (R)。其他参数设置如下: Conformation Generation 设置为 Best; MaxOmitFeat 值设置为 0, 表示构建的药效团模型所有特征元素都要匹配这6个小分子; 其余参数设置为默认。

1.6 构建基于受体-配体复合物的药效团模型

使用 DS3.5 软件中的 Receptor-ligand Pharmacophore Generation 模块基于 IPI-549/PI3K γ 复合物晶体结构 6XRL 构建受体-配体复合物药效团模型。首先, 采用 Prepare Protein 工具进行蛋白质优化: 去除水分子; 添加氢键及缺失的原子; 自动质子化; 赋予 CHARMM 立场。随后, 采用优化的复合物结构来构建药效团, 复合物蛋白质结构作为 Input Receptor, 复合物配体小分子作为 Input Ligand, 其余参数设置如下: Maximum Pharmacophores 为 10; Minimum Features 为 3; Maximum Features 为 6; 模型采用 GFA (Genetic Function Approximation) 算法进行打分^[25]。此外, 采用已知活性化合物与非活性化合物对产生的药效团模型进行验证: Validation 设置为 True, 其中抑制剂数据集 (Inhibitors dataset) 设置为 Active Ligands, 非抑制剂数据集 (Decoys dataset) 设置为 Inactive Ligands。模型采用留一法 (Leave-one-out) 进行验证, 并使用以下指标来进行模型评估: 包括敏感性 (SE)、特异性 (SP)、受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 及对应 ROC 曲线下面积 (AUC) 值。

$$SE = TP / (TP + FN)$$

$$SP = TN / (TN + FP)$$

其中 TP (true positive) 指真阳性, FN (false negative) 指假阴性, TN (true negative) 指真阴性, FP (false positive) 指假阳性。

1.7 分子动力学模拟

采用 6XRL 为分子动力学初始构象, 首先使用 Maestro 中 Protein Preparation 模块进行蛋白质结构的准备和优化: 去除水分子, 加入氢原子; 使用 OPLS-2005 力场进行结构优化至最小化均方根偏差 (RMSD) 达到最大值 0.3 Å。随后, 使用 Desmond 软件进行分子动力学模拟^[26], 首先使用 System

Builder 工具构建模拟体系: 水盒子设置为 orthorhombic, 每个方向截断值为 10 Å; 使用 TIP3P 水模型; 添加 Na⁺ 中和体系电荷; 添加 0.15 mol/L 浓度的 NaCl 溶液; 赋予 OPLS-2005 力场^[27]。随后, 使用 Desmond 软件默认的 Relax model 方法对体系进行优化。最后, 使用 Molecular Dynamics 工具运行动力学模拟: 模拟时间设置为 200 ns; 模拟体系设置为 NPT, 体系温度为 300 K, 压力为 1 bar。分子动力学模拟完成后, 使用 Simulation interaction diagram 工具进行结果分析。

2 结果与讨论

2.1 IPI-549具有显著的抗炎作用

首先检测 IPI-549 对 RAW264.7 细胞活性的影响, 从而筛选出活性实验的安全浓度。使用不同浓度的 IPI-549 处理 RAW264.7 细胞, 24 h 后检测细胞活力。图 1b 显示即使在药物高浓度 10 μ mol/L 作用下, 细胞存活率仍达 80% 以上, 表明细胞存活受到较小的影响, 而在小于 1.25 μ mol/L 药物作用下, 细胞的存活几乎没有影响, 表明了 IPI-549 较小的细胞毒性作用。使用 LPS 作用 RAW264.7 构建炎症细胞模型, 图 1c 表明, LPS 可以显著提升 RAW264.7 中 PI3K 通路中 Akt 的磷酸化水平, 而使用不同浓度 IPI-549 处理后, Akt473 的磷酸化水平 (p-Akt-S473) 受到显著抑制, 并呈现剂量依赖关系。对比空白组发现, 0.1 μ mol/L 的 IPI-549 即可显著抑制 Akt473 的磷酸化, 说明 IPI-549 可以有效地抑制炎症细胞中的 PI3K 信号通路。

LPS 刺激 RAW264.7 细胞为经典的炎症细胞模型, 其特征是 LPS 的诱导会使得细胞大量释放炎症介质, 其中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 较为典型^[28-29]。如图 1d-f 所示, 随着 LPS 的诱导刺激, 细胞中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的转录水平显著升高。使用不同浓度 IPI-549 (0.1、0.5、1.0 μ mol/L) 作用细胞, 可以看到 IPI-549 显著抑制炎症因子的释放, 并且这种抑制呈现浓度依赖关系。上述结果表明, IPI-549 可以通过抑制炎症细胞中的 PI3K 通路来有效地抑制炎症细胞中炎症因子的释放, 初步验证了 IPI-549 的抗炎作用。

2.2 基于分子共同特征 (HipHop) 药效团的分析

HipHop 可以提取系列化合物中具有相似活性但结构不同或结构柔性较大分子的共同化学特征,

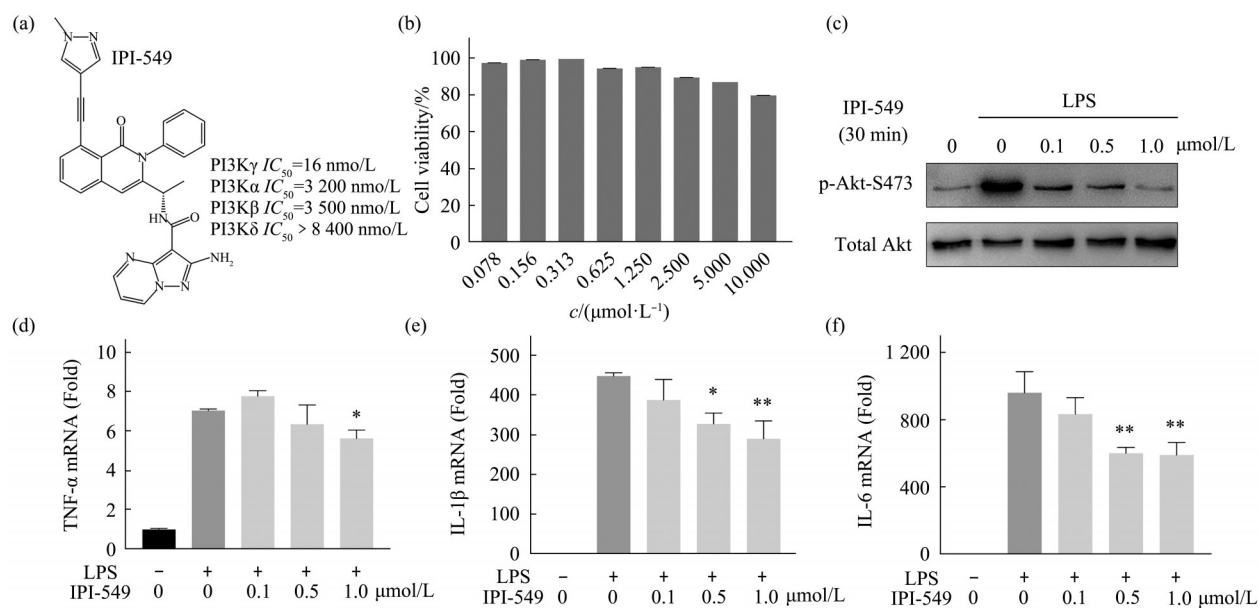


Fig. 1 Anti-inflammatory effects of IPI-549 *in vitro*

(a) 2D structure of IPI-549; (b) effect of serial concentration of IPI-549 on RAW264.7 cell viability; (c) inhibition of IPI-549 on PI3K signaling stimulated by LPS on RAW264.7 macrophages; (d–f) influence of IPI-549 on the inflammatory cellular model in response to LPS. Data represent the means $\pm$ SEM based on three independent experiments, * P < 0.05, ** P < 0.01.

并探索其中的构效关系^[30]。由表1可知, HipHop共生成10个药效团模型。其中HipHop_01药效团得分(Rank score)最高, 为84.783。“Direct Hit”及“Partial Hit”表示生成的药效特征与训练集分子匹配情况, 1表示完全匹配, 0表示部分匹配。由表1可知, HipHop_01的特征与6个小分子完全

匹配。HipHop_01拥有6个药效团特征, 包括了4个疏水特征(H)和2个氢键受体特征(A)(图2a)。其中, 氨基吡啶嘧啶基团对应的氢键特征尤其关键, 其产生的氢键作用保证了抑制剂与PI3K γ 蛋白的紧密结合(图2b)^[31]。

Table 1 Results of HipHop pharmacophore models

Model Name	Feature ¹⁾	Rank	Direct Hit	Partial Hit	Max fit
HipHop_01	HHHHAA	84.783	111111	000000	6
HipHop_02	RHAAA	81.961	111111	000000	5
HipHop_03	RRHAA	81.269	111111	000000	5
HipHop_04	RHHAA	80.649	111111	000000	5
HipHop_05	RHHAA	80.484	111111	000000	5
HipHop_06	RHHAA	79.874	111111	000000	5
HipHop_07	RHHAA	78.916	111111	000000	5
HipHop_08	RHHAA	78.916	111111	000000	5
HipHop_09	RHHAA	78.824	111111	000000	5
HipHop_10	RHHAA	78.786	111111	000000	5

¹⁾R, ring aromatic; H, hydrophobic; A, acceptor of H-bond.

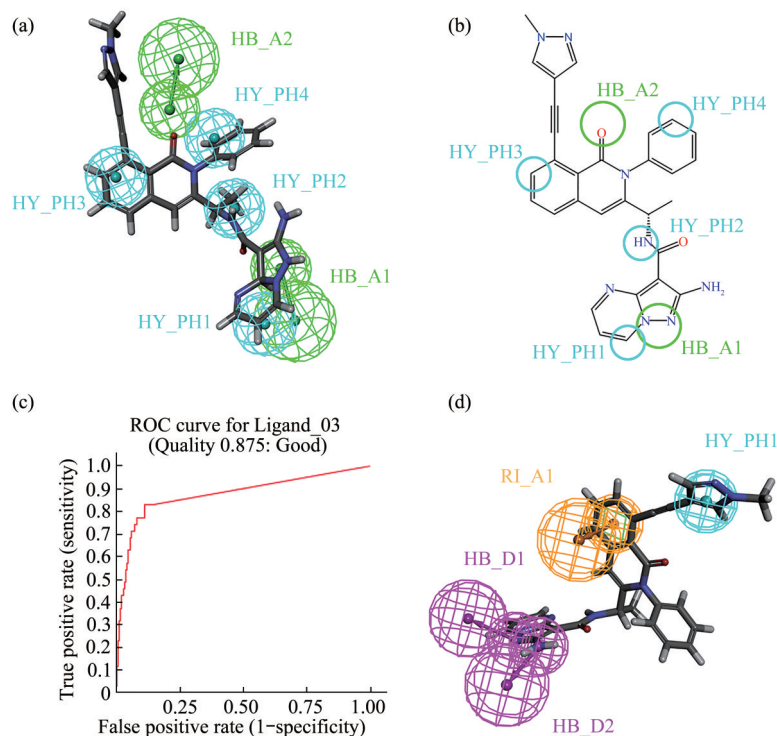


Fig. 2 Assessment of pharmacophore models

(a) 3D presentation of alignment of IPI-549 and HipHop_01 pharmacophore; (b) 2D presentation of alignment of IPI-549 and HipHop_01 pharmacophore; (c) ROC curve of pharmacophore_03 model; (d) alignment of pharmacophore_03 and IPI-549.

2.3 受体-配体复合物药效团模型分析

利用 IPI-549/PI3K γ 复合物晶体结构产生了 10 个药效团模型，其结果汇总于表 2。其中，1 号及 2 号药效团具有较高的选择性分数（selective score），为 9.777。两者分别产生了 5 个药效团特征：1 号含有 2 个氢键供体特征（D），2 个疏水特征（H）及

1 个芳香环中心特征（R）；2 号含有 2 个氢键供体特征（D）及 3 个疏水特征（H）。其余药效团均含有 4 个药效团特征，且基本都包含氢键供体特征（D）及疏水特征（H），表明疏水及氢键为 PI3K γ 与小分子结合的重要相互作用。

Table 2 Results of receptor–ligand pharmacophore models

Pharmacophore	Number of feature	Feature set ¹⁾	Selectivity score
Pharmacophore_01	5	DDHHR	9.777
Pharmacophore_02	5	DDHHH	9.777
Pharmacophore_03	4	DDHR	8.263
Pharmacophore_04	4	DDHH	8.263
Pharmacophore_05	4	DDHR	8.263
Pharmacophore_06	4	DDHH	8.263
Pharmacophore_07	4	DDHH	8.263
Pharmacophore_08	4	DHHR	7.349
Pharmacophore_09	4	DHHH	7.349
Pharmacophore_10	4	DHHR	7.349

¹⁾ D, donor of H-bond; H, hydrophobic; R, Ring aromatic.

选择性分数通过模型命中DS3.5软件内置化合物库中的 drug-like 分子数来进行评分,因而无法准确验证药效团模型对PI3K γ 抑制剂的筛选能力。因此,为了进一步考察模型区分抑制剂与非抑制剂的真实能力,使用活性化合物及非活性化合物数据集对模型进行验证(表3)。其中, Sensitivity (SE) 代表敏感度,表明模型预测活性化合物的准确性; Specificity (SP) 代表特异性,表明模型预测非活性化合物的准确性,两者数值越接近于1表示模型具有较准确的预测能力。从表3可以看出,生成的10个模型SE和SP值具有显著差距:1号及2号药效团尽管拥有较高的SP值,但是其SE值偏低,原因是这两个模型的TP值较低,表明模型不能有效预测出真实的PI3K γ 活性抑制剂;8~10号药效团均含有较高的SE值,但其SP值较低,原因是其TN值较低,表明这些模型无法区分出非活性化合物;3号及4号药效团具有相对较高的SE及SP值,表明这两个模型可以较为准确的区分PI3K γ 抑制剂及

非抑制剂。为了对各模型的区分能力进行全面的评估,计算了各模型的AUC值(表3),一般认为AUC>0.7,代表模型具有较好的预测能力。其中,3号模型的AUC值得分最高,为0.875(图2c),显示较高的预测能力,因此选择3号模型进行进一步分析。根据表2看出该模型共含有4个药效团特征:2个氢键供体(D),1个疏水中心(H),1个芳香环中心(R)。将该模型与IPI-549结构进行叠合分析(图2d),发现共轭结构连接的碳原子处具有疏水作用(蓝色),表明PI3K γ 蛋白在此处具有显著的疏水性。IPI-549的母核喹唑酮结构处对应了芳香环中心特征(黄色),这个母核结构类似于ATP的嘌呤结构,对抑制剂与PI3K γ 的结合发挥重要作用^[32]。第三个特征对应于氨基吡啶嘧啶基团,为氢键供体特征(紫色),表明PI3K γ 在此处易与抑制剂产生氢键相互作用,这个结果与上述HipHop结果吻合。上述结果表明,氢键及疏水是PI3K γ 蛋白与小分子结合的关键药效特征。

Table 3 Predicted results of receptor-ligand pharmacophore models

Pharmacophore	Total actives	Total inactives	True positives	True negatives	False positives	False negatives	Sensitivity	Specificity	AUC
Pharmacophore_01	35	850	10	772	78	25	0.286	0.908	0.603
Pharmacophore_02	35	850	12	748	102	23	0.346	0.880	0.618
Pharmacophore_03	35	850	29	727	123	6	0.829	0.855	0.875
Pharmacophore_04	35	850	27	670	180	8	0.771	0.788	0.807
Pharmacophore_05	35	850	24	460	390	11	0.686	0.541	0.699
Pharmacophore_06	35	850	18	561	289	17	0.514	0.660	0.615
Pharmacophore_07	35	850	28	317	533	7	0.800	0.373	0.658
Pharmacophore_08	35	850	31	141	709	4	0.886	0.166	0.533
Pharmacophore_09	35	850	31	105	745	4	0.886	0.124	0.542
Pharmacophore_10	35	850	29	772	675	6	0.829	0.206	0.541

2.4 分子动力学模拟结果分析

为了深入分析IPI-549与PI3K γ 的动态结合过程并进一步揭示两者的相互作用机制,将IPI-549/PI3K γ 复合物进行了200 ns动力学模拟。首先,计算了整个模拟过程中PI3K γ 蛋白主链C原子及IPI-549结构的均方根偏差值(RMSD)及主链C原子的均方根涨落(RMSF)。图S1a显示,在体系经过100 ns后,RMSD基本没有显著波动,表明体系经100 ns模拟后已达到平衡。图S1b显示,在ATP结合口袋位置处(氨基酸编号560~720),C原子波动较小,表示IPI-549与PI3K γ 蛋白ATP结合口袋的氨基酸发生紧密的结合。图3a显示了IPI-549与PI3K γ 活性口袋结合情况,可以发现IPI-549中吡唑

环中的氮原子和氨基上的氮原子与Val882形成关键的氢键相互作用,这个结果与上述药效团结果对应,说明这个氢键作用在PI3K γ 与抑制剂结合的过程中发挥重要作用。此外,图3b显示IPI-549的甲基吡啶基团与母核结构喹唑酮基本呈垂直状态,这个构象进一步稳定了氢键作用。同时甲基吡啶基团由于较长的炔基结构,使其深入PI3K γ 蛋白的“选择性口袋”(图3b),从而进一步增加抑制剂的PI3K γ 选择性。除了这些作用,IPI-549中的两个苯环与TRP812和THR887形成显著的 π - π 相互作用,进一步增加了抑制剂与蛋白的结合(图3a)。为了进一步定量分析这些相互作用,本文计算了复合物结合过程中重要氨基酸与IPI-549的结合作用力。

如图 3c 所示, 纵坐标使用 “Interaction Fraction” 表示, 即配体与氨基酸残基非键相互作用力持续时间占总作用时间的比例。若分数大于 1, 表示配体与该氨基酸残基可能同时具备多个复合作用力。可以看出, Val882 的氢键作用发挥了最大的能量贡

献。此外, 疏水相互作用也发挥了重要作用, 如 Met804、Trp812、Ile963 等, 这个结果与上述药效团结果吻合, 也进一步证明了疏水及氢键作用在 PI3K γ 选择性结合中发挥了重要作用。

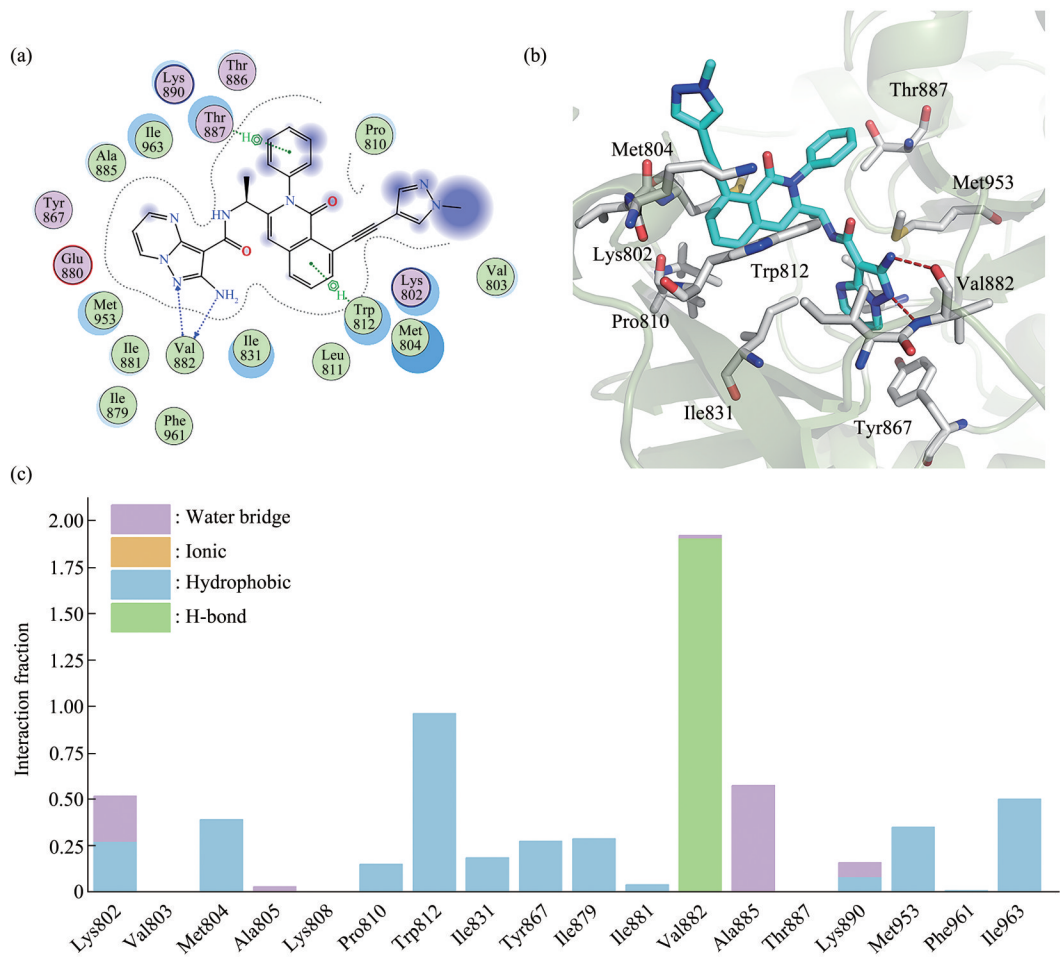


Fig. 3 Molecular dynamics simulation of IPI-549/PI3K γ complex

(a) 2D presentation of interactions between PI3K γ and IPI-549; (b) 3D presentation of interactions between PI3K γ and IPI-549; (c) interaction fractions of PI3K γ /IPI-549 complex.

3 结 论

哮喘、神经退行性疾病、心血管慢性疾病等通常伴随着不同程度的炎症反应, 大量研究已经表明 PI3K 相关信号通路与免疫细胞的生存和功能实现具有密切关系。随着 PI3K 各亚型生物功能研究的深入, 发现 PI3K γ 在免疫系统中起着重要且独特的作用, 从而揭示了 PI3K γ 潜在的炎症治疗成靶性。但是, 目前鲜有 PI3K γ 抑制剂用于炎症治疗的研究, 从而缺乏 PI3K γ 炎症治疗研究的工具药物。

IPI-549 是现已进入临床研究的 PI3K γ 抑制剂, 其具有活性强、选择性高的特点。但是其研究主要集中于肿瘤治疗, 目前尚没有抗炎作用的评价。因此, 本文采用 IPI-549 进行其抗炎作用的初步评价。炎症细胞模型体外实验表明, IPI-549 没有明显的细胞毒性, IPI-549 可以浓度依赖性地抑制炎症细胞中 PI3K 信号通路, 从而有效地抑制 LPS 诱导的巨噬细胞中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的释放。上述实验表明, IPI-549 可以通过抑制炎症细胞中 PI3K 信号通路来抑制炎症因子的释放, 从而初步

验证了 PI3K γ 抑制剂在炎症治疗方面的潜在作用, 也证明了 IPI-549 可以作为 PI3K γ 抑制剂炎症治疗的有效工具药物。

随后使用计算机模拟技术对 IPI-549 的 PI3K γ 选择性机制进行进一步研究。通过分别构建基于 PI3K γ 小分子抑制剂及 PI3K γ 蛋白大分子的药效团, 发现疏水及氢键作用在抑制剂与 PI3K γ 结合过程中发挥主要作用。动力学模拟的结果进一步验证了药效团特征: Val882 产生的氢键作用保证了抑制剂与 PI3K γ 的高效结合; Met804、Trp812、Ile963 等关键氨基酸提供了显著的疏水作用; IPI-549 的甲基吡唑基团可以进一步深入 PI3K γ 的“选择性口袋”位置, 从而进一步提高 IPI-549 的 PI3K γ 选择性。上述构效关系研究可以为新型 PI3K γ 抑制剂的开发提供一定的指导作用。

附件 见本文网络版 (<http://www.pibb.ac.cn> 或 <http://www.cnki.net>):

PIBB_20220529_Figure S1.pdf

PIBB_20220529_Table S1.pdf

PIBB_20220529_Table S2.pdf

参 考 文 献

- [1] Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 2008, **454**(7203): 428-435
- [2] Krishnamoorthy S, Honn K V. Inflammation and disease progression. *Cancer Metastasis Rev*, 2006, **25**(3): 481-491
- [3] Stark A K, Sriskantharajah S, Hessel E M, *et al.* PI3K inhibitors in inflammation, autoimmunity and cancer. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, **23**: 82-91
- [4] Saravia J, Raynor J L, Chapman N M, *et al.* Signaling networks in immunometabolism. *Cell Res*, 2020, **30**(4): 328-342
- [5] Zhu J Y, Li K, Xu L, *et al.* Insight into the selective mechanism of phosphoinositide 3-kinase gamma with benzothiazole and thiazolopiperidine gamma-specific inhibitors by in silico approaches. *Chem Biol Drug Des*, 2019, **93**(5): 818-831
- [6] Zhu J, Hou T, Mao X. Discovery of selective phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors to treat hematological malignancies. *Drug Discov Today*, 2015, **20**(8): 988-994
- [7] Zhu J, Li K, Yu L, *et al.* Targeting phosphatidylinositol 3-kinase gamma (PI3Kgamma): discovery and development of its selective inhibitors. *Med Res Rev*, 2021, **41**(3): 1599-1621
- [8] Zhu J Y, Zhang H, Yu L, *et al.* Computational investigation of the selectivity mechanisms of PI3K delta inhibition with marketed idelalisib: combined molecular dynamics simulation and free energy calculation. *Struct Chem*, 2021, **32**(2): 699-707
- [9] Hirsch E, Katanaev V L, Garlanda C, *et al.* Central role for g protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*, 2000, **287**(5455): 1049-1053
- [10] Fruman D A, Chiu H, Hopkins B D, *et al.* The PI3K pathway in human disease. *Cell*, 2017, **170**(4): 605-635
- [11] Hawkins P T, Stephens L R. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1851**(6): 882-897
- [12] Rathinaswamy M K, Gaieb Z, Fleming K D, *et al.* Disease-related mutations in PI3Kgamma disrupt regulatory C-terminal dynamics and reveal a path to selective inhibitors. *Elife*, 2021, **10**: e64691
- [13] Sala V, Della Sala A, Ghigo A, *et al.* Roles of phosphatidylinositol 3 kinase gamma (PI3Kgamma) in respiratory diseases. *Cell Stress*, 2021, **5**(4): 40-51
- [14] Vanhaesebroeck B, Perry M W D, Brown J R, *et al.* PI3K inhibitors are finally coming of age. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, **20**(10): 741-769
- [15] Thomas M, Edwards M J, Sawicka E, *et al.* Essential role of phosphoinositide 3-kinase gamma in eosinophil chemotaxis within acute pulmonary inflammation. *Immunology*, 2009, **126**(3): 413-422
- [16] Qiu X, Tian Y, Liang Z, *et al.* Recent discovery of phosphoinositide 3-kinase gamma inhibitors for the treatment of immune diseases and cancers. *Future Med Chem*, 2019, **11**(16): 2151-2169
- [17] Lanahan S M, Wymann M P, Lucas C L. The role of PI3Kgamma in the immune system: new insights and translational implications. *Nat Rev Immunol*, 2022, **22**(22): 687-700
- [18] Zhu J, Li K, Xu L, *et al.* Discovery of novel selective PI3Kgamma inhibitors through combining machine learning-based virtual screening with multiple protein structures and bio-evaluation. *J Adv Res*, 2022, **36**: 1-13
- [19] Jia L, Wang L, Jiang Y, *et al.* Exploring PI3Kgamma binding preference with Eganelisib, Duvelisib, and Idelalisib via energetic, pharmacophore and dissociation pathway analyses. *Comput Biol Med*, 2022, **147**: 105642
- [20] Lanahan S M, Wymann M P, Lucas C L. The role of PI3Kgamma in the immune system: new insights and translational implications. *Nat Rev Immunol*, 2022, **22**(11): 687-700
- [21] Garces A E, Stocks M J. Class 1 PI3K clinical candidates and recent inhibitor design strategies: a medicinal chemistry perspective. *J Med Chem*, 2019, **62**(10): 4815-4850
- [22] Zhu J Y, Jiang Y M, Jia L, *et al.* A multi-conformational virtual screening approach based on machine learning targeting PI3K gamma. *Mol Divers*, 2021, **25**(3): 1271-1282
- [23] Ruckle T, Schwarz M K, Rommel C. PI3Kgamma inhibition: towards an ‘aspirin of the 21st century’?. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, **5**(11): 903-918
- [24] Drew S L, Thomas-Tran R, Beatty J W, *et al.* Discovery of potent and selective PI3Kgamma inhibitors. *J Med Chem*, 2020, **63**(19): 11235-11257
- [25] Zhu J, Wu Y, Wang M, *et al.* Integrating machine learning-based virtual screening with multiple protein structures and bio-assay evaluation for discovery of novel GSK3beta inhibitors. *Front Pharmacol*, 2020, **11**: 566058
- [26] Robustelli P, Piana S, Shaw D E. Developing a molecular

- dynamics force field for both folded and disordered protein states. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, **115**(21): e4758-e4766
- [27] Shivakumar D, Williams J, Wu Y J, *et al.* Prediction of absolute solvation free energies using molecular dynamics free energy perturbation and the oplis force field. J Chem Theory Comput, 2010, **6**(5): 1509-1519
- [28] Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, *et al.* Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol, 2018, **233**(9): 6425-6440
- [29] Xiong W, Jia L, Liang J, *et al.* Investigation into the anti-airway inflammatory role of the PI3K γ inhibitor JN-PK1: an *in vitro* and *in vivo* study. Int Immunopharmacol, 2022, **111**: 109102
- [30] Zhu J Y, Jia L, Jiang Y M, *et al.* Integrated molecular modeling techniques to reveal selective mechanisms of inhibitors to PI3K δ with marketed Idelalisib. Chem Biol Drug Des, 2021, **97**(6): 1158-1169
- [31] Evans C A, Liu T, Lescarbeau A, *et al.* Discovery of a selective phosphoinositide-3-kinase (PI3K)- γ inhibitor (IPI-549) as an immuno-oncology clinical candidate. ACS Med Chem Lett, 2016, **7**(9): 862-867
- [32] Elmenier F M, Lasheen D S, Abouzid K A M. Phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) inhibitors as new weapon to combat cancer. Eur J Med Chem, 2019, **183**: 111718

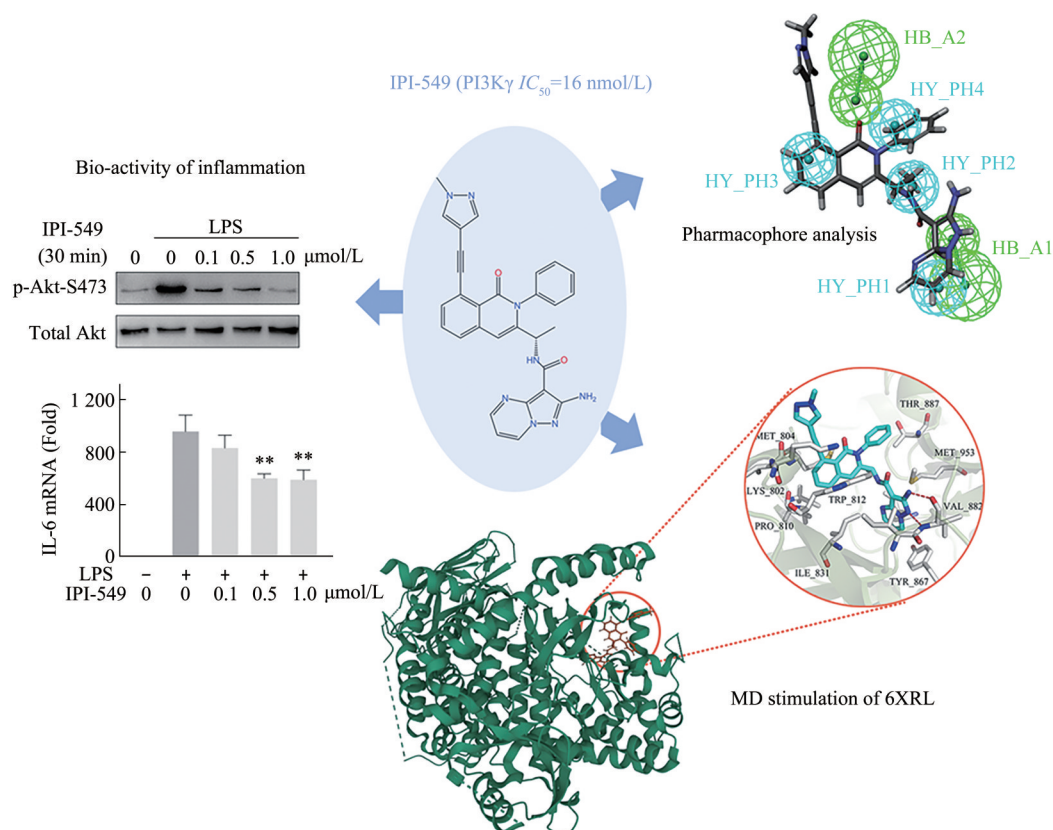
Investigation Into The Anti-inflammation and PI3K γ Inhibitory Preference of Eganelisib*

XIONG Wen-Dian^{1,2)**}, JIA Lei^{1,2)**}, CAI Yan-Fei¹⁾, CHEN Yun¹⁾, JIN Jian^{1)***}, ZHU Jing-Yu^{1)***}

⁽¹⁾School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

⁽²⁾School of Chemical & Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (21807049) and the University-Industry Cooperation Research Project in Jiangsu (BY2020432).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

JIN Jian. Tel: 86-510-85918219, E-mail: jianjin@jiangnan.edu.cn

ZHU Jing-Yu. Tel: 86-510-85918219, E-mail: jingyuzhu@jiangnan.edu.cn

Received: November 12, 2022 Accepted: January 11, 2023

Abstract Objective Phosphatidylinositol 3-kinase gamma (PI3K γ) plays a critical role in the immune system, thus identifying PI3K γ as a potential therapeutic target for inflammation. However, there are few reports of selective PI3K γ inhibitors being used in the field of anti-inflammation thus far, therefore, great efforts would be needed to study the anti-inflammatory effect of PI3K γ inhibitors. In the present study, Eganelisib, the PI3K γ inhibitor in clinical studies, was chosen to investigate the anti-inflammation and PI3K γ inhibitory preference. **Methods** Firstly, lipopolysaccharide (LPS)-induced RAW264.7 macrophage was used as *in vitro* inflammation model to estimate the anti-inflammation of Eganelisib. Then, a modeling strategy integrated common feature pharmacophore, receptor-ligand pharmacophore, and molecular dynamics simulation was employed to reveal the γ -selective mechanism of Eganelisib. **Results** Eganelisib treatment could downregulate the production of inflammatory mediators by suppressing the PI3K signaling pathway. The common feature and receptor-ligand pharmacophore models found that the hydrogen bond and hydrophobic features play key roles in the interaction between Eganelisib and PI3K γ protein. Several key residues such as Val882, Met804, Trp812, and Ile963 contributing to favorable PI3K γ binding were highlighted in molecular dynamics simulation. **Conclusion** Our findings provide the initial anti-inflammatory effect of Eganelisib, and reveal the mechanism of selective binding between inhibitors and PI3K γ , which may provide some guidelines for the development of anti-inflammatory PI3K γ inhibitors.

Key words PI3K γ inhibitor, Eganelisib (IPI-549), inflammation, pharmacophore, molecular dynamic simulation

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0529