

氮唑类抗真菌药物药效构象及其与酶活性位点对接

季海涛, 张万年*, 周有骏, 朱杰, 朱驹, 吕加国

(第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 目的: 研究氮唑类抗真菌药物与其受体蛋白活性位点相互作用机理。方法: 用随机构象搜寻和分子动力学模拟退火法确定 15 个 4 种不同类型的氮唑类抗真菌药物最低能量构象; 用活性类似物法限定药物分子药效基团之间的距离, 搜寻到各化合物药效构象; 将各化合物药效构象对接到白色念珠菌羊毛甾醇 14 α 去甲基化酶活性位点中。结果: 4 种结构类型的氮唑类药物在酶活性位点中有相似的对接位置; 真菌和哺乳动物的活性位点结构特异性的残基分布在 F 螺旋 C 端 β 6-1 和 β 6-2 区中; 氮唑类抗真菌药物共同的卤代芳环结构落入相同的疏水空穴中, 其中 Y132 的侧链羟苯基结构可与抑制剂卤代芳环形成电子迁移复合物。结论: 对接结果与已知 SAR 分析结论相符, 阐明了氮唑类药物与活性位点的氨基酸残基作用方式, 探讨结构选择性药物的结构需求。

关键词 羊毛甾醇 14 α 去甲基化酶; 氮唑类抗真菌药物; 药效构象; 对接; 白色念珠菌

氮唑类抗真菌药物中的酮康唑等芳乙基氮唑环状缩酮类化合物是治疗浅部真菌感染的首选药物, 氟康唑等芳乙基氮唑醇类化合物是治疗深部真菌感染的首选药物。氮唑类药物的作用机理是通过竞争性抑制真菌羊毛甾醇 14 α 去甲基化酶 (P450_{14DM}, P450₅₁), 使羊毛甾醇蓄积, 细胞膜结构功能组成成分麦角甾醇生物合成缺乏而起药效作用。羊毛甾醇 14 α 去甲基化酶是微粒体型细胞色素 P450 超家族蛋白, 也是唯一被发现普遍存在于高等植物、真菌和哺乳动物体内的 P450 蛋白。目前已从小麦^[1]、啤酒酵母^[2]、白色念珠菌^[3]、热带念珠菌^[4]、大鼠^[5]和人肝微粒体中^[6]克隆出 P450₅₁ 基因并测序分析。但作为真核微粒体 P450 蛋白由于和内质网膜结合, 难以制备单晶, 在目前研究条件下还无法测出其晶体结构。

前文^[7]用 4 个原核 P450 晶体结构 P450BM3, P450cam, P450terp 和 P450eryF 三维结构坐标同源蛋白模建了白色念珠菌羊毛甾醇 14 α 去甲基化酶, 并阐述了与血红素辅基作用残基, 与电子供体作用和参与电子传递残基, 底物进出通道残基和活性位点残基。为进一步揭示氮唑类抗真菌药作用机理, 探索解决该类药目前普遍存在的选择性作用差, 毒副作用大, 抗菌谱窄等缺点, 本文搜寻氮唑类药物的药效构象并与酶活性位点对接 (Docking) 研究。

材料与 方法

分子模建、构象分析和对接研究是在 Silicon Graphics Iris Indigo II R4400 图形工作站上, 用 Tripos 公司 SYBYL 6.2 软件包完成。计算中选用的各项参数除特别指明外, 都用缺省值。

1 构象分析

构象分析用 15 个高效代表性的氮唑类抗真菌化合物 (图 1)。除化合物 2 外, 其余都是上市或处于临床、临床前研究的药物。其中, 有晶体结构的直接以晶体结构为基础构建化合物, 没有晶体结构的采用 SYBYL 分子片段库中片段构建化合物, 用能量优化法, 能量收敛标准为 $1 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{Å}^{-1}$ 。

1.1 全局最低能量构象

各化合物进行随机构象搜寻, 搜寻到的最低能量构象再以分子动力学模拟退火反复操作, 参数设置: 升温到 1 000 K, 平台处理时间 1.0 ps, 退火至 250 K, 退火时间 1.5 ps, 指数型退火函数。Tripos 标准分子力场, Gasteiger-Hückel 电荷。每次 50 个循环得 50 个构象并能量优化, 找出能量最低的构象作为下一步的起始构象。如此反复操作, 以重复出现 5 次以上的最低能量构象作为全局最低能量构象。

1.2 药效构象搜寻

药效构象搜寻首先针对化合物 8 ~ 15。据报道^[8], 图 1 中所有化合物的三氮唑环 N4 或咪唑环 N3 共同的 2 位芳环是药效基团。化合物 8 ~ 15 的 3 位碳原子均为 R 构型时化合物才有抗真菌活性, 2 位碳的氧原子是共同结构特征, 对药效也有一定的

收稿日期: 1998-05-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39770876, 39470830) 和军队“九五”重点课题 (962030)

* 联系人 Tel: (021) 25070321, Fax: (021) 65490641,

E-mail: caddk@online.sh.cn

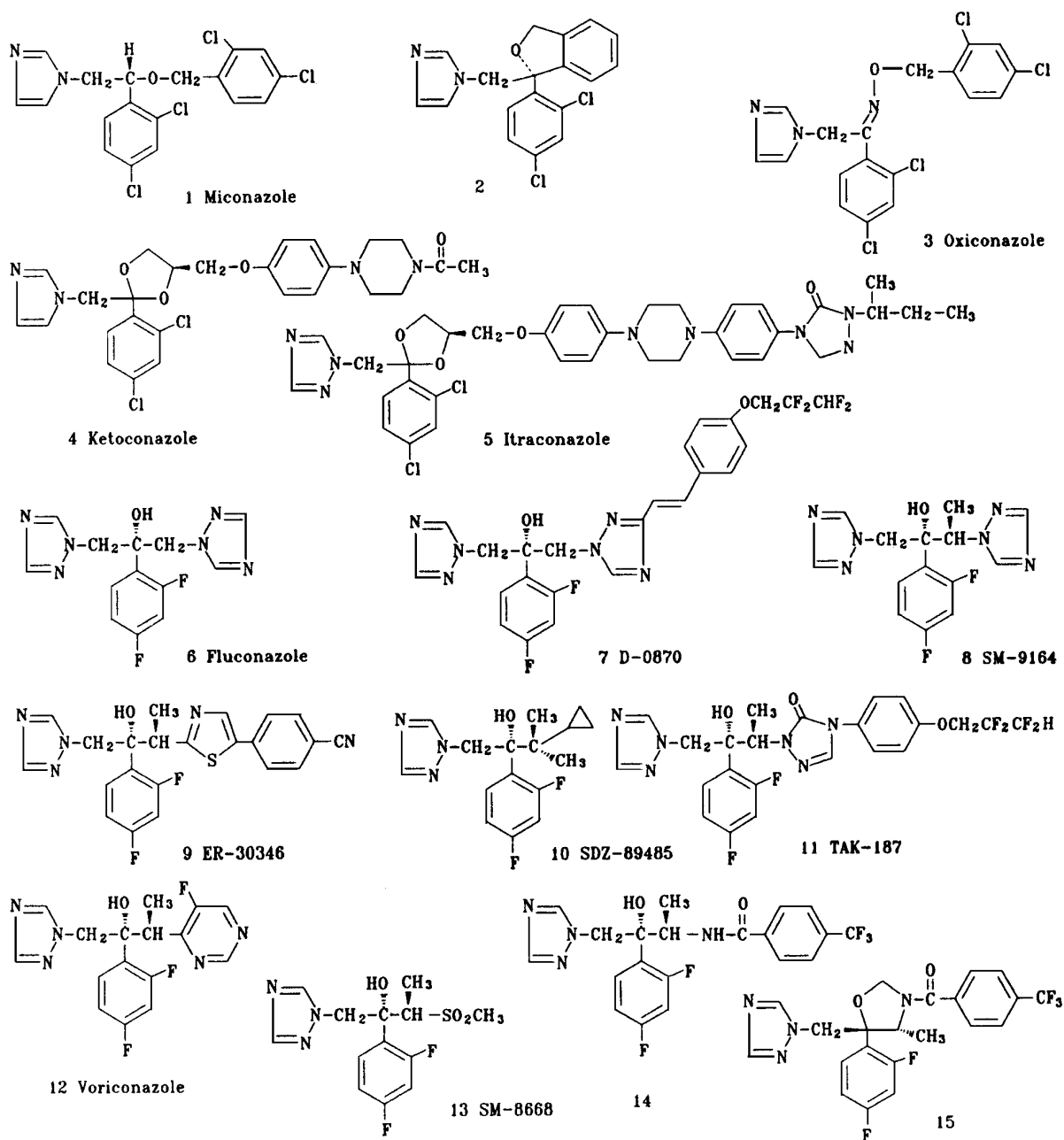


Fig 1 Structures of azole antifungals used in conformation analysis.

贡献。因此以氮唑环 N4 或 N3、芳环质心、2 位氧原子、3 位甲基碳原子作为药效必需点(图 2A), 距离限制系统构象搜寻。参数设置: 以 τ_1 - τ_6 为可旋转键, 旋转增量为 10° , 旋转幅度 $0^\circ \sim 359^\circ$, 锚原子为氮唑环 1 位氮原子, 所有构象从 0° 开始搜寻。Map Grid 为 0.2 Å。距离限制结果反过来分别过滤前面各化合物构象, 使每个化合物构象数目更少(表 1)。选择各化合物过滤后所得 100 个能量最低构象, 能量优化同时以药效点距离限定监控, 选择其中能量

最低构象为药效构象。化合物 1, 2, 4 ~ 7 由于没有 3 位手性碳原子, 因此以上面研究 D1, D2, D3 之间距离限定结果(表 1) 分别限定各化合物 3 个药效点(图 2B) 的距离, 系统构象搜寻, 以 $\tau_1 \sim \tau_4$ 为可旋转键, 参数设置同上, 得各化合物结果构象, 酮康唑则对分子动力学模拟退火结果以上述药效点距离限定, 得符合条件的能量最低构象作为药效构象。

以上所得各化合物药效构象, 用 MOPAC 6.0 中 AM1 方法计算 MOPAC 电荷。

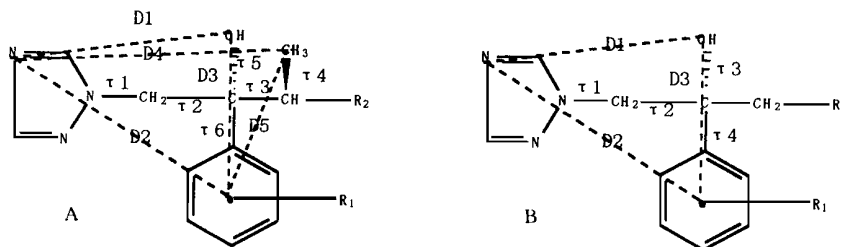


Fig 2 Proposed pharmacophore model , rotated bonds , and distance mapping patterns for azole antifungals .

Tab 1 Conformations in the systematic search and results of distance mapping

No.	Systematic Search	Systematic Search - distance map	After filter	No.	Systematic Search - distance constraints	Result of distance mapping (A)
15	2690	2690	539	1	188133	D1 :4 .104 - 4 .872
10	11269	2467	1089	2	157	D2 :4 .016 - 4 .575
13	30427	10603	10038	4	184	D3 :6 .545 - 6 .934
14	48856	18506	16587	5	200	D4 :3 .165 - 3 .678
8	67291	9673	8029	6	6323	D5 :3 .810 - 3 .887
12	74792	4620	3036	7	6070	
9	105293	5931	5931			
11	108159	8469	8469			

2 药效构象与酶活性位点对接

氮唑类抗真菌药都是通过氮唑 N3 或 N4 与血红素铁原子配位,抑制底物羊毛甾醇的结合^[9,10]。因此本文对接研究时保持 Fe—N 之间距离为 2.043 Å,设定 Fe—N 键为可旋转键,旋转步长为 5°,共得 72 个配体在受体蛋白活性位点中取向。对每种取向以 SYBYL/Interactive docking 评估配体与受体活性位点相互作用能,选择相互作用能最低的位置作为对接结果。取各化合物对接结果,以抑制剂向周围伸展 8 Å 范围内残基为酶活性位点,加和各化合物活性位点作为总酶-抑制剂复合物活性位点空间。对接结果能量优化,参数设置:Tripos 标准分子力场,最陡下降法能量优化法,蛋白质残基采用 Kollman 全原子电荷,血红素辅基电荷采用 Paulsen 和 Ornstein 的定义^[11],抑制剂采用 MOPAC 电荷,

配体和血红素辅基定义成集合,在能量优化过程中构象不发生变化,能量收敛标准 0.1 Kcal·mol⁻¹·Å⁻¹。

结 果 和 讨 论

1 构象分析

15 个抗真菌化合物搜寻到的药效构象与分子全局最低能量构象能量相差不超过 7.5 Kcal·mol⁻¹ (表 2),符合药效构象的能量要求。其中化合物 TAK-187 搜寻到的药效构象与其晶体构象很相似。化合物 8~15 药效点距离限定的结果见表 1。各化合物以药效构象 rms Fit 叠合结果见图 3。

2 对接结果分析

对接结果表明各化合物在酶活性部位中有相似的对接位置。与抑制剂相互作用的蛋白残基分布基

Tab 2 Energy differences between the active conformer energy^a and the global minimum energy^b, binding energy of compounds with active site of target enzyme

No.	E ₁ ^b	E ₂ ^a	ΔE	E _{binding}	No.	E1	E2	ΔE	E _{binding}
1	18.824	22.516	3.692	-26.223	9	26.387	26.400	0.013	-31.158
2	32.985	33.133	0.148	-15.763	10	126.255	127.946	1.191	-12.930
3	20.250	20.838	0.588	-11.647	11	34.910	37.676	2.766	-20.960
4	26.562	33.660	7.098	-33.737	12	18.130	18.324	0.194	-18.658
5	40.760	44.124	3.364	-42.362	13	15.879	15.879	0	-13.711
6	40.677	41.541	0.864	-10.731	14	20.167	21.901	1.734	-27.409
7	45.347	47.722	2.365	-16.847	15	28.009	29.151	1.142	-18.658
8	40.803	40.875	0.072	-13.866					

E₁: The global minimum energy; E₂: The active conformer energy; ΔE: Energy difference between E₂ and E₁; E_{binding}: Binding energy of compound with active site of target enzyme.

本相同。图 4 是氟康唑和伊曲康唑对接图,受体蛋白活性位点以抑制剂为中心向四周伸展 4 Å 范围内的残基。从图中可见化合物与相同活性位点残基作用。表 2 中给出 15 个抑制剂与酶活性位点结合能 ($E_{\text{binding}} = E_{\text{complex}} - (E_{\text{ligand}} + E_{\text{enzyme}})$)。36 个氟康唑的类似物对接到酶活性位点后以其抑制白色念珠菌生长的生物活性值的负对数 ($-\log IC_{50}$)^[12] 与 E_{binding} 进行回归得回归方程(表 3):

$$-\log IC_{50} = 5.834 - 0.211 \times E_{\text{binding}}$$

$$r = 0.893, F = 134.296, S = 0.378, P < 0.001$$

氮唑类抗真菌药物共同的卤代芳环结构落入相同的疏水空穴中,由残基 V125, Y132, C134, L224,

L300, G303, I304, M306, G307 组成(图 4)。该疏水空穴在芳环 2,6 位存在立体位阻,4 位有较大的空穴。因此抗真菌化合物芳环的 2 位不能接大于 Cl 原子的立体基团,而芳环 4 位有足够大的空间可以再接另一个 4-氯苯氧基,这些对接结果和 SAR 分析结论相符合。该疏水空穴中 Y132 的侧链羟苯基结构要求氮唑类化合物在该位置结构平坦,从对接结果来看,该羟苯基可与抑制剂卤代芳环形成电子迁移复合物。15 个氮唑类化合物侧链结构变化很大,伊曲康唑、酮康唑、TAK-187, D-0870 的侧链很长,而氟康唑、S-M8668, SDZ-89485, 咪康唑等侧链很短,但都具有很好的药效,以对接模型分析发现具有长侧链结构化合物,侧链超出酶活性位点,伸入底物进出通道并与通道中残基作用(图 4B)。

酶活性位点与氮唑类化合物作用距离配体 6 Å 范围内的残基见图 5。和 CYP450 51 蛋白代谢底物羊毛甾醇的活性位点残基分布相同,包括组成活性位点底部的 I 螺旋、Meander1 区、β6-1 区,也包括组成活性位点顶部的 β6-2 区、β1-5 -B' 螺旋 N 端和 F 螺旋 C 端。真菌、哺乳动物、高等植物的 CYP51 蛋白序列多重联配结果(图 5)比较发现,真菌和哺乳动物活性位点反映结构特异性的残基分布在 F 螺旋 C 端、β6-1 和 β6-2 区中,其中残基性质差别比较大的有:白色念珠菌 CYP51 中为 K226, P230, I231, H377, V509, V510。在药物设计减轻氮唑类化合物毒副作用时应考虑这些残基的性质差别,图 6 是白色念珠菌以上 6 个活性位点功能残基的空间相对位置。

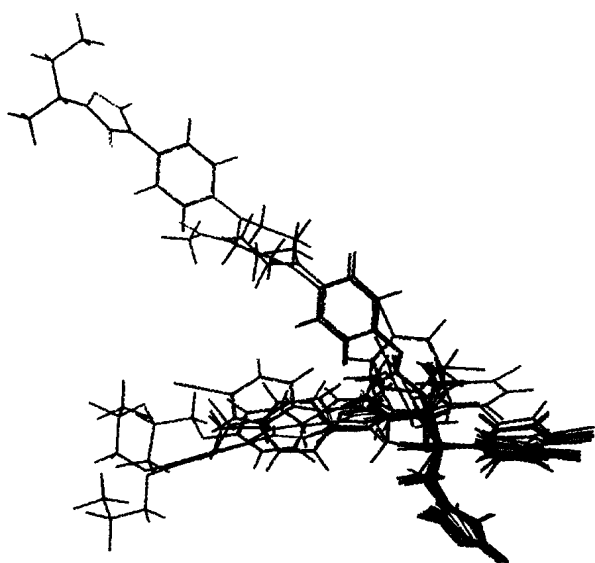


Fig 3 Stereo representation of 15 azole antifungals superimposed in pharmacophoric conformations.

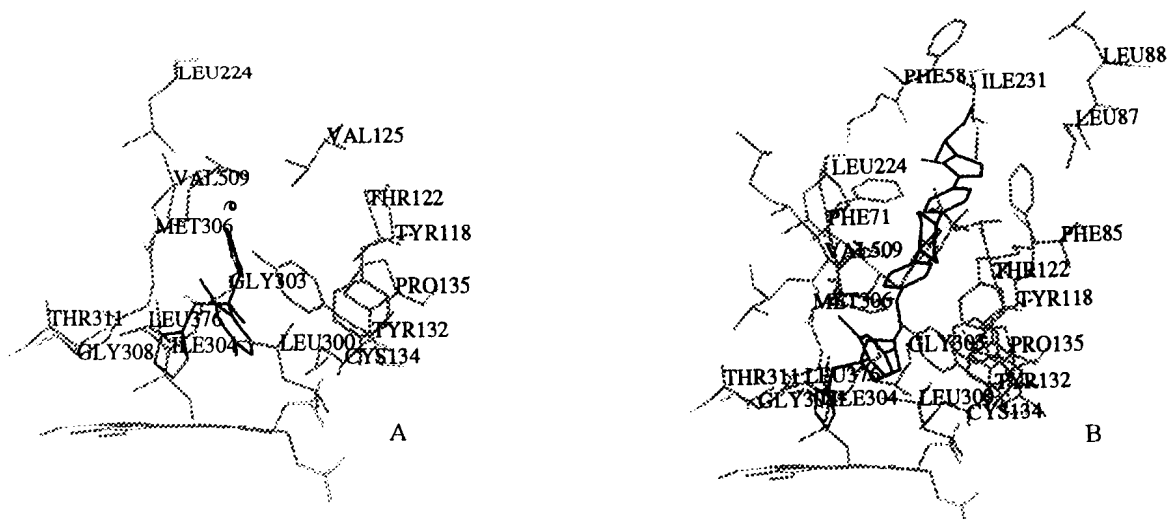
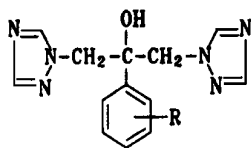


Fig 4 Stereoview of the active site of lanosterol 14α de methylase of *Candida albicans* bound with fluconazole (A) and itraconazole (B).

Tab 3 Chemical structures , antifungal activity and binding energy of triazole alcohols with active site of target enzyme



R	IC ₅₀ / × 10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹	- logIC ₅₀	E _{binding}	R	IC ₅₀ / × 10 ⁻⁹ mol·L ⁻¹	- logIC ₅₀	E _{binding}
H	103.58	6.9847	- 7.333	2OCH ₃ ,4CF ₃	28.50	7.5452	- 7.536
2CF ₃	103.45	6.9853	- 4.443	3Cl	541.39	6.2665	- 2.411
2CF ₃ ,4F	60.05	7.2215	- 9.142	3F,4CF ₃	84.19	7.0747	- 6.083
2CH ₃	95.29	7.0210	- 9.330	4CF ₃	3.25	8.4881	- 11.432
2CH ₃ ,4CN	87.40	7.0585	- 8.238	4CH ₃	13.76	7.8614	- 9.540
2CH ₃ ,4F	100.88	6.9962	- 5.004	4CH=CH ₂	22.94	7.6394	- 8.472
2Cl	3.05	8.5157	- 9.877	4Cl	3.02	8.5200	- 9.830
2Cl,4CF ₃	0.86	9.0655	- 14.859	4CN	31.49	7.5018	- 8.345
2Cl,4Cl	0.74	9.1308	- 17.485	4F	26.01	7.5849	- 8.421
2Cl,4F	3.25	8.4881	- 9.741	4OCF ₂ CF ₂ H	77.85	7.1087	- 8.877
2CN,4CF ₃	78.44	7.1055	- 7.494	4OCF ₃	0.56	9.2518	- 18.342
2,3,5,6-F	87.64	7.0573	- 6.391	4OCH ₃	268.00	6.5719	- 2.020
2F,4CF ₃	1.26	8.8996	- 12.483	4-(Oph)	2.88	8.5406	- 10.572
2F,4Cl	1.61	8.7932	- 13.994	4-Ph	13.28	7.8768	- 8.831
2F,4F	1.97	8.7055	- 10.731	4-SCH ₃	90.18	7.0449	- 6.301
2,4,6-F	35.46	7.4503	- 7.493	4-(4Cl-Ph)	7.19	8.1433	- 9.540
4-(2,4-F-Ph)	18.85	7.7247	- 9.052	4-(4Cl-Oph)	0.94	9.0269	- 13.486
2F,6F	107.41	6.9690	- 7.469	4-(4CN-Ph)	80.71	7.0931	- 7.693

	β1-5-B		Meander1		F		I		β6-1		β6-2	
	118	126	129	136	224	231	300	312	375	380	507	511
CYP51 (c.alb.)	YKHLTTPVF		GVIYDCPN		LDKGFTPI		LLIGILMGGQHTSA		PLHSIF		SMVVL	
CYP51 (c.tro.)	YTHLTTPVF		GVIYDCPN		LDKGFTPI		LLIGVLMGGQHTSA		PLHSIF		SMVTL	
CYP51 (s.cer.)	Y AHLTTPVF		GVIYDCPN		LDKGFTPI		LLIGVLMGGQHTSA		PLHSLF		SMVTL	
CYP51 (s.pom.)	YSHLTTPVF		DVVYDIPN		LDQGFSPV		MMIALLMAGQHTSA		PIHSHM		SMVAL	
CYP51 (p.ita.)	YGKLTTPVF		DVVYDCPN		LDLGFSPV		MMITLLMAGQHSSS		SIHTLM		SLFSR	
CYP51 (human)	YSRLTTPVF		GVAYDVPN		LDGGFSHA		MLIGLLLQHTSS		PIMIMM		TMIHT	
CYP51 (rat)	YGRLTTPVF		GVAYDVPN		LDGGFSHA		MLIGLLLQHTSS		PIMTMM		TMIHT	
CYP51 (t.aes.)	Y-RFNVPTF		GVVFDVDY		LDNGMLPI		LLIAALFAGQHTSS		PLIMLL		AMVVV	

Fig 5 Multiple sequence alignment of CYP51 proteins from *Candida albicans* (c.alb.), *Candida tropicalis* (c.tro.), *Saccharomyces cerevisiae* (s.cer.), *Schizosaccharomyces pombe* (s.pom.), *Penicillium italicum* (p.ita.), rat, human, *Triticum aestivum* (t.aes.). Secondary structure features are labeled.

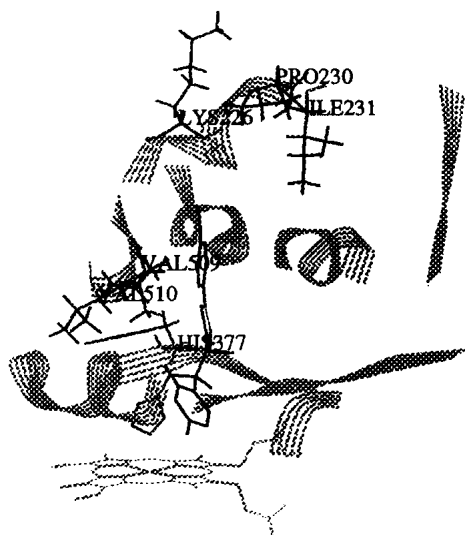


Fig 6 Stereoview of different residues of active site of lanosterol 14α de methylase of *Candida albicans* related to mammals with bound ER-30346.

参 考 文 献

- 1 Cabello-Hurtado F, Zimmerlin A, Rahier A, et al. Cloning and functional expression in yeast of cDNA coding for an obtusifolioside 14α de methylase (CYP51) in wheat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **230**: 381
- 2 Kalb VF, Woods CW, Turi TG, et al. Primary structure of the P450 lanosterol de methylase gene from *saccharomyces cerevisiae*. *DNA*, 1987, **6**: 529
- 3 Lai MH, Kirsh DR. Nucleotide sequence of cytochrome P450 LIA1 (lanosterol 14α de methylase) from *Candida albicans*. *Nucleic Acid Res*, 1989, **17**: 804
- 4 Chen C, Kalb VF, Turi TG, et al. Primary structure of the cytochrome P450 lanosterol 14α de methylase gene from *Candida tropicalis*. *DNA*, 1988, **7**: 617
- 5 Sloane DL, So O, Leung R, et al. Cloning and functional expression of the cDNA encoding rat lanosterol 14α de methylase. *Gene*, 1995, **161**: 243

- 6 Stromstedt M, Rozman D, Waterman MR. The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14 α demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **329**: 73
- 7 季海涛, 张万年, 周有骏, 等. 白色念珠菌羊毛甾醇 14 α 去甲基化酶三维结构分子模型研究. *生物化学与生物物理学报*, 1998, **30**: 583
- 8 Klopman G, Ptchelintsev D. Antifungal triazole alcohols: a comparative analysis of structure-activity, structure-teratogenicity and structure-therapeutic index relationships using the multiple computer-automated structure evaluation (Multi-CASE) methodology. *J Comput-Aided Mol Des*, 1993, **7**: 349
- 9 Yoshida Y, Aoyama Y. Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-450_{14DM} purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. *Biochem Pharmacol*, 1987, **36**: 229
- 10 Raag R, Li H, Jones BC, et al. Inhibitor-induced conformational change in cytochrome P-450_{cam}. *Biochemistry*, 1993, **32**: 4571
- 11 Paulsen MD, Ornstein RL. A 175-psec molecular dynamics simulation of camphor-bound cytochrome P-450_{cam}. *Proteins Struct Funct Genet*, 1991, **11**: 184
- 12 Flint OP, Boyle FT. Structure-teratogenicity relationships among antifungal triazoles. In: Ryley JF ed. *Chemotherapy of Fungal Diseases*. Berlin: Springer-Verlag; New York: Heidelberg, 1990. 231 ~ 248

PHARMACOPHORIC CONFORMATIONS OF AZOLE ANTIFUNGALS AND THEIR INTERACTION WITH ACTIVE SITE OF TARGET ENZYME

Ji Haitao (Ji HT), Zhang Wannian (Zhang WN), Zhou Youjun (Zhou YJ), Zhu Jie (Zhu J),
Zhu Ju (Zhu J) and Lu Jiaguo (Lu JG)

(School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

ABSTRACT **AIM:** To study the interactive mechanism of azole antifungals and functional residues of the active site of lanosterol 14 α demethylase of *Candida albicans*. **METHODS:** The global minimum-energy conformations of 15 azole antifungals which belong to 4 different structural categories were determined by random conformation search and molecular dynamics simulated annealing. Active analogue approach was employed to search for the pharmacophoric conformations of all compounds. The resulting bioactive conformations were docked into the active site of lanosterol 14 α demethylase of *Candida albicans*. **RESULTS:** All 15 azole antifungals was shown to have similar docking position in the active site. To compare with mammalian enzyme, the structurally selective residues of the active site of fungal lanosterol 14 α demethylase were distributed in C terminus of F helix, β 6-1 sheet and β 6-2 sheet. The common halogenated benzene substructure of azole inhibitors was located deep in the same hydrophobic cavity. The π ~ π charge transfer complex may exist between halogenated benzene ring of azoles and the hydroxyl benzene side chain of residue Y132 of lanosterol 14 α demethylase of *Candida albicans*. **CONCLUSION:** The dock results were in accord with SAR analysis. The interactive mode of azole antifungals with active site residues of lanosterol 14 α demethylase of *Candida albicans* was elucidated. The structural selectivity of the fungal target enzyme to its inhibitors was investigated at the same time.

KEY WORDS lanosterol 14 α demethylase; azole antifungals; pharmacophoric conformation; docking; *Candida albicans*