

· 综述 ·

抗真菌药物靶标及其抑制剂的研究进展

徐波^{1,2}, 蒋琰¹, 张万年¹, 盛春泉¹ (1 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2 上海市食品药品监督管理局崇明分局, 上海 202150)

[摘要] 目的 综述抗真菌药物靶标及其抑制剂的研究进展。方法 本文结合自身研究工作, 分析近5年文献, 总结抗真菌药物靶标及其抑制剂的最新进展。结果 β -1,3-葡聚糖合成酶、羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶、*N*-肉豆蔻酰基转移酶和分泌型天冬氨酸蛋白酶是目前研究最为集中的抗真菌药靶, 其抑制剂显示了良好的新药开发前景。结论 优化现有药物化学结构和发现全新作用机制的先导化合物, 对研发新一代抗真菌药物具有重要意义。

[关键词] 抗真菌药物靶标; β -1,3-葡聚糖合成酶; 羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶; *N*-肉豆蔻酰基转移酶; 分泌型天冬氨酸蛋白酶

[中图分类号] R914 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)05-0321-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.05.001

Progress on antifungal drug targets and inhibitors

XU Bo^{1,2}, JIANG Yan¹, ZHANG Wan-nian¹, SHENG Chun-quan¹ (1. School of Pharmacy, Second Military Medicinal University, Shanghai 200433, China; 2. Chongming Substation, Shanghai Food and Drug Administration, Shanghai 202150, China)

[Abstract] **Objective** To review recent progress of antifungal drug targets and their inhibitors. **Methods** Literatures in recent five years were analyzed in combination of the authors' own research work and recent developments of antifungal targets and inhibitors were summarized. **Results** Current research focused on lanosterol 14-demethylase, β -1,3-glucan synthase, *N*-myristoyltransferase and secreted aspartic protease. The inhibitors of these targets showed promising future for the development of new antifungal drugs. **Conclusion** Optimizing the chemical structures of current antifungal agents and discover lead compounds with novel mode of action are of great importance to develop new generation of antifungal agents.

[Key words] antifungal drug targets; lanosterol 14-demethylase; β -1,3-glucan synthase; *N*-myristoyltransferase; Secreted aspartic protease

近年来,真菌感染尤其是深部真菌感染(如侵入性白色念珠菌病,隐球菌病和曲霉菌病等)大幅上升,已成为一种严重威胁人类健康的疾病^[1,2]。这主要与免疫缺陷患者的急速增加有关,导管插管技术的普遍应用,广谱抗菌素的滥用,骨髓、器官移植和肿瘤放疗,以及艾滋病患者的增加等因素引起免疫抑制,进而导致机会性深部真菌感染的发生。目前临床上最常见的致病真菌主要有:白色念珠菌(*Candida albicans*)、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)和新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*),其中白色念珠菌和烟曲霉菌感染分别占深部真菌感染的70%~90%和10%~20%^[3]。另一方面,一些新型致病真菌(如毛霉菌属、镰孢菌属、结合菌属和足放线病菌属等)不断出现。同时,真菌对现有抗真菌药物的耐药性也在不断增

强。因而寻找新型的广谱、高效、低毒的抗真菌药物已成为研究热点,迫切需要研究者们对现有药物进行结构优化以提高抗真菌疗效,以及研制出作用于新靶点的新型抗真菌药物^[4]。

目前临床上治疗深部真菌感染的药物主要有:①三唑类,如氟康唑和伊曲康唑;②多烯类,如两性霉素B;③脂肽类,如卡泊芬净和米卡芬净;④抗代谢物类,如5-氟胞嘧啶,它经常与其他抗真菌药物联用。这四类抗真菌药物具有明确的作用机制和良好的疗效,但同时具有一定的局限性。唑类由于对细胞色素P₄₅₀酶系的抑制作用,会引起明显的药物-药物相互作用,对临床上出现的耐药菌株无效。两性霉素B的肾毒性很大,尤其是与氨基糖苷类和环孢霉素这些具有潜在肾毒性的药物联合用药时,会加大其肾毒性。脂肽类药物结构复杂,价格昂贵,而且不能口服。5-氟胞嘧啶抗菌谱相对较窄,并且也存在耐药性问题。对于深部真菌感染,现有的这些治疗手段是远远不够的。因而研究开发新型、高效、安全的抗真菌药物是临床

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30930107)。

[作者简介] 徐波(1978-),男,硕士研究生。

[通讯作者] 盛春泉。Tel:(021)81871239, E-mail:shengcq@hotmail.com.

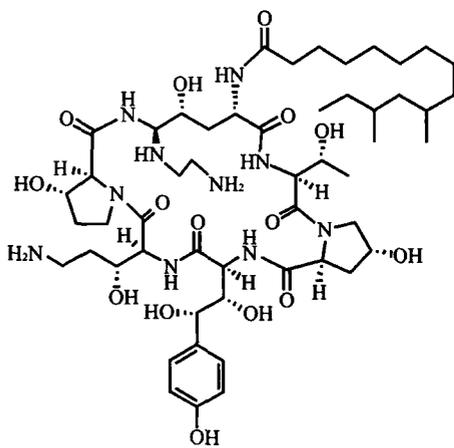
亟待解决的问题,本文就抗真菌药物作用靶点及其抑制剂的研究进展做一综述。

1 β -1,3-葡聚糖合成酶

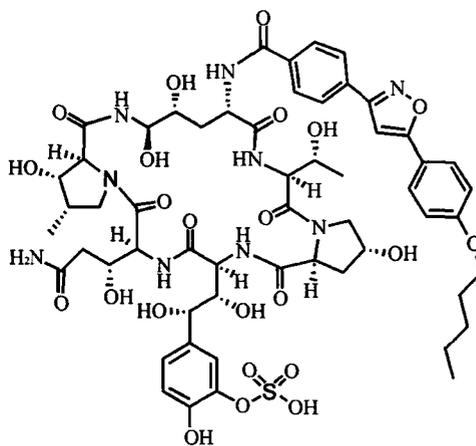
细胞壁是真核细胞区别于哺乳动物细胞的一个独特的结构特征。因此,真菌细胞壁生物合成途径中的酶系可以作为理想的高选择性靶标,具有高效低毒的特点。真菌细胞壁主要包含 3 种成分:葡聚糖(glucan)、几丁质(chitin)和甘露糖蛋白(manno-proteins),它们对于维持细胞壁的正常功能起着重要的调节作用。 β -1,3-葡聚糖合成酶(β -1,3-glucan synthase)是一种细胞膜结合酶,它催化转运尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)聚合生成葡聚糖,是真菌细胞生长中必需的酶,一旦该酶的活性受到抑制,会引起葡聚糖的合成受阻,进而导致细胞壁结构异常,细胞破裂。

目前已上市或者处于开发阶段的 β -1,3-葡聚糖合成酶抑制剂有卡泊芬净(caspofungin, 1),米卡芬

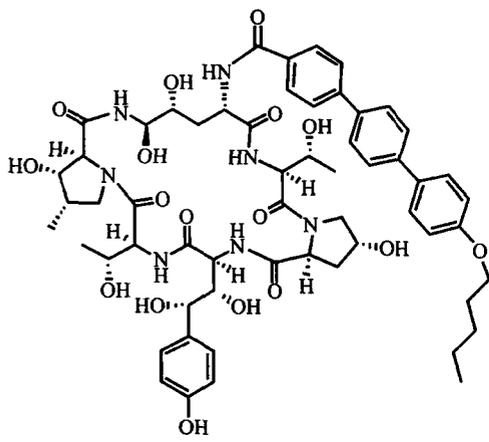
净(micafungin, 2),阿尼芬净(anidulafungin, 3),氨基康定(aminocandin, 4),它们的化学结构均属于脂肽类^[5]。另外,不同结构类型的非棘球白素类 β -1, 3-葡聚糖合成酶抑制剂正在研究中。萜苷类,如 emfufungin、ascosteroside、arundifungin 和 ergokonin A 均有一定的抗真菌活性,而且具有口服吸收的特点,因而这类药物有望在临床中得到应用^[4]。脂肽类 β -1,3 葡聚糖合成酶抑制剂的缺陷主要在于其溶解度不佳,生物利用度低,不能制成口服剂型,只能通过注射给药。而且该类药物结构复杂,价格十分昂贵。因此,寻找小分子 β -1,3 葡聚糖合成酶抑制剂代表着该领域未来的研究方向,目前已经取得一些初步进展。例如,苯并噻唑类抑制剂 5 的抑酶活性为 0.069 $\mu\text{g}/\text{ml}$,对白色念珠菌和烟曲霉菌的活性分别为 0.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[6]。2011 年,Merck 公司报道了噻嗪酮类抑制剂,化合物 6 的抑酶活性为 0.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$,并且显示了优秀的体内和体外抗真菌活性^[7,8]。



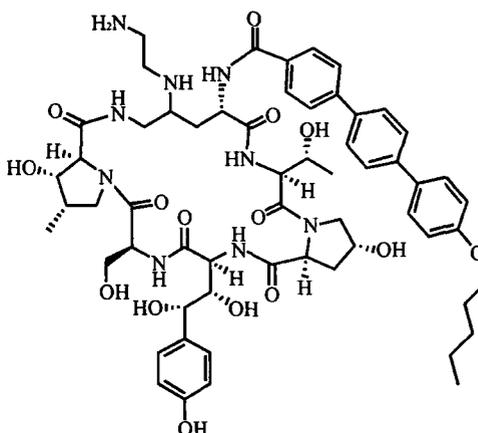
1 Caspofungin



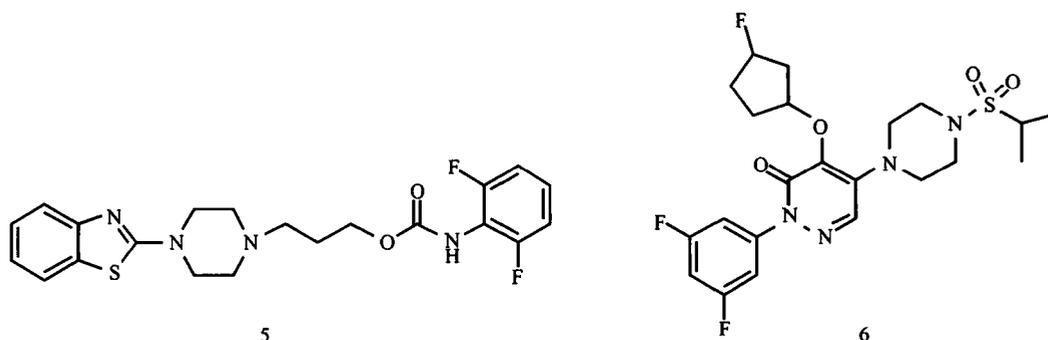
2 Micafungin



3 Anidulafungin



4 Aminocandin

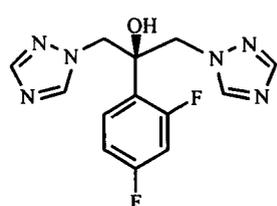


2 羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶

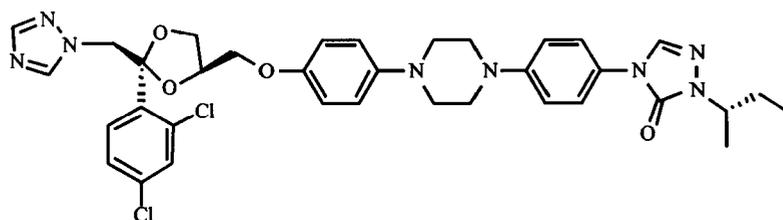
羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶 (lanosterol 14 α -demethylase, CYP1) 是真菌细胞膜生物合成中的关键酶, 它能使羊毛甾醇脱 14 α -甲基, 得到细胞膜的重要成分麦角甾醇。目前临床上应用最多的羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶抑制剂为氮唑类抗真菌药物, 例如氟康唑(7)、伊曲康唑(8)和伏立康唑(9)等。它们通过氮唑环上的氮原子与靶酶的血红素辅基 Fe 原子配位结合, 使血红素失去与氧原子结合的机会, 阻断底物的羟基化反应, 结果使真菌体内麦角甾醇合成受阻, 羊毛甾醇等前体积聚, 致使膜化学组成改变, 膜通透性和膜上许多酶的活性改变, 从而抑制和杀灭真菌。但是唑类药物的广泛应用导致了严重的耐药性, 因此亟待开发新一代药物。

目前, 已经有多个候选药物处于临床研究阶

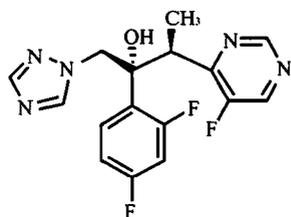
段。例如 Isavuconazole (BAL4815, 10) 进入了 III 期临床研究, 它对大部分致病真菌都显示了较好的抗真菌活性^[9]。Albaconazole (UR-9825, 11) 是一个新的广谱三唑类抗真菌药物, 对氟康唑产生耐药的白色念珠菌的抗真菌活性达到了 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 对隐球菌的活性在 0.002 4 ~ 0.156 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间, 对烟曲霉的活性达到了 0.06 ~ 0.125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间^[10]。此外, 基于 CYP51 三维结构开展唑类药物合理优化设计也大大提高了新药发现的效率。本课题组通过同源建模方法构建了白色念珠菌、新型隐球菌和烟曲霉 CYP51 的三维结构, 并通过分子对接方法研究了天然底物和唑类抗真菌药物与 CYP51 的作用模式^[11-13]。在此基础上, 设计合成得到一系列高活性三唑类化合物^[14-16], 从中开发得到艾迪康唑 (12)^[17], 并完成了 III 期临床试验。



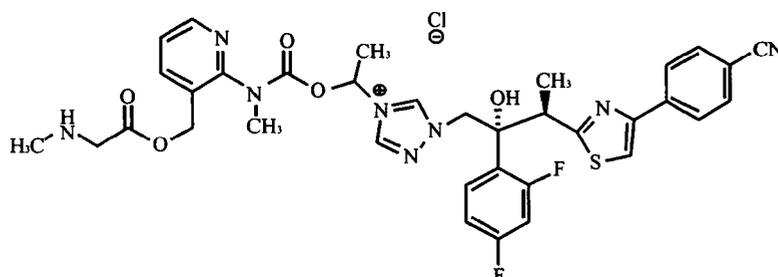
7 Fluconazole



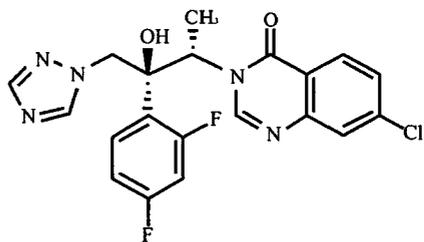
8 Itraconazole



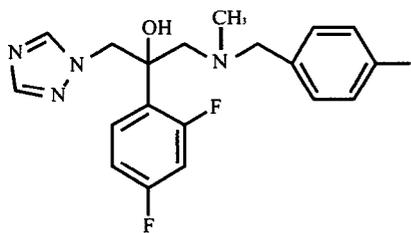
9 Voriconazole



10 Isavuconazole



11 Albacozazole



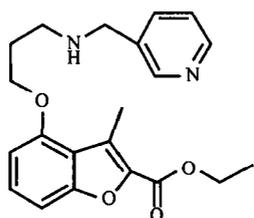
12 Iodiconazole

3 N-肉豆蔻酰基转移酶

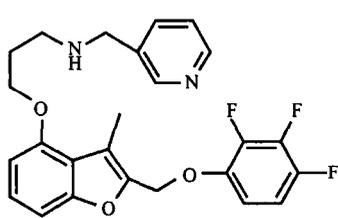
N-肉豆蔻酰基转移酶 (*N*-myristoyltransferase, NMT) 是一种细胞溶质单体酶, 它催化肉豆蔻酰基从肉豆蔻酰 CoA 转移到某些真核细胞和病毒蛋白的 *N*-末端甘氨酸上。N-肉豆蔻酰基转移酶是真菌生长和存活的关键酶, 是抗真菌药物研究的又一全新作用靶点。目前, 真菌 N-肉豆蔻酰基转移酶的晶体结构已经测出, 这提示可以通过靶酶的活性位点来设计抑制剂^[18]。

罗氏公司 (Roche) 通过随机筛选发现的苯并咪唑类 NMT 抑制剂, 随后通过测定系列晶体结构复合物来指导结构优化^[19]。化合物 13~15 不仅具有纳摩尔级的抑酶活性, 并且在体外和体内试验中均显示了很好的杀真菌活性^[20]。Yamazaki 等通过虚拟筛选发现苯并咪唑化合物 16 可抑制白色念珠菌 NMT ($IC_{50} = 1.5 \text{ M}$), 随后通过平行组合合成方法对其进行结构优化, 发现高活性化合物 FTR1335 (17)^[21]。

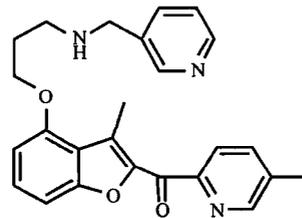
FTR1335 对 NMT 的 IC_{50} 值为 0.49 nM, 对白念珠菌的 MIC 值为 0.78 M, 是一个非常具有前景的先导结构^[22]。本课题组对苯并咪唑类抑制剂进行了三维定量构效关系 (3D-QSAR) 和分子对接研究, 发现该类化合物与苯并咪唑类抑制剂具有相似的作用模式^[23]。通过对现有 NMT 小分子抑制剂进行总结发现, 苯并二元杂环母核, 4 位侧链仲胺基团和 2 位疏水基团是其基本的结构元素。本课题组考察了 NMT 抑制剂母核部分的构效关系, 合成得到一系列苯并二元杂环衍生物, 显示了较好的体外抗真菌活性^[24]。此外, 本课题组还设计合成得到了四氢咪唑类新型 NMT 抑制剂, 该类化合物比苯并咪唑类抑制剂具有更广的抗真菌谱。例如, 化合物 18 对新型隐球菌的 MIC 值达到 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 与临床一线药物氟康唑相当^[25]。虽然目前还没有 NMT 抑制剂进入到临床试验阶段, 但是该类抑制剂作用机制新, 并具有杀真菌活性, 研究前景比较好。该领域未来的研究应集中于丰富 NMT 抑制剂的结构类型, 并改善分子的药代动力学性质。



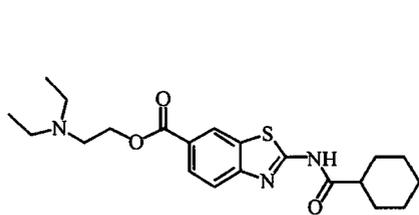
13



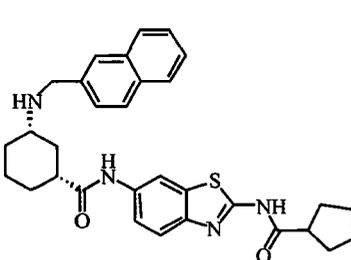
14



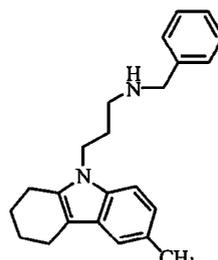
15



16



17 FTR1335



18

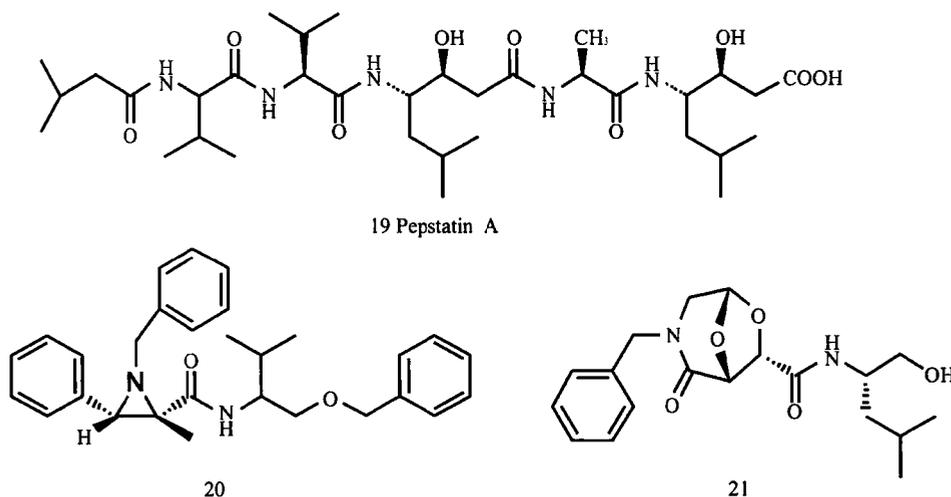
4 分泌型天冬氨酸蛋白酶

分泌型天冬氨酸蛋白酶 (secreted aspartic prote-

ase, Sap) 是一类酸性水解蛋白酶, 属于天冬氨酸蛋白酶家族, 在细胞外起催化水解蛋白质肽键的作用。

大量实验证明, Sap 是白色念珠菌致病的重要毒力因素, 并已经显示出作为抗真菌新靶点的良好前景。Sap 家族至少发现有 10 个成员 (Sap1-10), 其中 Sap2 是研究最为成熟的药物靶点。Sap2 与其抑制剂复合晶体三维结构已经被测定, 这为进行基于结构的合理药物设计创造了条件^[26]。目前, 关于 Sap 抑制剂的研究仍处于起步阶段。早期的 Sap 抑制剂主要是天然的肽类 (例如 pepstatin A, 19) 和拟肽类。虽然肽类抑制剂具有较强的抑酶活性, 但是它们选择性差, 体内易降解, 无抗真菌活性^[27]。因此, 发展小分子 Sap 抑制剂已经逐步成为重要的研究方向。

现有的小分子抑制剂主要来源于从微生物体内分离得到的次级代谢产物和化学合成产物等, 目前已经有两类 Sap2 小分子抑制剂报道。Degel 等^[28]合成了一系列的顺式配位氮杂环和氧杂环化合物, 化合物 20 [$IC_{50} = (7.8 \pm 2.5) \mu M$] 显示了 Sap2 抑制活性最强, 但是没有其抗真菌活性报道。Trabocchi 等^[29]通过筛选一个拟肽类化合物库, 发现化合物 21 对 Sap2 的抑制率达到 74%。更重要的是, 该化合物在阴道念珠菌病鼠模型中显示了与氟康唑相当的疗效, 而且对氟康唑抗性菌株同样有效。该研究初步验证了 Sap 抑制剂作为抗真菌药物的发展前景。



5 总结和展望

临床上现有的抗真菌药物非常有限, 并且存在副作用、疗效、抗菌谱、耐药性等诸多方面的问题。因而抗真菌药物研究的主要方向在于: (1) 提高药物选择性, 降低毒副作用; (2) 扩大抗菌谱, 提高药物对深部真菌的抗菌活性; (3) 根据真菌耐药机制设计新型抗真菌化合物, 降低耐药性; (4) 针对抗真菌药物新靶点, 设计合成新型作用机制的抗真菌化合物; (5) 针对成本较高的药物, 如脂肽类抗真菌药物, 进行小分子抑制剂的设计与合成, 降低药物成本。近年来, 随着基因组学、蛋白质组学、高通量筛选、组合化学和计算机辅助药物设计等一些新技术的出现及应用, 必定能加快发现作用于新靶点的新结构类型化合物。

【参考文献】

[1] Brown GD, Denning DW, Levitz SM. Tackling human fungal infections[J]. Science, 2012, 336(6082): 647.
[2] Lai CC, Tan CK, Huang YT, et al. Current challenges in the management of invasive fungal infections[J]. J Infect Chemother,

2008, 14(2): 77.
[3] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS[J]. AIDS, 2009, 23(4): 525.
[4] Sheng C, Zhang W. New lead structures in antifungal drug discovery[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(5): 733.
[5] Liu J, Balasubramanian MK. 1,3-beta-Glucan synthase: a useful target for antifungal drugs[J]. Curr Drug Targets Infect Disord, 2001, 1(2): 159.
[6] Kondoh O, Inagaki Y, Fukuda H, et al. Piperazine propanol derivative as a novel antifungal targeting 1,3-beta-D-glucan synthase[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(11): 2138.
[7] Ting PC, Kuang R, Wu H, et al. The synthesis and structure-activity relationship of pyridazinones as glucan synthase inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(6): 1819.
[8] Zhou G, Ting PC, Aslanian R, et al. SAR studies of pyridazinone derivatives as novel glucan synthase inhibitors[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2011, 21(10): 2890.
[9] Guinea J, Recio S, Escribano P, et al. In vitro antifungal activities of isavuconazole and comparators against rare yeast pathogens[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(9): 4012.
[10] Miller JL, Schell WA, Wills EA, et al. In vitro and in vivo efficacies of the new triazole albaconazole against Cryptococcus neoformans[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(2): 384.

(下转第 379 页)

采用本方法价格低廉,安全性高,反应条件温和,反应时间短,后处理容易,更适合工业化生产的需要。

2.2 在2-甲基-5-甲氧基苯甲酸乙酯(4)的合成中,文献报道冰浴下,将2-甲基-5-氨基苯甲酸乙酯溶于5% H₂SO₄ 溶液中搅拌15 min,滴加NaNO₂ 溶液后,0℃反应30 min,然后60℃反应18 h。笔者对该步工艺研究发现,反应温度对重氮化水解反应影响较大,如果没有控制好反应温度,反应时杂质会明显增多,影响产率。故滴加NaNO₂ 溶液时,反应液温度控制在(0~5)℃,后逐步升温反应,0℃反应1 h,30℃反应2 h,50℃反应2 h,60℃反应2 h。反应结束。产率由文献的86%提高至92.3%。

2.3 在2-甲基-5-甲氧基苯甲酸乙酯(1)的合成中,文献^[1]中采用氮气保护条件下,在氢氧化钠存在下,采用碘甲烷进行甲基化反应,无水要求高,操作不便,具有一定危险性;笔者采用碳酸钾做缚酸剂,与碘甲烷进行甲基化反应。操作简便,原料廉价易得。产率由文献的75%提高至89.1%。

笔者对文献采用的2-甲基-5-甲氧基苯甲酸乙

酯的合成工艺进行的优化改进。与文献合成方法相比,改进后的新工艺操作简便、条件温和、成本较低,总收率由文献的63.21%提高到76.33%,是一条适合放大制备2-甲基-5-甲氧基苯甲酸乙酯的合成工艺路线。

【参考文献】

- [1] Heemskerck J, McCall JM, Barnes KD. Isoindoline compounds for the treatment of spinal muscular atrophy and other uses [P]. 2009042907, 2009-04-02.
- [2] Lunn MR, Root DE, Martino AM, et al. Indoprofen upregulates the survival motor neuron protein through a cyclooxygenase-independent mechanism [J]. Chem Biol, 2004, 11(11):1489.
- [3] Philippe C, William C, Julien P, et al. The importance of the SMN genes in the genetics of sporadic ALS [J]. Amyotrophic Lateral Sclerosis, 2009, 10(5-6):436.
- [4] Giorgio DS, Irene I, Francesco DR, et al. Synthesis of calicoferol E and astrogorgiadiol, two marine 9,10-secosteroids [J]. Tetrahedron Letters, 1998, 39(26):4741.

[收稿日期]2012-12-10

[修回日期]2013-04-09

(上接第325页)

- [11] Sheng C, Zhang W, Zhang M, et al. Homology modeling of lanosterol 14-demethylase of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* and insights into the enzyme-substrate interactions [J]. J Biomol Struct & Dyn, 2004, 22(1):91.
- [12] Sheng C, Wang W, Che X, et al. Improved model of lanosterol 14 α -demethylase by ligand-supported homology modeling: validation by virtual screening and azole optimization [J]. Chem Med Chem, 2010, 5(3):390.
- [13] Sheng C, Miao Z, Ji H, et al. Three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase from *Cryptococcus neoformans*: active-site characterization and insights into azole binding [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(8):3487.
- [14] Sheng C, Che X, Wang W, et al. Design and synthesis of novel triazole antifungal derivatives by structure-based bioisosterism [J]. Eur J Med Chem, 2011, 46(11):5276.
- [15] Sheng C, Che X, Wang W, et al. Structure-based design, synthesis, and antifungal activity of new triazole derivatives [J]. Chem Biol Drug Des, 2011, 78(2):309.
- [16] Wang W, Wang S, Liu Y, et al. Novel conformationally restricted triazole derivatives with potent antifungal activity [J]. Eur J Med Chem. 2010, 45(2):6020.
- [17] Sun N, Wen J, Lu G, et al. An ultra-fast LC method for the determination of iodiconazole in microdialysis samples and its application in the calibration of laboratory-made linear probes [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 51(1):248.
- [18] Weston SA, Camble R, Colls J, et al. Crystal structure of the antifungal target *N*-myristoyl transferase [J]. Nat Struct Biol, 1998, 5(3):213.
- [19] Sogabe S, Masubuchi M, Sakata K, et al. Crystal structures of *Candida albicans* *N*-myristoyltransferase with two distinct inhibitors [J]. Chem Biol, 2002, 9(10):1119.
- [20] Farazi TA, Waksman G, Gordon JJ. The biology and enzymology of protein *N*-myristoylation [J]. J Biol Chem, 2001, 276(43):39051.
- [21] Yamazaki K, Kaneko Y, Suwa K, et al. Synthesis of potent and selective inhibitors of *Candida albicans* *N*-myristoyltransferase based on the benzothiazole structure [J]. J Biol Chem, 2005, 13(7):2509.
- [22] Ebara S, Naito H, Nakazawa K, et al. FTR1335 is a novel synthetic inhibitor of *Candida albicans* *N*-myristoyltransferase with fungicidal activity [J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(4):591.
- [23] Sheng C, Zhu J, Zhang W, et al. 3D-QSAR and molecular docking studies on benzothiazole derivatives as *Candida albicans* *N*-myristoyltransferase inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2007, 42(4):477.
- [24] Sheng C, Xu H, Wang W, et al. Design, synthesis and antifungal activity of isosteric analogues of benzoheterocyclic *N*-myristoyltransferase Inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2010, 45(9):3531.
- [25] 盛春泉, 张万年, 王文雅, 等. 取代四氢咪唑类抗真菌化合物及其制备方法 [P]. 中国专利, 201110094585.4, 2011-04-15.
- [26] Cutfield SM, Dodson EJ, Anderson BF, et al. The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from *Candida albicans* in complexes with two inhibitors [J]. Structure, 1995, 3(11):1261.
- [27] Stewart K, Abad-Zapatero C. *Candida* proteases and their inhibition: prospects for antifungal therapy [J]. Curr Med Chem, 2001, 8(8):941.
- [28] Degel B, Staib P, Rohrer S, et al. Cis-Configured aziridines are new pseudo-irreversible dual-mode inhibitors of *Candida albicans* secreted aspartic protease 2 [J]. Chem Med Chem 2008, 3(2):302.
- [29] Trabocchi A, Mannino C, Machetti F, et al. Identification of inhibitors of drug-resistant *Candida albicans* strains from a library of bicyclic peptidomimetic compounds [J]. J Med Chem, 2010, 53(6):2502.

[收稿日期]2013-01-13

[修回日期]2013-04-02