

抗菌药物新靶标 FabH 及其抑制剂研究进展

张学辉,于红综述 王莉莉,李松* 审校

(军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要:由于药物滥用等原因造成的耐药性和结核病在世界范围的卷土重来,迫切需要开发新的抗菌药物和靶标。近年来,细菌脂肪酸合成酶系统的单功能酶已成为基因组驱动的新型抗菌药物靶标研究的热点。 β -酮酰-ACP 缩合酶 III(KAS III ,FabH)是催化脂肪酸合成碳链延长循环的起始因子,广泛存在于细菌中,在细菌脂肪酸生物合成中起着必要和调节的作用。FabH 抑制剂由于其作用靶点与现有抗菌药物不同,有希望成为克服细菌耐药性的一种途径,也将成为今后研究的一个热点。本文综述了抗菌药物新靶标 KAS III 及其抑制剂的研究进展。

关键词:抗菌药物新靶标;脂肪酸合成酶; β -酮酰-ACP 缩合酶(FabH);酶抑制剂

中图分类号:R978 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2006)04-0262-04

随着细菌、寄生虫、病毒和真菌的耐药性出现,在过去 60 年间开发的许多强效的抗菌药物都失去了他们的功效,并发现耐药菌有逐年增加的趋势。曾经疗效确切的抗结核病药物(链霉素、异烟肼、利福平等),随着耐药菌的不断出现,对结核病的治疗效果明显下降。自 20 世纪 80 年代以来,盲目乐观地认为消除结核病在望,一直没有新的抗结核菌药物上市,结核病在世界范围卷土重来。卫生部公布数据显示,结果结核病已成为中国发病和死亡人数最高的疾病。为此,迫切需要开发新的药物和新的药物作用靶标。传统的抗菌化学治疗药物大多是干扰细菌体内氨基酸、核苷酸、氨基糖等小分子的合成,或者是干扰这些小分子合成蛋白质、核酸、肽聚糖等生物大分子的生化过程。近年来,细菌脂肪酸合成酶系统的单功能酶已成为基因组驱动的新型抗菌药物靶标研究的热点^[1~3]。 β -酮酰-ACP 缩合酶 III(β -ketoacyl-ACP synthase III , KAS III , FabH)抑制剂由于其作用靶点与现有抗菌药物不同,有希望成为克服细菌耐药性的一种途径,也将成为今后研究的一个热点。

1 抗菌药物新靶标 FabH

1.1 脂肪酸的生物合成

在所有的生物有机体中,脂肪酸合成(fatty acid synthesis ,FAS)本质上都是相同的,但催化脂肪酸生物合成的酶系具有两种类型(FAS I 和 FAS II)^[1]。FAS I 存在于哺乳动物和酵母中,其中全部的酶活性都分别编码在一条多肽链上,每一步脂肪酸合成反应都是由这个大的蛋白的不同功能域催化完成。FAS II 存在于细菌和植物中,它是由一系列小的分离的蛋白组成,每一步脂肪酸合成反应均是由截然不同的单功能酶催化完成的。以大肠杆菌为例^[2],细菌脂肪酸生物合成(fatty acid biosynthesis ,Fab)的途径如图 1 所示。FAS II 主要包括 7 种单功能酶,分别为酰基载体蛋白(ACP),丙二酸单酰-CoA :ACP 转酰酶(FabD),KAS(FabH ,FabB ,FabF), β -酮酰-ACP 还原酶(FabG), β -羟酰-ACP 脱水酶(FabA、FabZ),烯酰-ACP 还原酶(FabI ,FabK ,FabL),以及酰基硫酯酶(PlsB)。FAS II 涉及复合的细胞包膜脂(如分枝菌酸)的合成^[4]。这两类脂肪酸合成酶系(FAS I 和 FAS II)在结构和功能上是相关的,但缺乏总的序列同源性,这使得开发选择性抑制细菌 FAS II 的抗菌药物成为可能。FAS II 系统的单功能酶已成为基因组驱动的新型抗菌药物靶标研究的热点^[1~3]。近年来,世界各国的药物学家们对脂肪酸合成酶抑制剂进行了大量的研究,并已取得了一定的进展,一些抑制剂表现出强的抗菌作用。图 2 列举了一些作用于 FAS II 单功能酶的抑制剂^[2]。

1.2 FabH

KAS 可分为 3 种 ,KAS I(FabB),KAS II(FabF),KAS

收稿日期:2006-03-23

基金项目:国家“973”计划资助项目(2004CB518908)

作者简介:张学辉,男,在读硕士研究生,研究方向:抗耐药结核药物设计与合成,E-mail:xuehui_zhang@163.com

*通讯作者:李松,男,研究员,研究方向:计算机辅助药物设计, Tel:010-66931250,E-mail:lis@nic.bmi.ac.cn

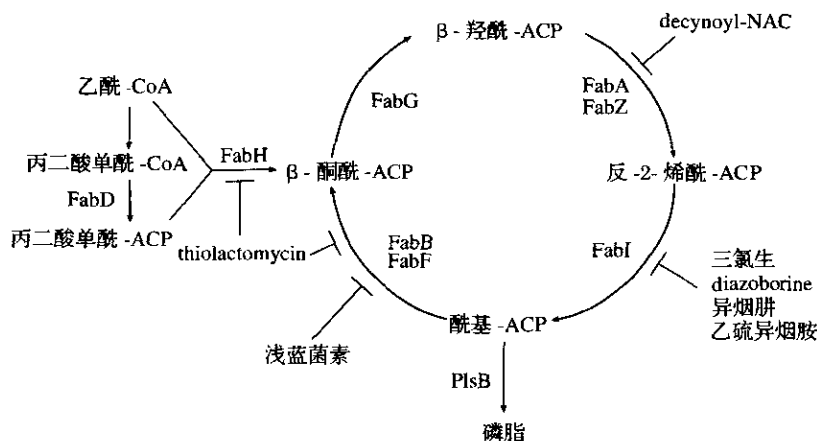


图1 大肠杆菌脂肪酸的生物合成途径

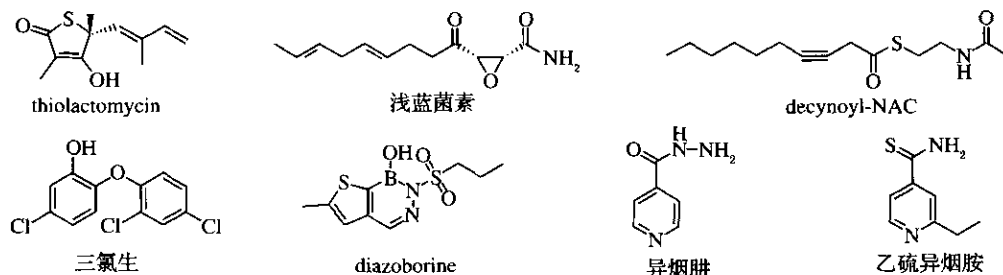


图2 作用于 FAS II 单功能酶的抑制剂

III (FabH)。在 3 种 KAS 中, FabH 的独特性在于^[5]: (1) FabH 催化脂肪酸生物合成途径的起始步骤 (2) 由于脂肪酸合成的最终产物棕榈酰-ACP 对 FabH 产生反馈抑制,使循环终止,可见 FabH 在整个合成途径中起着关键性调节作用 (3) 基因序列比对, FabH 不同于其他缩合酶。底物专属性比对, FabH 以乙酰基辅酶 A 为底物,而 FabB 和 FabF 以酰基-ACP 为底物 (4) 已知 KAS 抑制剂浅蓝菌素和 thiolactomycin 对 FabH 的抑制作用远低于对 FabB 和 FabF^[6] (5) 种系分析表明^[1,7], FabH 普遍存在于大量临床病原体中,如革兰阳性菌、革兰阴性菌、衣原体、厌氧菌、分枝杆菌和许多原生动植物中,而且 FabH 对他们的生存是必需的。而其他 Fab 基因,如 FabA, FabB, FabI 等并没有在所有的病原菌中被发现。

FabH 的这些显著特征激发了一些研究工作者的极大兴趣。通过对大量细菌 FabH 的晶体结构和反应动力学进行深入研究,提供了 FabH 详细的结构特征信息,揭示了 FabH 催化缩合反应的活性位点结构基础,提出了 FabH 催化缩合反应机制^[8,9]。这些都为基于结构的酶抑制剂设计奠定了基础。进一步深入研究还发现,在革兰阳性菌和革兰阴性菌

中, FabH 在基因序列和三维结构上是高度保守的,而在人体无同源蛋白^[10]。更为重要的是,组成 FabH 活性位点的氨基酸残基在革兰阳性菌和革兰阴性菌中无本质上的区别。研究已经证明, FabH 是细菌脂肪酸生物合成的关键性靶酶^[7],为广谱抗菌药物的新靶标。

2 FabH 抑制剂

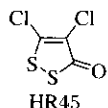
2.1 thiolactomycin

thiolactomycin((R, E)-4-羟基-3,5-二甲基-5-(2-甲基-1,3-丁二烯基噻吩-2-酮, TLM)是从土壤真菌诺卡氏菌属(*Nocardia* sp.)中分离得到的唯一具有硫内酯酮结构的天然产物。体外活性实验表明, TLM 具有中等强度的广谱抗菌活性,包括革兰阳性菌、革兰阴性菌及结核分枝杆菌等 II 型 FAS,而其对 KAS I 无抑制作用,为选择性抑制剂。体内活性试验结果显示, TLM 抑制结核分枝杆菌 FabH 的 IC₅₀ 值为 56 μmol·L⁻¹^[11],对大肠杆菌 FabF, FabB, FabH 抑制作用 IC₅₀ 值^[12]分别为 6.25, 110 μmol·L⁻¹。此外,实验还证实了 TLM 不仅对小鼠无毒,而且还为尿路及腹膜内的细菌感染提供了重要的防护作用。

TLM的全合成于1984年完成,随即,以TLM为先导化合物,多种衍生物相继被合成^[13]。生物活性研究表明,其中一些衍生物表现出较强的抑制分枝杆菌酸,以及叶绿体等KAS II合成的活性。

2.2 1,2-二硫-3-酮类化合物

He等^[14]通过虚拟筛选美国NCI数据库(National Cancer Institute database)发现了以HR45(4,5-二氯-1,2-二硫-4-环戊烯-3-酮)为代表的1,2-二硫-3-酮类化合物。该类化合物是TLM的类似物。HR45抑制大肠杆菌FabH和金黄色葡萄球菌FabH的 IC_{50} 值分别为2和0.16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对这两种细菌的抑菌活性MIC分别为1和25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。HR12(5-氯-4-苯基-1,2-二硫-4-环戊烯-3-酮)抑制大肠杆菌FabH和金黄色葡萄球菌FabH的 IC_{50} 值分别为5.7和0.98 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对这两种细菌的抑菌活性MIC分别为4.0和8.7 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该类化合物的活性比TLM有较大提高。



HR45



HR12(RWJ-3981)

2.3 浅蓝菌素

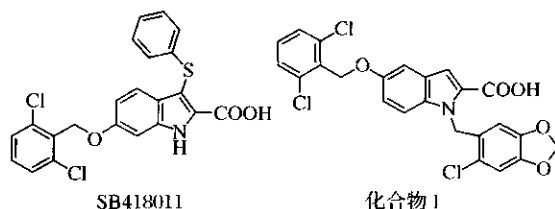
浅蓝菌素[(2R,3S)-3-[(4E,7E)-4,7-壬二烯酰基]环氧乙烷-2-酰胺, CER)是从青蓝头孢菌(*Cephalosporium caerulens*)的培养基中分离得到的天然活性产物,具有抗酵母、真菌和细菌等活性,其对KAS I和KAS II均表现出一定的抑制作用,是一非选择性抑制剂。CER抑制KAS I表现出对小鼠具有抗肿瘤^[15]和减少进食及降低体重的作用^[16];CER抑制KAS II表现出广谱的抗菌作用,其中,对大肠杆菌FabB, FabF, FabH抑制作用 IC_{50} 值分别为3, 20, 700 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[12]。KAS-CER的二元复合物晶体结构显示^[17], CER与KAS的活性位点半胱氨酸形成一共价产物,为不可逆抑制剂。

此外,由于CER分子结构中存在环氧乙烷结构,在体内不稳定,且毒性较大,因此,限制了其作为药物被广泛应用。

2.4 吲哚类化合物

最近,葛兰素史克公司的研究工作者们利用高通量筛选的方法发现,SB418011[6-(2,6-二氯苄氧基)-3-(苯硫基)吲哚-2-羧酸]和化合物1[1-(6-氯-3,4-亚甲二氧苄基)-5-(2,6-二氯苄氧基)吲哚-2-羧酸]等含羧基的吲哚类化合物为新型FabH抑制剂,该类化合物对大肠杆菌和肺炎链球菌等的FabH抑制

作用均强于CER和TLM,而对KAS I无抑制作用,选择性较好。SB418011对肺炎链球菌FabH抑制作用 IC_{50} 值为0.016 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;对大肠杆菌FabH抑制作用 IC_{50} 值为1.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;对人KAS I抑制作用 IC_{50} 值大于200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[6]。化合物1对肺炎链球菌FabH抑制作用 IC_{50} 值为0.040 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;对大肠杆菌FabH抑制作用 IC_{50} 值为0.83 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;对人KAS I抑制作用 IC_{50} 值为30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[18]。可见,这些新型选择性FabH抑制剂抗菌作用的发现,为人们克服致病耐药菌带来了希望。

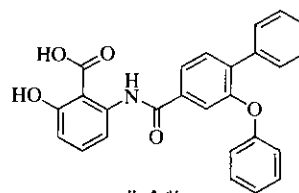


SB418011

化合物1

2.5 苯甲酸类化合物

Nie等基于已知的FabH晶体结构,设计并合成了一系列苯甲酸类衍生物,通过筛选发现了以化合物2[2-羟基-6-(4-苯基-3-苯氧基苯甲酰氨基)苯甲酸]为代表的FabH抑制剂^[8]。该化合物表现出较好的抑制粪肠球菌FabH和酿脓链球菌FabH的活性, IC_{50} 均为0.004 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但是抑菌活性MIC分别为>45和5.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,并不理想。该结果表明,该化合物穿越细胞膜能力差,或者容易被药物流出泵(efflux pumps)泵出。

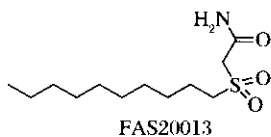


化合物2

2.6 FAS20013

FASgen公司开发了FAS20013[2-(癸磺酰基)乙酰]抗结核药物^[19],对多重耐药结核分枝杆菌表现出好的抑制活性。FAS20013抑制结核分枝杆菌活性MIC为0.75~1.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。该类化合物最初设计为 β -酮酰-ACP缩合酶(KAS)抑制剂,目前具体作用机制尚不清楚。FAS20013是近年来发展较快的抗结核药物,目前已完成临床前评价,有望2006年早些时候启动临床试验研究。该化合物在短时间内杀灭结核分枝杆菌的能力强,对多重耐药菌有效。例如,FAS20013在4h的杀菌效果超过异烟肼、利福平12~14d的效果。该化合物有望解决目前结核

病临床治疗的两大难题,即多重耐药问题和治疗时间长(≥ 6 个月)的问题。



3 结语

综上所述,近年来,脂肪酸缩合酶 FabH 靶标的识别和验证,为新型抗菌药物的研制和开发奠定了基础。发现了一些有潜力发展成为新型抗菌药物的 FabH 抑制剂。但是,必须看到, FabH 抑制剂的研究还处于起步阶段。到目前为止,还没有脂肪酸合成酶抑制剂作为抗菌药物上市。因此,寻找化学结构新颖、特异性强、低毒高效的抗菌新药 FabH 抑制剂,仍然是药物工作者长期而重要的研究领域。

参 考 文 献

- [1] Payne DJ, Warren PV, Holmes DJ, *et al.* Bacterial fatty-acid biosynthesis: a genomics-driven target for antibacterial drug discovery[J]. *Drug Discov Develop*, 2001, 6(10): 537 - 544.
- [2] Heath RJ, White SW, Rock CO. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents[J]. *Prog Lipid Res*, 2001, 40: 467 - 497.
- [3] Raman K, Rajagopalan P, Chandra N. Flux balance analysis of mycolic acid pathway: targets for anti-tubercular drugs[J]. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(5): 349 - 358.
- [4] Takayama K, Wang C, Besra GS. Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(1): 81 - 101.
- [5] Heath RJ, Rock CO. Regulation of fatty acid elongation and initiation by acyl-acyl carrier protein in *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(4): 1833 - 1836.
- [6] Khandekar SS, Gentry DR, Van Aller GS, *et al.* Identification, substrate specificity, and inhibition of the *Streptococcus pneumoniae* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH)[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(32): 30024 - 30030.
- [7] Revill WP, Bibb MJ, Scheu AK. Beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *J Bacteriol*, 2001, 183: 3526 - 3530.

- [8] Musayev F, Sachdeva S, Scarsdale JN, *et al.* Crystal structure of a substrate complex of *Mycobacterium tuberculosis* β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) with lauroyl-coenzyme A[J]. *J Mol Biol*, 2005, 346: 1313 - 1321.
- [9] Qiu X, Choudhry AE, Janson CA, *et al.* Crystal structure and substrate specificity of the beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) from *Staphylococcus aureus*[J]. *Protein Sci*, 2005, 14(8): 2087 - 2094.
- [10] Nie Z, Perretta C, Lu J, *et al.* Structure-based design, synthesis, and study of potent inhibitors of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III as potential antimicrobial agents[J]. *J Med Chem*, 2005, 48(5): 1596 - 1609.
- [11] Kremer L, Douglas JD, Baulard AR, *et al.* Thiolactomycin and related analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(22): 16857 - 16864.
- [12] Price AC, Choi KH, Heath RJ, *et al.* Inhibition of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase by thiolactomycin and cerulenin[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(9): 6551 - 6559.
- [13] Jones SM, Urch JE, Kaiser M, *et al.* Analogues of thiolactomycin as potential antimalarial agents[J]. *J Med Chem*, 2005, 48(19): 5932 - 5941.
- [14] He X, Reeve M, Desai UR, *et al.* 1,2-Dithiole-3-ones as potent inhibitors of the bacterial 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH)[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(8): 3093 - 3102.
- [15] Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, *et al.* Synthesis and antitumor activity of an inhibitors of fatty acid synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 3450 - 3454.
- [16] Loftus TM, Jaworsky DE, Frehywot GL, *et al.* Reduced food intake and body weight in mice treated with fatty acid synthase inhibitors[J]. *Science*, 2000, 288: 2379 - 2381.
- [17] Moche M, Schneider G, Edwards P, *et al.* Structure of the complex between the antibiotic cerulenin and its target, beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 6031 - 6034.
- [18] Daines RA, Pendrak I, Sham K, *et al.* First X-ray cocrystal structure of a bacterial FabH condensing enzyme and a small molecule inhibitor achieved using rational design and homology modeling[J]. *J Med Chem*, 2003, 46: 5 - 8.
- [19] Jones PB, Parrish NM, Houston TA, *et al.* A new class of antituberculosis agent[J]. *J Med Chem*, 2000, 43(17): 3304 - 3314.

(上接第 248 页)

- [13] Kohler R, Degenhardt C, Kuhn M, *et al.* Expression and function of endothelial Ca^{2+} -activated K^+ channels in human mesenteric artery: a single-cell reverse transcriptase-polymerase chain reaction and electrophysiological study *in situ*[J]. *Circ Res*, 2000, 87: 496 - 503.
- [14] Chen SZ, Jiang M, Zhen YS. HERG K^+ channel expression-related chemosensitivity in cancer cells and its modulation by erythromycin

[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 56(2): 212 - 220.

- [15] Abdul M, Santo A, Hoosein N. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(4): 3347 - 3351.
- [16] Jager H, Dreker T, Buck A, *et al.* Blockage of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels inhibit human pancreatic cancer cell growth *in vitro*[J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 65(3): 630 - 638.