

# 含香豆素结构的 CYP51 抑制剂的设计、 合成及抗真菌活性研究

王野,王艺潼,卢佳,刘娜,李佳凝,郭春\*,侯状\*

(沈阳药科大学 基于靶点的药物设计与研究教育部重点实验室,辽宁 沈阳 110016)

**摘要:**目的 为寻找具有抗耐药真菌活性的 CYP51 抑制剂,设计合成一系列新型含香豆素结构的唑类衍生物,并进行抗真菌活性评价及作用机制研究。方法 以 1-[2-(2,4-二氟苯基)-2,3-环氧丙烷]-1*H*-1,2,4-三氮唑(1)为起始原料,与叠氮化钠发生开环反应得到中间体 2,2 与含有不同取代基的 7-炔丙氧基香豆素(3a~3o)发生环合反应,得到目标化合物 A01~A15。采用二倍稀释法,以氟康唑为阳性对照测定了目标化合物对 7 种常规菌及 5 种耐药菌的抑制活性并进行了相关机制研究。**结果与结论** 共合成了 15 个新型含香豆素结构的唑类衍生物,其结构均经<sup>1</sup>H-NMR和 HR-ESI-MS 谱确证。体外抗真菌活性结果显示,15 个目标化合物对所测试的常规菌及耐药菌均表现出良好的抑制活性,其中化合物 A11 的抑菌活性优于阳性对照氟康唑,具有进一步研究的价值。

**关键词:**CYP51;抑制剂;香豆素;抗真菌

**中图分类号:**R914 **文献标志码:**A

真菌作为一类真核微生物,在自然界中分布极为广泛。研究数据显示,目前已知的真菌种类高达 300 万种,而其中仅约 1% (约 300 种) 可对人类健康构成威胁<sup>[1-2]</sup>。在临床层面,真菌感染可累及多个器官与系统。根据入侵人体组织、器官的深度不同,致病真菌可分为浅部真菌和深部真菌<sup>[3]</sup>。浅部真菌主要侵犯皮肤、毛发和指甲等表皮组织<sup>[4-5]</sup>,而深部真菌可侵入粘膜、深层组织、内脏器官乃至血液,引起全身性感染,严重时可导致死亡<sup>[6-10]</sup>。

14 $\alpha$ -去甲基化酶(CYP51)在真菌麦角甾醇合成过程中扮演重要角色,是抗真菌药物研发的关键靶点。该靶点抑制剂通过阻断麦角甾醇的生物合成,破坏真菌细胞膜结构,进而抑制真菌的生长与繁殖<sup>[11]</sup>。唑类药物(图 1)作为经典的 CYP51 抑制剂,广泛用于浅表至深部真菌感染的治疗。第一代抗真菌药物以克霉唑(clotrimazole)、咪康唑(miconazole)为代表。这类药物在角质组织中具有较强的富集能力,能够较好地渗透并滞留于皮肤、指甲等浅部组织,目前临床上多用于浅部真

菌感染的治疗,如体癣、股癣、手足癣及皮肤念珠菌感染等。但因其在深部组织中分布较少,且经系统给药后生物利用度偏低,故对侵袭性真菌感染的治疗效果有限<sup>[12-14]</sup>。第二代药物包括伊曲康唑(itraconazole)、氟康唑(fluconazole)、酮康唑(ketoconazole)和伏立康唑(voriconazole),抗菌活性明显增强,其中伏立康唑对侵袭性曲霉病疗效突出,已成为临床一线用药<sup>[15-16]</sup>。第三代药物艾沙康唑(isavuconazole)进一步扩展了深部真菌感染的治疗范围,不仅对曲霉属、念珠菌属保持强效活性,对毛霉属等罕见真菌亦具有一定抑制作用,为深部真菌感染提供了更多治疗选择<sup>[17-18]</sup>。第四代药物以四氮唑环为结构特征,代表药物奥特康唑(oteseconazole)在提高抗耐药菌活性的同时,降低了肝肾毒性<sup>[19-21]</sup>。然而,随着唑类药物的广泛使用,临床耐药问题日益突出,严重限制了该类药物的治疗效果和临床应用<sup>[22]</sup>。尽管已有研究人员开展了联合用药抗耐药真菌相关研究<sup>[23-25]</sup>,但开发能克服耐药的新型 CYP51 小分子抑制剂仍是当前研究的重点方向。

收稿日期:2025-10-20

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82273790)

作者简介:王野(1990-),男(汉族),辽宁沈阳人,硕士研究生,E-mail: gaibian299792458@163.com; \*通信作者:郭春(1963-),男(汉族),辽宁阜新,教授,博士生导师,主要从事药物化学教学与科研工作,E-mail: gc\_66888@163.com;侯状(1989-),男(汉族),四川阆中人,副教授,硕士生导师,主要从事药物化学教学与科研工作,Tel: (024)43520229,E-mail: houzhuang8@sina.com。

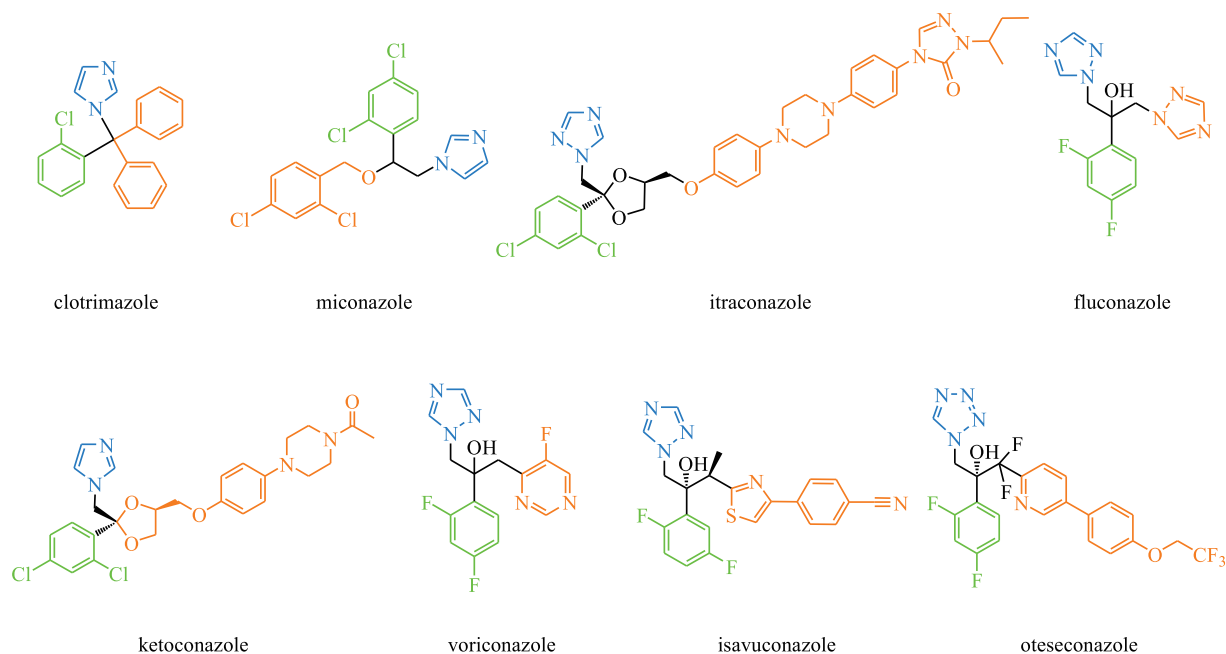


Figure 1 The structures of typical azole antifungal drugs

## 1 目标化合物的设计

唑类抗真菌药物凭借结构多样、抗真菌谱广、给药方便及生物利用度较高等优点,已成为临床一线抗真菌药物<sup>[26]</sup>。然而,随着其长期、广泛及不规范使用,耐药问题日益突出,严重制约了其临床疗效。研究证实,真菌生物膜的形成是介导耐药的关键机制之一,可显著阻碍药物渗透并降低药效<sup>[27]</sup>。因此,开发以生物膜为靶点的新型抗真菌药物,尤其是针对唑类耐药菌株的生物膜抑制剂,已成为极具前景的重要研究方向<sup>[28]</sup>。

香豆素类天然化合物不仅具有抗凝、抗氧化与抗炎等多种药理活性<sup>[29]</sup>,在抗真菌领域同样显示出独特的应用潜力<sup>[30]</sup>。近年研究发现,香豆素类化合物不仅能有效抑制多种真菌的生长,还能显著干扰真菌生物膜的形成<sup>[31]</sup>,为应对日趋严峻

的真菌耐药问题提供了新思路。基于此,本文作者拟将结构丰富、活性多样的香豆素母核与经典的氮唑基团进行合理拼接,设计并合成一系列新型含香豆素结构的 CYP51 唑类抑制剂,旨在发现具有抗耐药真菌活性的新型先导化合物。

首先对经典 CYP51 唑类抑制剂氟康唑的结构特征进行了分析(图 2)。其中,三氮唑环可与疏水通道 II 中的氨基酸残基相互作用,但 CYP51 蛋白的疏水通道 II 结构相对狭长,三氮唑环未能充分伸入其深部区域。如图 3 所示,本研究以氟康唑为先导化合物,通过点击化学在其疏水片段 II 中引入香豆素结构得到化合物 A01,其能够更好地伸入 CYP51 狭长的疏水通道 II 深部,从而提高对敏感菌株的抗真菌活性,同时借助香豆素结构赋予化合物抗耐药真菌活性。

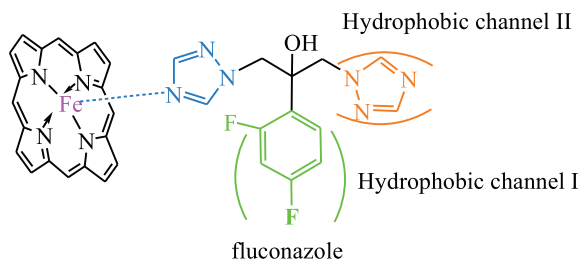


Figure 2 The key pharmacophores of CYP51 inhibitor fluconazole

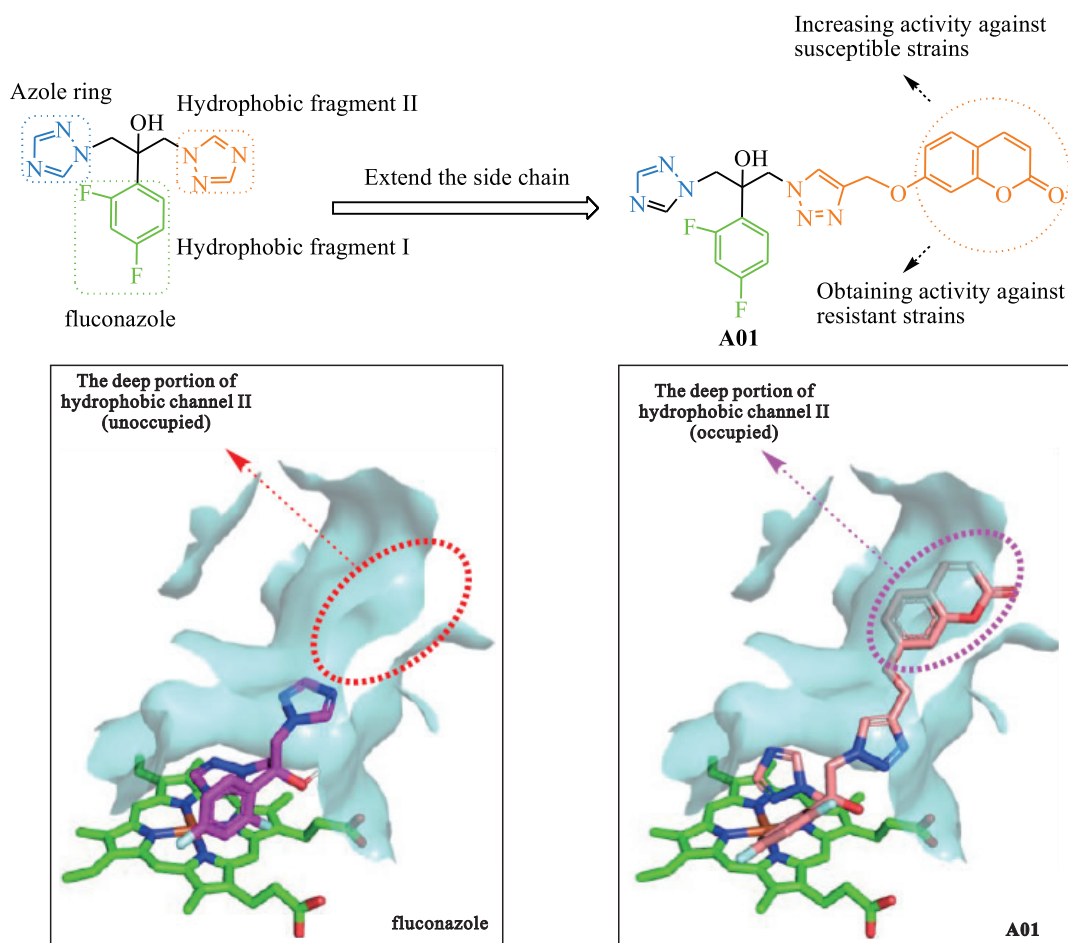
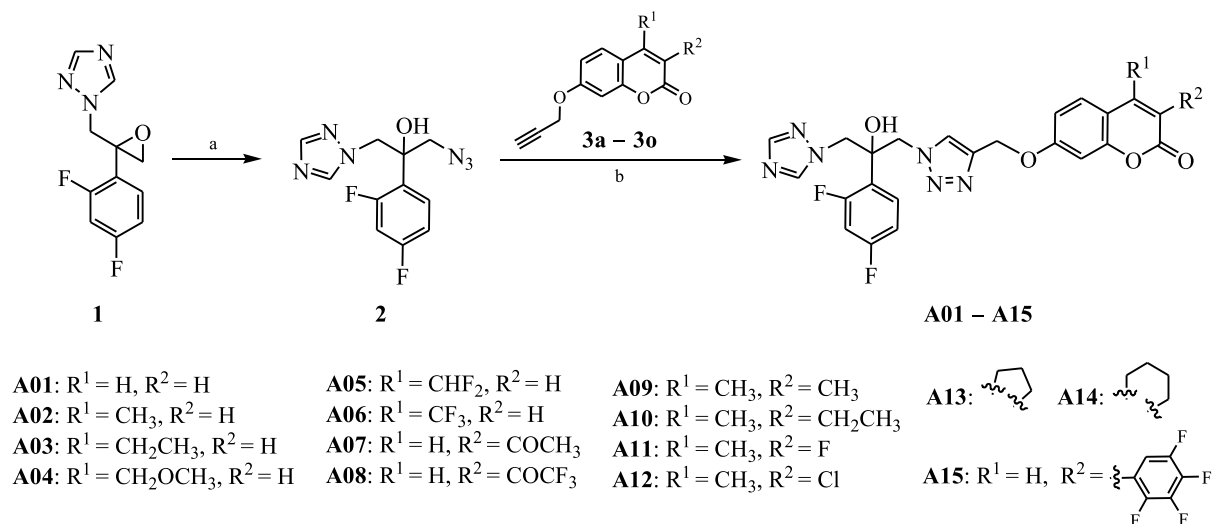


Figure 3 The design rationale of coumarin-containing azole derivatives

## 2 目标化合物的合成路线

目标化合物的合成路线见图4:以1-[2-(2,4-二氟苯基)-2,3-环氧丙烷]-1*H*-1,2,4-三氮唑

(1)为起始原料,与叠氮化钠发生开环反应得到中间体2,2与含有不同取代基的7-炔丙氧基香豆素(3a~3o)发生环合反应,得到目标化合物A01~A15。



Reagents and conditions: a) NaN<sub>3</sub>, Et<sub>3</sub>N, EtOH, 78 °C, 2 h; b) SA, CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, *t*-BuOH/H<sub>2</sub>O, 70 °C, 2 h.

Figure 4 Synthetic route of target compounds A01 - A15

### 3 合成实验

核磁共振谱采用 Bruker ARX-400 核磁共振波谱仪测定(德国 Bruker 公司),以 DMSO- $d_6$  为溶剂,四甲基硅烷(TMS)为内标;高分辨质谱采用 Agilent Accurate-Mass Q-TOF 6530 质谱仪测定(美国 Agilent 公司);熔点采用 X-4 数字显示显微熔点仪测定(北京泰克仪器有限公司);纯度采用 Prep 150 制备液相色谱仪测定(美国 Waters 公司),配备 ArtChrom WP C<sub>18</sub> 反相色谱柱(20 mm × 250 mm, 5 μm);柱色谱用硅胶 FCP(200 ~ 300 目, 50 ~ 71 μm, 青岛海洋化工厂)。实验所用试剂均为市售分析纯或化学纯。

#### 3.1 1-叠氮基-2-(2,4-二氟苯基)-3-(1H-1,2,4-三唑-1-基)丙-2-醇(2)的合成

将 1-[2-(2,4-二氟苯基)-2,3-环氧丙烷]-1H-1,2,4-三氮唑(1, 1.00 g, 3.00 mmol)溶于 20 mL 无水乙醇中,搅拌下分批加入叠氮化钠(0.30 g, 4.50 mmol),加入 1 mL 三乙胺,回流反应 2 h。反应结束,将反应液减压浓缩,加入二氯甲烷溶解,用水洗 3 次,无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,得到白色粉末状固体(2) 0.80 g,

收率为 67.8%。HR-ESI-MS  $m/z$ : calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>N<sub>5</sub>ONa 302.0850 [M + Na]<sup>+</sup>, found 302.0827。

#### 3.2 目标化合物 A01 ~ A15 的合成通法(以 7-(1-[2-(2,4-二氟苯基)-2-羟基-3-(1H-1,2,4-三唑-1-基)丙基]-1H-1,2,3-三唑-4-基}甲氧基)-2H-苯并吡喃-2-酮(A01)为例)

将 7-(丙-2-炔-1-基氧基)-2H-苯并吡喃-2-酮(3a, 0.88 g, 4.28 mmol)和中间体 2(1.00 g, 3.57 mmol)加入 20 mL 叔丁醇-水(体积比 1:1)的混合溶剂中,加入抗坏血酸钠(SA, 0.71 g, 3.57 mmol)和五水硫酸铜(0.09 g, 0.36 mmol),70 °C 反应 2 h。反应结束,将反应液减压浓缩,残余物用乙酸乙酯萃取(30 mL × 3),合并有机层,用 100 mL 饱和氯化钠溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,过滤,将滤液减压浓缩,经硅胶柱色谱分离纯化(石油醚-乙酸乙酯,体积比 50:1),得到白色固体(A01) 1.74 g。

化合物 A02 ~ A15 的合成方法与化合物 A01 相似,所有化合物均为白色固体。目标化合物的理化性质及波谱数据见表 1。

Table 1 The experimental and spectral data of target compounds A01 – A15

Compd.	Yield/%	mp/°C	HR-ESI-MS $m/z$	Purity/%	<sup>1</sup> H-NMR(400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$
A01	83.7	132 – 133	calcd. for C <sub>23</sub> H <sub>18</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Na 503.1250[M + Na] <sup>+</sup> , found 503.1276	99.12	8.37(s, 1H), 8.06(s, 1H), 8.03(d, $J$ = 9.5 Hz, 1H), 7.86(s, 1H), 7.66(d, $J$ = 8.6 Hz, 1H), 7.23(dd, $J$ = 15.3, 5.7 Hz, 1H), 7.13(s, 2H), 7.00(dd, $J$ = 8.6, 1.9 Hz, 1H), 6.81(d, $J$ = 8.2 Hz, 1H), 6.52(s, 1H), 6.34(d, $J$ = 9.5 Hz, 1H), 5.24(s, 2H), 5.05(d, $J$ = 14.4 Hz, 1H), 4.78(d, $J$ = 14.5 Hz, 1H), 4.73(d, $J$ = 14.4 Hz, 1H), 4.62(d, $J$ = 14.5 Hz, 1H)
A02	84.5	125 – 127	calcd. for C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Na 517.1503[M + Na] <sup>+</sup> , found 517.1524	98.44	8.38(s, 1H), 8.07(s, 1H), 7.87(s, 1H), 7.71(d, $J$ = 8.8 Hz, 1H), 7.25(ddd, $J$ = 11.8, 9.1, 2.5 Hz, 1H), 7.19 – 7.13(m, 1H), 7.12(d, $J$ = 2.5 Hz, 1H), 7.03(dd, $J$ = 8.8, 2.5 Hz, 1H), 6.82(td, $J$ = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 6.53(s, 1H), 6.26(d, $J$ = 1.0 Hz, 1H), 5.25(s, 2H), 5.06(d, $J$ = 14.4 Hz, 1H), 4.79(d, $J$ = 14.5 Hz, 1H), 4.74(d, $J$ = 14.3 Hz, 1H), 4.63(d, $J$ = 14.5 Hz, 1H), 2.44(s, 3H)
A03	83.2	123 – 125	calcd. for C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> F <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>4</sub> Na 531.1563[M + Na] <sup>+</sup> , found 531.1577	97.24	8.34(s, 1H), 8.03(s, 1H), 7.83(s, 1H), 7.72(d, $J$ = 8.9 Hz, 1H), 7.21(ddd, $J$ = 11.8, 9.1, 2.4 Hz, 1H), 7.15 – 7.05(m, 2H), 6.98(dd, $J$ = 8.9, 2.5 Hz, 1H), 6.77(td, $J$ = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 6.49(s, 1H), 6.17(s, 1H), 5.21(s, 2H), 5.02(d, $J$ = 14.4 Hz, 1H), 4.75(d, $J$ = 14.5 Hz, 1H), 4.70(d, $J$ = 14.3 Hz, 1H), 4.59(d, $J$ = 14.5 Hz, 1H), 2.80(q, $J$ = 7.4 Hz, 2H), 1.22(t, $J$ = 7.4 Hz, 3H)

(to be continued)

Continued Table 1

Compd.	Yield/%	mp/°C	HR-ESI-MS $m/z$	Purity/%	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$
<b>A04</b>	90.1	129 – 130	calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_5\text{Na}$ 547.1512[M + Na] $^+$ , found 547.1507	98.66	8.33(s,1H),8.03(s,1H),7.82(s,1H),7.61(d, $J=8.8$ Hz,1H),7.21(t, $J=9.5$ Hz,1H),7.14 – 7.05(m,2H),6.97(dd, $J=8.8,2.0$ Hz,1H), 6.77(t, $J=7.5$ Hz,1H),6.48(s,1H),6.27(s, 1H),5.21(s,2H),5.01(d, $J=14.3$ Hz,1H), 4.78 – 4.68(m,2H),4.66(s,2H),4.58(d, $J=$ 14.4 Hz,1H),3.38(d, $J=24.0$ Hz,3H)
<b>A05</b>	78.6	132 – 133	calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{F}_4\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ 553.1218[M + Na] $^+$ , found 553.1253	96.24	8.33(s,1H),8.02(s,1H),7.82(s,1H),7.60(d, $J=8.9$ Hz,1H),7.21(ddd, $J=11.7,9.2,2.4$ Hz, 1H),7.10(dd, $J=15.9,8.9$ Hz,1H),7.05(d, $J=$ 2.4 Hz,1H),6.95(dd, $J=8.8,2.4$ Hz,1H),6.78 (td, $J=8.5,2.2$ Hz,1H),6.48(s,1H),5.18(s, 2H),5.01(d, $J=14.4$ Hz,1H),4.75(d, $J=$ 14.5 Hz,1H),4.69(d, $J=14.4$ Hz,1H),4.58 (d, $J=14.4$ Hz,1H)
<b>A06</b>	77.3	139 – 140	calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{17}\text{F}_5\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ 571.1124[M + Na] $^+$ , found 571.1152	97.65	8.34(s,1H),8.05(s,1H),7.83(s,1H),7.61(d, $J=7.8$ Hz,1H),7.26(d, $J=2.3$ Hz,1H),7.20 (ddd, $J=11.7,9.3,2.3$ Hz,1H),7.10(dt, $J=$ 9.2,5.6 Hz,2H),6.87(s,1H),6.76(td, $J=8.5,$ 2.2 Hz,1H),6.49(s,1H),5.25(s,2H),5.02(d, $J=14.4$ Hz,1H),4.75(d, $J=14.5$ Hz,1H),4.70 (d, $J=14.3$ Hz,1H),4.59(d, $J=14.5$ Hz,1H)
<b>A07</b>	85.2	140 – 142	calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_5\text{Na}$ 545.1362[M + Na] $^+$ , found 545.1362	95.01	8.64(s,1H),8.34(s,1H),8.05(s,1H),7.90 – 7.81(m,2H),7.21(ddd, $J=11.9,9.2,2.5$ Hz, 1H),7.17(d, $J=2.2$ Hz,1H),7.13 – 7.07(m, 1H),7.03(dd, $J=8.7,2.3$ Hz,1H),6.78(td, $J=$ 8.5,2.4 Hz,1H),6.49(s,1H),5.25(s,2H), 5.02(d, $J=14.4$ Hz,1H),4.75(d, $J=14.4$ Hz, 1H),4.70(d, $J=14.4$ Hz,1H),4.59(d, $J=$ 14.5 Hz,1H),2.57(s,3H)
<b>A08</b>	88.4	135 – 136	calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{17}\text{F}_5\text{N}_6\text{O}_5\text{Na}$ 599.1073[M + Na] $^+$ , found 599.1041	96.88	8.95(s,1H),8.34(s,1H),8.00(s,1H),7.91(s, 1H),7.82(s,1H),7.45(d, $J=8.5$ Hz,1H),7.22 (t, $J=10.3$ Hz,1H),7.12(d, $J=7.9$ Hz,1H), 6.82(s,1H),6.70(s,1H),6.48(s,1H),5.13(s, 2H),5.00(d, $J=14.3$ Hz,1H),4.76(d, $J=$ 14.5 Hz,1H),4.70(d, $J=14.5$ Hz,1H),4.58 (d, $J=14.4$ Hz,1H)
<b>A09</b>	75.2	135 – 136	calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ 531.1563[M + Na] $^+$ , found 531.1560	97.82	8.57(s,1H),8.02(s,1H),7.96(s,1H),7.67(d, $J=8.9$ Hz,1H),7.21(t, $J=9.8$ Hz,1H),7.10 (d, $J=7.4$ Hz,1H),7.04(d, $J=2.2$ Hz,1H), 6.96(dd, $J=8.9,2.2$ Hz,1H),6.78(t, $J=$ 7.5 Hz,1H),6.48(s,1H),5.19(s,2H),5.01(d, $J=14.3$ Hz,1H),4.78(d, $J=13.9$ Hz,1H),4.69 (d, $J=14.3$ Hz,1H),4.59(d, $J=14.2$ Hz,1H), 2.36(s,3H),2.07(s,3H)
<b>A10</b>	80.1	129 – 131	calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ 545.1719[M + Na] $^+$ , found 545.1751	98.88	8.39(s,1H),8.03(s,1H),7.86(s,1H),7.68(d, $J=8.9$ Hz,1H),7.25 – 7.17(m,1H),7.11(dd, $J=15.9,8.8$ Hz,1H),7.04(d, $J=2.3$ Hz,1H), 6.96(dd, $J=8.8,2.3$ Hz,1H),6.77(t, $J=$ 7.4 Hz,1H),6.49(s,1H),5.19(s,2H),5.02(d, $J=14.3$ Hz,1H),4.76(d, $J=14.4$ Hz,1H),4.70 (d, $J=14.3$ Hz,1H),4.59(d, $J=14.4$ Hz,1H), 2.56(dd, $J=14.7,7.3$ Hz,2H),2.38(s,3H), 1.05(t, $J=7.4$ Hz,3H)

(to be continued)

Continued Table 1

Compd.	Yield/%	mp/°C	HR-ESI-MS $m/z$	Purity/%	$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) $\delta$
<b>A11</b>	89.4	136 – 137	calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ 535.1312[ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , found 535.1269	97.54	8.35(s,1H), 8.03(s,1H), 7.84(s,1H), 7.69(d, $J=8.9$ Hz,1H), 7.21(ddd, $J=11.8,9.1,2.5$ Hz, 1H), 7.15(d, $J=2.5$ Hz,1H), 7.10(dd, $J=8.9,$ 2.0 Hz,1H), 7.08 – 7.04(m,1H), 6.78(td, $J=$ 8.5,2.4 Hz,1H), 6.48(s,1H), 5.20(s,2H), 5.02(d, $J=14.4$ Hz,1H), 4.75(d, $J=14.5$ Hz, 1H), 4.69(d, $J=14.3$ Hz,1H), 4.59(d, $J=$ 14.5 Hz,1H), 2.36(d, $J=2.8$ Hz,3H)
<b>A12</b>	80.6	142 – 143	calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{ClF}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ 551.1017[ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , found 551.1022	94.26	8.33(s,1H), 8.03(s,1H), 7.82(s,1H), 7.77(d, $J=9.0$ Hz,1H), 7.23 – 7.18(m,1H), 7.15(d, $J=2.4$ Hz,1H), 7.13 – 7.07(m,1H), 7.04(dd, $J=8.9,2.4$ Hz,1H), 6.77(td, $J=8.5,2.4$ Hz, 1H), 6.48(s,1H), 5.22(s,2H), 5.01(d, $J=$ 14.4 Hz,1H), 4.74(d, $J=14.5$ Hz,1H), 4.69 (d, $J=14.3$ Hz,1H), 4.58(d, $J=14.5$ Hz,1H), 2.54(s,3H)
<b>A13</b>	85.9	141 – 142	calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ 543.1563[ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , found 543.1523	95.54	8.35(s,1H), 8.02(s,1H), 7.84(s,1H), 7.50(d, $J=8.7$ Hz,1H), 7.21(ddd, $J=11.7,9.2,2.4$ Hz, 1H), 7.15 – 7.06(m,2H), 6.97(dd, $J=8.7,$ 2.4 Hz,1H), 6.78(td, $J=8.5,2.3$ Hz,1H), 6.48 (s,1H), 5.19(s,2H), 5.01(d, $J=14.4$ Hz,1H), 4.75(d, $J=14.5$ Hz,1H), 4.69(d, $J=14.3$ Hz, 1H), 4.58(d, $J=14.4$ Hz,1H), 3.05(t, $J=$ 7.5 Hz,2H), 2.74(t, $J=7.3$ Hz,2H), 2.15 – 2.06(m,2H)
<b>A14</b>	88.7	135 – 136	calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{23}\text{F}_2\text{N}_6\text{O}_4$ 533.1754[ $\text{M} - \text{H}$ ] $^-$ , found 533.1704	96.22	8.39(s,1H), 8.07(s,1H), 7.88(s,1H), 7.68(d, $J=8.9$ Hz,1H), 7.27(ddd, $J=11.8,9.1,2.5$ Hz, 1H), 7.16(dd, $J=12.4,5.5$ Hz,1H), 7.12(d, $J=$ 2.5 Hz,1H), 7.02(dd, $J=8.8,2.5$ Hz,1H), 6.88 – 6.81(m,1H), 6.53(s,1H), 5.24(s,2H), 5.07(d, $J=14.4$ Hz,1H), 4.80(d, $J=14.5$ Hz, 1H), 4.75(d, $J=14.4$ Hz,1H), 4.63(d, $J=$ 14.5 Hz,1H), 2.82(d, $J=5.5$ Hz,2H), 2.47(t, $J=5.3$ Hz,2H), 1.85 – 1.76(m,4H)
<b>A15</b>	74.1	133 – 134	calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{18}\text{F}_6\text{N}_6\text{O}_4\text{Na}$ 651.1322[ $\text{M} + \text{Na}$ ] $^+$ , found 651.1309	95.66	8.34(s,1H), 8.03(s,1H), 7.83(s,1H), 7.68 (dd, $J=14.5,8.3$ Hz,1H), 7.28(dd, $J=8.9,$ 2.4 Hz,1H), 7.25 – 7.15(m,2H), 7.09(dd, $J=$ 15.8,8.9 Hz,1H), 6.95(dd, $J=8.9,2.5$ Hz, 1H), 6.76(t, $J=8.5$ Hz,1H), 6.48(s,1H), 6.45 (s,1H), 5.23(s,2H), 5.01(d, $J=14.4$ Hz,1H), 4.75(d, $J=14.5$ Hz,1H), 4.69(d, $J=14.4$ Hz, 1H), 4.58(d, $J=14.5$ Hz,1H)

## 4 活性评价

### 4.1 体外抗真菌活性研究

根据 CLSI M27-A3 标准,本研究以氟康唑为阳性对照,评估了化合物 **A01** ~ **A15** 的体外抗真菌活性。实验选取临床常见的致病真菌,包括白色念珠菌(*C. alb*(*sc5314*)和 *C. alb*(*400616*))、平滑念珠菌(*C. par*)、光滑念珠菌(*C. gla*)、克鲁斯念珠菌(*C. kru*)、热带假丝酵母菌(*C. tro*)和新型隐球菌(*C. neo*),采用二倍稀释法测定目标化

合物的最低抑菌浓度(MIC)。

在 96 孔板中,使用 RPMI 1640 培养基对化合物进行连续二倍稀释,共设置 10 个浓度梯度,每孔加入 100  $\mu\text{L}$  药液。随后向各孔加入 100  $\mu\text{L}$  制备好的标准化菌悬液,同时设立生长对照(仅含培养基和菌液)和空白对照(仅含培养基)。将培养板密封,于 32  $^{\circ}\text{C}$  静置培养相应时间,通过肉眼观察浊度判读 MIC 值。体外抗真菌活性测试结果见表 2。

Table 2 The antifungal activities of target compounds A01 – A15

Compd.	MIC/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )						
	<i>C. alb</i> ( <i>sc5314</i> )	<i>C. alb</i> ( <i>400616</i> )	<i>C. par</i>	<i>C. gla</i>	<i>C. kru</i>	<i>C. tro</i>	<i>C. neo</i>
A01	0.25	0.06	0.125	2	1	0.25	0.25
A02	0.25	0.03	0.06	1	0.5	0.125	0.25
A03	0.25	0.03	0.03	1	0.5	0.25	0.25
A04	0.25	0.03	0.015	0.5	0.5	0.25	0.125
A05	0.25	0.03	0.015	0.5	0.25	0.25	0.125
A06	0.125	0.015	0.03	2	0.25	0.125	0.125
A07	0.125	0.015	0.03	0.25	0.125	0.25	0.125
A08	0.125	0.015	0.03	0.25	0.125	0.25	0.06
A09	0.125	0.015	0.03	0.25	0.125	0.25	0.125
A10	0.125	0.015	0.015	0.25	0.06	0.25	0.03
A11	0.06	0.008	0.015	0.25	0.06	0.125	0.03
A12	0.125	0.03	0.015	0.25	0.06	0.125	0.03
A13	1	0.25	2	2	1	0.5	0.5
A14	1	0.25	1	2	2	1	2
A15	2	0.125	1	4	8	0.5	1
fluconazole	4	0.5	4	32	32	2	4

由上述测试结果可知,目标化合物 A01 ~ A15 均展现出较强的抗真菌活性, MIC 值范围为  $0.008 \sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 明显优于阳性对照氟康唑。其中, 化合物 A11 对所有测试菌株的抑制活性最强, MIC 值为  $0.008 \sim 0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在所有测试菌株中, 目标化合物对 *C. alb* (400616) 的抑制效果最佳, MIC 值为  $0.008 \sim 0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当香豆素环上的取代基由单取代变为双取代时, 抗真菌活性无明显变化; 将取代基改为环状结构时, 抗真菌活性略有下降, 这可能是因为大体积基团难以深入 CYP51 狭窄的疏水通道 II 中。

#### 4.2 抗真菌作用机制研究

本研究选取体外抗真菌活性最优的化合物 A11 作为代表, 以氟康唑为阳性对照, 采用 GC-MS 法分析真菌细胞膜甾醇组分的变化, 以探讨其作用机制。具体步骤如下: 将活化后的真菌菌悬液浓度调至  $1 \times 10^6 \text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 分别接种至含化合物 A11 的 YPD 液体培养基和不含药物的对照培养基中, 于  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  振荡培养 24 h。培养结束后, 样品经  $12\ 000 \text{ g}$  离心 10 min, 吸弃上清液, 菌体用 PBS 洗涤两次, 收集菌沉淀。随后加入质量分数为 15% 的氢氧化钠-乙醇/水皂化液, 于  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中皂化 1 h。冷却后用环己烷萃取, 水洗, 在  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴中挥干溶剂。所得残余物用色谱级环己烷溶解, 采用 GC-MS 进行甾醇组分分析, 以验证其抗真菌作用机制。测试结果见图 5。

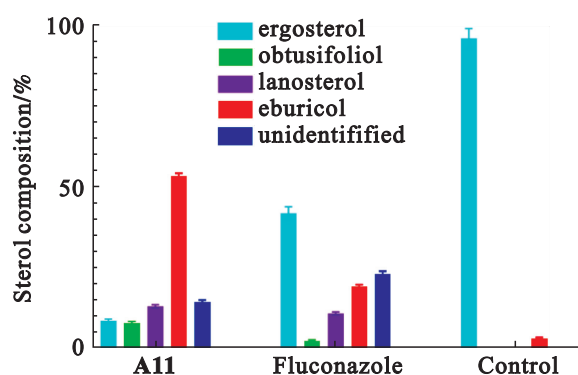


Figure 5 Fungal sterol composition analysis

唑类衍生物通过抑制 CYP51 活性, 可显著阻断麦角甾醇 (ergosterol) 的生物合成, 并导致甲基化甾醇[如钝叶醇 (obtusifoliol)、羊毛甾醇 (lanosterol)、齿孔醇 (eburicol)] 在胞内蓄积。如图 5 所示, 对照组中麦角甾醇占总甾醇的 96.22%, 为主要组分; 经化合物 A11 处理后, 麦角甾醇含量下降至 9.24%, 其他甾醇含量相应升高。该变化趋势与氟康唑处理组基本一致, 表明化合物 A11 可能通过抑制 CYP51, 干扰麦角甾醇合成途径, 从而发挥抗真菌作用。

#### 4.3 体外抗耐药真菌活性研究

本研究进一步测试了目标化合物 A01 ~ A15 对五种临床分离得到的唑类耐药白色念珠菌的抑制活性, 选用氟康唑为阳性对照。测试结果如表 3 所示, 阳性对照氟康唑对五株耐药菌均无抑制

作用, MIC  $> 128 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 而目标化合物对这些菌株均表现出一定的抗菌活性, MIC 值为  $0.25 \sim 32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。其中, 化合物 **A11** 抑制活性最佳,

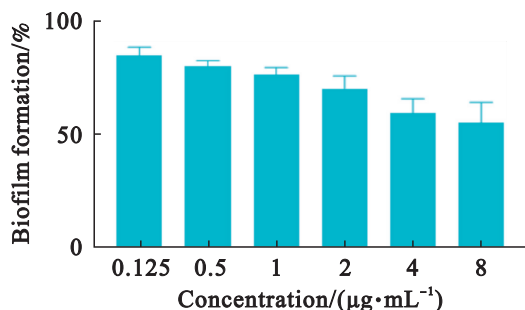
MIC 值为  $0.25 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 提示其具有良好的开发潜力。

**Table 3** *In vitro* antifungal activities of target compounds **A01** – **A15** against azole-resistant *Candida albicans* strains

Compd.	MIC/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$				
	Strain CaR	Strain 17#	Strain 632	Strain 904	Strain 901
<b>A01</b>	0.5	0.5	1	2	1
<b>A02</b>	0.5	2	2	2	4
<b>A03</b>	0.5	1	2	1	1
<b>A04</b>	0.5	1	1	2	2
<b>A05</b>	0.5	1	0.5	1	1
<b>A06</b>	0.5	1	1	0.5	0.5
<b>A07</b>	1	2	2	2	2
<b>A08</b>	1	4	2	4	2
<b>A09</b>	2	4	0.5	1	2
<b>A10</b>	2	2	1	2	2
<b>A11</b>	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>A12</b>	1	8	2	2	2
<b>A13</b>	8	16	16	8	16
<b>A14</b>	8	16	16	8	16
<b>A15</b>	16	32	32	32	32
fluconazole	$> 128$	$> 128$	$> 128$	$> 128$	$> 128$

#### 4.4 生物膜形成抑制研究

为初步探究目标化合物的抗耐药机制, 本研究进一步考察了化合物 **A11** 对氟康唑耐药白色念珠菌 904 成熟生物膜的破坏作用。将活化后的真菌用 RPMI 1640 培养基调整浓度至  $1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 在 96 孔板中每孔加入  $100 \mu\text{L}$  菌悬液,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 24 h 以形成成熟生物膜。弃去培养基, 用无菌 PBS 洗涤 3 次, 加入  $200 \mu\text{L}$  不同浓度的化合物 **A11**, 继续于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 24 h。孵育结束后, 吸弃上清液, 用 PBS 洗涤 3 次, 加入  $100 \mu\text{L}$  新鲜配制的 XTT-甲萘醌溶液,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  避光孵育 2 h。吸取  $70 \mu\text{L}$  上清液, 使用酶标仪于  $492 \text{ nm}$  波长处测定吸光度 (OD 值), 并计算生物膜抑制率。结果如图 6 所示。



**Figure 6** Effect of compound **A11** against biofilm formation of azole-resistant strain 904

结果显示, 化合物 **A11** 可浓度依赖性地有效破坏成熟生物膜, 提示这可能是其克服真菌耐药性的潜在机制之一。

#### 4.5 分子对接研究

为进一步阐明目标化合物活性增强的分子机制, 本研究将化合物 **A01** 与氟康唑对接到白色念珠菌 CYP51 (PDB: 5TZ1) 的活性口袋中, 比较二者的结合模式差异。

分子对接采用 AUTODOCK 4.2 完成, 所得结果通过 Pymol 进行可视化分析。结果如图 7 所示, **A01** 与氟康唑的整体结合模式较为相似, 其三氮唑环和二氟苯基片段能够与周围氨基酸残基产生保守的相互作用。二者的主要差异体现在疏水通道 II 区域: **A01** 结构中的香豆素环能够更深入地向该通道内部延伸, 并与远端残基 His377、Tyr64 及 Pro230 形成额外的疏水作用与范德华力, 这种独特的结合方式有助于提升化合物与靶点的结合稳定性。结合自由能 (对接分数) 计算结果显示, 化合物 **A01** 与 CYP51 的结合自由能为  $-7.215 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 低于氟康唑的  $-4.980 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 从能量角度进一步证实了 **A01** 具有更强的结合亲和力和更高的抗真菌活性。

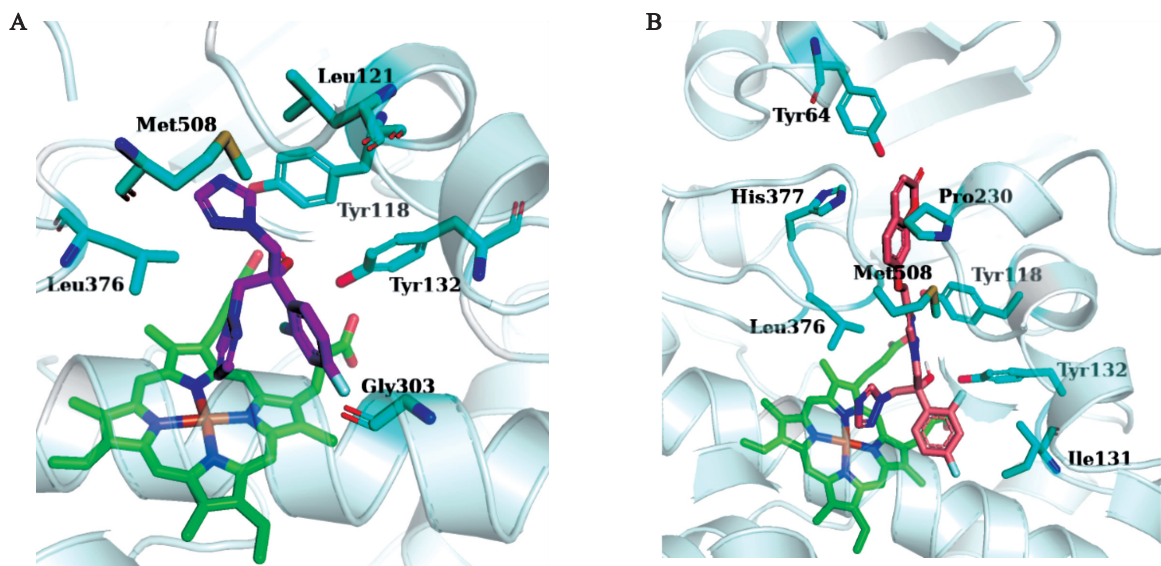


Figure 7 Fluconazole (A) and compound A01 (B) were docked into the active site of *Candida albicans* CYP51

## 5 结果与讨论

本研究以 1-[2-(2,4-二氟苯基)-2,3-环氧丙烷]-1*H*-1,2,4-三氮唑为起始原料,与叠氮化钠发生开环反应后,通过点击化学策略合成了 15 种含香豆素结构的唑类衍生物,所有目标化合物的结构均经  $^1\text{H-NMR}$  和 HR-ESI-MS 确证。体外抗真菌活性测试结果显示,在同一受试菌株中,目标化合物的抑菌活性均优于阳性对照氟康唑,其中化合物 **A11** 活性最优, MIC 值为  $0.008 \sim 0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。GC-MS 分析发现,目标化合物可显著抑制麦角甾醇的生物合成,表明其作用靶点可能为 CYP51。值得注意的是,大部分目标化合物对五种临床分离得到的耐药菌也展现出良好的抑制活性,化合物 **A11** 效果最佳, MIC 值为  $0.25 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,且可浓度依赖性地破坏成熟生物膜。综上所述,该类含香豆素结构的唑类衍生物(尤其是化合物 **A11**)具有良好的抗真菌活性及抗耐药菌潜力,值得开展进一步结构优化与机制研究。

### 参考文献:

[1] De OLIVEIRA H C, BEZERRA B T, RODRIGUES M L. Antifungal development and the urgency of minimizing the impact of fungal diseases on public health [J]. ACS Bio Med Chem Au, 2022, 3 (2): 137 - 146.

[2] WALL G, LOPEZ-RIBOT J L. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy [J]. Antibiotics (Basel), 2020, 9 (8):

445.

[3] PATHAKUMARI B, LIANG G, LIU W. Immune defence to invasive fungal infections: a comprehensive review [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 130: 110550.

[4] SULEYMAN G, ALANGADEN G J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention [J]. Infect Dis Clin N Am, 2016, 30 (4): 1023 - 1052.

[5] HILL R C, CAPLAN A S, ELEWSKI B, et al. Expert panel review of skin and hair dermatophytes in an era of antifungal resistance [J]. Am J Clin Dermatol, 2024, 25 (3): 359 - 389.

[6] NEOH C F, JEONG W, KONG D C, et al. The anti-fungal pipeline for invasive fungal diseases: what does the future hold? [J]. Expert Rev Anti-infect, 2023, 21 (6): 577 - 594.

[7] ENOCH D A, YANG H, ALIYU S H, et al. The changing epidemiology of invasive fungal infections [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1508: 17 - 65.

[8] LI Z, LU G, MENG G. Pathogenic fungal infection in the lung [J]. Front Immunol, 2019, 10: 1524.

[9] CHAKRAVARTY A, PANCHAGNULA M V, PATANKAR N A. Inhalation of virus-loaded droplets as a clinically plausible pathway to deep lung infection [J]. Front Physiol, 2023, 14: 1073165.

[10] GIANNELLA M, LANTERNIER F, DELLIERE S, et al. Invasive fungal disease in the immunocompromised host: changing epidemiology, new antifungal therapies, and management challenges [J]. Clin Microbiol Infect, 2025, 31 (1): 29 - 36.

- [11] PERFECT J R. The antifungal pipeline: a reality check [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16 (9): 603–616.
- [12] GARG A, SHARMA G S, GOYAL A K, et al. Recent advances in topical carriers of anti-fungal agents [J]. *Heliyon*, 2020, 6(8): 1–12.
- [13] WAL P, SARASWAT N, VIG H. A detailed insight onto the molecular and cellular mechanism of action of the antifungal drugs used in the treatment of superficial fungal infections [J]. *Curr Drug Ther*, 2022, 17(3): 148–159.
- [14] MIJALJICA D, SPADA F, HARRISON I P. Emerging trends in the use of topical antifungal-corticosteroid combinations [J]. *J Fungi*, 2022, 8(8): 812.
- [15] AHMED M Z, RAO T, SAEED A, et al. Antifungal drugs: mechanism of action and resistance [M]. Cham: Springer International Publishing, 2021: 143–165.
- [16] KALE P, JOHNSON L B. Second-generation azole antifungal agents [J]. *Drugs Today*, 2005, 41 (2): 91–105.
- [17] BISWAS B, THAKUR A. Fungal fighters: a comprehensive guide to antifungal therapies of the past, present, and future [M]. Singapore: Springer Nature Singapore, 2024: 43–64.
- [18] MAERTENS J A, RAAD I I, MARR K A, et al. Isavuconazole versus voriconazole for primary treatment of invasive mould disease caused by aspergillus and other filamentous fungi (SECURE): a phase 3, randomised-controlled, non-inferiority trial [J]. *Lancet*, 2016, 387(10020): 760–769.
- [19] HOY S M. Oteseconazole: first approval [J]. *Drugs*, 2022, 82(9): 1017–1023.
- [20] SOBEL J D, NYIRJESY P. Oteseconazole: an advance in treatment of recurrent vulvovaginal candidiasis [J]. *Future Microbiol*, 2021, 16: 1453–1461.
- [21] DEMIR K K, BUTLER-LAPORTE G, DELCORPO O, et al. Comparative effectiveness of amphotericin B, azoles and echinocandins in the treatment of candidemia and invasive candidiasis: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Mycoses*, 2021, 64(9): 1098–1110.
- [22] WALL G, LOPEZ-RIBOT J L. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy [J]. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9(8): 445.
- [23] XU C Z, MA R X, ZHANG J L, et al. Antifungal activity of ruthenium (II) complex combined with fluconazole against drug-resistant *Candida albicans* *in vitro* and its anti-invasive infection *in vivo* [J]. *J Inorg Biochem*, 2024, 255: 112522.
- [24] AN L, HUANG X, ZHONG M, et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of minocycline albumin nanoparticles in combination with fluconazole against azole-resistant *Candida* spp. [J]. *BMC Microbiol*, 2025, 25(1): 477.
- [25] ZHANG G Q, LIU R R, WU X D, et al. Design, synthesis and evaluation of HSP90 inhibitors combined with fluconazole against azole-resistant candidiasis [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2024, 34(1): 31–41.
- [26] PAPPAS P G, KAUFFMAN C A, ANDES D, et al. Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the infectious diseases society of America [J]. *Clin Infect Dis*, 2016, 62(4): e1–e50.
- [27] LILA A S A, RAJAB A A H, ABDALLAH M H, et al. Biofilm lifestyle in recurrent urinary tract infections [J]. *Life*, 2023, 13(1): 148.
- [28] VILA T, SULTAN A S, MONTELONGO-JAUREGUI D, et al. Oral candidiasis: a disease of opportunity [J]. *J Fungi*, 2020, 6(1): 15.
- [29] ANNUNZIATA F, PINNA C, DALLAVALLE S, et al. An overview of coumarin as a versatile and readily accessible scaffold with broad-ranging biological activities [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(13): 4618.
- [30] YANG G, JIN Q, XU C, et al. Synthesis, characterization and antifungal activity of coumarin-functionalized chitosan derivatives [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 106: 179–184.
- [31] GORNIK I, BARTOSZEWSKI R, KROLICZEWSKI J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids [J]. *Phytochem Rev*, 2019, 18(1): 241–272.

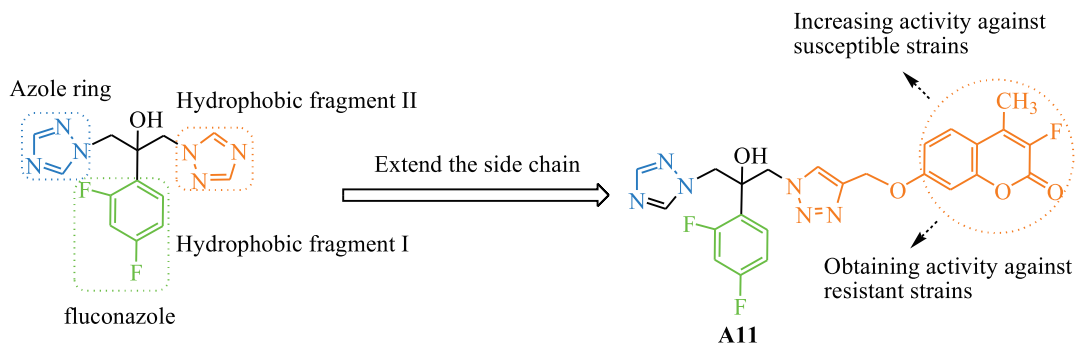
# Design, synthesis and antifungal activities evaluation of novel coumarin-containing azole derivatives as CYP51 inhibitors

WANG Ye, WANG Yitong, LU Jia, LIU Na, LI Jianing, GUO Chun\*, HOU Zhuang\*

(Key Laboratory of Structure-Based Drugs Design and Discovery

(Shenyang Pharmaceutical University), Ministry of Education, Shenyang 110016, China)

**Abstract:** To discover CYP51 inhibitors with anti-drug-resistant fungal activity, a series of novel azole derivatives containing a coumarin moiety were designed and synthesized, followed by evaluations of their antifungal activities and investigations into the underlying mechanism of action. Using 1-[2-(2,4-difluorophenyl)-2,3-epoxypropane]-1*H*-1,2,4-triazole (**1**) as the starting material, ring-opening reaction with sodium azide afforded intermediate **2**. Subsequent cycloaddition of intermediate **2** with 7-propargyloxycoumarins bearing different substituents (**3a** – **3o**) yielded the target compounds **A01** – **A15**, whose chemical structures were all confirmed by <sup>1</sup>H-NMR and HR-ESI-MS. The broth microdilution method was adopted to determine the inhibitory activities of the target compounds against seven strains of standard fungi and five strains of drug-resistant fungi, with fluconazole as the positive control, and relevant mechanistic studies were also conducted. *In vitro* antifungal activity assays demonstrated that all target compounds exhibited potent inhibitory activities against the tested standard and drug-resistant fungal strains. Among them, compound **A11** showed superior antifungal activity to the positive control fluconazole, indicating its potential for further research.



**Key words:** CYP51; inhibitor; coumarin; antifungal