

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ ФЛУКОНАЗОЛА С АЛАНИНОМ, ЛИЗИНОМ И ТРЕОНИНОМ

В. В. Чаговец ✉, Н. Л. Стародубцева, В. Е. Франкевич

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Изучение механизмов действия препаратов триазола и понимание молекулярной основы их аффинности и специфичности может быть использовано для рациональной разработки новых лекарственных средств. Целью работы было изучить комплексы представителя класса триазолов флуконазола с аминокислотами с помощью масс-спектрометрии, молекулярной динамики и квантово-химических *ab initio* расчетов. В ходе экспериментального исследования с помощью масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией и tandemной масс-спектрометрии были проанализированы растворы флуконазола, аланина, лизина и треонина. Молекулярно-динамическое моделирование комплексов флуконазола с аминокислотами проводили с использованием силового поля CHARMM. Квантово-химические расчеты структуры и энергетических параметров комплексов проводили на уровне теории функционала плотности с использованием функций B3LYP с базисом 3-21G и 6-311++G**. Масс-спектры показали, что флуконазол образует стабильные комплексы с аминокислотами в стехиометрическом соотношении 1 : 1. По результатам tandemной масс-спектрометрии с варьированием энергии фрагментации ионов-ассоциатов флуконазола с аминокислотами построен следующий ряд: $[Fluc + Ala + H]^+ < [Fluc + Lys + H]^+ < [Fluc + Thr + H]^+$. Получившиеся в результате квантово-химических расчетов энергии взаимодействия между флуконазолом и аминокислотой образуют ряд, аналогичный полученному по экспериментальным данным. Таким образом, на примере комплексов флуконазола с аминокислотами продемонстрирована возможность комбинирования экспериментальных масс-спектрометрических исследований и квантово-химического моделирования для изучения свойств таких комплексов.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, молекулярная динамика, квантовая химия, фармакология, противогрибковые препараты

Финансирование: работа выполнена в рамках соглашения № 05.604.21.0241 «Разработка технологии персонализированного лечения матерей и новорожденных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, вызванными мультирезистентными штаммами микроорганизмов, на основании генотипирования возбудителей и терапевтического лекарственного мониторинга антимикробных препаратов» (мероприятие 1,2, очередь 1) Министерства науки и высшего образования РФ. Программа: «Исследование и разработка по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы». Уникальный идентификатор проекта RFMEFI60419X0241.

Вклад авторов: В. В. Чаговец, В. Е. Франкевич, Н. Л. Стародубцева — концепция и дизайн исследования, обработка материала; В. В. Чаговец — статистическая обработка данных; В. В. Чаговец, Н. Л. Стародубцева — написание текста; В. Е. Франкевич — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Уральского государственного медицинского университета (протокол № 1451/19 от 20 сентября 2019 г.). Получено добровольное информированное согласие на участие пациента в научном исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Виталий Викторович Чаговец
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117198; vvchagovets@gmail.com

Статья получена: 22.07.2020 **Статья принята к печати:** 13.08.2020 **Опубликована онлайн:** 22.08.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.048

COMPLEXES OF FLUCONAZOLE WITH ALANINE, LYSINE AND THREONINE: MASS SPECTROMETRY AND THEORETICAL MODELING

Chagovets VV ✉, Starodubtseva NL, Frankevich VE

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V. I. Kulakov, Moscow, Russia

Investigation of the triazole-derived drugs action mechanisms and understanding of their affinity and specificity molecular basis may contribute to the new drugs development. The study was aimed to investigate the triazoles class representative (fluconazole) complexes with amino acids using mass spectrometry, molecular dynamics and *ab initio* quantum chemistry calculations. During the experimental study, the fluconazole, alanine, lysine and threonine solutions were analyzed by electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. The molecular dynamics modeling of the fluconazole–amino acid complexes was performed using the CHARMM force field. The quantum chemistry calculations of the complexes structure and energy parameters were carried out using the density-functional theory by B3LYP calculations (3-21G and 6-311++G** basis sets). Mass spectra indicated that fluconazole formed stable complexes with amino acids in the 1 : 1 stoichiometric ratio. In accordance with the tandem mass spectrometry with varying fluconazole–amino acid associates ion fragmentation energy, the following sequence was obtained: $[Fluc + Ala + H]^+ < [Fluc + Lys + H]^+ < [Fluc + Thr + H]^+$. The fluconazole–amino acid interaction energy values resulting from the quantum chemistry calculations formed the sequence similar to that obtained by experiment. Thus, as seen in the case of fluconazole–amino acid complexes, it is possible to combine the experimental mass spectrometry studies with quantum chemical modeling for the complexes properties assessment.

Keywords: mass spectrometry, molecular dynamics, quantum chemistry, pharmacology, antifungal drugs

Funding: the study was carried out as a part of the convention № 05.604.21.0241, Development of a Technology for Personalized Treatment of Mothers and Newborns With Infectious and Inflammatory Diseases Caused by Multi-resistant Strains of Microorganisms, Based on Genotyping of Pathogens and Therapeutic Drug Monitoring of Antimicrobial Drugs (item 1.2, queue 1), of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. Programme for Research and Development in Priority Areas of Development of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014-2020. Project ID: RFMEFI60419X0241.

Author contribution: Chagovets VV, Frankevich VE, Starodubtseva NL — study concept and design, data processing; Chagovets VV — statistical analysis; Chagovets VV, Starodubtseva NL — manuscript writing; Frankevich VE — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of Ural State Medical University (Protocol № 1451/19 dated September 20, 2019). The patient gave informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Vitaliy V. Chagovets
Oparina, 4, Moscow, 117198; vvchagovets@gmail.com

Received: 22.07.2020 **Accepted:** 13.08.2020 **Published online:** 22.08.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.048

Целью триазолов является продукт гена *ERG11* — цитохром-P450-стерол-14 α -деметилаза (CYP51). Фермент CYP51 превращает ланостерол в эргостерол, являясь частью пути биосинтеза основного компонента мембраны клеток грибов [1]. Ингибирование синтеза эргостерола замедляет развитие мицелиальных клеток за счет накопления токсичных стероидов, таких как метилированный стерол [2–4], нарушая целостность мембраны, текучесть и проницаемость [5]. Флуконазол (Fluc) действует как конкурентный ингибитор CYP51 и в настоящее время эффективен для лечения многих патогенных грибов.

Для лечения микозов и устойчивости к противогрибковым лекарственным средствам необходима разработка новых классов соединений. Противомикозные препараты относительно трудно разрабатывать по сравнению с антибактериальными из-за эукариотической природы клеток, к тому же противогрибковые препараты, основанные на триазольных соединениях, такие как флуконазол, постепенно становятся недостаточными для лечения многих инфекций. Необходимость разработки новых лекарственных средств побуждает к изучению молекулярных механизмов ингибирования препаратов триазола, что позволит понять молекулярную основу аффинности и специфичности флуконазола.

Ранее молекулярное моделирование использовали для поиска аналогов пиразола. Их искали, исходя из структуры белка CYP51-Ca [6, 7]. Кроме того, с помощью молекулярного моделирования выяснили особенности и механизмы взаимодействия различных ингибиторов с CYP51 [8] и роль мутаций в стабильности и аффинности связывания ферментов [9, 10]. Молекулярная динамика позволила также исследовать причины наибольшего сродства флуконазола к ферментам грибов по сравнению с микобактериальными и человеческими ортологами [11]. Недавно был опубликован обзор стратегий моделирования, используемых для конструирования лигандов для P450 [12].

На основании анализа баз данных был найден набор консервативных аминокислот (AA) [13, 14]. Из них с помощью молекулярно-динамического моделирования выделили три, играющие решающую роль в связывании белка с ингибитором: треонин (Thr77), аланин (Ala258) и лизин (Lys454) [8].

Хотя исследования молекулярной механики могут предсказать аминокислоты, участвующие в образовании комплекса белок–ингибитор, важно иметь набор экспериментальных методов, позволяющих проверить результаты моделирования. Экспериментальный подход, основанный на масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ЭРИ-МС), может оказаться надежным методом для прогнозирования взаимодействий хозяин–гость и быть комплементарным теоретическим расчетам, в которых использованы модели молекулярной механики.

ЭРИ-МС широко используют для изучения нековалентных взаимодействий белков и других биомолекул [15–17]. Процедура мягкой ионизации позволяет молекулярным комплексам сохранять в газовой фазе информацию об их структуре в растворе [18]. За последние десятилетия резко растущее число статей, посвященных изучению нековалентных взаимодействий с помощью МС, свидетельствует о том, что МС стала важной технологией в этой области благодаря высокой скорости анализа, чувствительности и использованию малых объемов образцов [19]. МС использовали для исследования взаимодействий хозяина и гостя [20–25].

Нековалентные взаимодействия между флуконазолом и аминокислотами как элементарные шаги образования белок-ингибиторных комплексов ранее не исследовали.

Целью данной работы было изучение комплексов флуконазола с аминокислотами в газовой фазе с помощью ЭРИ-МС, а также исследование структурных и энергетических параметров комплексов с помощью молекулярной динамики и квантово-химических *ab initio* расчетов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Флуконазол (Fluc), аланин (Ala), лизин (Lys), треонин (Thr), метиловый спирт (степени очистки для жидкостной хроматографии) были приобретены у Merck (Merck; Германия). Деионизированную воду готовили с помощью установки Milli-Q Reference Water Purification System (Merck; Франция). Исходный раствор каждой аминокислоты и флуконазола готовили в метаноле в концентрации 10 ммоль/мл. Для масс-спектрометрического исследования индивидуальных соединений исходные растворы разбавляли водой до концентрации 1 ммоль/мл. Образцы для исследования комплексов флуконазола с аминокислотами с помощью tandemной масс-спектрометрии готовили путем смешивания исходных растворов флуконазола и одной из аминокислот в объемном отношении 1 : 1. Полученные таким образом растворы разбавляли водой до 1 ммоль/мл каждого компонента и перемешивали в течение 30 с. Образец для сравнения относительных интенсивностей комплексов флуконазола с аминокислотами готовили путем смешивания равных объемов исходных растворов флуконазола, аланина, лизина и треонина. Затем раствор разбавили водой до 1 ммоль/мл каждого компонента и перемешивали в течение 30 с. Все образцы готовили при комнатной температуре.

Экспериментальные исследования проводили на масс-спектрометре MaxisImpact с гибридным квадруполь-времяпролетным анализатором и источником с электрораспылительной ионизацией (BrukerDaltonics; Германия). Масс-спектрометр работал в режиме положительных ионов при следующих условиях: диапазон масс m/z — 50–1000, напряжение на игле — 4,5 кВ, распыляющий газ подавали под давлением 0,6 бар, поток осушающего газа составлял 5,0 л/мин, температура осушающего газа — 200 °С. Эксперименты с tandemной масс-спектрометрией осуществляли с окном изоляции ионов m/z — 3 и вариацией энергии столкновений. Анализ проводили в режиме прямого ввода образца с помощью шприцевого насоса kdScientific (kdScientific; США) с потоком 3 мкл/мин.

Молекулярно-динамическое исследование комплексов Fluc + AA осуществляли с помощью программы NAMD [26]. Силовое поле для моделирования исследуемых комплексов было разработано на основании CHARMM General Force-Field (v3.1) [27, 28]. Типы атомов и частично заряды на атомах флуконазола подбирали по аналогии. Недостающие параметры связей, углов и двугранных углов, а также недостающие заряды на атомах флуконазола были оптимизированы с помощью Force Field Toolkit (ffTK) — плагина программы VMD [26].

Квантово-химические расчеты структуры и энергетических параметров комплексов флуконазола с аминокислотами проводили с использованием программ GAMESS [29]. Полную оптимизацию геометрии комплексов для изучения структурных и энергетических свойств проводили на уровне теории функционала плотности

(DFT) с использованием функций B3LYP с базисом 3-21G и 6-311++G** с диффузными и поляризационными орбиталями.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При исследовании растворов отдельных аминокислот методом ЭРИ-МС были зарегистрированы пики, соответствующие протонированным аминокислотам, а также их аддуктам с катионом натрия. В ЭРИ-МС экспериментах с растворами, содержащими как аминокислоту, так и флуконазол в воде, выявлены ассоциаты аминокислот с молекулой лекарственного препарата, что свидетельствует о достаточной стабильности таких комплексов в газовой фазе.

На рис. 1 представлен ЭРИ-масс-спектр положительных ионов раствора, содержащего все три аминокислоты и флуконазол в воде в эквимольных концентрациях. О возможности образования ассоциатов свидетельствуют пики $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ (m/z 396), $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ (m/z 453) и $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ (m/z 426). С учетом интенсивностей соответствующих пиков можно построить следующий ряд (табл. 1): $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+ < [\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+ < [\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$. Поскольку интенсивность масс-спектрометрического пика пропорциональна количеству соответствующих ионов, достигших детектора, можно предположить, что указанная последовательность справедлива и для энергии взаимодействия в комплексе, однако в интенсивность иона ассоциата, помимо стабильности, вносят вклад его эффективность ионизации, стабильность отдельных компонентов комплекса и др. Для дополнительной экспериментальной оценки стабильности комплексов и энергии взаимодействия были зарегистрированы и проанализированы тандемные масс-спектры, полученные в результате столкновительно-индуцированной диссоциации исследуемых ассоциатов. На рис. 2 представлены масс-спектры фрагментации комплексов $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ (рис. 2А), $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ (рис. 2Б), и $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ (рис. 2С). В масс-спектрах выявлены пики комплексов, а также пики фрагментов комплексов, обусловленные протонированным флуконазолом, в случае фрагментации ассоциатов с аланином и треонином, и протонированным лизином в случае фрагментации его ассоциата с флуконазолом. Таким образом, на этом этапе можно сделать вывод, что фрагментация рассматриваемых комплексов идет по двум направлениям: либо потеря нейтральной аминокислоты, либо нейтрального флуконазола. По всей видимости, это связано с различным сродством данных молекул к протону. Для количественной оценки стабильности исследуемых комплексов проанализировали интенсивности пиков в тандемных масс-спектрах с варьированием энергии столкновений. На рис. 3 представлены зависимости интенсивности иона-предшественника от энергии столкновений. Относительную стабильность ассоциатов флуконазола с различными аминокислотами оценивали путем сравнения энергии, необходимой для снижения интенсивности пика иона-предшественника на 50%. Для рассматриваемых комплексов эти величины составили 23, 25 и 29 эВ в комплексах с аланином, лизином и треонином соответственно (табл. 1).

Таким образом, в масс-спектрах растворов, содержащих флуконазол и аланин, треонин или лизин, были выявлены кластеры $[\text{Fluc} + \text{AA} + \text{H}]^+$. Поскольку удалось экспериментально оценить их стабильность, представляет интерес оценить энергию взаимодействия флуконазола с

каждой из рассматриваемых аминокислот, что и составило предмет описываемых далее молекулярно-динамического моделирования и квантово-химических расчетов.

Выбор начальной структуры играет решающую роль для оптимизации геометрии молекулы методами квантовой химии. Поскольку как аминокислоты, так и флуконазол обладают большим числом степеней свободы и конформационно подвижны, в данной работе выбор начальной структуры для квантово-химических расчетов осуществляли с помощью молекулярной динамики методом симуляции отжига. Выбор того, какая из молекул в комплексе, флуконазол или аминокислота, является акцептором протона, осуществляли на основании тандемных масс-спектров (см. рис. 2). В комплексах $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ и $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ протонированным был флуконазол, а в комплексе $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ протон локализовался на лизине. Полученные в результате симуляции отжига структуры оптимизировали методом B3LYP сначала с базисом 3-21G, а затем с базисом 6-311++G**. Полученные в результате оптимизации структуры комплексов представлены на рис. 4. В комплексах $[\text{Fluc} + \text{Ala} + \text{H}]^+$ и $[\text{Fluc} + \text{Thr} + \text{H}]^+$ оптимизация геометрии привела к смещению протона в сторону флуконазола, а в случае комплекса $[\text{Fluc} + \text{Lys} + \text{H}]^+$ протон локализован на лизине, что согласуется с предположением, высказанным на основании экспериментальных данных. Причиной такого поведения аминокислот по отношению к протону может быть различное сродство к протону у аминокислот и флуконазола, а также значение pI , которое для лизина составляет 9,74, а для аланина и треонина 6 и 5,6 соответственно. На основании выполненного моделирования были рассчитаны энергии образования комплексов по формуле $IE = E_{AB} - E_A - E_B$, где E_{AB} — энергия комплекса, E_A и E_B — энергии компонентов

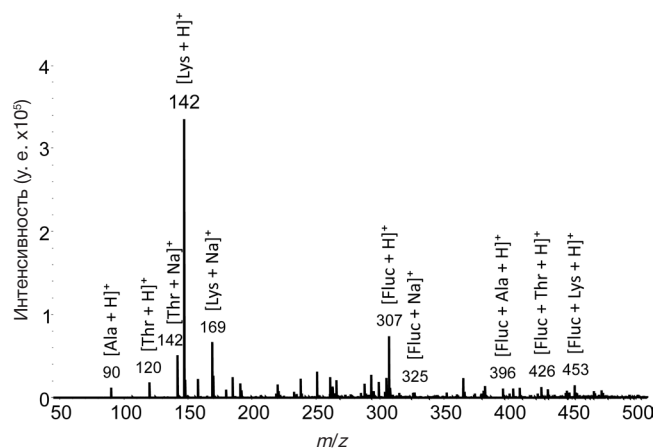


Рис. 1. Масс-спектр положительных ионов образца, содержащего флуконазол, аланин, треонин и лизин

Таблица 1. Параметры, характеризующие комплексы аминокислот с флуконазолом

Аминокислоты в составе комплекса	I, у.е. ¹	CE ₅₀ , эВ ²	B3LYP/6-311++G** IE, кДж/моль ³
Ala	15061	23	-56.8226463
Lys	17540	25	-65.600743
Thr	18325	29	-97.663349

Примечание: ¹ — интенсивность пика комплекса в масс-спектре, измеренная в условных единицах (рис. 1); ² — энергия, необходимая для снижения интенсивности пика предшественника в тандемных масс-спектрах на 50%; ³ — энергия взаимодействия в комплексе, рассчитанная методом квантовой химии B3LYP/6-311++G**.

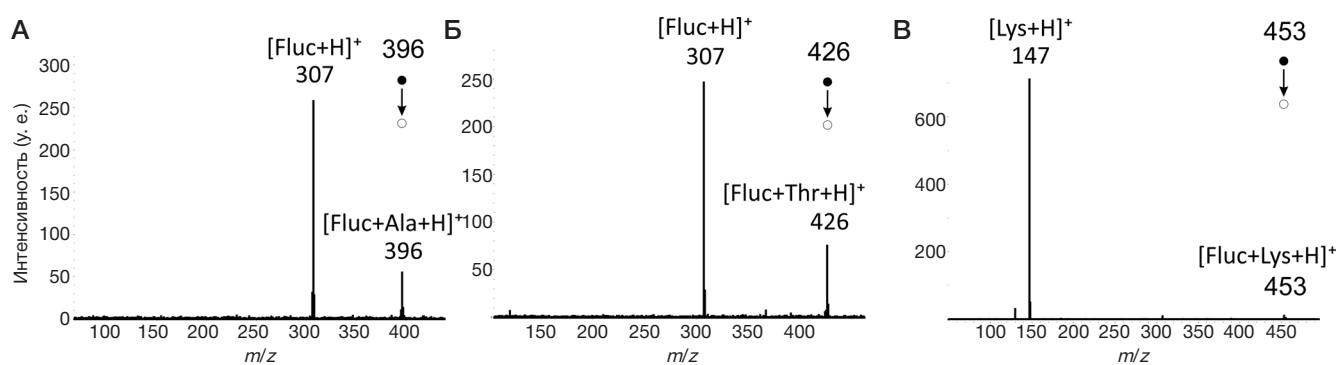


Рис. 2. Тандемные масс-спектры комплексов флуконазола с аланином (А), треонином (Б) и лизином (В), зарегистрированные в режиме положительных ионов

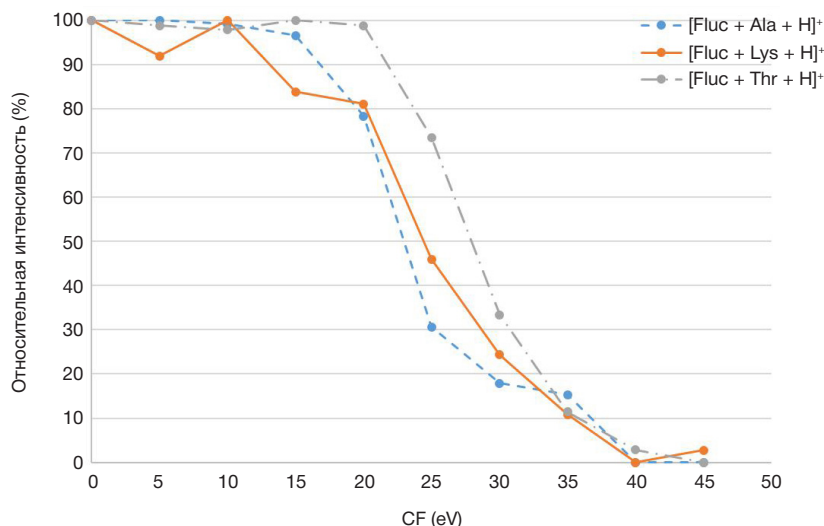


Рис. 3. Зависимость относительной интенсивности пика иона-предшественника комплекса флуконазола с аминокислотой от энергии столкновений (CE)

комплекса. В табл. 2 представлены значения энергии, полученные в результате квантово-химических расчетов методами V3LYP/3-21 и V3LYP/6-311++G^{**}. Значения энергии взаимодействия между компонентами комплекса, посчитанные методом V3LYP/6-311++G^{**}, совпадают с последовательностью, выявленной экспериментально, в то время как при расчете методом V3LYP/3-21 значение энергии взаимодействия флуконазола с лизином оказалось выше, чем с треонином. Этот факт может свидетельствовать о важности использования диффузных и поляризационных орбиталей при моделировании нековалентных комплексов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее была показана важность понимания того, какие аминокислоты участвуют в связывании триазиновых соединений и какого рода взаимодействия определяют стабильность комплексов «белок – лекарственный препарат» [11]. В упомянутой работе сравнивали взаимодействие флуконазола с различными СУР51. Энергия взаимодействия в таких комплексах является результатом конкурентных взаимодействий лиганда с остатками аминокислот в составе белка, с гемом и с молекулами воды. Взаимодействие белок–флуконазол оказалось более эффективным в СУР51 митохондрий из-за полярных взаимодействий с остатком аргинина. Однако в ферментах грибов эти взаимодействия замещает взаимодействие лиганда с гемом, которое компенсирует потерю полярной связи и приводит к более энергетически выгодному связыванию. Следовательно, разработка

лиганда с повышенной специфичностью к ферментам грибов должна быть сосредоточена на повышении полярности лиганда и усилении его взаимодействия с гемом. В то же время было высказано предположение, что более крупные гидрофобные лиганды лучше подходят для воздействия на микобактериальные и человеческие ферменты [11]. Подобные исследования демонстрируют важность понимания и учета взаимодействия лекарственных препаратов с различными компонентами их мишеней. Данная работа демонстрирует подход, который можно применять на ранних этапах проектирования и разработки новых лекарственных препаратов, позволяющая оценить стабильность комплексов лекарственного препарата с аминокислотами как с экспериментальной, так и с теоретической точки зрения.

ВЫВОДЫ

ЭРИ-МС и молекулярная динамика были использованы для изучения взаимодействия флуконазола с аминокислотами, которые, согласно литературным данным, играют решающую роль в связывании белка с ингибитором. Нековалентные комплексы оказались стабильными в газовой фазе, что позволило зарегистрировать соответствующие сигналы в масс-спектрах. С помощью тандемной масс-спектрометрии с варьированием энергии столкновений была исследована относительная стабильность зарегистрированных комплексов и построен ряд стабильности: $[Fluc + Ala + H]^+$ (23 эВ) < $[Fluc + Lys + H]^+$ (25 эВ) < $[Fluc + Thr + H]^+$ (29 эВ). Моделирование средствами молекулярной динамики и квантовой

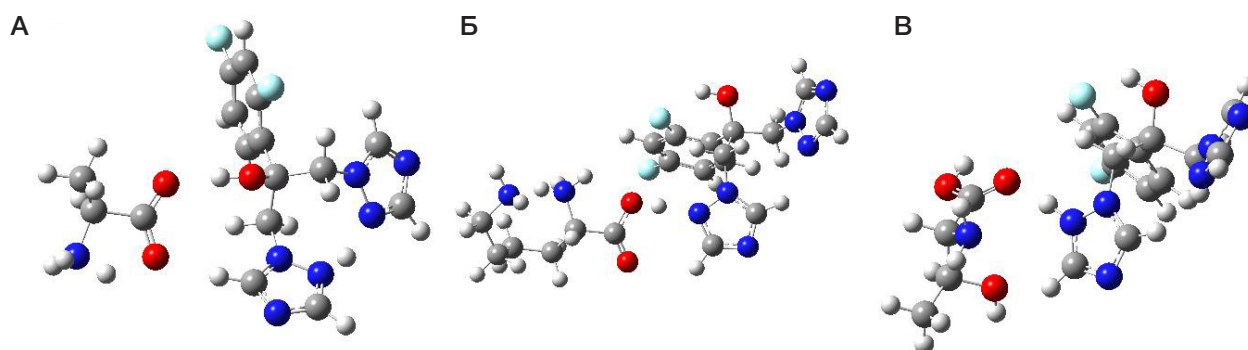


Рис. 4. Структуры комплексов флуконазола с аланином (А), лизином (Б) и треонином (Б), оптимизированные методом B3LYP/6-311++G**

Таблица 2. Значения энергии компонентов комплексов, самих комплексов флуконазола с аминокислотами, а также значения энергии взаимодействия в комплексе, рассчитанные методами квантовой химии B3LYP/3-21 и B3LYP/6-311++G**

Аминокислоты в составе комплекса	$E_{AB}(\text{Fluc} + \text{AA})$, у. е.	$E_A(\text{Fluc})$, у. е.	$E_B(\text{AA})$, у. е.	IE, у. е.	IE, кДж/моль
B3LYP/3-21					
Ala	-1422,2762	-1100,264222	-321,9574674	-0,0544686	-143,007
Lys	-1594,6453	-1100,238944	-494,3018987	-0,1044502	-274,234
Thr	-1536,1547	-1100,238944	-435,8476107	-0,0681227	-178,856
B3LYP/3-311++G**					
Ala	-1430,53104	-1106,65334	-323,85606	-0,02164	-56,82
Lys	-1603,88596	-1106,28645	-497,57453	-0,02499	-65,60
Thr	-1545,09491	-1106,63517	-438,42255	-0,03720	-97,66

химии позволило определить структуру комплексов и энергию взаимодействия в них, причем значения энергии взаимодействия, полученные методом B3LYP/6-311++G**, образуют ряд стабильности ассоциатов, аналогичный полученному с помощью эксперимента.

Такой подход комбинирования экспериментальных масс-спектрометрических исследований и квантово-химического моделирования может быть использован на начальных этапах разработки новых лекарственных препаратов и поиска молекулярных механизмов их действия.

Литература

- Balding PR, Porro CS, McLean KJ, Sutcliffe MJ, Maréchal JD, Munro AW, et al. How do azoles inhibit cytochrome P450 enzymes? A density functional study. *J Phys Chem A*. 2008; 112 (50): 12911–8.
- Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca M Del, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med*. 2002; 8 (2): 76–81.
- Marichal P, Gorrens J, Laurijssens L, Vermuyten K, Van Hove C, Le Jeune L, et al. Accumulation of 3-ketosteroids induced by itraconazole in azole-resistant clinical *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43 (11): 2663–70.
- White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11 (2): 382–402.
- Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011; 75 (2): 213–267.
- Doğan İS, Saraç S, Sari S, Kart D, Eşsiz Gökhan Ş, Vural İ, et al. New azole derivatives showing antimicrobial effects and their mechanism of antifungal activity by molecular modeling studies. *Eur J Med Chem*. 2017; 130: 124–38.
- Jacob K S, Ganguly S, Kumar P, Poddar R, Kumar A. Homology model, molecular dynamics simulation and novel pyrazole analogs design of *Candida albicans* CYP450 lanosterol 14 α -demethylase, a target enzyme for antifungal therapy. *J Biomol Struct Dyn*. 2017; 35 (7): 1446–63.
- Gao P, Cui YL, Wu RL. Molecular dynamic modeling of CYP51B in complex with azole inhibitors. *J Biomol Struct Dyn*. 2018; 36 (6): 1511–9.
- Keighobadi M, Emami S, Lagzian M, Fakhar M, Rafiei A, Valadan R. Molecular modeling and structural stability of wild-type and mutant CYP51 from *Leishmania major*: In vitro and in silico analysis of a laboratory strain. *Molecules*. 2018; 23 (3). DOI: 10.3390/molecules23030696.
- Vijayakumar S, Das P. Structural, molecular motions, and free-energy landscape of *Leishmania* sterol-14 α -demethylase wild type and drug resistant mutant: a comparative molecular dynamics study. *J Biomol Struct Dyn*. 2019; 37 (6): 1477–93.
- Honorato Siqueira T, Martínez L. Molecular simulations of fluconazole-mediated inhibition of sterol biosynthesis. *J Biomol Struct Dyn*. 2020; 38 (6): 1659–69.
- Kontoyianni M, Lacy B. Toward Computational Understanding of Molecular Recognition in the Human Metabolizing Cytochrome P450s. *Curr Med Chem*. 2018; 25 (28): 3353–73.
- Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta — Gen Subj*. 2007; 1770 (3): 467–77.
- Lepesheva GI, Waterman MR. Structural basis for conservation in the CYP51 family. *Biochim Biophys Acta — Proteins Proteomics*. 2011; 1814 (1): 88–93.
- Loo JA. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 1997; 16 (1): 1–23.
- Pramanik BN, Bartner PL, Mirza UA, Liu YH, Ganguly AK. Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: An emerging technology. *J Mass Spectrom*. 1998; 33 (10): 911–20.
- Loo JA. Electrospray ionization mass spectrometry: A technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int J Mass*

- Spectrom. 2000; 200 (1–3): 175–86.
18. Ray SS, Singh SK, Balaram P. Sulfonate (ANS) Binding to Proteins. *Data Process.* 2001; 0305 (01).
 19. Zhang S, Van Pelt CK, Wilson DB. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003; 75 (13): 3010–8.
 20. Tjernberg A, Carnö S, Oliv F, Benkestock K, Edlund PO, Griffiths WJ, et al. Determination of dissociation constants for protein-ligand complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004; 76 (15): 4325–31.
 21. Benkestock K. Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Determination of Noncovalent Interactions in Drug Discovery. 2008.
 22. Bligh SWA, Haley T, Lowe PN. Measurement of dissociation constants of inhibitors binding to Src SH2 domain protein by non-covalent electrospray ionization mass spectrometry. *J Mol Recognit.* 2003; 16 (3): 139–48.
 23. Zhang C, Chen H, Guymon AJ, Wu G, Cooks RG, Ouyang Z. Instrumentation and methods for ion and reaction monitoring using a non-scanning rectilinear ion trap. *Int J Mass Spectrom.* 2006; 255–256 (1–3): 1–10.
 24. Wu RF, Huang YD, Chu YQ, Liu ZP, Ding CF. Investigation of Non-covalent Interactions of 18-Crown-6 with Amino Acids in Gas Phase by Mass Spectrometry. *Chinese J Anal Chem.* 2018; 46 (2): 273–9.
 25. Zhang S, Van Pelt CK, Wilson DB. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003; 75 (13): 3010–8.
 26. Mayne CG, Saam J, Schulten K, Tajkhorshid E, Gumbart JC. Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit. *J Comput Chem.* 2013; 34 (32): 2757–70.
 27. Vanommeslaeghe K, Raman EP, MacKerell AD. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *J Chem Inf Model.* 2012; 52 (12): 3155–68.
 28. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem.* 2010; 31 (4): 671–90.
 29. Schmidt MW, Baldrige KK, Boatz JA, Elbert ST, Gordon MS, Jensen JH, et al. General atomic and molecular electronic structure system. *J Comput Chem.* 1993; 14 (11): 1347–63.

References

1. Balding PR, Porro CS, McLean KJ, Sutcliffe MJ, Maréchal JD, Munro AW, et al. How do azoles inhibit cytochrome P450 enzymes? A density functional study. *J Phys Chem A.* 2008; 112 (50): 12911–8.
2. Lupetti A, Danesi R, Campa M, Tacca M Del, Kelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends Mol Med.* 2002; 8 (2): 76–81.
3. Marichal P, Gorrens J, Laurijssens L, Vermuyten K, Van Hove C, Le Jeune L, et al. Accumulation of 3-ketosteroids induced by itraconazole in azole-resistant clinical *Candida albicans* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43 (11): 2663–70.
4. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11 (2): 382–402.
5. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75 (2): 213–267.
6. Doğan İS, Saraç S, Sari S, Kart D, Eşsiz Gökhan Ş, Vural İ, et al. New azole derivatives showing antimicrobial effects and their mechanism of antifungal activity by molecular modeling studies. *Eur J Med Chem.* 2017; 130: 124–38.
7. Jacob K S, Ganguly S, Kumar P, Poddar R, Kumar A. Homology model, molecular dynamics simulation and novel pyrazole analogs design of *Candida albicans* CYP450 lanosterol 14 α -demethylase, a target enzyme for antifungal therapy. *J Biomol Struct Dyn.* 2017; 35 (7): 1446–63.
8. Gao P, Cui YL, Wu RL. Molecular dynamic modeling of CYP51B in complex with azole inhibitors. *J Biomol Struct Dyn.* 2018; 36 (6): 1511–9.
9. Keighobadi M, Emami S, Lagzian M, Fakhar M, Rafiei A, Valadan R. Molecular modeling and structural stability of wild-type and mutant CYP51 from *Leishmania major*: In vitro and in silico analysis of a laboratory strain. *Molecules.* 2018; 23 (3). DOI: 10.3390/molecules23030696.
10. Vijayakumar S, Das P. Structural, molecular motions, and free-energy landscape of *Leishmania* sterol-14 α -demethylase wild type and drug resistant mutant: a comparative molecular dynamics study. *J Biomol Struct Dyn.* 2019; 37 (6): 1477–93.
11. Honorato Siqueira T, Martínez L. Molecular simulations of fluconazole-mediated inhibition of sterol biosynthesis. *J Biomol Struct Dyn.* 2020; 38 (6): 1659–69.
12. Kontoyianni M, Lacy B. Toward Computational Understanding of Molecular Recognition in the Human Metabolizing Cytochrome P450s. *Curr Med Chem.* 2018; 25 (28): 3353–73.
13. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta — Gen Subj.* 2007; 1770 (3): 467–77.
14. Lepesheva GI, Waterman MR. Structural basis for conservation in the CYP51 family. *Biochim Biophys Acta — Proteins Proteomics.* 2011; 1814 (1): 88–93.
15. Loo JA. Studying noncovalent protein complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.* 1997; 16 (1): 1–23.
16. Pramanik BN, Bartner PL, Mirza UA, Liu YH, Ganguly AK. Electrospray ionization mass spectrometry for the study of non-covalent complexes: An emerging technology. *J Mass Spectrom.* 1998; 33 (10): 911–20.
17. Loo JA. Electrospray ionization mass spectrometry: A technology for studying noncovalent macromolecular complexes. *Int J Mass Spectrom.* 2000; 200 (1–3): 175–86.
18. Ray SS, Singh SK, Balaram P. Sulfonate (ANS) Binding to Proteins. *Data Process.* 2001; 0305 (01).
19. Zhang S, Van Pelt CK, Wilson DB. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003; 75 (13): 3010–8.
20. Tjernberg A, Carnö S, Oliv F, Benkestock K, Edlund PO, Griffiths WJ, et al. Determination of dissociation constants for protein-ligand complexes by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Chem.* 2004; 76 (15): 4325–31.
21. Benkestock K. Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Determination of Noncovalent Interactions in Drug Discovery. 2008.
22. Bligh SWA, Haley T, Lowe PN. Measurement of dissociation constants of inhibitors binding to Src SH2 domain protein by non-covalent electrospray ionization mass spectrometry. *J Mol Recognit.* 2003; 16 (3): 139–48.
23. Zhang C, Chen H, Guymon AJ, Wu G, Cooks RG, Ouyang Z. Instrumentation and methods for ion and reaction monitoring using a non-scanning rectilinear ion trap. *Int J Mass Spectrom.* 2006; 255–256 (1–3): 1–10.
24. Wu RF, Huang YD, Chu YQ, Liu ZP, Ding CF. Investigation of Non-covalent Interactions of 18-Crown-6 with Amino Acids in Gas Phase by Mass Spectrometry. *Chinese J Anal Chem.* 2018; 46 (2): 273–9.
25. Zhang S, Van Pelt CK, Wilson DB. Quantitative determination of noncovalent binding interactions using automated nanoelectrospray mass spectrometry. *Anal Chem.* 2003; 75 (13): 3010–8.
26. Mayne CG, Saam J, Schulten K, Tajkhorshid E, Gumbart JC. Rapid parameterization of small molecules using the force field toolkit. *J Comput Chem.* 2013; 34 (32): 2757–70.
27. Vanommeslaeghe K, Raman EP, MacKerell AD. Automation of

- the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges. *J Chem Inf Model.* 2012; 52 (12): 3155–68.
28. Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, Kundu S, Zhong S, Shim J, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *J Comput Chem.* 2010; 31 (4): 671–90.
29. Schmidt MW, Baldrige KK, Boatz JA, Elbert ST, Gordon MS, Jensen JH, et al. General atomic and molecular electronic structure system. *J Comput Chem.* 1993; 14 (11): 1347–63.