

文章编号: 1001-8689(2019)08-0887-12

新型抗生素葡糖脱乙酰基酶 LpxC 抑制剂研究进展

王明华 张国宁 王菊仙 王玉成*

(中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所以, 北京 100050)

摘要: 革兰阴性菌耐药性已经严重威胁人类健康, 亟需开发新作用机制的抗菌药物。UDP-3-O-(R-羟基十四酰)-N-乙酰氨基葡糖脱乙酰基酶 (LpxC) 是催化合成革兰阴性菌外膜脂多糖主要成分脂 A 的关键酶, 在革兰阴性菌中具有较高的同源性, 与哺乳动物 (包括人) 的各种酶都没有共同序列。LpxC 的缺失或过表达都会使某些革兰阴性致病菌死亡, 这使其成为具有开发前景的抗革兰阴性菌药物的全新靶标。为此, 本文综述了 LpxC 的结构、酶学性质、催化机理及其抑制剂等研究进展。

关键词: UDP-3-O-(R-3-羟基肉豆蔻酰基)-N-乙酰葡糖胺脱乙酰基酶 (LpxC); 类脂 A 生物合成; LpxC 酶抑制剂; 革兰阴性菌; 细菌感染

中图分类号: R978 文献标志码: A

Research advances on the inhibitors of UDP-3-O-(R-3-hydroxyacyl)-n-acetylglucosamine deacetylase (LpxC) against Gram-negative bacteria

Wang Ming-hua, Zhang Guo-ning, Wang Ju-xian and Wang Yu-cheng

(Institute of Medical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050)

Abstract Infections caused by multidrug-resistant (MDR) Gram-negative organisms are a major health concern throughout the world, associated with high morbidity and mortality. The first irreversible step of lipid A biosynthesis was catalyzed by the UDP-3-O-(R-3-hydroxyacyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC), which is a Zn²⁺-dependent enzyme. The enzyme is required for growth and viability of Gram-negative bacteria, displays no sequence homology with any mammalian protein, but is highly conserved in Gram-negative bacteria. Either enhanced levels or lack of LpxC expression is lethal to some Gram-negative bacteria. Therefore, it may become a promising target in the development of novel antibiotics against Gram-negative bacteria. Thus, research on LpxC inhibitors as new antibacterial agents has become an attractive field in the development of the novel antibiotic therapy of Gram-negative bacteria. In this review, we will summarize the recent progress in the structure, enzymology, catalytic mechanism, and the research and development of LpxC inhibitors.

Key words UDP-3-O-(R-3-hydroxyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC); Lipid A biosynthesis; inhibitors of LpxC; Gram-negative bacterial; Bacterial infection

细菌耐药性尤其是革兰阴性菌的耐药性已成为人类健康的重大威胁。抗生素耐药性每年造成 70 万人的死亡, 如果这一问题无法解决的话, 专家们预测,

到 2050 年每年的死亡人数将会达到 1000 万人^[1]。2017 年 2 月, 世界卫生组织根据对新型抗生素的迫切需求程度将其分为极为重要、十分重要和中等重要 3

收稿日期: 2018-08-21

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81703366 和 No. 81473099)

作者简介: 王明华, 男, 生于 1989 年, 在读博士研究生, 主要从事药物化学研究, E-mail: huanlehuayu@163.com

* 通讯作者, E-mail: wyc9999@126.com

个类别^[2]。列为极为重要的包括耐碳青霉烯类药物的鲍曼不动杆菌 (CRA)、铜绿假单胞菌和产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 肠杆菌科 (CRE)³ 种细菌, 均为多重耐药性革兰阴性菌。目前临床上极度缺乏安全有效的治疗多重耐药革兰阴性菌感染的药物, 全球范围内处于临床研究的候选药物更是寥寥无几。因此迫切需要研发新作用机制的新型抗革兰阴性菌药物。

革兰阴性菌具有一层独特的外膜 (OM) 结构, 它是天然的渗透屏障, 能够阻碍药物渗透进入细菌, 并激活外排泵, 这是导致多种抗生素对革兰阴性菌疗效较差的重要原因。其中类脂 A (lipid A) 扮演了一个重要角色, 负责脂多糖 (LPS) 的正确装配以及锚定, 同时也是保护细菌抵御外部因子 (如抗生素和去污剂) 的重要构成部分^[3], 又是强有力的内毒素, 能引发宿主非常强烈甚至致死性的免疫反应 (败血性休克), 是革兰阴性菌感染致病的重要原因^[4-5]。研究表明, LPS 对于大部分革兰阴性菌的存活不可或缺, 可能关乎 LPS 在膜蛋白的正确折叠过程。因此抑制其生物合成对细菌来说是致命的。类脂 A 的生物合成共有 10 步反应, 细胞质中的 9 种特异性酶参与其中, 这 9 种酶都有成为靶点的可能。由于 LpxA 催化的第一步反应是可逆反应, 平衡常数不理想 (只有 0.001 左右)。因此, LpxC 催化的第二步去乙酰化反应成为 Lipid A 合成的第一个限速步骤, 决定着整个合成的效率^[6]。所以, 通过抑制细菌 Lipid A 的生物合成来对抗细菌, LpxC 便成为了研究人员心目中最为理想的靶点。

1 LpxC 简介

LpxC 在革兰阴性菌中具有较高的同源性, 但与哺乳动物 (包括人) 的各种酶都没有共同序列^[7]。LpxC 是控制革兰阴性菌感染的理想靶标, 其特异性抑制剂具有低脱靶和低毒性的特点。由于 LpxC 是抗革兰阴性菌的全新靶标, 不存在已有的耐药性, 所以其抑制剂对于临床上耐药革兰阴性菌同样有效。

1.1 LpxC 的结构

LpxC 是一种锌离子依赖的金属酶, 本文以铜绿假单胞菌的 LpxC 酶为例 (图 1), 其含有两个结构域 (domain I 和 domain II), 每个结构域由 5 个 β -折叠结构和两个 α -螺旋结构组成, β -折叠包夹着 α -螺旋, 形成了经典的 “ β - α - β ” 的三明治结构。这两个结构域虽然存在些许差别 (氨基酸序列), 但仍具有相同的二维拓扑结构。整个酶的活性部分则位于两个结构域的连接交界处。此外, 每个结构域各含有一

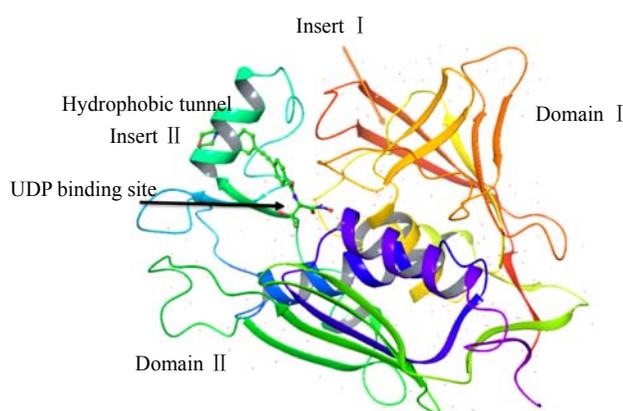


图 1 LpxC 结构 (PDB 5U39)

Fig. 1 The structure of LpxC (PDB 5U39)

个 β -折叠结构不同的插入区 (Insert I 和 Insert II), 插入区 I 界定了活性位置的范围, 由 3 个 β -折叠构成; 插入区 II 则形成一个 β - α - β 结构式的窄长封闭疏水通道, 可与一些疏水性氨基酸残基相连。因此, 其可以被疏水长链 (如肉豆蔻酸或抑制剂的疏水长链基团) 占据, 这样可以增加抑制剂与 LpxC 酶的识别能力, 使 LpxC 活性中心的锌离子与抑制剂的螯合基团 (如异羟肟酸等) 有效的配位结合。

1.2 LpxC 的催化机理

LpxC 是一种去乙酰化酶, 其活性依赖于锌离子, 目前得到普遍认可的催化机理主要来自 McClerren 课题组^[8]和 Hernick 课题组^[9]对大肠埃希菌和嗜嗜热菌中 LpxC 蛋白的研究。他们提出的催化机理都是基于共轭酸碱理论, 但又对组氨酸和苏氨酸在活性区域的作用存在争议。在去乙酰化反应中, McClerren 等^[8]认为 E78 作为催化碱夺取锌离子束缚的水分子中的一个质子, 促使活化的水分子中的氧原子与底物中乙酰胺基的羰基碳发生亲核反应, 形成中间态伴盐, 最后葡萄糖胺的末端胺再从 E78 夺取一个质子, 释放出乙酸变成葡萄糖胺。其中, H265 (253 of AaLpxC) 没有提供也没有夺取质子, 仅仅起到稳定伴盐中间体的作用 (图 2A)。但 Hernick 等^[9]则认为是葡萄糖胺的末端胺是从 H265 获得质子, 而不是 E78, 而起到稳定伴盐中间体作用的不是 H265, 而是 T191 (图 2B)。

此外, 也有研究报道^[10]称磷酸基参与锌离子的催化作用, 也有量子力学模型研究表明异羟肟酸类与锌离子形成五配位体中间态, 具有很强的结合力^[11]。

1.3 LpxC 的蛋白调控 FtsH

Kdo₂-lipidA 的合成效率受到膜蛋白降解酶 FtsH 的调控。当细胞内 Kdo₂-lipidA 过量时, FtsH 通过降

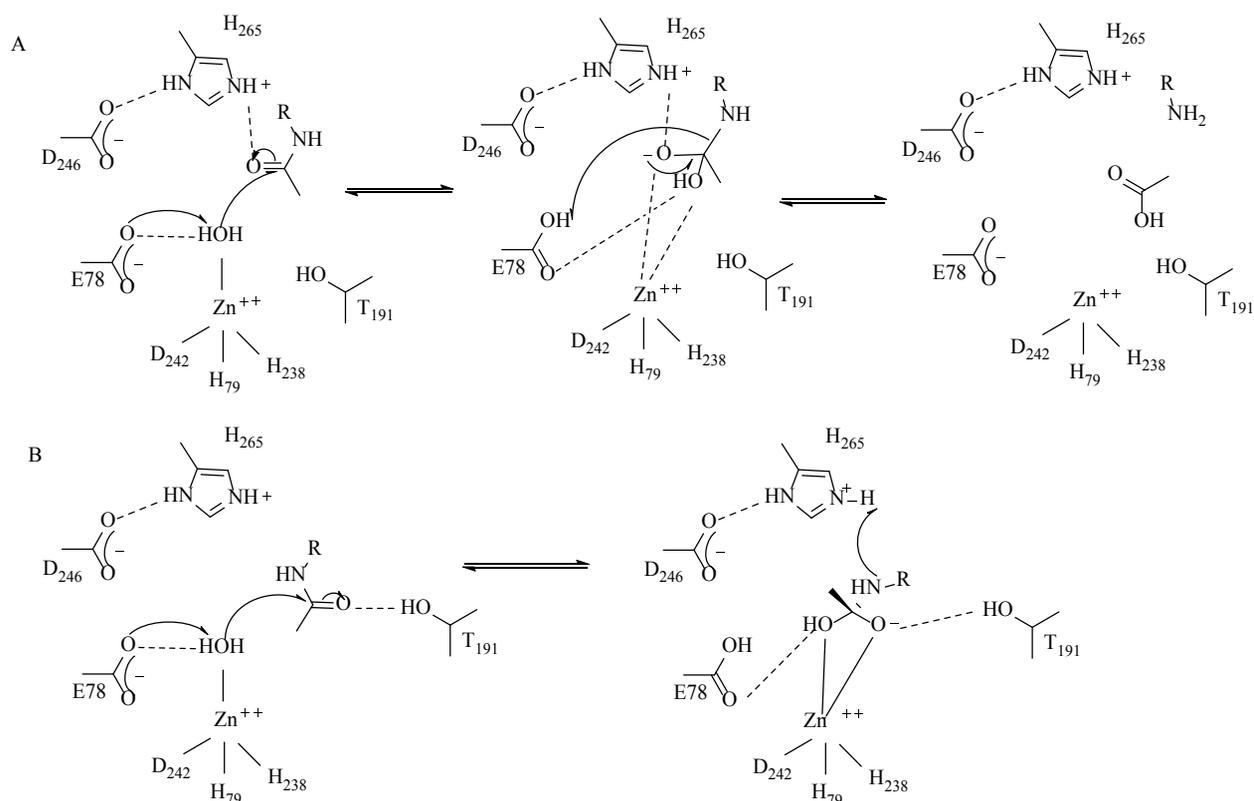


图 2 LpxC 的催化机理^[9]
 Fig. 2 The proposed catalytic mechanisms for LpxC^[9]

解关键酶 LpxC 和 KdtA 来降低其合成速率^[12]。因此通过调控 FtSH 来降解 LpxC 酶，从而抑制类脂 A 的生物合成，也是可以考虑的一个研究策略。

2 LpxC 抑制剂研究进展

自 90 年代至今的 20 多年里，LpxC 已然成为抗革兰阴性菌药物研究领域非常具有吸引力的靶点之一，针对这一靶点也设计合成了许多类型 LpxC 抑制剂，所以开发新型 LpxC 抑制剂也受到广大科研工作者们及制药企业的青睐。到目前为止，LpxC 抑制剂按其结构特点可分为以下 6 大类。

2.1 异羟肟酸类 LpxC 抑制剂

2.1.1 芳唑啉类

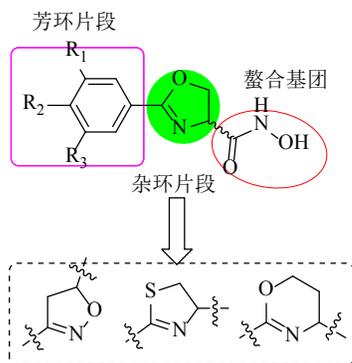
1996 年，Onishi 等^[13]在《科学》杂志上首次报道了芳唑啉类 LpxC 抑制剂—L-573,655，并合成许多结构相似的衍生物(图 3)。其中，化合物 L-161,240 对大肠埃希菌 LpxC 酶的 K_i 值为 50nmol/L，而对野生型 (*envA*⁺) 和敏感型大肠埃希菌 (*envA1*) 的 MIC 分别为 1~3ng/mL 和 8~16ng/mL，与氨苄西林相当，优于利福平和红霉素。但其抗菌谱较窄，对铜绿假单胞菌和黏质沙雷菌没有明显抑制活性。

为了便于分析讨论，本文以 L-573,655 为例，将其分为 3 部分：芳环片段、杂环片段和螯合基团(图

3)。1999 年 Chen 等^[14]以 L-573,655 为先导化合物，设计合成一系列衍生物，酶活性结果表明，螯合基团羟肟酸活性最优，芳环片段连有疏水基团-供电子基(3,4,5-三取代时)活性增加，而亲水或杂环基团对活性不利，这与透膜性有一定关系。2002 年 Kline 等^[15]为扩大此类化合物的抗菌谱，以 L-161,240 为先导化合物，设计合成一系列杂环片段为噁唑啉、噁嗪类、噻唑啉类衍生物，其对铜绿假单胞菌活性最好的达到 100nmol/L，其中吸电子基-三氟甲氧基对活性贡献较大。同年，Pirrung 等^[16]将 L-159,692 唑啉环替换成噁唑啉环，活性都不如先导化合物；2003 年他们首次利用高通量固相合成法设计合成 74 个苯唑啉类化合物，虽然对铜绿假单胞菌没有活性，但大部分化合物对野生型和敏感性大肠埃希菌有效^[17]，如化合物 5。

2.1.2 底物类

2000 年，Jackman 等^[18]以细菌 LpxC 的天然底物为先导化合物，设计合成了一类以四氢吡喃环为骨架的 LpxC 抑制剂，代表化合物为 TU-514 和 TU-517(图 4)。这两化合物对 EcLpxC [K_i 分别为 (650±280) nmol/L 和 (190±50) nmol/L] 和 AaLpxC 的活性达到较低的水平。然而，TU-514 可能由于其透膜性



1(L-573, 655)	R/S	R ₁ , R ₂ , R ₃ =H
2(L-159, 463)	R	R ₁ , R ₂ , R ₃ =H
3(L-159, 692)	R	R ₁ , R ₃ =H; R ₂ =OCH ₃
4(L-161, 240)	R	R ₁ , R ₂ =OCH ₃ ; R ₃ =CH ₂ CH ₂ CH ₃
5	R	R ₁ =CF ₃ ; R ₂ =F; R ₃ =H

图3 苯唑啉类化合物结构
Fig. 3 Structures of aryloxazolines

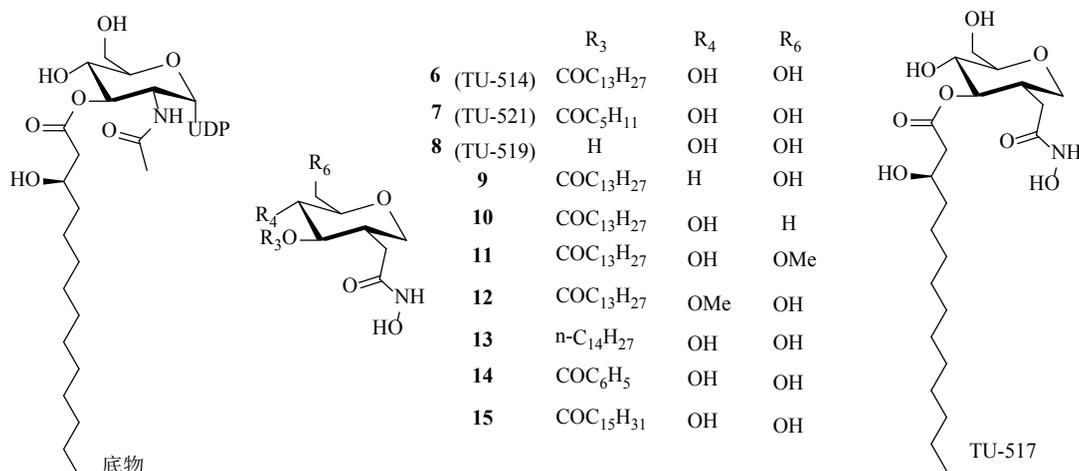


图4 底物类似物结构
Fig. 4 Structures of substrate analogs

较差并未表现出很好的抗菌活性；除此之外，烷基链缩短，对 EcLpxC 和 AaLpxC 活性显著下降。

2005 年，Li 等^[19]对 TU-514 的疏水区以及吡喃环上的羟基进行修饰，遗憾的是，衍生物对 *E. coli* LpxC 的抑制率都不尽如意。对吡喃环上的羟基甲基化或烷基链延长或缩短均使活性下降，而肉豆蔻酰基替换成苯甲酰基则活性保持（化合物 14，抑制率为 53%）。

2.1.3 磺酰胺类

2002 年，Clements 等^[20]通过金属酶抑制剂库筛选得到了磺酰胺-羟肟酸衍生物，其代表化合物为 BB-78484 和 BB-78485(图 5)。这些化合物均含有两个疏水基团，具有非常独特的结构。针对大肠埃希菌 LpxC 酶，BB-78484 和 BB-78485 的 K_i 值分别为 50 和 20nmol/L。这俩化合物对另一抗菌靶酶肽脱甲酰基酶(PDF)无明显抑制作用。经体外抗菌活性评价，BB-78484 和 BB-78485 具有广谱抑菌作用(表 1)。但随后几乎就没有有关此类化合物的研究报道了。

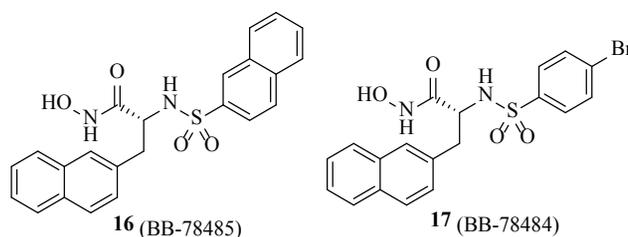


图5 磺酰胺类化合物结构^[20]
Fig. 5 Structures of sulfonamides^[20]

2.1.4 N-芳基-L-苏氨酸类

2004 年，Anderson 等^[21]报道了一种新型的 N-芳基-L-苏氨酸异羟肟酸类 LpxC 抑制剂，其中代表性的化合物是 CHIR-090(图 6)，由 McClerrend 等^[8]开发。CHIR-090 能同时抑制大肠埃希菌(MIC: 0.20μg/mL)和铜绿假单胞菌(MIC: 1.6μg/mL)的生长，且与妥布霉素和环丙沙星的抗菌活性相当，但是对豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)的抑制活性(K_i为 340nmol/L)不高。随后研究者们通过构建解析不同 LpxC 酶与 CHIR-090 的共晶复合物，开启

表 1 磺酰胺类 LpxC 对不同致病菌的活性 [20]

Tab. 1 Activities of sulfonamides against a range of pathogens [20]

Organism	MIC/($\mu\text{g/mL}$)		
	BB-78484	BB-78485	Imipenem
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	2	1	0.25
<i>Escherichia coli</i> ATCC12014	2	1	0.125
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	4	2	1
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	32	4	0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	>32	>32	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C53	>32	4	0.125
<i>Morganella morganii</i> ATCC36030	8	4	4
<i>Haemophilus influenzae</i> Syn1390	>32	4	2
<i>Moraxella catarrhalis</i> Syn2412	>32	4	<0.125
<i>Burkholderia cepacia</i> Syn2072	16	1	4
<i>Serratia marcescens</i> ATCC8100	2	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	>32	32	<0.125
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC27626	>32	>32	<0.125
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341	>32	>32	<0.125

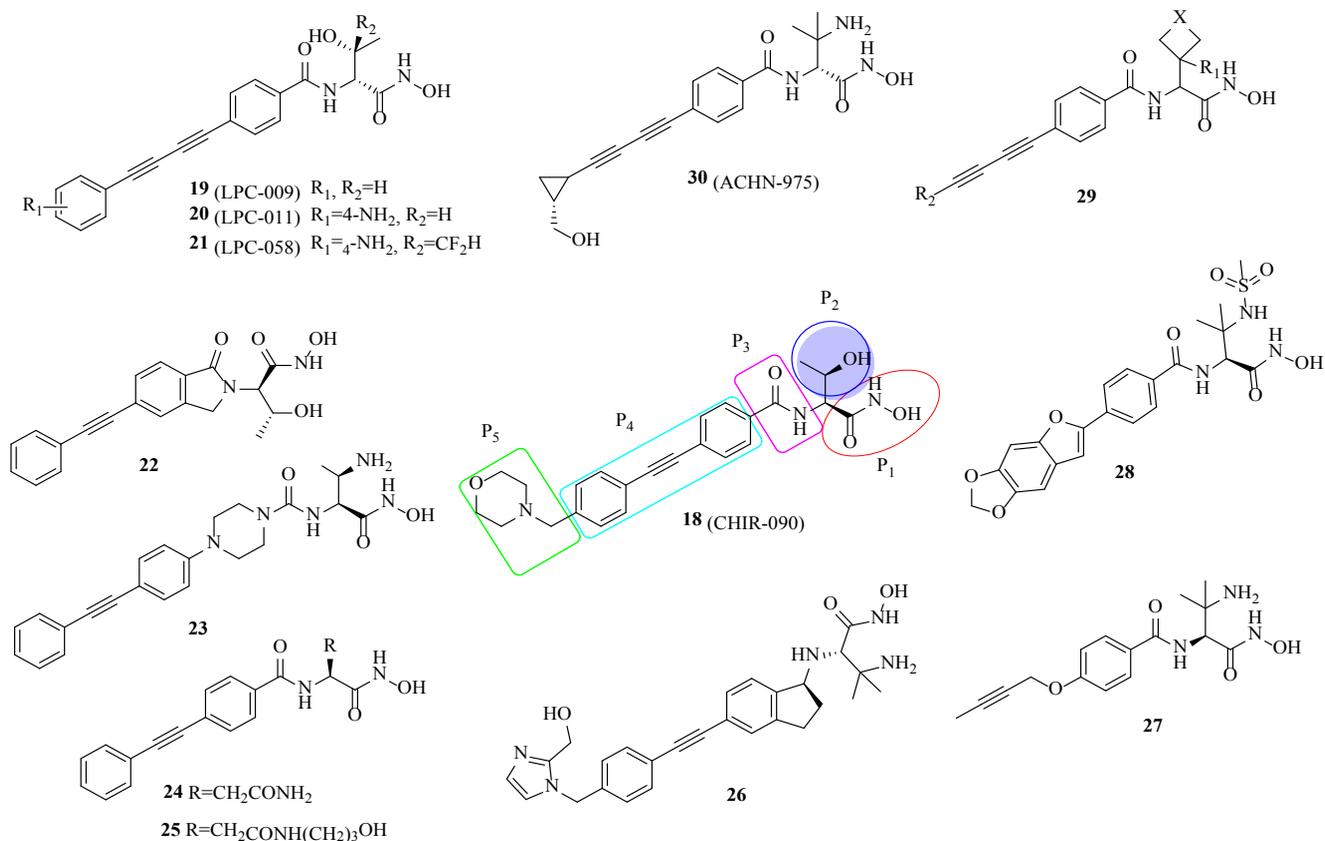


图 6 N-芳基-L-苏氨酸类化合物结构
 Fig. 6 Structures of N-aryl-L-threonines

性均有所降低。2016 年又报道 [28] 了一个具有广谱抗菌活性的化合物 LPC-058, 其对大肠埃希菌 LpxC 的 K_i 值达到了 3.5pmol/L, 对大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、对鲍曼不动杆菌的 MIC 分别为 0.0018、0.167 和 0.39 $\mu\text{g/mL}$, 这也是少有的对鲍曼不动杆菌有活性的化合物。

了 LpxC 抑制剂对革兰性阴性菌的的抗菌谱研究, 以及基于 CHIR-090 的结构修饰和优化 [22-23]。

目前绝大多数活性较高的化合物都是通过对 CHIR-090 结构优化和骨架跃迁得到的。为了便于分析讨论, 将 CHIR-090 结构拆分成 5 部分 (图 6): P1 为锌离子螯合基团; P2 区不同取代基对抗菌活性有不同的影响; P3 为连接疏水基团和螯合基团的连接子; P4 区为占据 LpxC 酶疏水口袋的疏水片段; P5 为末端基团 (溶剂暴露区), 一般对抗菌活性影响不大, 主要改善分子的理化或代谢性质。

2011 年, Lee 等 [24-27] 报道了以丁二炔为疏水骨架的化合物 LPC-009(MIC: *E. coli* 0.05 $\mu\text{g/mL}$; *P. aeruginosa* 0.74 $\mu\text{g/mL}$); 为解决溶解度问题, 又在末端引入氨基得到 LPC-011(MIC: *E. coli* 0.03 $\mu\text{g/mL}$; *P. aeruginosa* 0.5 $\mu\text{g/mL}$), 抑菌活性都要明显优于 CHIR-090。随后他们向 P2 区引入了一些芳 (杂) 环等, 活

2011 年, Mansoor 等 [29] 将 P3 区替换为苯并内酰胺和脲类衍生物 (如化合物 22~23); 苯并内酰胺类对 LpxC 酶活性弱于开环的, 而部分脲类具有广谱抗菌活性。2013 年, Hale 等 [30] 将 P2 区替换为不同取代氨基酸 (谷氨酸、

环氨基酸等), 其中含谷氨酸片段活性较好, 化合物 24 对铜绿假单胞菌 IC_{50} 为 4.4nmol/L, 化合物 25 对大肠埃希菌 IC_{50} 为 1.3nmol/L。2015 年, 杨玉社课题组^[31]在 P5 区引入曲酸及甲基砜片段, 其中引入曲酸片段使活性丢失, 部分甲基砜类化合物活性与 CHIR-090 相当, 在肝微粒体中的代谢性质要优于对照。2018 年, 他们又报道^[32]P1 区羟胺活性优于邻苯二胺; P2 区 2-氨基异丙基优于 2-羟基乙基, 且代谢更稳定; P3 区磺酰基无协同作用, 使活性降低; P4 区将苯环换成取代苯环或噁唑烷酮环或吡啶都会不同程度上降低活性。2017 年, Jing 等^[33]报道 P3 区为二环类似物, 代表化合物 26(MIC: *E. coli* 0.5 μ g/mL; *P. aeruginosa* 1 μ g/mL), 但是其具有静脉急性毒性并抑制钠离子通道 site II(97%, 25 μ mol/L, IC_{50} =400nmol/L)。诺华公司 Piizzi 等^[34]为改善水溶性和降低毒性, 对 P2 区进行了衍生 - 引入羧基及哌嗪酮等, 活性均有所提高; 将 P4 区二苯乙炔基替换为不同取代苯, 其中炔丙氧基最优, 如化合物 27, 对野生铜绿假单胞菌 IC_{50} 为 1.5nmol/L, MIC 为 1.0 μ g/mL, MDR 铜绿假单胞菌 MIC₉₀ 为 2 μ g/mL。Kawai 等^[35]报道了 P2 区为甲磺酰胺类化合物, 主要探讨了疏水区结构对活性的影响, 其中化合物 28 活性最优 (*E. coli* MIC=0.063 μ g/mL, *K. pneumoniae* MIC=0.5 μ g/mL 和 *P. aeruginosa* MIC=0.5 μ g/mL)。Achaogen 公司在了一项专

利中又报道^[36]了一类抗菌活性较优的化合物, 将 P2 区变为四、五元饱和杂环, 如化合物 29。

该类抑制剂中研究最为前沿的是 Achaogen 公司开发的 ACHN-975(铜绿假单胞菌 MIC: 0.25 μ g/mL), 该化合物曾进入 I 期临床研究, 它无论对于敏感型还是耐药型铜绿假单胞菌的抗菌活性都明显优于临床上常用的妥布霉素、环丙沙星、头孢他啶、亚胺培南和黏菌素等临床上常用的一、二线抗菌药物^[37]。然而该化合物由于局部注射耐受性问题从临床试验撤回。ACHN-975 的临床前和临床研究表明, N-芳基-L-苏氨酸类是一类具有广阔开发前景的抗革兰阴性菌化合物。

2.1.5 烷基砜类

2012 年, 辉瑞全球研发中心 Brown 等^[38]报道了烷基砜-异羟肟酸类抑制剂, 代表化合物为 1a(图 7)。化合物 1a 对铜绿假单胞菌 LpxC 酶的抑制活性达到纳摩尔级水平 (IC_{50} 为 1.37nmol/L), 与阳性对照 CHIR-090(IC_{50} 为 2.05nmol/L) 相当, 但其对铜绿假单胞菌 (PAO1) 的抑菌活性比 CHIR-090 要好 (MIC 分别为 0.125 和 1 μ g/mL)。此后, Montgomery 等^[39]对先导物 1a 进行了相应的结构修饰和改造, 得到系列吡啶酮烷基砜类化合物 (如 2a 和 33), 此类化合物中大部分都与先导物 1a 的抑酶抗菌活性相当。其中 2a 对铜绿假单胞菌 LpxC 酶的 IC_{50} 为 3.6nmol/L, 对铜绿假单

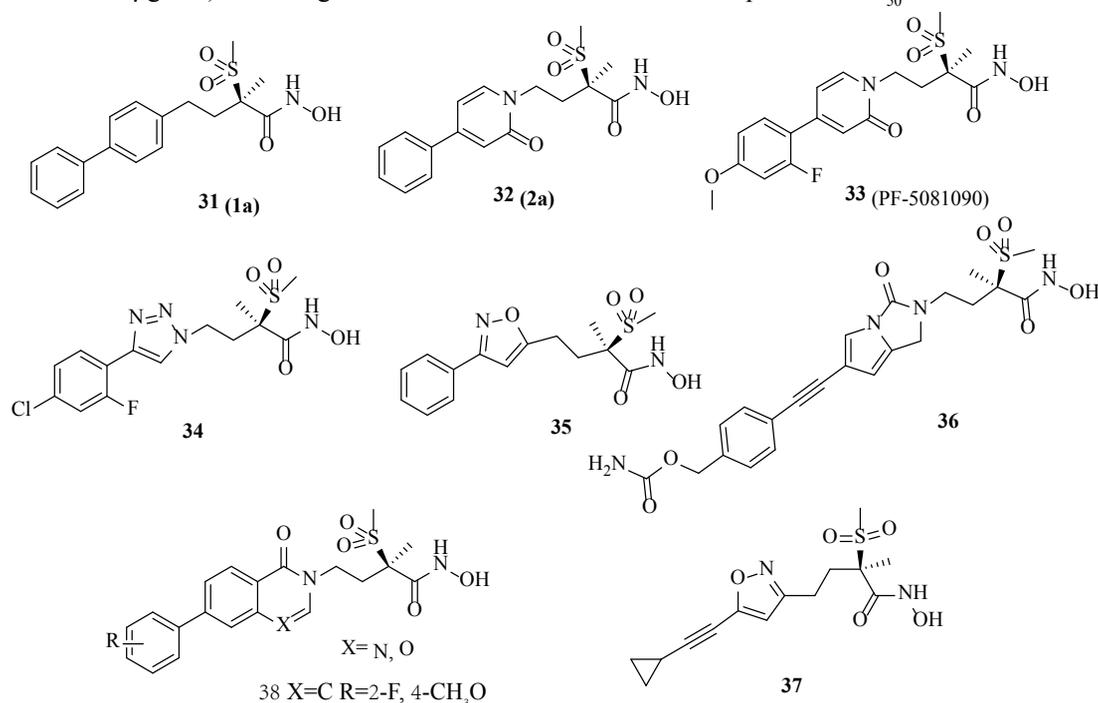


图 7 烷基砜类化合物结构
Fig. 7 Structures of methylsulfonyls

胞菌 (PAO1) 的 MIC 为 $0.5\mu\text{g/mL}$ 。McAllister 等^[40]对疏水区进行了 SAR 探索, 发现 5-三唑类 (化合物 34) 和异噻唑类 (化合物 35) 对铜绿假单胞菌有一定活性, MIC 均为 $0.5\mu\text{g/mL}$ 。Abdel-Magid 等^[41]申请的专利中报道了一类吡咯 [1,2-C] 咪唑 -3-酮类化合物 36, 其对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的 MIC 分别为 ≤ 0.063 和 $0.5\mu\text{g/mL}$ 。同年诺华公司的专利^[42]中报道一异噻唑类化合物 37, 对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的 MIC 分别为 0.25 和 $2\mu\text{g/mL}$; 葛兰素史克公司也报道^[43]了一类苯并噻唑类化合物 38, 对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的 MIC 分别为 ≤ 0.03 和 $0.06\mu\text{g/mL}$ 。

此类抑制剂的研究者主要为制药企业, 也是一类研究较多, 具有广阔开发前景的抗革兰阴性菌化合物。

2.1.6 呋喃乙酸及苄氧乙酸类

2012 年, Oddo 等^[44]合成了一类含糖苷类的 LpxC 抑制剂, 利用拼合原理和构象限制策略, 用 C-

糖苷骨架替换苏氨酸酰胺片段 (化合物 39, 图 8)。

2013 年, Jana 等^[45]对上述化合物疏水片段进行修饰得到 C-三氮唑 - α -D-呋喃糖苷类衍生物 (化合物 40), 利用琼脂扩散法表明其无抗菌活性及酶抑制活性, 可能是空间构象限制不利于与酶的结合; 2013 年^[46]合成了 C-三氮唑 - β -D-呋喃糖苷类, 同样也没有活性; 随后又设计了 C-乙炔基呋喃糖苷类 (化合物 41)^[47], 活性也不理想。2013 年, Löppenber 等^[48]也报道了将化合物 39 疏水片段替换为不同长度、构型、柔性的亲脂性链。活性结果表明, 相对较短、弯曲和柔性的亲酯链没有抗大肠埃希菌活性, 而较长刚性线性如二苯基丁二炔活性较好, 对大肠埃希菌 K_i 值为 $4.4\mu\text{mol/L}$, 其中糖苷开环产物 (化合物 42) 活性优于构象限制的。随后 Szermerski 等^[49]和 Tangherlini 等^[50]基于化合物 42, 通过去掉其中一个羟甲基, 设计了苄氧基乙异羟肟酸类, 但活性也不理想。

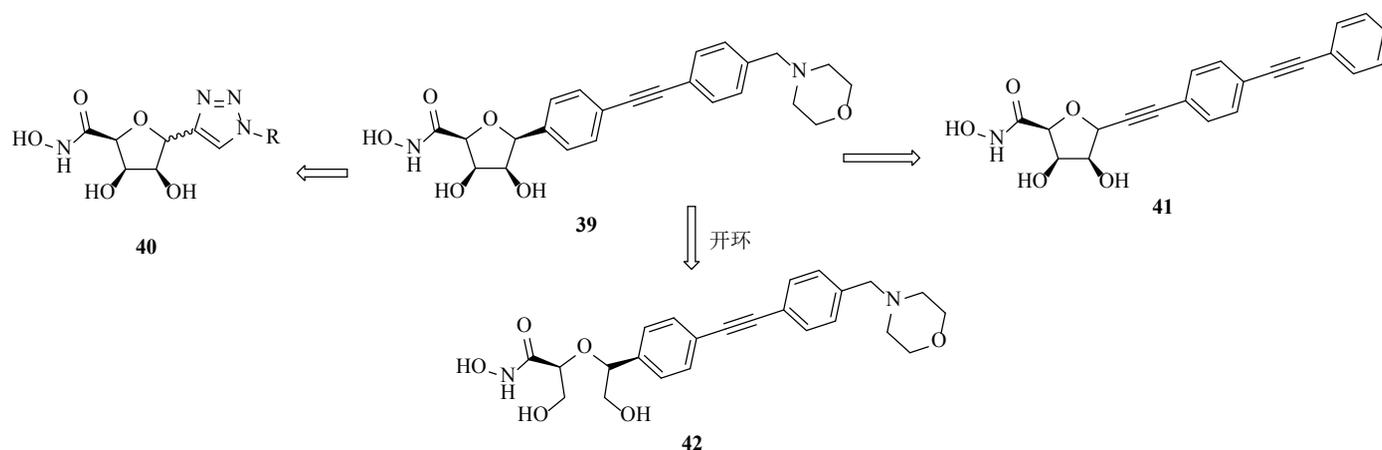


图 8 呋喃乙酸及苄氧乙酸类化合物结构

Fig. 8 Structures of C-glucosides

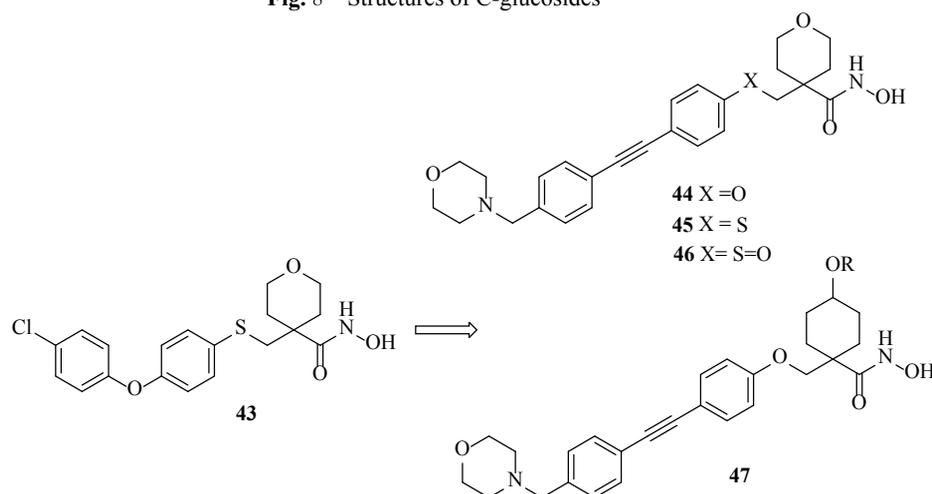


图 9 四氢吡喃类化合物结构

Fig. 9 Structures of tetrahydropyrans

2.1.7 四氢吡喃类

2014年, 阿斯利康 Murphy-Benenato 等^[51]对异羟肟酸化合物库进行筛选, 得到化合物 43(图 9), 是基质金属蛋白酶(MMP-2, -9, -8, -13)抑制剂 RS-130830 的衍生物。其对铜绿假单胞菌 LpxC IC_{50} 为 $(7.4 \pm 2.6) \text{ nmol/L}$, MIC 为 $50 \mu\text{mol/L}$, 但对野生型大肠埃希菌活性较弱(*E. coli* ARC523 MIC $> 200 \mu\text{mol/L}$)。以此化合物为苗头化合物, 保留四氢吡喃环对疏水区进行优化, 其中化合物 44 对铜绿假单胞菌 IC_{50} 为 $(4.4 \pm 1.6) \text{ nmol/L}$, 细胞水平活性相似, 对大肠埃希菌活性提高(MIC: $12.5 \mu\text{mol/L}$)。化合物 45~46 也呈现出较好活性, 但其对 MMP(基质金属蛋白酶)的活性并未消除, 这就增加了脱靶效应。而将吡喃环变为环己醇, 使活性降低。

2.1.8 噁唑烷酮类

2016年, Kurasaki 等^[52]将噁唑烷酮替换苏氨酸, 得到限制构象的噁唑烷酮类化合物, 其中化合物 48(图 10)对大肠埃希菌的 IC_{50} 为 6 nmol/L , MIC 为 $0.016 \mu\text{g/mL}$, 具有较低的外排率。

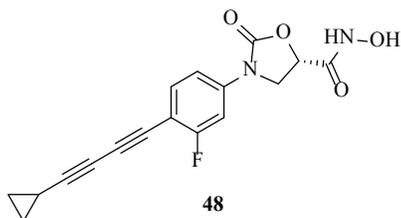


图 10 噁唑烷酮类化合物结构
Fig. 10 Structures of oxazolidinones

2.1.9 1,2,3-三唑连接核苷-氨基酸类

2017年, Malkowski 等^[53]依据底物设计了 4 个三唑连接核苷衍生物(图 11), 只测定了均衡校正电子相互作用的能量。在真空模型中, 化合物 51 具有较好的相互作用能; 通过计算机模拟发现三氮唑也能很好地与锌离子结合, 这加强了与锌离子的相互作用, 遗憾的是并未测抗革兰阴性菌的活性。

2.2 磷酸类 LpxC 抑制剂

2000年, Jackman 等^[18]在设计底物类似物时, 用磷酸基团代替异羟肟基团引入到 TU-521 中得到了四氢吡喃糖磷酸类抑制剂(化合物 53)(图 12), 此化合物对大肠埃希菌 $[(115 \pm 33) \mu\text{mol/L}]$ 和嗜嗜热菌 LpxC $[(192 \pm 38) \mu\text{mol/L}]$ 的抑制活性相对较弱, 不如异羟肟酸类。2002年, Pirrung 等^[16]也设计合成了 2 个芳唑啉磷酸类 LpxC 抑制剂(化合物 54 和 55), 化合物 54 对大肠埃希菌 LpxC 酶 $[IC_{50} = (4 \pm 2) \mu\text{mol/L}]$ 的抑制活性与阳性对照 L-159692 相当 ($IC_{50} = 3 \mu\text{mol/L}$)。2016年, 王玉成等^[54]将磷酸基引入 CHIR-090 得到化合物 56, 对大肠埃希菌和铜绿假单胞菌 MIC 分别为 0.28 和 $2.06 \mu\text{g/mL}$, 与 CHIR-090 相当。

2.3 脂肪族羧酸和两性苯甲酸类 LpxC 抑制剂

2007年, Shin 等^[55]报道了一类含有长疏水脂肪烷基链的羧酸或苯甲酸衍生物(图 13), 此类化合物为两亲性分子, 主要靶向窄长的疏水通道。虽然与 LpxC 酶结合活性 K_d 值最低达到了 $0.9 \mu\text{mol/L}$, 但此类化合物的抗菌活性不理想, 可能由于羧基的螯合能力较弱。另一方面, 疏水脂肪链的长短对与酶的

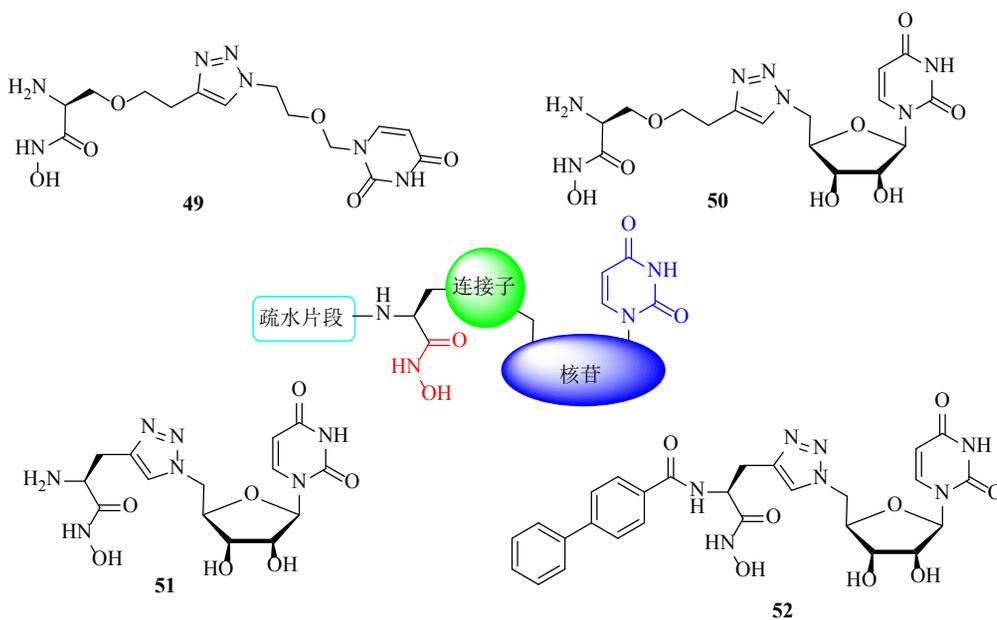


图 11 三唑连接核苷-氨基酸类化合物结构^[53]
Fig. 11 Structures of 1,2,3-triazole-linked nucleoside-amino acid conjugates^[53]

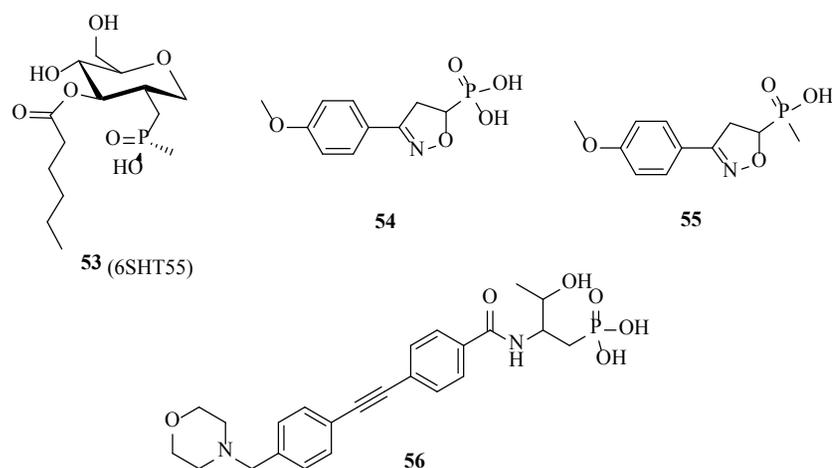


图 12 磷酸类化合物结构
Fig. 12 Structures of phosphates

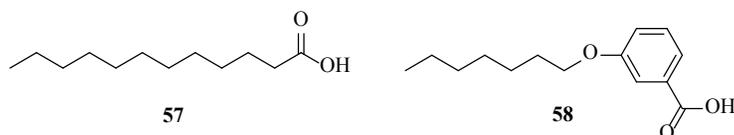


图 13 脂肪族羧酸和两性苯甲酸类化合物结构
Fig. 13 Structures of aliphatic carboxylic acid and amphipathic benzoic acids

结合活性有较大影响，最佳碳原子数为 6~12 个；碳原子数为 12 时活性最佳 (K_d 值为 $0.9\mu\text{mol/L}$)，少于 6 个时不能与疏水通道发生有效结合。由于此类化合物抗菌活性太弱，没有进一步研究价值。

2.4 乙内酰脲类 LpxC 抑制剂

2008 年，Schering 公司利用电子等排体乙内酰脲代替异羟肟酸，设计合成了一系列螯合基团为乙内酰脲类的化合物^[56](图 14)，期望降低 LpxC 抑制剂的毒性，提高选择性。其中，化合物 59 对 LpxC 抑制活性最优 (IC_{50} : $0.5\mu\text{mol/L}$)。虽然此类化合物具有适度的 LpxC 酶活性，但其具有较广谱的抗 G-菌活性，值得进一步研究。

2.5 尿嘧啶核苷类 LpxC 抑制剂

2009 年，Barb 等^[57]第一次设计合成了尿嘧啶核苷类 LpxC 抑制剂(图 15)，它们既不含锌离子螯合基团，也不含疏水侧链，主要作用于 UDP 结合位点。

此类化合物抑酶活性并不太强，代表化合物 60 对大肠埃希菌 LpxC 酶的 IC_{50} 才达到 $(27\pm 5)\mu\text{mol/L}$ 。此化合物有两方面值得注意：(1) 与大肠埃希菌 LpxC 酶 UDP 口袋的结合方式是一种新的竞争性方式，即 Ph- 依赖的两步共价结合，其中第一步反应是动力学不可逆的；(2) 可能与 CHIR-090 抑酶的作用机理不同，原因在于当 CHIR-090 失去对大肠埃希菌突变菌株 (Q202W/G210S)LpxC 的时间依赖性抑制作用时，其仍能以时间依赖性方式抑制该突变株。

当前，对“基于 UDP 位点”设计合成的 LpxC 抑制剂的研究甚少，但化合物 52 和 60 为我们打开了设计 LpxC 抑制剂的新思路—如何利用 UDP 位点设计出选择性更高、结合性更好的 LpxC 抑制剂，在现有活性较好的抑制剂的结构基础上引入与 UDP 口袋有效结合的基团不失为一个研究策略，但也充满艰难，因为其对抗菌活性影响很大。

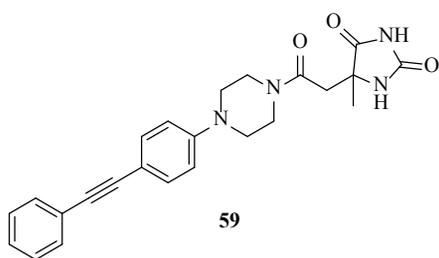


图 14 乙内酰脲类化合物结构
Fig. 14 Structures of hydantoin

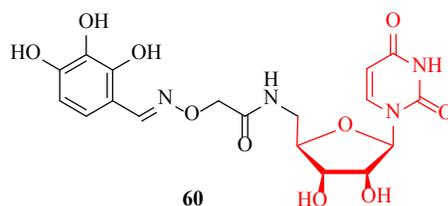


图 15 尿嘧啶核苷类化合物结构
Fig. 15 Structures of uridines

2.6 其他类

Forge Therapeutics 公司报道了一类非异羟肟酸类 LpxC 抑制剂, 其中 FG-944 表现出极好体内外

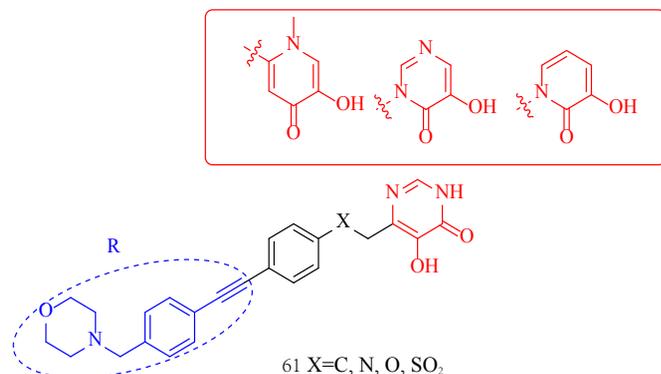


图 16 羟基吡啶酮和羟基嘧啶酮类化合物结构

Fig. 16 Structures of hydroxypyridinones and hydroxypyrimidinones

抗菌活性, 其对大肠埃希菌 MIC 为 0.25 μ g/mL, 肺炎克雷伯菌 1 μ g/mL, 对多重耐药菌株均有同等效果, 并且与其他锌离子金属蛋白没有交叉相互作用 (ACE1、HDACs 和 CAII), 遗憾的是公司并没有披露相关结构, 但本文根据其专利 [58] 推测, 其结构可能为羟基吡啶酮和羟基嘧啶酮类化合物 (图 16)。

3 结语与展望

随着多重耐药革兰阴性菌的日益严重, 迫切需要开发具有新的作用机制的新型抗生素来对抗这些病原体。LpxC 在几乎所有革兰阴性菌种中具有高度序列保守性, 并且与任何哺乳动物蛋白质缺乏序列同源性, 使得 LpxC 成为极具吸引力的药物靶标。目前, 虽然市场上还没有批准的 LpxC 抑制剂, 但在过去 20 多年, 学术界和制药业都在努力开发有效的 LpxC 抑制剂。其中, N-芳酰基-L-苏氨酸类和烷基砜类 LpxC 抑制剂是最有希望的类别。

然而, 尽管许多报道的化合物具有很好的临床前数据, 但除了最近撤回的 ACHN-975 之外, 目前还没有其他 LpxC 抑制剂进入临床试验。因此, 我们推测 LpxC 抑制剂可能存在如下缺点: (1) 疏水腔活性必需的亲脂性片段不仅可能增加由于非特异性亲脂相互作用引起的脱靶效应, 而且还可能导致较差的物理化学性质, 例如溶解度低、蛋白结合率高等; (2) 锌离子螯合基团-异羟肟酸在药动学性质方面是不利的, 它可以通过轭合快速代谢, 释放出有毒的羟胺; 还可能引起与不同的人锌离子依赖性蛋白的非特异性结合, 如 MMP、HDAC(组蛋白脱乙酰酶)、碳酸

酐酶等, 从而引起不可预测的副作用; (3) 一些致病菌如鲍曼不动杆菌、脑膜炎奈瑟菌和黏膜炎莫拉菌可以在没有脂质 A 的情况下存活, 而 LpxC 抑制剂缺乏针对此类菌种的活性; (4) 单一针对 LpxC 酶, 很容易产生耐药性。

因此, 此类研究应该寻找新的锌离子螯合基团取代异羟肟酸部分, 引入能深入渗透 UDP 结合位点的取代基 (缩短抑制剂的亲脂侧链来补偿活性的降低), 以期改善 LpxC 抑制剂的抗菌活性、选择性和理化性质, 并降低毒性。

参考文献

- [1] Brogan D M, Mossialos E. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility[J]. *Global Health*, 2016, 12(1): 8-14.
- [2] World Health Organization. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva: WHO Press, 2017: 1-7[S/OL]. <https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
- [3] Raetz C R, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins[J]. *Annu Rev Biochem*, 2002, 71(1): 635-700.
- [4] Miller S I, Ernst R K, Bader M W. LPS, TLR4 and infectious disease diversity[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3(1): 36-46.
- [5] Wyckoff T J, Raetz C R, Jackman J E. Antibacterial and anti-inflammatory agents that target endotoxin[J]. *Trends Microbiol*, 1998, 6(4): 154-159.
- [6] Langklotz S, Baumann U, Narberhaus F. Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(1): 40-48.
- [7] Barb A W, Zhou P. Mechanism and inhibition of LpxC: An essential zinc-dependent deacetylase of bacterial lipid A synthesis[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2008, 9(1): 9-15.
- [8] McClerren A L, Zhou P, Guan Z, et al. Kinetic analysis of the zinc-dependent deacetylase in the lipid A biosynthetic pathway[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(4): 1106-1113.
- [9] Hernick M, Gennadios H A, Whittington D A, et al. UDP-3-O-((R)-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylase functions through a general acid-base catalyst pair mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 16969-16978.
- [10] Clayton G M, Klein D J, Rickert K W, et al. Structure of the bacterial deacetylase LpxC bound to the nucleotide reaction product reveals mechanisms of oxyanion stabilization and proton transfer[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(47): 34073-34080.
- [11] Miller M D, Gao N, Ross P L, et al. Crystal structure of *A. aeolicus* LpxC with bound product deacetylation mechanism[J]. *Proteins*, 2015, 83(9): 1706-1719.
- [12] Langklotz S, Schakermann M, Narberhaus F. Control of

- lipopolysaccharide biosynthesis by FtsH-mediated proteolysis of LpxC is conserved in enterobacteria but not in all gram-negative bacteria[J]. *J Bacteriol*, 2011, 193(5): 1090-1097.
- [13] Onishi H R, Pelak B A, Gerckens L S, *et al.* Antibacterial agents that inhibit lipid A biosynthesis[J]. *Science*, 1996, 274(5289): 980-982.
- [14] Chen M H, Steiner M G, de Laszlo S E, *et al.* Carbohydroxamido-oxazolidines: Antibacterial agents that target lipid A biosynthesis[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9(3): 313-318.
- [15] Kline T, Andersen N H, Harwood E A, *et al.* Potent, novel *in vitro* inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* deacetylase LpxC[J]. *J Med Chem*, 2002, 45(14): 3112-3129.
- [16] Pirrung M C, Tumey L N, Raetz C R, *et al.* Inhibition of the antibacterial target UDP-(3-O-acyl)-N-acetylglucosamine deacetylase (LpxC): Isoxazoline zinc amidase inhibitors bearing diverse metal binding groups[J]. *J Med Chem*, 2002, 45(19): 4359-4370.
- [17] Pirrung M C, Tumey L N, McClarren A L, *et al.* High-throughput catch-and-release synthesis of oxazoline hydroxamates structure-activity relationships in novel inhibitors of *Escherichia coli* LpxC: *In vitro* enzyme inhibition and antibacterial properties[J]. *J Am Chem Soc*, 2003, 125(6): 1575-1586.
- [18] Jackman J E, Fierke C A, Tumey L N, *et al.* Antibacterial agents that target lipid A biosynthesis in Gram-negative bacteria inhibition of diverse UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine deacetylases by substrate analogs containing zinc binding motifs[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(15): 11002-11009.
- [19] Li X, McClarren A L, Raetz C R, *et al.* Mapping the active site of the bacterial enzyme LpxC using novel carbohydrate-based hydroxamic acid inhibitors[J]. *J Carbohydr Chem*, 2005, 24(4-6): 583-609.
- [20] Clements J M, Coignard F, Johnson I, *et al.* Antibacterial activities and characterization of novel inhibitors of LpxC[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(6): 1793-1799.
- [21] Anderson N, Bowman J, Erwin A, *et al.* Preparation of amino acid derivatives as antibacterial agents: WO, 2004/062601A2[P]. 2004-07-29.
- [22] Barb A W, McClarren A L, Snelath K, *et al.* Inhibition of lipid A biosynthesis as the primary mechanism of CHIR-090 antibiotic activity in *Escherichia coli*[J]. *Biochemistry*, 2007, 46(12): 3793-3802.
- [23] Cole K E, Gattis S G, Angell H D, *et al.* Structure of the metal-dependent deacetylase LpxC from *Yersinia enterocolitica* complexed with the potent inhibitor CHIR-090[J]. *Biochemistry*, 2010, 50(2): 258-265.
- [24] Lee C J, Liang X, Chen X, *et al.* Species-specific and inhibitor-dependent conformations of LpxC: Implications for antibiotic design[J]. *Chem Biol*, 2011, 18(1): 38-47.
- [25] Liang X, Lee C J, Chen X, *et al.* Syntheses, structures and antibiotic activities of LpxC inhibitors based on the diacetylene scaffold[J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19(2): 852-860.
- [26] Liang X, Lee C J, Zhao J, *et al.* Synthesis, structure, and antibiotic activity of aryl-substituted LpxC inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(17): 6954-6966.
- [27] Lee C J, Liang X, Gopalaswamy R, *et al.* Structural basis of the promiscuous inhibitor susceptibility of *Escherichia coli* LpxC[J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 9(1): 237-246.
- [28] Lee C J, Liang X, Wu Q, *et al.* Drug design from the cryptic inhibitor envelope[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10638-10645.
- [29] Mansoor U F, Vitharana D, Reddy P A, *et al.* Design and synthesis of potent Gram-negative specific LpxC inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21(4): 1155-1161.
- [30] Hale M R, Hill P, Lahiri S, *et al.* Exploring the UDP pocket of LpxC through amino acid analogs[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(8): 2362-2367.
- [31] Ding S, Wang W K, Cao Q, *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of LpxC inhibitors with novel hydrophilic terminus[J]. *Chinese Chem Lett*, 2015, 26(6): 763-767.
- [32] Ding S, Dai R Y, Wang W K, *et al.* Design, synthesis and structure-activity relationship evaluation of novel LpxC inhibitors as Gram-negative antibacterial agents[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28(2): 94-102.
- [33] Zhang J, Chan A, Lippa B, *et al.* Structure-based discovery of LpxC inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(8): 1670-1680.
- [34] Piizzi G, Parker D T, Peng Y, *et al.* Design, synthesis, and properties of a potent inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* deacetylase LpxC[J]. *J Med Chem*, 2017, 60(12): 5002-5014.
- [35] Kawai T, Kazuhiko I, Takaya N, *et al.* Sulfonamide-based non-alkyne LpxC inhibitors as Gram-negative antibacterial agents[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(4): 1045-1049.
- [36] Cohen F, Konradi A W, Choi T A, *et al.* Antibacterial agent: WO, 2017/223349A1[P]. 2017-12-28.
- [37] Developing novel antibacterials to treat multi -drug resistant Gram-negative bacterial infections[C]. Achaogen, 13th Needham Healthcare Conference April 8, 2014.
- [38] Brown M F, Reilly U, Abramite J A, *et al.* Potent inhibitors of LpxC for the treatment of Gram-negative infections[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(2): 914-923.
- [39] Montgomery J I, Brown M F, Reilly U, *et al.* Pyridone methylsulfone hydroxamate LpxC inhibitors for the treatment of serious Gram-negative infections[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(4): 1662-1670.
- [40] McAllister L A, Montgomery J I, Abramite J A, *et al.* Heterocyclic methylsulfone hydroxamic acid LpxC

- inhibitors as Gram-negative antibacterial agents[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(22): 6832-6838.
- [41] Abdel-Magid A F. LpxC inhibitors as effective therapy against multidrug resistant bacterial infections[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6(11): 1095-1096.
- [42] Fu J P, Jiang S Y, Kordikowski A. *et al.* Crystalline form of (R)-4-(5-(cyclopropylethynyl)isoxazol-3-yl)-n-hydroxy-2-methyl-2-(methylsulfonyl)butanamide as an antibacterial agent: WO, 2017216705A1[P]. 2017-12-21.
- [43] Jin Q, Pohlhaus D T, Spletstoser J. Substituted benzazinones as antibacterial compounds: WO, 2017098440A1[J]. 2017-06-15.
- [44] Oddo A, Holl R. Design and stereoselective synthesis of a C-aryl furanoside as a conformationally constrained CHIR-090 analogue[J]. *Carbohydr Res*, 2012, 359: 59-64.
- [45] Jana S K, Loeppenber M, Daniliuc C G, *et al.* Development of novel LpxC inhibitors: chiral-pool synthesis of triazolyl glycosides[J]. *Tetrahedron*, 2013, 69(45): 9434-9442.
- [46] Jana S K, Löppenber M, Daniliuc C G, *et al.* C-Triazolyl β -d-furanosides as LpxC inhibitors: Stereoselective synthesis and biological evaluation[J]. *Tetrahedron*, 2014, 70(37): 6569-6577.
- [47] Jana S K, Löppenber M, Daniliuc C G, *et al.* Synthesis and biological evaluation of C-ethynyl furanosides as LpxC inhibitors[J]. *Tetrahedron*, 2015, 71(6): 956-966.
- [48] Löppenber M, Müller H, Pulina C, *et al.* Synthesis and biological evaluation of flexible and conformationally constrained LpxC inhibitors[J]. *Org Biomol Chem*, 2013, 11(36): 6056-6070.
- [49] Szermerski M, Melesina J, Wichapong K, *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of benzyloxyacetohydroxamic acids as LpxC inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(3): 1016-1028.
- [50] Tangherlini G, Torregrossa T, Agoglitta O, *et al.* Synthesis and biological evaluation of enantiomerically pure glyceric acid derivatives as LpxC inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(5): 1032-1044.
- [51] Murphy-Benenato K E, Olivier N, Choy A, *et al.* Synthesis, structure, and SAR of tetrahydropyran-based LpxC inhibitors[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5(11): 1213-1218.
- [52] Kurasaki H, Tsuda K, Shinoyama M, *et al.* LpxC inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation of oxazolidinones as Gram-negative antibacterial agents[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, 7(6): 623-628.
- [53] Malkowski S N, Dishuck C F, Lamanilao G G, *et al.* Design, modeling and synthesis of 1,2,3-triazole-linked nucleoside-amino acid conjugates as potential antibacterial agents[J]. *Molecules*, 2017, 22(10): 1682-1695.
- [54] 王玉成, 张国宁, 王菊仙, 等. 新型锌离子螯合剂及其制备和在抗革兰阴性菌感染中的应用: CN, 105669750A[P]. 2016-06-15.
- [55] Shin H, Gennadios H A, Whittington D A, *et al.* Amphipathic benzoic acid derivatives: synthesis and binding in the hydrophobic tunnel of the zinc deacetylase LpxC[J]. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15(7): 2617-2623.
- [56] Mansoor U F, Reddy P A, Siddiqui M A. Hydantoin derivatives useful as antibacterial agents: WO, 2008027466A1[P]. 2008-03-06.
- [57] Barb A W, Leavy T M, Robins L I, *et al.* Uridine-based inhibitors as new leads for antibiotics targeting *Escherichia coli* LpxC[J]. *Biochemistry*, 2009, 48(14): 3068-3077.
- [58] Teng M, Taganov K, Puerta D T. Hydroxypyridinone and hydroxypyrimidinone based compounds for treating bacterial infections: WO, 2017/083431A2[P]. 2017-05-18.