靶向分枝菌酸生物合成的抗结核化合物研究进展

吕润秋 张 维 于丽芳*

(华东师范大学化学与分子工程学院 上海分子治疗与新药创制工程技术研究中心 上海 200062)

摘要 结核病近年来已超过艾滋病成为当今世界范围内致死率高的感染性疾病之一。结核病耐药问题严峻,耐多药结核病治愈率低、治疗方案复杂且周期长。抗耐药结核领域存在重大研究机遇,亟需发现与发展针对新靶点的新化学实体。分枝菌酸的生物合成和转运途径富含抗结核药物的有效靶点,综述了靶向该途径的抑制剂,讨论了其作用机制、药代动力学性质等最新研究进展。

关键词 耐药结核病;分枝菌酸的生物合成及转运途径;重要靶点;抑制剂

Recent Advances in Antitubercular Compounds Targeting Mycolic Acid Biosynthesis and Transport

Lü, Runqiu Zhang, Wei Yu, Lifang*

(Shanghai Engineering Research Center of Molecular Therapeutics and New Drug Development, School of Chemistry and Molecular Engineering, East China Normal University, Shanghai 200062)

Abstract Tuberculosis is now recognized as the most fatal infectious disease worldwide, eclipsing HIV in recent years. Drug-resistance tuberculosis continues to be a severe public crisis. The cure rate in persons with multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) is unacceptably low, and the treatment of MDR-TB requires complex treatment regimens over a long period. There is a great opportunity in the field of tuberculosis as novel chemical entities with different mechanisms of action are particularly needed. The biosynthesis and transport pathways of mycolic acid represents a well proven and effective target for chemical intervention for TB. This article reviews the important inhibitors targeting to this pathway, as well as the recent research advances in the mechanism and pharmacokinetic properties etc.

Keywords drug-resistant tuberculosis; biosynthesis and transport pathway of mycolic acid; important targets; inhibitors

结核病(Tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*)引起的感染性疾病,结核病的致死率已经超过艾滋病,是全球重大的公共卫生问题之一。据WHO(World Health Organization)报道,在2019年全球约有1000万例新发结核病,其中非艾滋病毒感染者中约有120万人死于结核病,另有20.8万艾滋病毒感染者死于结核病^[1]。目前,一线抗结核药物在治疗药物敏感型结核病时的周期长,患者依从性较差,而二线抗结核药物在治疗以耐多药结核病(Multidrug resistant tuberculosis, MDR-TB)和广泛耐药结核病(Extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB)为代表的耐药结核病患者时毒性大,有效性也缺乏严格的证据^[2]。因此,开发新型抗结核药物来解决目前传统抗结核药物

治疗周期长,对耐药结核病疗效差等问题具有重要的意义。

M. tb 为分枝杆菌属、放线菌门,是一类形状细长略微弯曲的杆菌^[3]。*M. tb* 的细胞壁结构致密,大多数抗菌药物很难透过其细胞壁发挥抑菌效果^[4]。*M. tb* 无内毒素,也不产生外毒素和侵袭酶类^[5],其致病作用主要靠细胞壁上大量的脂质复合物^[6]。分枝菌酸(Mycolic acids, MAs)是构成 *M. tb* 细胞壁上脂质复合物的重要组成部分,同时 MAs 与 *M. tb* 在人体内的毒性和慢性感染有关^[7]。在抗结核药物研发中以分枝菌酸生物合成及转运途径为靶点的优势在于此途径中的蛋白与人源蛋白差异大,对宿主细胞毒性低^[8]。

分枝菌酸是一种 α -烷基- β -羟基疏水脂肪酸,含有

* Corresponding author. E-mail: lfyu@sat.ecnu.edu.cn

Received December 4, 2020; revised January 21, 2021; published online February 3, 2021.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21778019).

国家自然科学基金(No. 21778019)资助项目。

一个碳数为 22~26 的短臂和一个碳数为 50~60 的长臂^[9]. 在结核杆菌细胞壁上 MAs 与阿拉伯半乳糖通过酯键相连, 同时 MAs 与外膜上的其它糖类结合为海藻糖单分枝菌酸酯(Trehalose monomycolate, TMM)、海藻糖二分枝菌酸酯(Trehalose dimycolate, TDM)和葡萄糖单分枝菌酸酯(Glucose monomycolate, GMM)等^[10]. 根

据分枝菌酸结构中带有基团的不同一般分为 3 个类型: α -分枝菌酸(1)、甲氧基分枝菌酸(2, 3)和酮式分枝菌酸(4, 5)^[11] (Scheme 1).

分枝菌酸的生物合成过程发生在细胞质中(图 1). I 型脂肪酸合酶(Fatty acid synthase-I, FAS-I)合成 2 条酰基-辅酶 A(CoA)脂肪酸链, 一条形成链长 C24~C26 的

图式 1 分枝菌酸的结构
Scheme 1 Structures of mycolic acids

图 1 分枝菌酸的合成和转运途径以及相关抗结核靶点和抑制剂
Figure 1 Synthesis and transport pathways of mycolic acid and related antituberculosis targets and inhibitors

饱和 α -支链, 另一条链通过 β -酮脂酰基载体蛋白合酶 (FabH) 和丙二酰-分枝杆菌酰基载体蛋白链 (AcpM) 缩合产生 C16-AcpM 链^[12]. *M. tb* 中的 II 型脂肪酸合酶 (Fatty acid synthase-II, FAS-II) 主要由四种酶组成, β -酮脂酰基 ACP 合成酶 (KasA、KasB, *Rv1745*、*Rv2246*)^[13], 酮还原酶 (MabA, *Rv1483*)^[14], β -羟烷基脱水酶 (HadABC, *Rv0635*、*Rv0636*、*Rv0637*) 和烯酰 ACP 还原酶 (InhA, *Rv1484*)^[15] 等. 其中 MabA、HadABC 和 InhA 经过一系列还原、脱水等步骤将 C16-AcpM 的饱和脂肪链与 AcpM 连接生成 C18-AcpM, KasA 和 KasB 负责将 C18-AcpM 运送至 FAS-II 的起点进行循环, 每个循环过程在 AcpM 上增加 2 个碳原子最终生成 C50~C60-AcpM^[16-17]. C50~C60-AcpM 由脂肪酸降解蛋白 (FadD32) 作用后形成分枝菌酸-AMP 链^[18]. 聚酮合酶 13 (Pks13) 催化分枝菌酸-AMP (β -支链) 与酰基-CoA (饱和 α -支链) 发生克莱森缩合反应, 生成分枝菌酸前体^[19].

Pks13 硫酯酶 (thioesterase, TE) 结构域运送分枝菌酸前体到海藻糖上形成酮式海藻糖分枝菌酸酯 (Trehalose ketomonomycolate, TMMk), TMMk 由还原酶 (CmrA) 还原形成 TMM^[20], 接着 TMM 被膜转运蛋白 (MmpL3) 转运到细胞膜外^[21]. 抗原 85 (Ag85) 在膜外将 TMM 上的分枝菌酸链转移细胞膜上形成重要的分枝菌酸酯类化合物^[22], 如: 分枝菌酸酯-阿拉伯糖-肽聚糖复合物 (mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan, mAGP)、TDM、GMM 和甘油单分枝菌酸酯 (Glycerin monomycolate, GroMM) 等; 同时游离的海藻糖经细胞膜上的 LpqY-SugA-SugB-SugC ABC 转运蛋白输送回细胞质, 形成循环过程^[23].

临床上使用的抗结核药物很多是靶向分枝菌酸生物合成途径的, 包括异烟肼 (isoniazid, INH)、乙硫异烟胺 (ethionamide) 和德拉马尼 (delamanid) 等. 异烟肼自 1952 年问世后便作为结核病治疗的一线药物. 它是一种前药, 需要被 KatG 激活产生自由基再与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 形成共价加合物来抑制 InhA. 由于 KatG 中的 Ser315 易发生突变, 导致 INH 在使用过程中容易出现耐药^[24]. 乙硫异烟胺是一种 INH 的类似物, 需要经 EthA (FAD 依赖性单加氧酶) 活化后作用于 InhA^[25]. 德拉马尼于 2014 年被欧盟批准上市用于 MDR-TB 的治疗, 它需要通过细胞内的异烟脱氮腺嘌呤依赖的硝基还原酶进行生物活化, 进而抑制分枝菌酸的生物合成^[26].

1 重要靶点及其抑制剂

1.1 KasA 及其抑制剂

KasA 属于 β -酮脂酰基合酶, 由 435 个氨基酸组成, 它负责延长酰基 ACP 的碳链. KasA 的晶体结构于 2016

年被解析出来 (PDB ID: 5LD8). Kumar 等^[27]在 2018 年报道了苯并吡唑磺胺类分子 DG167 (**6**) 靶向抑制 KasA, **6** 在 KasA 的结合口袋中以双分子形式占据不同位点, 阻止酶与底物结合^[28]. **6** 对野生型 H37Rv 菌株的 MIC 值为 0.39 $\mu\text{mol/L}$, 同时与一线抗结核药物无交叉耐药. 然而在动物实验中口服给药并不能明显降低 BALB/c 小鼠肺部细菌的数量, 利用液相-质谱联用监测发现 **6** 芳环上的甲基在体内易代谢脱去, 进而导致体内药效不佳. 于是 **6** 的结构被优化为 JSF-3285 (**7**, MIC_{H37Rv}: 0.20 $\mu\text{mol/L}$), 在雌性 CD-1 小鼠感染 H37Rv 菌株四周后以 5 mg/kg 的剂量口服给药 **7**, 与空白对照组相比能够使肺部菌落数量减少, AUC_{0-5 h} 大幅提升至 59323 (ng/mL)·h, 小鼠肝微粒体代谢半衰期由 10.1 min 增加至 28.4 min^[29] (Scheme 2). 此外, 在小鼠模型中优选化合物 **7** 的浓度大于 MIC 的时间为 5 h; 在 5 h 时肺部药物浓度与血浆药物浓度的比值为 0.75. 在毒性上, **7** 对 Vero 细胞的 CC₅₀ 值为 170 $\mu\text{mol/L}$, 对 hERG 钾通道的 IC₅₀ 值大于 50 $\mu\text{mol/L}$ (表 1).

图式 2 DG167 和 JSF-3285

Scheme 2 DG167 and JSF-3285

表 1 已报道的吸收、分布、代谢、排泄、毒性 (Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Excretion, ADME/TE)

Table 1 Reported Absorption-Distribution-Metabolism-Excretion-Excretion properties of JSF-3285

Vero CC ₅₀	170 $\mu\text{mol/L}$
hERG IC ₅₀	>50 $\mu\text{mol/L}$
t (C _{plasma} >MIC)	5 h
C _{lung} /C _{plasma} at 5 h	0.75

1.2 InhA 及其抑制剂

烯酰 ACP 还原酶 (InhA) 属于短链脱氢酶家族, 由 268 个氨基酸组成, 其晶体结构于 1998 年被报道 (PDB ID: 1BVR)^[30]. InhA 可以由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型辅酶 I 提供能量将脂肪酰基底物上 C(2) 和 C3 间的反式双键还原^[31], 而 InhA 的失活会导致二十四烷酸堆积

以及分枝杆菌细胞壁结构变化. 一线抗结核药物 INH 产生耐药性与活化酶 KatG 的 Ser315 突变有关, 所以目前许多研究小组致力于开发直接靶向 InhA 的抑制剂. 然而大多数化合物的酶抑制活性与细胞水平活性不相关, 选择性低、药代动力学性质差, 使得它们不适合进行更深入的研究^[32]. GSK 公司筛选得到的噻二唑类化合物 GSK613 (**8**)对 InhA 酶和 H37Rv 菌株均表现出较强的抑制活性(IC_{50} : 7 nmol/L, $MIC_{H37Rv} \leq 1 \mu\text{mol/L}$), 该类化合物属于竞争性抑制剂^[33]. 由于 **8** 的水溶性差、血药浓度低(Scheme 3), GSK 公司对 **8** 进行结构改造得到 GSK693 (**9**, IC_{50} : 7 nmol/L, MIC_{H37Rv} : 0.2 $\mu\text{mol/L}$), **9** 在 C57BL/6j 小鼠体内最大药物浓度提高至 37271 ng/mL, 小鼠肝微粒体清除率降低至 $2.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (Scheme 4). 在毒性上, 优选化合物 **9** 对 CYP450 3A4 亚型的 IC_{50} 值大于 50.1 $\mu\text{mol/L}$, 对 HepG2 细胞和心血管的 IC_{50} 值都大于 50 $\mu\text{mol/L}$. 在小鼠模型中以 4 mg/kg 的剂量静脉注射 **9**, 它在血浆稳态下的表现分布体积为 2.58 L/kg, 半衰期为 0.94 h, **9** 的其它 ADMET 参数见表 2.

图式 3 噻二唑类化合物的结构

Scheme 3 Structures of thiadiazoles

表 2 GSK693 的已报道 ADMET 性质

Table 2 Reported ADMET properties of GSK693

CYP450 3A4 IC_{50}	>50.1 $\mu\text{mol/L}$
HepG2 Cytotoxicity IC_{50}	>50 $\mu\text{mol/L}$
Ames test	Negative
Cardiovascular profile Qpatch IC_{50}	>50 $\mu\text{mol/L}$
Cli human (<i>in vitro</i>)	$0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
V_{ss} (4 mg/kg iv) ^a	2.58 L/kg
$t_{1/2}$ (4 mg/kg iv)	0.94 h
T_{max} (100 mg/kg po)	0.42 h
DNAUC (<i>in vivo</i>) ^b	935.8 (ng·h)/mL per mg/kg

^a Volume of distribution at steady state, ^b dose normalized exposure in mice.

天然产物吡啶霉素(**10**)于 2012 年也被证明对 InhA 有抑制作用(IC_{50} : 18.6 $\mu\text{mol/L}$, MIC_{H37Rv} : 0.39 $\mu\text{g/mL}$), 并且 **10** 对人对源细胞毒性较小^[34]. 此外, 还有 4-羟基-2-吡啶酮类(**11**, IC_{50} : $(0.57 \pm 0.04) \mu\text{mol/L}$, $MIC_{99, H37Rv}$: 0.08

$\mu\text{mol/L}$), 二芳基醚类(**12**, IC_{50} : 5 nmol/L, MIC_{H37Rv} : 1.0 $\mu\text{g/mL}$)等被报道靶向抑制 InhA^[35-36] (Scheme 4).

图式 4 其它靶向 InhA 的化合物

Scheme 4 Other compounds target to InhA

1.3 HadABC 及其抑制剂

异源二聚体 HadAB 和 HadBC 分别由 287 和 300 个氨基酸组成^[37], 在脂肪酸延伸循环过程中 HadAB 负责催化形成 C(22)~C(42)的分枝菌酸链, HadBC 负责延长碳链个数至 C(52)~C(64), 它们的晶体结构分别于 2015 年(PDB ID: 4RV2)和 2018 年(PDB ID: 5ZY8)被解析出来. Bhowruth 等^[38]报道 NAS-21 (**13**)类化合物具有抗结核活性. NAS-21 衍生物中双羰基侧链为活性必需, 将其替换为乙酰基时活性消失, 推测可能有两种原因: (1)双羰基结构衍生物与 β 酮底物相似, 在 HadABC 参与的生物途径中作为竞争性抑制剂; (2) CF_3 基团能使酮-烯醇互变异构体稳定, 从而与活性位点中的氨基酸残基产生相互作用. 在体外的 FAS-II 抑制试验中 **13** 的类似物 IC_{50} 值达到了 19 $\mu\text{g/mL}$. 该类化合物通过抑制 HadABC 在生物合成中的脱水作用, 从而影响分枝菌酸的合成. 此外, 戊氧苯硫脲(**14**, ISO, MIC_{H37Rv} : 2.5 $\mu\text{mol/L}$)和氨硫脲(**15**, TAC, MIC_{H37Rv} : 0.5 $\mu\text{mol/L}$)这两个前药由 EthA 活化靶向抑制 HadABC, 然而由于 **14** 在体内吸收差、生物利用度低, **15** 的毒性大而未能走得更远^[39] (Scheme 5).

1.4 FadD32 及其抑制剂

脂肪酰基-AMP 连接酶 FadD32 由含 492 个氨基酸的 N 末端结构域和含 144 个氨基酸的 C 末端结构域组成, 负责活化由 FAS-II 合成的分枝菌酸长链, 随后参与 Pks13 介导的克莱森缩合反应^[40]. Kuhn 等^[41]利用 PhU-AMS 配体(**16**) (Scheme 6)解析出 FadD32 的晶体结构(PDB ID: 5HM3). Stanley 等^[42]在 2013 年通过全细胞

图式 5 HadABC 抑制剂
Scheme 5 HadABC inhibitors

图式 6 PhU-AMS (16), CCA34 (17) 和喹啉-2-酰胺(20)的结构以及香豆素母核(18)在碱性条件下开环
Scheme 6 Structures of PhU-AMS (16), CCA34 (17), and quinoline-2-carboxamides (20), and coumarin core (18) underwent ring opening under basic condition

筛选发现二芳基香豆素类衍生物是一类有效的 FadD32 抑制剂($\text{IC}_{90}: 36 \mu\text{mol/L}$), 其中化合物 CCA34 (17)对 H37Rv 菌株的 MIC 值达到 $0.24 \mu\text{mol/L}$ (Scheme 6), 在 BALB/c 小鼠感染 Erdman 菌株 7 d 后以 35 mg/kg 的剂量腹腔注射 17 能使肺部菌落数量减少 1 个 log CFU.

Fang 等^[43]考虑到香豆素母核上的内酯容易在体内形成共价加合物引起毒性, 并且当香豆素母核上存在吸电子基团时, 18 在碱性条件下不稳定容易开环成为 19 (Scheme 6). 于是他们将香豆素母核替换为喹啉环, 结构稳定性得到改善, 并且在喹啉环上更容易进行取代基的拓展和优化. 经改造得到的喹啉-2-甲酰胺(20, $\text{MIC}_{\text{H37Rv}}: 0.8 \mu\text{mol/L}$)对 H37Rv 菌株的抑制活性与 17 基本持平, 并且对人源细胞的毒性较小(HepG2 $\text{IC}_{50}: 60 \mu\text{mol/L}$), 有望进行更深入的研究. 此外, Galandrin 等^[44]利用化合物对酶热稳定性的影响筛选得到五类结构对 FadD32 有抑制作用, 分别为苯并咪唑类、硫代嘧啶类、吡咯唑类、喹诺酮类和异喹诺酮类.

1.5 Pks13 及其抑制剂

聚酮合酶 Pks13 包含 1733 个氨基酸, 分子质量为 186 kDa. Pks13 由 5 个结构域组成, 分别为酰基合成酶(KS)域、乙酰转移酶(AT)域、C 端酰基载体蛋白域(C-ACP)、N 端酰基载体蛋白域(N-ACP)和硫酯酶(TE)结构域^[45]. Pks13 是催化分枝菌酸生物合成最后一步的关键酶, 是抗结核药物研发中发现的一个新靶点.

2013 年 Wilson 等^[46]报道了第一个具有抗结核活性的噻吩类 Pks13 抑制剂, 其中代表性化合物 TP2(21)对 H37Rv 菌株的 MIC 为 $1.0 \mu\text{mol/L}$. 抗性突变体进行全基因组测序发现突变位点 F79S 位于 Pks13 的 N-ACP 区域附近, 推测此类化合物是通过抑制 Pks13 中 N-ACP 上 P-pant 臂装载功能影响了 FadD32 上的分枝菌酸-AMP 链的装载. Thanna 等^[47]发现将环庚基替换为含氮杂环后 $\text{MIC}_{\text{H37Rv}}$ 降至 $0.69 \mu\text{mol/L}$, 并且 22 在 THP-1 细胞内 ($\text{IC}_{90}: 9.75 \mu\text{mol/L}$)和低氧条件下($\text{IC}_{90}: 1.5 \mu\text{mol/L}$)对 H37Rv 菌株都有较好的抑制作用(Scheme 7).

图式 7 噻吩类 Pks13 抑制剂
Scheme 7 Thiophene series of Pks13 inhibitors

2013 年 Iorger 等^[48]报道了苯并咪唑类化合物

TAM1 [**23**, IC_{50} : $(0.26 \pm 0.03) \mu\text{mol/L}$, MIC_{H37Rv} : $2.3 \mu\text{mol/L}$] 靶向抑制 Pks13, 对抗性突变体进行全基因组测序发现突变位点位于 Pks13 的 TE 域. Sacchettini 课题组^[49] 利用生物化学方法验证了苯并呋喃类化合物对 Pks13-TE 具有抑制作用, 解析了化合物与 Pks13-TE 的共晶复合物, 设计合成的 TAM16 (**24**) 对 H37Rv 菌株有很强的抑制活性 (MIC : $0.09 \mu\text{mol/L}$), 对耐药菌株的抑制也同样高效. 在小鼠急、慢性感染模型中, **24** 分别在 200 和 300 mg/kg 的口服剂量下可显著降低肺部的结核杆菌菌落数量. **24** 对细胞色素 P450 酶各亚型无明显抑制, 利用 TI+通量测定法发现其对 hERG 钾通道的影响不大 (IC_{50} : $21 \mu\text{mol/L}$), 同时在小鼠模型中连续 3 d 单次给药 300 mg/kg 以下无明显急性毒性^[49]. 优化化合物 **24** 在小鼠模型中, 以 10 mg/kg 的剂量口服给药, **24** 在血浆中的最大浓度为 444 ng/mL, 药物达到最高浓度的时间为 0.5 h, 小鼠的 AUC_{0-24} 值为 $75 \mu\text{g} \cdot \text{min/mL}$, 口服生物利用度达到 28% (表 3)^[49].

表 3 TAM16 的已报道 ADMET 性质
Table 3 Reported ADMET properties of TAM16

Plasma protein binding	Mouse 73% Human 72%
CYP inhibition	No significant inhibition
c_{max} in plasma (10 mg/kg po)	444 ng/mL
T_{max} (10 mg/kg po)	0.5 h
AUC_{0-24} (10 mg/kg po)	74940 ng·min/mL
AUC_{0-24} (3 mg/kg iv)	79369 ng·min/mL
V_{ss} (3 mg/kg iv) ^a	4.2 L/kg
Oral bioavailability (F)	28%

^a Volume of distribution at steady state.

我们课题组发现苯并呋喃衍生物 3 位为乙酯时, 化合物在小鼠体内容易水解失活. 我们将天然产物 coumestan 骨架合理应用于 Pks13 抑制剂的设计合成, 发展了体内有效的类天然产物 coumestan 抗结核活性化合物^[50] (Scheme 8), 其中 coumestan48 (**25**) 的 MIC_{H37Rv} 值达到 3.9 ng/mL, 同时 **25** 的半衰期和人源肝微粒体代谢稳定性大幅提升. 在小鼠血清滴定抑制实验中以 100

mg/kg 的剂量口服给药, **25** 的活性优于 **24**, 并且 **25** 对其它代表性致病菌 (金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌) 有较好的选择性. 此外, **25** 对药物敏感性菌株 (V4207 MIC : $0.0078 \mu\text{mol/L}$)、广泛耐药菌株 (TF274 MIC : $0.0078 \mu\text{mol/L}$, R506 MIC : $0.0078 \mu\text{mol/L}$) 和耐药菌株 (KZN494 MIC : $0.0039 \mu\text{mol/L}$, V2475 MIC : $0.0156 \mu\text{mol/L}$) 的抑制效果同样高效^[51]. 在毒性上, **25** 对 Vero 细胞的 IC_{50} 值为 $4 \mu\text{g/mL}$, 对人源细胞株 MRC-5、HFL-1、HEK-293 的 IC_{50} 值都是大于 $50 \mu\text{g/mL}$, 对人源细胞株 QSG-7701 的 IC_{50} 值为 $(40.1 \pm 3.5) \mu\text{g/mL}$ ^[51]. 2019 年 Molin 等^[52] 通过表型筛选得到呋喃骨架 **26** 对 H37Rv 菌株的 MIC 值达到 $0.244 \mu\text{mol/L}$, 其作用位点同样是 Pks13 的 TE 域 (Q1610R、T1645P).

1.6 MmpL3 及其抑制剂

MmpL 蛋白是一类跨膜转运蛋白, 依赖质子动力转运底物透过细胞膜^[53]. 结核分枝杆菌基因组中包含 13 种 MmpL 基因^[8], MmpL3 (*Rv0206c*) 是其中唯一必需的^[54-55]. MmpL3 含有 800~1100 个氨基酸, 分子量范围

图式 8 Pks13 抑制剂
Scheme 8 Pks13 inhibitors

表 4 MmpL3 抑制剂的 MIC_{H37Rv} 值、基因突变以及具体位置
Table 4 MIC_{H37Rv} value of MmpL3 inhibitor, gene mutations and specific position

Compound	MIC_{H37Rv}	AA change	Location
AU1235	0.01 $\mu\text{g/mL}$	G253E	TMH ^a X
BM212/BM635	0.12 / 0.3 $\mu\text{mol/L}$	L215S	TMH IX
indole carboxamides	0.012 $\mu\text{mol/L}$	S288T	TMH XI
HC2091	19.3 $\mu\text{mol/L}$ ^b	V643, F644	TMH IV
Spiro	0.06 $\mu\text{mol/L}$	F255L, Y252C	TMH X
TBL-140	2.5 $\mu\text{mol/L}$ ^b	L189R, L567P, V643M, F644L	TMH VIII, II, IV
THPP	0.15 $\mu\text{mol/L}$	A249P, A677V	TMH X, V
SQ109	0.78~1.56 $\mu\text{mol/L}$	A700T, Q40R, L567P	TMH V, VII; 周质区

^a TMH: transmembrane α helices, the number comes from the crystal structure (PDB ID: 5AJF). ^b MIC_{H37Rv} : the lowest concentration of drug leading to at least 99% inhibition of bacterial growth.

为 100000~122000. MmpL3 包含 12 个跨膜 α 螺旋, 负责将细胞质内的 TMM 转运到细胞膜外^[56]. 近十年, 人们通过全细胞筛选和全基因测序技术得到了很多以 MmpL3 为靶点的抑制剂, 分子结构多种多样, 包括 SQ109、TBL-140、AU1235、BM212、HC2091、吡啶酰胺类化合物、Spiro 和 THPP^[57-68]. 表 4 中列出了代表性的抑制剂, 对应的抑菌活性以及基因突变的具体位置.

SQ109 (**27**)是一种乙二胺类化合物, 当前处于临床 IIb~III期. 改变 **27** 结构左侧不饱和烷烃链的长度, 用芳香环、脂肪环替代烷烃链或者还原该不饱和烷烃链等改造策略, 都会使化合物的抗菌活性出现不同程度的下降; 用其它环替代右侧金刚烷基时, 活性同样降低. **27** 对耐药和药物敏感型分枝杆菌都有较强的抑制作用, 与其它抗结核药物联用可有效缩短治疗周期^[69-70]. 据研究发现 **27** 抑制 MmpL3 可能有三种作用机制: 直接抑制 MmpL3、降低质子动势、以及抑制甲萘醌的生物合成^[60]. **27** 较低的致突变频率($\sim 2.55 \times 10^{-11}$)可能与它作用机制的多样性有关. 另外还有一些 **27** 类似物作为 MmpL3 抑制剂正在被研究, 如 TBL-140 (**28**), 它有着更好的代谢稳定性^[64](Scheme 9).

图式 9 乙二胺类 MmpL3 抑制剂

Scheme 9 Ethylenediamines MmpL3 inhibitors

2013 年 Ballell 等^[71]筛选得到吡啶酰胺类化合物 **29** 对结核分枝杆菌有抑制作用. Kozikowski 课题组^[61,72-73]用苯环或含氮杂环替代环己基, 活性降低; 并且发现吡啶-2-酰胺母核中两个 NH 基团为活性必需. 为进一步提升细胞水平活性, 将 **29** 优化为 **30**, **30** 对 H37Rv 菌株的抑制活性为 0.012 $\mu\text{mol/L}$, 同时对 H37Rv/DS、V4207/DS、KZN494/MDR、V2475/MDR、TF274/XDR、R506/XDR 这六种菌株的抑制作用分别达到 0.012、0.023、0.012、0.047、0.006 和 0.012 $\mu\text{mol/L}$ ^[74]. 在 ADMET

性质上, **30** 的代谢稳定性较好, 细胞毒性较小(Vero IC₅₀ > 192 $\mu\text{mol/L}$), 对 CYP450 各亚型和 hERG 钾通道无明显抑制作用, 在老鼠模型中以 100 mg/kg 的剂量口服给药, **30** 在老鼠肺部和血浆中达到最大浓度的时间都为 4 h^[74](表 5). 另外, **30** 与低剂量利福平(RIF)联用有很好的协同作用^[75]. 同时, 诺华公司为改善苗头化合物的代谢稳定性, 将其优化为 NITD-304 (**31**)和 NITD-349 (**32**). 在 CD-1 小鼠的感染模型中以 25 mg/kg 的剂量口服给药 **31** 和 **32**, 它们的生物利用度分别为 53% 和 51%^[62](Scheme 10). 在毒性上, **31** 和 **32** 对 HepG2 和 THP-1 细胞的 CC₅₀ 都大于 20 $\mu\text{mol/L}$, 对 hERG 钾通道也无明显抑制作用(IC₅₀ > 30 $\mu\text{mol/L}$)^[62](表 6). 目前吡啶酰胺衍生物处于临床前研究中.

图式 10 吡啶酰胺类 MmpL3 抑制剂

Scheme 10 Indoleamide series of MmpL3 inhibitors

表 5 Compound **30** 的已报道 ADMET 性质

Table 5 Reported ADMET properties of compound **30**

Vero cells IC ₅₀	$\geq 192 \mu\text{mol/L}$
Remaining ($T=120 \text{ min}$)	52%
CYP inhibition (% inhibition) CYP2C9	—5.2
CYP inhibition (% inhibition) CYP2D6	36.6
CYP inhibition (% inhibition) CY3A4	—6.7
hERG IC ₅₀	>30 $\mu\text{mol/L}$
T_{max} (100 mg/kg po)	Plasma 4 h Lung 4 h
c_{max} (100 mg/kg po)	Plasma 1.71 $\mu\text{g/unit}^a$ Lung 3.50 $\mu\text{g/unit}$

^a unit = mL for plasma samples.

2011 年, Rosa 等^[58]从唑类化合物库中筛选得到

BM212 (**33**), **33** 与 **27** 的作用机制类似, 直接抑制 MmpL3 转运蛋白的同时还抑制 TMM 的转运过程. 为提高 **33** 的细胞水平活性, 他们在初步结构改造中发现了 BM635 (**34**), 其活性将近提高 40 倍. 由于 **34** 的水溶性较差 ($<1 \mu\text{mol/L}$), Poce 等^[76]将吡咯氮原子上的 4-氟苯基替换为异丙基(**35**)后 $\text{MIC}_{\text{H37Rv}}$ 值为 $0.15 \mu\text{mol/L}$, 水溶性大幅提升, 且小鼠肝微粒体代谢稳定性明显优于 **34** (Scheme 11). 在 C57 小鼠的感染模型中将 **35** 以 50 mg/kg 的剂量持续口服给药 8 d 后, 小鼠肺部减少的菌落数量为 1.5 个 log CFU.

表 6 NITD-304 和 NITD-349 的已报道 ADMET 性质

Table 6 Reported ADMET properties of NITD-304 and NITD-349

ADMET properties	NITD-304	NITD-349
$t_{1/2}$ (25 mg/kg po in mice)	233 min	11 min
Cytotoxicity HepG2 CC_{50}	$>20 \mu\text{mol/L}$	$>20 \mu\text{mol/L}$
Cytotoxicity THP-1 CC_{50}	$>20 \mu\text{mol/L}$	$>20 \mu\text{mol/L}$
hERG IC_{50}	$>30 \mu\text{mol/L}$	$>30 \mu\text{mol/L}$
Cardiovascular Profile		
QPatch IC_{50}	$>30 \mu\text{mol/L}$	NA ^a
Ames test	Negative	Negative
CYP450 inhibition 3A4 IC_{50}	$>20 \mu\text{mol/L}$	$>20 \mu\text{mol/L}$
CYP450 inhibition 2D6 IC_{50}	$>20 \mu\text{mol/L}$	$>20 \mu\text{mol/L}$
CYP450 inhibition 2C9 IC_{50}	$>20 \mu\text{mol/L}$	$2.67 \mu\text{mol/L}$
C_{max} (25 mg/kg po in mice)	$3.51 \mu\text{mol/L}$	$4.21 \mu\text{mol/L}$

^a NA: Not known.

图式 11 BM212 及其类似物的结构

Scheme 11 Structures of BM212 and its analogues

螺环类化合物是由 GSK 公司发现的. 为改善 **36** 的

代谢稳定性, Remuinan 等将^[63]其优化为 **37** (Scheme 12), 后者在小鼠肝微粒中清除率为 1.2 mL/min/g . 金刚烷脲类化合物 AU1235 (**38**) 在 2012 年由 Scherman 等^[77]筛选发现, **38** 能使 RIF 在 *M. tb* 中积聚并且在体外与 RIF 和贝达喹啉有协同抑菌效应. 但在类药性评价中发现 **38** 及其类似物对人类可溶性环氧化物水解酶(sEH)有显著的抑制作用(IC_{50} : 0.4 nmol/L), 与血浆蛋白的结合率也非常高(98.8%), 这些不良因素限制了该类化合物的进一步发展.

图 12 (A)提高螺环类化合物的代谢稳定性和(B) AU1235 的结构

Scheme 12 (A) Improve the metabolic stability of spiro, and (B) structure of AU1235

四氢吡唑并嘧啶类化合物 **39** 由于半衰期短、血浆分布率低, 导致其在动物实验中无活性^[63]. Zheng 等^[67]于 2018 年筛选得到 HC2091 (**40**)对 H37Rv 菌株的 MIC_{99} 值为 $19.3 \mu\text{mol/L}$. 他们在构效关系研究中发现 **40** 的酰胺部分与苯环间的两个碳原子为活性必需, 当苯环上的氯原子被异丁基、乙基等基团取代时, 活性明显提升; 当苯环的其它位置有取代基时, 活性显著降低. 利莫那班(rimonabant, **41**)与 **33** 具有相似的分子结构, 因此 **41** 对 H37Rv 菌株也有一定的抑制作用, MIC 值为 $25 \mu\text{g/mL}$ ^[78].

2019 年, 饶子和院士课题组^[79]解析出 MmpL3 的晶体结构, 提出了 MmpL3 抑制剂(AU1235, SQ109, 吡啶酰胺类, 利莫那班)的作用机制: 小分子插入质子转移通道中, 使两对关键氨基酸作用力断裂(Asp256-Tyr646, Asp645-Tyr257), 导致质子动力降低, 进而抑制 MmpL3. 在靶点确证上, Li 等^[80]用吡啶酰胺类化合物与荧光基团共价结合形成一种分子探针 North100 (**42**), 可鉴别该靶点的抑制剂是否直接抑制 MmpL3 转运蛋白(Scheme 13).

图式 13 其他类 MmpL3 抑制剂
Scheme 13 Other MmpL3 inhibitors

1.7 Ag85 蛋白及其抑制剂

Ag85 蛋白家族包含 Ag85A (PDB ID: 1SFR)、Ag85B (PDB ID: 1F0N)、Ag85C (PDB ID: 1VA5), 这三个同源蛋白的晶体结构分别于 2001 年、2004 年相继被解析出来^[81-82]. Ag85ABC 属于 α/β 水解酶, 分别由 304、285、303 个氨基酸组成, 它们之间有 70.8%~77.5% 的同源性^[83]. Ag85 蛋白在 *M. tb* 中负责与丝氨酸水解酶协同将 TMM 上的分枝菌酸链转移到细胞壁上^[84]. Warrier 等^[85]发现一类 Ag85C 蛋白抑制剂(**43**)在普通菌株和耐药菌株中均表现出良好的活性. **43** 与 Ag85C 的共晶结构显示该分子的噻吩环在空间上阻碍了 Ag85C 与 TMM α 链的结合, 从而阻断了 *M. tb* 细胞壁上重要脂质的合成. Lehmann 等^[86]利用 β -内酯(**44**)模拟分枝菌酸结构, 从而阻断了分枝菌酸合成过程中丝氨酸水解酶、Ag85 与分枝菌酸酯的结合, 进而抑制细胞壁的合成(Scheme 14).

图式 14 Ag85 抑制剂
Scheme 14 Ag85 inhibitors

1.8 未知靶点的抑制剂

2014 年被欧盟批准上市的德拉马尼(Delamanid, **45**)属于硝基咪唑衍生物, 需要经过硝基还原酶活化后抑制分枝菌酸的合成^[20]. 在靶点认证实验中, 对抗性突变体进行全基因组测序, 突变位点位于编码与 **45** 活化过程相关的酶上, 所以 **45** 的具体靶点仍未确认^[87]. **45** 源于 1989 年 Ciba-Geigy 公司报道的化合物 CGI-17341 (**46**)^[88], 其致突变作用限制了它的发展, Matsumoto 等^[89]将侧链的 2 位替换为氧原子改善了致突变问题. 基于前期研究, Sasaki 等^[90]为改善水溶性以提高生物利用度, 在苯环对位引入哌啶得到 **47**; 为寻找细胞水平和体内活性更好的分子, 在进一步结构改造中发现了德拉马尼 (Scheme 15).

图式 15 德拉马尼的发现
Scheme 15 Discovery of Delamanid

北京协和医学院的张东峰课题组将 **25** 的苯并呋喃母核替换为苯并吡喃酮得到了化合物 **48** (Scheme 16), **48** 具有良好的肝微粒体稳定性. 在 BALB/c 小鼠急性感染模型中, **48** 能有效降低肺部菌落数量^[91]. 然而该类化合物未进行靶点确证.

图式 16 苯并吡喃酮衍生物
Scheme 16 4H-Chromen-4-one derivatives

2 结论与展望

虽然近半个世纪以来仅有贝达喹啉和硝基咪唑两类抗结核新化学实体被批准上市, 但已对严重耐药结核病的治疗带来巨大福音. 据 2020 年新英格兰杂志报道, 对严重耐药结核病患者采用贝达喹啉、普托马尼和利奈

唑胺三药联用的治疗方案可以极大缩短治疗周期至6个月,治愈率可高达90%^[92],这被认为是近五十多年以来结核病治疗的重大突破之一。异烟肼已被人们使用将近七十年,现在仍然作为一线药物来治疗各类型的结核病,这说明了基于分枝菌酸的生物合成和转运途径研发的药物有其独特的优势。同时近年来越来越多靶向此途径的化合物处于临床及临床前研究的各个阶段(表7),

SQ109在I期实验中已经显示出优良的安全性、耐受性和显著的疗效,当前处于临床IIb~III期;吡唑酮酰胺类、噻二唑类和吡唑酮酰胺类化合物显示出优异的体内/外活性,目前已进入临床前研究中。靶向分枝菌酸生物合成和转运途径的抗结核新化学实体的发现与发展有望为耐药结核病的治疗提供更多选择。

表7 靶向分枝菌酸的代表性抗结核抑制剂

Table 7 Representative antitubercular inhibitors targeting to mycolic acid

靶点	代表性小分子化合物	结构类别	发展阶段
KasA	DG167, JSF-3285	吡唑酮酰胺类	Lead Optimization
InhA	GSK693	噻二唑类	Lead Optimization
	NITD916	4-羟基-2-吡啶酮类	Hit-to-Lead
	PT03	二芳基醚类	Hit-to-Lead
HadABC	NAS21	1,3-二酮类	Hit-to-Lead
FadD32	喹啉-2-酰胺	喹啉类	Hit-to-Lead
Pks13	TP4	噻吩类	Hit-to-Lead
	TAM16, Coumestan48	苯并呋喃类	Lead Optimization
MmpL3	SQ109	乙二胺类	Phase IIb~III
	NITD-304, NITD-349	吡唑酮酰胺类	Pre-Clinical
	AU1235	金刚烷胺类	Hit-to-Lead
	BM212/BM635	吡咯和吡啶类	Hit-to-Lead
	THPP	四氢吡啶并[1,5-a]嘧啶类	Hit-to-Lead
	Spiro	哌啶螺环类	Hit-to-Lead
	PIPD1	羟基哌啶类	Hit-to-Lead
Ag85	I3-AG85	噻吩类	Hit-to-Lead
未知靶点	德拉马尼	亚硝基咪唑类	EMA 上市

References

- [1] WHO Global Tuberculosis Report 2020, World Health Organization, 2020. https://www.who.int/tb/publications/global_report/zh/.
- [2] Zumla, A. I.; Gillespie, S. H.; Hoelscher, M.; Philips, P. P.; Cole, S. T.; Abubakar, I.; McHugh, T. D.; Schito, M.; Maeurer, M.; Nunn, A. J. *Lancet Infect. Dis.* **2014**, *14*, 327.
- [3] Ivanyi, J. *Tuberc. Pathog. Prot. Control* **1994**, 437.
- [4] Sun, P.; Mei, J. *Chin. J. Antituberc.* **2010**, *43*, 44 (in Chinese). (孙丕, 梅建, 中国防痨杂志, **2010**, *43*, 44.)
- [5] Jackson, M.; Stadthagen, G.; Gicquel, B. *Tuberculosis* **2007**, *87*, 78.
- [6] Yuan, Y.; Lee, R. E.; Besra, G. S.; Belisle, J. T.; Barry III, C. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 6630.
- [7] North, E. J.; Jackson, M.; Lee, R. E. *Curr. Pharm. Design* **2014**, *20*, 4357.
- [8] Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M. A.; Rajandream, M. A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J. E.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Barrell, B. G. *Nature* **1998**, *393*, 537.
- [9] Daffé, M.; Draper, P. *Adv. Microb. Physiol.* **1998**, *39*, 131.
- [10] Marrakchi, H.; Lanéelle, M. A.; Daffé, M. *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 67.
- [11] Takayama, K.; Wang, C.; Besra, G. S. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 81.
- [12] Kremer, L.; Nampoothiri, K. M.; Lesjean, S.; Dover, L. G.; Graham, S.; Betts, J.; Brennan, P. J.; Minnikin, D. E.; Loch, C.; Besra, G. S. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 27967.
- [13] Choi, K. H.; Kremer, L.; Besra, G. S.; Rock, C. O. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 28201.
- [14] Kremer, L.; Dover, L. G.; Carrère, S.; Nampoothiri, K. M.; Lesjean, S.; Brown, A. K.; Brennan, P. J.; Minnikin, D. E.; Loch, C.; Besra, G. S. *Biochem. J.* **2002**, *364*, 423.
- [15] Marrakchi, H.; Ducasse, S.; Labesse, G.; Montrozier, H.; Margeat, E.; Emorine, L.; Charpentier, X.; Daffé, M.; Quemard, A. *Microbiology* **2002**, *148*, 951.
- [16] Banerjee, A.; Dubnau, E.; Quemard, A.; Balasubramanian, V.; Um, K. S.; Wilson, T.; Collins, D.; Lisle, G. D.; Jacobs, W. R. Jr. *Science* **1994**, *263*, 227.
- [17] Odriozola, J. M.; Ramos, J. A.; Bloch, K. *Biochim. Biophys. Acta, Lipids Lipid Metab.* **1977**, *488*, 207.
- [18] Trivedi, O. A.; Arora, P.; Sridharan, V.; Tickoo, R.; Mohanty, D.; Gokhale, R. S. *Nature* **2004**, *428*, 441.
- [19] Bhatt, A.; Brown, A. K.; Singh, A.; Minnikin, D. E.; Besra, G. S. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 930.
- [20] Lea-Smith, D. J.; Pyke, J. S.; Tull, D.; McConville, M. J.; Coppel, R. L.; Crellin, P. K. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 11000.

- [21] Grzegorzewicz, A. E.; Pham, H.; Gundi, V. A. K. B.; Scherman, M. S.; North, E. J.; Hess, T.; Jones, V.; Gruppo, V.; Born, S. E. M.; Kordulakova, J.; Chavadi, S. S.; Morisseau, C.; Lenaerts, A. J.; Lee, R. E.; McNeil, M. R.; Jackson, M. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 334.
- [22] Jackson, M.; Raynaud, C.; Laneelle, M. A.; Guilhot, C.; Laurent-Winter, C.; Ensergueix, D.; Gicquel, B.; Daffe, M. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 1573.
- [23] Kalscheuer, R.; Weinrick, B.; Veeraraghavan, U.; Besra, G. S.; Jacobs, W. R. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*, 21761.
- [24] Ramaswamy, S. V.; Reich, R.; Dou, S. J.; Jasperse, L.; Pan, X.; Wanger, A.; Quitugua, T.; Graviss, E. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1241.
- [25] DeBarber, A. E.; Mdluli, K.; Bosman, M.; Bekker, L. G.; Barry, C. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 9677.
- [26] Liu, Y. G.; Matsumoto, M.; Ishida, H.; Ohguro, K.; Yoshitake, M.; Gupta, R.; Geiter, L.; Hafkin, J. *Tuberculosis* **2018**, *111*, 20.
- [27] Kumar, P.; Capodagli, G. C.; Awasthi, D.; Shrestha, R.; Maharaja, K.; Sukheja, P.; Li, S. G.; Inoyama, D.; Zimmerman, M.; Liang, H. P. H.; Sarathy, J.; Mina, M.; Rasic, G.; Russo, R.; Peryman, A. L.; Richmann, T.; Gupta, A.; Singleton, E.; Verma, S.; Husain, S.; Soteropoulos, P.; Wang, Z.; Morris, R.; Porter, G.; Agnihotri, G.; Salgame, P.; Ekins, S.; Rhee, K. Y.; Connell, N.; Dartois, V.; Neiditch, M. B.; Freundlich, J. S.; Alland, D. *mBio* **2018**, *9*, e02101.
- [28] Abrahams, K. A.; Chung, C. W.; Ghidelli-Disse, S.; Rullas, J.; Rebollo-Lopez, M. J.; Gurucha, S. S.; Cox, J. A. G.; Mendoza, A.; Jimenez-Navarro, E.; Martinez-Martinez, M. S.; Neu, M.; Shillings, A.; Homes, P.; Argyrou, A.; Casanueva, R.; Loman, N. J.; Moynihan, P. J.; Lelievre, J.; Selenski, C.; Axtman, M.; Kremer, L.; Bantscheff, M.; Angulo-Barturen, I.; Izquierdo, M. C.; Cammack, N. C.; Drewes, G.; Ballell, L.; Barros, D.; Besra, G. S.; Bates, R. H. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12581.
- [29] Inoyama, D.; Awasthi, D.; Capodagli, G. C.; Tsotetsi, K.; Sukheja, P.; Zimmerman, M.; Li, S. G.; Jadhav, R.; Russo, R.; Wang, X.; Grady, C.; Richmann, T.; Shrestha, R.; Li, L. P.; Ahn, Y. M.; Ho, L. H. P.; Mina, M.; Park, S.; Freundlich, J. S. *Cell Chem. Biol.* **2020**, *27*, 560-570.
- [30] Chollet, A.; Mourey, L.; Lherbet, C.; Delbot, A.; Julien, S.; Baltas, M.; Bernadou, J.; Pratiel, G.; Maveyraud, L.; Bernardes-Génisson, V. *J. Struct. Biol.* **2015**, *190*, 328.
- [31] Rozwarski, D. A.; Vilcheze, C.; Sugantino, M.; Bittman, R.; Sacchettini, J. C. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 15582.
- [32] Chollet, A.; Mourey, L.; Lherbet, C.; Delbot, A.; Julien, S.; Baltas, M.; Bernadou, J.; Pratiel, G.; Maveyraud, L.; Bernardes-Génisson, V. *J. Struct. Biol.* **2015**, *190*, 328.
- [33] Martinez-Hoyos, M.; Perez-Herran, E.; Gulten, G.; Encinas, L.; Alvarez-Gomez, D.; Alvarez, E.; Ferrer-Bazaga, S.; Garcia-Perez, A.; Ortega, F.; Angulo-Barturen, I.; Rullas-Trincado, J.; Blanco Ruano, D.; Torres, P.; Castaneda, P.; Huss, S.; Fernandez Menendez, R.; Gonzalez Del Valle, S.; Ballell, L.; Barros, D.; Modha, S.; Dhar, N.; Signorino-Gelo, F.; McKinney, J. D.; Garcia-Bustos, J. F.; Lavandera, J. L.; Sacchettini, J. C.; Jimenez, M. S.; Martin-Casabona, N.; Castro-Pichel, J.; Mendoza-Losana, A. *EBioMedicine* **2016**, *8*, 291.
- [34] Hartkoorn, R. C.; Sala, C.; Neres, J.; Pojer, F.; Magnet, S.; Mukherjee, R.; Uplekar, S.; Boy-Rottger, S.; Altmann, K. H.; Cole, S. T. *EMBO Mol. Med.* **2012**, *4*, 1032.
- [35] Manjunatha, U. H.; Rao, S. P. S.; Kondreddi, R. R.; Noble, C. G.; Camacho, L. R.; Tan, B. H.; Ng, S. H.; Ng, P. S.; Ma, N. L.; Lakshminarayana, S. B.; Herve, M.; Barnes, S. W.; Yu, W. X.; Kuhen, K.; Blasco, F.; Beer, D.; Walker, J. R.; Tonge, P. J.; Glynn, R.; Smith, P. W.; Diagona, T. T. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 1.
- [36] Pan, P.; Tonge, P. J. *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 672.
- [37] Dong, Y.; Qiu, X.; Shaw, N.; Xu, Y.; Sun, Y.; Li, X.; Li, J.; Rao, Z. *Protein Cell.* **2015**, *6*, 504.
- [38] Bhowruth, V.; Brown, A. K.; Besra, G. S. *Microbiology* **2008**, *154*, 1866.
- [39] Grzegorzewicz, A. E.; Kordulakova, J.; Jones, V.; Born, S. E.; Belardinelli, J. M.; Vaquie, A.; Gundi, V. A.; Madacki, J.; Slama, N.; Laval, F.; Vaubourgeix, J.; Crew, R. M.; Gicquel, B.; Daffe, M.; Morbidoni, H. R.; Brennan, P. J.; Quemard, A.; McNeil, M. R.; Jackson, M. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 38434.
- [40] Portevin, D.; de Sousa-D'Auria, C.; Montrozier, H.; Houssin, C.; Stella, A.; Laneelle, M. A.; Bardou, F.; Guilhot, C.; Daffe, M. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 8862.
- [41] Kuhn, M. L.; Alexander, E.; Minasov, G.; Page, H. J.; Warwzrak, Z.; Shuvalova, L.; Flores, K. J.; Wilson, D. J.; Shi, C.; Aldrich, C. C.; Anderson, W. F. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 579.
- [42] Stanley, S. A.; Kawate, T.; Iwase, N.; Shimizu, M.; Clatworthy, A. E.; Kazyanskaya, E.; Sacchettini, J. C.; Ioerger, T. R.; Siddiqi, N. A.; Minami, S.; Aquadro, J. A.; Grant, S. S.; Rubin, E. J.; Hung, D. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 11565.
- [43] Fang, C.; Lee, K. K.; Nietupski, R.; Bates, R. H.; Fernandez-Menendez, R.; Lopez-Roman, E. M.; Guijarro-Lopez, L.; Yin, Y.; Peng, Z.; Gomez, J. E.; Fisher, S.; Barros-Aguirre, D.; Hubbard, B. K.; Serrano-Wu, M. H.; Hung, D. T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, *28*, 3529.
- [44] Galandrin, S.; Guillet, V.; Rane, R. S.; Leger, M.; N, R.; Eynard, N.; Das, K.; Balganes, T. S.; Mourey, L.; Daffe, M.; Marrakchi, H. *J. Biomol. Screen* **2013**, *18*, 576.
- [45] Bergeret, F.; Gavalda, S.; Chalut, C.; Malaga, W.; Quemard, A.; Pedelacq, J. D.; Daffe, M.; Guilhot, C.; Mourey, L.; Bon, C. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 33675.
- [46] Wilson, R.; Kumar, P.; Parashar, V.; Vilcheze, C.; Veyron-Churlet, R.; Freundlich, J. S.; Barnes, S. W.; Walker, J. R.; Szymonifka, M. J.; Marchiano, E.; Shenai, S.; Colangeli, R.; Jacobs, W. R., Jr.; Neiditch, M. B.; Kremer, L.; Alland, D. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 499.
- [47] Thanna, S.; Knudson, S. E.; Grzegorzewicz, A.; Kapil, S.; Goins, C. M.; Ronning, D. R.; Jackson, M.; Slayden, R. A.; Sucheck, S. J. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 6119.
- [48] Ioerger, T. R.; O'Malley, T.; Liao, R.; Guinn, K. M.; Hickey, M. J.; Mohaideen, N.; Murphy, K. C.; Boshoff, H. I.; Mizrahi, V.; Rubin, E. J.; Sasseti, C. M.; Barry, C. E., 3rd; Sherman, D. R.; Parish, T.; Sacchettini, J. C. *PLoS One* **2013**, *8*, e75245.
- [49] Aggarwal, A.; Parai, M. K.; Shetty, N.; Wallis, D.; Woolhiser, L.; Hastings, C.; Dutta, N. K.; Galaviz, S.; Dhakal, R. C.; Shrestha, R.; Wakabayashi, S.; Walpole, C.; Matthews, D.; Floyd, D.; Scullion, P.; Riley, J.; Epemolu, O.; Norval, S.; Snavey, T.; Robertson, G. T.; Rubin, E. J.; Ioerger, T. R.; Sirgel, F. A.; van der Merwe, R.; van Helden, P. D.; Keller, P.; Bottger, E. C.; Karakousis, P. C.; Lenaerts, A. J.; Sacchettini, J. C. *Cell* **2017**, *170*, 249.
- [50] Zhang, W.; Lun, S.; Wang, S. H.; Jiang, X. W.; Yang, F.; Tang, J.; Manson, A. L.; Earl, A. M.; Gunosewoyo, H.; Bishai, W. R.; Yu, L. F. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 791.
- [51] Zhang, W.; Lun, S.; Liu, L. L.; Xiao, S.; Duan, G.; Gunosewoyo, H.; Yang, F.; Tang, J.; Bishai, W. R.; Yu, L. F. *J. Med. Chem.* **2019**, *62*, 3575.
- [52] Dal Molin, M.; Selchow, P.; Schafle, D.; Tschumi, A.; Ryckmans, T.; Laage-Witt, S.; Sander, P. J. *Mol. Med. (Berl.)* **2019**, *97*, 1601.
- [53] Nikaido, H. *Res. Microbiol.* **2018**, *169*, 363.
- [54] Domenech, P.; Reed, M. B.; Barry, C. E. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 3492.
- [55] Tullius, M. V.; Harmston, C. A.; Owens, C. P.; Chim, N.; Morse, R. P.; McMath, L. M.; Iniguez, A.; Kimmey, J. M.; Sawaya, M. R.; Whitelegge, J. P.; Horwitz, M. A.; Goulding, C. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 5051.
- [56] Degiacomi, G.; Benjak, A.; Madacki, J.; Boldrin, F.; Provvedi, R.; Palu, G.; Kordulakova, J.; Cole, S. T.; Manganelli, R. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 43495.
- [57] Grzegorzewicz, A. E.; Pham, H.; Gundi, V. A.; Scherman, M. S.; North, E. J.; Hess, T.; Jones, V.; Gruppo, V.; Born, S. E.; Kordulakova, J.; Chavadi, S. S.; Morisseau, C.; Lenaerts, A. J.; Lee, R. E.; McNeil, M. R.; Jackson, M. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 334.
- [58] La Rosa, V.; Poce, G.; Canseco, J. O.; Bironi, S.; Pasca, M. R.; Biava, M.; Raju, R. M.; Porretta, G. C.; Alfonso, S.; Battilocchio, C.; Javid, B.; Sorrentino, F.; Ioerger, T. R.; Sacchettini, J. C.; Manetti, F.; Botta, M.; De Logu, A.; Rubin, E. J.; De Rossi, E. *An-*

- timicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 324.
- [59] Stanley, S. A.; Grant, S. S.; Kawate, T.; Iwase, N.; Shimizu, M.; Wivagg, C.; Silvis, M.; Kazyanskaya, E.; Aquadro, J.; Golas, A.; Fitzgerald, M.; Dai, H.; Zhang, L.; Hung, D. T. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1377.
- [60] Tahlan, K.; Wilson, R.; Kastrinsky, D. B.; Arora, K.; Nair, V.; Fischer, E.; Barnes, S. W.; Walker, J. R.; Alland, D.; Barry, C. E., 3rd; Boshoff, H. I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1797.
- [61] Lun, S.; Guo, H.; Onajole, O. K.; Pieroni, M.; Gunosewoyo, H.; Chen, G.; Tipparaju, S. K.; Ammerman, N. C.; Kozikowski, A. P.; Bishai, W. R. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2907.
- [62] Rao, S. P. S.; Lakshminarayana, S. B.; Kondreddi, R. R.; Herve, M.; Camacho, L. R.; Bifani, P.; Kalapala, S. K.; Jiricek, J.; Ma, N. L.; Tan, B. H.; Ng, S. H.; Nanjundappa, M.; Ravindran, S.; Seah, P. G.; Thayalan, P.; Lim, S. H.; Lee, B. H.; Goh, A.; Barnes, W. S.; Chen, Z.; Gagaring, K.; Chatterjee, A. K.; Pethe, K.; Kuhen, K.; Walker, J.; Feng, G.; Babu, S.; Zhang, L. J.; Blasco, F.; Beer, D.; Weaver, M.; Dartois, V.; Glynn, R.; Dick, T.; Smith, P. W.; Diagona, T. T.; Manjunatha, U. H. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 214.
- [63] Remuinan, M. J.; Perez-Herran, E.; Rullas, J.; Alemparte, C.; Martinez-Hoyos, M.; Dow, D. J.; Afari, J.; Mehta, N.; Esquivias, J.; Jimenez, E.; Ortega-Muro, F.; Fraile-Gabaldon, M. T.; Spivey, V. L.; Loman, N. J.; Pallen, M. J.; Constantinidou, C.; Minick, D. J.; Cacho, M.; Rebollo-Lopez, M. J.; Gonzalez, C.; Sousa, V.; Angulo-Barturen, I.; Mendoza-Losana, A.; Barros, D.; Besra, G. S.; Ballell, L.; Cammack, N. *PLoS One* **2013**, *8*, e60933.
- [64] Foss, M. H.; Pou, S.; Davidson, P. M.; Dunaj, J. L.; Winter, R. W.; Pou, S.; Licon, M. H.; Doh, J. K.; Li, Y.; Kelly, J. X.; Dodean, R. A.; Koop, D. R.; Riscoe, M. K.; Purdy, G. E. *ACS Infect. Dis.* **2016**, *2*, 500.
- [65] Dupont, C.; Viljoen, A.; Dubar, F.; Blaise, M.; Bernut, A.; Pawlik, A.; Bouchier, C.; Brosch, R.; Guerardel, Y.; Lelievre, J.; Ballell, L.; Herrmann, J. L.; Biot, C.; Kremer, L. *Mol. Microbiol.* **2016**, *101*, 515.
- [66] Shetty, A.; Xu, Z.; Lakshmanan, U.; Hill, J.; Choong, M. L.; Chng, S. S.; Yamada, Y.; Poulsen, A.; Dick, T.; Gengenbacher, M. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2960.
- [67] Zheng, H.; Williams, J. T.; Coulson, G. B.; Haiderer, E. R.; Abramovitch, R. B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, 02459-17.
- [68] Sacksteder, K. A.; Protopopova, M.; Barry, C. E.; Andries, K.; Nacy, C. A. *Future Microbiol.* **2012**, *7*, 823.
- [69] Jia, J.; Tomaszewski, J. E.; Hanrahan, C.; Coward, L.; Noker, P.; Gorman, G.; Nikonenko, B.; Protopopova, M. *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *144*, 80.
- [70] Reddy, V. M.; Einck, L.; Andries, K.; Nacy, C. A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2840.
- [71] Ballell, L.; Bates, R. H.; Young, R. J.; Alvarez-Gomez, D.; Alvarez-Ruiz, E.; Barroso, V.; Blanco, D.; Crespo, B.; Escibano, J.; Gonzalez, R.; Lozano, S.; Huss, S.; Santos-Villarejo, A.; Martin-Plaza, J. J.; Mendoza, A.; Rebollo-Lopez, M. J.; Remuinan-Blanco, M.; Lavandera, J. L.; Perez-Herran, E.; Gamo-Benito, F. J.; Garcia-Bustos, J. F.; Barros, D.; Castro, J. P.; Cammack, N. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 313.
- [72] Onajole, O. K.; Pieroni, M.; Tipparaju, S. K.; Lun, S.; Stec, J.; Chen, G.; Gunosewoyo, H.; Guo, H.; Ammerman, N. C.; Bishai, W. R.; Kozikowski, A. P. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 4093.
- [73] Kondreddi, R. R.; Jiricek, J.; Rao, S. P.; Lakshminarayana, S. B.; Camacho, L. R.; Rao, R.; Herve, M.; Bifani, P.; Ma, N. L.; Kuhen, K.; Goh, A.; Chatterjee, A. K.; Dick, T.; Diagona, T. T.; Manjunatha, U. H.; Smith, P. W. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 8849.
- [74] Stec, J.; Onajole, O. K.; Lun, S.; Guo, H.; Merenbloom, B.; Vistoli, G.; Bishai, W. R.; Kozikowski, A. P. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 6232.
- [75] Li, W.; Sanchez-Hidalgo, A.; Jones, V.; de Moura, V. C.; North, E. J.; Jackson, M. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*.
- [76] Poce, G.; Cocozza, M.; Alfonso, S.; Consalvi, S.; Venditti, G.; Fernandez-Menendez, R.; Bates, R. H.; Barros Aguirre, D.; Ballell, L.; De Logu, A.; Vistoli, G.; Biava, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *145*, 539.
- [77] Scherman, M. S.; North, E. J.; Jones, V.; Hess, T. N.; Grzegorzewicz, A. E.; Kasagami, T.; Kim, I. H.; Merzlikin, O.; Lenaerts, A. J.; Lee, R. E.; Jackson, M.; Morisseau, C.; McNeil, M. R. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3255.
- [78] Ramesh, R.; Shingare, R. D.; Kumar, V.; Anand, A.; B, S.; Veeraraghavan, S.; Viswanadha, S.; Ummanni, R.; Gokhale, R.; Srinivasa Reddy, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *122*, 723.
- [79] Zhang, B.; Li, J.; Yang, X.; Wu, L.; Zhang, J.; Yang, Y.; Zhao, Y.; Zhang, L.; Yang, X.; Yang, X.; Cheng, X.; Liu, Z.; Jiang, B.; Jiang, H.; Guddat, L. W.; Yang, H.; Rao, Z. *Cell* **2019**, *176*, 636.
- [80] Li, W.; Stevens, C. M.; Pandya, A. N.; Darzynkiewicz, Z.; Bhattarai, P.; Tong, W.; Gonzalez-Juarrero, M.; North, E. J.; Zgurskaya, H. I.; Jackson, M. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 1001.
- [81] Ronning, D. R.; Vissa, V.; Besra, G. S.; Belisle, J. T.; Sacchettini, J. C. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 36771.
- [82] Anderson, D. H.; Harth, G.; Horwitz, M. A.; Eisenberg, D. *J. Mol. Biol.* **2001**, *307*, 671.
- [83] Content, J.; de la Cuvelierie, A.; De Wit, L.; Vincent-Levy-Frebault, V.; Ooms, J.; De Bruyn, J. *Infect. Immun.* **1991**, *59*, 3205.
- [84] Jackson, M.; Raynaud, C.; Laneelle, M. A.; Guilhot, C.; Laurent-Winter, C.; Ensergueix, D.; Gicquel, B.; Daffe, M. *Mol. Microbiol.* **1999**, *31*, 1573.
- [85] Warrier, T.; Tropis, M.; Werngren, J.; Diehl, A.; Gengenbacher, M.; Schlegel, B.; Schade, M.; Oschkinat, H.; Daffe, M.; Hoffner, S.; Eddine, A. N.; Kaufmann, S. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 1735.
- [86] Lehmann, J.; Cheng, T. Y.; Aggarwal, A.; Park, A. S.; Zeiler, E.; Raju, R. M.; Akopian, T.; Kandror, O.; Sacchettini, J. C.; Moody, D. B.; Rubin, E. J.; Sieber, S. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 348.
- [87] Liu, Y. G.; Matsumoto, M.; Ishida, H.; Ohguro, K.; Yoshitake, M.; Gupta, R.; Geiter, L.; Hafkin, J. *Tuberculosis* **2018**, *111*, 20.
- [88] Ashtekar, D. R.; Costa-Perira, R.; Nagrajan, K.; Vishvanathan, N.; Bhatt, A. D.; Rittel, W. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37*, 183.
- [89] Matsumoto, M.; Hashizume, H.; Tomishige, T.; Kawasaki, M.; Tsubouchi, H.; Sasaki, H.; Shimokawa, Y.; Komatsu, M. *PLoS Med.* **2006**, *3*, e466.
- [90] Sasaki, H.; Haraguchi, Y.; Itotani, M.; Kuroda, H.; Hashizume, H.; Tomishige, T.; Kawasaki, M.; Matsumoto, M.; Komatsu, M.; Tsubouchi, H. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7854.
- [91] Zhao, W.; Wang, B.; Liu, Y.; Fu, L.; Sheng, L.; Zhao, H.; Lu, Y.; Zhang, D. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *189*, 112075.
- [92] Conradie, F.; Diacon, A. H.; Ngubane, N.; Howell, P.; Everitt, D.; Crook, A. M.; Mendel, C. M.; Egizi, E.; Moreira, J.; Timm, J.; McHugh, T. D.; Wills, G. H.; Bateson, A.; Hunt, R.; Van Niekerk, C.; Li, M.; Olugbosi, M.; Spigelman, M.; Nix, T. B. T. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 893.

(Lu, Y.)