

治疗隐球菌感染新药研究进展

廖国建¹, 郑 姣¹, 黄宇琪¹, 付 琛¹, 谢建平^{2*}

(1. 西南大学药学院现代生物医药研究所, 重庆 400716; 2. 西南大学生命科学学院现代生物医药研究所, 三峡库区生态环境与生物资源省部共建国家重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 隐球菌感染每年导致超 100 万例患者新增感染及近 60 万例病死报道, 严重威胁公众健康。隐球菌对目前有限的抗菌药物的耐药性日益严重, 新药研究十分迫切。抗隐球菌药物发挥药效除需具备一般抗真菌药物的特点外, 还需进入宿主细胞以及穿透血脑屏障。筛选具有全新作用机制的小分子化合物和已上市药物“老药新用”是目前抗隐球菌药物研发的两种主要策略。本文综述了据此获得的抗隐球菌先导化合物或药物的抗菌活性、作用机制和临床研究进展。

关键词: 新型隐球菌; 隐球菌病; 隐球菌性脑膜炎; 高通量筛选; 老药新用; 舍曲林

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0859-06

Novel antifungal agents against cryptococcal infections

LIAO Guo-jian¹, ZHENG Jiao¹, HUANG Yu-qi¹, FU Chen¹, XIE Jian-ping^{2*}

(1. Institute of Modern Biopharmaceuticals, School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Institute of Modern Biopharmaceuticals, State Key Laboratory Breeding Base of Eco-Environment and Bio-Resource of the Three Gorges Area, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Cryptococcal meningitis, caused by fungus *Cryptococcus neoformans*, is responsible for over a million infections and 600 000 deaths annually. Largely due to the limited treatment options and the intrinsic drawbacks coupled with drug resistance to current therapies, it is urgent to discover novel antifungal agents against cryptococcosis. An ideal antifungal drug should at least satisfy the following criteria: fungicidal, fungus-specific, permeable for the host barriers such as cell membranes of phagocytes and the blood-CNS barrier. Both discovery of candidates with novel mode of action and repurposing existing molecules with potent anti-cryptococcal activity are effective ways in discovery of new anti-cryptococcal agents. Here, we summarized recent advances in the study of anti-fungal activities, mechanisms of action, and clinical developments of new anti-cryptococcal drugs.

Key words: *C. neoformans*; cryptococcosis; cryptococcal meningitis; high-throughput screening; drug repurposing; sertraline

隐球菌是人类的致命性真菌之一, 每年新发感染高达 100 万例, 近 60 万人死于隐球菌感染^[1]。感染人类的隐球菌主要为 3 类: 新生隐球菌格鲁比变种

(*Cryptococcus neoformans* var. *grubii*)、新生隐球菌新生变种 (*C. neoformans* var. *neoformans*) 和格特隐球菌 (*C. gattii*)^[2]。在免疫力低下的患者中, 绝大多数隐球菌感染表现为脑膜炎。隐球菌性脑膜炎病死率高, 即使接受两性霉素 B 治疗, 急性 (3 个月内) 脑膜炎病死率仍高达 35%~40%^[3]。此外, 免疫正常人群也会受到感染, 北美西北太平洋地区曾报道免疫功能无明显改变的人群中爆发过格特隐球菌引发的持续

收稿日期: 2016-12-27; 修回日期: 2017-03-05.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31670050); 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2016A015).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-23-68367108, E-mail: georgex@swu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1228

感染^[4]。在我国,免疫正常人群中也有过隐球菌感染报道^[5]。尤为严重的是,随着抗真菌药物的大量使用,隐球菌的耐药性日益严峻^[6]。

隐球菌感染的严重危害,耐药性菌株的不断涌现以及临床可用药物少,都使得研发新抗隐球菌药物迫在眉睫。本世纪初,人们通过分子水平和细胞水平的高通量药物筛选技术 (high-throughput screening, HTS),发现了不少具有潜在抗隐球菌活性的化合物,继而为抗隐球菌新药的发现提供了重要的先导化合物。与此同时,一些研究者对已上市药物进行抗隐球菌活性评价,开展“老药新用” (drug repurposing),也不失为一种有效策略。通过这两种策略发现了不少抗隐球菌新化合物,其中3种化合物进入了临床研究阶段。本文综述了采用上述两种策略发现的抗隐球菌药物的抗菌活性、作用机制和临床研究进展。

1 现有抗隐球菌药物及其局限性

目前治疗隐球菌病的药物种类非常有限,仅有多烯类 (两性霉素 B)、嘧啶类似物 (5-氟胞嘧啶, 5-FC) 和三唑类 (氟康唑) 三类 (图 1)。这些药物的疗效受毒性较高、非杀菌性 (抑菌) 作用方式或耐药性发展等因素的制约。当前,隐球菌性脑膜炎治疗的基础药物是两性霉素 B,它通过与隐球菌细胞膜的麦角甾醇结合及氧化损伤重要细胞成分诱导细胞死亡而杀菌^[7,8]。两性霉素 B 抗菌谱广、起效快,但具有蓄积性肾毒性,故临床应用受到限制。5-FC 通过合成有毒中间产物干扰真菌 DNA 和蛋白质合成而导致真菌死亡,对病原真菌具有特异性,缺点是容易出现耐药性和具有血液毒性^[2]。氟康唑是真菌 14 α -去甲基酶的抑制剂,破坏真菌细胞膜合成而抑制真菌生长。该酶催化羊毛甾醇转化为麦角甾醇。氟康唑的口服生物利用度好,脑脊液药物浓度较高。然而由于氟康唑是抑菌剂,清除病原菌较慢,长期使用易导致耐药性。目前,耐氟康唑的隐球菌菌株逐渐增多,其治疗局限性也日益明显^[9,10]。总之,针对现有药物治疗隐球菌病的各种不足,研发具有新活性新机制的药物具有重要临床意义。

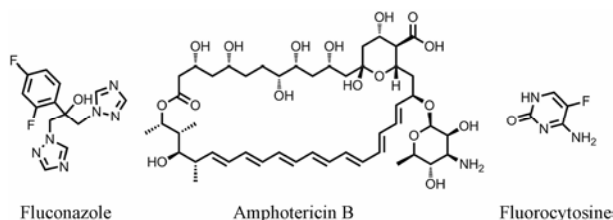


Figure 1 Chemical structures of fluconazole, amphotericin B and fluorocytosine

2 抗隐球菌的理想药物

理论上讲,抗隐球菌的理想药物应当尽可能避免上述药物的不足,并应具备如下特点:对已上市药物耐药菌株有效,具有广谱活性,与现有抗生素之间没有交叉耐药性,具有杀真菌活性,对人体毒性尽可能低^[11]。因隐球菌病的常见形式是脑膜炎,且多发于医疗设备有限的 HIV 感染高发区域,因此抗隐球菌理想药物还应具有另两个特点:能穿透中枢神经系统的血脑屏障;最好能口服,并可与氟康唑联用。

3 抗隐球菌化合物

美国罗彻斯特大学 Krysan、英国伯明翰大学 Hall 等利用 HTS 筛选了化合物库和专利过期药物库,发现了 36 个具有抗隐球菌活性的化合物^[12]。目前,研究者对这些化合物主要进行了体外 (*in vitro*) 抑菌活性评价和作用机制解析,体内评价 (*in vivo*) 报道较少。这些活性化合物将为新型抗隐球菌药物的研发提供重要的先导化合物。

3.1 HTS 筛选化合物库获得抗隐球菌化合物 评价化合物抗真菌活性的经典方法是肉汤或微量肉汤生长抑制试验。通过测定含药培养基光密度来确定微生物的生长抑制情况。然而该方法难以区分化合物是抑菌还是杀菌。就抗隐球菌药物研发而言,具有杀菌活性的化合物往往更受青睐,因多数隐球菌感染患者免疫力低下,故更依赖抗真菌药物直接清除病原菌。Krysan 等^[13]建立了一种筛选杀菌化合物的方法,并用于高通量药物筛选。其基本原理是以胞外腺苷酸激酶 (adenylate kinase, AK) 的含量作为真菌胞体裂解的生物标志物。AK 是一种胞内酶,将两分子的 ADP 转化为 ATP 和 AMP,当细胞膜失去完整性,AK 将释放到培养基中,使用商业荧光素酶活性测定试剂盒可以检测胞外 AK 的活性。利用胞外 AK 活性进行初筛,结合真菌细胞壁完整性筛选模型进行复筛,获得 4 个具有杀菌活性的化合物^[14]。

以 AK 活性 $EC_{50} \leq 10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、对 3 种哺乳动物细胞系 (HepG2、HEK293 和 A549) 的 $LD_{50} \geq 20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、在含有山梨醇培养基中化合物最小抑菌浓度 (MIC) 增加 1.5 倍为标准,筛选获得了 4 个环硫代羟基结构化合物 (1~4) (图 2)。添加山梨醇能够抑制由于细胞壁完整性破坏而导致的细胞死亡。化合物 1~3 的 MIC 为 $4\sim 8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,而含有六元环的化合物 (4) 活性较弱 ($MIC=32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。基于低哺乳动物细胞毒性的化合物 1 合成了 60 个结构类似物,初步构效关系研究表明,硫脲基团是发挥活性所必需的。不过,令人遗憾的是,新合成衍生物的活性尚

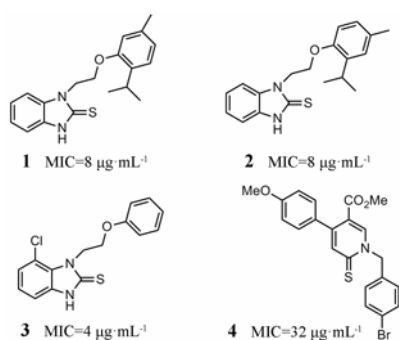


Figure 2 Compounds targeting the cell wall integration signaling pathway in *C. neoformans*

无优于初筛化合物的。

3.2 HTS 筛选已上市药物获得抗隐球菌药物 基于 AK 活性筛选技术, Kyran 等^[12]对包含 1 200 种专利过期药物/小分子库进行了筛选, 开展“老药新用”研究。共发现 31 种药物/小分子具有杀隐球菌活性, 其中包括后文提到的舍曲林。值得特别指出是, 其中部分药物能够杀灭胞内感染隐球菌。肺泡巨噬细胞是机体对抗隐球菌的第一道防线, 但隐球菌却能够在巨噬细胞吞噬体中生存和繁殖。能够清除胞内感染的化合物有望作为一种新方法治疗隐球菌病和作为现有抗真菌药物的补充。研究发现胺碘酮 (amiodarone) 和甲硫哒嗪 (thioridazine) 均可以杀死胞内隐球菌^[12] (图 3)。胺碘酮是抗心律失常药, 是轻度非竞争性的 α 及 β 肾上腺素受体阻滞剂; 甲硫哒嗪是抗精神分裂药物, 可阻断 DA 受体、M-受体和 α -受体等, 它们杀隐球菌的机制尚不明确。Hall 等^[15]利用相同的专利过期药物库, 通过宿主细胞毒评价、胞外抗真菌活性评价和巨噬细胞胞内抗真菌活性评价, 发现芬地林 (fendiline) 具有杀灭胞内感染隐球菌的活性。有趣的是, 芬地林是一种 L-型钙离子通道抑制剂, 通过释放内质网中存储的钙离子增加细胞质中钙离子浓度, 其本身并无抗真菌活性, 但是可通过促进吞噬体的酸化发挥抗菌作用。

4 临床研究阶段的抗隐球菌药物

目前, 绝大多数的抗隐球菌新化合物处于生物活性测试或临床前研究阶段, 但有 3 种小分子化合物进入临床研究阶段 (表 1)。

4.1 VT-1129 真菌细胞膜麦角甾醇的生物合成途径是重要的抗真菌药物靶标, CYP51 抑制剂 (如氟康唑) 是治疗隐球菌感染的重要药物。现有 CYP51 抑制剂由于脱靶效应抑制了人类细胞色素 P450 酶 (如 CYP3A4) 导致了一系列毒副作用^[16]。对药物-靶点相互作用分析发现三唑类药物高亲和力的金属结合基

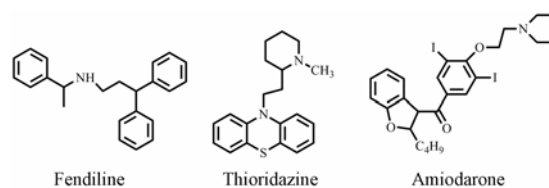


Figure 3 Inhibitors against intracellular replication of *C. neoformans* in macrophages

团 (metal-binding group, MBG) 是脱靶效应的主要来源, 因此, Viamet Pharmaceuticals 的 Hoekstra 等^[16]基于伏立康唑合成了一系列低亲和力 MBG 衍生物, 其中含有 1-四唑的衍生物 (5) 具有良好的治疗系数 (CYP3A4 IC_{50} /*Candida albicans* MIC = 1.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。该公司的研究者进一步对骨架结构进行修饰获得了一系列 16 个新型抗真菌化合物 (图 4)。其中口服化合物 VT-1129, 具有强的抗隐球菌活性和对真菌 CYP51 的高度特异性 (CYP3A4 IC_{50} /*C. albicans* MIC > 79 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。体外活性评价发现, VT-1129 对新生隐球菌的 MIC₅₀ 范围为 0.015 ~ 0.125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, MIC₁₀₀ 为 0.015 ~ 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 优于已上市的药物^[17]。氟康唑对新生隐球菌的 MIC₅₀ 范围是 0.5 ~ 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。更为重要的是 VT-1129 对氟康唑耐药的隐球菌也有活性 (MIC₅₀ = 0.003 75 ~ 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, MIC₁₀₀ = 0.003 75 ~ 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[18]。VT-1129 在 ICR 小鼠中的血浆半衰期长达 6 天, 在 ICR 小鼠真菌感染量模型和存活模型中, VT-1129 都具有良好的治疗效果。在存活模型中, 对照小鼠在 12 天全部死亡, 而给药组 30 天后大部分存活 (>70%)。不同给药剂量小鼠脑部的真菌负担为 0.46 ~ 4.57 log CFU·g⁻¹, 而对照组为 6.41 log CFU·g⁻¹, 所有测试给药剂量的 VT-1129 都显著降低了真菌的感染量。根据给药剂量不同, 在第 15 天血浆中和脑脊液中的药物浓度分别为 0.187 到 5.70 mg·L⁻¹ 和 0.533 到 13.99 mg·L⁻¹, 表明药物具有透过血脑屏障能力在脑中富集。VT-1129 具有良好的体内外抗隐球菌活性, 且能够口服。因此, VT-1129 于 2015 年获得了美国 FDA 合格传染病产品 (Qualified infectious disease product, QIDP) 认证, 作为治疗隐球菌性脑膜炎的孤儿药, 进入 I 期临床试验。

4.2 AR-12 真菌乙酰辅酶 A 合成酶 (acetyl-CoA synthetase, Acs) 以依赖 ATP 的方式利用乙酸和辅酶 A 合成乙酰辅酶 A^[19]。Acs 是白色念珠菌的必需基因, 也是新生隐球菌发挥毒力的必需基因^[20,21]。人体细胞绝大多数的乙酰辅酶 A 合成依赖 ATP 的柠檬酸裂合酶。鉴于乙酰辅酶 A 在真菌代谢中的重要性, 及人体细胞和真菌的合成路径有别, Acs 有望成为一个新型

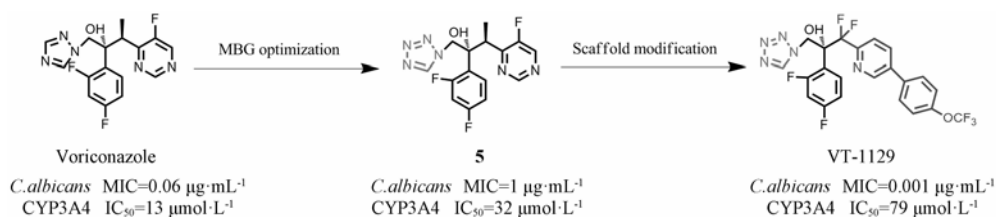


Figure 4 Chemical structures of Fungal CYP51 inhibitor, structure optimization and anti-fungal activity

抗真菌药物候选靶点。

最近的研究发现,对病原真菌具有广谱活性的 OSU-03012/AR-12 的药物靶点是 Acs^[22]。AR-12 是塞来昔布衍生物 (图 5),具有良好的抗肿瘤活性,已完成抗肿瘤一期临床试验,总体安全性较好 (临床试验编号: NCT00978523)。AR-12 对酵母、霉菌和双态性真菌的 MIC 值为 2~4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[21]。此外,AR-12 对三唑类或棘白霉素耐药的白色念珠菌也有良好活性。AJ/Cr 小鼠隐球菌性脑膜炎模型中 AR-12 能够提升氟康唑的治疗效果。氟康唑 (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 AR-12 (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 联用 6 天比单独使用氟康唑 (10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 降低小鼠脑部隐球菌数量约 90%。单独使用 AR-12 (100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 对控制隐球菌性脑膜炎无效。基于 AR-12 的良好体外抗菌效果,以及与氟康唑联用对控制小鼠隐球菌性脑膜炎的效果,2015 年该药物在欧洲取得孤儿药资格,用于与氟康唑联用治疗隐球菌性脑膜炎。

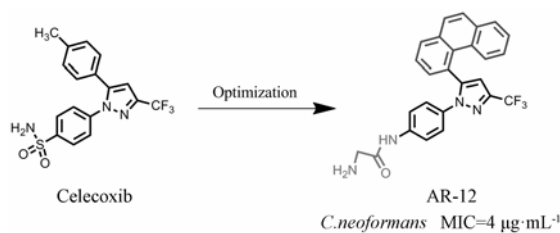


Figure 5 Chemical structure of the inhibitor of fungal acetyl-CoA synthetase and structure optimization

4.3 舍曲林 蛋白质合成过程对生物存活非常重要,而真菌与人体细胞蛋白质合成的差异环节往往是理想的候选药物靶点。粪壳菌素是从 *Sordaria araneosa* 的代谢物中发现的一种具有抗真菌活性的天然产物,可选择性结合真菌翻译延伸因子 2 (EF-2) 与核糖体

形成的复合物,通过抑制蛋白质的合成而抑制真菌生长^[23]。舍曲林是一种治疗抑郁症的专利过期药物,是 5-羟色胺选择性再摄取抑制剂。舍曲林也通过干扰真菌蛋白质合成而发挥抗隐球菌活性^[24],但具体的作用靶标尚有待阐明。

多个研究小组筛选新抗隐球菌药物,以及筛选能与氟康唑联用药物的过程中都发现了舍曲林的良好活性^[24,25]。舍曲林可以杀隐球菌 (MIC₉₀=2~6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, MFC=6~10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),并与氟康唑具有协同作用。口服舍曲林能实现脑脊液浓度为血液浓度的 10~40 倍。在 AJ/Cr 小鼠隐球菌性脑膜炎模型中,单独使用舍曲林,以及舍曲林和氟康唑联用能够显著降低小鼠大脑中真菌数量,联用效果优于氟康唑单独使用。最近在非洲开展了舍曲林辅助治疗 HIV 相关隐球菌性脑膜炎疗效的小规模随机非盲 III 期临床试验 (临床试验编号: NCT01802385),研究结果初步显示了舍曲林作为新抗隐球菌药物的潜力。使用舍曲林的受试者具有比既往报告更快的隐球菌脑脊液清除率和更低的免疫重建炎性综合征发生率及复发率^[26]。虽然这些包含舍曲林方案的早期抗真菌活性优于两性霉素 B 联合氟康唑治疗的历史数据,但是不同的临床试验结果之间存在差异。因此,需要更大规模的随机对照双盲临床试验来进一步证实舍曲林治疗隐球菌性脑膜炎的效果。

5 展望

目前进入临床研究阶段的 3 种药物都满足口服、杀菌、对氟康唑耐药菌株有效、在动物模型中与氟康唑有协同作用的特点,VT-1129 和舍曲林还具有脑脊液浓度高的特征,有望成为治疗隐球菌性脑膜炎新药。然而,AR-12 和 VT-1129 都处于临床研究的早期阶段,比如 VT-1129 的安全性尚不明确,其开发存在

Table 1 Anti-cryptococcal drugs in clinical development

Compound	Mode of action	Company	Development	Reference
AR-12	Selective inhibitor of fungal Acs	Arno Therapeutics	Phase I. Orphan drug	21, 22
VT-1129	Highly selective inhibitor of fungal CYP51	Viamet Pharmaceuticals	Phase I. QIDP and Orphan drug	16, 17, 18
Sertraline	Inhibitor of fungal protein translation	University of Minnesota	Phase III.	24, 25, 26

很大的不确定性。舍曲林虽然在随机非盲 III 临床试验中安全性较好, 脑脊液中隐球菌的清除更快, 但还需要更大规模的随机对照双盲临床试验来进一步证实舍曲林的疗效。为了扩大候选药物的范围, 需要从“老药”中选择具有杀菌活性, 能够通过血脑屏障和具有其他良好药理特征的药物开展临床前评价; 需要将一些存在用药风险的老药, 如抗心律失常药物碘胺酮, 确定其抗真菌靶点, 基于小分子-药靶的相互作用, 优化碘胺酮的母核, 获得选择性的抗隐球菌药物用于后续的开发; 需要将高通量药物筛选发现的化合物, 进行结构优化和构效关系研究, 获得高活性先导化合物。此外, 还需利用转录组学、蛋白质组学、代谢组学和反向遗传学等工具, 深入研究隐球菌与宿主相互作用过程中的关键分子^[27], 筛选宿主和致病菌两个方面的候选药物靶点, 为开发全新作用机制的药物提供基础。最后, 需要加强对耐药流行病学和分子机制的解析^[27, 28], 指导临床上合理使用抗真菌药物, 降低耐药菌株的发生率。这些都可能为更好控制隐球菌感染提供基础。

References

- [1] Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, et al. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS [J]. *AIDS*, 2009, 23: 525–530.
- [2] May RC, Stone NR, Wiesner DL, et al. *Cryptococcus*: from environmental saprophyte to global pathogen [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2016, 14: 106–117.
- [3] Day JN, Chau TT, Lalloo DG. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368: 2522–2523.
- [4] Byrnes EJ 3rd, Li W, Lewit Y, et al. Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000850.
- [5] Fang W, Fa Z, Liao W. Epidemiology of *Cryptococcus* and cryptococcosis in China [J]. *Fungal Genet Biol*, 2015, 78: 7–15.
- [6] Smith KD, Achan B, Hullsiek KH, et al. Increased antifungal drug resistance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59: 7197–7204.
- [7] Belenky P, Camacho D, Collins JJ. Fungicidal drugs induce a common oxidative-damage cellular death pathway [J]. *Cell Rep*, 2013, 3: 350–358.
- [8] Anderson TM, Clay MC, Cioffi AG, et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge [J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 400–406.
- [9] Sionov E, Lee H, Chang YC, et al. *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000848.
- [10] Posteraro B, Sanguinetti M, Sanglard D, et al. Identification and characterization of a *Cryptococcus neoformans* ATP binding cassette (ABC) transporter-encoding gene, CnAFR1, involved in the resistance to fluconazole [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 47: 357–371.
- [11] Mutz M, Roemer T. The GPI anchor pathway: a promising antifungal target? [J]. *Future Med Chem*, 2016, 8: 1387–1391.
- [12] Butts A, DiDone L, Koselny K, et al. A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis [J]. *Eukaryot Cell*, 2013, 12: 278–287.
- [13] DiDone L, Scrimale T, Baxter BK, et al. A high-throughput assay of yeast cell lysis for drug discovery and genetic analysis [J]. *Nat Protoc*, 2010, 5: 1107–1114.
- [14] Hartland K, Pu J, Palmer M, et al. High-throughput screen in *Cryptococcus neoformans* identifies a novel molecular scaffold that inhibits cell wall integrity pathway signaling [J]. *ACS Infect Dis*, 2016, 2: 93–102.
- [15] Samantaray S, Correia JN, Garelnabi M, et al. Novel cell-based *in vitro* screen to identify small-molecule inhibitors against intracellular replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 48: 69–77.
- [16] Hoekstra WJ, Garvey EP, Moore WR, et al. Design and optimization of highly-selective fungal CYP51 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 3455–3458.
- [17] Lockhart SR, Fothergill AW, Iqbal N, et al. The investigational fungal Cyp51 inhibitor VT-1129 demonstrates potent *in vitro* activity against *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 2528–2531.
- [18] Nielsen K, Vedula P, Smith KD, et al. Activity of VT-1129 against *Cryptococcus neoformans* clinical isolates with high fluconazole MICs [J]. *Med Mycol*, 2016, pii: myw089.
- [19] Strijbis K, Distel B. Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism [J]. *Eukaryot Cell*, 2010, 9: 1809–1815.
- [20] Carman AJ, Vylkova S, Lorenz MC. Role of acetyl coenzyme

- A synthesis and breakdown in alternative carbon source utilization in *Candida albicans* [J]. *Eukaryot Cell*, 2008, 7: 1733–1741.
- [21] Koselny K, Green J, DiDone L, et al. The celecoxib derivative AR-12 has broad-spectrum antifungal activity *in vitro* and improves the activity of fluconazole in a murine model of cryptococcosis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 7115–7127.
- [22] Koselny K, Green J, Favazzo L, et al. Antitumor/antifungal celecoxib derivative AR-12 is a non-nucleoside inhibitor of the anl-family adenylyating enzyme acetyl CoA synthetase [J]. *ACS Infect Dis*, 2016, 2: 268–280.
- [23] Justice MC, Ku T, Hsu MJ, et al. Mutations in ribosomal protein L10e confer resistance to the fungal-specific eukaryotic elongation factor 2 inhibitor sordarin [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 4869–4875.
- [24] Zhai B, Wu C, Wang L, et al. The antidepressant sertraline provides a promising therapeutic option for neurotropic cryptococcal infections [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56: 3758–3766.
- [25] Robbins N, Spitzer M, Yu T, et al. An antifungal combination matrix identifies a rich pool of adjuvant molecules that enhance drug activity against diverse fungal pathogens [J]. *Cell Rep*, 2015, 13: 1481–1492.
- [26] Rhein J, Morawski BM, Hullsiek KH, et al. Efficacy of adjunctive sertraline for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: an open-label dose-ranging study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16: 809–818.
- [27] Liu TB, Subbian S, Pan W, et al. Cryptococcus inositol utilization modulates the host protective immune response during brain infection [J]. *Cell Commun Signal*, 2014, 12: 51.
- [28] Huang W, Liao G, Baker GM, et al. Lipid flippase subunit Cdc50 mediates drug resistance and virulence in *Cryptococcus neoformans* [J]. *MBio*, 2016, 7: pii: e00478-16. DOI: 10.1128/mBio.00478-16.