LpxH靶向抗菌药物研究进展

张 高, 夏 杰*, 吴 松*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050)

摘要: 尿苷二磷酸-2,3-二酰基葡糖胺焦磷酸水解酶 (UDP-2,3-diacylglucosamine pyrophosphate hydrolase, LpxH) 是革兰阴性菌的脂质A (lipid A) 生物合成途径中的关键酶。由于脂质A作为脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的必要组成成分, 在革兰阴性菌中参与着重要的生物学功能, LpxH被认为是抗菌药物研究的重要靶标之一。本文从LpxH的功能与结构出发, 对目前已报道的LpxH抑制剂进行了系统总结和分析, 并对未来的研究方向进行了展望。本综述将为LpxH抑制剂的设计提供思路, 有助于LpxH靶向的新型抗菌药物的研发。

关键词: 抗生素; 革兰阴性菌; LpxH抑制剂; 脂多糖; 磺酰哌嗪

中图分类号: R914 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2025)06-1616-15

Research progress on LpxH-targeted antibacterial drugs

ZHANG Gao, XIA Jie*, WU Song*

(*State Key Laboratory of Bioactive Substance and Function of Natural Medicines, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

Abstract: UDP-2, 3-diacylglucosamine pyrophosphate hydrolase (LpxH) is a key enzyme in the lipid A biosynthesis pathway of Gram-negative bacteria. Lipid A is an indispensable component of lipopolysaccharide (LPS), and LPS plays an important biological function in Gram-negative bacteria. Therefore, LpxH is considered one of the important targets in the research of antibacterial drugs. Based on the function and structure of LpxH enzyme, this review systematically summarizes and analyzes the currently reported LpxH inhibitors, and offers perspectives on future research directions. This review will provide ideas for the design of LpxH inhibitors and contribute to the development of new antibacterial drugs targeting LpxH.

Key words: antibiotics; Gram-negative bacterium; LpxH inhibitor; lipopolysaccharide; sulfonylpiperazine

在全世界公共健康领域, 耐药性革兰阴性菌所致的感染性疾病是十分棘手的问题, 目前已经发现多种菌株对现有的抗生素产生了广泛的耐药性。在世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 2024年最新列出的优先级病原菌名录 (Priority list)[1]中, 碳青霉烯类耐药鲍曼不动杆菌、碳青霉烯类耐药肠杆菌、第3代头孢菌素耐药肠杆菌和利福平耐药结核分枝杆菌被列为最高优先级耐药菌, 除结核分枝杆菌外均为革兰阴性菌。我国细菌耐药监测网显示[2], 临床最常见的病原性耐药细菌排名前5位的分别是大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *Ec*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, *Kp*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, *Sa*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pa*) 和鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*, *Ab*), 多数为革兰阴性菌, 碳青霉烯类耐药革兰阴性杆菌的检出率处于高位。目前已知的针对革兰阴性菌的抗生素类型包括: *β*-内酰胺类、*β*-内酰胺酶抑制剂类、四环素类、喹诺酮类、氨基糖苷类、截短侧耳素类及多黏菌素类[3]。但是细菌耐

收稿日期: 2025-02-19; 修回日期: 2025-04-10.

基金项目: 工业与信息化部2024年产业技术基础公共服务平台项目 (GN2024-31-4700); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大项目 (2021-I2M-1-069); 北京协和医学院中央高校基本科研业务费学生项目 (3332024170).

*通讯作者 Tel: 86-10-83163542,

E-mail: jie.william.xia@hotmail.com; ws@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0158

药性的出现使得上述药物药效丧失或者降低, 因此亟需发现新结构类型和新机制的抗革兰阴性菌药物。

革兰阴性菌的膜结构由细菌内膜、膜间质和细菌外膜组成。细菌内膜由磷脂双分子层组成, 间质中含有一层较薄的肽聚糖, 细菌外膜为高度不对称的脂双层结构。细菌外膜结构中存在一种特殊的物质——脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 其作用是维持细菌外膜的结构完整性和作为细菌的屏障, LPS是革兰阴性菌外膜的重要组成成分, 通常由3部分组成: 脂质A、核心多糖 (core oligosaccharide) 和*O*-抗原 (*O*-antigen), 如图1A所示[4,5]。脂质A构成LPS的疏水部分, 帮助LPS锚定在细菌的外膜, 是革兰阴性菌致热性和毒性的主要来源, 因此又称内毒素。核心多糖连接脂质A和*O*-抗原, 通常由数个单糖分子构成, 包括庚糖、葡萄糖、半乳糖等。*O*-抗原是LPS的多糖部分, 具有亲水性, 暴露在细菌表面, 其具有高度变异性, 有助于细菌逃逸宿主免疫系统[4,6,7]。LPS对革兰阴性菌的生存具有关键作用: ① LPS嵌入细菌外膜, 通过电荷作用和疏水作用与磷脂分子相互作用, 可以增强细菌外膜的稳定性, 并帮助细菌抵抗药物分子的损害, 以及逃避宿主的免疫攻击; ② 脂质A的结构改变 (如磷酸化模式的变化和脂肪酸链种类和分布的变异) 能够调控其与宿主免疫系统的相互作用, 从而影响细菌的生存策略和致病能力[6,8-11]。

脂质A (lipid A) 是LPS的重要组成部分。目前, 对大肠杆菌中脂质A生物合成途径的研究最多。在大肠杆菌中, 脂质A的合成途径被称为Raetz途径[4], 其中涉及的酶包括LpxA～LpxD、LpxH、LpxK、LpxL、LpxM和KdtA共9种酶, 如图1B所示[4,5]。与大肠杆菌不同, 鲍曼不动杆菌缺失催化前3步的酶LpxA、LpxC和LpxD时依然可以存活, 但当其缺失LpxH、LpxB和LpxK等后期步骤相关酶时, 毒性中间体尿苷二磷酸-2,3-二酰基葡糖胺 (uridine diphosphate-2,3-diacylglucosamine, UDP-DAGn) 将在鲍曼不动杆菌内积累, 致使其死亡[12,13]。因此, 根据酶的重要性, 革兰阴性菌脂质A的生物合成相关酶被分为两类, 分别是重要性较低的早期相关酶 (LpxA、LpxC和LpxD) 和重要性较高的晚期相关酶 (LpxH、LpxB和LpxK等)[14-17]。目前为止, 还没有针对脂质A合成相关酶的药物上市, 但是已经有关于LpxC[18-28]、LpxA[29-31]、LpxD[30,32]等早期相关酶抑制剂的报道, 其中LpxC抑制剂的研究进展较快, 已有化合物进入了临床研究阶段[33], 以上进展对脂质A生物合成途径作为新型抗生素的靶标进行了概念验证。值得注意的是, 抑制脂质A合成后期相关酶 (例如LpxH) 可能更有利于减少细菌的耐药突变, 因为抑制后期相关酶可以通过破坏脂质A的生物合成途径和增加毒性中间体的积累两种途径使细菌死亡。

尿苷二磷酸-2,3-二酰基葡糖胺焦磷酸水解酶 (UDP-2, 3-diacylglucosamine pyrophosphate hydrolase, LpxH) 参与Raetz途径的第4步, 是第一个后期相关酶, 其催化UDP-DAGn的水解, 产生脂质A合成过程中的关键中间体——脂质X (lipid X), 以及尿苷单磷酸 (uridine monophosphate, UMP)。LpxH在约70%的革兰阴性细菌中起作用, 包括所有临床上重要的肠杆菌, 例如肺炎克雷伯菌、大肠杆菌等[34], 而在哺乳动物细胞中不存在LpxH的同源蛋白, 因此, LpxH是研发安全有效的广谱抗革兰阴性菌药物的理想靶标。尽管目前还没有靶向LpxH的上市抗菌药物, 但近年来针对LpxH抑制剂的研究取得了许多重要进展。本文在LpxH的生物学功能与结构特征分析的基础上, 阐述小分子抑制剂研发进展, 并对目前存在的挑战和未来研究方向进行展望。

1　LpxH的功能与结构

1.1　LpxH的功能　LPS的组成成分脂质A通常不是单独存在的, 而是在多种酶的催化作用下与两个3-脱氧-*D*-甘露聚糖-八碳酸 (3-deoxy-*D*-manno-octulosonic acid, Kdo) 分子结合生成Kdo_2-脂质A复合物。Kdo_2-脂质A复合物的合成过程即Raetz途径 (Raetz pathway)[6,35], 如图1B所示, 起始物尿苷二磷酸-*N*-乙酰-*α*-*D*-葡糖胺 (UDP-*N*-acetyl-*α*-*D*-glucosamine, UDP-GlcNAc) 在上述一系列酶的催化下, 脂肪酸链和磷酸基团被逐步添加, 最终变成具有双糖骨架的Kdo_2-脂质A。核心多糖在相关酶的催化下与Kdo_2-脂质A结合, 转运到内膜外侧。在周质中, *O*-抗原与脂质A-核心多糖复合物结合形成LPS[7], 最终被细菌内LPS转运蛋白 (LptABCDEFG) 系统转运到细菌外膜, 发挥其生物学功能[36]。

在大肠杆菌的Raetz途径中, LpxH催化脂质A合成的第4步, 功能是裂解尿苷二磷酸-2,3-二酰基葡糖胺 (UDP-2,3-diacylglucosamine, UDP-DAGn) 的焦磷酸键, 生成UMP和脂质A的生物合成前体脂质X[4,7], 如图1C所示。LpxH的催化功能主要依赖蛋白质结构中的UDP-DAGn的结合位点中心存在的两个Mn^{2+}离子构成的金属螯合结构域[12,37]。

UDP-DAGn水解生成UMP和脂质A的过程在革兰阴性菌中由同工酶LpxH、LpxG或LpxI催化。其中LpxH存在于近70%的革兰阴性菌 (包括所有临床上的重要菌株) 中; LpxG或LpxI则存在于另外30%的革兰阴性菌如衣原体、立克次体中, 此类细菌通常被认为不具有高抗生素耐药性的风险[38,39]。值得注意的是, 在一种细菌中, 这3种同工酶不会同时存在。

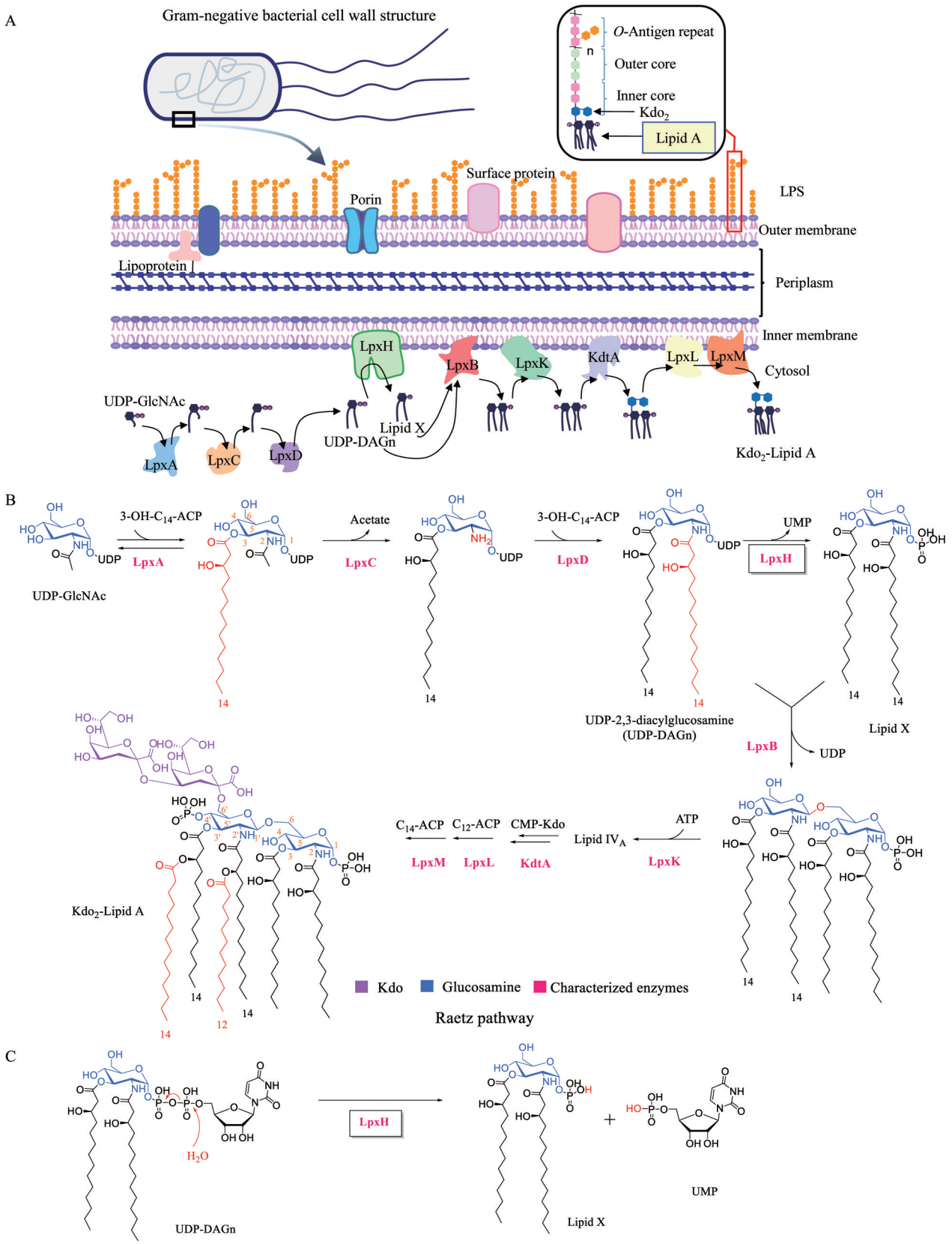


Figure 1 Biosynthesis of lipid A and the function of LpxH in *E. coli*. A: The schematic representation of Gram-negative bacterial cell wall (with *E. coli* as an example), including inner membrane, periplasm, and outer membrane (The Kdo_2-lipid A unit is essential for growth of *E. coli*), Ref. 5 licensed under CC-BY 4.0; B: Lipid A biosynthesis in *E. coli* (Raetz pathway); C: LpxH catalyzes the conversion of UDP-DAGn to lipid X, Ref. 5 licensed under CC-BY 4.0. Kdo: 3-Deoxy-*D*-manno-octulosonic acid; UDP-DAGn: UDP-2,3-diacylglucosamine

1.2　LpxH的结构　LpxH是二价金属锰离子(Mn^{2+})依赖的脂质焦磷酸水解酶, 属于钙调神经磷酸酶样磷酸酯酶(calcineurin-like phosphoesterases, CLP)家族[40,41]。LpxH的晶体结构解析结果显示(以肺炎克雷伯菌的LpxH为例, PDB ID: 6PH9, 如图2A所示[42]), 该蛋白的结构具有保守性, 主要由盖子区域(cap domain)、核心区域(core domain)和一个催化结构域(catalytic domain)构成。盖子区域包含3个α螺旋(图2A中的红色部分), 这些α螺旋覆盖在活性位点之上, 有助于与底物UDP-DAGn结合[40,41]。核心区域由多组紧密排列的β折叠和α螺旋构成(图2A中的绿色部分), 包括一组6股β折叠和一组5股β折叠, 它们以平行或反平行的方式排列, β折叠通过Loop区域连接到外围的α螺旋。催化结构域位于盖子区域和核心区域之间, 与底物结合发挥催化作用[43]。

在没有配体结合时, 盖子区域会变得更加延展, 且结构趋于不稳定。盖子区域的α螺旋是高度动态的, 而不是稳固地锚定在核心区域, 这种灵活性使LpxH能够采取多种构象, 包括开放型构象[43]。

LpxH的催化活性区域位于盖子区域和核心区域之间, 在此区域存在两个Mn^{2+}离子, 这两个Mn^{2+}离子由CLP酶的标志性金属螯合序列的氨基酸残基进行配位[40,41], 是发挥酶催化作用所必需的。这两个金属离子能够作为一个单元整体稳定与底物相互作用的过渡态, 从而促进带有负电荷的配体的加入和解离。Mn^{2+}离子作为LpxH的辅因子发挥着重要作用, 含Mn^{2+}的

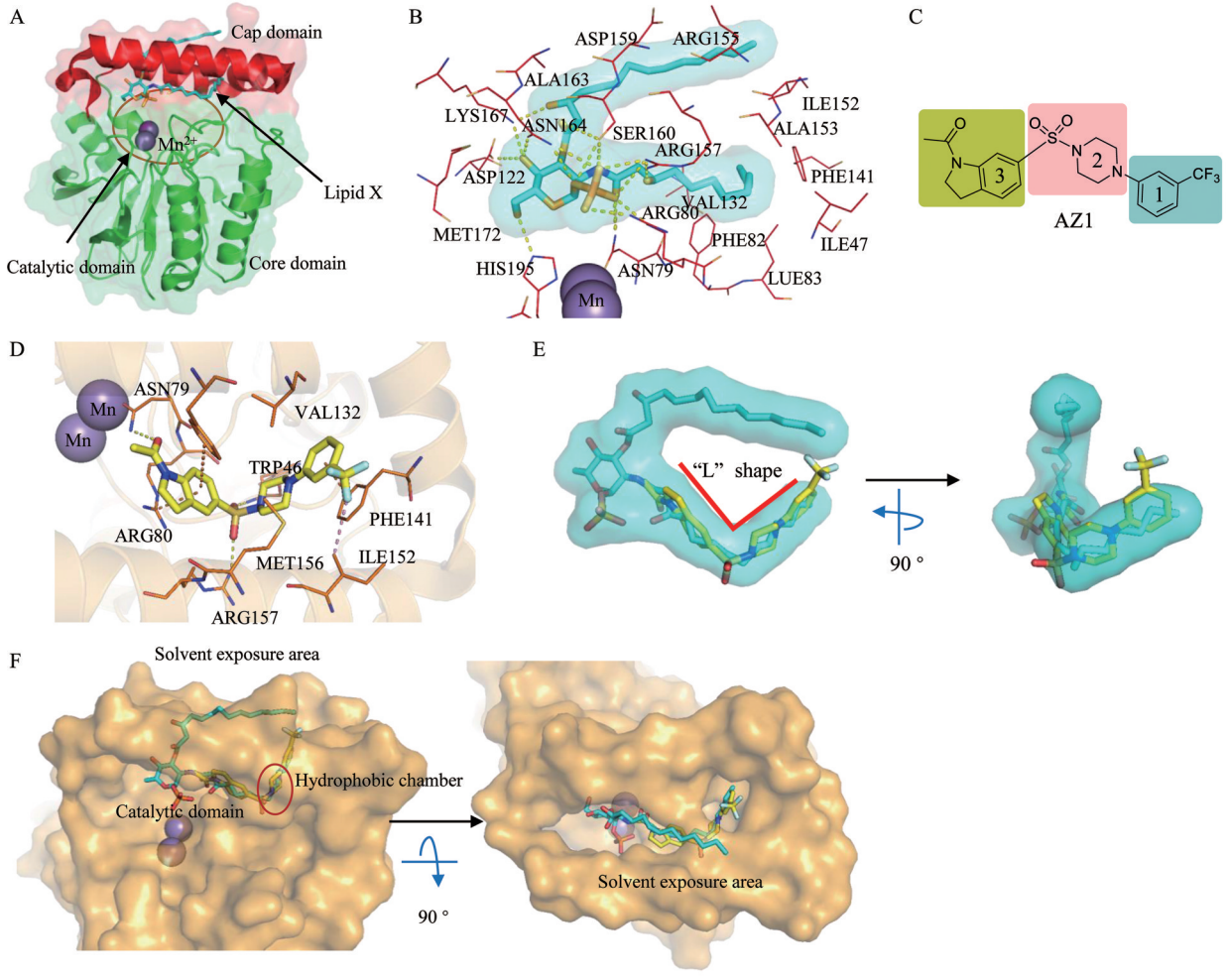


Figure 2　The crystal structures of LpxH in complex with ligands. A: The co-crystal structure of *Kp*LpxH complexed with lipid X (PDB ID: 6PH9, represented by cartoon and surface, cap domain: red, core domain: green; Lipid X is located at the catalytic domain between cap domain and core domain); B: The detailed binding mode of lipid X (PDB ID: 6PH9); C: The first LpxH inhibitor, AZ1; D: The binding mode of AZ1 to *Kp*LpxH (PDB ID: 6PIB); E: The superimposition of lipid X and AZ1. The sulfonylpiperazine moiety adopts an "L" shape in AZ1, similar to lipid X; F: The binding cavity of AZ1 and lipid X. The *N*-acetyl dihydroindole of AZ1 points to the catalytic site, and the trifluoromethyl group points to the solvent exposure area (the same as the 3-*O*-acyl chain of lipid X). All the binding modes were depicted by PyMol (Open-Source PyMol™, version 2.6). *Kp*: *Klebsiella pneumonia*

流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenza*, *Hi*) LpxH 酶水解活性是不含 Mn^{2+} 的 *Hi*LpxH 的 670 倍; 如果将 Mn^{2+} 替换为 Co^{2+}、Fe^{3+} 和 Ni^{2+} 等金属离子, *Hi*LpxH 的水解活性仅提高 10~50 倍[37]。

2 LpxH 小分子抑制剂

2.1 LpxH 抑制剂的结合模式 大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌和鲍曼不动杆菌等 WHO 列出的高优先级病原菌的生存都依赖 LpxH, 这使得 LpxH 成为研发抗革兰阴性菌感染的有潜力的靶标。

LpxH 催化 UDP-DAGn 水解生成脂质 X 和 UMP, 研究 LpxH 与脂质 X 晶体复合物的结合特征对于小分子抑制剂的设计具有一定的指导意义。目前已经报道了多种常见的革兰阴性菌 LpxH 与脂质 X 结合的复合物晶体结构[44], 如: 肺炎克雷伯菌 (*Kp*LpxH 与脂质 X 的复合物, PDB ID: 6PH9)[42,45,46]; 大肠杆菌 (*Ec*LpxH 与脂质 X 的复合物, PDB ID: 8QJZ)[5]; 铜绿假单胞菌 (*Pa*LpxH 与脂质 X 的复合物, PDB ID: 5B49、5B4A、5B4B 和 5B4C)[41]; 流感嗜血杆菌 (*Hi*LpxH 与脂质 X 的复合物, PDB ID: 5K8K)[40]等。LpxH 与催化产物脂质 X 的晶体复合物的结构特征如图 2A、F 所示 (PDB ID: 6PH9): LpxH 的催化产物脂质 X 的葡萄糖胺-1-磷酸基位于催化活性位点, 其磷酸基团位于两个 Mn^{2+} 离子上方, 而 2-*N*-酰基链埋藏在核心区域与盖子区域之间的疏水室内部, 3-*O*-酰基链位于活性位点上方的开放性区域[34]。LpxH 与脂质 X 的结合模式主要包括三种类型的相互作用 (如图 2B 所示, 此处仍以 *Kp*LpxH 与脂质 X 的晶体复合物 PDB ID: 6PH9 为例[42]): ① 盐桥作用: 磷酸基团与 ARG80、ARG157 形成盐桥相互作用; ② 氢键相互作用: 磷酸基团与 ASN79、SER160 和 ASN164 形成了氢键网络; 葡萄糖胺母核 2 位的脂肪酰胺基侧链与 ASN79、ARG157、SER160 等氨基酸残基形成氢键; 3 位脂肪酰基侧链与 LYS167 形成氢键作用; 4 位羟基与 ASP122、ASN164 和 LYS167 形成氢键网络; 5 位羟甲基与 HIS195 形成氢键; ③ 烷基相互作用: 2 位脂肪酰胺基侧链位于由 VAL132、PHE141、ILE152、ALA153 等疏水性氨基酸残基构成的疏水性空腔内部, 形成 π-烷基、烷基−烷基等相互作用; 3 位脂肪酰基侧链与 ILE152 形成烷基−烷基相互作用。不同细菌的 LpxH 与脂质 X 之间的相互作用特征见表 1。

截至目前, 仅有磺酰哌嗪类 LpxH 小分子抑制剂的报道。根据目前已有的小分子抑制剂, 可以将其构效关系总结为图 3: ① 芳环 1 与 PHE141 形成了重要的 π-π 堆积作用, 此区域在蛋白口袋表面存在一个较小的疏水口袋, 这一侧可以容纳体积较小的取代基如氯原子、甲基等, 另一侧 R_2 基团朝向溶剂暴露区; ② 中间的哌嗪环 (环 2) 与 LpxH 的疏水空腔之间存在疏水相互作用, 磺酰基的一个氧原子与 TRP46 主链上的-N-H-形成关键的氢键相互作用, 另外一个关键特征为磺酰哌嗪基具有明显的结构扭转, 这与 LpxH 的催化产物脂质 X 的 2-*N*-酰基链的“L”型扭转一致, 如图 2E 所示; ③ 芳环 3 可以与 ARG80 的胍基侧链形成阳离子-π 相互作用, 酰胺上的羰基氧原子与 ASN79 的侧链形成关键的氢键作用; ④ 芳环 4 与 TYR125、PHE128 形成 T 型芳环堆积相互作用; 环 4 上酰胺羰基邻位取代基 R_3 若为 *N*-甲基-甲磺酰胺基, 则可以与 ASN79 的侧链、ARG80 的胍基侧链形成氢键作用, 能够明显增强结合作用; 另外, 甲磺酰胺取代基的对位一侧 R_4 位置是溶剂暴露区, 在此位置可以通过添加极性基团或带电基团, 如氨基、羧基等改善化合物的理化性质。

2.2 LpxH 小分子抑制剂研究进展 AZ1 是首个报道的 LpxH 抑制剂。2015 年, 阿斯利康 (AstraZeneca) 公司通过高通量筛选技术发现了对外排缺陷型大肠杆菌 (ATCC 25922 ΔtolC, TolC 蛋白是一种外膜通道蛋白, 是大肠杆菌中外排泵发挥作用所必需的, TolC 失

Table 1 The interactions between lipid X and key amino acid residues of LpxH in different Gram-negative bacteria, i. e. *Kp*LpxH, *Pa*LpxH, *Hi*LpxH and *Ec*LpxH. *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Hi*: *Haemophilus influenza*; *Ec*: *Escherichia coli*

Interaction	Chemical group of lipid X	*Kp*LpxH (6PH9)	*Pa*LpxH (5B4B)	*Hi*LpxH (5K8K)	*Ec*LpxH (8QJZ)
Salt bridge	Phosphate	ARG80, ARG157	ARG80	ARG81, ARG158, LYS165	ARG80, ARG157
Hydrogen bond	Phosphate	ASN79, SER160, ASN164	−	ASN80, ARG81	ASN79, ARG80, SER160, ASN164
	2-*N*-Acyl	ASN79, ARG157, SER160	ASN79, SER160	SER161	ASN79, ARG157, SER160
	3-*O*-Acyl	LYS167	SER160, GLN163, LYS167	SER161, LYS168	LYS167
	4-Hydroxyl	ASP122, ASN164, LYS167	ASP122, LYS167	ASP123, LYS168	ASP122, LYS167, ASN164
	5-Hydroxy-methyl	HIS195	HIS195	HIS196	HIS195
Alkyl interaction	2-*N*-Acyl	VAL132 (σ-σ); PHE141 (π-σ)	LEU83, LEU141, ARG149, LEU152 (σ-σ)	VAL133, LEU138 (σ-σ); PHE142 (π-σ)	VAL132, LEU137 (σ-σ); PHE141 (π-σ)
	3-*O*-Acyl	ILE152 (σ-σ)	TRP131 (π-σ); LEU152, LEU156 (σ-σ)	LEU138 (σ-σ)	ILE152 (σ-σ)

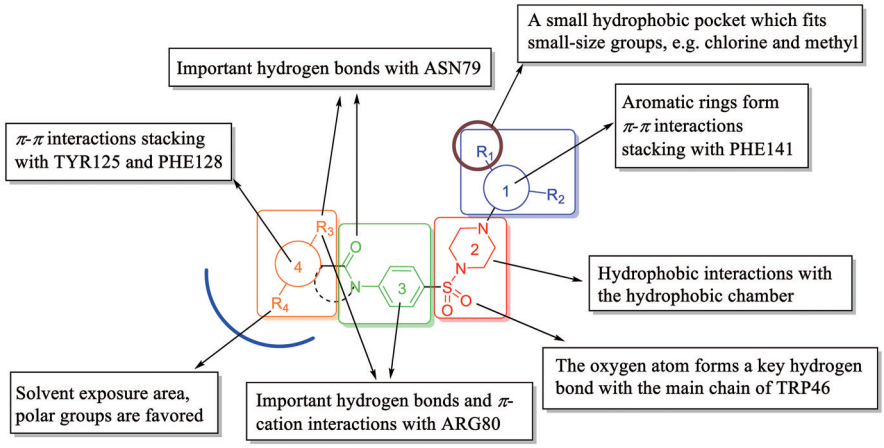


Figure 3　The structure-activity relationship of sulfonylpiperazine inhibitors

活会使外排泵活性丧失[47]) 表现出抗菌活性的化合物AZ1 (其对外排缺陷型的MIC为0.25 μg·mL^{-1}), 接着通过全基因组测序分析, 发现该化合物作用于大肠杆菌的LpxH, 由此鉴定出首个LpxH抑制剂, 但对于具体的酶抑制活性则没有报道, 其结构如图2C所示[13]。AZ1的结构可以分为三部分: 右侧苯基部分 (环1)、中间磺酰哌嗪部分 (环2) 和左侧的*N*-乙酰基二氢吲哚部分 (环3)。

2019年, 杜克大学Hong和Zhou研究团队在其发表的一篇研究论文[48]及其在2021年披露的一项专利 (WO 2021072369 A1)[49]中展示了其在AZ1的基础上进行的初步构效关系研究。该团队通过其自主建立的酶抑制活性测试体系 (LpxE-偶联孔雀石绿检测法) 测定出了AZ1在1 μmol·L^{-1}浓度下对于大肠杆菌*Ec*LpxH的酶抑制率为83%, IC_{50}值为0.15 μmol·L^{-1} (后续又测出了对*Kp*LpxH的IC_{50}值为0.36 μmol·L^{-1}[42])。如图4C上部分所示, 在AZ1的基础上, 合成了一系列衍生物, 并测试了化合物对大肠杆菌*Ec*LpxH酶的抑制活性 (10 μmol·L^{-1}/1 μmol·L^{-1}浓度下的抑制率)。初步总结构效关系为: ① 当右侧环1上C3-位取代基为三氟甲基 (AZ1)、溴原子时 (**3**), 酶抑制活性较好; 替换为其他取代基, 如烷基 (**2**)、羧基 (**4**)、羟基等基团或者没有取代基时酶抑制活性降低或丧失; 这说明C3-位取代基的亲脂性以及取代基体积大小会显著影响酶抑制活性; ② 中间哌嗪环的开环 (**6**)、扩环 (**7**) 或在苯环1和哌嗪环2之间插入碳原子都会使酶抑制活性降低或丧失; 将磺酰哌嗪的磺酰胺替换为酰胺, 活性丧失; 这说明哌嗪环的构象对活性是必要的; ③ 左侧*N*-乙酰基吲哚对活性较为关键 (缺失则活性丧失), 可以在*N*-乙酰基的基础上进一步延伸[48]。由于当时并未有复合物晶体结构的报道, 因此该团队通过Schrödinger软件构建了药效团模型, 为后续研究提供了一定的参考价值。

2020年2月, Hong和Zhou团队首次解析出了AZ1与肺炎克雷伯菌的*Kp*LpxH结合的复合物晶体结构 (PDB ID: 6PIB)[42], 结合模式如图2D、F所示。AZ1的*N*-乙酰基二氢吲哚环指向催化活性中心, 哌嗪基团位于疏水空腔内部, 环1延伸至疏水空腔的远端, 三氟甲基指向蛋白外侧溶剂暴露区。除此之外, 该研究团队利用溶液蛋白质–配体动态核磁共振技术发现在^{19}F NMR谱图中, 配体AZ1在结合状态下三氟甲基存在两个不同的化学位移值, 这是由于AZ1在3-三氟甲基苯基和哌嗪环之间含有一个可旋转单键, 其中以占比84.5%的信号峰为主, 这一现象是在复合物晶体结构中无法观察到的 (图4A)。其中在晶体结构中观察到的构象是三氟甲基指向蛋白表面, 无法观察到的次要构象则是三氟甲基占据脂质X的*N*-酰基链末端所在较小的疏水口袋。因此, 如果在环1的C5-位加入一个疏水基团占据该位置, 促使三氟甲基朝向上方的溶剂暴露区, 有可能增强结合作用。为了验证这一假设, 该团队合成了两种AZ1衍生物 (图4C中间部分所示), **8**和**9**, 分别在三氟甲基的间位 (即C5-位) 引入了氟原子和氯原子取代基。引入氯原子的**9**具有更强的结合作用 (IC_{50} = 0.026 μmol·L^{-1} *vs* AZ1: IC_{50} = 0.36 μmol·L^{-1}), 该团队解析了**9**与*Kp*LpxH的复合物晶体结构 (PDB ID: 6PJ3), 结果验证了其预测的结合方式, 氯原子填补了蛋白一侧较小的疏水口袋, 此时三氟甲基则指向3-*O*-酰基链方向的溶剂暴露区 (图4B)。该团队通过溶液蛋白质–配体动态核磁共振技术深入研究了AZ1与LpxH结合的细节, 指出了AZ1在结合时三氟甲基存在的构象偏好, 揭示了结合口袋的具体细节, 为后续的结构优化指明了方向。

该团队在2020年9月以及2023年陆续报道了一系列针对肺炎克雷伯菌*Kp*LpxH设计的磺酰哌嗪类衍生物[45,46], 如图4C下部分所示。在**9**的基础上继续进

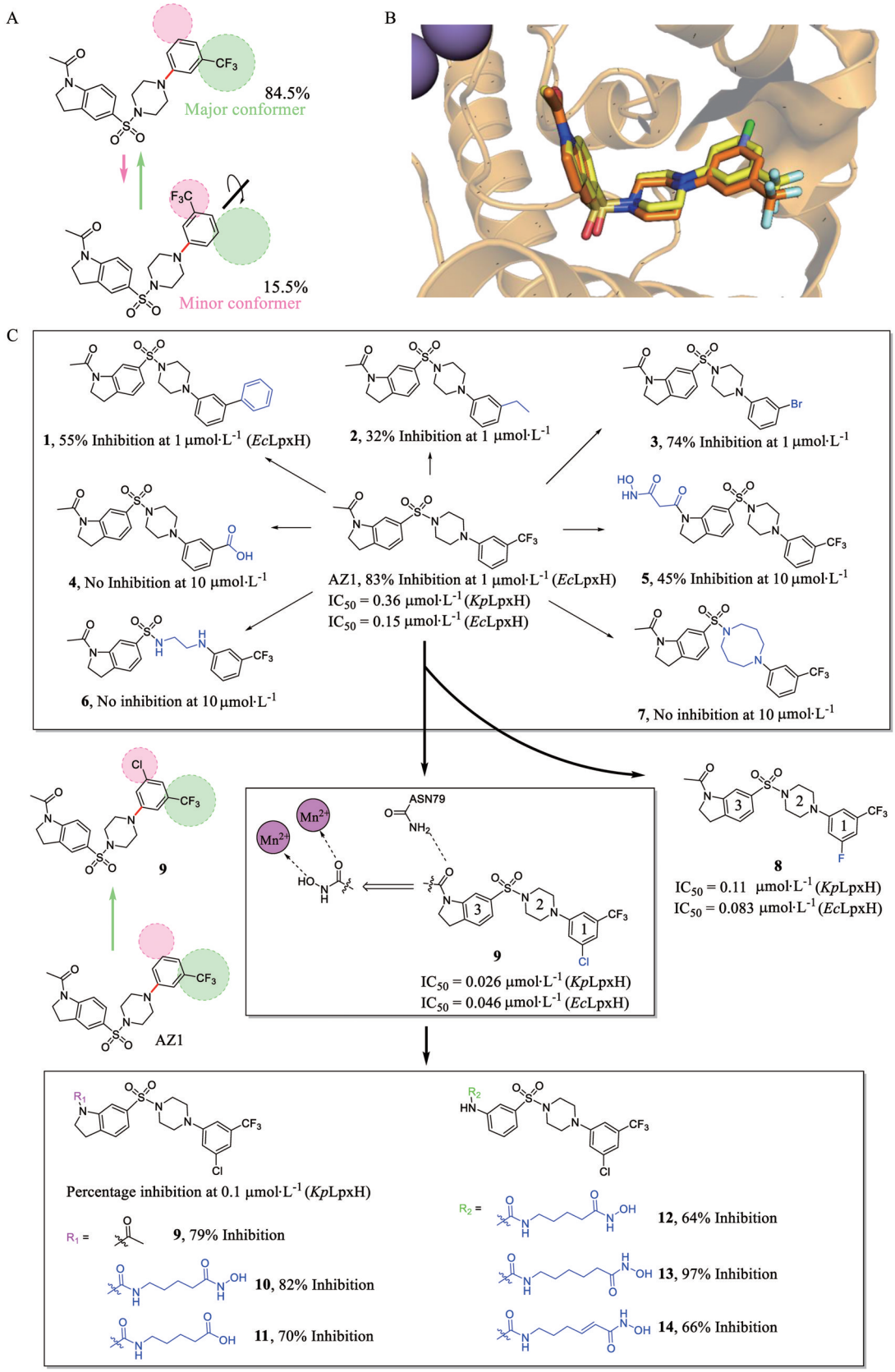


Figure 4 Representative modifications to AZ1. A: Two poses of AZ1 bound to *Kp*LpxH. The trifluoromethyl group pointing to the protein surface is disfavored (15.5%, minor), while that group pointing out is favored (84.5%, major); B: The superimposition of AZ1 and **9**. The chlorine atom fills the minor hydrophobic pocket at the protein surface, while the trifluoromethyl group points to the solvent exposure area; C: Representative structural modifications to AZ1 and the resulting derivatives

行研究, 在环3位置将*N*-乙酰基继续延伸, 希望延伸后的基团形成与Mn^{2+}的络合作用, 从而增强对*Kp*LpxH酶的抑制活性。该团队将*N*-乙酰基替换为脲片段, 并继续延长碳链, 碳链末端是金属离子螯合基团, 如羧基、羰基羟胺等结构片段, 发现当脲片段和羰基羟胺中间间隔为4个碳原子长度时 (**12**), 末端羟胺结构并没有与Mn^{2+}离子配位 (**12**与*Kp*LpxH的晶体复合物结构, PDB ID: 6WII, 图5A), 但晶体结构显示羟胺的羟基与MET172的主链羰基形成了额外的氢键相互作用。当脲片段和羰基羟胺中间为5个碳原子长度的碳链时 (**13**), 酶抑制活性得到提高, 在0.1 μmol·L^{-1}浓度下达到了97%的抑制率, 超过AZ1 (22%)、**12** (64%)以及**9** (79%)的抑制活性。化合物**13**与*Kp*LpxH结合的复合物晶体结构显示 (PDB ID: 7SS7, 图5B), **13**的羰基羟胺部分此时与催化域的两个Mn^{2+}离子发生了配合作用, 并且化合物的IC_{50}值达到了7.7 nmol·L^{-1}, 但可能由于理化性质不佳等问题, 体外抗菌MIC值并没有显著的改善 (对肺炎克雷伯菌ATCC 10031的MIC值为**9**: 0.83 μg·mL^{-1}; **10**: 18.7 μg·mL^{-1}; **13**: 3.3 μg·mL^{-1})。该团队通过一系列结构优化, 获得了酶抑制活性良好的化合物, 但化合物存在理化性质不佳、体外抗菌活性表现一般的问题, 存在进一步优化的空间。

2023年4～9月, 罗氏 (ROCHE) 公司披露了3项专利 (WO 2023061617 A1、WO 2023072794 A1、WO 2023166103 A1)[50-52], 报道了其团队在磺酰哌嗪类LpxH抑制剂上进行的结构改造: 由于三氟甲基一侧在与LpxH结合时可以延伸到溶剂暴露区, 有进一步延伸的空间, 因此该团队在该位置将三氟甲基的其中一个氟原子替换, 并进一步延长, 在此位置通过增加极性基团改善化合物的理化性质 (**15**, MIC = 0.26～0.52 μg·mL^{-1}); 在另一侧环3部分, 该团队采用噁唑烷酮 (**16**, MIC = 0.26～0.53 μg·mL^{-1})、吡咯烷酮 (**17**, MIC = 0.30～0.45 μg·mL^{-1}) 等五元环结构, 在保留关键的酰胺结构片段的同时, 突破了二氢吲哚结构类型的专利保护 (图5C)。2024年4月, 罗氏公司披露另一项专利 (WO 2024213610 A1)[53], 在2023年专利的基础上该团队采

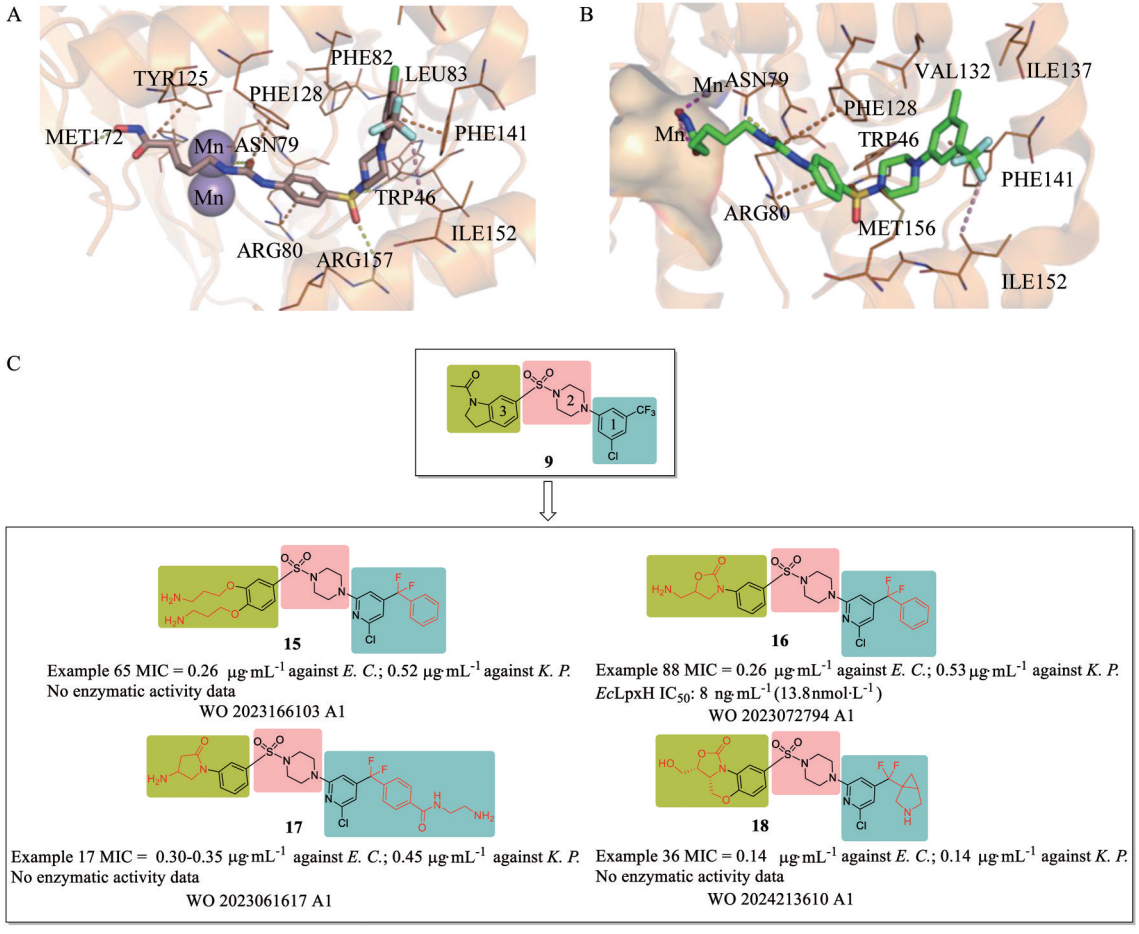


Figure 5　The Mn^{2+} chelation strategy and structural modifications to compound **9**. A: The co-crystal structure of *Kp*LpxH in complex with compound **12** (PDB ID: 6WII); B: The co-crystal structure of *Kp*LpxH in complex with compound **13** (PDB ID: 7SS7); C: Representative patented compounds disclosed by ROCHE

用并环策略, 将噁唑烷酮与环3进行并环, 形成了三元稠环结构 (**18**, 图5C), 并环结构对酰胺键的构象进行了限制, 进一步提高了活性 (对大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的MIC均达到0.14 μg·mL^{-1})。罗氏公司的代表性的化合物如图5C所示, 报道的化合物具有不错的体外抗菌活性, 对大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的MIC值可达到0.2 μg·mL^{-1}左右, 其中仅有少数化合物有酶抑制活性数据, 如化合物**16**对大肠杆菌LpxH的IC_{50}值达到13.8 nmol·L^{-1}, 可以推测其余具有类似结构特征的化合物也会具有优秀的酶抑制活性。

2024年4月, Uppsala大学Karlén和Hughes研究团队报道了对新结构特征磺酰哌嗪类抑制剂的优化过程[5]。其早在2022年披露过一项专利 (WO 2022220725 A1)[54], 对其发现的化合物进行了专利保护。该研究团队首先针对TolC失活的突变体大肠杆菌 (*ΔtolC*) 进行抗菌活性的表型筛选。在筛选中, 该研究团队首先通过在PubChem数据库 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/573) 中进行筛选发现了化合物**19** (图6A)[55]。其对外排缺陷型大肠杆菌 (*ΔtolC*) 的MIC为4～8 μg·mL^{-1}, 并具有低细胞毒性 (HepG2: CC_{50} > 32 μmol·L^{-1})。接着研究团队对该化合物诱导的耐药菌株进行了全基因组序列分析, 和AZ1耐药菌株的基因序列对比发现, 该化合物的靶点可能是LpxH。虽然**19**针对外排泵缺陷型菌株是有活性的, 但是对于革兰阴性菌而言, 化合物的外膜穿透性和外排特性对于抗革兰阴性菌药物的开发往往是巨大的障碍。该研究团队发现通过表型筛选得到的化合物**19**和最早发现的化合物AZ1具有相同的母核结构片段 (苯基磺酰哌嗪 *vs* 苯基磺酰哌啶), 这预示着这两个化合物的结合模式可能存在互补性, 因此研究团队尝试将AZ1和化合物**19**的优势片段进行了结构融合得到了新化合物**20**。如图6A所示, **20**对野生型 (wild type, WT) 大肠杆菌具有较好的活性 (*E. coli* MIC_{WT}: 2 μg·mL^{-1}; $MIC_{\Delta tolC}$: < 0.125 μg·mL^{-1})。为了进一步优化结构, 研究团队解析了**20**与*Ec*LpxH结合的复合物晶体结构, 如图6B所示 (PDB ID: 8QK9)。尽管**20**具有良好的体外抗菌活性, 但其依然存在一些局限性, 如溶解度低、代谢稳定性差以及体外加入血清时抗菌活性明显减弱等问题。研究团队在**20**的基础上尝试进一步优化, 由于在核心环2和3上进行修饰会导致活性降低, 因此, 研究团队尝试对环1和4进行修饰改造。环1亲脂性很高, 如果在环1上引入极性基团则有可能改善化合物的理化性质。化合物**21**是将环1替换为了嘧啶环, 其在加入血清时MIC值仅略微降低 (MIC_{WT}: 1 μg·mL^{-1}, $MIC_{\Delta tolC}$: < 0.125 μg·mL^{-1}), 同时保留了良好的靶标亲和力。在环4的C5-位置进行修饰, 添加不同的极性取代基 (**22**), 可以降低血清对化合物MIC值的影响, 使溶解度略有增加, 如图6A所示。由于这类化合物在体内的主要代谢途径是环4上*N*-甲基-甲磺酰胺取代基上的氧化*N*-去甲基化, 而在C5-位进行极性基团修饰, 可以增加环4的极性, 从而提高化合物的代谢稳定性。研究团队将环1和环4上的修饰进行组合, 得到化合物**23**和**24**。两个化合物具有良好的体外抗菌活性 (MIC_{WT}: 2 μg·mL^{-1}, $MIC_{\Delta tolC}$: < 0.125 μg·mL^{-1}) 和优秀的理化性质。化合物**23**是在**21**的基础上在C5-位置增加了极性氨基侧链, 将**23**的晶体复合物 (PDB ID: 8QK5) 与**20**的晶体复合物进行叠合可以发现 (**20**为黄色棍棒表示, **23**为蓝紫色棍棒表示) 两个化合物的结合构象重叠得很好 (图6C)。化合物**23**和**24**具有较好的小鼠体内安全性, 在小鼠腹膜炎感染模型中, 对大肠杆菌和肺炎克雷伯菌的感染具有保护作用, 剂量 ⩾ 50 mg·kg^{-1}时产生的抗肺炎克雷伯菌效果与环丙沙星 (13 mg·kg^{-1}) 相当。化合物的单剂量的ED_{50}分别为: **23**, 12.3 mg·kg^{-1} (大肠杆菌) 和21.0 mg·kg^{-1} (肺炎克雷伯菌); **24**, 20.0 mg·kg^{-1} (大肠杆菌) 和20.2 mg·kg^{-1} (肺炎克雷伯菌)。该团队详细报道了其对新结构特征LpxH抑制剂的发现和结构优化过程, 并报道了小鼠体内抗菌活性研究结果, 为后续对该靶点抑制剂的研究提供了重要的参考。

2024年8月, Karlén团队[56]继续报道了*N*-甲基-甲磺酰胺取代位置重要性的研究, 并解析了晶体结构。先前的研究揭示了在环4的邻位引入*N*-甲基-甲磺酰胺取代基可以显著提高酶抑制活性。而在这一篇研究中, 该团队报道了在环4的间位, 即C3-位置进行取代基修饰也可以保持一定的抗菌活性。如图7A所示, *N*-甲基-甲磺酰胺在邻位时, 氮原子的甲基取代是必要的 (化合物**25**); 在间位时, *N*-甲磺酰胺的氮原子上缺少甲基取代时活性更高 (化合物**28**)。与*Kp*LpxH的晶体复合物结构显示 (PDB ID: 9ENG, 图7B), 在间位进行取代后, 甲磺酰胺的两个氧原子缺少了和ARG80的氢键相互作用, 取而代之的是甲基和TYR125的范德华相互作用。接着他们尝试将环1的苯环替换为嘧啶环并在环4的C5-位进行极性基团修饰 (化合物**29**～**32**), 以增加对革兰阴性菌的外膜穿透性[57]。虽然上述化合物的安全性得到进一步提高, 但此类修饰没有明显提高化合物的体外抗菌活性 (对大肠杆菌的MIC: 8～64 μg·mL^{-1}), 推测可能是由于化合物的刚性所致, 特别是在环4的C5-位上继续进行刚性环取代基的修饰会增加化合物被革兰阴性菌外排泵泵出的可能性。该研究表明, 在环4不同位置进行*N*-甲磺酰胺取代基修饰, 作用模式存在差别, 但仍能保留一定活性。

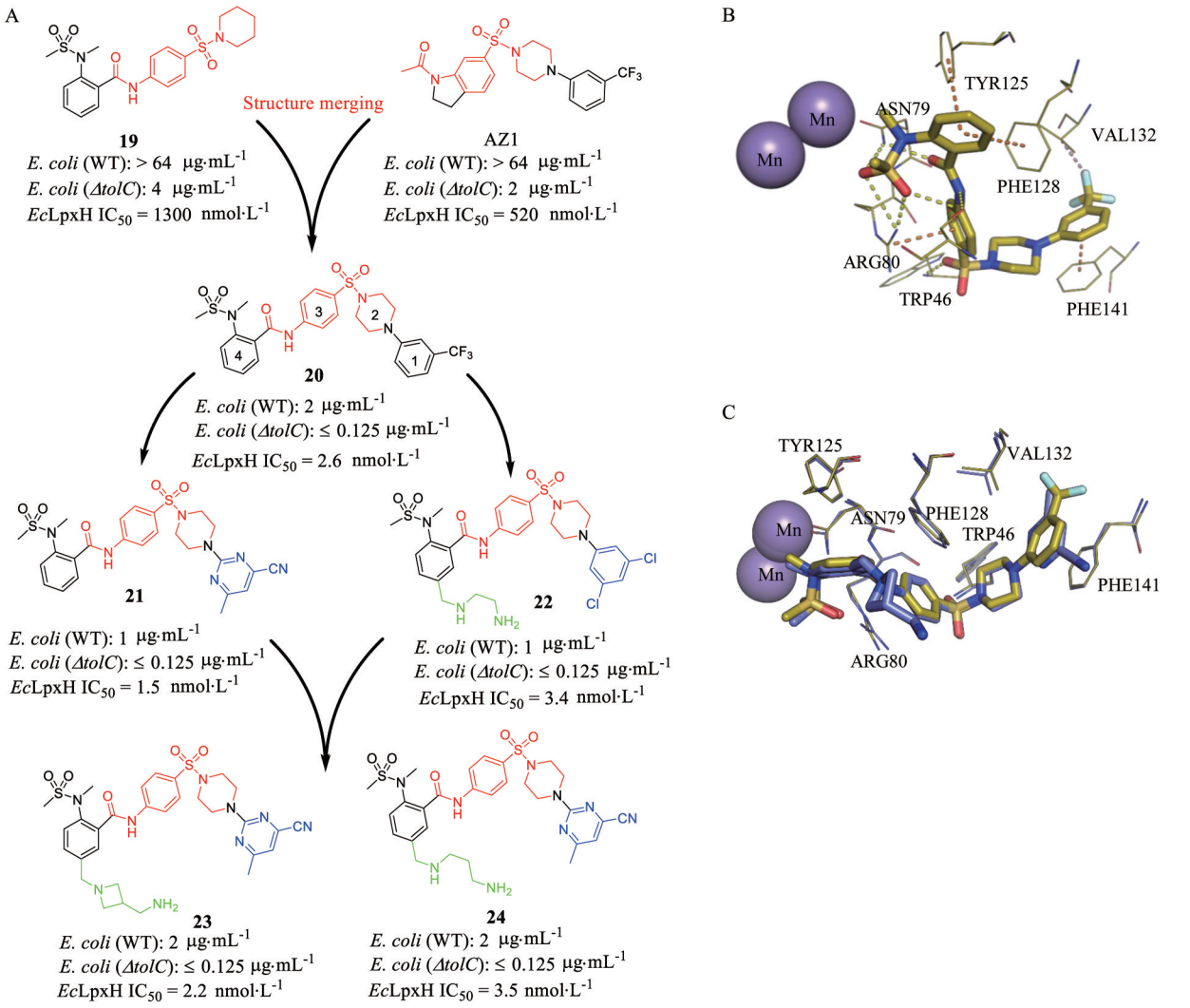


Figure 6　Compound **19** discovered from PubChem, and its derivatives from structure merging with AZ1 and its structural modifications. A: Structure merging and modifications, Ref. 5 licensed under CC-BY 4.0; B: The co-crystal structure of *Ec*LpxH in complex with **20** (PDB ID: 8QK9); C: The superimposition of **20** (PDB ID: 8QK9) and **23** (PDB ID: 8QK5)

2024年, Hong和Zhou研究团队发表研究论文[58], 并且披露了相关化合物的专利 (WO 2024211444 A2)[59], 报道了其团队的结构修饰结果。该团队在乙酰吲哚类结构片段研究 (AZ1) 的基础上, 尝试在环1、4上进一步改造。如图8所示, 将环1替换为芳杂环, 如噻唑 (**33**)、噻二唑 (**34**)、3/4-吡啶环 (**35**, **36**) 等 (对 *Kp*LpxH 的 IC_{50} > 913 nmol·L^{-1}, 对肺炎克雷伯菌的 MIC 10.1～> 64 μg·mL^{-1}), 酶抑制活性下降; 替换为2-吡啶 (**37**, **38**) 或嘧啶环 (**39**), 相比 AZ1 (IC_{50} 360 nmol·L^{-1}, MIC > 64 μg·mL^{-1}) 活性有所提高 (IC_{50} 85～112 nmol·L^{-1}, MIC 0.25～2.0 μg·mL^{-1}); 继续在5-三氟甲基-2-吡啶环的C3-位增加氯原子取代 (**40**, **41**), 活性进一步提高 (IC_{50} 4.6～7.6 nmol·L^{-1}, MIC 0.08～0.10 μg·mL^{-1})。该团队将Karlén团队报道的化合物 **19** 的 *N*-甲基-甲磺酰胺片段与他们的化合物骨架进行融合, 获得了化合物 **42** 和 **43**, 活性显著增强: **42** 对 *Kp*LpxH 的 IC_{50} 值为 0.044 nmol·L^{-1}, 对 *Ec*LpxH 的 IC_{50} 值为 0.058 nmol·L^{-1}, 而 **43** 对 *Kp*LpxH 和 *Ec*LpxH 的 IC_{50} 值均为 0.13 nmol·L^{-1}。*N*-甲基-甲磺酰胺取代基的加入使酶活提高了约100倍 (**41** 对 *Kp*LpxH 的 IC_{50} 为 7.6 nmol·L^{-1})。从复合物晶体结构可以看出 (见原文附录, 尚未在PDB数据库发布), 环4部分与TYR125和PHE128的侧链形成了T型 π-π 堆积作用, 邻位的 *N*-甲基-甲磺酰胺与ARG80形成了氢键, 这两类作用显著增强了结合亲和力。化合物 **42** 和 **43** 比Karlén团队报道的先导化合物 **23** 和 **24** 的酶抑制活性更强 (IC_{50}: 0.044～0.13 *vs* 2.2～3.5 nmol·L^{-1}), 体外活性也显著提高 (MIC: 0.04～0.63 *vs* 0.5～2 μg·mL^{-1})。进一步研究发现, 化合物 **43** 具有较低的自发耐药突变频率 (4×MIC药物浓度时为 2.0×10^{-9}), 耐药突变仅发现于LpxH基因中, 最常见的氨基酸突变位点在PHE141、

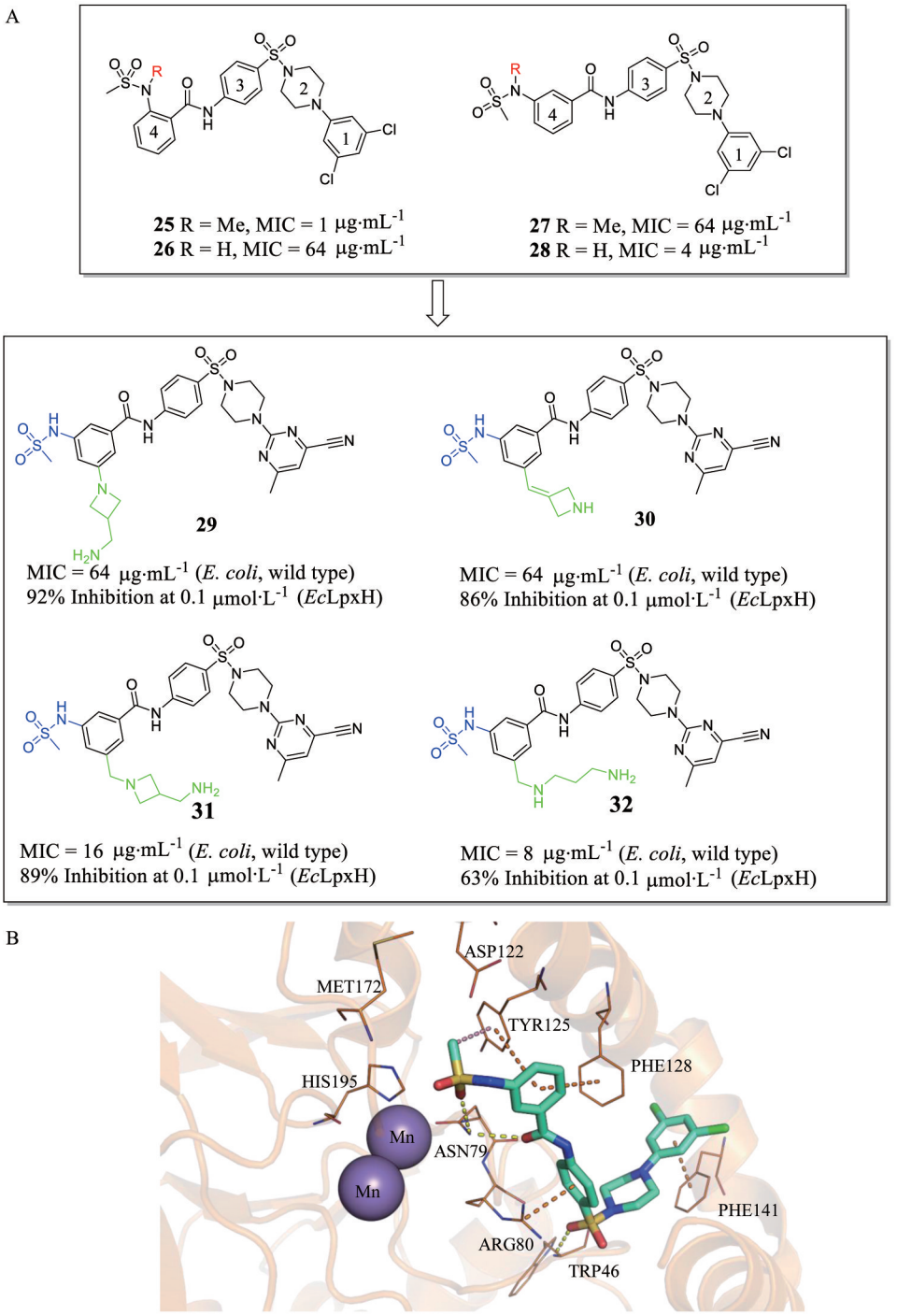


Figure 7 Discovery of *meta*-sulfonamidobenzamide analogs. A: Further modification at ring-4 and their activity; B: The co-crystal structure of *Kp*LpxH in complex with **28** (PDB ID: 9ENG)

PHE128 和 ARG80, 这些位点都是靶点和小分子抑制剂发生关键结合相互作用的氨基酸残基。该团队在先前研究的基础上, 结合了 Karlén 团队的研究, 获得了活性优异的化合物 **42** 和 **43**。化合物 **42** 和 **43** 具有极强的酶抑制活性 (亚纳摩尔级别的 IC_{50} 值), 以及优秀的体外抗菌活性, 尤其是对于肺炎克雷伯菌的 MIC 值达到 0.04 μg·mL^{-1}, 而对于大肠杆菌 (MIC 值分别为 0.63 和 0.31 μg·mL^{-1}) 则还有进一步提高的空间。另外, 目前还没有这类化合物动物体内数据的披露, 其成药性有待进一步评价。

3 总结与展望

LpxH 作为脂质 A 生物合成途径中的关键酶, 是抗革兰阴性菌药物研发的全新靶点。通过深入研究 LpxH 的结构和功能, 开发新型高效低毒的 LpxH 抑制

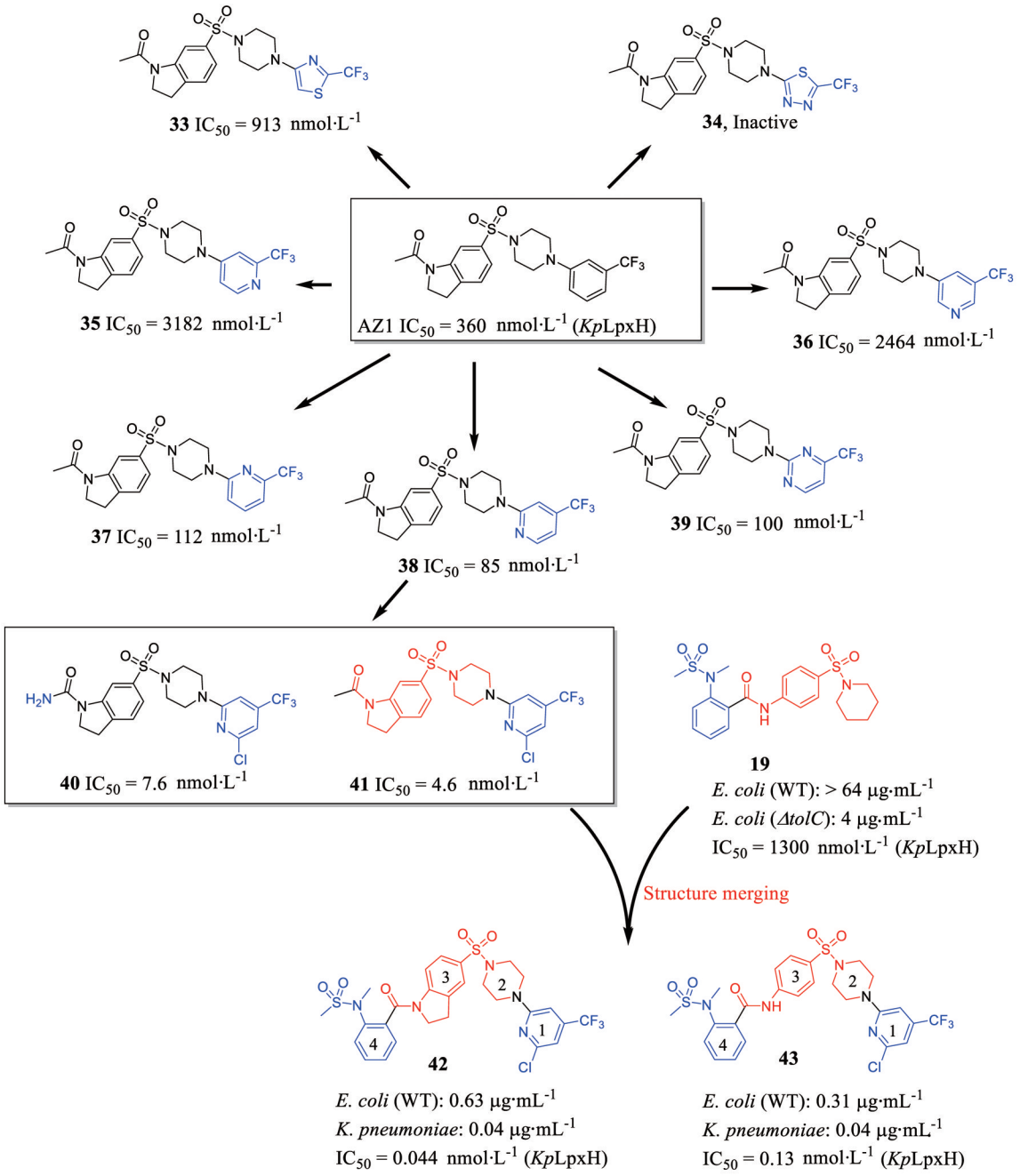


Figure 8　Structural modifications to the *N*-acetyl-dihydroindole analogs, Ref. 58 licensed under CC-BY-NC-ND 4.0

剂, 有望发现具有抗革兰阴性菌活性的新型抗生素。

AZ1是第一个LpxH抑制剂, 其具有磺酰哌嗪的结构母核。到目前为止, LpxH抑制剂的研究均集中于磺酰哌嗪母核上的结构修饰。原因可能在于磺酰哌嗪具有的特殊构象, 只有保持其“L”型的结构扭转才能适配LpxH的结合口袋, 将磺酰哌嗪替换为普通的酰胺则活性消失。目前报道的LpxH小分子抑制剂已经具有较好的抗菌活性, 许多化合物对大肠杆菌的MIC值在0.06～0.25 μg·mL^{-1}, 对肺炎克雷伯菌的MIC值在0.1 μg·mL^{-1}左右, 对*Ec*LpxH和*Kp*LpxH的酶抑制活性可以达到亚纳摩尔级别。目前报道的部分化合物在动物水平也产生了一定的抗菌药效: 在小鼠腹膜炎感染模型中, 化合物**23**和**24**在剂量 ≥ 50 mg·kg^{-1}时产生的抗肺炎克雷伯菌的药效与环丙沙星 (13 mg·kg^{-1}) 相当。

现有的抑制剂设计主要基于传统药物化学策略: ① 高通量筛选技术, AZ1和**19**均是通过高通量筛选技术对实体化合物库进行筛选而发现的先导化合物; ② 通过合成化合物, 根据化合物3D结构的特征构建药效团模型[48], 关键的药效团特征包括, 芳环1和芳环3、磺酰哌嗪的“L”型扭转、磺酰基氧原子以及环3上酰

胺取代基作为氢键受体等特征; ③ 随着小分子−蛋白晶体复合物的解析, 设计策略转向基于结构的设计, 例如利用动态NMR技术、晶体结构数据等进行结构修饰与改造, 同时通过片段融合将优势片段进行连接, 或通过增加金属离子螯合作用增强作用力; ④ 通过添加极性基团对理化性质进行优化。

随着人工智能 (artificial intelligence, AI) 技术的发展, 越来越多的领域融入了深度学习 (deep learning) 模型。药物设计领域也有望应用该技术, 突破传统计算机辅助药物设计的技术瓶颈。① 分子生成技术有望突破现有化合物库的限制从而扩展化学空间。比如, AutoMolDesigner是一款可视化的开源AI药物设计软件, 可利用该软件进行LpxH抑制剂分子的生成和虚拟筛选 (活性/成药性预测)[60]。比如, 使用AutoMolDesigner对已有的革兰阴性菌胞内聚集数据进行建模, 帮助筛选具有更好的外膜透过率的化合物; ② 选择性建模。由于现有的抑制剂对于不同细菌LpxH酶的抑制活性存在差别, 随着更多小分子抑制剂数据的积累, 有望利用AI建立选择性预测模型, 并实现选择性抑制剂的设计[61-63]。

在大肠杆菌和肺炎克雷伯菌中, 小分子抑制剂与LpxH结合的关键氨基酸残基具有保守性, 因此现有的抑制剂对这两种细菌的活性相当。然而, 目前已报道的小分子抑制剂对于鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌都没有明显抑制活性, 因此, 继续开发具有广谱抗革兰阴性菌活性的抑制剂具有挑战性。在大肠杆菌的研究中, 发现其中3个氨基酸残基对于结合作用具有显著影响, 分别是PHE141、PHE128和ARG80, 这3个氨基酸残基可以分别与磺酰哌嗪类抑制剂的环1、3和4发生关键性的结合作用。在铜绿假单胞菌中, 128和141位氨基酸均为亮氨酸; 在鲍曼不动杆菌中, 128位氨基酸是亮氨酸; 因此推测现有的抑制剂缺少了和*Pa*LpxH或*Ab*LpxH结合的关键π-π堆积作用。由于这些氨基酸的差异, 抑制剂在与不同细菌LpxH结合时具有不同的结合构象和结合强度。比如, 化合物**24**对大肠杆菌*Ec*LpxH的结合作用比铜绿假单胞菌*Pa*LpxH强10倍以上[5]。因此, 为开发具有广谱抗革兰阴性菌作用的LpxH抑制剂, 首先要提高化合物对不同细菌靶点的亲和力。

革兰阴性菌的外排作用及外膜穿透性依然是开发抗革兰阴性菌药物的巨大障碍。如上文所述, 许多对LpxH具有极强酶抑制活性的化合物 (IC_{50} < 0.1 μmol·L^{-1}) 缺乏对于野生型菌株的抗菌活性, 但对于外排泵缺陷型或膜缺陷型菌株则有优秀的体外抗菌活性 (MIC < 0.5 μg·mL^{-1})。因此, 考虑如何增加外膜穿透性 (如应用EnTry规则, 增加极性阳离子伯胺基团、增加分子平面性、减少柔性等[64]), 减少外排泵的作用也是后续LpxH小分子抑制剂的研究方向。脂质A合成途径中存在着多个催化酶, 目前已有许多关于LpxC抑制剂的报道, 并进入了临床研究, 如ACHN-975[33]。关于LpxA[29-31]、LpxD[30,32]也有一些新型抑制剂的报道。因此, 针对该通路设计的小分子抑制剂进行联合应用来发挥协同抗菌作用也是一个可行的研究思路。

综上所述, LpxH抑制剂研究的未来充满希望, 但仍然存在包括抗菌谱较窄、外膜穿透性差、容易被外排泵泵出、理化性质不佳等问题, 在今后的分子设计和优化中应加以考虑并逐步解决相关问题。随着LpxH研究的深入和高质量先导结构的发现, LpxH抑制剂有望发展成为一类全新作用机制的抗菌药物。

作者贡献: 张高负责组织文章的框架、文章的撰写及修改; 夏杰负责文章的审阅、修改和完善; 吴松负责了文章的思路指导和审阅。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance, to Guide Research, Development, and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance [M]. Geneva: World Health Organization, 2024, 1-11.

[2] China antimicrobial surveillance network. CHINE Surveillance of Bacterial Resistance: Results of 2024 [R]. Shanghai: Institute of Antibiotics, Huashan Hospital, Fudan University, 2025, 10-50.

[3] Chen Y, Lin Y, Jiang JD. Research progress on anti-Gram-negative bacteria [J]. Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术), 2022, 17: 237-244.

[4] Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins [J]. Annu Rev Biochem, 2002, 71: 635-700.

[5] Huseby DL, Cao S, Zamaratski E, et al. Antibiotic class with potent *in vivo* activity targeting lipopolysaccharide synthesis in Gram-negative bacteria [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2024, 121: e2317274121.

[6] Molinaro A, Holst O, Di Lorenzo F, et al. Chemistry of lipid A: at the heart of innate immunity [J]. Chem Eur J, 2015, 21: 500-519.

[7] Raetz CR, Reynolds CM, Trent MS, et al. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria [J]. Annu Rev Biochem, 2007, 76: 295-329.

[8] Garcia-Vello P, Di Lorenzo F, Zucchetta D, et al. Lipopolysaccharide lipid A: a promising molecule for new immunity-based therapies and antibiotics [J]. Pharmacol Ther, 2022, 230: 107970.

[9] Troudi A, Pagès JM, Brunel JM. Chemical highlights supporting the role of lipid A in efficient biological adaptation of Gram-

negative bacteria to external stresses [J]. J Med Chem, 2021, 64: 1816-1834.

[10] Henderson JC, Zimmerman SM, Crofts AA, et al. The power of asymmetry: architecture and assembly of the Gram-negative outer membrane lipid bilayer [J]. Annu Rev Microbiol, 2016, 70: 255-278.

[11] Bertani B, Ruiz N. Function and biogenesis of lipopolysaccharides [J]. EcoSal Plus, 2018, 8: 10.1 128/ecosalplus.E SP-0001-2018.

[12] Babinski KJ, Kanjilal SJ, Raetz CRH. Accumulation of the lipid A precursor UDP-2, 3-diacylglucosamine in an *Escherichia coli* mutant lacking the LpxH gene [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 25947-25956.

[13] Nayar AS, Dougherty TJ, Ferguson KE, et al. Novel antibacterial targets and compounds revealed by a high-throughput cell wall reporter assay [J]. J Bacteriol, 2015, 197: 1726-1734.

[14] Moffatt JH, Harper M, Harrison P, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54: 4971-4977.

[15] Richie DL, Takeoka KT, Bojkovic J, et al. Toxic accumulation of LPS pathway intermediates underlies the requirement of LpxH for growth of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 [J]. PLoS One, 2016, 11: e0160918.

[16] Martínez-Guitián M, Vázquez-Ucha JC, Álvarez-Fraga L, et al. Antisense inhibition of LpxB gene expression in *Acinetobacter baumannii* by peptide−PNA conjugates and synergy with colistin [J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75: 51-59.

[17] Wei JR, Richie DL, Mostafavi M, et al. LpxK is essential for growth of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606: relationship to toxic accumulation of lipid A pathway intermediates [J]. mSphere, 2017, 2: e00199-17.

[18] Lee CJ, Liang XF, Chen X, et al. Species-specific and inhibitor-dependent conformations of LpxC: implications for antibiotic design [J]. Chem Biol, 2011, 18: 38-47.

[19] Lee CJ, Liang XF, Gopalaswamy R, et al. Structural basis of the promiscuous inhibitor susceptibility of *Escherichia coli* LpxC [J]. ACS Chem Biol, 2014, 9: 237-246.

[20] Liang XF, Lee CJ, Chen X, et al. Syntheses, structures and antibiotic activities of LpxC inhibitors based on the diacetylene scaffold [J]. Bioorg Med Chem, 2011, 19: 852-860.

[21] Liang XF, Lee CJ, Zhao JS, et al. Synthesis, structure, and antibiotic activity of aryl-substituted LpxC inhibitors [J]. J Med Chem, 2013, 56: 6954-6966.

[22] Brown MF, Reilly U, Abramite JA, et al. Potent inhibitors of LpxC for the treatment of Gram-negative infections [J]. J Med Chem, 2012, 55: 914-923.

[23] Montgomery JI, Brown MF, Reilly U, et al. Pyridone methylsulfone hydroxamate LpxC inhibitors for the treatment of serious Gram-negative infections [J]. J Med Chem, 2012, 55: 1662-1670.

[24] Barb AW, Jiang L, Raetz CR, et al. Structure of the deacetylase LpxC bound to the antibiotic CHIR-090: time-dependent inhibition and specificity in ligand binding [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104: 18433-18438.

[25] Lee CJ, Liang XF, Wu QL, et al. Drug design from the cryptic inhibitor envelope [J]. Nat Commun, 2016, 7: 10638.

[26] Skiles JW, Gonnella NC, Jeng AY. The design, structure, and clinical update of small molecular weight matrix metalloproteinase inhibitors [J]. Curr Med Chem, 2004, 11: 2911-2977.

[27] Fujita K, Takata I, Yoshida I, et al. TP0586532, a non-hydroxamate LpxC inhibitor, has *in vitro* and *in vivo* antibacterial activities against *Enterobacteriaceae* [J]. J Antibiot (Tokyo), 2022, 75: 98-107.

[28] Zhou P, Barb AW. Mechanism and inhibition of LpxC: an essential zinc-dependent deacetylase of bacterial lipid A synthesis [J]. Curr Pharm Biotechnol, 2008, 9: 9-15.

[29] Dangkulwanich M, Raetz CRH, Williams AH. Structure guided design of an antibacterial peptide that targets UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase [J]. Sci Rep, 2019, 9: 3947.

[30] Kroeck KG, Sacco MD, Smith EW, et al. Discovery of dual-activity small-molecule ligands of *Pseudomonas aeruginosa* LpxA and LpxD using SPR and X-ray crystallography [J]. Sci Rep, 2019, 9: 15450.

[31] Han W, Ma XL, Balibar CJ, et al. Two distinct mechanisms of inhibition of LpxA acyltransferase essential for lipopolysaccharide biosynthesis [J]. J Am Chem Soc, 2020, 142: 4445-4455.

[32] Ma XL, Prathapam R, Wartchow C, et al. Structural and biological basis of small molecule inhibition of *Escherichia coli* LpxD acyltransferase essential for lipopolysaccharide biosynthesis [J]. ACS Infect Dis, 2020, 6: 1480-1489.

[33] Krause KM, Haglund CM, Hebner C, et al. Potent LpxC inhibitors with *in vitro* activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63: e00977-19.

[34] Zhou P, Hong JY. Structure- and ligand-dynamics-based design of novel antibiotics targeting lipid A enzymes LpxC and LpxH in Gram-negative bacteria [J]. Acc Chem Res, 2021, 54: 1623-1634.

[35] Wang XY, Quinn PJ, Yan AX. Kdo_2-lipid A: structural diversity and impact on immunopharmacology [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2015, 90: 408-427.

[36] Sperandeo P, Martorana AM, Polissi A. The Lpt ABC transporter for lipopolysaccharide export to the cell surface [J]. Res Microbiol, 2019, 170: 366-373.

[37] Young HE, Donohue MP, Smirnova TI, et al. The UDP-diacylglucosamine pyrophosphohydrolase LpxH in lipid A biosynthesis utilizes Mn^{2+} cluster for catalysis [J]. J Biol Chem, 2013, 288: 26987-27001.

[38] Metzger LE 4th, Raetz CR. An alternative route for UDP-diacylglucosamine hydrolysis in bacterial lipid A biosynthesis [J]. Biochemistry, 2010, 49: 6715-6726.

[39] Young HE, Zhao JS, Barker JR, et al. Discovery of the elusive UDP-diacylglucosamine hydrolase in the lipid A biosynthetic pathway in *Chlamydia trachomatis* [J]. mBio, 2016, 7: e00090.

[40] Cho JE, Lee CJ, Zhao JS, et al. Structure of the essential *Haemophilus influenzae* UDP-diacylglucosamine pyrophosphohydrolase LpxH in lipid A biosynthesis [J]. Nat Microbiol, 2016, 1: 16154.

[41] Okada C, Wakabayashi H, Kobayashi M, et al. Crystal structures of the UDP-diacylglucosamine pyrophosphohydrase LpxH from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Sci Rep, 2016, 6: 32822.

[42] Cho JE, Lee M, Cochrane CS, et al. Structural basis of the UDP-diacylglucosamine pyrophosphohydrolase LpxH inhibition by sulfonyl piperazine antibiotics [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117: 4109-4116.

[43] Bohl HO, Ieong P, Lee JK, et al. The substrate-binding cap of the UDP-diacylglucosamine pyrophosphatase LpxH is highly flexible, enabling facile substrate binding and product release [J]. J Biol Chem, 2018, 293: 7969-7981.

[44] Karthikeyan D, Kumar S, Jayaprakash NS. A comprehensive review of recent developments in the Gram-negative bacterial UDP-2,3-diacylglucosamine hydrolase (LpxH) enzyme [J]. Int J Biol Macromol, 2024, 267: 131327.

[45] Kwak SH, Cochrane CS, Ennis AF, et al. Synthesis and evaluation of sulfonyl piperazine LpxH inhibitors [J]. Bioorg Chem, 2020, 102: 104055.

[46] Kwak SH, Cochrane CS, Cho JE, et al. Development of LpxH inhibitors chelating the active site dimanganese metal cluster of LpxH [J]. ChemMedChem, 2023, 18: e202300023.

[47] Anes J, McCusker MP, Fanning S, et al. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli* [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 587.

[48] Lee M, Zhao JS, Kwak SH, et al. Structure-activity relationship of sulfonyl piperazine LpxH inhibitors analyzed by an LpxE-coupled malachite green assay [J]. ACS Infect Dis, 2019, 5: 641-651.

[49] Zhou P, Hong JY. LpxH targeting compounds, compositions thereof, and methods of making and using the same: WO, 2021072369 A1 [P]. 2021-04-15.

[50] Amrein K, Dey F, Ding X, et al. Sulfonylpiperazinyl compounds for treatment of bacterial infections: WO, 2023061617 A1 [P]. 2023-04-20.

[51] Dey F, Ding X, Shi HG, et al. Piperazinylsulfonylaryl compounds for treatment of bacterial infections: WO, 2023072794 A1 [P]. 2023-05-04.

[52] Dey F, Ding X, Shi HG, et al. Benzamide compounds for treatment of bacterial infections: WO, 2023166103 A1 [P]. 2023-09-07.

[53] Dey F, Ding X, Lerner C, et al. Tricyclic compounds for treatment of bacterial infections: WO, 2024213610 A1 [P]. 2024-10-17.

[54] Zamaratski E, Antonov D, Konda VR, et al. LpxH inhibitors as anti-infective agents: WO, 2022220725 A1 [P]. 2022-10-20.

[55] Bolton EE, Wang Y, Thiessen PA, et al. Chapter 12-PubChem: integrated platform of small molecules and biological activities [M]//Annual Reports in Computational Chemistry: Vol. 4. Amsterdam: Elsevier, 2008: 217-241.

[56] Benediktsdottir A, Sooriyaarachchi S, Cao S, et al. Design, synthesis, and *in vitro* biological evaluation of *meta*-sulfonamidobenzamide-based antibacterial LpxH inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2024, 278: 116790.

[57] Gurvic D, Zachariae U. Multidrug efflux in Gram-negative bacteria: structural modifications in active compounds leading to efflux pump avoidance [J]. NPJ Antimicrob Resist, 2024, 2: 6.

[58] Ennis AF, Cochrane CS, Dome PA, et al. Design and evaluation of pyridinyl sulfonyl piperazine LpxH inhibitors with potent antibiotic activity against Enterobacterales [J]. JACS Au, 2024, 4: 4383-4393.

[59] Zhou P, Hong JY. Antibiotics comprising LpxH-targeting compounds and methods of making and using the same: WO, 2024211444 A2 [P]. 2024-10-10.

[60] Shen T, Guo JL, Han ZS, et al. AutoMolDesigner for antibiotic discovery: an AI-based open-source software for automated design of small-molecule antibiotics [J]. J Chem Inf Model, 2024, 64: 575-583.

[61] Di Stefano M, Piazza L, Poles C, et al. KinasePred: a computational tool for small-molecule kinase target prediction [J]. Int J Mol Sci, 2025, 26: 2157.

[62] Yoshizawa T, Ishida S, Sato T, et al. Selective inhibitor design for kinase homologs using multiobjective Monte Carlo tree search [J]. J Chem Inf Model, 2022, 62: 5351-5360.

[63] Zhang MZ, Liu YL, Jang H, et al. Strategy toward kinase-selective drug discovery [J]. J Chem Theory Comput, 2023, 19: 1615-1628.

[64] Richter MF, Drown BS, Riley AP, et al. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic [J]. Nature, 2017, 545: 299-304.