

靶向细菌肽聚糖合成酶抑制剂的研究进展

刘凡^{1†}, 孟浩毅^{1†}, 孙正阳¹, 李丹阳², 金媛媛², 杨兆勇²,
吴少杰^{3*}, 陈静^{1*}

(1. 华北理工大学基础医学院, 河北 唐山 063000; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 3. 淮海工学院海洋学院, 江苏 连云港 222000)

摘要: 近年来, 由于抗生素的滥用, 使耐药菌株广泛出现, 已成为威胁人类健康的重大问题。研发具有新的作用机制的抗菌药物迫在眉睫。抗菌药物资源匮乏, 究其原因, 主要是由于有效的药物作用靶点数量不足, 远远不能满足当前防治的需要。因此抗菌药物作用靶标的筛选是新型抗菌药物研发的关键一步。细菌细胞壁的主要成分是肽聚糖, 肽聚糖是病原菌生存所必需的。Mur 酶 (MurA-F) 是肽聚糖生物合成必不可少的酶, 可以以此为靶标发现新的抗生素。本文详细介绍了 MurA-F 抑制剂的研究现状, 并总结了临床上缺少成功抑制剂的原因和所面临的挑战。

关键词: 肽聚糖; 抗生素; Mur 酶; 酶抑制剂; 药物发现

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0362-09

Advances in the research of inhibitors of enzymes of bacterial peptidoglycan biosynthesis

LIU Fan^{1†}, MENG Hao-yi^{1†}, SUN Zheng-yang¹, LI Dan-yang², JIN Yuan-yuan²,
YANG Zhao-yong², WU Shao-jie^{3*}, CHEN Jing^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China;
2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. HuaiHai Institute of Technology, Lianyungang 222000, China)

Abstract: In recent years, owing to the abuse of antibiotics, the widespread of resistant bacterial strains became a serious threat to public health. This status demands development of new antibacterial agents with novel mechanisms of action. The reason for the limited new antibacterials is the small number of effective therapeutic targets, which cannot meet the current needs for the multiple drug-resistant treatment. Screening for new targets is the key step in the development of novel antibacterial agents. Peptidoglycan is the main component of the cell wall of bacteria, which is essential for survival of pathogenic bacteria. Within the biochemical pathway for peptidoglycan biosynthesis is the Murligases, described in this review as highly potential targets for the development of new classes of antibacterial agents. This review provides an in-depth insight into the recent developments in the field of inhibitors of the Mur enzymes (MurA-F). Moreover, the reasons for the lack of candidate inhibitors and the challenges to overcome the hurdles are also discussed.

Key words: peptidoglycan; antibiotics; Mur enzyme; enzyme inhibitor; drug discovery

收稿日期: 2016-09-18; 修回日期: 2016-10-12

基金项目: 北京市自然科学基金 (7164279); NSFC-NIH (中美) 国际合作与交流项目 (81261120417).

†同等贡献.

*通讯作者 Tel / Fax: 86-315-3725859, E-mail: chjingchuchu@hotmail.com; 15051184532@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-0902

2012年之前,全球近40年无全新结构和作用机制的抗菌药品上市,其中新型可药性靶标的发现相对缺乏是限制抗菌新药发展的瓶颈之一。因此,针对全新靶点的抗菌新药的研发迫在眉睫。

细菌细胞壁是位于细胞最外的一层厚实、坚韧的外被,具有固定细胞外形和保护细胞不受损伤等多种生理功能。细菌细胞壁由一些化学成分不同的物质组成,如肽聚糖、磷壁酸、脂多糖、磷脂、外膜蛋白等,在这些组成成分中对细胞壁的生理功能起主要作用的是肽聚糖,除少数细菌如产甲烷细菌这类古细菌的细胞壁是由其他化学物质组成外,几乎所有细菌的细胞壁都含有肽聚糖,在 G^+ 细菌中肽聚糖含量高达30%~95%, G^- 细菌也有5%~20%的含量。由于哺乳动物细胞内不存在与细菌类似的细胞壁结构,也不存在合成细胞壁的各种生物通路,因此,与细胞壁合成相关的通路一直都是抗菌药物研究的热点。

肽聚糖是细菌细胞壁重要的组成部分,是细菌生存所必须的,它为细菌提供刚性结构使得细菌可在低渗环境中生存。近年来,随着肽聚糖在细菌内的生物合成通路被逐步解析,肽聚糖生物合成所涉及的每一个酶也成为发现新型抗生素的重要靶点^[1,2]。

在以往抗生素发现的进程中,研究重点主要集中在肽聚糖生物合成的后半部^[3-5]。然而,最近几年研究人员也开始关注胞内肽聚糖合成所涉及的靶酶尤其是Mur酶系^[2,6-8]。

MurA-F催化6步酶促反应最终形成肽聚糖的先导物尿苷-5'-二磷酸(UDP)-*N*-乙酰胞壁酸五肽(图1)。MurA和MurB以UDP-*N*-乙酰葡萄糖胺(UDP-

GlcNAc)为底物催化形成UDP-*N*-乙酰胞壁酸(UDP-MurNAc)。随后,Mur连接酶(MurC-F)先后将*L*-Ala、*D*-Glu、meso-diaminopimelic acid(革兰阴性菌)或*L*-Lys(革兰阳性菌)和二肽*D*-Ala-*D*-Ala连入UDP-MurNAc形成UDP-MurNAc-五肽^[9,10]。

目前对肽聚糖生物合成通路中酶的底物专一性、动力学、催化机制和结构生物学研究的逐渐深入^[6,9-15]为抗结核药物的研究提供了重要的基础和保障。本文对Mur酶近10年所发现的小分子抑制剂的研究进展进行了综述和总结,为本领域研究人员提供挖掘抑制剂的前沿方向,为发现活性更为优异的药物先导物打下坚实的基础。

1 MurA 抑制剂

众所周知,广谱抗生素fosfomycin(化合物1,图2)是MurA的抑制剂之一,它能与MurA的活性位点(Cys115)形成共价键。Fosfomycin对MurA的抑制存在时间依赖性,并且在底物UDP-GlcNAc存在的情况下抑制活性升高^[16]。结核分支杆菌、沙眼衣原体和伯氏疏螺旋体等对于fosfomycin具有固有耐药性,因为它们相应的Cys突变为Asp^[17]。另外,细菌降低渗透压、修饰活性中心和产生相应的酶钝化fosfomycin可产生对fosfomycin的耐药性^[17],因此,当前迫切需要研发具有不同化学结构和作用机制的抑制剂。

最近,Chang等^[18]报道了从*Neosartorya fischeri*分离得到的燕麦曲菌素衍生物(化合物2,图2),该类化合物是MRSA和fosfomycin抵抗的MurA的有效抑制剂。通过对Novartis化合物库进行高通量筛选,2-aminotetralone衍生物和benzothioxalone系列化合

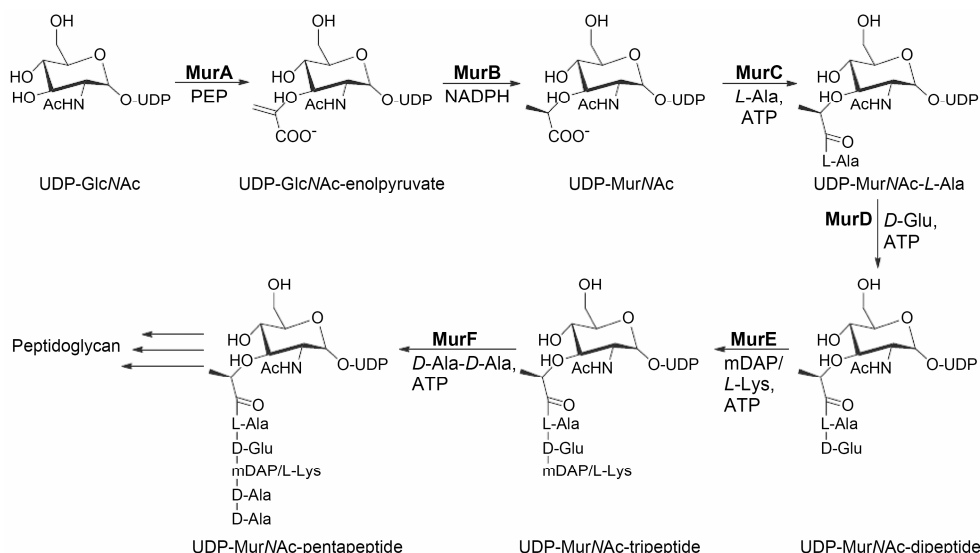


Figure 1 Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis catalyzed by the Mur enzymes

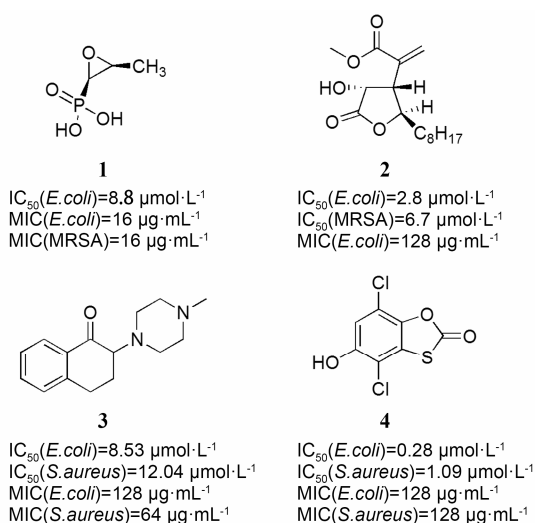


Figure 2 Structures and biological activities of some structurally diverse inhibitors of MurA

物被鉴定出来。2-Aminotetralone 衍生物 (化合物 3, 图 2), 对来自于 *E. coli* 和 *S. aureus* 的 MurA 的 IC_{50} 在微摩尔级别, 并且显示出良好的抑菌活性, MIC 在 8 至 $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。Benzothiazolidinone 系列化合物 (化合物 4, 图 2) 对 MurA 的 IC_{50} 在 0.25 到 $18.54 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 一些此类抑制剂对 *S. aureus* 的 MIC 在 4 和 $128 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 之间。

2 MurB 抑制剂

至今为止, 只报道了少数几种 MurB 的抑制剂。4-Thiazolidinone 衍生物 (化合物 5, 图 3) 是第一类被报道的 MurB 的抑制剂, 它是模拟烯醇式丙酮酸-UDP-GlcNAc 中的二磷酸胞苷部分设计的^[19]。其杂环生物电子等排体, imidazolinone 衍生物 (化合物 6, 图 3) 显示出对 MurB 高效的抑制性, 并对 *S. aureus* 显示出优异的抗菌活性^[20]。

Alkyl pyrazolidinedione 衍生物 (化合物 7, 图 3) 对来源于 *S. aureus* 和 *E. coli* 的 MurB 具有良好的抑制性, 同时对革兰阳性细菌尤其是耐青霉素的 *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) 显示出中等的抗菌活性^[21]。另外, 一系列 pyrazolidinedione 衍生物 (化合物 8, 图 3) 在低微摩尔浓度下对来源于 *S. aureus* 和 *E. coli* 的 MurB 能够产生抑制作用, 同时对 MurA 和 MurC 也具有中等的抑制性^[22, 23]。

Mur 连接酶 MurC、MurD、MurE 和 MurF 具有 3 个相同的活性结构域^[24, 25]。N-端结构域 1、中心结构域 2 和 C-结构域 3 (图 4)。结构域 1 结合核苷底物。例如, 来自大肠中的酶, 由 5 个平行的 β -折叠被 α -螺旋包围组成, 其中 α -螺旋在 MurE 中为 2 个, 在 MurF 中为 3 个, 在 MurC 和 MurD 中为 4 个; MurD、MurE、

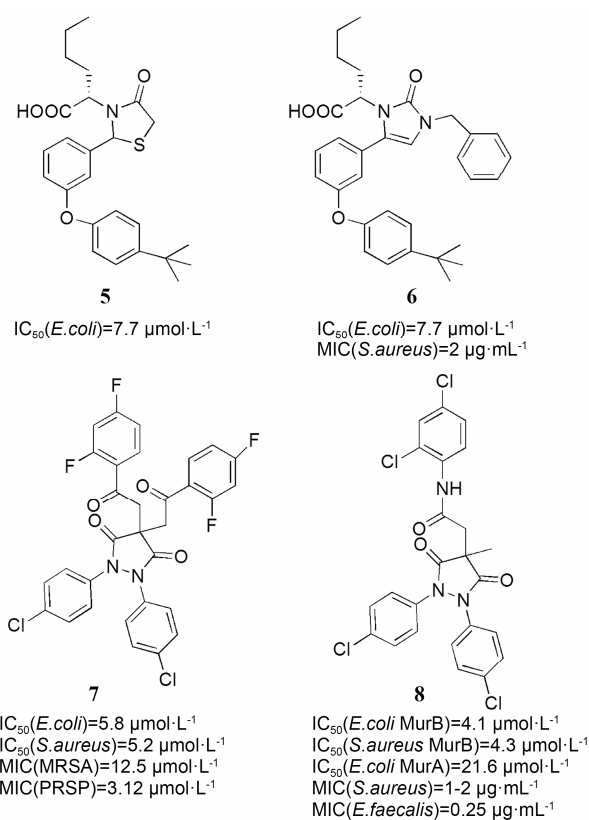


Figure 3 Structures and biological activities of the MurB inhibitors, and the dual MurA/MurB inhibitors

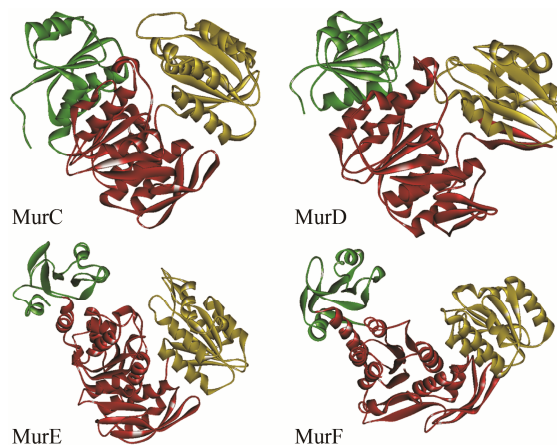


Figure 4 Representation of the tridimensional structures of MurC, MurD, MurE and MurF. Domain 1 of the Mur ligases is represented in green, domain 2 in red and domain 3 in yellow

MurF 的中心结构域包含 6 个平行的 β -折叠, MurC 则为 7 个。MurD 和 MurE 中 β -折叠被 7 个 α -螺旋环绕, MurC 中 β -折叠被 4 个 α -螺旋环绕, MurF 中 β -折叠被 8 个 α -螺旋环绕, 这个结构域的两侧被更小的反平行的 3β -折叠包围; 结构域 3 包含 6 个 β -折叠, 其中 1 个反平行的、5 个平行的, 这 6 个 β -折叠被 5 个 α -螺旋包围。这个结构域包含罗斯曼二核苷酸折叠并结合氨基酸基质。这些特点可被用来设计同时靶向多个酶

的多靶点抑制剂, 使与靶标相关抵抗的发展的可能性降到最低。

3 MurC 抑制剂

第一类 MurC 抑制剂是 phosphinate transition-state 衍生物, 其抑制作用最强的化合物 (化合物 9, 图 5) 的 IC_{50} 为 $49 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。研究发现该类化合物的 UDP 部分是活性必须基团^[26]。

2004 年, AstraZeneca 公司通过高通量筛选化合物库获得一系列 benzofuran acyl-sulfonamides MurC 抑制剂。活性最高的衍生物 (化合物 10, 图 5) 对 *E. coli* 来源的 MurC 显示出时间依赖性的、部分可逆的低微摩尔浓度 (IC_{50} , $2.3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的抑制作用。最近, 该公司又筛选获得了一个 pyrazolopyrimidine 化合物 (化合物 11, 图 5), 该化合物对 *E. coli* 和 *P. aeruginosa* 来源的 MurC 的 IC_{50} 均在纳摩尔级别。

Pfizer 公司报道了另一个有潜力的 MurC 的抑制剂。他们利用对 *E. coli* 来源的 MurC 进行高通量筛选获得一个可逆的小分子抑制剂 (化合物 12, 图 5), 其 IC_{50} 为 $30.2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验表明化合物 12 与 ATP 竞争性结合 MurC, 其 K_i 为 $8.2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。然而遗憾的是化合物 12 仅能抑制部分来源于与 *E. coli* 紧密相关菌株的 MurC (如 *Proteus mirabilis*, IC_{50} : $41.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; *Klebsiella pneumoniae*, IC_{50} : $26.4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 对于来源于其他革兰阴性菌 (*H. influenzae*, *Acinetobacter baylyi*, *P. aeruginosa*) 的 MurC 无明显抑制作用, 另外化合物 12 对 *E. coli* 的生长无明显抑制作用^[27]。

4 MurD 抑制剂

MurD 催化 *D*-Glu 和 UDP-MurNAc-*L*-Ala 之间的

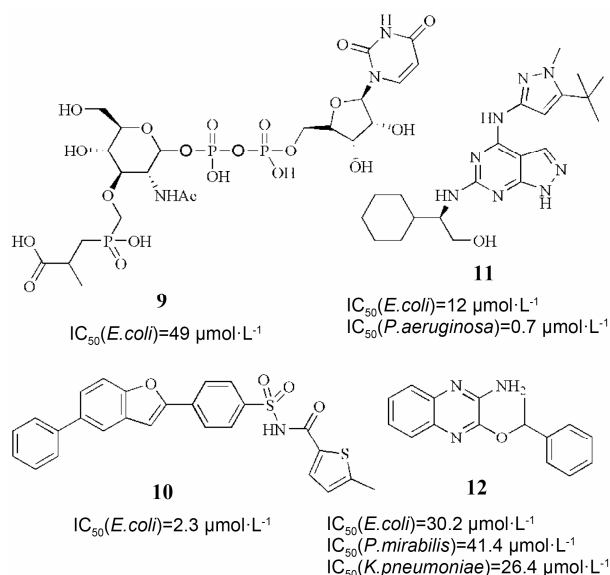


Figure 5 Structures and biological activities of the MurC inhibitors

酰胺键形成 UDP-MurNAc-*L*-Ala-*D*-Glu。由于 MurD 对 *D*-氨基酸基质表现出非常高的特异性, 使得它被认为是发现选择性抗菌剂的最有希望的新靶标之一。

以 MurD 为靶点的药物筛选研究已有多篇文献报道^[9,28]。通过计算机辅助设计获得的化合物 13 (IC_{50} : $0.7 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 是活力最好的大环类 MurD 抑制剂^[29]。通过虚拟筛选获得 9*H*-xanthene 衍生物和 polycyclic 杂环类抑制剂。化合物 14 是其中最具有代表性的, 它对 *E. coli* 来源的 MurD 的 IC_{50} 为 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[30]。Benzene-1,3-dicarboxylic acid 衍生物也是通过虚拟筛选获得的, 化合物 15 (图 6) 是其中活性最高的, (IC_{50} : $270 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 另外, 化合物 15 对 *E. coli* 来源的 MurE 也有抑制作用 (IC_{50} : $32 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[31]。

下一代 MurD 抑制剂是带有谷氨酸结构基元的抑制剂, 最早的含谷氨酸的抑制剂是 phosphinate transition-state 类似物^[32]。这个系列的抑制剂依然是至今已报道过的 MurD 抑制剂中活性最强的 (例如化合物 16, 图 6)。随着谷氨酸部分被确证是发挥 MurD 抑制活性的关键部分, 对此类抑制剂其他部分改造的研究也在进行着, 引入磺胺基后得到了另一系列的 MurD 抑制剂。和次磷酸盐结构一样, 磺胺基的引入是为了模拟 MurD 四面体过渡态^[33-35]。早期的萘磺胺类是 *N*-substituted glutamic acid 衍生物^[34,35], 化合物 17 (包含 *D*-Glu) 和化合物 18 (包含 *L*-Glu) 均可抑制 *E. coli* 来源的 MurD, 包含 *L*-Glu 对映体 (化合物 18) 的效价要比 *D*-Glu 衍生物 (化合物 17) 低的多^[34]。对早期萘磺胺结构进一步优化得到的新的抑制剂, 其中活性最好的化合物 19 对 MurD 的 IC_{50} 可达 $85 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过 NMR 和考虑配体柔性和配体-酶特殊相互作用的分子动力学研究对萘磺胺和 MurD 之间的相互作用进一步分析解释了其抑制活性不高的潜在原因^[36]。通过用更加刚性的环取代 *D*-Glu 得到了化合物 20 和 21 (图 6), 与原始结构的化合物相比, 对 MurD 的抑制活性有所提高, 因此证实了构象限制的优势。化合物 20 与 MurD 共结晶结构揭示两个羧酸基团与母体化合物的 *D*-Glu 占据了完全一样的结合位点。

Benzylidene-2,4-thiazolidin-dione 和 2-thioxothiazolidin-4-onesubstituted glutamic acids 代表着另一大类 MurD 抑制剂。研究发现这类 MurD 抑制剂当 *D*-Glu (化合物 22, 图 6) 被 *L*-Glu (化合物 23, 图 6) 取代后活性并未消失^[37]。进一步研究发现, 当对取代的芳香环进行改变后, *E. coli* 来源的 MurD 抑制活性 (化合物 24, 图 6) IC_{50} 为 $45 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[38]。一些 benzylidene-2,4-

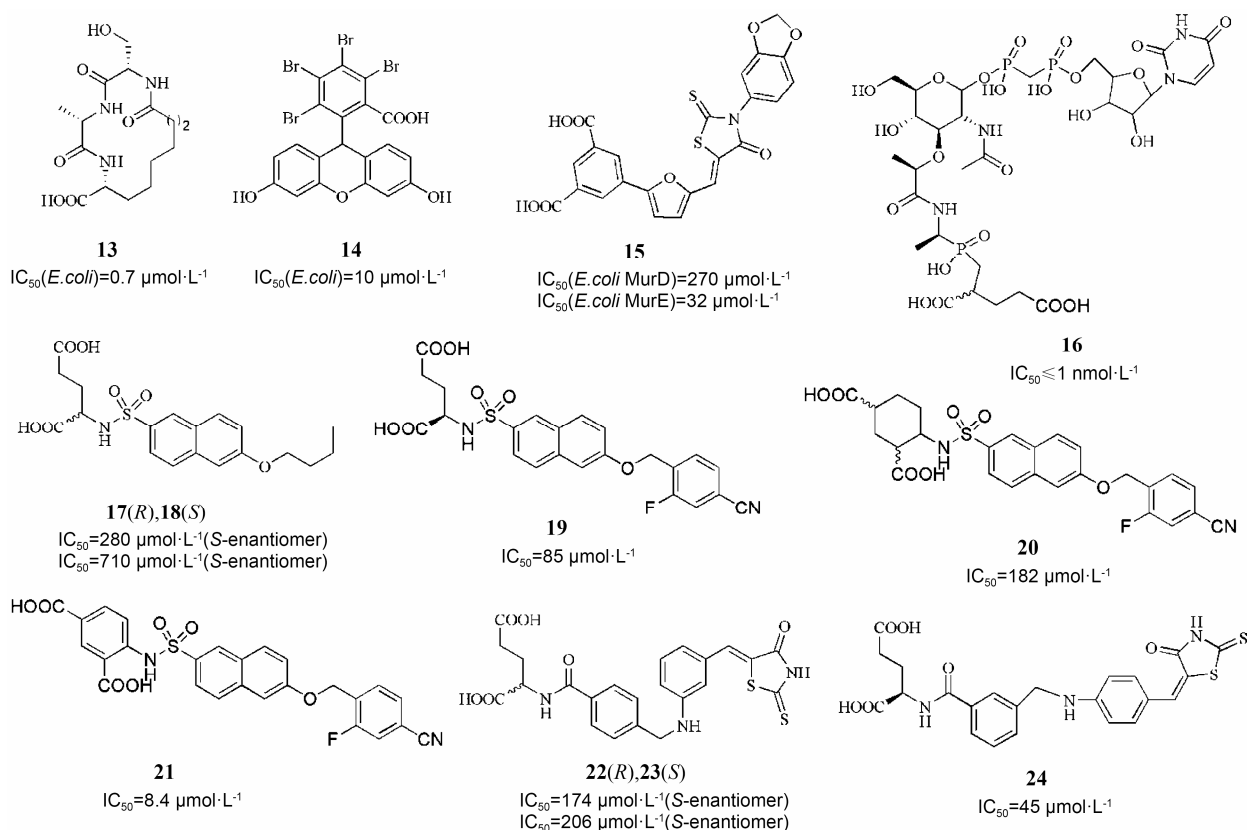


Figure 6 Structures and biological activities of some diverse inhibitors of MurD and dual MurD/MurE inhibitors

thiazolidin-dione 和 2-thioxothiazolidin-4-one 类抑制剂与 MurD 复合物晶体结构的成功解析是这类抑制剂发展的一个里程碑, 并且揭示了它们的结合模式, 这两类抑制剂的结合模式非常相似。

来自不同菌种的 MurD 酶具有保守的催化活性必须的氨基酸残基。然而, 它们整个氨基酸序列的相似性非常小。因此, 只有少数化合物能够同时抑制不同种属的 MurD 酶也就不足为奇了。例如, 化合物 **21** 和 **24** 能够在微摩尔水平抑制来自 *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *B. burgdorferi* 和 *M. tuberculosis* 的 MurD 酶。

至今已有多个多肽和非肽类抑制剂被报道。两个九肽 (序列分别为 CPAHWPHPC 和 CSAWSNKFC) 显示出对 *E. coli* 来源的 MurD 良好的抑制活性^[39]。

5 MurE 抑制剂

第一个被发现的 MurE 的抑制剂是亚磷酸盐 (化合物 **25**, IC_{50} : $1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[40]。类似于上述 MurD 的磺胺类抑制剂也可以抑制 MurE 的活性 (化合物 **26**, 图 7; IC_{50} : $181 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[31]。序列为 CQANLRSQC 的环肽对 *S. aureus* 来源的 MurE 有抑制活性^[28]。MurE 的多肽类抑制剂也被发现, 例如 MurEp1 对 MurE 的 IC_{50} 为 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[41]。3-Methoxynordomesticine (化合物 **27**, 图 7) 是 *M. tuberculosis* 来源的 MurE 抑制

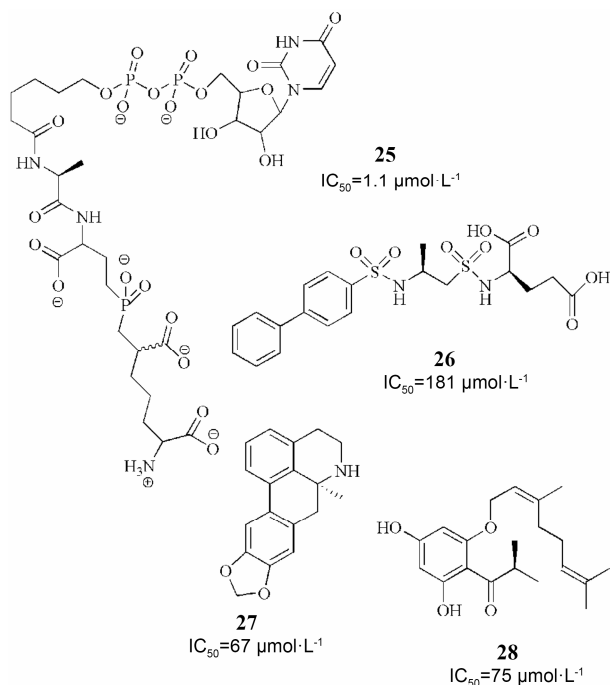


Figure 7 Structures and biological activities of the MurE inhibitor

剂。另一个最近发现的可抑制 *M. tuberculosis* 来源 MurE 的抑制剂是化合物 **28** (IC_{50} : $75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[42,43]。

6 MurF 抑制剂

最初, 利用亲和和选择筛选技术获得了两个非常有前景的 MurF 抑制剂 (化合物 **29**, 图 8; IC_{50} : $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[44]。它们与 MurF 的复合晶体结构证实了结合模型, 这些数据也为后来的结构优化及最终获得活性最高的化合物 **30** (IC_{50} : $22 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[45, 46]奠定了基础。不幸的是, 这一系列化合物均未显示出抗菌活性, 而且对 *E. coli* AcrAB 外排泵突变菌株也未显示出活性。这些实验结果全都表明 MurF 可能不是肽聚糖生物合成的限速步骤^[47]。

通过 MurF 的酶结合实验筛选获得一系列的 8-hydroxyquinolines 化合物, 其可抑制 *E. coli* 来源的

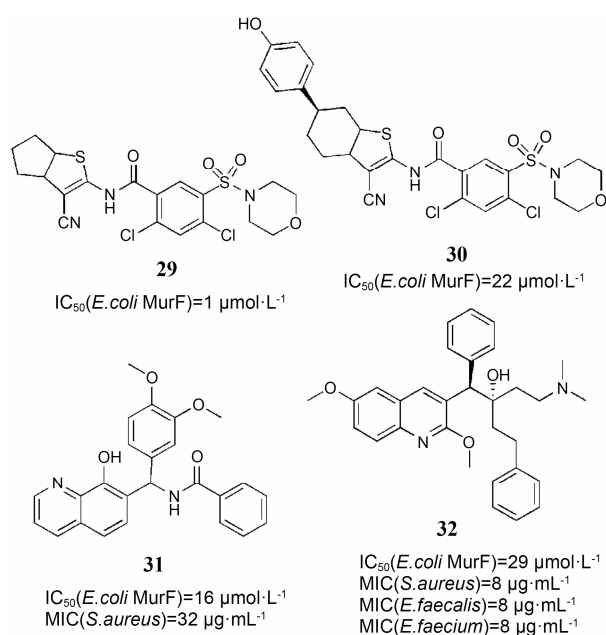


Figure 8 Structures and biological activities of the MurF inhibitors

MurF 活性, 其中化合物 **31** (图 8) 显示出显著的抗菌活性^[48]。此外, 通过在这些化合物基础上构建的一个药效团模型获得两个 diarylquinolines 化合物 (例如化合物 **32**, 图 8), 可通过破坏细胞壁的生物合成抑制 MurF 活性。化合物 **32** 还对 *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* 和 *S. aureus* 有抑菌活性, MIC 是 $8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[49]。

7 Mur 酶多靶点抑制剂

研究人员已认识到多靶点药物的治疗效果要比选择性单靶点药物的要高。但是设计多靶点药物仍面临着众多挑战, 例如保留类药特性和平衡各靶点之间的亲和作用^[50, 51]。针对多靶点 Mur 酶抑制剂的研究已获得了一些具有适度多靶点抑制活性的化合物。

Wyeth 等^[52]研究发现萘基特窗酸是 Mur 酶的多靶点抑制剂, 对 MurA-E, 显示出 IC_{50} 在微摩尔级别的抑制活性。化合物 **33** (图 9) 显示出对 9 个 Mur 酶均衡的抑制作用, 而且对 *E. coli* 和 *S. aureus* 具有显著的抗菌活性, 其 MIC 值分别为 $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $1\sim 2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

最近, Perdih 等^[53]通过虚拟筛选发现 benzene-1,3-dicarboxylic acid 2,5-dimethylpyrrole 类衍生物具有 MurD/MurE 双靶点抑制活性, 并在此基础上经过结构优化发现了 5 个抑制水平在微摩尔级别的 MurC-MurF 的多靶点抑制剂 (例如化合物 **34**)。Perdih 等^[54]还报道了 furan-based benzene-1,3-dicarboxylic acid 类衍生物对 MurC-MurF 的多靶点抑制活性, 其中, 化合物 **35** 还对 *S. aureus* 有抑菌活性, MIC 是 $32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

8 结语

由于耐药菌的广泛出现, 使得新药的研究迫在

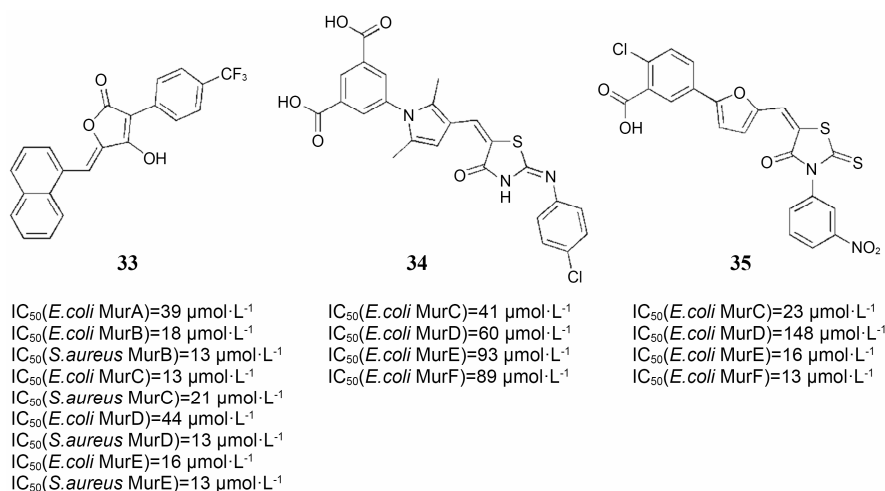


Figure 9 Multiple inhibitors of the Mur enzymes

眉睫^[55,56]。本篇综述以尚未开发的抗菌药物靶标——Mur 酶为切入点详细介绍了很多已报道的 Mur 酶抑制剂。Mur 酶被用于抗菌抑制剂靶标研究的原因如下: ① 它是细菌生存所必需的; ② X 射线晶体结构的获得, 显示了跨菌种的相似性, 并为以结构为基础的药物治疗设计提供了可能; ③ 它们与哺乳动物的酶没有同源性; ④ 它们的复合底物和生化实验较易获得或实现; ⑤ 迄今已研制出很多的抑制剂, 证明 Mur 酶具有成药性^[6,9,14]。

以 MurA 为靶点的抗菌药物的有效性, 已通过在临床上使用的小分子抗生素 fosfomycin 被证实。但是, 还有一些与其他 Mur 酶相关的问题在将来抑制剂的开发过程中需要牢记和克服^[57]。至今为止还未有具有抗菌活性的 MurB-F 抑制剂明确作用模式的报道。主要原因是大多数抑制剂不能透过细胞壁或者被外排泵快速泵出。另外, Mur 系列酶在体内可能会形成复杂的多酶复合物, 并阻止抑制剂到达其活性位点。同时 Mur 系列酶容易对代谢通路中的产物产生反馈抑制。概括地说, 要获得具有良好抗菌活性的 Mur 酶抑制剂还有很长的路要走^[57]。目前, 具有纳摩尔级别抑制活性和类药性的抑制剂仅局限于 MurF, 不可逆抑制剂仅在 MurA 中发现, 针对其他 Mur 酶的抑制剂还有待于进一步的设计开发。

众所周知, 作用于单靶点的抑制剂容易由于细菌结合位点的突变而失去活性。为了避免此种情况, 同时作用于多靶点的抑制剂被开发出来。尽管现阶段多靶点 Mur 酶抑制剂还处于概念验证阶段, 但相信随着进一步的结构优化和发展, 最终会产生具有良好抗菌活性的多靶点 Mur 酶抑制剂^[50,51]。

References

- [1] Green DW. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2002, 6: 1–20.
- [2] Gautam A, Vyas R, Tewari R. Peptidoglycan biosynthesis machinery: a rich source of drug targets [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2011, 31: 295–336.
- [3] Sauvage E, Kerff F, Terrak M, et al. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32: 234–258.
- [4] Kong KF, Schnepfer L, Mathee K. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology [J]. *APMIS*, 2010, 118: 1–36.
- [5] Schneider T, Sahl HG. An oldie but a goodie—cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway [J]. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300: 161–169.
- [6] Bugg TDH, Braddock D, Dowson CG, et al. Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target [J]. *Trends Biotechnol*, 2011, 29: 167–173.
- [7] Coates ARM, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? [J]. *Brit J Pharmacol*, 2011, 163: 184–194.
- [8] Wise R, Blaser M, Carrs O, et al. The urgent need for new antibacterial agents [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66: 1939–1940.
- [9] Barreteau H, Kovač A, Boniface A, et al. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32: 168–207.
- [10] El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque RC. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors [J]. *Mol Microbiol*, 2003, 47: 1–12.
- [11] Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture [J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32: 149–167.
- [12] Katz AH, Caufield CE. Structure-based design approaches to cell wall biosynthesis inhibitors [J]. *Curr Pharm Design*, 2003, 9: 857–866.
- [13] Van Heijenoort J. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit [J]. *Nat Prod Reports*, 2001, 18: 503–519.
- [14] Smith CA. Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases [J]. *J Mol Biol*, 2006, 362: 640–655.
- [15] Lovering AL, Safadi SS, Strynadka NCJ. Structural perspective of peptidoglycan biosynthesis and assembly [J]. *Ann Rev Biochem*, 2012, 81: 451–478.
- [16] Marquardt JL, Brown ED, Lane WS, et al. Kinetics, stoichiometry, and identification of the reactive thiolate in the inactivation of UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase by the antibiotic fosfomycin [J]. *Biochemistry*, 1994, 33: 10646–10651.
- [17] Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance [J]. *Antibiotics*, 2013, 2: 217–236.
- [18] Chang CM, Chern J, Chen MY, et al. Avenaciolides: potential MurA-targeted inhibitors against peptidoglycan biosynthesis in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 137: 267–275.
- [19] Bachelier A, Mayer R, Klein CD. Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 5605–5609.

- [20] Steinbach A, Scheidig AJ, Klein CD. The unusual binding mode of cnicin to the antibacterial target enzyme MurA revealed by X-ray crystallography [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 5143–5147.
- [21] Kutterer KMK, Davis JM, Singh G, et al. 4-Alkyl and 4,4'-dialkyl 1,2-bis(4-chlorophenyl) pyrazolidine-3,5-dione derivatives as new inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 2527–2531.
- [22] Gilbert AM, Failli A, Shumsky J, et al. Pyrazolidine-3,5-diones and 5-hydroxy-1*H*-pyrazol-3(2*H*)-ones, inhibitors of UDP-*N*-acetylenolpyruvyl glucosamine reductase [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 6027–6036.
- [23] Yang Y, Severin A, Chopra R, et al. 3,5-Dioxypyrazolidines, novel inhibitors of UDP-*N*-acetylenolpyruvyl glucosamine reductase (MurB) with activity against Gram-positive bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 556–564, 2527–2531.
- [24] Smith CA. Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases [J]. *J Mol Biol*, 2006, 362: 640–655.
- [25] Kouidmi I, Levesque RC, Paradis-Bleau C. The biology of Mur ligases as an antibacterial target [J]. *Mol Microbiol*, 2014, 94: 242–253.
- [26] Reck F, Marmor S, Fisher S, et al. Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurC [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 1451–1454.
- [27] Zawadzke LE, Norcia M, Desbonnet CR, et al. Identification of an inhibitor of the MurC enzyme, which catalyzes an essential step in the peptidoglycan precursor synthesis pathway [J]. *Assay Drug Develop Technol*, 2008, 6: 95–103.
- [28] Šink R, Barreteaue H, Patin D, et al. MurD enzymes: some recent developments [J]. *Biomol Concepts*, 2013, 4: 539–556.
- [29] Horton JR, Bostock JM, Chopra I, et al. Macrocyclic inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme Mur D [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 1557–1560.
- [30] Turk S, Kovač A, Boniface A, et al. Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17: 1884–1889.
- [31] Perdiš A, Kovač A, Wolber G, et al. Discovery of novel benzene 1,3-dicarboxylic acid inhibitors of bacterial MurD and MurE ligases by structure-based virtual screening approach [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 2668–2673.
- [32] Tanner ME, Vaganay S, van Heijenoort J, et al. Phosphinate inhibitors of the *D*-glutamic acid-adding enzyme of peptidoglycan biosynthesis [J]. *J Org Chem*, 1996, 61: 1756–1760.
- [33] Humljan J, Kotnik M, Boniface A, et al. A new approach towards peptidosulfonamides: synthesis of potential inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurE [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62: 10980–10988.
- [34] Kotnik M, Humljan J, Contreras-Martel C, et al. Structural and functional characterization of enantiomeric glutamic acid derivatives as potential transition state analogue inhibitors of MurD ligase [J]. *J Mol Biol*, 2007, 370: 107–115.
- [35] Humljan J, Kotnik M, Contreras-Martel C, et al. Novel naphthalene-*N*-sulfonyl-*D*-glutamic acid derivatives as inhibitors of MurD, a key peptidoglycan biosynthesis enzyme [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 7486–7494.
- [36] Simčić M, Hodošček M, Humljan J, et al. NMR and molecular dynamics study of the binding mode of naphthalene-*N*-sulfonyl-*D*-glutamic acid derivatives: novel MurD ligase inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 2899–2908.
- [37] Tomašić T, Zidar N, Rupnik V, et al. Synthesis and biological evaluation of new glutamic acid-based inhibitors of MurD ligase [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 153–157.
- [38] Zidar N, Tomašić T, Šink R, et al. Discovery of novel 5-benzylidenerhodanine and 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione inhibitors of MurD ligase [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 6584–6594.
- [39] Bratkovič T, Lunder M, Urleb U, et al. Peptide inhibitors of MurD and MurE, essential enzymes of bacterial cell wall biosynthesis [J]. *J Basic Microbiol*, 2008, 48: 202–206.
- [40] Zeng B, Wong KK, Pompliano DL, et al. A phosphinate inhibitor of the meso-diaminopimelic acid-adding enzyme (MurE) of peptidoglycan biosynthesis [J]. *J Org Chem*, 1998, 63: 10081–10085.
- [41] Paradis-Bleau C, Lloyd A, Sanschagrin F, et al. *Pseudomonas aeruginosa* MurE amide ligase: enzyme kinetics and peptide inhibitor [J]. *Biochem J*, 2009, 421: 263–272.
- [42] Guzman JD, Gupta A, Evangelopoulos D, et al. Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65: 2101–2107.
- [43] Shiu WKP, Malkinson JP, Rahman MM, et al. A new plant-derived antibacterial is an inhibitor of efflux pumps in *Staphylococcus aureus* [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 42: 513–518.
- [44] Comess KM, Schurdak ME, Voorbach MJ, et al. An ultra efficient affinity-based high-throughput screening process: application to bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurF [J]. *J Biomol Screening*, 2006, 11: 743–754.

- [45] Gu YG, Florjancic AS, Clark RF, et al. Structure-activity relationships of novel potent MurF inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 267–270.
- [46] Stamper GF, Longenecker KL, Fry EH, et al. Structure-based optimization of MurF inhibitors [J]. *Chem Biol Drug Design*, 2006, 67: 58–65.
- [47] Hrast M, Anderluh M, Knez D, et al. Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on a cyanothiophene scaffold [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 73: 83–96.
- [48] Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Klinger A, et al. A MurF inhibitor that disrupts cell wall biosynthesis in *Escherichia coli* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 4420–4426.
- [49] Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Foleno BD, et al. MurF inhibitors with antibacterial activity: effect on muropeptide levels [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 3240–3247.
- [50] Silver LL. Multi-targeting by monotherapeutic antibacterials [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 41–55.
- [51] Silver LL. Polypharmacology as an Emerging Trend in Antibacterial Discovery [M]//Peter JU. Polypharmacology in Drug Discovery. Hoboken: John Wiley and Sons, 2012: 167–202.
- [52] Mansour TS, Caufield CE, Rasmussen B, et al. Naphthyltetrone acids as multi-target inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis [J]. *ChemMedChem*, 2007, 2: 1414–1417.
- [53] Perdih A, Hrast M, Barreateau H, et al. Benzene-1,3-dicarboxylic acid 2, 5-dimethylpyrrole derivatives as multiple inhibitors of bacterial Mur ligases (MurC-MurF) [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22: 4124–4134.
- [54] Perdih A, Hrast M, Pureber K, et al. Furan-based benzene mono- and dicarboxylic acid derivatives as multiple inhibitors of the bacterial Mur ligases (MurC-MurF): experimental and computational characterization [J]. *J Computer-aided Mol Design*, 2015, 29: 541–560.
- [55] Bax RP, Anderson R, Crew J, et al. Antibiotic resistance – what can we do? [J]. *Nat Med*, 1998, 4: 545–546.
- [56] Projan SJ, Youngman PJ. Antimicrobials: new solutions badly needed [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2002, 5: 463–465.
- [57] Silver LL. Challenges of antibacterial discovery [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2011, 24: 71–109.