

分枝杆菌膜蛋白 3 抑制剂的研究进展

杨 旭, 张 翔*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 活性物质发现与适药化研究北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 分枝杆菌膜蛋白 3 (mycobacterial membrane protein large 3, MmpL3) 属于抗瘤细胞分裂 (RND) 蛋白超家族, 它主要参与结核分枝杆菌中海藻糖单霉菌酸酯的转运过程, 对 MmpL3 的抑制可以影响结核分枝杆菌细胞壁的合成。近年来, 通过表型筛选已发现并确证了 7 类不同化学骨架的 MmpL3 抑制剂, 拟用于耐药结核病的治疗。本文将简要论述这几类 MmpL3 抑制剂及其构效关系, 介绍靶标确证的方法, 并进一步探讨 MmpL3 抑制剂的作用机制。

关键词: 分枝杆菌膜蛋白 3; 结核分枝杆菌; 构效关系; 作用机制

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 09-1379-08

Recent advances in study of mycobacterial membrane protein large 3 inhibitors

YANG Xu, ZHANG Xiang*

(Beijing Key Laboratory of Active Substance Discovery and Druggability Evaluation, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Mycobacterial membrane protein large 3 (MmpL3) belongs to the resistance, nodulation and division (RND) superfamily whose role in mycobacteria is transporting trehalosemonomycolate (TMM). The inhibition of MmpL3 influences the formation of cell wall of mycobacteria. In the past few years, several whole cell-based screenings of compound libraries by different research groups has brought by a number of diverse chemical scaffolds active against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). The aim of this review is to provide the recent advances in discovery of MmpL3 inhibitors with a special focus on the structure-activity relationship (SAR). Besides, this review will provide the information of target identification and the modes of action of the MmpL3 inhibitors.

Key words: mycobacterial membrane protein large 3; *Mycobacterium tuberculosis*; structure-activity relationship; modes of action

结核病 (tuberculosis, TB) 是由结核分支杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 引起的慢性传染性疾病。世界卫生组织 2015 年《全球结核报告》显示 2014 年全球有 960 万人感染结核, 其中印度、印

度尼西亚和中国分别占比 23%、10% 和 10%; 150 万人死于结核, 其中 40 万人同时患有艾滋病。结核病与艾滋病已经成为全球死亡率最高的疾病。世卫组织预测, 2014 年 3.3% 新的 TB 患者和 20% 接受过治疗的 TB 患者患有耐多药结核病 (multi-drug resistant tuberculosis, MDR-TB), 全球大概有 30 万的 MDR-TB 患者, 其中 54% 来自印度、中国和俄罗斯^[1]; MDR-TB 患者中又有大概 9.7% 患有广泛耐药结核病 (extensively drug resistant tuberculosis, XDR-TB)^[1]。

收稿日期: 2017-01-16; 修回日期: 2017-02-12.

基金项目: 国家科技重大专项“重大新药创制”子课题 2015ZX09102007 “抗耐药结核新药 TBI-001 的临床前研究”。

*通讯作者 Tel: 86-10-63165248, E-mail: simon@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0058

目前 TB 的标准治疗方法是异烟肼、利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇四药联合使用, 每日口服, 持续治疗 6~9 个月^[1]。如果患者严格遵守治疗法则, 这种治疗方法对药敏型 (drug-sensitive) TB 的治愈率将达到 85%~90%^[2]。然而, 这 4 种药物均有较为严重的不良反应, 包括胃肠道炎症或疼痛、肝脏毒性等^[3]。由于较长的治疗时间以及严重的不良反应, 病人对这种治疗方法依从性较差, 导致接受治疗的患者中会有 20%~30% 产生耐药性^[4]。MDR-TB 患者对异烟肼和利福平有耐药性, 只能使用二线抗 TB 药物治疗, 治疗时间长达 18~20 个月, 且不良反应更为严重^[5]。而 XDR-TB 患者不但对异烟肼和利福平产生耐药性, 而且对氟喹诺酮类药物中的一种以及卷曲霉素、卡那霉素和丁胺卡那霉素中的一种或者一种以上产生耐药性, 目前几乎没有有效的治疗方法。考虑到 TB 患者对现存抗 TB 药物的较高耐药性, 发现与开发具有新的作用靶标和作用机制的抗 TB 药物是研究者亟需解决的问题^[6]。

Mtb 对普通抗生素具很强抗药性, 这与其复杂的细胞壁结构有关。Mtb 细胞壁组成成分及合成途径是结核杆菌特有的, 在哺乳动物细胞中完全不存在, 因此, 阻碍细胞壁形成是目前开发抗 TB 药物的主要思路之一。

分枝杆菌膜蛋白 3 (mycobacterial membrane protein large 3, MmpL3) 在构建细胞壁必须成分的转运过程中起到关键作用 (本文第三部分中将详细介绍), 因此筛选与设计抑制 MmpL3 靶标的小分子化合物成为近年来开发抗 TB 药物的热点之一。近年来, MmpL3 已经成为最成功的抗 TB 药物靶标。基于全细胞的高通量筛选已经确证 7 类化学骨架不同的 MmpL3 抑制剂。本文将简要论述这几类 MmpL3 抑制剂, 介绍靶标确证方法, 并进一步探讨 MmpL3 抑制剂的作用机制。

1 研发中的 MmpL3 抑制剂

1.1 乙二胺类抑制剂

在利用组合化学固相合成方法合成一系列乙胺丁醇类似物以进一步研究其构效关系的过程中, Barry 团队发现了化合物 SQ109 (图 1)^[7]。SQ109 作用于 MmpL3 转运蛋白, 抑制分枝菌酸的转运, 进而产生抗 TB 活性^[8], 目前已完成二期临床研究。

体外活性测试中, SQ109 对敏感型和耐药型 Mtb 的 MIC 值分别为 $0.6 \sim 1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.6 \sim 2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。体外及体内活性测试结果表明, SQ109 的活性均要明显优于乙胺丁醇^[9]。此外, 对于巨噬细胞中的 Mtb,

SQ109 的活性与异烟肼相当, 明显优于乙胺丁醇。体外联合用药结果显示 SQ109 与已上市或在研抗 TB 药物具有协同作用。同时, SQ109 显示杰出的药代性质, 在犬、大鼠和小鼠中的口服生物利用度分别为 2.4%~5%、12% 和 3.8%; 尽管其口服生物利用度较低, 但组织分布研究显示其在小鼠的肺和脾部位的浓度达到 MIC 值的 45 倍。在一个 8 周的小鼠模型中, SQ109 代替乙胺丁醇进行四药联用, 疗效得到显著提高。此外, 当 SQ109 联合其他标准抗 TB 药物或者贝达喹啉使用时, 其治疗效果也要优于标准治疗方案^[10]。临床 I 期研究显示 SQ109 在人体内单一剂量或多剂量使用时均具有良好的安全性及耐受性。II 期临床研究表明 SQ109 单一疗法每日剂量为 75、150 和 300 mg 或者和标准剂量的利福平联合使用时均呈现出良好的安全性及耐受性^[9]。

SQ609 (图 1) 在体外具有很好的抗 TB 活性。20 天 Mtb 感染引起的体重损失的小鼠模型实验中, SQ609 可以很好地防止小鼠体重的损失并提高其生存能力。停止给药后, SQ609 的治疗效果可延长 10~15 天左右^[11]。

Eric Oldfield 团队合成了 11 个新的类似物, 其中化合物 3 和 4 (图 1) 的 MIC 值分别为 $0.02 \sim 0.05$ 和 $0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 体外活性优于 SQ109。结果表明根据生物电子等排原理, 用氧原子代替 NH 后也可维持化合物的抗 TB 活性^[12]。

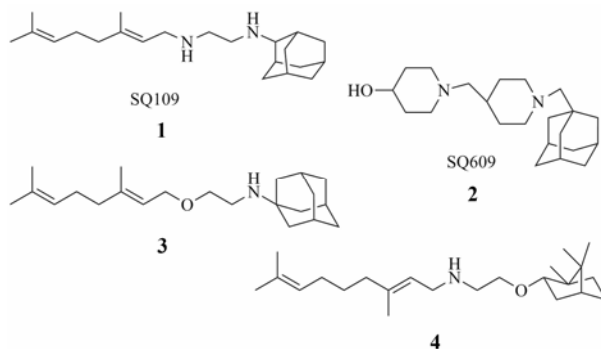


Figure 1 The structures of SQ109 and its analogues

对该类化合物现有研究工作结果初步分析, 构效关系如下: ① 乙二胺骨架是抗 TB 活性的结构基础; ② 乙二胺骨架上取代烷基的体积及性质对活性有重要的影响; ③ 结构中两个碱性 NH 不是活性所必需的; ④ 长链烷基与大体积烷基有利于提高活性 (图 2)。

1.2 吡啶-2-甲酰胺类抑制剂

Franzblau 团队^[13]在对 6 800 个化合物进行表型筛选时发现了苗头化合物 5 (表 1), 它对 Mtb 有较强的抗菌活性, MIC 值为

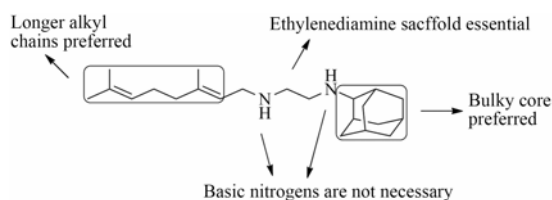


Figure 2 SAR analysis of SQ109 and its analogues

Table 1 The structures of indole-2-carboxamide inhibitors

| Entry | Skeleton | X | R |
|--------------|----------|-----------------|---|
| 5 | | CH ₃ | |
| 6 | | CH ₃ | |
| 7 (NITD-304) | | Cl | |
| 8 (NITD-349) | | F | |
| 9 | | F | |

0.93 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。然而化合物 **5** 在 pH 6.8 时溶解度小于 4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，其脂水分布系数 $c\text{Log}P$ 为 4.48，且在小鼠肝微粒体中清除率较高 ($\text{Cl}_{\text{int}}=693 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)。随后 Kozikowski 团队^[14]经过优化，确定了先导化合物 **6** (表 1)。先导物 **6** 对 MtbH37Rv 的 MIC 值为 0.013 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，对 Vero 细胞的 IC_{50} 值为 54 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，表明其具有较高的安全选择性。

Novartis 公司研究团队对苗头化合物 **5** 的结构优化确定了两个临床前候选药物 NITD-304 和 NITD-349 (表 1)。NITD-304 和 NITD-349 对 H37Rv 菌株显示良好活性，MIC 值分别为 0.015 和 0.023 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，对耐药性菌株 MIC 值在 0.02~0.08 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。体外实验中，NITD-304 和 NITD-349 在小鼠和人肝微粒体中具有适中的清除率。进行口服药代性质评估时，两个候选药物在不同动物属种均呈现良好药代性质：前者口服生物利用度在 15%~76%，而后者口服生物利用度在 38%~100%。体内活性测试实验中，给药剂量为 25 和 75 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时，前者分别降低 2.6 和 4.8 个菌落形成单位 (colony-forming units, CFU)，后者分别降低 2.4 和 4.6 个 logCFU ^[15]。

2016 年 Kozikowski 团队^[16]又确定一个新的先导物 **9** (表 1)，对 H37Rv 的 MIC 值达到 0.012 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，对 Vero 细胞的 IC_{50} 值大于 192 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，呈现出很高的安全选择性。

对吡啶-2-甲酰胺类抑制剂现阶段研究工作的结果综合分析，可将构效关系归纳如下：① 吡啶-2-甲酰胺化学骨架是其活性基础；② 吡啶环上的 NH 以及酰胺键上的 NH 对活性有重要影响；③ 4,6-二氯取代或 4,6-二氟取代可提高其代谢稳定性；④ 抗 TB 活性

与 $c\text{Log}P$ 之间呈正相关；⑤ 极性基团取代可提高化合物的溶解性，但同时也会降低其抗 TB 活性 (图 3)。

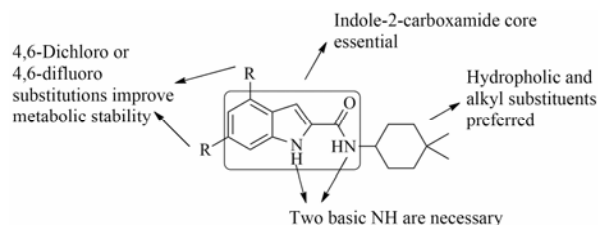


Figure 3 SAR analysis of indole-2-carboxamide inhibitors

1.3 金刚烷基脲类抑制剂 Lee 团队^[17]利用微量肉汤稀释法对包含约 12 000 个化合物的库进行筛选，确定了 1-金刚烷基-3-苯基脲类抑制剂。这类化合物的作用靶标也是 MmpL3，同时对人体可溶环氧化物水解酶 (human soluble epoxide hydrolase, hsEH) 以及 Mtb 环氧化物水解酶具有抑制作用。AU1235 (表 2) 是其中的一个代表性的苗头化合物，它对 Mtb 的 MIC 达到 0.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Table 2 The structures of adamantly urea inhibitors

| Entry | Skeleton | R1 | R2 |
|-------------|----------|----|----|
| 10 (AU1235) | | | |
| 11 | | | |
| 12 | | | |
| 13 | | | |

然而，AU1235 这系列化合物的溶解性与体外药代性质较差。随后，在对包含有 1 600 个脲类化合物的化合物库进行筛选时发现 1-金刚烷基-3-苯基脲的对位有极性基团时可维持活性，同时发现化合物 **11** 口服给药后在小鼠血浆中的浓度高于其 MIC，然而其并未消除小鼠模型中 Mtb 的感染数量。体内活性的丧失究竟是由高蛋白结合率导致或者其他原因所致还有待进一步实验证明^[18]。基于生物电子等排原理，以吡啶环、嘧啶环、三嗪环、噁唑环等芳杂环代替原先的苯环，合成一系列 1-金刚烷基-3-芳杂环脲类化合物，在维持抗 TB 活性的同时体外药代性质得到改善，选择性也有所提高，但这些化合物并不具有体内活性^[12, 19]。

最近，中国学者宋宏锐的团队^[20]为增强 AU1235

与靶点的相互作用, 将金刚烷部分改造为其他类取代基, 设计合成一系列脲类衍生物, 其中化合物 **13** 具有很好的抗 TB 活性 ($MIC = 0.060 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 并且细胞毒性和脂水分配系数均较低, 值得进一步研究。

此类抑制剂的初步构效关系综述如下: ① 1-环烷基-3-苯基双取代脲母核是其抗 TB 活性所必需; ② 对于环烷基部位, 大位阻基团如金刚烷基等活性更高; ③ 苯环上可容纳各种不同的取代基 (图 4)。

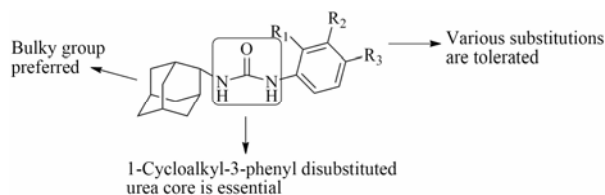


Figure 4 SAR analysis of adamantyl urea inhibitors

1.4 四氢吡唑并嘧啶-3-甲酰胺 (tetrahydropyrazolo [1,5- α]pyrimidine-3-carboxamide, THPP) 类抑制剂 在利用表型高通量筛选化合物的过程中, 不同的研究团体均各自独立的确证了 THPP 这类化学骨架的 MmpL3 抑制剂。

葛兰素史克公司 (GSK) 的 Cammack 团队发现苗头化合物 **14** (表 3), 其对 H37Rv 菌株的 MIC 达到 $0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 但在多种溶剂中的溶解度都很差, 无法进行体内药效研究。随后的结构优化过程发现化合物 **15** (表 3), 其维持体外抗 TB 活性 (对 H37Rv 的 MIC 是 $0.16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的同时, 能够在一次口服剂量 $50 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的条件下达到可接受的血浆浓度 ($AUC_{24h} = 26.5 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)。对小鼠给药 100 和 $300 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后, 肺部感染菌数分别降低 1.5 和 2.2 logCFU。然而化合物 **15** 结构中包含苯并二噁茂环片段, 可能存在与其他药物相互作用及可能的毒性等问题^[21]。

Table 3 The structures of THPP inhibitors of GSK

| Entry | Skeleton | R |
|-------|----------|---|
| 14 | | |
| 15 | | |

Novarits 公司的 Jiricek 团队^[22]也合成了系列 THPP 骨架的抑制剂 (表 4), 其中 NITD-192 活性最好, 但它具有较高的脂水分配系数 ($c\text{Log}P = 6.3$) 和血浆蛋白结合率 (plasma protein binding, PPB > 99.0%) 以及低溶解度, 成药性需改进。随后 Novarits 的研究人员改善 NITD-192 的类药性质, 尽管获得的新类似

物如化合物 **17~19** 等具有较好的体内药代性质, 却完全丧失体内活性; 而 NITD-192 在给药剂量为 $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时具有和乙胺丁醇相当的体内活性, 并对所有的 MDR-TB 菌株有抑制活性, 因此 NITD-192 在治疗 MDR-TB 方面仍是很有前景的候选药物^[12, 23]。总结 GSK 和 Novarits 的工作: ① 四氢嘧啶环上的 NH、吡唑环以及二级酰胺侧链是抗 TB 活性所必需; ② (5R,7S) 构型的骨架具有抗 TB 活性; ③ 两侧苯环上引入极性基团会导致活性降低甚至丧失; ④ 化合物脂水分布系数降低会导致其体内活性降低 (图 5)。

Table 4 Structures of THPP inhibitors of Novarits

| Entry | Skeleton | R | X |
|---------------|----------|---|---|
| 16 (NITD-192) | | | F |
| 17 | | | F |
| 18 | | | F |
| 19 | | | H |

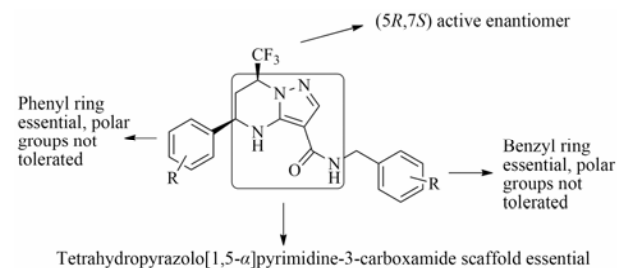


Figure 5 SAR analysis of THPP inhibitors

1.5 1,5-二苯基吡咯类抑制剂 研究者通过基于全细胞表型筛选确证了 1,5-二苯基吡咯类化学骨架的 MmpL3 抑制剂, 并发现了 BM212^[19]、BM521^[24]、BM533^[25]和 BM579^[25]这 4 个活性化合物 (表 5)。与母体化合物 BM212 相比, BM521、BM533 和 BM579 具有很好的抗 TB 活性 (MIC 值在 $0.16 \sim 0.20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 但类药性评估结果显示这 3 个活性化合物在小鼠肝微粒体中具有较高的清除率。其结构中硫代吗啉部分是在微粒体内不稳定的原因, 故 Biava 团队^[23]集中精力修饰这一结构部位, 用吗啉环代替硫代吗啉环, 合成了系列化合物, 并将 BM635 (表 5) 确定为候选化合物。

BM635 具有很好的体外抗 TB 活性 (MIC 值 $0.12 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 及小鼠微粒体稳定性 ($1.4 \text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), 并且 Tox50 高于 MIC 值 100 多倍。基于其优良的类药性质, Biava 团队^[23]进一步研究其体内药代动力学

Table 5 The structures of 1,5-diphenyl pyrrole inhibitors

| Entry | Skeleton | R1 | R2 | X |
|------------|----------|------------------------------------|----|----|
| 20 (BM212) | | Cl | | Cl |
| 21 (BM521) | | CH ₃ | | F |
| 22 (BM533) | | CH ₃ O | | F |
| 23 (BM579) | | CH ₃ S | | F |
| 24 (BM635) | | (CH ₃) ₂ CH | | F |

性质及其体内活性, 在小鼠急性感染模型中, BM635 呈现出很好的抗 TB 活性, ED₉₉ 值 [使肺部 CFU (菌落形成单位) 降低 99% 的有效剂量值] 为 49 mg·kg⁻¹; 给药剂量为 50 mg·kg⁻¹ 时, 体内半衰期为 1 h, 体内最高浓度达到 1.62 μmol·L⁻¹。综合考量 AUC 与 ED₉₉ 值, BM635 体内每单位有效浓度的效能与一线抗 TB 药物异烟肼、利福平、莫西沙星相比具较强优势, 故对其进一步的结构优化将为抗 TB 提供具有更高活性及更优良类药性质的候选药物。1,5-二苯基吡咯类抑制剂的初步构效关系可归纳如下: ① 1,5-二苯基吡咯骨架是其抗 TB 活性的结构基础; ② 两个苯环对位取代抗 TB 活性更好; ③ F 对位取代 N-1 位苯环可增加其活性并降低细胞毒性; ④ 烷基对位取代 C-5 位苯环可增加其活性; ⑤ C-2 位侧链长度增加会导致活性丧失; ⑥ C-3 位的吗啉环可增加微粒体稳定性 (图 6)。

1.6 螺环类抑制剂 GSK 的 Barturen 团队^[26]通过高通量表型筛选确定具有螺环化学骨架的苗头化合物 GSK2200150A (表 6)。尽管其对 H37Rv 的 MIC 是 0.3 μmol·L⁻¹, 但物理化学性质及体外药代动力学参数均不理想, 因此无法进行体内药效研究。保留其 N-亚甲基苯基结构以维持其抗 TB 活性的同时, 研究

Table 6 The structures of spirocycle inhibitors

| Entry | Skeleton | R |
|------------------|----------|---|
| 25 (GSK2200150A) | | |
| 26 | | |

着重于优化其物化性质以改善类药性质, 最终获得化合物 26 (表 6)。

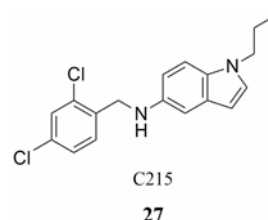
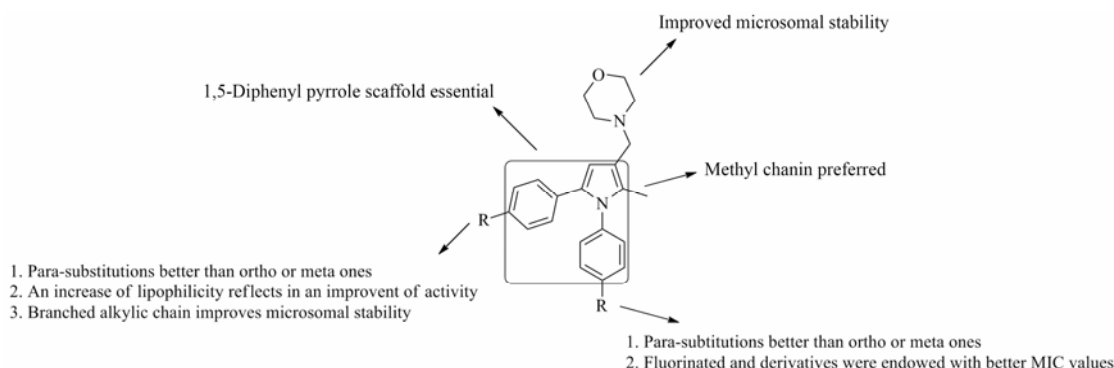
尽管化合物 26 具有较高的脂水分布系数, 但其体外活性显著提高 (H37Rv MIC 0.06 μmol·L⁻¹), 且一次口服给药 50 mg·kg⁻¹ 后, 血浆内的暴露程度达到了可接受的程度, 因此研究人员进一步对其进行小鼠急性感染 Mtb 模型实验。结果显示, 给药 50 和 100 mg·kg⁻¹ 后, 小鼠肺部的 Mtb 分别减少了 2.3 和 2.7 个 logCFU, 与 III 期临床的抗 TB 候选药物莫西沙星相比在给药剂量方面具有一定优势^[19,26]。

1.7 苯并咪唑类抑制剂 在对布罗德研究所的 2 万个小分子化合物库进行全细胞表型筛选的过程中 Hung 团队^[27]确证了化合物 C215 (图 7) 的抗结核作用。

C215 对结核分枝杆菌的抑制 90% 细菌繁殖的浓度 (IC₉₀) 为 16 μmol·L⁻¹, 在巨噬细胞中 C215 的细菌效能增强, 同时其对哺乳动物细胞的毒性较小, IC₉₀ 为 37.5 μmol·L⁻¹^[28]。

2 靶标确证

针对上述几类 MmpL3 抑制剂的作用机制研究, MmpL3 作为 TMM 转运蛋白的功能逐渐被发现与揭示。

**Figure 7** The structure of C215**Figure 6** SAR analysis of 1,5-diphenyl pyrrole inhibitors

Mtb 的细胞壁含有丰富的脂质结构,使得分枝杆菌可以存活于严酷的环境并抵抗宿主的免疫反应^[29];其核心层霉菌酸-阿拉伯半乳聚糖-肽聚糖复合物 (mycolic acid-arabinogalactan-peptidoglycan complex, MAPc)^[30]对维持细胞的活性有重要作用^[31](图 8);研究还表明霉菌酸与 Mtb 的毒性有关^[32]。霉菌酸的生物合成途径较为复杂,由多功能的I型脂肪酸合成酶 (FAS-I) 和多酶复合物的II型脂肪酸合成酶 (FAS-II) 共同完成^[33,34]。霉菌酸可以键合到海藻糖二糖的 6-羟基上形成 TMM^[35]。TMM 是海藻糖二霉菌酸酯 (trehalosedimycolate, TDM) 和其他细胞壁上的霉菌酸酯的前体化合物。

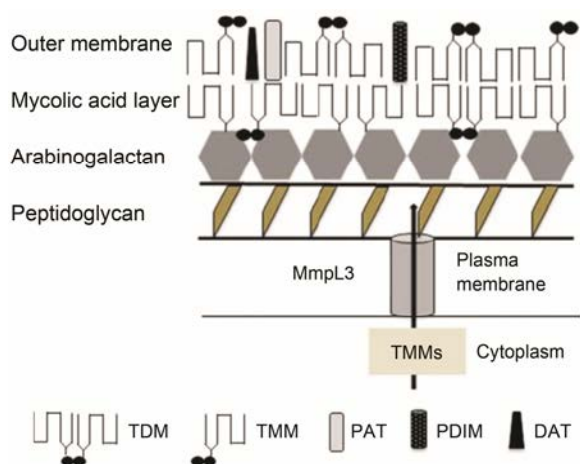


Figure 8 Schematic representation of the mycobacterial cell wall

TMM 从胞浆内转运到周质边缘需要跨膜蛋白 MmpL3 的参与^[36, 37]。MmpL3 属于分枝杆菌膜蛋白大家族, MmpL 蛋白则属于抗瘤细胞分裂 (resistance-nodulation-cell division, RND) 蛋白超家族^[38]。Mtb 中有 13 种 RND 蛋白, 即 13 种 MmpL 蛋白, 分子质量在 100~122 kDa 之间^[29]。研究发现 Mtb 编码的 13 种 MmpL 蛋白中只有 MmpL3 是维持 Mtb 活性所必需的, 它调节 TMM 的跨膜转运。因此, 抑制 MmpL3 靶标可以阻断 TMM 的跨膜转运, 从而阻碍 Mtb 细胞

壁的形成, 达到抑制 Mtb 的目的。

在对上述几类化合物的耐药突变菌株进行全基因测序^[39]时发现 mmpL3 基因发生点突变。自发的耐药菌株在接受药物治疗时趋向于在 MmpL3 蛋白处发生突变以此缓解抑制剂的早期毒性效应。这些突变株均显示了中等程度的耐药性: BM212、AUs、SQ109、吡啶-2-甲酰胺类抑制剂和 THPPs 的 MIC 值分别增加了 16~33 倍、8 倍、4~8 倍、4~122 倍和 8~70 倍^[40]。

用 1x、5x 和 10x MIC 浓度的上述几类抑制剂处理 Mtb 时, 尽管细胞内霉菌酸酯的总量没有发生变化, 但是霉菌酸酯的亚细胞分布发生变化。上述几类化合物处理的 Mtb 细胞中, TDM 与嵌合到细胞壁阿拉伯半乳聚糖上的霉菌酸酯的数量都有明显下降, 同时可以观察到细胞内 TDM 前体 TMM 数量的增加。这说明上述化合物并不抑制霉菌酸酯的生物合成, 而是抑制 TMM 的转运过程。最近研究提出: 上述几类化合物抑制 TMM 的转运是通过一个间接的过程。BM212、THPPs、吡啶-2-甲酰胺类^[41]、AUs^[42]和 SQ109 影响跨膜质子浓度 (ΔpH) 和膜电位 ($\Delta\psi$) 中一种或者两种, 从而驱散 PMF, 进而抑制 MmpL3 调节的转运过程^[10]。SQ109 不但作为解偶联剂驱散质子泵, 同时抑制涉及维生素 K2 和 ATP 合成的酶^[43](图 9)。但为何自发的耐药突变映射到 mmpL 基因, 这一问题仍没有答案, 有待进一步的研究加以揭示。

3 总结与展望

2012 年 FDA 批准了近 40 年来的首个抗 TB 新药 贝达喹啉用于治疗成人多重耐药结核, 这标志着人类在与 MDR-TB 及 XDR-TB 的抗争中迈出了重要的一步, 但目前的形势依然严峻。

MmpL3 靶标是近年来最为成功的抗 TB 靶标之一, 多方的研究成果提供了一系列化学骨架不同的候选药物。这些 MmpL3 抑制剂不但化学结构新颖, 同时具有完全不同于传统抗 TB 药物的作用机制, 对 DS-TB、MDR-TB、XDR-TB 均呈现出很好的活性; 但现有化合物同时也存在着诸如脂水分配系数较高

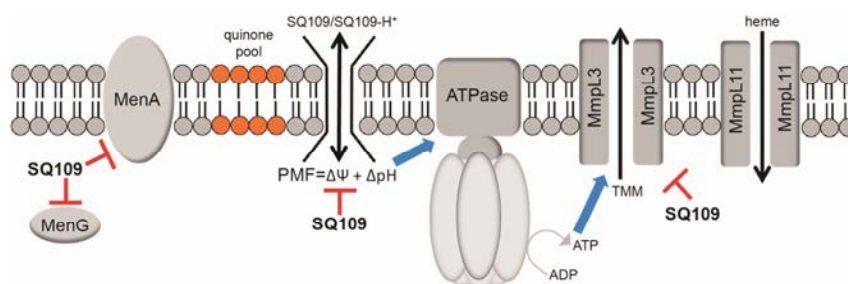


Figure 9 MOA of SQ109

($\text{clog}P > 4.2$)、溶解度较低等药代性质方面的缺陷。目前还没有任何研究团队解析出 MmpL3 蛋白的完整晶体结构, 这给基于理性的方法设计 MmpL3 抑制剂带来了一定的困难。

未来的研究取决于结构生物学的突破, 如能解析出 MmpL3 蛋白结构, 药化工作者可运用更多的技术手段合理地先导物进行结构修饰, 改善现有的 MmpL3 抑制剂的药代性质, 有望促进该类抑制剂的早日上市, 为 TB 患者带来更多、更好的用药选择。

References

- [1] Global tuberculosis report 2015 [M]. 20th ed. World Health Organization, 2015: 1–3.
- [2] Cooper CB. Development of *Mycobacterium tuberculosis* whole cell screening hits as potential antituberculosis agents: miniperspectives series on phenotypic screening for anti-infective targets [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 7755–7760.
- [3] Quy H, Lönnroth K, Lan N, et al. Treatment results among tuberculosis patients treated by private lung specialists involved in a public-private mix project in Vietnam [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7: 1139–1146.
- [4] Goldberg DE, Siliciano RF, Jacobs WR. Outwitting evolution: fighting drug-resistant TB, malaria, and HIV [J]. *Cell*, 2012, 148: 1271–1283.
- [5] Zumla A, Abubakar I, Raviglione M, et al. Drug-resistant tuberculosis—current dilemmas, unanswered questions, challenges, and priority needs [J]. *J Infect Dis*, 2012, 205 (suppl 2): S228–S240.
- [6] Rivers EC, Mancera RL. New anti-tuberculosis drugs in clinical trials with novel mechanisms of action [J]. *Drug Discov Today*, 2008, 13: 1090–1098.
- [7] Lee RE, Protopopova M, Crooks E, et al. Combinatorial lead optimization of [1, 2]-diamines based on ethambutol as potential antituberculosis preclinical candidates [J]. *J Comb Chem*, 2003, 5: 172–187.
- [8] Tahlan K, Wilson R, Kastrinsky DB, et al. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chem*, 2012, 56: 1797–1809.
- [9] Sacksteder KA, Protopopova M, Barry CE, et al. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action [J]. *Future Microbiol*, 2012, 7: 823–837.
- [10] Poce G, Consalvi S, Biava M. MmpL3 inhibitors: diverse chemical scaffolds inhibit the same target [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16: 1274–1283.
- [11] Bogatcheva E, Hanrahan C, Nikonenko B, et al. Identification of SQ609 as a lead compound from a library of dipiperidines [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 5353–5357.
- [12] Li K, Schurig-Briccio LA, Feng X, et al. Multitarget drug discovery for tuberculosis and other infectious diseases [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 3126–3139.
- [13] Collins L, Franzblau SG. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* [J]. *Antimicrob Agents Chem*, 1997, 41: 1004–1009.
- [14] Onajole OK, Pieroni M, Tipparaju SK, et al. Preliminary structure-activity relationships and biological evaluation of novel antitubercular indolecarboxamide derivatives against drug-susceptible and drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 4093–4103.
- [15] Kondreddi RR, Jiricek J, Rao SP, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of indole-2-carboxamides: a promising class of antituberculosis agents [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 8849–8859.
- [16] Stec J, Onajole OK, Lun S, et al. Indole-2-carboxamide-based MmpL3 inhibitors show exceptional antitubercular activity in an animal model of tuberculosis infection [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 6232–6247.
- [17] Brown JR, North EJ, Hurdle JG, et al. The structure activity relationship of urea derivatives as anti-tuberculosis agents [J]. *Bioorg Med Chem*, 2011, 19: 5585–5595.
- [18] Scherman MS, North EJ, Jones V, et al. Screening a library of 1600 adamantyl ureas for anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity *in vitro* and for better physical chemical properties for bioavailability [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20: 3255–3262.
- [19] Deidda D, Lampis G, Fioravanti R, et al. Bactericidal activities of the pyrrole derivative BM212 against multidrug-resistant and intramacrophagic *Mycobacterium tuberculosis* strains [J]. *Antimicrob Agents Chem*, 1998, 42: 3035–3037.
- [20] Wang H, Wen H, Cui HQ, et al. Synthesis and anti-tubercular activity of 1-(2-adamantyl)-3-(2,3,4-trifluorophenyl)urea derivatives [J]. *Chin J Med Chem(中国药物化学杂志)*, 2016, 26: 280–287.
- [21] Remuiñán MJ, Pérez-Herrán E, Rullás J, et al. Tetrahydropyrazolo [1,5-a] pyrimidine-3-carboxamide and *N*-benzyl-6',7'-dihydrospiro [piperidine-4,4'-thieno[3,2-c]pyran] analogues with bactericidal efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* targeting MmpL3 [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e60933.
- [22] Yokokawa F, Wang G, Chan WL, et al. Discovery of tetrahydropyrazolopyrimidine carboxamide derivatives as potent and

- orally active antitubercular agents [J]. ACS Med Chem Lett, 2013, 4: 451–455.
- [23] Poce G, Bates RH, Alfonso S, et al. Improved BM212 MmpL3 inhibitor analogue shows efficacy in acute murine model of tuberculosis infection [J]. PLoS One, 2013, 8: e56980.
- [24] Biava M, Porretta GC, Poce G, et al. Antimycobacterial agents. Novel diarylpyrrole derivatives of BM212 endowed with high activity toward *Mycobacterium tuberculosis* and low cytotoxicity [J]. J Med Chem, 2006, 49: 4946–4952.
- [25] Biava M, Porretta GC, Poce G, et al. Identification of a novel pyrrole derivative endowed with antimycobacterial activity and protection index comparable to that of the current antitubercular drugs streptomycin and rifampin [J]. Bioorg Med Chem, 2010, 18: 8076–8084.
- [26] Rullas J, García JI, Beltrán M, et al. Fast standardized therapeutic-efficacy assay for drug discovery against tuberculosis [J]. Antimicrob Agents Chem, 2010, 54: 2262–2264.
- [27] Stanley SA, Grant SS, Kawate T, et al. Identification of novel inhibitors of *M. tuberculosis* growth using whole cell based high-throughput screening [J]. ACS Chem Biol, 2012, 7: 1377–1384.
- [28] Stanley SA, Grant SS, Kawate T, et al. Identification of novel inhibitors of *M. tuberculosis* growth using whole cell based high-throughput screening [J]. ACS Chem Biol, 2012, 7: 1377–1384.
- [29] Rayasam GV. MmpL3 a potential new target for development of novel anti-tuberculosis drugs [J]. Expert Opin Ther Target, 2014, 18: 247–256.
- [30] Yamaryo-Botte Y, Rainczuk AK, Lea-Smith DJ, et al. Acetylation of trehalose mycolates is required for efficient MmpL-mediated membrane transport in corynebacterineae [J]. ACS Chem Biol, 2014, 10: 734–746.
- [31] Kaur D, Guerin ME, Škovierová H, et al. Biogenesis of the cell wall and other glycoconjugates of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Adv Appl Microbiol, 2009, 69: 23–78.
- [32] Vander Beken S, Al Dulayymi J a R, Naessens T, et al. Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern [J]. Eur J Immunol, 2011, 41: 450–460.
- [33] Schweizer E, Hofmann J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68: 501–517.
- [34] Nataraj V, Varela C, Javid A, et al. Mycolic acids: deciphering and targeting the Achilles' heel of the tubercle bacillus [J]. Mol Microbiol, 2015, 98: 7–16.
- [35] Nobre A, Alarico S, Maranha A, et al. The molecular biology of mycobacterial trehalose in the quest for advanced tuberculosis therapies [J]. Microbiology, 2014, 160: 1547–1570.
- [36] Varela C, Rittmann D, Singh A, et al. MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in mycobacteria and corynebacteria [J]. Chem Biol, 2012, 19: 498–506.
- [37] Belardinelli JM, Yazidi A, Yang L, et al. Structure-function profile of MmpL3, the essential mycolic acid transporter from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. ACS Infect Dis, 2016, 2: 702–713.
- [38] Domenech P, Reed MB, Barry CE. Contribution of the *Mycobacterium tuberculosis* MmpL protein family to virulence and drug resistance [J]. Infect Immun, 2005, 73: 3492–3501.
- [39] Goldman RC. Why are membrane targets discovered by phenotypic screens and genome sequencing in *Mycobacterium tuberculosis*? [J]. Tuberculosis, 2013, 93: 569–588.
- [40] Li W, Upadhyay A, Fontes FL, et al. Novel insights into the mechanism of inhibition of MmpL3, a target of multiple pharmacophores in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chem, 2014, 58: 6413–6423.
- [41] Lun S, Guo H, Onajole OK, et al. Indoleamides are active against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Nat Commun, 2013, 4: 2907.
- [42] Grzegorzewicz AE, Pham H, Gundi VA, et al. Inhibition of mycolic acid transport across the *Mycobacterium tuberculosis* plasma membrane [J]. Nat Chem Biol, 2012, 8: 334–341.
- [43] Foss MH, Pou S, Davidson PM, et al. Diphenylether-modified 1, 2-diamines with improved drug properties for development against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. ACS Infect Dis, 2016, 2: 500–508.