

二氢叶酸还原酶抑制剂在肿瘤和细菌感染治疗中的研究进展

陈灿彤, 黄 蕾, 关霁晨, 来芳芳*

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

摘要: 二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 是治疗肿瘤、细菌感染和寄生虫感染的广为人知的关键靶点。DHFR 在细胞 DNA 生物合成中发挥重要作用, 其抑制剂通过抑制底物与 DHFR 结合, 干扰一碳代谢, 从而抑制细胞增殖。DHFR 抑制剂的研究从 20 世纪 40 年代持续至今, 已有多种 DHFR 抑制剂上市, 主要用于抗肿瘤、抗菌、抗寄生虫和抗炎的治疗。本文以单靶点和双靶点为分类依据综述了近年来具有抗肿瘤或抗菌作用的 DHFR 抑制剂的研究进展, 并展望了该领域研究所面临的机遇与挑战。

关键词: 二氢叶酸还原酶; 抗肿瘤; 抗细菌感染; 双靶点; 二氢叶酸还原酶抑制剂

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-2952-09

Research advances on dihydrofolate reductase inhibitors in the treatment of tumors and bacterial infections

CHEN Can-tong, HUANG Lei, GUAN Ji-chen, LAI Fang-fang*

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

Abstract: Dihydrofolate reductase (DHFR) is a well-known key target in the treatment of tumors, bacterial infections, and parasitic infections; and it plays a critical role in the biosynthesis of cellular DNA. DHFR inhibitors interfere with one-carbon metabolism by inhibiting substrate binding to DHFR, thereby inhibiting cell proliferation. Research on DHFR inhibitors has continued since the 1940s. To date, a variety of DHFR inhibitors have come into the market, primarily used for anti-tumor, antibacterial, antiparasitic, and anti-inflammatory therapy. This review summarizes the research progress of DHFR inhibitors with antitumor or antibacterial effects in recent years based on the classification of single-target and dual-target and looks forward to the opportunities and challenges faced by the work in this field.

Key words: dihydrofolate reductase; anti-tumor; antibacterial; dual-target; dihydrofolate reductase inhibitor

二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 普遍存在于所有生物中, 是一种利用还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 将体内叶酸 (dihydrofolate, FA) 或二氢叶酸 (dihydrofolate, DHF) 还原为四氢叶酸 (tetrahydrofolate, THF), 从而调节 THF 再生的生物

所需的重要氧化还原酶。自 20 世纪中叶以来, DHFR 作为治疗靶点的潜力已得到证实, 近年来的研究趋势表明, DHFR 是治疗多种疾病的一个优良靶点, 在发现和设计新药方面将继续受到重视。

目前已上市的 DHFR 抑制剂 (表 1) 在抗肿瘤、抗菌、抗疟原虫及其他原生动物的广泛应用中。甲氨蝶呤 (methotrexate, MTX, 表 1) 以高亲和力结合并抑制 DHFR, 从而抑制 THF 生成, 干扰胸腺嘧啶核苷酸及腺嘌呤核苷酸的合成, 阻断 DNA 和 RNA 生物合成, 达到抗肿瘤效果。甲氧苄啶 (trimethoprim, TMP, 表 1) 为选

收稿日期: 2023-03-17; 修回日期: 2023-05-17.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173854).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165207, E-mail: laifangfang@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0320

择性抑制细菌 DHFR 的广谱抗菌剂, 可与抑制二氢蝶酸合酶 (dihydropteroate synthase, DHPS) 的磺胺类药物, 如磺胺甲噁唑 (sulfamethoxazole, SMZ) 等联用, 抑制细菌叶酸合成代谢通路。乙胺嘧啶 (pyrimethamine, Pyr, 表 1) 对弓形虫和疟原虫的 DHFR 有较高亲和力, 可以抑制叶酸合成, 是一种用于预防和治疗弓形虫病和疟疾的抗寄生虫药物。此外, 以 MTX 为代表的 DHFR 抑制剂也被用于治疗自身免疫性疾病, 如类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 和银屑病。

然而, 已上市的 DHFR 抑制剂虽然已经相对成熟, 但也存在一些局限性, 如仅作用于单靶点导致的耐药性频发、某些药物溶解性或渗透性差及缺乏选择性导致的毒副作用等。抗微生物耐药性 (antimicrobial resistance, AMR) 对全球公共卫生的威胁越来越大, 根据世界卫生组织的统计, 每年约有 70 万人死于 AMR, 预计未来几年这一数字将迅速上升^[1], 而单靶点抗生素的使用正是造成 AMR 频率加快的原因之一。在肿瘤治疗中, 靶向叶酸代谢通路的抑制剂通常具有较高的细胞毒性, 因此需要联合治疗来降低毒性或在低剂量下获得高疗效, 如果单一抑制剂的剂量过高, 会产生让患者无法忍受的毒副作用^[2]。双靶点抑制剂在应对这些问题中显示出巨大潜力, 它可以增加靶点的命中率并提高疗效, 扩大治疗窗口以降低毒性反应。此外, 肿瘤细胞或细菌在 DHFR 抑制剂的诱导下发生代偿性改变时, 双靶点抑制剂可以有效延缓耐药的发生。本文简单归纳了目前已上市的 DHFR 抑制剂, 以单靶点和双靶点为分类依据综述了近年来具有抗肿瘤或抗菌作用的 DHFR 抑制剂的研究进展, 并展望了该领域的研究工作所面临的机遇与挑战。

1 DHFR 与叶酸代谢

DHFR 分子质量为 18~25 kDa, 是一种相对较小的水溶性蛋白^[3]。迄今为止, 蛋白质数据库 (protein data bank, PDB) 已经收集了 500 多个从真核生物和原核生物获得的单独或与不同配体复合的 DHFR 结构。通过对不同生物 DHFR 的氨基酸序列进行比对, 科学

家发现了一系列严格保守的氨基酸残基, 其中大部分残基在催化机制中发挥着重要作用, 几乎所有残基都参与构成底物或辅酶结合位点。研究者也发现不同 DHFR 物种之间的同源性相当低 (小于 30%), 但同时具有很高的结构相似性^[3], 因此其活性位点腔内的轻微结构差异可能导致物种特异性抑制^[4]。DHFR 的三级结构由一个 β 折叠主导, 它包含 7 条平行 β 链和 1 条反平行 β 链^[5], 所有酶亚型都包含至少 4 个 α -螺旋, 其中一个构成底物结合位点, 还有两个组成辅酶的结合位点^[3]。Met20 环 (与人 DHFR 中的 Leu22 环等效) 是 DHFR 的一个重要结构, 它有利于稳定 NADPH 的烟酰胺环, 从而促进氢化物从 NADPH 转化为 DHF, 并且能够打开、关闭或封闭酶的活性位点^[6]。在大肠杆菌 DHFR 中, 可以观察到等效的 Met20 环构象在催化过程中配体结合阶段的开放、闭合或封闭^[7], 而人和其他所有脊椎动物 DHFR 结构的 Leu22 环则处于关闭的构象中, 这一事实表明大肠杆菌与人 DHFR 采用不同的动力学机制^[8]。在原生动物寄生虫中, DHFR 和胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TS) 以双功能酶 DHFR-TS 的形式表达, 而在其他生物体中它们以单独的蛋白质形式表达, 有证据显示弓形虫 DHFR 活性位点口袋中的疏水环境可用于药物设计, 以提高抗叶酸抑制剂的效力和选择性^[7]。

FA 是一种水溶性 B 族维生素, 又称维生素 M, 由喋啶环、对氨基苯甲酸和谷氨酸残基组成, 在 DNA 合成与甲基化、蛋白质代谢、红细胞生成和成熟等环节中十分重要, 其缺失会抑制细胞生长和增殖^[9]。大多数细菌、酵母和植物具有内源性叶酸生物合成途径, 而哺乳动物没有从头合成叶酸的能力, 需要通过膳食摄入 FA^[10]。摄入的 FA 本身不具有生物活性, 通过 DHFR 的两次催化作用先还原为 DHF, 再转化为体内活性形式 THF, 作为底物参与叶酸循环代谢。叶酸代谢支持着用于激活和转移生物合成过程中一碳单位的一碳代谢^[11]。与 THF 结合的一碳单位可以处于不同的氧化状态: 5,10-亚甲基四氢叶酸 (5,10-methylene-THF)、

Table 1 DHFR inhibitors on the market. DHFR: Dihydrofolate reductase; TS: Thymidylate synthase

Generic name	Company	Target	Main indication
Methotrexate	Antares Pharma	DHFR, TS, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase	Rheumatoid arthritis, psoriasis, lymphoblastic leukemia, other types of lymphoma and solid malignancy
Pemetrexed	Eli Lilly and Company	DHFR, TS, glycinamide ribonucleotide formyltransferase	Mesothelioma, non-small cell lung cancer
Pralatrexate	Acrotech Biopharma Llc	DHFR, TS	Peripheral T-cell lymphoma
Trimetrexate	Medimmune Oncology Inc	DHFR	<i>Pneumocystis carinii</i> pneumonia
Trimethoprim	Monarch Pharmaceuticals Llc	DHFR	Bacterial infection
Brodinoprim	Helsinn	DHFR	Bacterial infection
Pyrimethamine	Vyera Pharmaceuticals Llc	DHFR	Malaria, toxoplasmosis
Proguanil	Ayerst Laboratories	DHFR	Malaria

5-甲基四氢叶酸 (5-methyl-THF) 和 10-甲酰基四氢叶酸 (10-formyl-THF) 之间相互转换, 它们各自支持不同的生物功能^[12], 对胸苷酸、氨基酸和嘌呤的从头合成至关重要^[13](图 1)。丝氨酸、甘氨酸和肌氨酸等来源的一碳单位在丝氨酸羟甲基转移酶 (serine hydroxymethyltransferase, SHMT) 作用下通过与 THF 分子 5 和 10 位氮原子共价结合形成 5,10-methylene-THF, 进入叶酸循环^[10]。TS 通过 5,10-methylene-THF 依赖性反应将脱氧尿苷一磷酸 (deoxyuridine monophosphate, dUMP) 转化为脱氧胸苷一磷酸 (deoxythymidine monophosphate, dTMP), 同时得到 DHF, SHMT 使用 5,10-methylene-THF 将丝氨酸转化为甘氨酸^[14], 5,10-methylene-THF 通过亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 的 NADPH 依赖性反应产生 5-methyl-THF, 并被钴胺素依赖性蛋氨酸合酶消耗生成甲硫氨酸参与甲硫氨酸循环^[10]。此外, 5,10-methylene-THF 还通过亚甲基四氢叶酸脱氢酶 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, MTHFD) 的作用得到 10-formyl-THF, 10-formyl-THF 参与嘌呤合成, 同时也能不可逆地氧化为 CO₂, 产生 NADP 还原当量, 有研究表明叶酸介导的 NADPH 产生可能在线粒体氧化还原稳态中尤为重要^[15]。

2 用于抗肿瘤的 DHFR 抑制剂

2.1 作用于单靶点的抗肿瘤 DHFR 抑制剂

叶酸类似物 MTX 是目前作为抗癌药物应用得最广泛的 DHFR 抑制剂, 用于白血病治疗时, 大剂量的 MTX 会导致 FA 缺乏进而抑制嘌呤和嘧啶的从头合成, 导致循环白细胞的减少^[16]。MTX 疗效受到与剂量有关的毒副作用和抗性发展的限制, 缺乏肿瘤选择性也导致了该药物的使用局限性。因此, Woźniak 等^[17]

设计了肿瘤靶向 MTX 递送系统来解决这些限制因素, 以提高 MTX 的安全性和疗效。相较于正常细胞, 新生肿瘤细胞对葡萄糖 (glucose, GLU) 的摄入量升高, 这有赖于葡萄糖转运体 (glucose transporters, GLUTs) 的过度表达^[18]。将 GLU、连接体和 MTX 通过易受水解酶作用的可裂解键连接合成 GLU-MTX 偶联物, 该偶联物对乳腺癌、肺癌和结直肠癌等 5 种癌细胞系有很强的细胞毒作用, 而对健康成纤维细胞没有影响。在肿瘤微环境中 GLU-MTX 显示出增强的选择性^[19], 与未结合的 MTX 相比, 该偶联物的摄取量增加了 17 倍。GLU-MTX 也引起了乳腺癌小鼠体内肿瘤生长的明显延迟。此外, 一种 GLUT1 抑制剂显著干扰了 GLU-MTX 诱导的生长抑制, 这表明 GLU 介导该药物的摄取。

Liang 等^[20]合成了一系列由 MTX 类似物衍生的 DHFR 抑制剂作为放疗增敏剂。选出其中具有最强 DHFR 抑制作用的化合物作为放疗增敏剂与 X 射线放疗相结合处理肿瘤细胞, 结果表明该组合对宫颈癌细胞的抗增殖活性比单独用药或单独用 X 射线治疗要突出得多, 同时该化合物显示出比 MTX 更高的选择性和放射增敏作用。体外实验显示, 该化合物与 X 射线的组合通过激活 caspase-8、9 和 3 以及活性氧 (reactive oxygen, ROS) 介导的线粒体功能紊乱引发细胞凋亡, 且该组合明显抑制了 HeLa 细胞的迁移能力。体内抗肿瘤效果表明, 该组合有效地抑制了肿瘤的生长, 同时没有引起明显的不良反应。

2021 年, Ewida 等^[21]报道了一系列新的噻唑类化合物, 其中最优秀的化合物表现出与 MTX 相当的对 DHFR 的强效抑制作用, 它对 MCF7 乳腺癌细胞系显示出很好的细胞毒性, 可以诱导细胞周期停滞和细胞凋亡。此外, 与对照组相比, 在小鼠乳腺接种埃利希腹

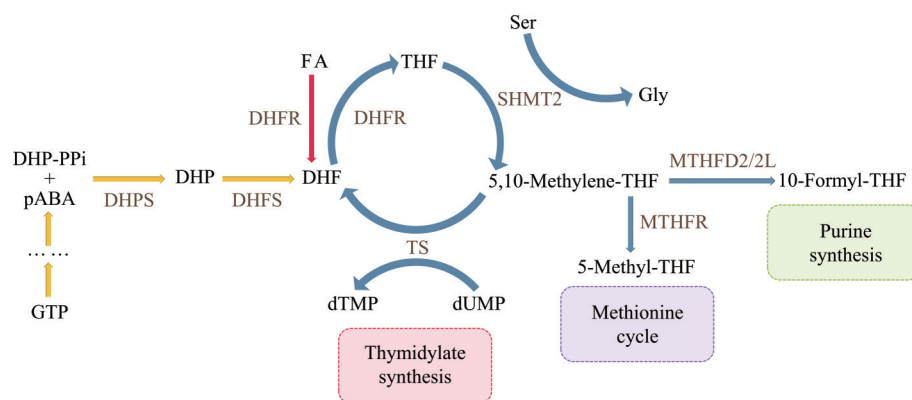


Figure 1 An overview of folate metabolism in humans (red and blue arrows) and bacteria (yellow and blue arrows). Enzymes are shown in brown. GTP: Guanosine triphosphate; DHP-PPi: Dihydropteridine phosphate; DHP: Dihydropteroate; pABA: p-Aminobenzoic acid; DHPS: Dihydropteroate synthase; DHFS: Dihydrofolate synthase; SHMT2: Serine hydroxymethyl transferase 2; Ser: Serine; Gly: Glycine; THF: Tetrahydrofolate; dUMP: Deoxyuridine monophosphate; dTMP: Deoxythymidine monophosphate; MTHFD2/2L: Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2/2-like; MTHFR: Methylenetetrahydrofolate reductase

水癌实体瘤的动物模型中, 该化合物显示出显著降低体重和肿瘤体积的潜力。

中药中用于治疗癌症的最著名的中草药之一是紫草科的紫草, 其根提取物紫草素已被证明具有抗病毒、抗微生物和抗肿瘤作用, 一些研究表明紫草素对胃癌、乳腺癌、黑色素瘤和急性髓细胞性白血病有不同程度的抑制作用并诱导凋亡^[22], 然而紫草素作用于肿瘤细胞的具体机制仍不明晰。Wang等^[23]首次描述了乙酰紫草素抑制DHFR的能力, 乙酰紫草素对重组hDHFR的直接酶抑制IC₅₀在微摩尔水平, 与抑制体外癌细胞生长的浓度在同一数量级。研究还发现, 乙酰紫草素可以通过caspase-3激活诱导肿瘤细胞凋亡, 还可以下调控制癌症生长和进展的关键介质, 如HER2、Src和STAT3。此外, 乙酰紫草素能延迟Δ16HER2转基因小鼠中的原位乳腺癌的发生, 减小肿瘤体积。

2.2 作用于双靶点或多靶点的抗肿瘤DHFR抑制剂

2.2.1 DHFR/TS

探索开发多靶点药物是一种有吸引力的替代联合疗法, 特别是用于治疗癌症等复杂疾病。TS是关键的叶酸依赖性酶, 催化胸苷酸从头生物合成的最后阶段, 抑制癌细胞中的TS可以阻断DNA生物合成并导致细胞死亡^[24]。DHFR与TS偶联参与原核细胞和真核细胞中细胞增殖原料(如dTMP)的合成, 因此, 同时抑制DHFR和TS可以增强抗癌药物的活性。Tian等^[25]设计和合成了一系列新的6-取代吡咯并嘧啶类似物, 对6种癌细胞系的生物活性评估结果表明大多数化合物表现出微摩尔级别的抗增殖效力。活性最强的化合物可显著影响肿瘤细胞的细胞周期分布, 并在一定程度上诱导G2/M期阻滞, 在100 μmol·L⁻¹时该化合物对DHFR的抑制率为66.7%, 随后靶向酶的鉴定实验提示该化合物的抗增殖活性可能通过对TS和DHFR的双重抑制起作用。

2.2.2 DHFR/TrxR

硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)是控制细胞的氧化还原平衡的关键酶之一, 有助于细胞的生长和生存。在肿瘤细胞中, 过表达的TrxR会导致细胞异常增生和凋亡障碍, 促进肿瘤耐药发生。抑制TrxR可以使细胞内ROS的积累, 进而发挥细胞毒性作用。Gambini等^[26]合成了两种金(I)咪唑/膦配合物, 它们对人MDA-MB-231细胞和鼠A17细胞具有显著的抑制活性, 能够以剂量依赖的方式降低细胞活力, IC₅₀值在低微摩范围内。在小鼠A17移植瘤模型中, 两种化合物具有很好的抗癌效果, 与同为金属基药物的顺铂相比, 肾毒性更小。将2种化合物与3种乳腺癌细胞共孵育后, 所有肿瘤细胞系中的DHFR和TrxR酶活性都受到了强烈的抑制, 提示DHFR和TrxR可能是该化合物的潜在靶点^[27]。

2.2.3 DHFR/EGFR/HER2

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和人表皮生长因子受体-2(human epidermal growth factor receptor-2, HER2)具有酪氨酸激酶活性, 在许多癌细胞特别是乳腺癌、宫颈癌、结肠癌和肝癌细胞中过度表达, 因此学界普遍认为抑制EGFR和HER2在靶向治疗癌细胞方面有重要作用^[28,29]。达沙替尼是一种酪氨酸激酶抑制剂^[30], Sabry等^[31]对达沙替尼和含有噻唑的化合物进行了结构上的修改, 获得了新的具有预期多靶点抗癌活性的系列化合物。与索拉非尼相比, 6个化合物对测试的癌细胞系尤其是MCF-7显示出较好的抗癌活性, 且具有较高的安全性和选择性指数。对EGFR、HER2和DHFR多重抑制效果最好的化合物通过G1/S期的周期阻滞而不是坏死来诱导细胞毒性。体内抗乳腺癌研究显示, 随着体内凋亡生物标志物caspase-3免疫表达的恢复, 该化合物治疗组的肿瘤体积显著减小, 这表明治疗组的细胞凋亡可能是通过caspase依赖性途径引起的。

2.2.4 DHFR/TP

寄生虫与肿瘤细胞有许多共同的代谢途径, 这为将抗寄生虫药重新利用为抗肿瘤药奠定了基础。在已上市的DHFR抑制剂中, Pyr可以选择性作用于寄生虫DHFR, 在临床上被用于治疗原生动物的寄生虫引起的感染, 如疟疾和弓形虫病。然而近年来, 一些研究发现Pyr对癌细胞具有良好的选择性和细胞毒性, 可能有利于治疗不同类型的肿瘤, 如肝癌、肺癌、黑色素瘤、乳腺癌、卵巢癌和急性骨髓性白血病^[32]。Pyr通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期和破坏DNA发挥对肿瘤细胞的细胞毒作用, 在不同类型的癌症模型中, Pyr能抑制STAT3、NF-κB、DX2、MAPK和端粒酶等致癌蛋白的表达^[33]。胸苷磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP)是一种核苷代谢酶, 与肿瘤的迁移和侵袭有重要的联系, 相对于正常组织, TP在肿瘤组织中的表达升高^[34], 且TP低表达与延长患者生存期相关^[35]。有研究提出Pyr可以通过抑制肺癌细胞中hDHFR和TP, 进而抑制肺癌细胞的增殖、上皮-间充质转化、侵袭和转移^[36]。最近, 在一项I/II期临床试验中, Pyr治疗降低了慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia, CLL)患者肿瘤组织中STAT3特征基因的表达, 50%的复发性CLL患者在服用Pyr后病情稳定^[37]。目前研究Pyr抗肿瘤作用的临床试验还处于初级阶段, 未来还需要更多的临床前和临床研究将Pyr作为抗癌药物推广到临床治疗领域。

3 用于抗细菌感染的DHFR抑制剂

3.1 作用于单靶点的抗菌DHFR抑制剂

3.1.1 针对普通细菌的单靶点抗菌DHFR抑制剂 MTX

是临床上广泛应用的抗肿瘤 DHFR 抑制剂, 但它在酶抑制实验中对细菌 DHFR 有更高效力^[38]。然而, 由于 MTX 靶向性缺乏及细菌细胞壁的存在, MTX 对人类细胞的细胞毒性和对细菌的低渗透性使其不适合作为安全有效的抗菌药物使用。铁载体是微生物分泌的一种低分子量铁螯合因子, 通过受体介导的主动摄取机制从环境中获取铁离子。Zhao 等^[39]将这种高效的细菌靶向载体与 MTX 偶联, 实现了细菌内的 MTX 积累从而有效抑制了细菌生长, 同时降低对正常人类细胞的细胞毒性。此外, 由于不同的细菌分泌并识别不同的铁载体, 这一偶联策略可以实现对不同细菌的选择性, 有利于减缓细菌耐药性的传播^[40]。

Yang 等^[41]报道了一种结核分枝杆菌 DHFR (*M. tuberculosis* DHFR, Mtb DHFR) 抑制剂 TA-C, 它对酶仅表现出适度的抑制活性, IC_{50} 约为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 然而, TA-C 对细胞具有显著的抗菌活性 ($MIC_{50} = 10\sim 20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。后续研究表明, 在细胞内 TA-C 不仅靶向 DHFR 发挥抑制作用, 而且以前药形式被多个 Mtb F₄₂₀ 依赖性氧化还原酶还原为 TA-C-acid^[42]。TA-C-acid 对 Mtb DHFR 的 IC_{50} 相较于前药提高了 100 倍, 约为 $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但对于细胞的抗菌活性有所下降。TA-C 的这种多靶点特性和可以被多个酶转化的前药属性使之在缓解耐药性方面颇具前景。

3.1.2 针对耐药细菌的单靶点抗菌 DHFR 抑制剂 抗菌药耐药性的迅速产生和传播降低了许多曾经可靠的治疗方法的疗效, 已经成为治疗细菌感染的一个重要威胁。L28R 是大肠杆菌 DHFR 基因 *folA* 中最常见的耐药突变之一, L28R 突变在增加 DHF 亲和力的同时降低了 TMP 亲和力, 是对 TMP 耐药性形成最有利的基因突变, 它为导致耐药性的多种进化轨迹提供了可能。4'-DTMP 可以抑制 DHFR 及其 L28R 变体, 抗生素敏感的大肠杆菌在 4'-DTMP 选择下获得抗性的速度比在 TMP 选择下慢得多, 此外 4'-DTMP 通过选择具有 L28R 突变的抗性基因型并将遗传轨迹转移到其他具有催化缺陷的抗性 DHFR 突变来阻碍抗性的进化^[43]。

Zhang 等^[44]应用综合的计算和实验方法发现了一种新的化合物 CD15-3, 它能抑制大肠杆菌 DHFR 的野生型 (wild type, WT) 和 TMP 抗性突变体 L28R、P21L 和 A26T。在体外进化实验中, TMP 抗性迅速出现并导致菌株 IC_{50} 有 8~200 倍的提升, 而 CD15-3 诱导下大肠杆菌进化出的 IC_{50} 仅比 WT 大 2.7 倍。CD15-3 耐药菌株的全基因组序列分析显示, 大肠杆菌中编码 DHFR 的 *folA* 基因座没有突变, 几个外排泵的基因复制是导致对 CD15-3 产生适度抗性的原因。

金葡菌对 TMP 的耐药性主要是通过内源性 TMP

敏感染色体 DHFR 基因 *dfrB* 的点突变和获得先天耐药的质粒 DHFR 基因 *dfrA* 两种机制实现的^[45,46], 另外两个质粒编码的 DHFR 耐药基因 *dfrG* 和 *dfrK* 也会导致抗性发生, *dfrG* 是主要的耐药性决定因素^[47]。新的 DHFR 抑制剂对野生型和突变型金葡菌表现出强的细胞活性, 对野生型的 MIC 值小于 $0.001 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对 3 种临床分离的 TMP 耐药的耐甲氧西林的金葡菌的 MIC 值分别为 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (*dfrA*)、 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (*dfrG*) 和 $0.312 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (*dfrK*), 该化合物对细菌野生型和 TMP 耐药突变型酶也表现出低纳摩尔级的酶活性^[38], 是一个有前景的苗头化合物。

Iclaprim 是由罗氏研发的一种小分子 DHFR 抑制剂, 以类似于 TMP 的方式结合并抑制细菌 DHFR, 在亚微摩尔浓度下特异性和选择性地抑制革兰阳性 (gram positive, G⁺) 和革兰阴性 (gram negative, G⁻) 菌的 DHFR, 而在超过 5 个数量级的高浓度下对 hDHFR 几乎没有抑制作用^[48]。与 TMP 相比, iclaprim 和 DHFR 之间更强的疏水相互作用导致两者亲和力增加, 使得其比 TMP 具有更强的活性, 并且与 TMP 不同, iclaprim 能够在纳摩尔级别抑制耐药酶, 从而克服染色体基因中点突变引起的 TMP 耐药^[49]。Iclaprim 在体外对主要的 G⁺ 病原体和一些 G⁻ 呼吸道病原体具有活性^[50], 其在体外血浆中的快速杀菌作用^[51] 有助于它被开发为单一疗法。同时, iclaprim 在体外也与磺胺类药物如磺胺甲噁唑和磺胺嘧啶表现出明显的协同作用^[52]。此外, 该药物在败血症、腹膜炎和肺炎的动物感染模型中显示出疗效^[53]。两项 II 期临床研究分别对疑似或确诊由 G⁺ 病原体引起的医院获得性肺炎 (hospital acquired pneumonia, HAP) 患者和复杂性皮肤和皮肤结构感染 (complicated skin and skin structure infections, cSSSI) 患者进行了 iclaprim 和万古霉素治疗评估, 两者临床治愈率和安全性相当^[54,55]。两项 III 期临床研究比较了 iclaprim 和利奈唑胺对 cSSSI 患者的临床治愈率, 分别为 82.2% 和 85.3%^[56]。随后两项 III 期临床研究比较了 iclaprim 和万古霉素在急性细菌性皮肤和皮肤结构感染 (acute bacterial skin and skin structure infections, ABSSSI) 患者中的疗效, iclaprim 和万古霉素的合并早期临床反应分别为 79.6% 和 78.8%, 表明与万古霉素相比, iclaprim 在治疗 ABSSSI 方面到达了非劣效性 (界值: 10%) 的主要终点^[57]。Iclaprim 的不良事件主要是恶心、腹泻和头痛, 目前的研究表明, 万古霉素相关的急性肾损伤的发生率在 5%~42%^[58], 用 iclaprim 替代万古霉素治疗 ABSSSI 可能会避免万古霉素相关的急性肾损伤^[59]。Iclaprim 目前正在开发中, 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 于

2015年授予 iclaprim 合格传染病产品和快速跟踪状态, 用于治疗 ABSSSI 和 HAP, 于2017年授予 iclaprim 治疗囊性纤维化患者金葡菌肺部感染的孤儿药地位, 于2019年提出需要额外的数据进一步评估 iclaprim 的肝脏毒性风险。

3.2 作用于双靶点的抗菌 DHFR 抑制剂

3.2.1 DHFR/细胞膜 双靶点药物在低治疗浓度下能达到较高的疗效, 同时能有效降低细菌的耐药频率, 因此许多研究都致力于开发双靶甚至多靶点抗生素。破坏细菌细胞膜和抑制细菌 DHFR 是抗菌药物常见的两种独立的作用机制, 而将这两种不同靶向的分子结合到同一化学骨架上可能获得比抗生素联合使用更强大的疗效。Martin 等^[60]表征了一种新化合物 SCH-79797, 它可以杀死 G⁺ 和 G⁻ 菌, 并且具有无法检测到的低耐药频率。进一步研究表明, SCH-79797 有两个独立的细胞靶点, 它通过抑制 DHFR 和破坏细胞膜完整性的双靶向作用机制表现出抗菌作用。IRS-16 是在 SCH-79797 分子核心的基础上开发的衍生物, 它的抗菌活性增强, 但对哺乳动物细胞系的毒性没有增加, 同时 IRS-16 在小鼠阴道感染模型中也显示出对淋病奈瑟菌的疗效。

3.2.2 DHFR/TS Li 等^[61]合成了一组 DHFR 和 TS 的双重抑制剂, 这些化合物对危及生命的耐药 G 病原体表现出非常强的抗菌活性, 在体外与 SMZ 杀灭 G 病原体表现出很强的协同作用, 代表性化合物 OYYF-175 在大肠杆菌引起的小鼠腹腔感染模型中有明显治疗效果。与结构相似的 SCH-79797 相比, OYYF-175 具有更强的大肠杆菌 DHFR 抑制作用和抗菌活性, 这可能是 OYYF-175 通过抑制同一途径中的两种酶而发挥协同作用引起的。

3.2.3 DHFR/DNA 回旋酶 DNA 回旋酶是一种广泛存在于细菌内的 II 型拓扑异构酶, 在哺乳动物细胞中不存在, 这使得该酶从选择性和毒性的角度成为开发潜在抗菌药物的理想靶标。DNA 回旋酶在 DNA 复制中有至关重要的作用, 负责 DNA 两条链的瞬时断裂, 以及在 DNA 中引入负超螺旋^[62]。Hassan 等^[63]探讨了一系列吡啶席夫碱化合物的免疫调节和体外抗菌活性, 其中最优秀的化合物对 G⁺ 菌、G⁻ 菌和真菌都具有良好的活性, 且对两种癌细胞系有较强的抗增殖作用。对 DHFR 和 DNA 回旋酶的酶测定结果显示, 该化合物对两种酶的抑制作用分别强于标准药物 TMP 和环丙沙星, 表明该化合物有希望通过更深入的研究成为新药开发的候选药物。

3.2.4 DHFR/COX-2 细菌感染引发的炎症反应是不可忽视的临床症状, 因此开发兼具抗炎和抗菌活性

的药物为细菌感染的治疗提供了新视野。环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 是非甾体类抗炎药 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 已知的靶点之一, Metwally 等^[64]开发的新化合物通过抑制 COX-2 和 DHFR 发挥抗炎和抗菌的双重作用。该化合物在卡拉胶诱导的大鼠足肿胀模型中表现出比参考药物塞来昔布更好的抗炎作用, 在体外对金葡菌和变形链球菌的抗菌效果强于氨苄西林。在 COX-2 和 DHFR 的直接酶抑制实验中, 该化合物表现出与标准药物相当或更优的 IC₅₀ 值, 提示该化合物有进一步开发的价值。

4 总结与展望

DHFR 是广泛生物体内存在的参与叶酸代谢的酶, 与嘌呤和嘧啶合成相关, 是许多疾病中经过充分验证的重要靶点。本文对近几年合成和开发的、在临床前研究和临床试验阶段的具有抗肿瘤或抗菌作用的 DHFR 抑制剂进行了介绍。人 DHFR 与细菌 DHFR 存在结构和序列上的差异, 利用这种差异设计有选择性的 DHFR 抑制剂, 降低对人体的毒副作用是提高选择性的方法之一。合理探索骨架和靶标的结构、修改现有的抑制剂以适应新用途是一种合成 DHFR 抑制剂的有效方法, 因此许多团队利用结构骨架设计了很多有效的化合物, 呈现出很好的体外和体内生物活性。

DHFR 抑制剂在临床广泛使用后耐药性问题日益严重, 因此急需针对耐药 DHFR 开发新的抑制剂。鉴于 TMP 是广泛应用的针对 DHFR 的抑制剂, 耐药频率高, 研发与 DHFR 结合特性和选择性优于现有抑制剂、对耐药 DHFR 有良好抑制作用、在体外和体内都有良好的增殖抑制活性的 DHFR 抑制剂的需求十分迫切。Iclaprim 是针对 TMP 耐药的金葡菌 DHFR 设计的新型 DHFR 抑制剂, 它对野生型和耐药型 DHFR 都有强大的抑制作用, 目前已完成 III 期临床试验, 未来可能用于治疗细菌和皮肤结构感染。

联合药物治疗或序贯治疗有助于耐药性频发的细菌感染和寄生虫感染的临床治疗, 然而联合用药存在不确定的药物相互作用, 可能增加治疗的潜在风险。以低药物浓度和长细胞内停留时间为特点的抗叶酸制剂递送系统可以延缓耐药的发生。此外, 双靶点治疗也是开发联合疗法和设计治疗方案以延长药物寿命的一种替代策略。双靶点的新一代 DHFR 抑制剂不仅能够同时结合不同靶点, 降低耐药发生频率, 还可以有效避免药物相互作用、生物分布与代谢的差异^[65], 是开发 DHFR 抑制剂的一种有前途的方法。在靶点的选择上, 选择与 DHFR 在同一代谢通路的靶点, 如 DHFR/TS, 可以使该通路被双重抑制, 这可能比抑制两个不同通路的独立靶点表现出更好的药物作用。在抗肿瘤

化合物的靶点选择方面,同时抑制肿瘤细胞中过表达的、与生长、增殖和迁移相关的多个发挥协同作用的靶点,如 DHFR/TrxR、DHFR/TP 和 DHFR/EGFR/HER2,可以治疗这种与细胞过度增殖相关的疾病。在抗菌化合物的靶点选择上,抑制细菌内存在而哺乳动物中没有的特异性靶点,如 DHFR/细菌细胞膜和 DHFR/DNA 回旋酶,有助于提升化合物的选择性和疗效。此外,与单一靶点相比,选择与炎症相关的靶点,如 DHFR/COX,在易引起炎症的细菌感染的新药开发中更具优势。未来,提高选择性和生物活性、降低耐药频率、开发多靶点药物、明确作用机制仍是 DHFR 抑制剂研发中令人感兴趣的研究方向。

作者贡献: 陈灿彤主要负责文章主要内容的撰写;黄蕾和关霁晨负责文章格式和语法的修订;来芳芳负责文章的立意和框架搭建。

利益冲突: 所有作者均没有利益冲突。

References

- [1] Ling H, Lou XY, Luo QH, et al. Recent advances in bacteriophage-based therapeutics: insight into the post-antibiotic era [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 4348-4364.
- [2] Hu X, Zhang J, Zhang Y, et al. Dual-target inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase-1 for cancer therapy: advances, challenges, and opportunities [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 230: 114094.
- [3] Polshakov VI. Dihydrofolate reductase: structural aspects of mechanisms of enzyme catalysis and inhibition [J]. *Russ Chem Bull*, 2001, 50: 1733-1751.
- [4] Volpato JP, Pelletier JN. Mutational 'hot-spots' in mammalian, bacterial and protozoal dihydrofolate reductases associated with antifolate resistance: sequence and structural comparison [J]. *Drug Resist Update*, 2009, 12: 28-41.
- [5] Klon AE, Héroux A, Ross LJ, et al. Atomic structures of human dihydrofolate reductase complexed with NADPH and two lipophilic antifolates at 1.09 Å and 1.05 Å resolution [J]. *J Mol Biol*, 2002, 320: 677-693.
- [6] Arora K, Brooks Iii CL 3rd. Functionally important conformations of the Met20 loop in dihydrofolate reductase are populated by rapid thermal fluctuations [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 5642-5647.
- [7] Anderson AC. Targeting DHFR in parasitic protozoa [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10: 121-128.
- [8] Bhabha G, Ekiert DC, Jennewein M, et al. Divergent evolution of protein conformational dynamics in dihydrofolate reductase [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 1243-1249.
- [9] Hao M, Zhao W, Zhang L, et al. Low folate levels are associated with methylation-mediated transcriptional repression of miR-203 and miR-375 during cervical carcinogenesis [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11: 3863-3869.
- [10] Ducker GS, Rabinowitz JD. One-carbon metabolism in health and disease [J]. *Cell Metab*, 2017, 25: 27-42.
- [11] Guo ZR. Research and development of pemetrexed driven by chemical synthesis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2486-2490.
- [12] Newman AC, Maddocks ODK. One-carbon metabolism in cancer [J]. *Br J Cancer*, 2017, 116: 1499-1504.
- [13] Galassi R, Oumarou CS, Burini A, et al. A study on the inhibition of dihydrofolate reductase (DHFR) from *Escherichia coli* by gold (I) phosphane compounds. X-ray crystal structures of (4, 5-dichloro-1*H*-imidazole-1-yl)-triphenylphosphane-gold (I) and (4, 5-dicyano-1*H*-imidazole-1-yl)-triphenylphosphane-gold (I) [J]. *Dalton Trans*, 2015, 44: 3043-3056.
- [14] Ducker GS, Chen L, Morscher RJ, et al. Reversal of cytosolic one-carbon flux compensates for loss of the mitochondrial folate pathway [J]. *Cell Metab*, 2016, 23: 1140-1153.
- [15] Fan J, Ye J, Kamphorst JJ, et al. Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production [J]. *Nature*, 2014, 510: 298-302.
- [16] Steffen J, Stolzmann W. Studies on *in vitro* lymphocyte proliferation in cultures synchronized by the inhibition of DNA synthesis: I. variability of S plus G2 periods of first generation cells [J]. *Exp Cell Res*, 1969, 56: 453-460.
- [17] Woźniak M, Pastuch-Gawolek G, Makuch S, et al. *In vitro* and *in vivo* efficacy of a novel glucose - methotrexate conjugate in targeted cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 1748.
- [18] Calvaresi EC, Hergenrother PJ. Glucose conjugation for the specific targeting and treatment of cancer [J]. *Chem Sci*, 2013, 4: 2319-2333.
- [19] Woźniak M, Pastuch-Gawolek G, Makuch S, et al. Overcoming hypoxia-induced chemoresistance in cancer using a novel glycoconjugate of methotrexate [J]. *Pharmaceuticals*, 2020, 14: 13.
- [20] Liang Y, Zeng D, You Y, et al. Designing dihydrofolate reductase inhibitors as X-ray radiosensitizers to reverse radioresistance of cervical cancer [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11: 1421-1428.
- [21] Ewida MA, Ewida HA, Ahmed MS, et al. 3-Methyl-imidazo [2, 1-b] thiazole derivatives as a new class of antifolates: synthesis, *in vitro/in vivo* bio-evaluation and molecular modeling simulations [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 115: 105205.
- [22] Guo C, He J, Song X, et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin—a review in recent years [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 149: 104463.
- [23] Wang J, Iannarelli R, Pucciarelli S, et al. Acetylshikonin isolated from *Lithospermum erythrorhizon* roots inhibits dihydrofolate reductase and hampers autochthonous mammary carcinogenesis in Δ16HER2 transgenic mice [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161: 105123.

- [24] Wróbel A, Drozdowska D. Recent design and structure-activity relationship studies on the modifications of DHFR inhibitors as anticancer agents [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28: 910-939.
- [25] Tian C, Wang M, Han Z, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 6-substituted pyrrolo [3, 2-d] pyrimidine analogues as antifolate antitumor agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 630-643.
- [26] Gambini V, Tilio M, Maina EW, et al. *In vitro* and *in vivo* studies of gold (I) azolate/phosphane complexes for the treatment of basal like breast cancer [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 155: 418-427.
- [27] Galassi R, Luciani L, Gambini V, et al. Multi-targeted anticancer activity of imidazole phosphane gold (I) compounds by inhibition of DHFR and TrxR in breast cancer cells [J]. *Front Chem*, 2021, 8: 602845.
- [28] Maennling AE, Tur MK, Niebert M, et al. Molecular targeting therapy against EGFR family in breast cancer: progress and future potentials [J]. *Cancers*, 2019, 11: 1826.
- [29] Huang T, Luo X, Wu B, et al. Pyrotinib enhances the radiosensitivity of HER2-overexpressing gastric and breast cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2020, 44: 2634-2644.
- [30] Mestermann K, Giavridis T, Weber J, et al. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib acts as a pharmacologic on/off switch for CAR T cells [J]. *Sci Transl Med*, 2019, 11: eaau5907.
- [31] Sabry MA, Ghaly MA, Maarouf AR, et al. New thiazole-based derivatives as EGFR/HER2 and DHFR inhibitors: synthesis, molecular modeling simulations and anticancer activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 241: 114661.
- [32] Huang H, He Q, Guo B, et al. Progress in redirecting antiparasitic drugs for cancer treatment [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 2747.
- [33] Ramchandani S, Mohan CD, Mistry JR, et al. The multifaceted antineoplastic role of pyrimethamine against human malignancies [J]. *IUBMB Life*, 2022, 74: 198-212.
- [34] Liu H, Liu Z, Du J, et al. Thymidine phosphorylase exerts complex effects on bone resorption and formation in myeloma [J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8: 353ra113.
- [35] Naito S, Eto M, Shinohara N, et al. Multicenter phase II trial of S-1 in patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28: 5022-5029.
- [36] Liu H, Qin Y, Zhai D, et al. Antimalarial drug pyrimethamine plays a dual role in antitumor proliferation and metastasis through targeting DHFR and TPPyrimethamine antitumor proliferation and metastasis [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18: 541-555.
- [37] Brown JR, Walker SR, Heppler LN, et al. Targeting constitutively active STAT3 in chronic lymphocytic leukemia: a clinical trial of the STAT3 inhibitor pyrimethamine with pharmacodynamic analyses [J]. *Am J Hematol*, 2021, 96: E95-E98.
- [38] Reeve SM, Si D, Krucinska J, et al. Toward broad spectrum dihydrofolate reductase inhibitors targeting trimethoprim resistant enzymes identified in clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *ACS Infect Dis*, 2019, 5: 1896-1906.
- [39] Zhao S, Wang ZP, Lin Z, et al. Drug repurposing by siderophore conjugation: synthesis and biological evaluation of siderophore-methotrexate conjugates as antibiotics [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202204139.
- [40] Alm RA, Lahiri SD. Narrow-spectrum antibacterial agents-benefits and challenges [J]. *Antibiotics*, 2020, 9: 418.
- [41] Yang X, Wedajo W, Yamada Y, et al. 1, 3, 5-Triazaspiro [5.5] undeca-2, 4-dienes as selective *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase inhibitors with potent whole cell activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 144: 262-276.
- [42] Aragaw WW, Lee BM, Yang X, et al. Potency boost of a *Mycobacterium tuberculosis* dihydrofolate reductase inhibitor by multienzyme F420H2-dependent reduction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118: e2025172118.
- [43] Manna MS, Tamer YT, Gaszek I, et al. A trimethoprim derivative impedes antibiotic resistance evolution [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 2949.
- [44] Zhang Y, Chowdhury S, Rodrigues JV, et al. Development of antibacterial compounds that constrain evolutionary pathways to resistance [J]. *Elife*, 2021, 10: e64518.
- [45] Vickers AA, Potter NJ, Fishwick CW, et al. Analysis of mutational resistance to trimethoprim in *Staphylococcus aureus* by genetic and structural modelling techniques [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63: 1112-1117.
- [46] Dale GE, Broger C, Hartman PG, et al. Characterization of the gene for the chromosomal dihydrofolate reductase (DHFR) of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990: the origin of the trimethoprim-resistant S1 DHFR from *Staphylococcus aureus*? [J]. *J Bacteriol*, 1995, 177: 2965-2970.
- [47] Reeve SM, Scocchera EW, Narendran G, et al. MRSA isolates from united states hospitals carry *dfrG* and *dfrK* resistance genes and succumb to propargyl-linked antifolates [J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23: 1458-1467.
- [48] Hawser S, Lociuoro S, Islam K. Dihydrofolate reductase inhibitors as antibacterial agents [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71: 941-948.
- [49] Oefner C, Bandera M, Haldimann A, et al. Increased hydrophobic interactions of iclaprim with *Staphylococcus aureus* dihydrofolate reductase are responsible for the increase in affinity and antibacterial activity [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2009, 63: 687-698.
- [50] Noviello S, Huang DB, Corey GR. Iclaprim: a differentiated option for the treatment of skin and skin structure infections [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2018, 16: 793-803.
- [51] Laue H, Valensise T, Seguin A, et al. *In vitro* bactericidal activity

- of iclaprim in human plasma [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 4542-4544.
- [52] Laue H, Weiss L, Bernardi A, et al. *In vitro* activity of the novel diaminopyrimidine, iclaprim, in combination with folate inhibitors and other antimicrobials with different mechanisms of action [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60: 1391-1394.
- [53] Schneider P, Hawser S, Islam K. Iclaprim, a novel diaminopyrimidine with potent activity on trimethoprim sensitive and resistant bacteria [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 4217-4221.
- [54] Krievins D, Brandt R, Hawser S, et al. Multicenter, randomized study of the efficacy and safety of intravenous iclaprim in complicated skin and skin structure infections [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 2834-2840.
- [55] Huang DB, File TM Jr, Torres A, et al. A phase II randomized, double-blind, multicenter study to evaluate efficacy and safety of intravenous iclaprim *versus* vancomycin for the treatment of nosocomial pneumonia suspected or confirmed to be due to gram-positive pathogens [J]. *Clin Ther*, 2017, 39: 1706-1718.
- [56] Huang DB, Dryden M. Iclaprim, a dihydrofolate reductase inhibitor antibiotic in phase III of clinical development: a review of its pharmacology, microbiology and clinical efficacy and safety [J]. *Future Microbiol*, 2018, 13: 957-969.
- [57] Huang DB, Corey GR, Holland TL, et al. Pooled analysis of the phase 3 REVIVE trials: randomised, double-blind studies to evaluate the safety and efficacy of iclaprim *versus* vancomycin for treatment of acute bacterial skin and skin-structure infections [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2018, 52: 233-240.
- [58] van Hal SJ, Paterson DL, Lodise TP. Systematic review and meta-analysis of vancomycin-induced nephrotoxicity associated with dosing schedules that maintain troughs between 15 and 20 milligrams per liter [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57: 734-744.
- [59] Wang L, Fan J, Zheng L, et al. Efficacy and safety of iclaprim for the treatment of skin structures and soft tissue infections: a methodology framework [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 2370.
- [60] Martin JK 2nd, Sheehan JP, Bratton BP, et al. A dual-mechanism antibiotic kills gram-negative bacteria and avoids drug resistance [J]. *Cell*, 2020, 181: 1518-1523.
- [61] Li Y, Ouyang Y, Wu H, et al. The discovery of 1,3-diamino-7H-pyrrol [3, 2-f] quinazoline compounds as potent antimicrobial antifolates [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 228: 113979.
- [62] Dighe SN, Collet TA. Recent advances in DNA gyrase-targeted antimicrobial agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 199: 112326.
- [63] Hassan AS, Askar AA, Naglah AM, et al. Discovery of new Schiff bases tethered pyrazole moiety: design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking study as dual targeting DHFR/DNA gyrase inhibitors with immunomodulatory activity [J]. *Molecules*, 2020, 25: 2593.
- [64] Metwally NH, Mohamed MS. New imidazolone derivatives comprising a benzoate or sulfonamide moiety as anti-inflammatory and antibacterial inhibitors: design, synthesis, selective COX-2, DHFR and molecular-modeling study [J]. *Bioorg Chem*, 2020, 99: 103438.
- [65] Zhang Y, Hu Z, Zhang J, et al. Dual-target inhibitors of indoleamine 2,3 dioxygenase 1 (Ido1): a promising direction in cancer immunotherapy [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 238: 114524.