

革兰阴性菌分泌系统小分子抑制剂的研发进展

单 淇^{1,2}, 郑忠辉³, 王玉成^{1*}

1. 中国医学科学院 医药生物技术研究所, 北京 100050

2. 天津药物研究院, 天津 300193

3. 山东新华制药股份有限公司, 山东 淄博 255005

摘 要: 随着耐药致病菌的传播和致病菌耐药谱的扩大, 抗菌药物的临床选择已经非常有限, 不寻求直接杀灭病原菌而仅抑制其致病能力正成为一种新的抗感染策略。分泌系统是革兰阴性菌最为重要的毒力因子之一, 承担各种致病相关效应蛋白和遗传物质的分泌和转运, 在不同病原菌中结构和功能相对保守, 因而被认为是抗毒力因子药物的理性靶标, 受到越来越多研究者的重视。按照化合物的结构类型, 总结了目前在研革兰阴性菌分泌系统小分子抑制剂的结构特征和构效关系, 并对此类抑制剂的开发难点进行了探讨, 旨在为更多分泌系统抑制剂的研发提供参考。

关键词: 革兰阴性菌; 毒力因子; 分泌系统; 抑制剂; 构效关系

中图分类号: R978.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2019)12 - 3786 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.12.062

Recent progress on secretion systems small-molecule inhibitors for gram-negative bacteria

SHAN Qi^{1, 2}, ZHENG Zhong-hui³, WANG Yu-cheng¹

1. Institute of Medicinal Biotechnology Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

3. Shandong Xinhua Pharmaceutical Co., LTD., Zibo 255005, China

Abstract: With the spread of drug-resistant pathogens and the expansion of drug resistance spectrum, the clinical choice of antibacterial drugs has been quite restricted. To inhibit the pathogenicity instead of directly killing pathogens became a new anti-infective strategy. As the vital virulence factors of Gram-negative bacteria, secretion systems are responsible for the secretion and translocation of various pathogenic effector proteins and genetic material, with relatively conserved structures and functions among different pathogens, and thus were believed as potential drug targets by researchers. According to the type of compounds, structural characteristics and structure-function relationship of the small molecule inhibitors of the main secretory systems of Gram-negative bacteria are reviewed, and the limitation and development prospects of these inhibitors are discussed for further research.

Key words: Gram-negative bacteria; virulence factors; secretion systems; inhibitors; structure-function relationship

随着致病细菌耐药性的传播以及耐药谱的扩大, 传统以使用抗菌药物为主的抗感染临床治疗手段正受到前所未有的挑战。作为一种选择压力较小、理论上不易产生耐药性的抗感染方式, 抗细菌毒力因子药物受到越来越多研究者的重视。细菌分泌系统是革兰阴性菌最重要的细菌毒力因子之一, 在致

病菌中分布广泛, 承担将细菌细胞内合成物质转运至胞外环境或宿主细胞内的作用, 与细菌的生存及致病性等紧密相关。革兰阳性菌只有一层细胞膜, 主要依赖在真核和原核细胞中相对保守的 Tat 和 Sec 途径向膜外转运蛋白。革兰阴性菌由于具有内膜外膜双层结构, 其分泌机制比革兰阳性菌更为复

收稿日期: 2019-09-18

作者简介: 单 淇, 研究方向为中药与天然药物。E-mail: shanq@tjipr.com

*通信作者 王玉成, 教授, 博士生导师, 从事新药设计及药物合成研究。E-mail: wyc9999@126.com

杂多样, 相关研究也更深入。目前已知的革兰阴性菌分泌系统, 除 Tat 和 Sec 外, 还有 7 类, 包括 I~VI 和 IX 型^[1-2], 其中 I、III、IV 和 VI 型为一步分泌系统, II、V 和 IX 型为两步分泌系统^[3]。研究者以不同分泌系统的结构蛋白、效应因子以及相关基因调控因子等为靶标设计抑制剂, 具有不显著干扰细菌生存、对宿主毒性低、抑制毒力因子释放或转运的优点。目前已有许多针对 II、III、和 IV 型分泌系统的小分子抑制剂^[4], 特别是 III 型分泌系统, 因其在细菌致病性方面的重要地位而获得最多的关注。另外, 随着对细菌感染机制的研究深入, IV 型和 II 型分泌系统也逐渐受到重视。革兰阴性菌 II、III、和 IV 型分泌系统示意图见图 1。本文将对上述 3 个分泌系统抑制剂的作用特点、结构特征及构效关系等进行总结, 并对此类药物的研发难点展开讨论。

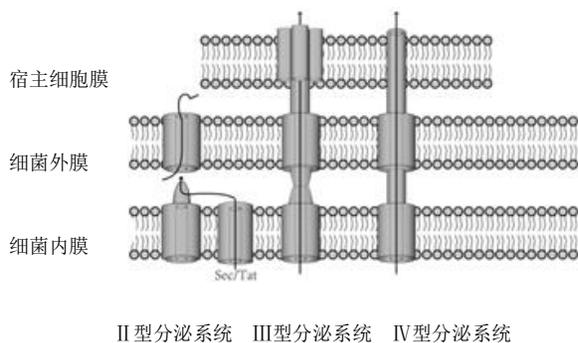


图 1 革兰阴性菌 II、III 和 IV 型分泌系统示意图

Fig. 1 Overview of type II, III, and IV secretion systems

1 III 型分泌系统抑制剂

III 型分泌系统 (T3SSs) 是革兰阴性菌最主要的毒力因子, 由 20 种以上蛋白构成, 广泛存在于各种致病阴性菌中^[5]。革兰阴性菌通常可表达两类 T3SSs, 一类被称作注入复合体或针状复合物简称 iT3SS, 可将细菌胞质中的效应蛋白或毒力因子转运至宿主细胞, 从而调控宿主细胞的代谢过程及细菌与宿主细胞的相互作用^[6]; 另一类编码细菌鞭毛, 简称 fT3SS, 可调控细菌的运动能力。T3SS 的蛋白序列、结构和功能在多种革兰阴性菌中相对保守, 开发以此为靶点的各种结构类型的抑制剂, 很多都已被证明具有保护真核细胞免受细菌毒素及其诱发的宿主细胞毒作用, 适用于控制相关细菌的急性感染。由于完整的 T3SS 系统目前仍无法在体外构建, 小分子抑制剂的筛选主要在整体细胞水平上, 通过高通量判读效应蛋白的分泌情况或测定相关

ATPase 的活性实现。按照抑制剂化学结构类型, 可主要分为以下几种:

1.1 亚水杨基酰肼类

亚水杨基酰肼衍生物是研究较早的一类小分子 T3SS 抑制剂, 最初通过人工构建含报告基因的假核核耶尔森氏菌 *Yersinia pseudotuberculosis* 筛选获得^[7]。该类抑制剂对铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 及耶尔森氏菌 *Yersinia*、沙门氏菌 *Salmonella*、志贺氏菌 *Shigella*、埃希菌 *Escherichia* 的诸多致病阴性菌株以及沙眼衣原体 *Chlamydia trachomatis* 的 T3SS 系统都证实有类似的抑制活性^[8-9], 活性化合物对 T3SS 抑制率的半抑制浓度 (IC₅₀) 值一般在 5~25 μmol/L^[10]。不同衍生物的作用机制存在差别, 某些可通过下调 T3SS 相关基因的转录发挥作用, 另一些则抑制效应蛋白的分泌和转运, 还有些影响注入复合体的装配或通过干扰鞭毛蛋白表达影响细菌的运动能力^[10]。较小的化学结构差异也可导致衍生物在作用机制上产生显著变化, 如衍生物 INP0010 (1) 在鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* 和大肠埃希菌 *Escherichia coli* 等菌株中可介导 iT3SS 相关基因的沉默, 并对多种效应蛋白的分泌有抑制作用, 但对 fT3SS 系统无影响; 衍生物 INP0404 (2) 仅与 INP0010 相差一个溴原子, 却可显著抑制 *S. typhimurium* 等的运动能力和胞外鞭毛蛋白的表达^[9, 11]。亚水杨基酰肼类 T3SS 抑制剂的结构通式及衍生物实例见图 2。

亚水杨基酰肼类 T3SS 抑制剂的构效关系目前仍不明确, 尽管有少量建立 QSAR 模型报道^[12], 仍难以总结规律。其原因在于此类抑制剂的活性受化合物透膜能力的影响较大, 而且具有多靶点性质, 已知的靶蛋白包括 Tpx、WrbA 和 FolX 等, 因而特定化学结构的改变常不能直接反映活性的变化, 但有证据表明水溶性、酚羟基酸解常数 (pKa) 等理化性质的改变对 T3SS 的抑制活性有显著影响^[10, 13-14]。

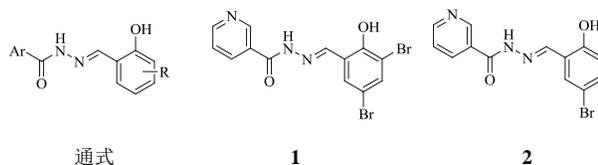


图 2 亚水杨基酰肼类 T3SS 抑制剂的结构通式及衍生物实例

Fig. 2 General and representative structures of salicylidene acylhydrazide T3SS inhibitors

1.2 8-羟基喹啉类

8-羟基喹啉 T3SS 抑制剂与亚水杨基酰肼类衍生物的发现途径类似,也是通过 *Y. pseudotuberculosis* 高通量体系筛选得到的。此类衍生物能够阻断负调控因子 ExsE 经 T3SS 向胞外分泌,不利于胞内 ExsC-ExsD 复合体的形成,使得 ExsA 无法激活 T3SS 基因转录。8-羟基喹啉类化合物对 iT3SS 和 fT3SS 基因转录均有抑制作用,其作用靶点推测是 T3SS 的 ATPase^[15]。与亚水杨基酰肼类抑制剂相比,8-羟基喹啉类具有更广的抑制谱,同时对沙眼衣原体等有抑制作用。目前已筛选出的活性化合物结构中均有 7-位侧链,芳环取代的含氮五/六元脂环通过亚甲基与喹啉相连。在这些抑制剂中,INP1767 (3) 和 INP1855 (4) 对假结核耶氏菌感染巨噬细胞的保护作用较强,且细胞毒性较低^[16]。8-羟基喹啉类 T3SS 抑制剂的结构通式及衍生物实例见图 3。

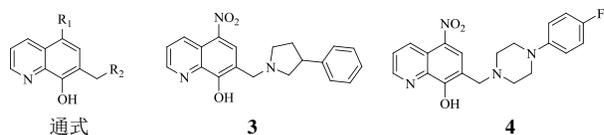


图 3 8-羟基喹啉类 T3SS 抑制剂的结构通式及衍生物实例
Fig. 3 General and representative structures of 8-hydroxyquinoline T3SS inhibitors

1.3 N-羟基苯并咪唑类

N-羟基苯并咪唑衍生物是一类通过虚拟筛选得到的,以多重适应响应 (MAR) 蛋白 (如 *E. coli* 的 MarA、SoxS 和 Rob 等) 为靶标的小分子抑制剂^[17]。Mar 蛋白存在于多种有重要临床意义的致病菌中,其羧基末端的 DNA 结合域 (α 螺旋-转角- α 螺旋) 非常保守,很多革兰阴性菌必需的 T3SS 转录因子都是 MAR 蛋白,如 *Y. pseudotuberculosis* 的 LcrF、*P. aeruginosa* 的 ExsA 等。N-羟基苯并咪唑类衍生物结合于这些转录因子的 DNA 结合域后,能够阻遏转录因子与 DNA 启动子的结合^[18-19],从而实现 T3SS 系统的抑制。

构效关系研究表明当化合物的 D 环杂原子 X 为 N 时,衍生物对靶蛋白的抑制率与非杂环时接近,但对被 *P. aeruginosa* 感染巨噬细胞的保护作用有所增强^[18]; D 环取代基 Y 为乙酰基时,细胞保护作用强于甲硫基、三氟甲基等; Linker 为 NHCOCH=CH 时,对 LcrF 的抑制活性最高, NHCO 次之; A 环取代基 R 为硝基和氰基时,对 LcrF 的抑制活性明显

强于其他给电子和吸电子基,两者对被感染细胞的保护能力接近^[19]。在目前已进行活性研究中,化合物 5631 (5) 是活性最高的抑制剂之一,其对 ExsA 和 LcrF 的 IC₅₀ 分别达到 0.93、1.20 $\mu\text{mol/L}$,该衍生物与其钠盐可拮抗 *P. aeruginosa* 诱发的细胞毒作用,在 125 $\mu\text{mol/L}$ 剂量下的细胞存活率接近未感染水平^[20]。N-羟基苯并咪唑类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 4。

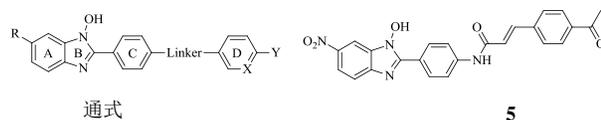


图 4 N-羟基苯并咪唑类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例
Fig. 4 General and representative structures of N-hydroxybenzimidazole T3SS inhibitors

1.4 酚酸类

除亚水杨基酰肼和羟基苯并咪唑类衍生物能够抑制 T3SS 基因的表达外,某些天然来源的酚酸类成分也有类似的活性。最初研究者发现 *p*-香豆酸、*o*-香豆酸、反式肉桂酸等对植物病原菌菊欧氏杆菌 *Erwinia chrysanthemi* 的 T3SS 基因表达有抑制作用^[21-22],之后陆续发现这类酚酸衍生物,如 TS027 (6, *p*-氨基肉桂酸) 和 TS101 (7, *p*-羟基肉桂酸甲酯),可通过 GacSA-RsmYZ-RsmA-ExsA 信号转导系统,影响铜绿假单胞菌 T3SS 效应因子 PAO1 的编码基因 ExoS 的表达,TS027 在 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下即表现抑制活性,TS101 的起效浓度相对较高。酚酸类衍生物的构效关系仍不明确,肉桂酸是此类化合物的共同母核,当羧基为羟肟酸取代时,如 TS103 (*p*-羟基肉桂酰羟肟酸) 和 TS134 (肉桂酰羟肟酸),化合物成为 ExoS 表达的诱导剂^[23]。由于在结构上与亚水杨基酰肼 T3SS 抑制剂具有相似性,通过借鉴后者的某些结构特征,将酚酸羧基衍生化或引入含氮基团,也得到具有较好活性的衍生物,如 2-硝基苯丙烯酸乙酯类化合物 I-9 (8)、I-12 (9)、I-13 (10)^[24]。由亚水杨基酰肼到 2-硝基丙烯酸乙酯类抑制剂的骨架跃迁见图 5。

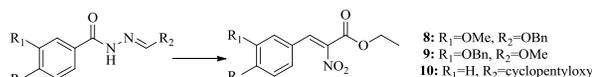


图 5 由亚水杨基酰肼到 2-硝基丙烯酸乙酯类抑制剂的骨架跃迁
Fig. 5 The scaffold hopping from salicylidene acylhydrazides to ethyl 2-nitro-3-arylacrylates

1.5 2-亚胺-5-芳叉噻唑啉酮类

2-亚胺-5-芳叉噻唑啉-4-酮衍生物是高通量筛选得到的一类非常广谱的 T3SS 抑制剂。该类衍生物对 FT3SS 无活性，但对 T2SS、iT3SS 和 IV 型纤毛系统均有抑制作用。上述 3 个系统共有的蛋白组件外膜分泌通道蛋白被推测是该类化合物的作用靶点^[15, 25-26]。构效关系表明 2-位苯亚胺和 5-位取代苯叉基是活性的必需基团，若 2-苯亚胺的芳环上有取代基、5-苯叉基的双键被还原或丁香酚基被其他取代苯基替换，活性都会大幅下降至消失；值得关注的是，丁香醛结构本身就具有 T3SS 抑制活性^[27]。另外，N₃-取代基也对抑制活性有贡献，当羰基或烷

氧羰基取代时，对鼠伤寒沙门氏菌的分泌通道蛋白 SipA 的起效抑制浓度可达在 1 μmol/L 以下。研究还发现当 N₃ 为二肽取代时，衍生物的溶解度有所改善，但对活性的影响通常不显著，只有二肽为联苯丙氨酸精氨酸酰胺时，活性才显著提高，如化合物 **11** 的 S 和 R 差向异构体对 SipA 的 IC₅₀ 值分别达到 8.3 μmol/L^[28]。另外，2-亚胺-5-芳叉噻唑啉酮的二聚体同样具有外膜分泌通道蛋白抑制活性，且活性通常高于相应的单体，如化合物 **12** 对 SipA 的 IC₅₀ 达 5 μmol/L，而两个组成单体的 IC₅₀ 值分别只有 36、54 μmol/L^[29]。2-亚胺-5-芳叉噻唑啉酮类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 6。

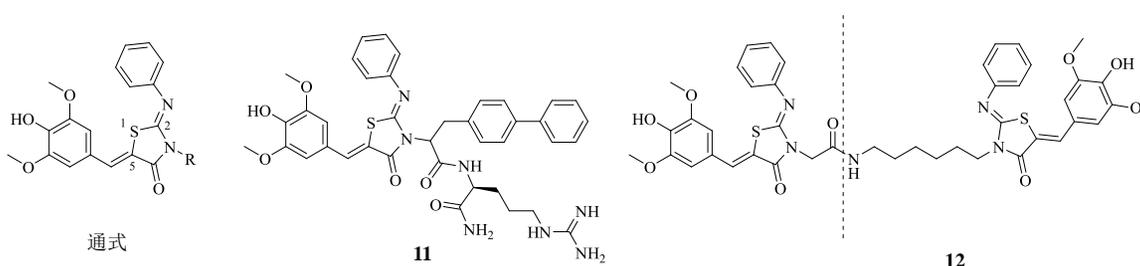


图 6 2-亚胺-5-芳叉噻唑啉酮类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例

Fig. 6 General and representative structures of 2-imino-5-arylidene thiazolidin-4-one T3SS inhibitors

1.6 苯氧乙酰胺类

苯氧乙酰胺衍生物能够特异性的影响某些 T3SS 效应因子的分泌和转运，从降低 T3SS 介导的细胞毒作用。在铜绿假单胞菌中，苯氧乙酰胺衍生物具有单一作用靶点，为 iT3SS 胞外针状结构的主要组成蛋白 PscF^[30]，抑制剂与靶蛋白结合后，能够干扰影响感染持久性、扩散性的效应蛋白 ExoS 或 ExoU 的分泌或转运^[31]。构效关系显示此类化合物的 A 环仅有很小的调整空间，以 2,4-二氯苯基活性最高，用其他吸电子或给电子基或卤素（溴、氟）取代，活性均下降或消失；若 A 环替换为吡啶环仍有活性，如化合物 MBX 2359 (**13**)，对 ExoS 分泌的抑制活性显著强于最初筛选出的苗头化合物 MBX 1641 (**14**)，而抑制转运的活性则有所下降^[30]。

连接区结构同样较保守，连接 A 环的杂原子为 O 时，衍生物通常即可抑制 ExoS 的分泌也可干扰其转运；若替换为 S，则仅保留抑制分泌活性，以其他原子或基团替换，活性消失^[32]；酰胺侧链仅为甲基和乙基时抑制活性显著，若侧链长度增加、引入支链或杂原子，活性均消失^[33]；另外，苯氧乙酰胺衍生物的 T3SS 抑制存在立体选择性，仅酰胺羰基 α 位为 R-构型的异构体有活性^[31]。B 环的结构多样性较高，含（取代）苯基、杂环或苯并杂环的衍生物均有表现出较高活性的可能。目前已报到活性的此类衍生物中，B 环为咪唑-5-基、苯并噻吩-5-基的 R-构型衍生物（如 MBX2359），抑制 ExoS 分泌和转运的 IC₅₀ 值分别低于 1、5 μmol/L^[32]。苯氧乙酰胺类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 7。

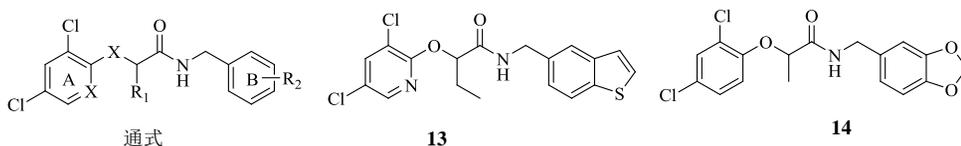


图 7 苯氧乙酰胺类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例

Fig. 7 General and representative structures of phenoxyacetamide T3SS inhibitors

1.7 2-硫代苯甲酰胺类

ATPase 是 iT3SS 的基本组成单位, 由于 iT3SS ATPase 与人体细胞中的 ATPase 同源性较低 (相似度仅 20%~22%), 因而被认为是 T3SS 抑制剂的潜在靶点。2-硫代苯甲酰胺衍生物是根据肠致病性大肠杆菌 T3SS 的 EscN ATPase 的 ATP 结合位点晶体结构, 经虚拟筛选得到的一类 T3SS 抑制剂。在对苗头化合物的细菌细胞毒性、宿主细胞毒性、ATPase 抑制常数 K_i 、效应蛋白 EspG 分泌抑制和被感染细胞保护作用等指标进一步筛选的基础上, 获得了先导化合物 (15)。初步构效关系显示活性化合物苯环上的硫原子通常形成硫代乙酰胺结构, 苯甲酰 N 原子上需连有取代苯基或稠合苯基, 且苯环上取代基不能位于酰胺 N 原子的邻位。经结构优化后得到的活性化合物 WEN05-03 (16), 在保留高靶点选择性和低毒性的同时, 与 EscN ATPase 的抑制常数可低至 $16 \mu\text{mol/L}$, 比先导化合物降低了约 30 倍^[34]。2-硫代苯甲酰胺类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 8。

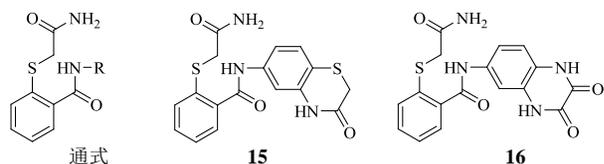


图 8 2-硫代苯甲酰胺类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例

Fig. 8 General and representative structures of 2-thiobenzamide T3SS inhibitors

1.8 多胺类

细菌 T3SS 的激活受到其所处生存环境的影响, 一项对铜绿假单胞菌的研究发现, 宿主细胞的内源性多胺分子亚精胺和精胺是调控 T3SS 激活的关键^[35]。铜绿假单胞菌亚精胺特异性转运体 SpuDEFGH 对多胺类信号分子具有极高的亲和性, 以此为靶点设计的多胺缀合物能够阻断宿主-病原菌的亚精胺信号通路。在这些缀合物中以罗丹明 101-精胺缀合物 R101SPM 的活性最高, 该类衍生物能够抑制 T3SS 基因的表达, 拮抗 T3SS 介导的宿主细胞毒作用, 提高被感染动物的存活率。构效关系显示, 缀合物中的多胺只有为亚精胺 (如化合物 17) 时活性最高, 多胺侧链被修饰或改变长度均对活性不利。多肽类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 9。

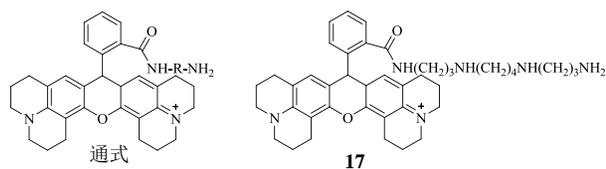


图 9 多肽类 T3SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例

Fig. 9 General and representative structures of polyamine conjugate T3SS inhibitors

1.9 其他

除前述几类抑制剂外, 还有一些经高通量筛选得到苗头化合物, 如以耶尔森氏菌效应蛋白 YopE 转运及 T3SS ATPase YscN 活性等为指标筛选出的化合物 C20、C22、C24、C34 和 C38^[36] 及 7812、7832 和 7086^[37] 等, 这些化合物结构各异, 在体外和体内研究也显示出优良的活性, 但目前未进一步开展构效关系及其他相关研究。

另外, 除合成和半合成抑制剂之外, 一些天然产物也发现具有 T3SS 抑制活性。如斜阳岛海绵 *Pseudoceratina sp.* 中的溴酪氨酸生物碱成分 pseudoceramine B 和 spermatinamine^[38], 葡萄属 *Vitis* 植物中的白藜芦醇四聚体(-)hopeaphenol^[39], 灰类放线菌 *Streptomyces goldiniensis* 的聚酮类抗生素 1-methylmocimycin (aurodox)^[40], 山芙蓉 *Hibiscus taiwanensis* 等植物中的挥发油丁香醛^[27]。这些天然产物可以直接或间接影响革兰阴性致病菌 T3SS 的基因表达、相关效应蛋白分泌或转运, 起到抑制 T3SS 的作用。

很多革兰阴性菌还是重要的植物致病菌, T3SS 也是这些细菌产生致病力的关键因素。近年来, 研究者陆续筛选出很多以植物致病菌 T3SS 为靶标, 具新骨架结构的分泌系统抑制剂。如对 Hrp 组植物病原菌, 如西瓜嗜酸菌 *Acidovorax citrulli*、水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*, Xoc 和丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 等有活性的苜蓿碳亚胺二腈类^[41]、2-巯基-1,3,4-噻二唑类^[42]等。这些 T3SS 抑制剂与临床病原菌的 T3SS 具有类似的活性, 抑制谱也较广泛, 在农业领域有广阔的应用前景, 但是否在人致病菌中有效还未经证实。

2 IV型分泌系统抑制剂

所有与细菌接合系统同源或功能类似的分泌途径均属于 IV 型分泌系统 (T4SS), 典型的 T4SS 系统通常含有 12 个蛋白 VirB1-11 和 VirD4, 构成跨阴性菌内外膜的高分子复合体^[43]。T4SS 系统分为 3 种

亚型：效应蛋白转运系统、DNA 接合转移系统和 DNA 摄取分泌系统^[44]。阴性菌的 T4SS 对致病性至少有两方面贡献，一方面，很多大分子毒素，如幽门螺杆菌 *Helicobacter pylori* 毒蛋白 CagA 的跨膜运输依赖于 T4SS，在巴尔通体属 *Bartonella*、布鲁氏属 *Brucella*、军团菌属 *Legionella* 及螺杆菌属 *Helicobacter* 的病原菌中，很多致病性毒力因子可直接借助 T4SS 输入宿主细胞；另一方面，T4SS 介导遗传信息的转运，帮助耐药性决定簇在致病菌间扩散^[45]。因此，抑制 T4SS 在降低致病菌毒力的同时有助于控制耐药菌的传播。

2.1 噻二唑啉二酮类

噻二唑啉-3,5-二酮衍生物是通过高通量筛选得到的一类 T4SS 抑制剂，该类化合物可特异性结合幽门螺杆菌 T4SS 中的转运 ATPase CagA(与农杆菌的 VirB11 同源，也称作 VirB11 型 ATPase)，降低幽门螺杆菌定植肠粘膜的能力，抑制毒蛋白 CagA 向宿主细胞转运。化合物 CHIR-1 (18) 抑制 CagA 的 IC₅₀ 值为 0.45 μmol/L，对幽门螺杆菌的 MIC 约 90 μmol/L，预防给药 (50 μmol/L) 可降低被感染细胞的损伤程度^[46]。噻二唑啉二酮类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 10。

2.2 咪唑并吡嗪类

咪唑并[1,2-a]吡嗪衍生物是另一类以 VirB11

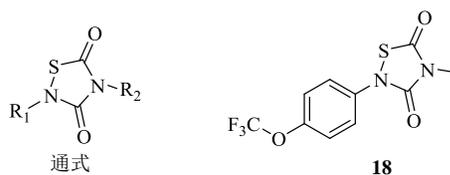


图 10 噻二唑啉二酮类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例
Fig. 10 General and representative structures of thiazolidine-3,5-dione T4SS inhibitors

ATPase 为靶标的 T4SS 抑制剂。与大多数细菌分泌系统抑制剂的发现途径不同，其苗头化合物不是通过高通量筛选得到的，而是通过靶蛋白 (HP0525) 结构理性设计获得的。咪唑并[1,2-a]吡嗪抑制剂可结合于酶的活性中心，是 ADP 的竞争性抑制剂。分子对接结果显示，咪唑环的 2 或 3 位被芳基取代是其与受体结合的必需条件，芳基的疏水作用对结合自由能贡献很大。构效关系研究证实芳基为 β-萘基时抑制活性较高，用杂芳环等极性芳环替换则活性大幅降低甚至消失；另外，2-芳基取代的衍生物通常比 3-芳基取代活性更高；8 位取代基对配体与活性位点的结合也有较大贡献，目前已知的高活性化合物大多具有芳基磺胺(如化合物 19)或吡啶苯胺结构(如化合物 20)，对 VirB11 ATPase 的 IC₅₀ 值一般低于 10 μmol/L^[47]。咪唑并吡嗪类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 11。

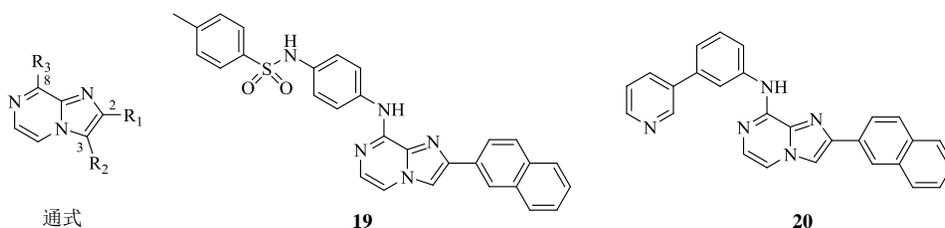


图 11 咪唑并吡嗪类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例
Fig. 11 General and representative structures of imidazo[1,2-a]pyrazine T4SS inhibitors

2.3 亚水杨基酰胺类

此类 T4SS 抑制剂是以 T4SS 的关键蛋白 VirB8 为靶点，经细菌双杂交系统高通量筛选得到一类抑制剂，与亚水杨基酰胺类 T3SS 抑制剂具有类似的母核结构。VirB8 蛋白在阴性菌中以二聚体 (VirB8-VirB8 或 VirB8-VirB10) 形式参与完整的 T4SS 构建，此类亚水杨基酰胺衍生物是一种干扰蛋白相互作用的变构抑制剂，能够结合于 VirB8 形成二聚体的界面(非蛋白二聚化位点)，引起蛋白构

象变化，阻止二聚化。除此之外，一些亚水杨基酰胺衍生物，如化合物 B8I-2 (21)，还可抑制布鲁氏菌 VirB 基因及群体感应的相关基因的转录，并干扰其在巨噬细胞内的增殖^[48]。初步构效关系研究表明此类抑制剂结构中酰胺左侧的羟基苯甲酰胺部分和右侧的硝基苯部分对抑制 VirB8 二聚体形成均起重要作用。若羟基苯甲酰胺替换为氯苯或吡啶，或者硝基苯的硝基从邻位移至对位，活性均会消失；与之相比，去掉咪唑基，活性仍有一定程度的保留；

苯甲酰胺的羟基位置变化或引入第二个羟基对活性的影响不大。目前已知的亚水杨基酰肼类 T3SS 抑制剂均未显示出 VirB8 抑制活性^[49]。近期研究发现某些亚水杨基酰肼类 T4SS 抑制剂还具有抑制阴性菌质粒接合转移的活性。接合转移系统是 T4SS 的一种亚型，而接合转移传递是细菌耐药基因传播的重要途径，抑制剂可通过与 VirB8 同源蛋白 TraE 结合发挥作用。目前已报道的亚水杨基酰肼类接合抑

制剂均是在 B8I-2 基础上经结构优化得到的，其中活性最高的为化合物 BAR-072 (22)。对接合抑制活性而言，由于蛋白结合位点不同，化合物呈现的构效关系与 VirB8 抑制活性并不一致，例如化合物 B8I-2 本身几乎没有抑制质粒接合的活性，而化合物 UM-024 (23) 显著抑制 pKM101 质粒的接合转移，但其 VirB8 抑制活性却很低^[50]。亚水杨基酰肼类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 12。

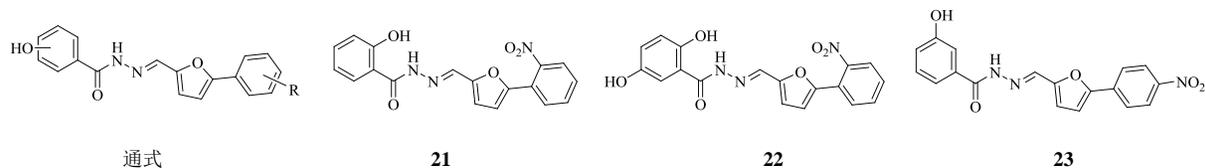


图 12 亚水杨基酰肼类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例

Fig. 12 General and representative structures of salicylidene acylhydrazide T4SS inhibitors

2.4 芳基羧酸类

芳基羧酸衍生物是基于亲和片段设计合成的一类接合转移系统抑制剂。在解析 TraE 及其他同源 VirB8 蛋白与亲和片段复合物晶体结构的基础上，研究者发现两个不同的配体片段结合位点，位点 1 位于二聚体交界面的沟槽中，即亚水杨基酰肼 T4SS 抑制剂与 VirB8 的结合位点，位点 2 则在 TraE 二聚化位点临近的 α -螺旋上。在目前已筛选的小分子片段中，芳环和羧基是构成亲和片段的必要结构单位，根据结合于位点 1 的亲和片段设计合成的抑制剂化合物 239852 (24)，由两部分结构组成，分别来自 2-呋喃羧酸和 2-氯异烟酸，该化合物可通过改变蛋白结构，抑制二聚体生成，其与 TraE 的平衡解离常数为 $19.6 \mu\text{mol/L}$ 。与之结构类似的化合物 105055 (25) 则与 TraE 结合于位点 2，可直接阻碍两分子蛋白二聚化，其平衡解离常数仅为 $9.3 \mu\text{mol/L}$ ^[51]。芳基羧酸类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 13。

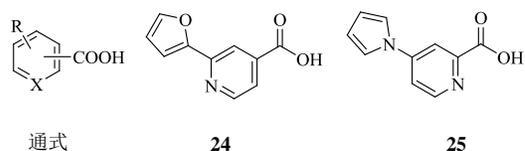


图 13 芳基羧酸类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例

Fig. 13 General and representative structures of aryl carboxylic acid T4SS inhibitors

2.5 肽模拟物类

拟肽类 T4SS 抑制剂具有稠合 2-吡啶酮的基本骨架，该骨架是一系列具有干扰“分子伴侣-引领蛋白”(CUP) 信号通路活性的小分子抑制剂的共同结构特征。CUP 通路调控细菌纤毛的形成，某些致病阴性菌(如幽门螺杆菌)的效应蛋白定位于细菌纤毛顶端附近，因此纤毛结构也被认为是 T4SS 系统的胞外延伸部分，对于 T4SS 发挥正常功能至关重要。目前筛选出的不同拟肽类 T4SS 抑制剂，虽然结构上非常相似，但在作用机制上可能存在一定差异。如化合物 C10 (26) 和 KSK85 (27) 仅在 2-吡啶酮的萘取代基上相差一个甲氧基，两者也都能够抑制幽门螺杆菌 cag T4SS 介导的效应因子转运及大肠杆菌 pKM101 和 R1-16 质粒接合转移($150 \mu\text{mol/L}$)，但化合物 KSK85 能够阻碍 T4SS 相关纤毛结构的装配，而 C10 对纤毛的生物发生没有显著影响，由此可推测前者的抑制活性来源于对细菌纤毛结构完整性的影响，而后者可能通过其他方式发挥作用^[44]。拟肽类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 14。

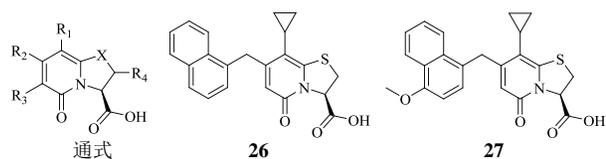


图 14 拟肽类 T4SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例

Fig. 14 General and representative structures of peptidomimetic T4SS inhibitors

2.6 脂肪酸类

脂肪酸类 T4SS 抑制剂是一类来源于天然产物骨架的接合转移系统抑制剂, 与其他接合转移抑制剂不同, 此类衍生物最初通过全细胞高通量筛选得到的。早期筛选出的此类抑制剂均具有 2-炔基脂肪酸 (2-AFAs) 骨架, 如 2-hexadecynoic acid (**28**), 对不同菌群中多种接合质粒, 包括高感染性、传播性的 R1-16 均有抑制作用^[52], 但对某些真核细胞和革兰阳性菌有毒性, 其成药性方面也存在问题。后期从青霉属海洋真菌中筛选出靶向性更强、对各类

细胞毒性较低的 tanzawaic acid 类衍生物, 如 tanzawaic acid A (**29**) 和 B (**30**), 此类化合物可特异抑制接合转移质粒 R388 和 R1drd19^[53]。以前普遍认为不饱和双键或叁键是此类抑制剂必需的结构特征, 近来研究发现某些饱和脂肪酸, 如 2-溴软脂酸 (**31**), 也具有类似作用^[54]。上述脂肪酸衍生物尽管结构各异, 其作用靶点均为 VirB11 同源 ATPase, 如质粒 R388 的 TrwD ATPase, 由此推测脂肪酸的空间构象可能是抑制剂与靶酶结合的关键。脂肪酸类 T4SS 抑制剂实例见图 15。

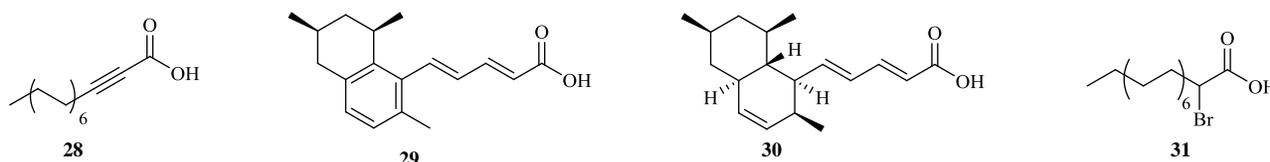


图 15 脂肪酸类 T4SS 抑制剂实例

Fig. 15 Structures of some fatty acid T4SS inhibitors

3 II 型分泌系统抑制剂

II 型分泌系统 (T2SS) 分布于铜绿假单胞菌、霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 及埃希氏菌属、克雷伯氏菌属 *Klebsiella*、欧文氏菌属 *Erwinia* 的多种致病阴性菌中, 主要负责折叠蛋白的释放。T2SS 通常由 12~16 个蛋白组件构成, 分为 4 个亚结构: 外膜复合体、内膜复合体、ATPase 和假纤毛结构。与 T3SS 和 T4SS 不同, T2SS 的分泌通道蛋白仅存在于阴性菌外膜, 必需借助 Sec 或 Tat 分泌途径将蛋白运输至细胞周质才能完成蛋白的分泌; T2SS 的内膜复合体负责分泌通道蛋白、假菌丝和 ATPase 之间的信号通信; 假纤毛则被推测是推动蛋白通过分泌通道的“活塞”^[1]。致病菌通过 T2SS 系统分泌各种脂酶、磷酸酶、蛋白酶和多糖水解酶, 以及多种细菌外毒素, 从而引发宿主细胞死亡, 组织破坏等, 另外, T2SS 对生物膜的形成至关重要, 因而对细菌耐药也有贡献^[55]。

由于对 T2SS 的精细结构和调控机制认识较晚, 目前 T2SS 抑制剂的研发仍处于起步阶段, 研究者陆续开发了以转运 ATPaseGspER^[55]、外膜膜孔蛋白 GspD^[56] 等为靶点或基于全细胞的高通量筛选体系应用于 T2SS 抑制剂的筛选, 部分化合物的活性已经在分子或细胞水平得到验证。

3.1 8-羟基喹啉类

8-羟基喹啉类是基于全细胞 (含生物发光报告

基因的铜绿假单胞菌) 高通量筛选方法得到一类 T2SS 抑制剂, 与 8-羟基喹啉类 T3SS 抑制剂具有相同的母核。目前筛选出的该类衍生物对铜绿假单胞菌弹性蛋白酶外膜分泌抑制率 IC₅₀ 在 13~32 μmol/L, 与同类型 T3SS 抑制剂相比结构多样性更高, 含氮脂环侧链可连接在喹啉环 5 位 (如化合物 **32**), 脂环上的芳香取代基不是影响活性的关键因素, 8-羟基被酯化仍可保留活性 (如化合物 **33**), 其中某些抑制剂, 如 INP1768 (**34**), 同时对 T3SS 和 T2SS 均有活性。对其他分泌蛋白而言, 只有含氮脂环上连有芳环后才会对铜绿假单胞菌磷脂酶 C 的分泌产生活性; 而 8-位羟基处于游离状态是抑制类鼻疽伯克氏菌 *Burkholderia pseudomallei* 蛋白酶的分泌所必需的, 若其被酯化, 则活性消失^[57]。8-羟基喹啉类 T2SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见图 16。

3.2 芳酰胺基硫脲类

芳酰胺基硫脲类也是通过全细胞高通量筛选体系得到的一类 T2SS 抑制剂。与 8-羟基喹啉类 T2SS 抑制剂类似, 该类抑制剂对分泌蛋白的酶活无显著影响, 仅干扰 T2SS 介导的蛋白分泌, 但与前者相比, 芳酰胺基硫脲类对铜绿假单胞菌弹性蛋白酶和磷脂酶 C 的外膜分泌抑制活性更高, 对内切蛋白酶分泌也有作用。由于目前仅筛选出少数此类衍生物, 其构效关系并不明确, 已报道的活性化合物结构非常接近, 化合物之间谷本系数 (Tanimoto coefficients)

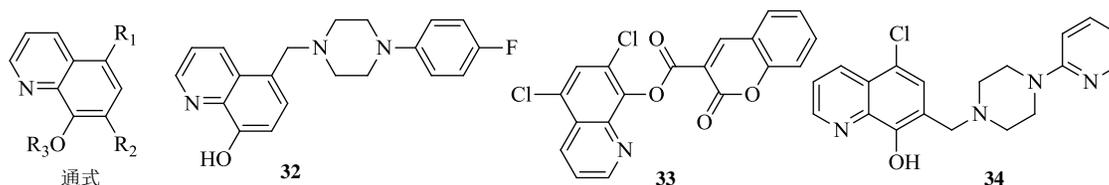


图 16 8-羟基喹啉类 T2SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例

Fig. 16 General and representative structures of 8-hydroxyquinoline T2SS inhibitors

均大于 0.9, 如化合物 35^[57]和 36^[58]。芳酰胺基硫脲类 T2SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例见表 17。

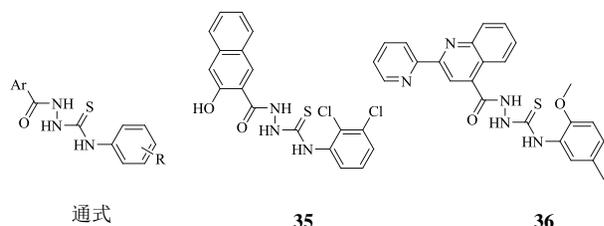


图 17 芳酰胺基硫脲类 T2SS 抑制剂的结构通式和衍生物实例
Fig. 17 General and representative structures of arylamidithiourea T2SS inhibitors

3.3 短肽类

假纤毛是 T2SS 的核心构件, 与 IV 型纤毛系统同源。在铜绿假单胞菌中, 多个假纤毛蛋白 (XcpT-X) 构成 T2SS 的顶端复合体, 其中 XcpV 和 XcpW 对 T2SS 发挥正常功能至关重要。根据上述两蛋白相互作用界面处氨基酸序列设计合成的短肽类抑制剂 Peptide 1 (37) 和 Peptide 2 (38), 均可有效减少 T2SS 介导的脂酶分泌, 显著增加宿主秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的存活率^[59]。上述短肽在序列中都保留了相互作用所必需的氨基酸, 并在肽链末端调整了亲水氨基酸以增加溶解度。根据相互作用界面氨基酸序列设计的短肽抑制剂见图 18。

XcpV	⁴⁸ MWIADNRLNELQ ⁵⁸
Peptide1	EWESDNRLNEEQ
XcpW	¹⁹⁵ GKLVKVVWRL ¹⁹⁸
Peptide1	TKLTRTWQR

图 18 根据相互作用界面氨基酸序列设计的短肽抑制剂
Fig. 18 Peptide inhibitors designed based on protein interaction interface of XcpV and XcpW

4 结语

II、III 和 IV 型分泌系统是细菌, 特别是革兰阴

性菌特有的细胞结构组件, 在致病菌中分布广泛, 且对细菌产生致病性至关重要, 因而已成为开发抗菌毒力药物的理想靶点。目前很多在研的分泌系统抑制剂都具备特异性高、选择压力较小、对宿主细胞低毒的特点, 某些抑制剂从发现至今已有近 20 年时间, 但目前还没有任何一种分泌系统抑制剂进入正式临床研究阶段, 很多仍处于高通量筛选得到的苗头化合物阶段。目前分泌系统抑制剂的开发难度在于:

4.1 作用靶蛋白不明确或不唯一

由于细菌分泌系统为膜蛋白复合体, 分离纯化具有相当的难度, 目前只有部分抑制剂是根据蛋白晶体结构理性设计合成的, 以亚水杨基酰肼为代表的很多抑制剂最初都是通过全细胞高通量筛选得到的。在靶点不明确的前提下难以阐述构效关系, 某些抑制剂虽然在体外分子水平上呈现不错的活性, 但由于没有构效关系指导结构优化, 始终无法克服成药性上的缺陷。

4.2 靶标专一性存在疑问

很多分泌系统抑制剂的作用靶点都是 ATPase (如 EscN、VirB11、TrwD 等), 有些 (如 2-硫代苯甲酰胺、咪唑并吡嗪之类) 是 ADP 的竞争性抑制剂。众所周知, ATPase 在真核和原核细胞中分布非常广泛, 尽管蛋白序列同源性上可能差异显著, 但由于 ATP 水解机制的保守性, ATPase 的 ATP 或 ADP 结合位点也可能存在一定的相似性。研究证实最初以 EscN ATPase 虚拟筛选得到的 2-硫代苯甲酰胺类抑制剂, 对 PscN ATPase 也有抑制作用, 尽管分属于大肠杆菌和铜绿假单胞菌的这两种 T3SS ATPase 的序列同源性仅有 50%, 后期研究还发现该类化合物对 T2SS ATPase 同样有活性^[60], 甚至对细菌的非 T3SS ATPase 有普遍抑制作用^[61]。另外, 噻二唑啉二酮类 T4SS 抑制剂对细菌非 VirB11 型 ATPase 及宿主细胞中的各类 ATPase 均存在抑制作用。因此

不能忽视以分泌系统 ATPase 为靶标的抑制剂存在相当大的脱靶风险。

4.3 抗菌谱较窄

相比 T3SS 抑制剂, T4SS 和 T2SS 抑制剂的菌种抑制谱相对较窄。很多以某一致病菌分泌系统关键蛋白为靶标筛选出的抑制剂, 在其他同类型分泌系统中没有体现相应的活性, 或活性还无法证实。如虽然 VirB8 与接合质粒 pKM101 中的 TraE 等蛋白同源, 但以 VirB8 为靶标筛选出的亚水杨基酰肼类抑制剂对 pKM101 的接合转移作用无显著影响, 而以某些以 TraE 筛选出的同类型抑制剂又不能干扰 VirB8 形成二聚体。抑制谱窄意味着临床应用范围可能比较有限, 降低了进一步开发的價值。

4.4 抑制活性普遍较低

与一般抗菌药物相比, 现有各种分泌系统抑制剂的活性相对较低, IC₅₀ 值一般在微摩尔级, 几乎没有能达到纳摩尔级的化合物。由于起效浓度较大, 对化合物理化性质、药代特性和安全性的要求更高, 实现成药的难度更大。

尽管存在上述局限, 作为一种极具潜力的抗感染药物, 分泌系统抑制剂所具备的优势也不容忽视, 除了具备与其他抗细菌毒力因子药物类似的选择压力较小、不易产生耐药性的特点外, 很多分泌系统抑制剂的靶标位于阴性菌的外膜上, 如 T3SS 针状复合物、T4SS 的纤毛结构、T2SS 的假纤毛结构等, 抑制剂较容易达到作用部位, 从而规避了传统抗菌药物难以透膜和被外排泵排出的问题。随着更多蛋白组件被分离纯化并解析结构, 分泌系统抑制剂设计和结构优化效率也将获得更大的提升, 未来将会有更具成药性的小分子抑制剂进入开发阶段。

参考文献

- [1] Green E R, Meccas J. Bacterial secretion systems: an overview [J]. *Microbiol Spectr*, 2016, 4(1): 215-239.
- [2] Abby S S, Cury J, Guglielmini J, et al. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 23080.
- [3] 余乐正, 柳凤娟, 鄢南南, 等. 革兰氏阴性菌分泌系统及其分泌物研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2017, 38(8): 80-84.
- [4] Bitter W, Kuijl C. Targeting bacterial virulence: The coming out of type VII secretion inhibitors [J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 16(4): 430-432.
- [5] Anantharajah A, Buyck J M, Sundin C, et al. Salicylidene acylhydrazides and hydroxyquinolines act as inhibitors of type three secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa* by distinct mechanisms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(6): 1-17.
- [6] 汪莉, 王玉民, 黄培堂, 等. III型分泌系统分子伴侣研究进展 [J]. *微生物学报*, 2004, 44(6): 840-844.
- [7] Kauppi A M, Nordfelth R, Uvell H, et al. Targeting bacterial virulence: inhibitors of type III secretion in *Yersinia* [J]. *Chem Biol*, 2003, 10(3): 241-249.
- [8] Charro N, Mota L J. Approaches targeting the type III secretion system to treat or prevent bacterial infections [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2015, 10(4): 373-387.
- [9] Tree J J, Wang D, McInally C, et al. Characterization of the effects of salicylidene acylhydrazide compounds on type III secretion in *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Infect Immun*, 2009, 77(10): 4209-4220.
- [10] Tsou L K, Dossa P D, Hang H C. Small molecules aimed at type III secretion systems to inhibit bacterial virulence [J]. *MedChemComm*, 2013, 4(1): 68-79.
- [11] Negrea A, Bjur E, Ygberg S E, et al. Salicylidene acylhydrazides that affect type III protein secretion in *Salmonella enterica* serovar typhimurium [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(8): 2867-2876.
- [12] Dahlgren M K, Zetterström C E, Gylfe Å, et al. Statistical molecular design of a focused salicylidene acylhydrazide library and multivariate QSAR of inhibition of type III secretion in the Gram-negative bacterium *Yersinia* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(7): 2686-2703.
- [13] Nordfelth R, Kauppi A M, Norberg H A, et al. Small-molecule inhibitors specifically targeting type III secretion [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(5): 3104-3114.
- [14] Wang D, Zetterström C E, Gabrielsen M, et al. Identification of bacterial target proteins for the salicylidene acylhydrazide Class of virulence-blocking compounds [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(34): 29922-29931.
- [15] Anantharajah A, Mingeot-Leclercq M P, Van Bambeke F. Targeting the type three secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2016, 37(9): 734-749.
- [16] Enquist P A, Gylfe Å, Hägglund U, et al. Derivatives of 8-hydroxyquinoline - antibacterial agents that target intra- and extracellular Gram-negative pathogens [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(10): 3550-3553.
- [17] Bowser T E, Bartlett V J, Grier M C, et al. Novel anti-infection agents: small-molecule inhibitors of bacterial transcription factors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(20): 5652-5655.
- [18] Kim O K, Garrity-Ryan L K, Bartlett V J, et al. *N*-hydroxybenzimidazole inhibitors of the transcription factor LcrF in *Yersinia*: Novel antivirulence agents [J]. *J*

- Med Chem*, 2009, 52(18): 5626-5634.
- [19] Grier M C, Garrity-Ryan L K, Bartlett V J, *et al.* *N*-Hydroxybenzimidazole inhibitors of ExsA MAR transcription factor in *Pseudomonas aeruginosa*: *in vitro* anti-virulence activity and metabolic stability [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(11): 3380-3383.
- [20] Marsden A E, King J M, Spies M A, *et al.* Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* ExsA DNA-binding activity by *N*-hydroxybenzimidazoles [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(2): 766-776.
- [21] Charkowski A O, Peng Q, Wang Q, *et al.* The plant phenolic compound *p*-coumaric acid represses gene expression in the *Dickeya dadantii* type III secretion system [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 75(5): 1223-1228.
- [22] Yang S, Peng Q, San Francisco M, *et al.* Type III secretion system genes of *Dickeya dadantii* 3937 are induced by plant phenolic acids [J]. *PLoS One*, 2008, 3(8): 21-24.
- [23] Yamazaki A, Li J, Zeng Q, *et al.* Derivatives of plant phenolic compound affect the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* via a GacS-GacA two-component signal transduction system [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(1): 36-43.
- [24] Jiang S, Li H, Ahmed W, *et al.* Discovery of ethyl 2-nitro-3-arylacrylates molecules as T3SS inhibitor reducing the virulence of plant pathogenic bacteria *xanthomonas* [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 1874.
- [25] Tosi T, Estrozi L F, Job V, *et al.* Structural similarity of secretins from type II and type III secretion systems [J]. *Structure*, 2014, 22(9): 1348-1355.
- [26] Felise H B, Nguyen H V., Pfuetzner R A, *et al.* An inhibitor of Gram-negative bacterial virulence protein secretion [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 4(4): 325-336.
- [27] Lv Q, Chu X, Yao X, *et al.* Inhibition of the type III secretion system by syringaldehyde protects mice from salmonella enterica serovar typhimurium [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(7): 4679-4688.
- [28] Kline T, Felise H B, Barry K C, *et al.* Substituted 2-imino-5-arylidene-thiazolidin-4-one inhibitors of bacterial type III secretion [J]. *J Med Chem*, 2008, 51(22): 7065-7074.
- [29] Kline T, Barry K C, Jackson S R, *et al.* Tethered thiazolidinone dimers as inhibitors of the bacterial type III secretion system [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(5): 1340-1343.
- [30] Bowlin N O, Williams J D, Knoten C A, *et al.* Mutations in the *Pseudomonas aeruginosa* needle protein gene *pscF* confer resistance to phenoxyacetamide inhibitors of the type III secretion system-[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(4): 2211-2220.
- [31] Aiello D, Williams J D, Majgier-Baranowska H, *et al.* Discovery and characterization of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion-[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5): 1988-1999.
- [32] Williams J D, Torhan M C, Neelagiri V R, *et al.* Synthesis and structure-activity relationships of novel phenoxyacetamide inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system (T3SS)-[J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23(5): 1027-1043.
- [33] 张成芳, 吴小刚, 李燕, 等. 铜绿假单胞菌 PAO1III型分泌系统新型抑制剂的合成和生物活性研究 [J]. 有机化学, 2013, 33(6): 1309.
- [34] Bzdziun L, Krezel H, Wrzeszcz K, *et al.* Design of small molecule inhibitors of type III secretion system ATPase EscN from enteropathogenic *Escherichia coli* [J]. *Acta Biochim Pol*, 2017, 64(1): 49-63.
- [35] Wang C, Liu X, Wang J, *et al.* Design and characterization of a polyamine derivative inhibiting the expression of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(7): 1-13.
- [36] Harmon D E, Davis A J, Castillo C, *et al.* Identification and characterization of small-molecule inhibitors of Yop translocation in *Yersinia pseudotuberculosis* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(8): 3241-3254.
- [37] Swietnicki W, Carmany D, Retford M, *et al.* Identification of small-molecule inhibitors of *Yersinia pestis* type III secretion system YscN atpase [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19716.
- [38] Yin S, Davis R A, Shelper T, *et al.* Pseudoceramines A-D, new antibacterial bromotyrosine alkaloids from the marine sponge *Pseudoceratina sp.* [J]. *Organic Biomol Chem*, 2011, 9(19): 6755-6760.
- [39] Zetterström C E, Hasselgren J, Salin O, *et al.* The resveratrol tetramer (-)-hopeaphenol inhibits type III secretion in the gram-negative pathogens *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): 1-12.
- [40] McHugh R E, O'Boyle N, Connolly J P R, *et al.* Characterization of the mode of action of aurodox, a type III secretion system inhibitor from streptomyces goldiniensis [J]. *Infect Immun*, 2019, 87(2): 1-12.
- [41] Ma Y, Chen L, Si N, *et al.* Identification of benzyloxy carbonimidoyl dicyanide derivatives as novel type III secretion system inhibitors via high-throughput screening [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 1059-1069.

- [42] Tao H, Tian H, Jiang S, *et al.* Synthesis and biological evaluation of 1,3,4-thiadiazole derivatives as type III secretion system inhibitors against *Xanthomonas oryzae* [J]. *Pestic Biochem Phys*, 2019, 160(3): 87-94.
- [43] Low H H, Gubellini F, Rivera-Calzada A, *et al.* Structure of a type IV secretion system [J]. *Nature*, 2014, 508(7497): 550-553.
- [44] Shaffer C L, Good J A D, Kumar S, *et al.* Peptidomimetic small molecules disrupt type IV secretion system activity in diverse bacterial pathogens [J]. *mBio*, 2016, 7(2): 1-10.
- [45] Baron C. Antivirulence drugs to target bacterial secretion systems [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13(1): 100-105.
- [46] Hilleringmann M, Pansegrau W, Doyle M, *et al.* Inhibitors of *Helicobacter pylori* ATPase Caga block CagA transport and cag virulence [J]. *Microbiology*, 2006, 152(10): 2919-2930.
- [47] Sayer J R, Walldén K, Pesnot T, *et al.* 2- and 3-substituted imidazo[1,2-a]pyrazines as inhibitors of bacterial type IV secretion [J]. *Bioorg Med Chem*, 2014, 22(22): 6459-6470.
- [48] Paschos A, Den Hartigh A, Smith M A, *et al.* An *in vivo* high-throughput screening approach targeting the type IV secretion system component VirB8 identified inhibitors of *Brucella abortus* 2308 proliferation [J]. *Infect Immun*, 2011, 79(3): 1033-1043.
- [49] Smith M A, Coinon M, Paschos A, *et al.* Identification of the binding site of *Brucella* VirB8 interaction inhibitors [J]. *Chem Biol*, 2012, 19(8): 1041-1048.
- [50] Casu B, Smart J, Hancock M A, *et al.* Structural Analysis and inhibition of TraE from the pKM101 type IV secretion system [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(45): 23817-23829.
- [51] Casu B, Arya T, Bessette B, *et al.* Fragment-based screening identifies novel targets for inhibitors of conjugative transfer of antimicrobial resistance by plasmid pKM101 [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1-7.
- [52] Cabezón E, De La Cruz F, Arechaga I. Conjugation inhibitors and their potential use to prevent dissemination of antibiotic resistance genes in bacteria [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 1-7.
- [53] Getino M, Fernández-López R, Palencia-Gándara C, *et al.* Tanzawaic acids, a chemically novel set of bacterial conjugation inhibitors [J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): 1-13.
- [54] García-Cazorla Y, Getino M, Sanabria-Rós D J, *et al.* Conjugation inhibitors compete with palmitic acid for binding to the conjugative traffic ATPase TrwD, providing a mechanism to inhibit bacterial conjugation [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(43): 16923-16930.
- [55] Arifuzzaman M, Mitra S, Jahan S I, *et al.* A Computational workflow for the identification of the potent inhibitor of type II secretion system traffic ATPase of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Comput Biol Chem*, 2018, 76: 191-201.
- [56] Waack U, Johnson T L, Chedid K, *et al.* Targeting the type II secretion system: development, optimization, and validation of a high-throughput screen for the identification of small molecule inhibitors [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 1-12.
- [57] Moir D T, Di M, Wong E, *et al.* Development and application of a cellular, gain-of-signal, bioluminescent reporter screen for inhibitors of type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia pseudomallei* [J]. *J Biomol Screen*, 2011, 16(7): 694-705.
- [58] Massai F, Saleeb M, Doruk T, *et al.* Development, optimization, and validation of a high throughput screening assay for identification of *tat* and type II secretion inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 250.
- [59] Zhang Y, Faucher F, Zhang W, *et al.* Structure-guided disruption of the pseudopilus tip complex inhibits the Type II secretion in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14(10): 1-27.
- [60] Swietnicki W, Czarny A, Antkowiak L, *et al.* Identification of a potent inhibitor of type II secretion system from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 513(3): 688-693.
- [61] Swietnicki W, Czarny A, Urbanska N, *et al.* Identification of small molecule compounds active against *Staphylococcus aureus* and *Proteus mirabilis* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(4): 1047-1051.