

鸟氨酸拟肽类外排泵抑制剂合成及增效抗生素对抗铜绿假单胞菌活性研究

朱 喜, 马西灿, 张昕彤, 刘忆霜, 何 宁, 解云英, 宋丹青*

(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)

摘要: 为解决铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 对多类抗生素耐药难题, 寻找 *P. aeruginosa* 外排泵抑制剂是一条有效途径。本研究以二肽类外排泵抑制剂 PA β N 为先导物, 通过改变天然氨基酸侧链结构, 设计合成 15 个全新的鸟氨酸拟肽类衍生物, 评价了其协同单环 β -内酰胺类抗生素氨曲南对抗 *P. aeruginosa* 活性。其中, 化合物 **12b** 不仅可增强 β -内酰胺类抗生素, 包括氨曲南、头孢他啶、美罗培南的抗菌活性, 还可显著增强大环内酯类抗生素克拉霉素的抗菌作用, 显示出广谱的协同增敏作用。此外, 化合物 **12b** 还具有良好的安全性。初步机制显示, **12b** 直接靶向向外排转运体 MexB 发挥作用。研究结果为发展一类新型的对抗 MDR *P. aeruginosa* 的外排泵抑制剂提供了新先导化合物。

关键词: 外排泵抑制剂; 合成; 铜绿假单胞菌; 协同活性; MexAB-OprM

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)06-1720-10

Synthesis of ornithine peptidomimetic efflux pump inhibitors and synergistic antibiotic activity against *Pseudomonas aeruginosa*

ZHU Xi, MA Xi-can, ZHANG Xin-tong, LIU Yi-shuang, HE Ning, XIE Yun-ying, SONG Dan-qing*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: In order to solve the problem of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to multiple antibiotics, it is an effective way to find inhibitors of *P. aeruginosa* efflux pump. In this study, 15 new ornithine peptidomimetic derivatives were designed and synthesized by changing the side chain structure of natural amino acids with PA β N, a dipeptide efflux pump inhibitor, and their synergic activity with aztreonam, a monocyclic β -lactam antibiotic, against *P. aeruginosa* was evaluated. Among them, the representative compound **12b** not only enhanced the antibacterial activity of β -lactam antibiotics aztreonam, ceftazidime and meropenem, but also significantly enhanced the antibacterial action of macrolide antibiotics clarithromycin, showing a broad-spectrum synergic sensitization effect. In addition, compound **12b** also has a good safety. Preliminary mechanisms suggest that **12b** works by directly targeting the efflux transporter MexB. These results provide a new lead compound for the development of a new class of efflux pump inhibitors against *P. aeruginosa*.

Key words: efflux pump inhibitor; synthesis; *Pseudomonas aeruginosa*; synergistic activity; MexAB-OprM

多药耐药 (MDR) 细菌在全球范围内的广泛传播对全球公共卫生健康造成巨大威胁^[1-5]。世界卫生组织

公布了一份迫切需要开发新的抗微生物药物的病原体清单, 其中包括绿假单胞菌^[6,7] (*P. aeruginosa*)。 *P. aeruginosa* 是一种革兰阴性病原体, 可造成重症和免疫功能低下的人群感染^[8]。药物外排泵的表达以及外膜通透性的降低, 是造成 *P. aeruginosa* 对抗生素耐药并引起广泛传播的主要原因^[9]。 *P. aeruginosa* 存在

收稿日期: 2024-02-01; 修回日期: 2024-03-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (32141003); 中国医学科学院医学科学创新基金项目 (2021-12M-1-070).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165268, E-mail: songdanqingsdq@sina.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0104

多种药物外排泵, 其中 MexAB-OprM 是与抗生素耐药性有关的主要外排系统^[10-12]。因此, 寻找靶向关键外排泵的药物可能为恢复病原体的药物敏感性提供新的策略。目前, 靶向 *P. aeruginosa* 的外排泵抑制剂 (EPI) 主要有 3 类: 第一类是基于吡啶并嘧啶结构的 EPI, 代表性化合物 ABI-PP^[13] (图 1) 与 *P. aeruginosa* 外排系统中 MexB 发生特异性结合, 从而抑制部分药物外排, 但不抑制其他外排系统如 MexY^[14], 限制其发展为治疗 MDR *P. aeruginosa* 药物; 第二类 EPI 代表性化合物 TXA09155 (图 1) 可抑制多种药物外排系统, 增强野生型与 MDR *P. aeruginosa* 中抗生素的敏感性, 发挥广谱外排抑制作用, 但其在低浓度下抑制 hERG 引发关注^[15], 还需进一步优化; 最后一类是临床研究较广泛的二肽类化合物苯丙氨酸-精氨酸- β -萘酰胺 (PA β N, 图 1), 是 *P. aeruginosa* 中多种外排系统的底物, 可以竞争性抑制药物外排。PA β N 是第一个广谱的二肽类 EPI, 可以恢复 MDR *P. aeruginosa* 对抗生素的敏感性^[16]。但其稳定性差, 且存在潜在的肾毒性, 限制了在临床进一步应用^[17]。综上, 由于多种原因, 目前尚无 EPI 作为抗生素佐剂被批准用于临床, 急需开发新的 EPI。

据此, 本课题以 PA β N 为先导化合物, 首先将 PA β N 的 A 部分侧链胍基替换为氨基, 使 A 侧链的精氨酸结构变换为鸟氨酸结构; 其次, 将侧链 B 部分的苯丙氨酸结构替换为 β -氨基-苯丁酸和 β -氨基-萘丁酸, 以解决 PA β N 中含有天然氨基酸结构引起的代谢不稳定, 提高先导化合物的活性并改善其成药性, 同时在苯环的对位引入各种吸电子与给电子基团, 观察各类取代基对化合物活性的影响; 最后还根据生物电子等排

原理将 C 部分的 2-萘胺替换为 3-氨基喹啉, 从而设计合成了一类新型的鸟氨酸拟肽类衍生物。

继而, 采用棋盘法评价该类化合物协同抗生素对抗 *P. aeruginosa* 的活性, 同时对化合物进行了安全性评价, 并初步探讨了鸟氨酸拟肽类结构类型的化合物对 *P. aeruginosa* 外排泵的影响。

结果与讨论

1 化学合成

目标化合物的合成见合成路线 1, 将缩合剂 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDCI) 与 1-羟基苯并三唑 (HOBT) 加入起始原料 **2a**~**2m** 的超干乙酸乙酯溶液^[18] (加热时, DCM 沸点较低溶剂损耗较多, 而 DMF 在反应完成后难以旋蒸除去, 影响产物纯度, 因此最终采用乙酸乙酯作为缩合溶剂) 中, 50 °C 搅拌 30 min, 然后加入 **1a** 和 **1b**, 50 °C 搅拌 8 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **3a**~**3m**; 将反应中间体 **3a**~**3m** 加入装有超干二氯甲烷的烧瓶中, 再加入三氟乙酸 (TFA), 室温搅拌 2 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **4a**~**4m**。将 HOBT 和 EDCI 加入到搅拌中的 **5a** 的超干乙酸乙酯溶液中, 在室温下搅拌 30 min, 然后加入中间体 **4a**~**4m**, 室温搅拌 8 h, TLC 检测反应完全, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **6a**~**6m**; 将反应中间体加入装有超干二氯甲烷的烧瓶中, 加入 TFA, 室温搅拌 2 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到目

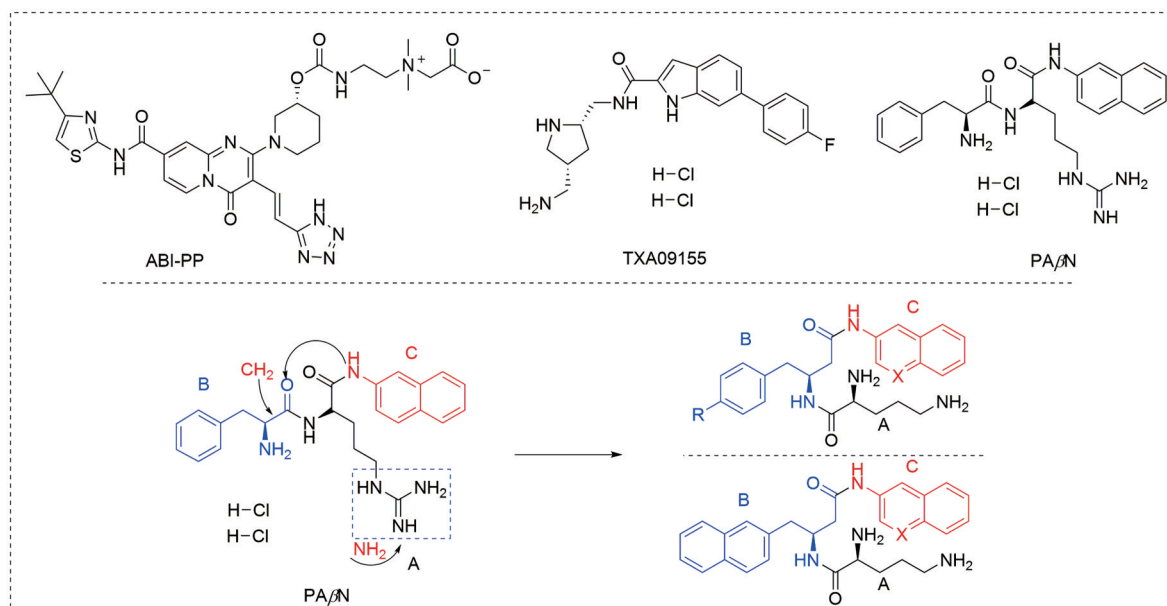


Figure 1 Chemical structures of efflux pump inhibitors (EPIs) and target compounds

标终产物 **7a**~**7m**, 总产率为4%~38%。

将EDCI与HOBT加入起始原料**8a**的超干乙酸乙酯溶液中, 50 °C搅拌30 min, 然后加入**1a**和**1b**, 50 °C继续搅拌8 h, TLC检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体**9a**和**9b**; 将**9a**和**9b**加入装有超干二氯甲烷的烧瓶中, 再加入TFA, 室温搅拌2 h, TLC检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物继续用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体**10a**和**10b**。将HOBT和EDCI加入到搅拌中的**5a**的超干乙酸乙酯溶液中, 在室温下搅拌30 min, 然后加入中间体**10a**和**10b**, 室温搅拌8 h, TLC检测反应完全, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体**11a**和**11b**; 将反应中间体加入装有超干二氯甲烷的烧瓶中, 加入TFA, 室温搅拌2 h, TLC检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到目标终产物**12a**和**12b**, 总产率为11%。

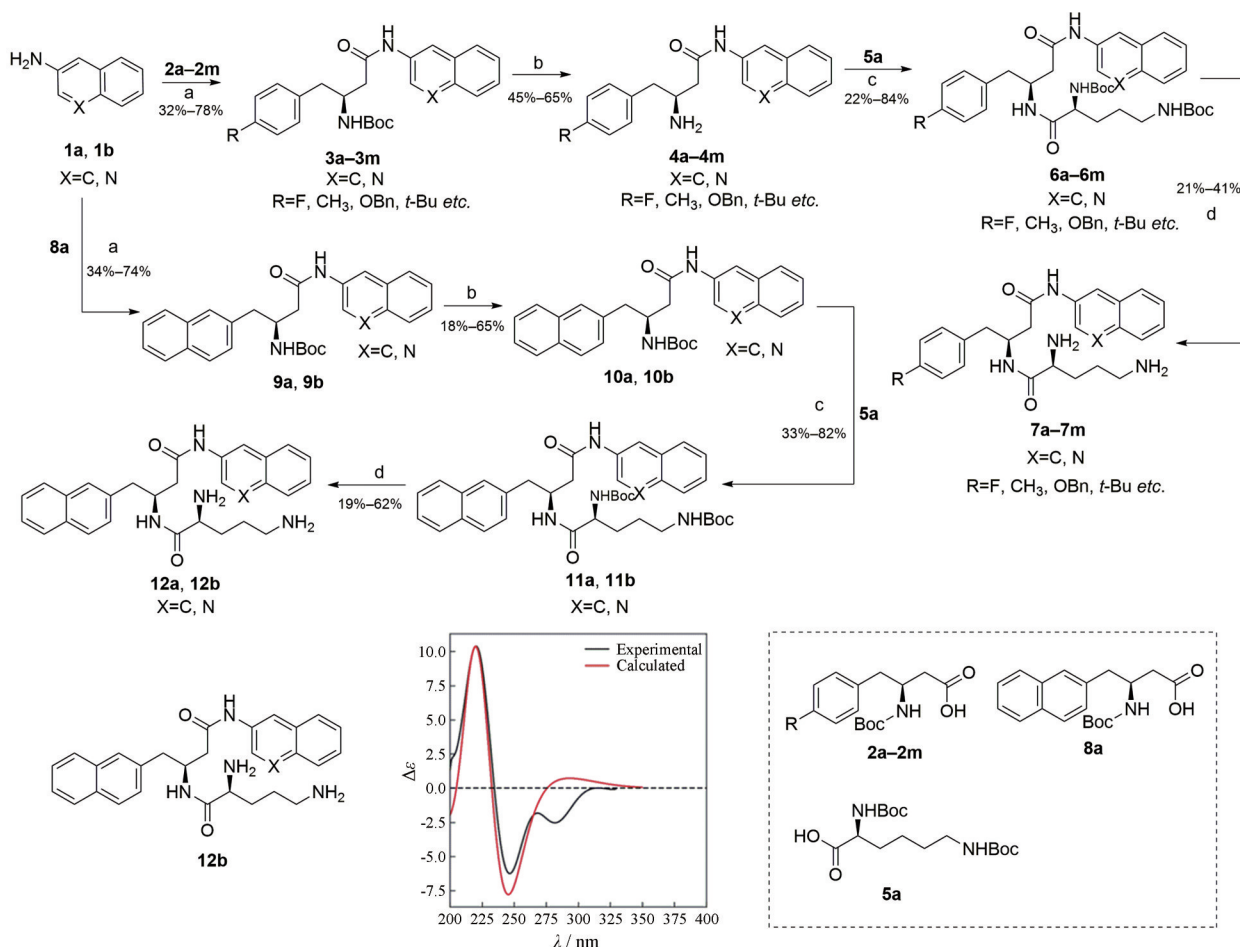
采用高斯计算方法, 在B3LYP/6-311G(d,p)水平, 基于时间依赖性密度泛函理论(TDDFT)在0.5 eV的半频

带宽度下得到代表性化合物**12b**的理论圆二色谱(ECD), 见合成路线1, 与实验得到的ECD光谱高度相似, 表明此类化合物的构型(*S,S*)即为预测构型(*S,S*)。

所有化合物结构经¹H NMR、¹³C NMR及HR-MS分析确证, 目标化合物的收率、理化参数和波谱数据见表1。

2 协同抗生素抗铜绿假单胞菌的活性评价

本课题共设计合成了15个全新的鸟氨酸拟肽类衍生物, 其协同单环β-内酰胺类抗生素氨基曲南(AZT)对抗铜绿假单胞菌的活性及结构见表2。所有化合物活性的测定均以二肽类外排泵抑制剂PAβN作为对照药物。活性数据结果显示, 引入氨基使苯丙氨酸结构变为β-氨基-苯丁酸^[16], 并在β-氨基-苯丁酸对位引入不同的吸电子与给电子基团包括叔丁基、苄氧基、氰基、硝基、甲氧基等时, 部分化合物对AZT显示出一定程度的增敏作用, 并且引入给电子基团时, 衍生物增敏AZT的作用优于吸电子基团的引入, 特别是叔丁基的引入使化合物**7h**将AZT的MIC由2 μg·mL⁻¹降低至



Scheme 1 Synthetic routes of all the target compounds and circular dichroism of compound **12b**. Reagents and conditions: (a) EDCI, HOBT, EA, 50 °C, 8 h; (b) TFA, rt, 2 h; (c) EDCI, HOBT, EA, rt, 8 h; (d) TFA, rt, 2 h

0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, FICI 值 (fractional inhibitory concentration index) 小于 0.5, 对 AZT 有显著协同作用, 而当 3-氨基喹啉替代 2-萘胺时, 活性无显著变化; 接着将 β -氨基-苯丁酸替换为 β -氨基-萘丁酸, 同时将 2-萘胺替换为 3-氨基喹啉时, 衍生物 **12b** 的协同增敏活性进一步增强, FICI 值为 0.375, 活性显著优于对照药物 PA/ βN 。

Table 1 Physical properties and spectra data of all synthesized compounds

Compd.	Yield /%	mp /°C	¹ H NMR (600 MHz, CD ₃ OD) δ	¹³ C NMR (150 MHz, CD ₃ OD) δ	HR-ESI-MS
					<i>m/s</i> Formula Calcd. Found
7a	38	78.8–80.8	8.14–8.13 (m, 1H), 7.81 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.48–7.44 (m, 1H), 7.42–7.39 (m, 1H), 7.34–7.30 (m, 4H), 7.25–7.22 (m, 1H), 4.70–4.64 (m, 1H), 3.79 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.00 (dd, $J = 13.7, 7.0$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J = 13.7, 7.1$ Hz, 1H), 2.76–2.69 (m, 3H), 2.57 (dd, $J = 14.7, 9.4$ Hz, 1H), 1.88–1.73 (m, 2H), 1.69–1.60 (m, 2H).	170.3, 168.1, 137.7, 135.7, 133.8, 130.8, 129.1 (2), 128.3, 128.2 (2), 127.2, 127.1, 126.4, 126.2, 124.8, 120.1, 116.8, 52.4, 48.9, 40.4, 40.2, 38.5, 28.4, 22.3.	[M+H] ⁺ : C ₂₅ H ₃₁ N ₄ O ₂ 419.244 2 419.242 2
7b	12	112.2–114.0	8.18 (m, 1H), 7.80–7.75 (m, 3H), 7.55 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.46–7.43 (m, 1H), 7.40–7.37 (m, 1H), 7.35–7.33 (m, 2H), 7.23–7.22 (m, 2H), 4.66–4.61 (m, 1H), 2.95–2.87 (m, 2H), 2.74–2.65 (m, 3H), 2.61 (dd, $J = 14.5, 8.8$ Hz, 1H), 1.69–1.48 (m, 5H), 1.28 (s, 9H).	161.8, 161.6, 135.8, 134.8, 133.8, 128.9 (2), 128.1, 127.2, 127.1, 126.1, 125.0 (2), 124.7, 120.0, 117.8, 116.5, 115.9, 53.8, 48.5, 48.2, 40.8, 38.9, 33.8, 31.3, 30.4 (3), 23.6.	[M+H] ⁺ : C ₂₉ H ₃₉ N ₄ O ₂ 475.306 8 475.305 2
7c	24	67.2–69.1	8.12 (m, 1H), 7.80 (t, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.76 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.53–7.51 (m, 1H), 7.47–7.44 (m, 1H), 7.41–7.39 (m, 3H), 7.37–7.34 (m, 2H), 7.31–7.28 (m, 1H), 7.23–7.20 (m, 2H), 6.95–6.94 (m, 2H), 5.02 (s, 2H), 4.64–4.61 (m, 1H), 3.88–3.86 (m, 1H), 2.94 (dd, $J = 13.8, 6.7$ Hz, 1H), 2.85 (dd, $J = 13.8, 7.2$ Hz, 1H), 2.75–2.70 (m, 3H), 2.58–2.54 (m, 1H), 1.91–1.78 (m, 2H), 1.70–1.64 (m, 2H).	170.3, 167.5, 157.8, 137.4, 135.7, 133.8, 130.8, 130.1 (2), 129.8, 128.3, 128.1 (2), 127.5, 127.3, 127.1 (3), 126.2, 124.8, 120.1, 116.8, 114.7 (2), 69.6, 52.3, 49.1, 40.5, 39.5, 38.5, 28.1, 22.2.	[M+H] ⁺ : C ₃₂ H ₃₇ N ₄ O ₃ 525.286 0 525.286 1
7d	21	85.9–87.9	8.14–8.13 (m, 1H), 7.81 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.69–7.68 (m, 2H), 7.53–7.49 (m, 3H), 7.48–7.45 (m, 1H), 7.43–7.37 (m, 1H), 4.75–4.69 (m, 1H), 3.85 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.05 (dd, $J = 7.0, 3.1$ Hz, 2H), 2.77 (dd, $J = 14.7, 4.4$ Hz, 1H), 2.74–2.69 (m, 2H), 2.59 (dd, $J = 14.7, 9.4$ Hz, 1H), 1.91–1.76 (m, 2H), 1.69–1.62 (m, 2H).	169.9, 167.6, 143.7, 135.6, 133.8, 132.0 (2), 130.8, 130.2 (2), 128.3, 127.3, 127.1, 126.3, 124.9, 120.0, 118.3, 116.8, 110.3, 52.2, 40.6, 40.2, 38.5, 28.1, 27.6, 22.2.	[M+H] ⁺ : C ₂₆ H ₃₀ N ₅ O ₂ 444.239 4 444.237 6
7e	34	78.4–80.4	8.12 (m, 1H), 7.81 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.47–7.44 (m, 1H), 7.42–7.39 (m, 1H), 7.19–7.12 (m, 4H), 4.67–4.61 (m, 1H), 3.85 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 2.96 (dd, $J = 13.7, 6.8$ Hz, 1H), 2.87 (dd, $J = 13.7, 7.2$ Hz, 1H), 2.75–2.70 (m, 3H), 2.55 (dd, $J = 14.7, 9.5$ Hz, 1H), 2.29 (s, 3H), 1.91–1.77 (m, 2H), 1.69–1.63 (m, 2H).	170.3, 167.5, 136.1, 135.6, 134.5, 133.8, 130.8, 129.0 (2), 128.8 (2), 128.3, 127.2, 127.1, 126.2, 124.8, 120.1, 116.8, 52.3, 49.0, 40.4, 39.9, 38.5, 28.1, 22.2, 19.7.	[M+H] ⁺ : C ₂₅ H ₃₃ N ₄ O ₂ 433.259 8 433.258 1
7f	21	46.7–48.7	8.13 (m, 1H), 7.82–7.79 (m, 2H), 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.52 (dd, $J = 8.8, 2.1$ Hz, 1H), 7.47–7.44 (m, 1H), 7.42–7.39 (m, 1H), 7.32–7.30 (m, 2H), 7.06–7.02 (m, 2H), 4.66–4.63 (m, 1H), 3.86 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H), 2.95 (qd, $J = 13.9, 7.0$ Hz, 2H), 2.76–2.69 (m, 3H), 2.57 (dd, $J = 14.7, 9.4$ Hz, 1H), 1.89–1.79 (m, 2H), 1.69–1.64 (m, 2H).	170.2, 167.6, 161.9, 135.6, 133.8, 133.6, 130.8, 130.8, 130.7, 128.3, 127.3, 127.1, 126.2, 124.8, 120.1, 116.8, 114.9, 114.8, 52.3, 48.9, 40.5, 39.3, 38.5, 28.1, 22.2.	[M+H] ⁺ : C ₂₅ H ₃₀ FN ₄ O ₂ 437.234 7 437.233 3
7g	8	72.8–74.8	8.21–8.18 (m, 2H), 8.13 (m, 1H), 7.81 (t, $J = 9.3$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.56–7.51 (m, 3H), 7.48–7.45 (m, 1H), 7.42–7.39 (m, 1H), 4.78–4.73 (m, 1H), 3.87–3.85 (m, 1H), 3.14–3.06 (m, 2H), 2.82–2.72 (m, 3H), 2.64–2.60 (m, 1H), 1.91–1.77 (m, 2H), 1.69–1.63 (m, 2H).	169.9, 167.6, 147.0, 145.7, 135.6, 133.8, 130.8, 130.2 (2), 128.3, 127.3, 127.1, 126.3, 124.9, 123.2 (2), 120.0, 116.8, 52.2, 48.5, 40.7, 39.9, 38.5, 28.1, 22.2.	[M+H] ⁺ : C ₂₅ H ₃₀ N ₅ O ₄ 464.229 2 464.227 8
7h	11	67.3–68.6	8.13 (s, 1H), 7.82–7.79 (m, 2H), 7.76 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.53–7.51 (m, 1H), 7.47–7.44 (m, 1H), 7.42–7.39 (m, 1H), 7.22–7.20 (m, 2H), 6.88–6.86 (m, 2H), 4.64–4.60 (m, 1H), 3.87–3.86 (m, 1H), 3.75 (m, 3H), 2.93 (dd, $J = 13.9, 6.9$ Hz, 1H), 2.87–2.83 (m, 1H), 2.75–2.70 (m, 3H), 2.58–2.53 (m, 1H), 1.91–1.77 (m, 2H), 1.69–1.63 (m, 2H).	170.4, 167.5, 158.7, 135.7, 133.8, 130.8, 130.0 (2), 129.5, 128.3, 127.2, 127.1, 126.2, 124.8, 120.1, 116.8, 113.6 (2), 54.2, 52.3, 49.1, 40.4, 39.4, 38.5, 28.1, 22.2.	[M+H] ⁺ : C ₂₆ H ₃₃ N ₄ O ₃ 449.254 7 449.253 3

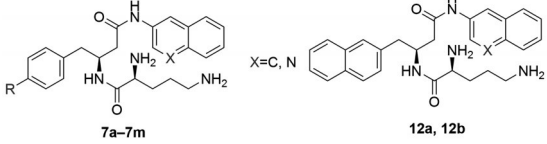
Compd.	Yield /%	mp /°C	¹ H NMR (600 MHz, CD ₃ OD) δ	¹³ C NMR (150 MHz, CD ₃ OD) δ	Continued
					HR-ESI-MS <i>m/z</i> Formula Calcd. Found
7i	4	56.0–58.0	8.97–8.96 (m, 1H), 8.63–8.62 (m, 1H), 7.98 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.90–7.89 (m, 1H), 7.72–7.69 (m, 1H), 7.63–7.60 (m, 1H), 7.32–7.29 (m, 4H), 7.23–7.20 (m, 1H), 4.68–4.66 (m, 1H), 3.89–3.87 (m, 1H), 3.03 (dd, <i>J</i> = 13.8, 7.1 Hz, 1H), 2.94 (dd, <i>J</i> = 13.7, 7.1 Hz, 1H), 2.86–2.83 (m, 2H), 2.78 (dd, <i>J</i> = 14.9, 4.6 Hz, 1H), 2.68–2.64 (m, 1H), 1.95–1.90 (m, 1H), 1.86–1.80 (m, 1H), 1.76–1.71 (m, 2H).	170.7, 167.8, 144.0, 143.8, 137.7, 132.5, 129.1 (2), 128.7, 128.4, 128.2 (2), 127.5, 127.4, 127.2, 126.4, 124.8, 52.3, 48.9, 40.5, 40.1, 38.6, 28.2, 22.4.	[M+H] ⁺ : C ₂₄ H ₃₀ N ₅ O ₂ 420.239 4 420.238 3
7j	33	98.5–100.5	8.97–8.96 (m, 1H), 8.63–8.62 (m, 1H), 7.98 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.90–7.89 (m, 1H), 7.72–7.69 (m, 1H), 7.63–7.60 (m, 1H), 7.32–7.29 (m, 4H), 7.23–7.20 (m, 1H), 4.68–4.66 (m, 1H), 3.89–3.87 (m, 1H), 3.03 (dd, <i>J</i> = 13.8, 7.1 Hz, 1H), 2.94 (dd, <i>J</i> = 13.7, 7.1 Hz, 1H), 2.86–2.83 (m, 2H), 2.78 (dd, <i>J</i> = 14.9, 4.6 Hz, 1H), 2.68–2.64 (m, 1H), 1.95–1.90 (m, 1H), 1.86–1.80 (m, 1H), 1.76–1.71 (m, 2H).	170.7, 167.8, 144.0, 143.8, 137.7, 132.5, 129.1 (2), 128.7, 128.4, 128.2 (2), 127.5, 127.4, 127.2, 126.4, 124.8, 52.3, 48.9, 40.5, 40.1, 38.6, 28.2, 22.4.	[M+H] ⁺ : C ₂₄ H ₂₉ N ₆ O ₄ 465.224 5 465.222 7
7k	33	84.8–85.7	8.99 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.99 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.91–7.90 (m, 1H), 7.73–7.70 (m, 1H), 7.64–7.61 (m, 1H), 7.30 (m, 4H), 4.68–4.63 (m, 1H), 3.88 (s, 1H), 3.00–2.93 (m, 2H), 2.85–2.77 (m, 3H), 2.65 (dd, <i>J</i> = 14.3, 8.6 Hz, 1H), 1.92 (s, 1H), 1.84–1.73 (m, 3H).	170.5, 167.8, 144.2, 144.1, 136.4, 132.5, 132.3, 130.7 (2), 128.5, 128.3 (3), 127.5 (2), 127.3, 124.5, 52.3, 48.7, 40.5, 39.3, 38.6, 28.2, 22.4.	[M+H] ⁺ : C ₂₄ H ₂₉ ClN ₅ O ₂ 454.200 4 454.199 3
7l	7	68.3–69.9	8.97–8.96 (m, 1H), 8.62 (m, 1H), 7.98 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.90–7.88 (m, 1H), 7.72–7.69 (m, 1H), 7.62–7.60 (m, 1H), 7.37–7.28 (m, 5H), 7.23–7.19 (m, 2H), 6.92 (d, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 4.98 (s, 2H), 4.65–4.60 (m, 1H), 3.90–3.88 (m, 1H), 2.96 (dd, <i>J</i> = 13.8, 6.8 Hz, 1H), 2.87–2.81 (m, 3H), 2.76 (dd, <i>J</i> = 14.5, 5.2 Hz, 1H), 2.62 (dd, <i>J</i> = 14.8, 8.7 Hz, 1H), 1.95–1.80 (m, 2H), 1.76–1.71 (m, 2H).	170.7, 167.7, 157.8, 144.2, 144.1, 137.3, 132.5, 130.1 (2), 129.8, 128.5, 128.3, 128.1 (2), 127.5(3), 127.3, 127.1 (2), 124.5, 114.6 (2), 69.6, 52.3, 49.0, 40.4, 39.4, 38.6, 28.2, 22.4.	[M+H] ⁺ : C ₃₁ H ₃₆ N ₅ O ₃ 526.281 3 526.280 3
7m	33	91.5–92.8	8.97 (m, 1H), 8.62 (m, 1H), 7.98 (d, <i>J</i> = 8.4 Hz, 1H), 7.90–7.88 (m, 1H), 7.72–7.70 (m, 1H), 7.63–7.60 (m, 1H), 7.34 (d, <i>J</i> = 7.6 Hz, 2H), 7.24–7.22 (m, 2H), 4.68–4.63 (m, 1H), 3.91–3.89 (m, 1H), 3.00 (dd, <i>J</i> = 13.7, 6.5 Hz, 1H), 2.90–2.84 (m, 3H), 2.77 (dd, <i>J</i> = 14.9, 4.8 Hz, 1H), 2.62 (dd, <i>J</i> = 14.8, 8.8 Hz, 1H), 1.96–1.84 (m, 2H), 1.77–1.73 (m, 2H), 1.26 (s, 9H).	170.7, 167.7, 149.4, 144.2, 144.1, 134.4, 132.5, 128.8 (2), 128.5, 128.3, 127.5, 127.4, 127.3, 125.1 (2), 124.4, 52.3, 48.8, 40.3, 39.6, 38.6, 33.8, 30.4 (3), 28.2, 22.4.	[M+H] ⁺ : C ₂₈ H ₃₈ N ₅ O ₂ 476.302 0 476.301 7
12a	11	162.3–164.2	8.11 (m, 1H), 7.85–7.79 (m, 5H), 7.77–7.75 (m, 2H), 7.51–7.43 (m, 5H), 7.42–7.39 (m, 1H), 4.89–4.76 (m, 1H), 3.84 (t, <i>J</i> = 6.1 Hz, 1H), 3.18 (dd, <i>J</i> = 13.7, 7.2 Hz, 1H), 3.11 (dd, <i>J</i> = 13.7, 7.0 Hz, 1H), 2.81 (dd, <i>J</i> = 14.7, 4.3 Hz, 1H), 2.69 (t, <i>J</i> = 7.4 Hz, 2H), 2.63 (dd, <i>J</i> = 14.7, 9.3 Hz, 1H), 1.89–1.76 (m, 2H), 1.68–1.61 (m, 2H).	170.3, 167.6, 135.6, 135.2, 133.8, 133.7, 132.6, 130.8, 128.3, 127.9, 127.6, 127.2 (4), 127.1, 126.2, 125.8, 125.3, 124.8, 120.1, 116.9, 52.3, 49.0, 40.6, 40.3, 38.5, 28.2, 22.2.	[M+H] ⁺ : C ₂₉ H ₃₃ N ₄ O ₂ 468.259 8 469.258 3
12b	11	169.9–171.2	8.88–8.87 (m, 1H), 8.52–8.51 (m, 1H), 7.97–7.95 (m, 1H), 7.85–7.77 (m, 5H), 7.70–7.67 (m, 1H), 7.61–7.57 (m, 1H), 7.49–7.47 (m, 1H), 7.45–7.39 (m, 2H), 4.8–4.76 (m, 1H), 3.87–3.85 (m, 1H), 3.22–3.19 (m, 1H), 3.13–3.09 (m, 1H), 2.86–2.79 (m, 3H), 2.71–2.66 (m, 1H), 1.92–1.79 (m, 2H), 1.73–1.68 (m, 2H).	170.6, 167.8, 144.2, 135.2, 133.6, 132.5, 132.4, 128.5, 128.3, 127.9, 127.7, 127.4 (3), 127.3, 127.2 (3), 125.8, 125.3, 124.5, 52.3, 48.9, 40.7, 40.3, 38.5, 28.3, 22.4.	[M+H] ⁺ : C ₂₈ H ₃₃ N ₅ O ₂ 470.255 1 470.253 8

为了进一步验证该类化合物对抗生素的协同增敏作用,选取初步具有协同活性的化合物 **7h** 与 **12b**, 与 AZT 联用对抗单一表达外排泵 MexAB-OprM 的 *P. aeruginosa* 26 菌株 (用质粒 pAK1900-MexAB-OprM 转化)。结果如表 3 所示,代表性化合物 **7h** 与 **12b** 对 AZT 仍表现出较强的协同增敏活性,并且化合物 **12b**

的活性更优于 **7h**。

基于此,进一步评价 **12b** 联用多种抗生素,包括 AZT、美罗培南 (MEM)、头孢他啶 (CAZ) 和克拉霉素 (CLR) 对抗临床分离的 MDR *P. aeruginosa* 的协同增敏活性。结果显示 (表 4), 化合物 **12b** 对上述 4 种抗生素均表现出明显的协同增敏活性。提示化合物 **12b** 对

Table 2 Activity of the target compound in coordination with aztreonam (AZT) against *P. aeruginosa* K199 strain. MIC^a: MIC of compound ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); MIC^{AZT}: MIC of AZT; FICI = MIC (A in combination with B) / MIC (A alone) + MIC (B in combination with A) / MIC (B alone), synergy was defined as FICI ≤ 0.5



No.	R	X	Alone		Combined		FICI
			MIC ^a	MIC ^{AZT}	MIC ^a	MIC ^{AZT}	
7a	-	C	>128	2	64	1	<1
7b	<i>t</i> -Bu	C	32	2	16	0.125	0.562 5
7c	OBn	C	32	2	16	0.25	0.625
7d	CN	C	>128	2	128	1	<1.5
7e	CH ₃	C	128	2	64	1	1
7f	F	C	>128	2	64	1	<1
7g	NO ₂	C	>128	2	16	1	<0.625
7h	OCH ₃	C	>128	2	32	0.5	<0.5
7i	-	N	>128	2	64	1	<1
7j	NO ₂	N	>128	2	64	1	<1
7k	Cl	N	>128	2	8	1	<0.562 5
7l	OBn	N	128	2	64	0.5	0.75
7m	<i>t</i> -Bu	N	128	2	64	0.5	0.75
12a	-	C	64	2	32	0.25	0.625
12b	-	N	128	2	16	0.5	0.375
PA β N	-	-	>128	2	128	0.5	<1.25

Table 3 Activity of the target compound in coordination with AZT against *P. aeruginosa* 26 strain

Strain	Compd.	Alone		Combined		FICI
		MIC ^a	MIC ^{AZT}	MIC ^a	MIC ^{AZT}	
26	7h	128	8	32	1	0.375
	12b	128	8	32	0.5	0.312 5
	PA β N	>128	16	16	2	<0.25

抗生素具有广谱的协同作用,可作为抗生素佐剂,调节抗生素在亚MIC浓度下发挥抗菌作用。

3 安全性与类药性评价

3.1 细胞毒性的测定 进一步评价代表性化合物 **12b** 在不同细胞系的安全性,包括人胚胎肾细胞 (HEK293 细胞) 与非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞)。以 PA β N 为对照化合物,采用 MTT 法测定了化合物与细胞共培养 24 h 的半数细胞毒性浓度 (CC₅₀)。结果表明,在 HEK293

细胞和 Vero 细胞中, **12b** 的 CC₅₀ 值均大于 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 2a),表明化合物 **12b** 在高浓度时 (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),对 HEK293 和 Vero 细胞均无细胞毒性,具有良好的安全性。

3.2 hERG 心脏毒性的测定 进一步评估化合物是否具有潜在的的心脏毒性,采用电生理手动膜片钳方法测试了代表性化合物 **12b** 对 hERG 钾通道 (human *Ether-a-go-go* related gene potassium channel) 电流的影响。结果显示 (图 2b),化合物 **12b** 对 hERG 钾通道电流的半数抑制浓度值 (IC₅₀) 大于 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,这表明化合物 **12b** 的心脏毒性较小,具有良好的安全性。

3.3 代表性化合物 12b 类药性预测 使用 ADMET Predictor 9.5 软件对化合物 **12b** 的吸收、代谢和毒理性质进行类药性预测并打分,包括吸收风险系数 (Absn risk)、代谢性质风险系数 (CYP risk)、毒性风险系数 (TOX risk) 及 ADMET risk 几个方面对 **12b** 的吸收、代谢及毒性性质进行全方面的类药性预测评估 (表 5)。结果显示, **12b** 的多数风险系数预测分值在成药性范围内,提示 **12b** 具有一定类药性特点。

4 生物学验证与分子对接

4.1 外排机制的验证 为验证化合物是否靶向细菌外排泵发挥作用,评估了在 *P. aeruginosa* 26 菌株中,化合物 **12b** 抑制荧光底物 Hoechst 33342 (RND 外排泵底物) 外排的潜在能力。通过比较化合物 **12b** 与 PA β N 处理与未处理过的细菌最终荧光计算得到相对最终荧光 (RFF) 值^[19],见图 3。结果表明, **12b** 表现出剂量依赖性的外排抑制能力,在低浓度 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,具有明显优于 PA β N 的抑制外排能力;而在高浓度时,与 PA β N 抑制外排的活性相当。表明化合物 **12b** 具有对外排泵 MexAB-OprM 的潜在调节活性,通过抑制细菌外排泵恢复细菌对抗生素的敏感性。

4.2 Schrodinger 分子对接 鉴于 MexB 是 RND 外排系统中结合抗生素的主要外排转运体^[20],采用 Schrodinger 软件对化合物 **12b** 与 MexB (PDB ID: 3W9I) 进行分子对接,并通过 Docking score 来评估配体在受体腔内的结合能力。结果显示, **12b** 对接打分为 -6.792,

Table 4 Activity of **12b** in coordination with antibiotics against MDR *P. aeruginosa*. MIC^{12b}: MIC of **12b**; MIC^{PA β N}: MIC of PA β N; CLR: Clarithromycin; CAZ: Ceftazidime; MEM: Meropenem

Strain	Compd.	Alone			Combined				FICI	
		MIC ^a	MIC ^{12b}	MIC ^{PAβN}	MIC ^a	MIC ^{12b}	MIC ^a	MIC ^{PAβN}	12b	PA β N
181245	AZT	8	>512	>512	2	128	2	128	<0.5	<0.5
	CLR	256	>512	>512	0.5	128	0.5	128	<0.25	<0.25
	CAZ	64	>512	>512	2	128	16	128	<0.28	<0.5
	MEM	32	>512	>512	8	128	8	128	<0.5	<0.5
181643	AZT	4	>512	512	1	128	1	128	<0.5	0.5
	CLR	256	512	512	32	128	32	128	0.375	0.375
	CAZ	2	512	512	0.5	128	0.5	128	0.5	0.5

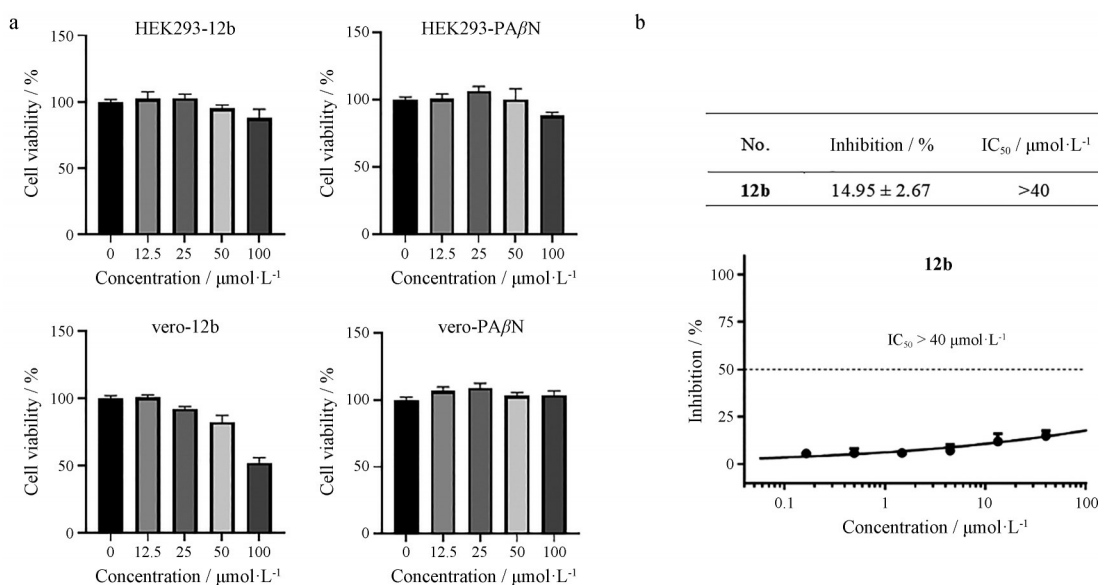


Figure 2 Safety evaluation of compounds. (a) Cytotoxicity of compound **12b** and PAβN; (b) Dose-effect curve of compound **12b** on the inhibition of hERG potassium channel current

Table 5 ADMET prediction result of **12b**. Absn risk (evaluation of absorption properties of compounds), suggested values: ≤ 4; CYP risk (evaluation of metabolic properties of compounds), suggested values: ≤ 2; TOX risk (evaluation of toxic properties of compounds), suggested values: ≤ 2; ADMET risk (evaluation of medicinal properties of compounds), suggested values: ≤ 7

Compd.	Absn	CYP	TOX	ADMET
12b	4.014	0	0.6	4.014

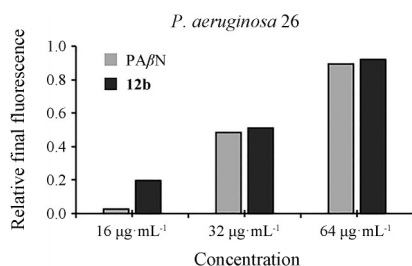


Figure 3 Effect of **12b** and PAβN on the accumulation of Hoechst 33342

PAβN 对接打分为-5.906, 化合物 **12b** 打分结果更优于 PAβN, 表明化合物 **12b** 与 PAβN 相比, 对外排转运体 MexB 可能有较高的亲和力。

采用 Schrodinger 将对接结果进行可视化分析。结果如图 4a、b 所示, 化合物 **12b** 可与 MexB 活性腔的 ASP-85、ARG-185、GLN-273、ASP-274、GLN-773 等氨基酸残基形成较强的氢键相互作用, 同时与 ASP-274 形成盐桥; 而 PAβN 与 MexB 活性腔的氨基酸残基 GLN-273、ASP-274、TRP-753、SER-755、GLN-773 形成氢键相互作用, 并未形成盐桥 (图 4c、d), 这可能是 **12b**

对 MexB 结合力更强的原因。

综上所述, 代表性化合物 **12b** 和 MexB 的结合方式与 PAβN 相似, 且亲和力更强, 提示 **12b** 直接靶向外排转运体 MexB 发挥抑制外排作用, 从而恢复细菌对抗生素的敏感性。

结论

本研究设计合成了 15 个全新的鸟氨酸拟肽类衍生物, 通过棋盘法评价了其协同单环 β-内酰胺类抗生素 AZT 对抗 *P. aeruginosa* 敏感菌株活性。其中化合物 **12b** 表现出最好的协同抗菌活性, 进一步研究显示, **12b** 不仅增强 β-内酰胺类抗生素 AZT、CAZ、MEM, 而且还增强大环内酯类抗生素 CLR 对抗 MDR *P. aeruginosa* 的活性。初步作用机制显示, 此类化合物主要通过靶向外排泵 MexAB-OprM 发挥作用, 与先导物 PAβN 一致。另外, 化合物 **12b** 具有合成简单、安全性高的特点, 是一个理想的先导物, 值得进一步修饰探索。

实验部分

所用化学试剂及原料均购自泰坦公司、毕得公司、伊诺凯公司和通广等公司的分析纯试剂, 溶剂未经纯化直接使用。抗生素标准品购自中国食品药品检定研究院。MHB 培养基、LB 培养基购自海博生物技术有限公司。

化合物熔点采用 MP90 型精密熔点仪 (Mettler Toledo, Switzerland) 测得, 温度未校正; ¹H NMR 和 ¹³C NMR 采用 Bruker Avance III 600 MHz 核磁共振仪

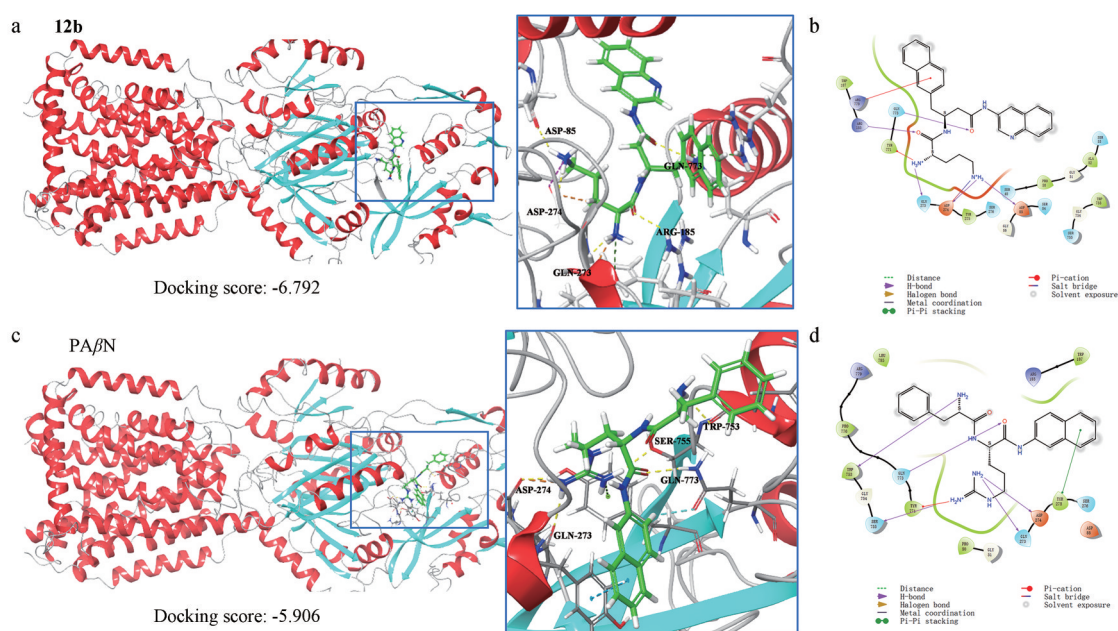


Figure 4 Docking results with MexB. (a) 3D structure of docking result between compound **12b** and MexB; (b) 2D structure of docking result between compounds **12b** and MexB; (c) 3D structure of docking result between PAβN and MexB; (d) 2D structure of docking result between PAβN and MexB

(Varian, USA) 测得, 溶剂均为 CD_3OD , 内标为 TMS; HR-MS 采用 Autospec Ultima-TOF 质谱测定仪 (Micro-mass UK Ltd., UK) 测得, Flash 柱分离纯化采用 Combi flash Rf 200 快速制备液相 (Teledyne, USA); 薄层色谱 (TLC) 采用 Merck 60 F₂₅₄ 薄层色谱硅胶板, 紫外检测用 ZF-7A 手提紫外检测灯 (上海宝山顾村光电仪器厂); 吸光度采用酶标仪 (Multiskan FC, Thermo, USA) 测定。

1 化学合成

鸟氨酸拟肽类衍生物 7a~7m 的合成 将缩合剂 EDCI 与 HOBT 加入起始原料 **2a~2m** 的超干乙酸乙酯溶液中, 50 °C 搅拌 30 min, 然后加入 **1a** 与 **1b**, 50 °C 搅拌 8 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **3a~3m**; 将反应中间体 **3a~3m** 加入装有超干二氯甲烷的烧瓶中, 再加入三氟乙酸 TFA, 室温搅拌 2 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **4a~4m**。将 HOBT 和 EDCI 加入到搅拌中的 **5a** 的超干乙酸乙酯溶液中, 在室温下搅拌 30 min, 然后加入中间体 **4a~4m**, 室温搅拌 8 h, TLC 检测反应完全, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **6a~6m**; 将反应中间体加入装有超干二氯甲烷的烧瓶中, 加入 TFA, 室温搅拌 2 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到目标终产物 **7a~7m**。

鸟氨酸拟肽类衍生物 12a、12b 的合成 将 EDCI

与 HOBT 加入起始原料 **8a** 的超干乙酸乙酯溶液中, 50 °C 搅拌 30 min, 然后加入 **1a** 和 **1b**, 50 °C 搅拌 8 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **9a** 和 **9b**; 将 **9a** 和 **9b** 加入装有超干二氯甲烷的烧瓶中, 再加入 TFA, 室温搅拌 2 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **10a** 和 **10b**。将 HOBT 和 EDCI 加入搅拌中 **5a** 的超干乙酸乙酯溶液中, 在室温下搅拌 30 min, 然后加入中间体 **10a** 和 **10b**, 室温搅拌 8 h, TLC 检测反应完全, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到反应中间体 **11a** 和 **11b**; 将反应中间体加入装有超干二氯甲烷的烧瓶中, 加入 TFA, 室温搅拌 2 h, TLC 检测反应完成, 有机相浓缩, 残余物用硅胶快速柱色谱法纯化, 得到目标终产物 **12a** 和 **12b**。

2 棋盘法测定协同活性

本研究按照 CLSI 标准, 采用微量肉汤稀释法进行抑菌活性测定和棋盘法试验。化合物和 PAβN 用阳离子调节的 Mueller-Hinton 肉汤 (CAMH 肉汤, 含有 20~25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Mg^{2+} , 10~12.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Ca^{2+}) 在 96 孔板上沿纵坐标 2 倍稀释, 抗生素以同样方式沿横坐标稀释, 每孔终体积为 90 μL 。所有测试菌株均在 37 °C 的 Luria-Bertani 肉汤 (LB 肉汤) 中培养过夜。将培养物调至 0.5 McFarland (1.5×10^8 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$), 并用 CAMH 肉汤以 1:30 稀释至 5×10^6 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。然后将 10 μL 细菌悬浮

液加入各孔中,使最终细菌浊度为 5×10^5 CFU·mL⁻¹。将96孔板置于37℃恒温孵育18h。观察菌株生长情况,测定化合物与抗生素的最低抑菌浓度并计算FICI值, $FICI = MIC(A \text{ in combination with } B) / MIC(A \text{ alone}) + MIC(B \text{ in combination with } A) / MIC(B \text{ alone})$, synergy was defined as $FICI^{[17]} \leq 0.5$ 。

3 MTT法测定细胞毒性

取对数期生长期的Vero细胞及HEK293细胞,在96孔板中每孔接种 1×10^4 个数量的细胞,与药物共培养24h。将20 μL MTT (5 mg·mL⁻¹) 溶液加入到每孔中,并于37℃、5% CO₂的培养箱中孵育4h。去除培养基并加入150 μL DMSO以完全溶解结晶物后,测定其在570 nm处的吸光度值。

4 电生理手动膜片钳方法测定hERG心脏毒性

稳定表达hERG的CHO细胞置于37℃、5% CO₂的培养箱培养,每48h按1:5比例进行传代。试验当天,吸走细胞培养液,用细胞外液淋洗1遍后加入0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen) 溶液,在室温下消化5 min,吸走消化液,用细胞外液重悬后将细胞转移到实验皿中备用。阳性对照化合物采用西沙比利(cisapride),最终测试浓度为300 nmol·L⁻¹。设置化合物的测试浓度,每个浓度至少测试2个细胞($n \geq 2$)。数据分析处理采用pClamp、GraphPad Prism 8和Excel软件。不同化合物浓度对hERG钾电流的抑制程度用公式计算: $Inhibition \% = [1 - (I / I_0)] \times 100\%$ 。

5 Schrodinger Maestro Version 12.8 117分子对接

对接过程:使用软件自带模块处理MexB蛋白(UniProt数据库, ID: 3W9I), pH设置为 7.4 ± 0.05 ;配体小分子化合物按软件默认设置处理;根据sitemap预测位点生成对接盒子,其余选项均为默认设置。

6 测定化合物12b和PAβN对Hoechst 33342的外排抑制

通过比较EPI处理与未处理细胞的最终荧光计算RFF值,实验具体操作参考文献^[20]。RFF指数计算公式: $RFF = (RF_{45 \text{ min处理}} - RF_{45 \text{ min未处理}}) / RF_{45 \text{ min未处理}}$ 。

致谢:感谢中国医学科学院医药生物技术研究所分析测试中心测定目标化合物的核磁共振氢谱、碳谱及高分辨质谱。

作者贡献:朱喜负责目标化合物合成与构型确定、耐药菌株活性测定、分子对接以及初稿撰写;马西灿负责化合物的设计与指导;张昕彤负责细胞毒性的测定;刘忆霜副研究员负责敏感菌株活性初筛与机制研究;何宁老师负责耐药菌株的管理;解云英研究员负责菌株的管理指导;本文通讯作者宋丹青研究员负责实验的设计与把关,以及稿件修改等工作。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Chaudhary AS. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery [J]. Acta Pharm Sin B, 2016, 6: 552-556.
- [2] Mills JP, Marchaim D. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: infection prevention and control update [J]. Infect Dis Clin North Am, 2021, 35: 969-994.
- [3] Catalano A, Iacopetta D, Ceramella J, et al. Multidrug resistance (MDR): a widespread phenomenon in pharmacological therapies [J]. Molecules, 2022, 27: 616.
- [4] Li Z, Guo Z, Lu X, et al. Evolution and development of potent monobactam sulfonate candidate IMBZ18g as a dual inhibitor against MDR Gram-negative bacteria producing ESBLs [J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13: 3067-3079.
- [5] Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis [J]. Lancet, 2022, 399: 629-655.
- [6] De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 33: e00181-19.
- [7] Hwang W, Yoon SS. Virulence characteristics and an action mode of antibiotic resistance in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Sci Rep, 2019, 9: 487.
- [8] Behzadi P, Baráth Z, Gajdács M. It's not easy being green: a narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Antibiotics, 2021, 10: 42.
- [9] Krishnamoorthy G, Leus IV, Weeks JW, et al. Synergy between active efflux and outer membrane diffusion defines rules of antibiotic permeation into Gram-negative bacteria [J]. mBio, 2017, 8: e01172-17.
- [10] Piddock LJV. Multidrug-resistance efflux pumps? Not just for resistance [J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4: 629-636.
- [11] Puzari M, Chetia P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide [J]. World J Microbiol Biotechnol, 2017, 33: 24.
- [12] Renau TE, Léger R, Flamme EM, et al. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin [J]. J Med Chem, 1999, 42: 4928-4931.
- [13] Yoshida KI, Nakayama K, Ohtsuka M, et al. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and *in vivo* active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15: 7087-7097.
- [14] Nakashima R, Sakurai K, Yamasaki S, et al. Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters [J]. Nature, 2013, 500: 102-106.

- [15] Compagne N, Cruz AVD, Müller RT, et al. Update on the discovery of efflux pump inhibitors against critical priority Gram-negative bacteria [J]. *Antibiotics*, 2023, 12: 180.
- [16] Ma X, Guo W, Zhu X, et al. Synthesis of peptidomimetics as antibiotic adjuvants for combination with aztreonam to combat MDR *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 260: 115778.
- [17] Wright GD. Antibiotic adjuvants: rescuing antibiotics from resistance [J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24: 862-871.
- [18] Renau TE, Léger R, Filonova L, et al. Conformationally-restricted analogues of efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 2755-2758.
- [19] Tambat R, Mahey N, Chandal N, et al. A microbe-derived efflux pump inhibitor of the resistance-nodulation-cell division protein restores antibiotic susceptibility in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *ACS Infect Dis*, 2022, 8: 255-270.
- [20] Verchère A, Dezi M, Adrien V, et al. *In vitro* transport activity of the fully assembled MexAB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6890.