

• 综述 •

抗革兰阴性菌新靶标: 脂多糖转运蛋白 LptDE 及其抑制剂研究进展

李 玥¹, 李国庆², 田元元³, 李聪然², 杨信怡^{2*}, 姚开虎^{1*}, 游雪甫^{2*}

(1. 国家儿童医学中心/首都医科大学附属北京儿童医院/北京市儿科研究所/国家呼吸系统疾病临床医学研究中心/教育部儿科重大疾病研究重点实验室/儿童呼吸道感染性疾病研究北京市重点实验室, 北京 100045; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 抗感染药物研究北京市重点实验室, 北京 100050; 3. 国家儿童医学中心/首都医科大学附属北京儿童医院皮肤科, 北京 100045)

摘要: 富含脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的外膜是绝大多数革兰阴性 (Gram-negative, G⁻) 菌生存必需的生物学屏障。LPS 转运蛋白 (lipopolysaccharide transport protein, Lpt) 复合体 LptDE 负责 LPS 转运和外膜组装的最后关键一步, 在 G⁻ 菌中普遍存在且结构-功能较为保守, 哺乳动物细胞中缺乏同源蛋白, 是颇具开发前景的抗菌新靶标。近 10 年, LptDE 蛋白三维结构的破译为基于此类“非酶”蛋白靶标的药物发现奠定了基础, 首个作用于 LptD 的拟肽类化合物 murepavadin 开启了一类新作用机制的抗菌药物研究。本文将总结 LptDE 的分子特征、结构-功能, 梳理 murepavadin 等新型拟肽类抗菌药物的研究进展, 以为相关研究提供参考。

关键词: 革兰阴性菌; 脂多糖外膜; 脂多糖转运蛋白复合体 DE; 抗菌新靶标; 新型拟肽类抗菌药物

中图分类号: R966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2024)02-0279-10

Novel antibacterial drug target against Gram-negative bacteria: lipopolysaccharide transport protein LptDE and its inhibitors

LI Yue¹, LI Guo-qing², TIAN Yuan-yuan³, LI Cong-ran², YANG Xin-yi^{2*}, YAO Kai-hu^{1*}, YOU Xue-fu^{2*}

(1. National Center for Children's Health/Beijing Children's Hospital, Capital Medical University/Beijing Pediatric Research Institute/National Clinical Research Center for Respiratory Diseases/Key Laboratory of Major Diseases in Children, Ministry of Education/Beijing Key Laboratory of Pediatric Respiratory Infection Diseases, Beijing 100045, China; 2. Beijing Key Laboratory of Antimicrobial Agents, Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 3. Department of Dermatology, National Center for Children's Health/Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China)

Abstract: The outer membrane composed predominantly of lipopolysaccharide (LPS) is an essential biological barrier for most Gram-negative (G⁻) bacteria. Lipopolysaccharide transport protein (Lpt) complex LptDE is responsible for the critical final stage of LPS transport and outer membrane assembly. The structure and function of LptDE are highly conserved in most G⁻ bacteria but absent in mammalian cells, and thus LptDE complex is regarded as an attractive antibacterial target. In recent 10 years, the deciphering of the three-dimensional structure of LptDE protein facilitates the drug discovery based on such "non-enzyme" proteins. Murepavadin, a peptidomimetic compound, was reported to be the first compound able to target LptD, enlightening a new class of antibacterial molecules with novel mechanisms of action. This article is devoted to summarize the molecular characteristics, structure-function of LptDE protein complex and review the development of murepavadin and related peptidomimetic compounds, in order to provide references for relevant researches.

收稿日期: 2023-07-25; 修回日期: 2023-09-14.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204465).

*通讯作者 E-mail: xinyiyang@imb.cams.cn; jiuhu2655@sina.com; xuefuyou@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0903

Key words: Gram-negative bacteria; lipopolysaccharide outer membrane; lipopolysaccharide transport protein complex DE; new antibacterial drug target; novel peptidomimetic compound

革兰阴性 (Gram-negative, G⁻) 菌耐药日趋严重, 有效药物匮乏, 临床治疗困难。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是 G⁻ 菌外膜的关键结构单元, 不存在于革兰阳性 (Gram-positive, G⁺) 菌和哺乳动物的细胞中, 因此构成 G⁻ 菌所特有的生物学屏障, 并是一种重要的毒力因子, 为绝大多数 G⁻ 菌生存所必需。LPS 是携带负电荷的脂水两亲性生物大分子 (图 1), 由脂质 A、核心多糖和 O-特异性寡糖三部分以共价结合方式相连。脂质 A 是 LPS 结构-功能的核心, 通常以二聚 N-乙酰葡萄糖胺为骨架, 连接着 6 条长链脂肪酸, 具有两个磷酸化位点。脂肪酰基链在疏水作用的驱动下致密堆积, 携带负电荷的磷酸基团与插入 LPS 分子之间的二价阳离子 (如 Mg²⁺) 相互作用, 形成疏水-电荷双重渗透屏障。LPS 外膜生物学屏障不仅导致 G⁻ 菌对已有的疏水性抗菌药物敏感性差, 也是抗 G⁻ 菌新药研发难度大、周期长的重要原因。

LPS 生物合成和转运对保证外膜结构-功能完整性至关重要。早在 1980s~1990s, LPS 保守核心结构 Kdo2-脂质 A 在胞浆中的生物合成通路已被 Anderson 等^[1]解析得较为清楚, 其中以限速酶 UDP-3-O-(R-羟基十四酰)-N-乙酰氨基葡萄糖脱乙酰氨基酶 (LpxC) 为靶标开发的抗菌药物候选物 ACHN-975 曾一度进入 I 期临床试验^[2]。近 10 年, 蛋白三维结构的解析和功能学研究不断深入与精细化, LPS 跨膜运输和外膜组装机制逐渐清晰。其中, LPS 转运蛋白 (lipopolysaccharide transport protein, Lpt) LptD 和 LptE 组成“桶-塞”结构蛋白复合体, 定位于 G⁻ 菌外膜, 负责 LPS 运输及插膜的最后一步, 对外膜合成和组装至关重要。2010 年瑞士苏黎世大学的 Robinson 课题组基于天然抗菌肽 protegrin I (PG-I) 研发了强效、特异性杀灭铜绿假单胞菌的环状拟肽, 机制研究推测其首要靶标为 LptD。Polyphor 公司开发的同类型拟肽 murepavadin (POL7080 或 RO7033877) 是首个作用于 G⁻ 菌外膜蛋白的抗菌药物候选物。迄今, murepavadin 注射剂治疗铜绿假单胞菌肺炎的最高研究阶段为 III 期临床试验 (已终止)。

尽管 murepavadin 掀起了 LptDE 作为新型抗 G⁻ 菌分子靶标的热度, 但是目前还没有真正通过“定靶筛选”发现的 LptDE 抑制剂, 导致基于 LptDE 的抗菌药物研究无法突破以拟肽为主的单一结构类型。当前面临的研究瓶颈与 LptDE 这类“非酶”膜蛋白结构-功能的复杂性直接相关。本文将从 LPS 转运的全过程谈起, 着重总结 LptDE 的分子生物学和生物化学性质、三维结构

特征、重要功能结构域, 梳理新型拟肽类抗菌药物的研究进展, 期为针对该靶标的相关药物研究提供参考。

1 LPS 转运蛋白及其跨膜运输机制

1989 年, Sampson^[3]发现了一个与细菌膜通透性相关的基因, 命名为 *imp* (increased membrane permeability)。进一步研究发现 *imp* 与大肠埃希菌对有机溶剂正己烷的耐受水平相关, 故又将其称作 *ostA* (organic solvent tolerance)^[4]。2002 年, 普林斯顿大学发表研究揭示了 Imp/OstA 是大肠埃希菌外膜形成和细菌存活的必需蛋白, 属于 β -桶状蛋白, 定位于外膜^[5]。2006 年普林斯顿大学和哈佛大学医学院联合发现 Imp/OstA 与脂蛋白 RlpB 以复合体形式存在^[6]。2007~2008 年间, 陆续鉴定了其他的 LPS 转运蛋白, 包括位于周质空间的 LptA (YhbN)、LptC (YrbK) 与位于内膜的 LptB (YhbG)、LptF (YjgP) 和 LptG (YjgQ), 并将 Imp/OstA 和 RlpB 重新命名为 LptD 和 LptE^[7,8]。

2008 年, Sperandio 等^[9]基于 MsbA 和 7 个转运蛋白 (LptA~G) 的细胞定位、生物化学特点和生物学功能提出 LPS 跨越内膜-周质空间-外膜转运的分子模型 (图 1): LPS 在内膜内侧合成, 由内膜上的 ATP 结合盒转运体 MsbA 将其从内膜内侧翻转至内膜外侧, ABC 转运复合体 LptB₂FG 将 LPS 从内膜外页 (inner leaflet) 移出并引导至 LptC, LptC 继而将 LPS 传递给周质空间转运蛋白 LptA, 多聚化的 LptA 蛋白纤维搭建起 LPS 跨越周质空间的桥梁, LptD 周质空间结构域接收由 LptA 呈递的 LPS, 通过 LptDE 复合体跨膜区将 LPS 插入外膜外页 (outer leaflet) 中。2011 年至今, 7 个 LPS 转运蛋白的三维结构均已得到解析, 从结构生物学角度佐证了 Sperandio 提出的 LPS 跨膜转运模型。

既往研究显示, LPS 转运蛋白功能如果存在缺陷, 通常引发外膜结构-功能异常、细胞形态异常、细胞内容物外泄直至死亡等一系列生物学改变^[5,6], 主要包括: ① 细菌对疏水性化合物 (抗菌药物、染料等) 通透性增加; ② 细菌胞内蛋白渗出; ③ 电镜下细菌黏连, 呈现长丝样改变 (细胞分裂异常); ④ 膜样物质在周质空间异常堆积; ⑤ LPS/磷脂比例异常, 外膜密度改变; ⑥ 外膜蛋白 PagP/PagL 被激活并对 LPS 进行化学修饰; ⑦ 活细菌数随细菌繁殖迭代降低。

2 LptDE 生物化学特征

据粗略估计, 单个 G⁻ 菌外膜上大约分布着 60 个 LptDE 分子, 属于极低丰度蛋白, 无法通过免疫印迹

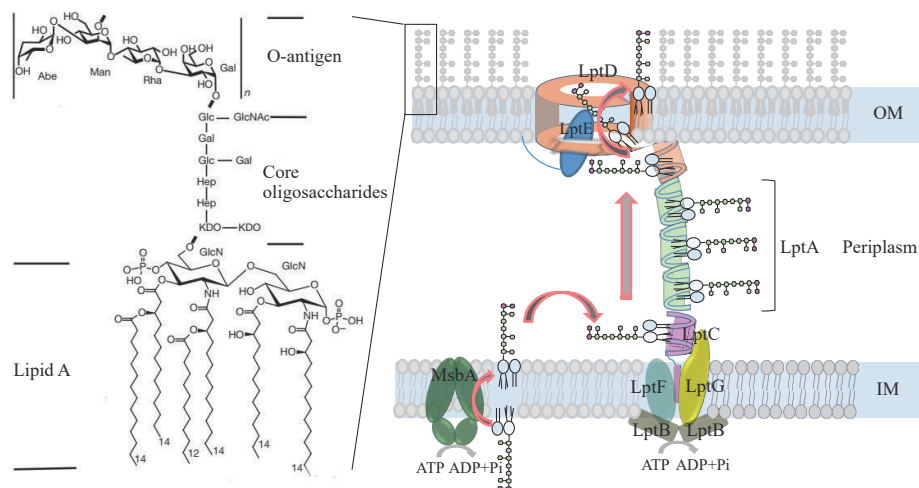


Figure 1 Proposed model for LPS transportation and insertion into the outer membrane. LPS: Lipopolysaccharide; OM: Outer membrane; IM: Inner membrane

(Western blot, WB)的方法在全细胞裂解液中检测到,需分离提取外膜蛋白后方可检测^[5,10]。LptDE复合体为1:1异源二聚体。LptD大致由780~800个氨基酸(amino acid, aa)组成,分子量~90 kD,芳香族氨基酸占比超过13%;LptE为~20 kD的脂蛋白,常由169个aa组成,通过N-末端半胱氨酸残基翻译后脂化锚定在外膜内侧^[11]。

LptD的两对二硫键 Cys173-Cys725 和 Cys31-Cys724 对维系 β 桶高级结构至关重要,导致LptD变性前后在凝胶电泳中的迁移速率不同。天然状态的LptD或与其他LPS转运蛋白形成高分子复合体,可能由于分子量过大不能进入SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)的孔隙中,无法通过凝胶电泳检测到。LptDE复合体对1.5%的SDS稳定,LptDE核心复合物(包括LptD 521~542 aa和LptE 146~157 aa)可以抵抗胰蛋白酶降解^[11]。360 mmol·L⁻¹ β -巯基乙醇使大肠埃希菌LptDE复合物彻底解离和变性,LptD、LptE分别在~83 kD和~20 kD处呈现单一条带;非还原态下从30 °C加热至100 °C,复合体逐渐变性,LptD的迁移位置在83~110 kD之间变化,可能同时出现2~3个条带^[12]。

LptD至少需要和LptE的C-末端共表达才能形成具有天然折叠状态的 β 桶状高级结构。2014~2022年间,多个研究团队尝试实现不同种属G菌LptDE的体外重组表达,普遍发现全长的LptDE可溶性差,去掉LptD的N-末端周质空间结构域后,LptDE的可溶性表达大大提高^[13-15]。

3 LptDE 三维结构特征

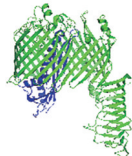
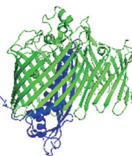
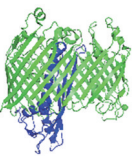
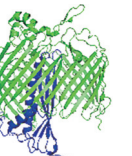
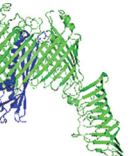
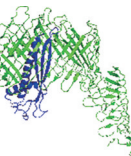
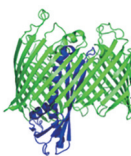
2014年7月3日,中国科学院生物物理所的Qiao等^[16]和东英吉利大学的Dong等^[17]于同一天在《Science》

上发表两篇文章,首次解析了福氏志贺菌和鼠伤寒沙门菌LptDE的三维结构。目前,共7个种属G菌的LptDE三维结构得到解析(表1),其中福氏志贺菌、肺炎克雷伯菌和淋病奈瑟菌的LptDE三维结构是包含LptD N-末端周质空间结构域的全长蛋白。不同种属G菌LptDE三维结构高度相似,下文多以福氏志贺菌LptDE三维结构(PDB ID: 4Q35)为例进行结构-功能阐述。

LptD是迄今发现的最大的 β 桶状蛋白,也是唯一以一个独立的蛋白(LptE)作为“塞子”的 β 桶状蛋白^[17]。LptD三维结构可进一步分为C-末端 β 桶跨膜区(图2A,蓝色)和N-末端周质空间区(图2A,绿色和红色)。如图2B所示,LptD的C-末端 β 桶跨膜区由26个 β 片层($\beta 1 \sim \beta 26$)正-反向折叠环绕成肾型的桶样结构,在 $\beta 1$ 和 $\beta 26$ 两条 β 片层之间闭合,各 β 片层由环状结构(loop, L)连接,胞外侧的环明显比周质空间侧的环长,其中L4和L8两条环伸向 β 桶中部孔隙,其他环伸向 β 桶表面。 β 桶孔隙内遍布携带电荷的氨基酸,形成亲水环境,有利于LPS分子中的亲水性糖链进入而不利于脂质部分进入。N-末端周质空间区可以进一步分为N-末端环(图2A,红色)和 β -jellyroll(图2A,绿色), β -jellyroll由11个正-反向折叠的 β 片层构成蛋糕卷样结构,中部凹槽形成V型疏水腔(图2C)。

LptE(图2A,紫色)大体位于LptD的 β 桶中部孔隙内,约有1/3的体积暴露于周质空间中,LptE并未填满整个 β 桶,在周质空间侧留有约45 Å × 35 Å的空隙,足够LPS进入 β 桶中^[15]。LptE是一个罕见的脂蛋白,如图2D所示由2个 α 螺旋($\alpha 1$ 、 $\alpha 2$)和4个 β 折叠($\beta 1 \sim \beta 4$)组成,4个 β 折叠包括3条长链($\beta 2 \sim \beta 4$)和一条短链($\beta 1$),LptE的三维结构与节肢动物螯所产生的抗内毒素蛋白LALF较为相似(图2D)^[18]。LptE通过N-末

Table 1 The three-dimensional structures of LptDE protein complex in various species of Gram-negative bacteria. The data comes from Protein Data Bank (PDB). *S. flexneri*: *Shigella flexneri*; *S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*; *E. coli*: *Escherichia coli*; *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*; *N. gonorrhoeae*: *Neisseria gonorrhoeae*; *Y. pestis*: *Yersinia pestis*; aa: Amino acid

Information	Species						
	<i>S. flexneri</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Y. pestis</i>
Structure							
PDB ID	4Q35	4N4R	4RHB	5IVA	5IV9	7OMM	5IXM
Sequence	LptD 25-784 aa LptE 20-169 aa	LptD 226-786 aa LptE 19-169 aa	LptD 230-784 aa LptE 20-169 aa	LptD 317-898 aa LptE 21-169 aa	LptD 25-783 aa LptE 20-169 aa	LptD 88-801 aa LptE 31-158 aa	LptD 3-556 aa LptE 2-146 aa

端半胱氨酸残基脂质化锚定在外膜内侧。

4 LptDE 功能结构域预测

当前的研究推测, LptDE 至少应当具备以下 5 种分子功能: ① LPS 单体插入外膜的门控功能; ② LptD-LptE 相互作用的功能; ③ 结合转运底物 LPS 的功能; ④ 辅助自身 β 桶折叠的功能; ⑤ 与其他 LPS 转运蛋白相互作用的功能。目前, LptDE 功能结构域的研究多基于结构预测和分子模拟, 分子机制不完全清楚, 下文将对其进行总结。

4.1 LPS 插膜门控区

LPS 插膜门控区大致位于 LptD 的 β 桶上。如图 3A 显示 β 折叠 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 上分布着 3 个高度保守的脯氨酸 (Pro231、Pro246、Pro261), 导致这 3 条 β 折叠之间所形

成的氢键很少, 堆叠疏松、柔性强^[13,15-17]。Qiao 等^[16]推测 $\beta 1$ - $\beta 2$ 发挥门的作用, 在 $\beta 3$ 和 $\beta 26$ 之间形成一个 16 Å 的横向裂隙, 这个裂隙很可能是 LPS 插入外膜的出口。Lundquist 等^[19]采用分子动力学模拟 LptD 转运 LPS 的动态过程, 推测 LPS 在微秒级别上激活了 LptD。

4.2 LptD-LptE“桶-塞”互作区

LptD-LptE 广泛的互作界面维系了“桶-塞”高级结构。采用交联法发现大肠埃希菌 LptD 上有 27 个氨基酸直接与 LptE 相互作用^[20], 其遍布 LptD 的 β 桶内部。基于鼠伤寒沙门菌 LptDE 三维结构全面预测了两者的相互作用 (图 3B), 发现以 LptDE 核心复合物中的氨基酸残基相互作用较为强烈, 组成核心复合物的 LptD 胞外环 L8 上的 Ser533、Asp531、Leu535 与 LptE

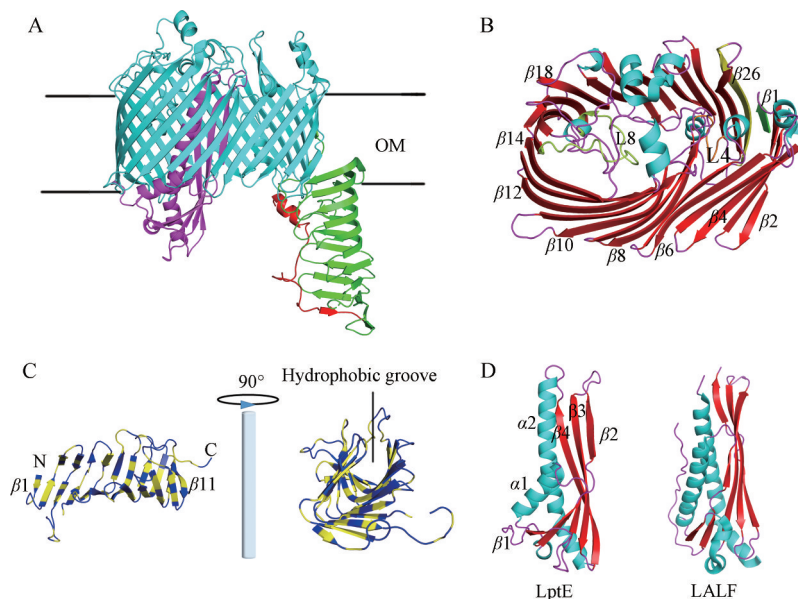


Figure 2 The three dimensional structure of LptDE protein complex (PDB ID: 4Q35). A: The C-terminal β -barrel (233-784 aa), N-terminal loop (24-50 aa) and N-terminal β -jellyroll (51-232aa) of LptD, were colored in blue, red and green respectively, LptE was colored in purple; B: The overlook view of β -barrel; C: The structure of β -jellyroll, hydrophobic and hydrophilic amino acids were colored in yellow and blue respectively; D: The three dimensional structures of LptE and LALF (PDB ID: 3BGH)

的 Glu139、Ala125、Met142 相互作用, 另外 LptD 胞外环 L4 (335~354 aa) 与 LptE 也可以形成多位点互作^[16]。互作氨基酸突变菌株 *lptE14* 相较野生型菌株对红霉素和利福平的药物敏感性明显提高, 但不影响 LPS 转运和 LptD 折叠, 推测“桶-塞”互作位点改变后可能导致 LptE“塞子”松动, 抗菌药物或直接通过 β -桶中部孔隙进入胞内^[21]。

4.3 底物结合区

4.3.1 LptD 底物结合区 研究普遍推测 N-末端 β -jellyroll 是 LptD 结合 LPS 的结构域。如图 3C 所示, β -jellyroll 由 11 个正-反向折叠的 β 片层组成蛋糕卷样结构, 其内表面形成 V-型疏水腔, 这一结构特征与另外两个 LPS 转运蛋白 LptC、LptA 高度相似, 有利于结合 LPS 的疏水区。根据 LptA 与 LPS 的结合位点推测 β -jellyroll 上的 Val51、Tyr112 和 Leu128 (图 3C) 是其与

LPS 互作的关键氨基酸^[16], 但尚缺乏体内、体外实验证据。

4.3.2 LptE 底物结合区 体外分子互作实验显示, LptE 可以特异性结合 LPS, 当 LptE 达到一定浓度时可以使 LPS 多聚体解聚。基于 LptE 和抗 LPS 因子 LALF 的结构相似性, 推测连接 $\beta 2$ - $\beta 3$ 和连接 $\beta 4$ - $\alpha 2$ 的两个环状结构上的阳离子氨基酸 R91、K136 或与 lipid A 携带负电的磷酸基团相互吸引 (图 3D), 发挥结合底物 LPS 的作用。R91、K136 位点突变后显著影响 LPS 多聚体的解聚, 双位点突变菌株对万古霉素和利福平的药物敏感性显著提高^[18]。加入 LPS 前后铜绿假单胞菌 LptE 连接 β 折叠和 α 螺旋的环状结构上有部分氨基酸残基发生了光谱学改变^[13]。

4.4 LptE 辅助 β 桶折叠的功能区

研究发现, LptD 前体蛋白只有先结合 LptE, 才能

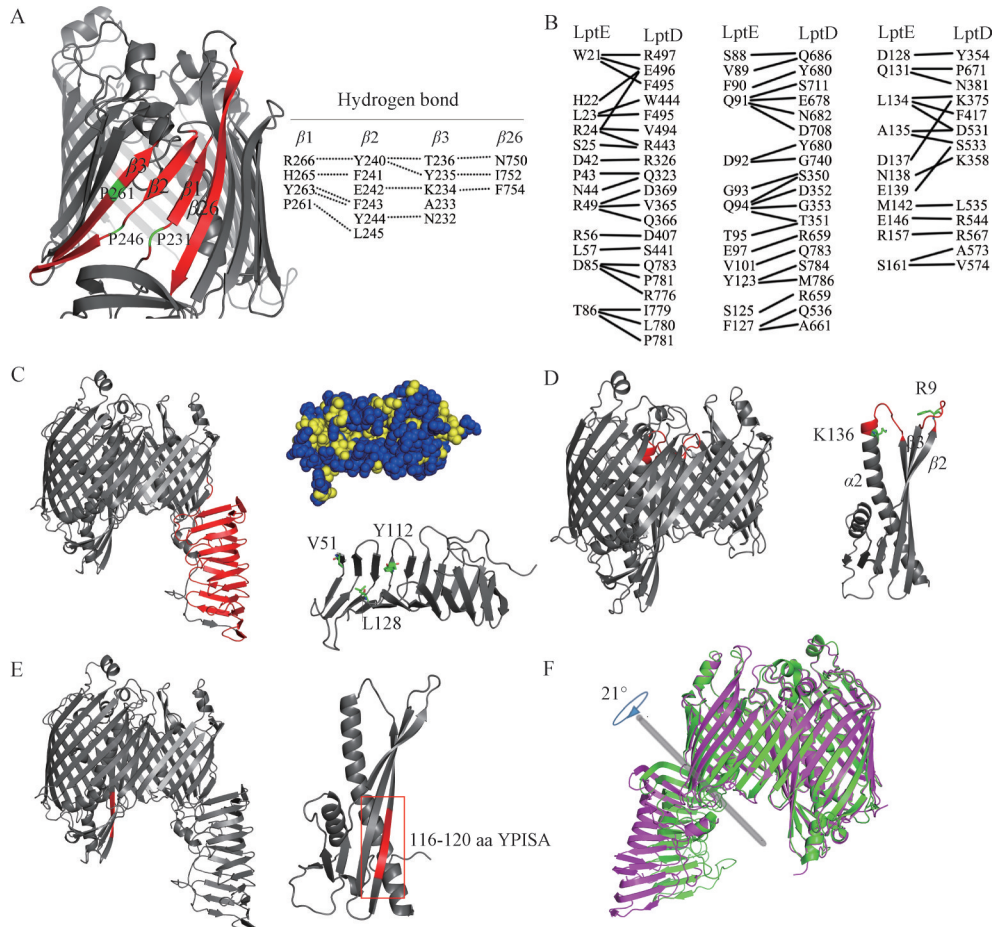


Figure 3 Structures and functions of LptDE domains. A: The lateral insertion gate of LPS, and hydrogen bonds formation between $\beta 1$, 2, 3, and 26; B: Schematic representation of LptD and LptE interactions; C: Cartoon presentation of LptDE complex, β -jellyroll domain was colored in red (left), surface representation of hydrophobic groove which was colored in yellow (right top), V51, Y112, L128 were predicted to bind LPS and shown in sticks (right bottom); D: Cartoon presentation of LptDE complex, loops interacting with LPS were colored in red, K136 and R9 were predicted to bind LPS and shown in sticks; E: Cartoon presentation of LptDE complex, the proposed chaperon domain of LptE was colored in red; F: Superposition of *S. flexneri* LptDE (PDB ID: 4Q35) and *K. pneumoniae* LptDE (PDB ID: 5IV9) presented 21° rotation of β -jellyroll domain

被周质空间氧化酶 DsbA 氧化形成二硫键, 继而形成具有 β 桶结构的成熟蛋白^[11], 推测 LptE 结合 LptD 前体蛋白后促进了远距离半胱氨酸在空间结构上相互靠近。后续研究进一步定位了辅助 β 桶折叠的关键氨基酸, 发现 LptE 上 116~120 aa 区段由 YPISA 变成 YRA 后 (图 3E), 氧化态的 LptD 明显减少, LptD 蛋白稳定性显著降低, 突变菌株对杆菌肽和利福平的敏感性提高^[22]。

4.5 与其他 LPS 转运蛋白相互区

在 7 个 LPS 转运蛋白中, LptA 和 LptD 的 β -jellyroll 具有高度的结构-功能相似性, 分子模拟推测它们通过相似的 V 型疏水腔结合和传递 LPS, 在时间和空间上相互承接。LptD 的 β -jellyroll 三维结构分辨率明显低于 β -桶, 相较于福氏志贺菌, 肺炎克雷伯菌 LptD 的 β -jellyroll 发生了 21 Å 的扭转^[15] (图 3F)。以上研究均显示, β -jellyroll 为柔性较强的结构域, 或通过适度扭转协调 LPS 转运桥的稳定性。

5 新型阳离子拟肽类抗菌药物 murepavadin

5.1 研发历程

PG-I 是猪白细胞产生的天然阳离子抗菌肽, 由 18 个氨基酸组成, 富含半胱氨酸, Cys6-Cys15 和 Cys8-Cys13 在两个反向折叠的 β 片层之间形成两对二硫键, 使得 PG-I 呈现 β -发夹样三维结构 (图 4A)。PG-I 主要通过裂解生物膜发挥广谱抗菌活性, 具有很强的溶血性, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PG-I 溶血率为 37%。2002 年瑞士苏黎世大学的 Robinson 课题组^[12]将类似 PG-I 的环状多肽连接在 *D*-脯氨酸-*L*-脯氨酸刚性模板上合成了 β -发夹样拟肽分子库, 初步筛选发现 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 14 元环拟肽

L8-1 溶血率降低至 1%。

其后, Robinson 课题组以 L8-1 为先导化合物进行结构优化 (图 4A), 其中 L27-11 对铜绿假单胞菌 PAO1 的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC) 为 0.004 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 对其他受试 G^- 菌和 G^+ 菌的 MIC 值均 $\geq 64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 4B), 体现出特异、强效杀灭铜绿假单胞菌的活性^[23]。L27-11 浓度提高至 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时没有观察到明显的溶血作用。但 L27-11 容易被人血清中的胰蛋白酶降解。瑞士的 Polyphor 公司进一步优化了此类拟肽的成药性, 采用 α,γ -二氨基丁酸 (Dab) 替代 L27-11 中的赖氨酸或精氨酸, 开发了 POL7080 (也称 RO7033877), 药品名称为 murepavadin。Murepavadin 是首个作用于 G^- 菌外膜蛋白的“first-in-class”抗菌药物, 主要用于治疗铜绿假单胞菌引起的医院获得性细菌性肺炎和呼吸机相关细菌性肺炎。Murepavadin 静脉注射剂最高研究阶段为 III 期临床试验, 目前 2 项 III 期临床试验均已终止 (表 2)。终止原因或与患者发生急性肾损伤的频率高于预期有关。Polyphor 公司 (2022 年更名为 SPEXIS 公司) 官网最新消息显示, 他们目前正积极推动 murepavadin 吸入给药剂型治疗肺纤维化感染的临床研究。

Murepavadin III 期临床试验终止至今尚无新的 LptDE 抑制剂问世。由于 LptDE 是具有复杂结构和多种功能的大分子膜蛋白, 笔者推测缺乏酶活性、难以可溶性表达、柔性强、构象变化、功能结构域未十分明确等问题会给药物筛选模型的构建带来很大挑战, 故而从“源头”上获得新的先导化合物困难大、周期长。此

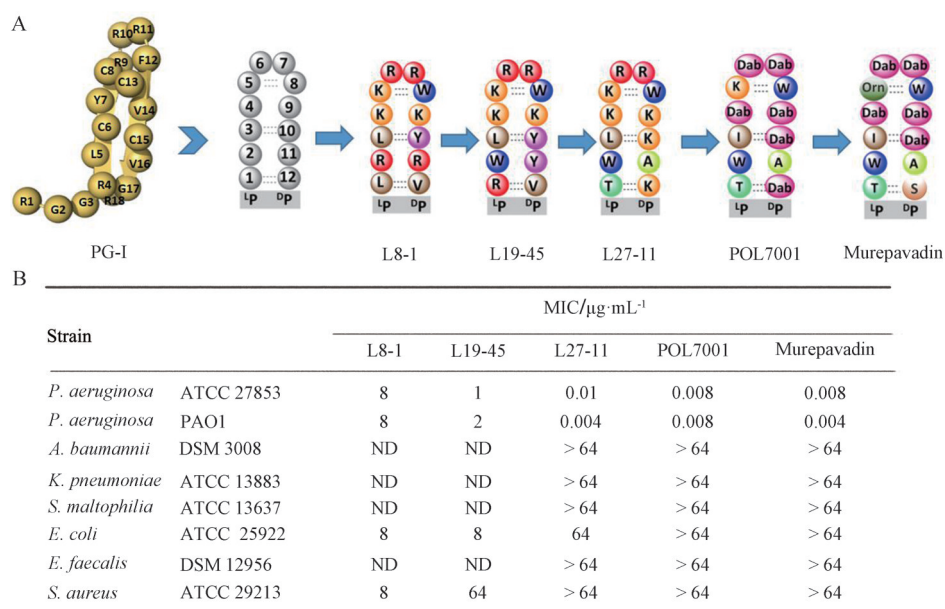


Figure 4 Structures and *in vitro* antimicrobial activities of protegrin I (PG-I) and peptidomimetics. A: Structures of PG-I and peptidomimetics; B: Minimal inhibitory concentration (MIC) of peptidomimetics against a panel of Gram-negative and Gram-positive strains

外, murepavadin 和 LptD 的分子间相互作用还不十分清楚, 因此基于 murepavadin 的化学改造、构-效关系研究等方面也缺乏可靠的分子基础。

5.2 药理学研究进展

5.2.1 体外药理学研究 Murepavadin 对全球范围内分离的 1 219 株铜绿假单胞菌的 50% 和 90% 最低抑菌浓度值 ($MIC_{50/90}$ 值) 为 $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}/0.12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[24]; 对 785 株泛耐药铜绿假单胞菌的 $MIC_{50/90}$ 值为 $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}/0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[25]; 抑制铜绿假单胞菌生物被膜形成的 90% 最低杀膜浓度值 ($MBBC_{90}$ 值) 为 $64 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[26]。

Murepavadin 的最低杀菌浓度 (minimum bactericidal concentration, MBC) 与 MIC 比值为 1~2。其发挥杀菌作用具有一定的浓度、时间依赖性, 在 1~4× MIC 值范围内使活菌数降低至初始接种量的 1/1 000 所需时间为 3~7 h。

观察体外培养条件对 murepavadin 抗菌活性的影响, 发现 50% 的人类血清可以使 murepavadin 抗铜绿假单胞菌的 MIC 值升高 8 倍, 初始接种量 ($5\times 10^5\sim 1\times 10^8 \text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$)、pH 值 (5.5~8.5) 和 50% 的肺表面活性物质对 murepavadin 体外抗菌活性影响不大^[27]。

Murepavadin 的抗生素后效应为 1.2~4.2 h^[28]。1× MIC 值浓度下铜绿假单胞菌对 murepavadin 的随机耐药突变率为 $10^{-8}\sim 10^{-9}$ ^[29]。Murepavadin 联合阿奇霉素、氨曲南、头孢他啶、环丙沙星、黏菌素、亚胺培南抗铜绿假单胞菌均未体现出明显的协同或拮抗作用^[27]。

5.2.2 体内药理学研究 皮下注射 murepavadin 治疗铜绿假单胞菌感染所致小鼠败血症的半数有效剂量范围为 $0.25\sim 0.55 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[23]; 治疗敏感 ($MIC = 0.125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和耐药 ($MIC = 16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 铜绿假单胞菌引起的小鼠败血症的生存率达到 100% 时所需的药物剂量分别为 1 和 $3 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[27]。

采用小鼠腿部感染模型和肺炎模型研究 murepavadin 的药效指数和药效靶值, 发现主要疗效参数为游离血药浓度-时间曲线下面积 (free-drug area under the concentration-time curve, fAUC) 和 MIC 值的比值即 fAUC/MIC。以小鼠肺内活菌数降低至初始接种量的 1/10 为药效靶值, fAUC/MIC 需要达到 39.85^[30]。

小鼠、大鼠、家兔和猴 4 种实验动物的 murepavadin 单剂量药代动力学研究显示, 峰浓度 (maximum plasma concentration, C_{max})、AUC 与给药剂量呈线性关系, 符合二房室模型, 半衰期 ($t_{1/2}$) 为 5~8 h, 血浆清除率 (plasma clearance, CL) 与肾小球过滤率相似。皮下注射生物利用度为 67%~79%, 口服生物利用度 < 0.01%^[31]。Murepavadin 主要分布于肾脏、心脏、肝脏和肺中, 肾脏药物浓度最高, 脑组织药物浓度最低。

Murepavadin 经蛋白降解后主要由尿液排出^[31]。

5.2.3 临床研究 Murepavadin 在美国 FDA 注册的临床试验共 9 项, 包括 I 期临床试验 5 项, II 期临床试验 2 项, III 期临床试验 2 项 (表 2)。健康受试者静脉输注 murepavadin 单次剂量达 $4.5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、多次剂量达 $5 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 持续 6 天, 未出现严重不良反应或死亡^[32]。相较于健康受试者, 肾脏功能损伤者静脉输注 murepavadin 单次剂量为 $2.2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, $AUC_{0-\infty}$ 增加 2~2.5 倍, C_{max} 增加 1.5 倍, CL 由 $7 \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ 降低至 $2.4\sim 3.8 \text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, $t_{1/2}$ 由 7.7 h 延长至 24 h^[33]。常见的不良事件包括输液部位反应、导管部位相关反应、头晕、感觉异常和口周感觉异常, 大多是轻微、一过性现象^[32,33]。PK/PD 模型预测, murepavadin 治疗敏感铜绿假单胞菌 ($MIC = 0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 医院获得性肺炎, 药效达标率为 100%^[34]。目前, murepavadin 联合其他抗菌药物治疗铜绿假单胞菌肺炎的两项 III 期临床试验均已提前终止。美国临床试验数据库 (ClinicalTrials.gov) 中 murepavadin 所登记的两项 III 期临床试验终止的原因均简要记录为“安全数据审查”, Polyphor 公司曾发表声明称 III 期临床试验数据显示, 患者血清中肌酐浓度升高, 急性肾损伤的频率高于预期^[35]。

5.2.4 作用机制研究 Murepavadin 等新型阳离子拟肽具有独特的抗菌谱, 与已知抗菌药物无明显交叉耐药性, 也体现出新机制、新靶标抗菌活性物的优势所在。系列研究显示, L27-11 等抑制 LPS 向外膜转运, 导致 LPS 不能被外膜蛋白 PagL 催化脱去 3-O-脂肪酰基链^[36]。此类药物显著提高铜绿假单胞菌对去污剂 (SDS 和 TritonX-100)、抗菌药物 (替加环素、利福平等) 和荧光染料 diSC3 的通透性, 能够引起细胞内膜样物质堆积、细胞表面出泡、多细胞黏连等形态学改变^[23,36,37]。

Murepavadin 诱导耐药研究显示, 高水平耐药突变菌株 ($MIC > 32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 相较于野生型菌株在 *lptD* 的 β -jellyroll 编码区 628~645 nt 出现了 18 个碱基的重复串联^[23]。体外分子互作实验显示, L27-11 与 LptDE 具有纳摩尔级别的亲和力 [$K_D = (32 \pm 10)\times 10^{-9} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]。以 L27-11 结构类似物 PAL-6 作为光标记探针分子, 在铜绿假单胞菌全细胞水平进行靶标垂钓发现, LptD 与 PAL-6 存在特异性相互作用。通过胰蛋白酶降解使 LptD 片段化, 发现 PAL-6 结合在 LptD 的周质空间区段, 质谱鉴定与 PAL-6 结合的肽段为位于 LptD 周质空间 β -jellyroll 上的 199~201 aa 和插入序列上的 85~87 aa^[37]。相较于其他常见的 G 菌, 周质空间插入序列是铜绿假单胞菌 LptD 所特有的结构^[13], PAL-6 靶向此结构也一定程度解释了 murepavadin 窄谱、特异性杀灭铜绿假单胞菌的独特药理学特性。

Table 2 Clinical researches of murepavadin (POL7080/RO7033877). The data comes from ClinicalTrials.gov. PK: Pharmacokinetics; C_{\max} : Maximum plasma concentration; AUC: Area under the concentration-time curve; ADEs: Adverse events; ECG: Electrocardiogram; PD: Pharmacodynamic

NCT number	Title	Primary outcome measure	Phase	Date	Organization	Status
NCT02165293	A single center study to evaluate the penetration of RO7033877 into the lung in healthy volunteers	Multiple dose PK of RO7033877: C_{\max} , AUC, C_{\max} /AUC	Phase I	2014.6–2014.9	Roche	Completed
NCT02156323	A single-center, open-label, randomized, two sequence, 3-way crossover study to investigate the interaction between multiple doses of colistin methanesulfonate sodium and multiple doses of RO7033877 in healthy subjects	Multiple dose PK of RO7033877 and colistin: C_{\max} , AUC	Phase I	2014.7–2015.3	Roche	Completed
NCT02165332	A two-part, single-dose, randomized study to evaluate the safety of supra-therapeutic doses of RO7033877 and to investigate the effect of RO7033877 on the QTc interval	Part 1: Incidence of ADEs after single supratherapeutic dose of RO7033877; plasma and urine concentrations, AUC Part 2: ECG recordings	Phase I	2014.7–2014.11	Roche	Completed
NCT02110459	An open-label, non-randomized, monocenter, single-dose, phase I study to evaluate PK and safety of POL7080 administered as single intravenous infusion to subjects with renal impairment	Plasma concentrations of POL7080	Phase I	2013.4–2015.7	Polyphor	Completed
NCT02897869	A single-center, open-label, two sequence, crossover study to investigate the interaction between amikacin and POL7080 in healthy subjects	Multiple dose PK of POL7080 and amikacin: plasma C_{\max} , AUC	Phase I	2016.4–2016.12	Polyphor	Completed
NCT02096328	A phase II, open-label, multi-center study to assess PK, safety and efficacy of POL7080 co-administered with standard of care treatment in patients with ventilator-associated pneumonia due to suspected or documented <i>P. aeruginosa</i> infection	Plasma concentrations of POL7080	Phase II	2013.10–2016.12	Polyphor	Completed
NCT02096315	A phase II, open-label, multicenter study to assess the tolerance, safety, efficacy and PK/PD of POL7080 in the treatment of patients with acute exacerbation of non-cystic fibrosis bronchiectasis due to <i>P. aeruginosa</i> infection requiring intravenous treatment	Sputum bacterial clearance	Phase II	2013.12–2015.11	Polyphor	Terminated
NCT03409679	A multicenter, open-label, randomized, active-controlled, parallel group, pivotal study to investigate the efficacy, safety and tolerability, and pharmacokinetics of murepavadin combined with one anti-pseudomonal antibiotic versus two anti-pseudomonal antibiotics in adult subjects with ventilator-associated bacterial pneumonia suspected or confirmed to be due to <i>P. aeruginosa</i>	Clinical cure rate	Phase III	2016.4–2016.12	Polyphor	Terminated
NCT03582007	A multicenter, open label, sponsor blinded, randomized, active controlled, parallel group, pivotal study to evaluate the efficacy, safety, and tolerability of murepavadin given with ertapenem versus an anti-pseudomonal- β -lactam-based antibiotic in adult subjects with nosocomial pneumonia suspected or confirmed to be due to <i>P. aeruginosa</i>	All cause mortality rates	Phase III	2018.10–2019.7	Polyphor	Terminated

另有一些研究揭示了此类拟肽可能的多机制、多靶标效应。如 murepavadin 可以通过 MRGPRX2 激活人体肥大细胞的免疫调节功能, 有助于细菌清除和伤口愈合^[38]; PmrB 变异后的 LPS 化学修饰也可以引发铜

绿假单胞菌对 murepavadin 耐药^[39]; 同类拟肽 JB-95 不仅作用于 LptD, 而是作用于更多的 β -桶状外膜蛋白^[40]。

以往研究显示, 抗菌肽不仅可以直接作用于细菌发挥抗/杀菌活性, 且常常具有免疫调节功能。但是目

前的研究显示 murepavadin 不能中和 LPS 诱导的巨噬细胞活化, 没有明显的免疫调节功能和抗炎作用^[41]。

6 展望

LptDE 蛋白复合体因其特殊的细胞定位、重要的生物学功能、高度的 G 菌特异性被视为理想的抗菌新靶标, murepavadin 所体现出来的窄谱、强效杀铜绿假单胞菌活性印证了 LptDE 的可靶性, 开创了以抑制 LPS 转运蛋白为作用机制的新型抗菌药物研究, 为临床最为棘手的耐药铜绿假单胞菌抗感染治疗带来了希望。

从 murepavadin 等拟肽类抗菌药物的研究历程可以看出, 此类药物并不是基于靶标发现的, 而是通过诱导耐药、靶标垂钓等反向找靶的方法定位到其作用靶标。Murepavadin 首次报道的时间甚至要早于 LptDE 三维结构破译 4 年。目前为止, 还没有一个真正基于靶标发现的 LptDE 抑制剂。

LptDE 是具有复杂结构和功能的膜蛋白, 可能通过瞬时的动态变构完成多种分子功能。基于此类“非酶”靶标的药物发现具有一定挑战性, 一方面需要尽可能精细化靶标蛋白的功能-结构域、分子机制, 另一方面需要借助高效、准确的实体或虚拟筛选策略获得先导化合物。本课题组尝试基于分子间相互作用构建药物高通量筛选模型并初步得到一些与 LptDE 结合能力较强的活性分子, 其靶标特异性和分子机制有待进一步验证。当前人工智能 (artificial intelligence, AI) 技术逐渐应用于先导化合物发现和优化、药物分子从头生成、分子设计等新药研究的各个环节。相较于传统计算机辅助的苗头化合物识别, 基于 AI 的药物发现更为准确、快速、有效, 未来将有望助力基于此类“非酶”靶标的新药发现。另外, 蛋白水解靶向嵌合体 (PROTACs) 等新技术的发展, 特别是最近报道的 BacPROTACs 技术^[42], 也扩展了细菌中可靶蛋白的范围, 或为干预复杂结构-功能的蛋白靶标 (诸如 LptDE 在细胞质中的前体蛋白) 提供全新的解决方案。预计在不久的将来, 基于 LptDE 的药物研究定会会有所发现, 突破当前单一的结构类型, 为临床抗 G 菌感染提供更为丰富的候选药物。

作者贡献: 李玥负责文献检索和综述撰写; 李国庆、田元元、李聪然负责文章修改; 杨信怡、姚开虎、游雪甫负责文章的思路指导、审阅及完善工作。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Anderson MS, Raetz CR. Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262: 5159-5169.
- [2] Kalinin DV, Holl R. LpxC inhibitors: a patent review (2010-2016) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2017, 27: 1227-1250.
- [3] Sampson B. Identification and characterization of a new gene of *Escherichia coli* K-12 involved in outer membrane permeability [J]. *Genetics*, 1989, 3: 491-501.
- [4] Aono R. Mapping of organic solvent tolerance gene *OstA* in *Escherichia coli* K-12 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 7: 1231-1235.
- [5] Braun M, Silhavy TJ. Imp/OstA is required for cell envelope biogenesis in *Escherichia coli* [J]. *Mol Microbiol*, 2002, 45: 1289-1302.
- [6] Wu T, McCandlish AC, Gronenberg LS, et al. Identification of a protein complex that assembles lipopolysaccharide in the outer membrane of *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 11754-11759.
- [7] Sperandio P, Cescutti R, Villa R, et al. Characterization of LptA and LptB, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189: 244-253.
- [8] Ruiz N, Gronenberg LS, Kahne D, et al. Identification of two inner-membrane proteins required for the transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 5537-5542.
- [9] Sperandio P, Lau FK, Carpentieri A, et al. Functional analysis of the protein machinery required for transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli* [J]. *J Bacteriol*, 2008, 190: 4460-4469.
- [10] Link AJ, Robison K, Church GM. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12 [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 1259-1313.
- [11] Ruiz N, Chng SS, Hiniker A, et al. Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107: 12245-12250.
- [12] Shankaramma SC, Athanassiou Z, Zerbe O, et al. Macrocyclic hairpin mimetics of the cationic antimicrobial peptide protegrin I: a new family of broad-spectrum antibiotics [J]. *Chembiochem*, 2002, 3: 1126-1133.
- [13] Moehle K, Kocherla H, Bacsá B, et al. Solution structure and dynamics of LptE from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Biochemistry*, 2016, 55: 2936-2943.
- [14] Botte M, Ni D, Schenck S, et al. Cryo-EM structures of a LptDE transporter in complex with pro-macrobodies offer insight into lipopolysaccharide translocation [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 1826.
- [15] Botos I, Majdalani N, Mayclin SJ, et al. Structural and functional characterization of the LPS transporter LptDE from Gram-negative pathogens [J]. *Structure*, 2016, 24: 965-976.
- [16] Qiao S, Luo Q, Zhao Y, et al. Structural basis for lipopolysaccharide insertion in the bacterial outer membrane [J]. *Nature*, 2014, 511: 108-111.
- [17] Dong H, Xiang Q, Gu Y, et al. Structural basis for outer

- membrane lipopolysaccharide insertion [J]. *Nature*, 2014, 511: 52-56.
- [18] Malojeic G, Andres D, Grabowicz M, et al. LptE binds to and alters the physical state of LPS to catalyze its assembly at the cell surface [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111: 9467-9472.
- [19] Lundquist KP, Gumbart JC. Presence of substrate aids lateral gate separation in LptD [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2020, 1862: 183025.
- [20] Freinkman E, Chng SS, Kahne D. The complex that inserts lipopolysaccharide into the bacterial outer membrane forms a two-protein plug-and-barrel [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 2486-2491.
- [21] Grabowicz M, Yeh J, Silhavy TJ. Dominant negative LptE mutation that supports a role for LptE as a plug in the LptD barrel [J]. *J Bacteriol*, 2013, 195: 1327-1334.
- [22] Chimalakonda G, Ruiz N, Chng SS, et al. Lipoprotein LptE is required for the assembly of LptD by the beta-barrel assembly machine in the outer membrane of *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 2492-2497.
- [23] Srinivas N, Jetter P, Ueberbacher BJ, et al. Peptidomimetic antibiotics target outer-membrane biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Science*, 2010, 327: 1010-1013.
- [24] Sader HS, Dale GE, Rhomberg PR, et al. Antimicrobial activity of murepavadin tested against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the United States, Europe, and China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62: e00311-18.
- [25] Sader HS, Flamm RK, Dale GE, et al. Murepavadin activity tested against contemporary (2016-17) clinical isolates of XDR *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73: 2400-2404.
- [26] Diez-Aguilar M, Ekkelenkamp M, Morosini MI, et al. Anti-biofilm activity of murepavadin against cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2021, 76: 2578-2585.
- [27] Martin-Loeches I, Dale GE, Torres A. Murepavadin: a new antibiotic class in the pipeline [J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2018, 16: 259-268.
- [28] Bernardini FM. *In vitro* evaluation of MBCs, killing kinetics and inoculum effect of the novel *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic POL7080 [C]// European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. London: The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2012: 1456.
- [29] Diez-Aguilar M, Hernandez-Garcia M, Morosini MI, et al. Murepavadin antimicrobial activity against and resistance development in cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2021, 76: 984-992.
- [30] Melchers MJ, Teague J, Warn P, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of murepavadin in neutropenic mouse models [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63: e01699-18.
- [31] Kuhlmann O. Metabolism and excretion of the novel macrocycle antibiotic POL7080 [C]// European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Amsterdam: The European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2016: 1703.
- [32] Wach A, Dembowski K, Dale GE. Pharmacokinetics and safety of intravenous murepavadin infusion in healthy adult subjects administered single and multiple ascending doses [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62: e02355-17.
- [33] Dale GE, Halabi A, Petersen-Sylla M, et al. Pharmacokinetics, tolerability, and safety of murepavadin, a novel antipseudomonal antibiotic, in subjects with mild, moderate, or severe renal function impairment [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62: e00490-18.
- [34] Food and Drug Administration. Murepavadin (POL7080) a Pathogen-specific, Novel Antibiotic for the Treatment of Infections Due to *P. aeruginosa* in Patients with Nosocomial Pneumonia: Report of FDA Public Workshop [R]. Wallnöfer: FDA, 2017.
- [35] Polyphor closes the Phase III PRISM studies of murepavadin intravenous formulation and evaluates further product improvement options [EB/OL]. Allschwil, Switzerland: FirstWorld PHARMA, 2019 [2019-07-17]. <https://firstworldpharma.com/story/4824705>.
- [36] Werneburg M, Zerbe K, Juhas M, et al. Inhibition of lipopolysaccharide transport to the outer membrane in *Pseudomonas aeruginosa* by peptidomimetic antibiotics [J]. *Chembiochem*, 2012, 13: 1767-1775.
- [37] Andolina G, Bencze LC, Zerbe K, et al. A peptidomimetic antibiotic interacts with the periplasmic domain of LptD from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13: 666-675.
- [38] Amponnawarat A, Chompunud N, Ali H. Murepavadin, a small molecule host defense peptide mimetic, activates mast cells via MRGPRX2 and MrgprB2 [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 689410.
- [39] Romano KP, Warrior T, Poulsen BE, et al. Mutations in PmrB confer cross-resistance between the LptD inhibitor POL7080 and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, 63: e00511-19.
- [40] Urfer M, Bogdanovic J, Lo MF, et al. A peptidomimetic antibiotic targets outer membrane proteins and disrupts selectively the outer membrane in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 1921-1932.
- [41] Javed A, Slingerland CJ, Wood TM, et al. Chimeric peptidomimetic antibiotic efficiently neutralizes lipopolysaccharides (LPS) and bacteria-induced activation of RAW macrophages [J]. *ACS Infect Dis*, 2023, 9: 518-526.
- [42] Morreale FE, Kleine S, Leodolter J, et al. BacPROTACs mediate targeted protein degradation in bacteria [J]. *Cell*, 2022, 185: 2338-2353.