



## Identifikasi Mekanisme Molekuler Senyawa Ftalosianina sebagai Kandidat *Photosensitizer* pada Terapi Fotodinamika secara *In Silico*

Taufik Muhammad Fakih\*, Anggi Arumsari, Mentari Luthfika Dewi, Nurfadillah Hazar, Tanisa Maghfira Syarza

Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Ranga Gading No. 8, Bandung 40116 Telp. (022) 4203368

\*Corresponding author: [taufikmuhammadf@gmail.com](mailto:taufikmuhammadf@gmail.com)

DOI: 10.20961/alchemy.17.1.41184.37-42

Received 16 April 2020, Accepted 16 October 2020, Published 08 March 2021

### Kata kunci:

*photosensitizer*;  
ftalosianina;  
*Pseudomonas aeruginosa*;  
studi *in silico*;  
terapi  
fotodinamika.

**ABSTRAK.** Bakteri patogen seperti *Pseudomonas aeruginosa* membutuhkan zat besi untuk dapat mempertahankan kelangsungan hidupnya. HasAp merupakan suatu protein yang dihasilkan oleh bakteri patogen sebagai sumber zat besi tersebut. Protein HasAp selanjutnya akan berikatan dengan protein membran luar yaitu HasR untuk dapat meneruskan sinyal pada sel bakteri. Penyerapan zat besi pada bakteri patogen ini dapat menjadi strategi pengembangan metode terapi dalam mengendalikan dan mencegah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*, salah satunya dengan memanfaatkan ftalosianina sebagai *photosensitizer* pada terapi fotodinamika. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi, mengevaluasi, dan mengeksplorasi mekanisme aksi senyawa ftalosianina terhadap protein HasAp, serta pengaruhnya pada bagian sisi aktif HasR dengan menggunakan studi *in silico*. Studi ligan-protein *docking* dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2 untuk mengamati afinitas dan interaksi molekuler antara molekul senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan Ga-ftalosianina (Ga-Pc) terhadap makromolekul protein HasAp. Selanjutnya, studi protein-protein *docking* dilakukan terhadap sistem kompleks ligan-protein untuk mengamati pengaruhnya terhadap area pengikatan dari makromolekul protein HasR dengan menggunakan perangkat lunak PatchDock. Berdasarkan hasil ligan-protein *docking*, senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) memiliki afinitas paling baik terhadap kedua protein HasAp, yaitu dengan nilai masing-masing -68,45 kJ/mol dan -69,16 kJ/mol. Kemudian, hasil studi protein-protein *docking* antara kompleks senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan protein HasAp terhadap protein HasR memiliki nilai *Atomic Contact Energy* (ACE) positif, yaitu 556,56 kJ/mol. Perbedaan struktur molekul senyawa ftalosianina terbukti mampu mempengaruhi mekanisme aksi terhadap protein target, sehingga hasil studi ini dapat menjadi acuan dalam mendesain struktur senyawa ftalosianina sebagai kandidat *photosensitizer* dalam terapi fotodinamika.

### Keywords:

*photosensitizer*;  
phthalocyanine;  
*Pseudomonas aeruginosa*;  
*in silico* study;  
photodynamic  
therapy.

**ABSTRACT.** Identification of the Molecular Mechanism of Pthalocyanine Compounds as Photosensitizer Candidates in Photodynamic Therapy by *In Silico*. Pathogenic bacteria including *Pseudomonas aeruginosa* need iron elements to be able to maintain their survival. HasAp is a protein produced by pathogenic bacteria as a source of iron. The HasAp protein will then bind to the outer membrane protein, namely HasR, to be able to forward signals in bacterial cells. Absorption of iron in these pathogenic bacteria can be a strategy for developing therapeutic methods in controlling and preventing infectious diseases caused by pathogenic bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, one of which is by using phthalocyanine as a photosensitizer in photodynamic therapy. This study aims to identify, evaluate, and explore the mechanism of action of phthalocyanine compounds against HasAp proteins, and their effects on the active site of HasR through *in silico* studies. Ligand-protein docking studies were performed using MGLTools 1.5.6 with AutoDock 4.2 to observe the affinity and molecular interactions between molecules of Fe-phthalocyanine (Fe-Pc) and Ga-phthalocyanine (Ga-Pc) against HasAp protein macromolecules. Furthermore, a protein-protein docking study of the ligand-protein complexes system was simulated to observe its effect on the binding area of the HasR protein macromolecules using PatchDock. Based on the ligand-protein docking results, Fe-phthalocyanine (Fe-Pc) compounds have the best affinity for both HasAp proteins, with a binding energy value of -68.45 kJ/mol and -69.16 kJ/mol, respectively. The protein-protein docking study results between the complex compound Fe-phthalocyanine (Fe-Pc) and HasAp protein against HasR protein have a positive Atomic Contact Energy (ACE) value, with an ACE value of 556.56 kJ/mol. Differences in the molecular structure of phthalocyanine compounds are proven to be able to influence the mechanism of action against the target protein. Therefore, the results of this study can be a reference in designing the structure of phthalocyanine compounds as photosensitizer candidates in photodynamic therapy.

## PENDAHULUAN

Protein HasAp merupakan suatu hemofor yang disekresi oleh beberapa bakteri patogen dengan sistem akuisisi heme (Has), diantaranya adalah *Pseudomonas aeruginosa* (Letoffe *et al.*, 1998). Bakteri patogen tersebut memproduksi protein HasAp yang digunakan untuk menangkap heme dari inangnya sebagai sumber zat besi. Heme yang ditangkap oleh protein HasAp selanjutnya berpindah ke reseptor membran luar yang disebut protein HasR (Letoffe *et al.*, 2001). Penyerapan zat besi ini dapat dijadikan salah satu strategi yang efektif dalam menghambat kelangsungan hidup bakteri patogen. Fenomena ini adalah sebuah pendekatan yang menarik terutama untuk pengembangan terapi alternatif dalam mengatasi infeksi bakteri akibat resisten antibiotika (Cassat *and* Skaar, 2013).

Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa resistensi terhadap antibiotika diperkirakan mencapai 45% dari jumlah total kematian yang disebabkan oleh mikroba patogen. Dengan demikian resistensi antimikroba merupakan salah satu ancaman kesehatan yang serius (Tacconelli *et al.*, 2018). Penggunaan *photosensitizer* dan cahaya pada terapi fotodinamika dapat menjadi metode alternatif untuk melawan mikroba patogen (Sugden *et al.*, 2016). Pemancaran cahaya pada panjang gelombang tertentu terhadap molekul *photosensitizer* akan menghasilkan partikel dengan reaktivitas tinggi yang dapat menghancurkan sel mikroba patogen (Denis *and* Hamblin, 2011). Senyawa *photosensitizer* yang saat ini banyak diteliti dan dikembangkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba pathogen yaitu ftalosianina (Staicu *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2015).

Dalam upaya pengembangan dan desain molekul ftalosianina sebagai agen *photosensitizer*, diperlukan studi awal untuk membuktikan interaksi senyawa ftalosianina terhadap protein HasAp pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan pengaruhnya pada sisi aktif pengikatan protein HasR. Penelitian ini mempelajari identifikasi, evaluasi, dan eksplorasi mekanisme aksi struktur molekul ftalosianina (Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan Ga-ftalosianina (Ga-Pc)) terhadap makromolekul protein HasAp dan protein HasR secara *in silico*. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan dalam desain struktur molekul ftalosianina sebagai kandidat *photosensitizer* pada terapi fotodinamika.

## METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tiga struktur kristal makromolekul reseptor, diantaranya dua makromolekul protein HasAp yang membentuk kompleks dengan Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan Ga-ftalosianina (Ga-Pc), serta makromolekul protein HasR. Makromolekul ketiga protein tersebut diperoleh dari web Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) dengan kode PDB masing-masing adalah 3W8O (Shirataki *et al.*, 2014), 5XHL (Shisaka *et al.*, 2019), dan 3CSL (Krieg *et al.*, 2009). Molekul senyawa uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan Ga-ftalosianina (Ga-Pc) yang memiliki aktivitas terhadap protein HasAp serta telah dibuktikan pada penelitian sebelumnya. Perangkat lunak yang digunakan diantaranya terdapat Sistem Operasi Windows 10 dan Linux Ubuntu 18.10, MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2, PatchDock, Chimera 1.14, dan BIOVIA Discovery Studio 2020. Perangkat keras yang digunakan adalah komputer dengan spesifikasi *processor* Intel (R) Core i3-6100 CPU @ 2.30GHz (4 CPUs), *memory* 4096 MB RAM, Harddisk 320GB, dan VGA Intel HD Graphics 520.

### Preparasi Makromolekul Protein

Struktur kristal makromolekul protein HasAp dan HasR yang telah diunduh dari web Protein Data Bank selanjutnya dipreparasi terlebih dahulu dengan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio 2020 dan MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2. Preparasi makromolekul protein ini dilakukan dengan menghilangkan molekul air dan ligan alami, kemudian dilanjutkan dengan menambahkan atom hidrogen polar dan menghitung muatan parsial Kollman (Kurniawan *et al.*, 2018).

### Preparasi Molekul Senyawa Uji

Struktur molekul senyawa uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan Ga-ftalosianina (Ga-Pc) yang telah dipisahkan dari kedua makromolekul protein HasAp. Molekul senyawa ini kemudian dipreparasi dengan penambahan atom hidrogen dan menghitung muatan parsial Gasteiger menggunakan perangkat lunak MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2 (Forli *et al.*, 2016).

### Studi Ligan-Protein Docking

Studi ligan-protein *docking* dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak MGLTools 1.5.6 yang dilengkapi dengan AutoDock 4.2 dengan tujuan untuk mengamati dan mengidentifikasi afinitas dan interaksi molekuler yang terjadi antara makromolekul protein HasAp dengan molekul Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan Ga-ftalosianina (Ga-Pc). Jarak antara bagian permukaan makromolekul protein dan molekul senyawa uji dibatasi dengan batas radius maksimum 0,375 Å. Semua studi dilakukan menggunakan ukuran *grid box* 64×60×60, selanjutnya digunakan metode *Lamarckian Genetic Algorithm* dengan 100 konformasi (Morris *et al.*, 1998).

### Studi Protein-Protein Docking

Studi protein-protein *docking* dilakukan untuk mengamati dan mengidentifikasi afinitas dan interaksi molekuler yang terbentuk antara kompleks ligan-HasAp dengan makromolekul protein HasR dengan menggunakan perangkat lunak PatchDock. Jarak antara bagian permukaan makromolekul protein dan kompleks ligan-HasAp dibatasi dengan batas radius maksimum 4.0 Å. Studi protein-protein *docking* ini menggunakan parameter dengan berdasarkan pada representasi bentuk molekul, bagian sisi aktif pengikatan makromolekul target, serta pemilihan dan penilaian. Studi ini juga dilakukan secara efisien tanpa adanya ikatan antar molekul yang bersifat rigid (Aruleba *et al.*, 2018).

### Analisis Hasil Studi

Hasil dari studi ligan-protein *docking* dan protein-protein *docking* kemudian diamati dan diidentifikasi afinitasnya berdasarkan nilai energi bebas ikatan dan *Atomic Contact Energy* (ACE) (Prabhu and Rajeswari, 2016). Interaksi molekuler yang terjadi dievaluasi dan dieksplorasi, terutama residu asam amino yang berperan pada bagian sisi aktif dengan menggunakan perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio 2020.

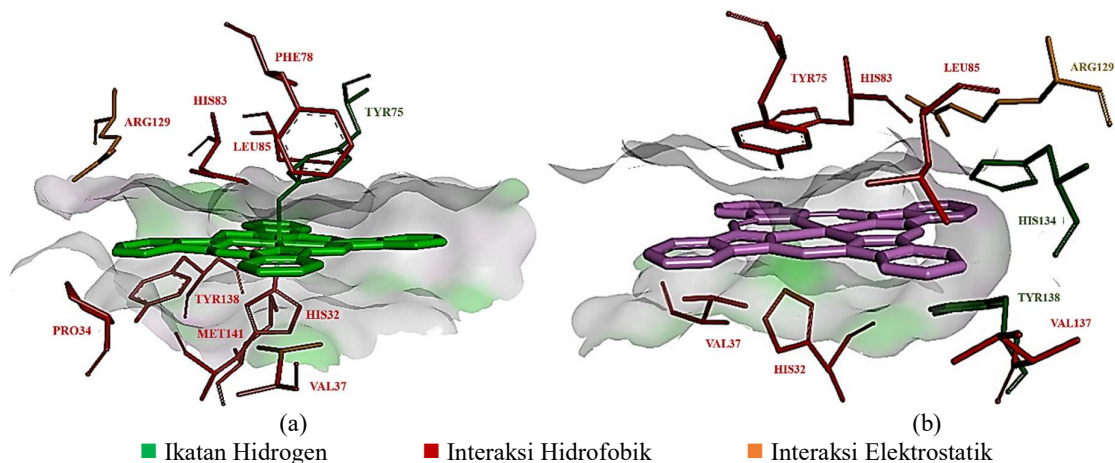
### HASIL DAN PEMBAHASAN

Pose pengikatan ligan-protein dengan konformasi terbaik hasil studi ini dipilih dan dibandingkan berdasarkan nilai energi bebas ikatan. Data hasil ligan-protein *docking* yang terdapat pada Tabel 1 menunjukkan bahwa molekul senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) memiliki afinitas yang paling baik terhadap kedua makromolekul protein HasAp, yaitu dengan nilai energi bebas ikatan masing-masing adalah -68,45 kJ/mol dan -69,16 kJ/mol. Fenomena ini dapat diprediksi bahwa lokasi tempat pengikatan senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) berada pada bagian sisi aktif dari makromolekul protein HasAp.

**Tabel 1.** Nilai energi bebas ikatan hasil studi ligan-protein *docking*.

Senyawa Uji	Energi bebas ikatan (kJ/mol)	
	HasAp-Fe	HasAp-Ga
Fe-ftalosianina (Fe-Pc)	-68,45	-69,16
Ga-ftalosianina (Ga-Pc)	-48,53	-56,44

Identifikasi dan evaluasi lebih lanjut dilakukan terhadap visualisasi dari kompleks molekul senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan Ga-ftalosianina (Ga-Pc) terhadap makromolekul protein HasAp. Seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1, dapat diamati bahwa kedua senyawa uji memiliki kemiripan posisi pengikatan pada area sisi aktif pengikatan dari makromolekul protein HasAp. Namun, apabila dieksplorasi berdasarkan interaksi molekuler yang terbentuk, senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) memiliki interaksi yang lebih banyak dibandingkan senyawa Ga-ftalosianina (Ga-Pc). Interaksi yang terbentuk dari kompleks senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan protein HasAp terdiri dari dua ikatan hidrogen (dengan Tyr75), delapan belas interaksi hidrofobik (dengan His32, Pro34, Val37, Tyr75, Phe78, His83, Leu85, Val137, Tyr138, dan Met141), dan satu interaksi elektrostatik (dengan Arg129). Menariknya, senyawa ini juga memiliki dua ikatan pada logam besi (Fe), yaitu dengan residu asam amino His32 dan Tyr75. Disisi lain, senyawa Ga-ftalosianina (Ga-Pc) hanya mampu membentuk dua puluh interaksi, meliputi empat ikatan hidrogen (dengan His134 dan Tyr138), lima belas interaksi hidrofobik (dengan His32, Val37, Tyr75, His83, Leu85, Arg129, Val137, dan Tyr138), dan satu interaksi elektrostatik (dengan Arg129).



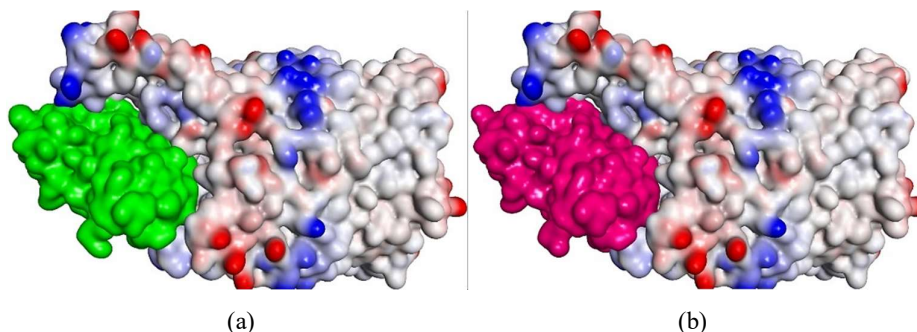
**Gambar 1.** Interaksi molekuler antara makromolekul protein HasAp dengan molekul senyawa (a) Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan (b) Ga-ftalosianina (Ga-Pc).

Pengamatan lebih lanjut dilakukan terhadap kedua kompleks ligan-protein dengan makromolekul HasR menggunakan perangkat lunak PatchDock. Model pengikatan protein-protein dengan konformasi terbaik hasil penambatan molekuler dipilih dan dibandingkan berdasarkan nilai *Atomic Contact Energy* (ACE) (Prabhu dan Rajeswari, 2016). Data hasil studi protein-protein *docking* yang terdapat pada Tabel 2 menunjukkan bahwa kompleks Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan HasAp memiliki nilai ACE positif yaitu 556,56 kJ/mol, sedangkan kompleks Ga-ftalosianina (Ga-Pc) memiliki nilai ACE sebesar -1430,22 kJ/mol. Fenomena tersebut membuktikan bahwa senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) mampu menghambat terjadinya ikatan terhadap makromolekul reseptor HasR sehingga sinyal tidak dapat diteruskan.

**Tabel 2.** Nilai *atomic contact energy* (ACE) hasil studi protein-protein *docking*.

Kompleks Ligan-Protein	<i>Atomic Contact Energy</i> (ACE) (kJ/mol)
Fe-ftalosianina (Fe-Pc) + HasAp	556,56
Ga-ftalosianina (Ga-Pc) + HasAp	-1430,22

Apabila diamati berdasarkan pose pengikatan pada bagian sisi aktif dari makromolekul protein HasR, kedua kompleks ligan-protein memiliki kemiripan (Gambar 2). Namun, kompleks Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan HasAp cenderung membentuk interaksi yang tidak diinginkan (*unfavorable bond*) dengan beberapa residu asam amino pada area pengikatan makromolekul protein HasR, seperti Asn360, Thr363, Tyr367, Lys372, Leu422, Asp423, Asn424, Gln473, Arg542, Thr544, Gly545, Ser547, Ser604, Ser670, Ile671, dan Gly672. Hal ini membuktikan bahwa nilai ACE positif dari kompleks Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan makromolekul protein HasR dapat disebabkan karena adanya interaksi tersebut. Dengan demikian, dapat diprediksi bahwa perbedaan struktur molekul ligan yang terikat pada makromolekul protein HasAp akan dapat mempengaruhi interaksi molekuler yang akan terbentuk dengan makromolekul protein HasR.



**Gambar 2.** Pose pengikatan kompleks (a) Fe-ftalosianina (Fe-Pc) + HasAp dan (b) Ga-ftalosianina (Ga-Pc) + HasAp pada sisi aktif makromolekul protein HasR.

## KESIMPULAN

Penelitian ini telah berhasil mempelajari identifikasi, evaluasi, dan eksplorasi terhadap mekanisme aksi dari molekul senyawa Fe-ftalosianina (Fe-Pc) dan Ga-ftalosianina (Ga-Pc) terhadap makromolekul protein HasAp, serta pengaruhnya terhadap makromolekul protein HasR. Perbedaan struktur molekul terbukti mampu mempengaruhi afinitas senyawa ftalosianina sehingga akan berpengaruh terhadap kemampuan protein HasAp dalam berinteraksi dengan protein HasR yang berperan pada pengaturan sinyal sel bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Oleh karena itu, studi *in silico* sangat penting dalam mendesain dan mengembangkan senyawa ftalosianina sebagai kandidat *photosensitizer* pada terapi fotodinamika.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada LPPM (Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat), Universitas Islam Bandung, atas dukungan finansial yang diberikan melalui skema hibah Penelitian Dosen Muda tahun 2019, No.137/B.04/LPPM/XI/2019.

## DAFTAR PUSTAKA

- Aruleba, R.T., Adekiya, T.A., Oyinloye, B.E., and Kappo, A.P., 2018. Structural Studies of Predicted Ligand Binding Sites and Molecular Docking Analysis of Slc2a4 as a Therapeutic Target for the Treatment of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2), 1–15. doi: 10.3390/ijms19020386.
- Cassat, J. E. and Skaar, E. P., 2013. Iron in Infection and Immunity. *Cell Host Microbe* 13(5), 509–519. doi: 10.1016/j.chom.2013.04.010
- Denis, T.G.S. and Hamblin, M.R., 2011. An Introduction to Photoantimicrobials: Photodynamic Therapy as a Novel Method of Microbial Pathogen Eradication. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 675–683.
- Forli, S., Huey, R., Pique, M.E., Sanner, M., Goodsell, D.S., and Olson, A.J., 2016. Computational Protein-Ligand Docking and Virtual Drug Screening with the AutoDock Suite. *Nature Protocols* 11(5), 905–919. doi: 10.1038/nprot.2016.051.
- Huang, H., Song, W., Riefel, J., and Lovell, J.F., 2015. Emerging Applications of Porphyrins in Photomedicine. *Frontiers of Physics* 3(23), 1–15. doi: 10.3389/fphy.2015.00023.
- Krieg, S., Hucho, F., Diederichs, K., Izadi-Pruneyre, N., Lecroisey, A., Wandersman, C., Delepelaire, P., and Welte, W., 2009. Heme Uptake Across the Outer Membrane as Revealed by Crystal Structures of the Receptor-Hemophore Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(4), 1045–1050. doi: 10.1073/pnas.0809406106.
- Kurniawan, F., Miura, Y., Kartasasmita, R.E., Yoshioka, N., Mutalib, A., and Tjahjono, D.H., 2018. In Silico Study, Synthesis, and Cytotoxic Activities of Porphyrin Derivatives. *Pharmaceuticals* 11(1), 1–18. doi: 10.3390/ph11010008.
- Letoffe, S., Deniau, C., Wolff, N., Dassa, E., Delepelaire, P., Lecroisey, A., and Wandersman, C., 2001. Haemophore-mediated Bacterial Haem Transport: Evidence for a Common or Overlapping Site for Haem-Free and Haem-Loaded Haemophore on its Specific Outer Membrane Receptor. *Molecular Microbiology* 41(2), 439–450. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02530.x.
- Letoffe, S., Redeker, V., dan Wandersman, C., 1998. Isolation and Characterization of an Extracellular Haem-Binding Protein from *Pseudomonas aeruginosa* that Shares Function and Sequence Similarities with the *Serratia marcescens* HasA Haemophore. *Molecular Microbiology* 28(6), 1223–1224. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00885.x.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Bewley, R.K., and Olson, A.J., 1998. Automated Docking using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry* 19(14), 1639–1662. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B.
- Prabhu, D.S. and Rajeswari, V.D., 2016. *In silico* Docking Analysis of Bioactive Compounds from Chinese Medicine *Jinqi Jiangtang* Tablet (JQJTT) using Patch Dock. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8(5), 15–21.
- Shirataki, C., Shoji, O., Terada, M., Ozaki, S., Sugimoto, H., Shiro, Y., and Watanabe, Y., 2014. Inhibition of Heme Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* by its Hemophore (HasAp) Bound to Synthetic Metal Complexes. *Angewandte Chemie International Edition* 126(11), 2862–2866. doi: 10.1002/anie.201307889.
- Shisaka, Y., Iwai, Y., Yamada, S., Uehara, H., Toshi, T., Sugimoto, H., Shiro, Y., Stanfield, J.K., Ogawa, K., Watanabe, Y., and Shoji, O., 2019. Hijacking the Heme Acquisition System of *Pseudomonas aeruginosa* for

- the Delivery of Phthalocyanine as an Antimicrobial. *ACS Chemical Biology* 14(7), 1637–1642. doi: 10.1021/acscchembio.9b00373.
- Staicu, A., Pascu, A., Nuta, A., Sorescu, A., Raditoiu, V., and Pascu, M.L., 2013. Studies About Phthalocyanine Photosensitizers to be used in Photodynamic Therapy. *Romanian Reports in Physics* 65(3), 1032–1051.
- Sugden, R., Kelly, R., and Davies, S., 2016. Combatting Antimicrobial Resistance Globally. *Nature Microbiology* 1(10), 16187–16192. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.187.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., et al., 2018. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 18(3), 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.