

МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗЫ: ВЛИЯНИЕ СТРОЕНИЯ АКТИВНЫХ ЦЕНТРОВ НА МЕХАНИЗМЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ И ИНГИБИРОВАНИЯ

©2021 г. Е. О. ЛЕВИНА¹, М. Г. ХРЕНОВА^{1,2*}

¹ *Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

² *Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Классификация металло- β -лактамаз. III. Механизмы гидролиза β -лактамов IV. Механизмы ингибирования металло- β -лактамаз. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Растущее число случаев устойчивости к антибактериальным препаратам ставит под угрозу эффективное лечение широкого ряда инфекций, вызываемых бактериями. Эффективное проведение химиотерапии, инвазивных процедур, трансплантации органов невозможно в условиях отсутствия антибактериальных препаратов широкого спектра действия. Ежегодно заболевания, вызванные резистентными микроорганизмами, вызывают порядка 70000 смертей в США и Европе [1]. Одними из наиболее популярных противомикробных препаратов являются β -лактамы (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы), ингибирующие синтез клеточной стенки бактерий. Однако в последние годы увеличивается распространение β -лактамаз, способных гидролизовать широкий спектр β -лактамов. Среди них стоит выделить отдельно большой класс металло- β -лактамаз (M β L), содержащих в активном центре один или два катиона цинка [2, 3].

*Адрес для корреспонденции: khrenova.maria@gmail.com

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (18-74-10056).

II. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТАЛЛО- β -ЛАКТАМАЗ

M β L – обширный класс ферментов, который на сегодняшний день насчитывает порядка 500 представителей [4]. Все они имеют характерную сендвичную $\alpha\beta/\beta\alpha$ структуру (M β L fold) [5, 6] в которой β -листы окружены α -спиралями и катионы цинка располагаются на границе β -листов (рис. 1). Несмотря на низкую степень совпадения аминокислотных последовательностей внутри класса M β L (~2–25 % между представителями разных подклассов) [6], структурно среди них выделяют 3 подкласса: B1, B2 и B3 (табл. 1). Представители подкласса B2 имеют наиболее высокий порог идентичности аминокислотных последовательностей (~ 55 %), тогда как внутри подклассов B1 и B3 он составляет порядка ~ 20 % [7, 8]. Каждый из выделяемых подклассов имеет характерные особенности в отношении числа катионов цинка в активном центре ферментов и спектра гидролизуемых субстратов (табл. 2). Ферменты B1 (наиболее клинически значимые и многочисленные среди всех M β L [9]) и B3 в активной форме, в подавляющем большинстве, двуцинковые, а B2 – одноцинковые [5, 7]. Аминокислотные остатки, координирующие катион Zn²⁺ (табл. 2, рис. 2), совпадают у всех трех подклассов, за исключением цистеина – в подклассе B3 эту роль играет гистидин. Находящийся на месте цистеина серин в подклассе B3, не участвует в координации Zn²⁺, но играет важную роль в гидролизе субстратов, формируя с ними водородные связи [10–12]. Также для некоторых представителей подкласса B3 (таких как, например, GOB-18 или LRA-12) характерно наличие метионина в данной позиции [11, 13]. Катион Zn¹⁺ для представителей подклассов B1 и B3 координирован тремя остатками гистидина, в то время как для подкласса B2 на месте одного из гистидинов находится аспарагин (Табл. 2). Кристаллическая структура Sfh-I [14] позволяет предполагать, что в активной форме представителей подкласса B2 Zn¹⁺ может быть замещен молекулой воды, формирующей водородные связи с гистидинами. Также в активных центрах всех M β L присутствует гидроксид-ион или молекула воды, ответственные за гидролитическую активность данных ферментов [8] (рис. 2).

Другой характерной особенностью M β L являются петли, находящиеся вблизи активного центра (рис. 1). Подвижные петли L3 и L10 у ферментов подкласса B1 во многом обуславливают их гидролитическую активность как в отношении карбапенемов, так и пеницилинов и цефалоспоринов [5, 15, 16]. В процессе связывания субстрата петля L3 закрывает активный центр фермента, тем самым косвенно участвуя в процессе гидролиза [15, 17]. В пользу особой роли данной

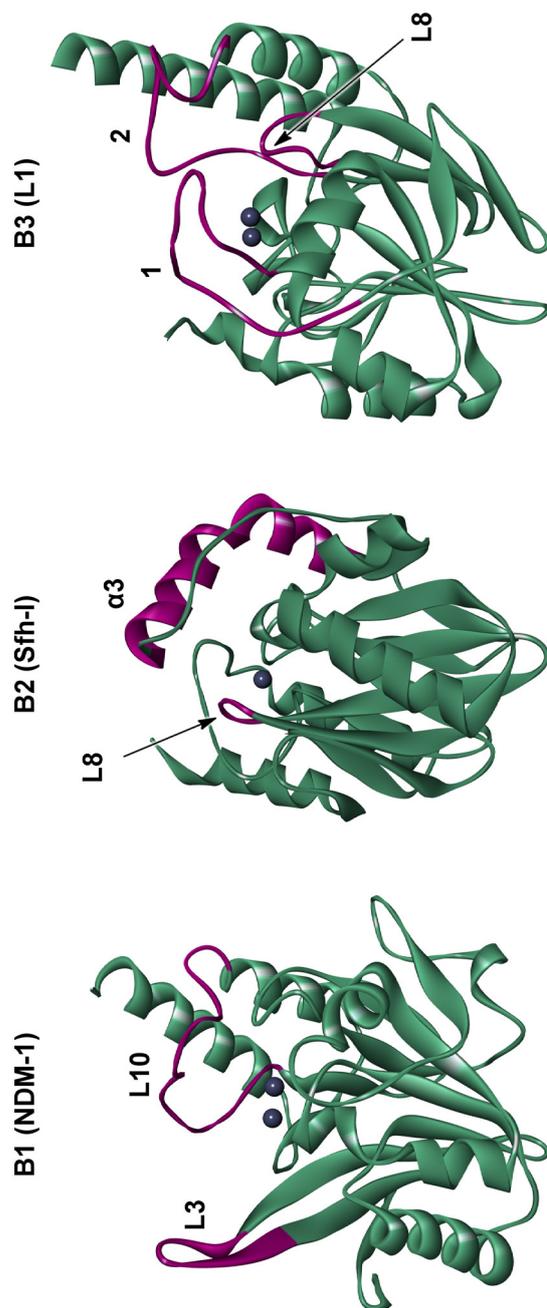


Рис. 1. Структуры представителей различных подклассов M β L в активных формах (PDB 3SPU [26], 3SD9 [14], 1SML [27]). Катионы цинка обозначены серыми сферами. Петли и участки структуры, ответственные за особенности гидролитической активности данных ферментов, выделены малиновым.

Таблица 1. Некоторые представители подклассов В1, В2 и В3 металло- β -лактамаз.

	Число ферментов ^{а)}	Представители	Микроорганизм [6]
В1	340	BcII	<i>Bacillus cereus</i>
		BlaB	<i>Chryseobacterium meningoseptica</i>
		Bla2	<i>Bacillus anthracis</i>
		CcrA	<i>Bacteroides fragilis</i>
		IMP-1	<i>Serratia Marcescens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		SPM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		NDM-1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i>
		VIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
В2	26	CphA	<i>Aeromonas hydrophila</i>
		Sfh-I	<i>Serratia fonticola</i>
В3	151	AIM-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		BJP-1	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
		CPS-1	<i>Chryseobacterium piscium</i>
		GOB-1	<i>Chryseobacterium meningoseptica</i>
		FEZ-1	<i>Legionella gormannii</i>
		L1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
		SMB-1	<i>Serratia marcescens</i>

^{а)} согласно базе данных MBLED [4]

петли также говорит тот факт, что представители подкласса В2, имеющие более короткую петлю L3 и дополнительную гидрофобную область вблизи активного центра, формируемую за счет $\alpha 3$ спирали (рис. 1), способны гидролизовать только карбапенемы [16, 18] (табл. 2). Мутации, влияющие на уменьшение подвижности петли L10 в ферменте NDM-1 [19], указывают на снижение каталитической активности данного фермента в отношении как пенициллинов, так и цефалоспоринов и карбапенемов. Ферменты класса В3 имеют другую организацию петель в области активного центра [20] (рис. 1). Петли 1 и 2 так же участвуют в распознавании субстратов [21]. Исследования мутаций в области петли L8 демонстрируют, что ее строение связано со скоростью гидролиза антибиотиков в активном центре фермента [22].

Таблица 2. Структурные особенности активного центра В1, В2 и В3 подклассов МβL и данные об их гидролитической активности.

		В1	В2	В3
Число катионов Zn ²⁺ в активном состоянии / в неактивном состоянии ^{а),б)}		2 / 1 (Zn1)	1(Zn2) / 2	2
Остатки координирующие катионы Zn ²⁺	Zn1	3 His	— ^{в)}	3 His ^{г)}
	Zn2	Asp, Cys, His	Asp, Cys, His	Asp, 2 His
Гидролизуемые субстраты		Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы	Карбапенемы	Преимущественно пенициллины и цефалоспорины
Не гидролизуемые (слабо гидролизуемые) субстраты		Монобактамы	Монобактамы, пенициллины, цефалоспорины	Монобактамы, карбапенемы

^{а)} в случае одного катиона цинка в скобках указано какой именно катион присутствует в данной форме;

^{б)} существует ряд исследований, указывающий на гидролитическую активность одноцинковых ферментов подклассов В1 (В1а2 [28]) и В3 (L1 [29]);

^{в)} в области сайта связывания Zn1, который занимает молекула воды в случае одноцинковой формы фермента, присутствуют остаток Asn и два остатка His;

^{г)} в случае ферментов семьи GOB, продуцируемых *Chryseobacterium Meningoseptica*, на месте одного из гистидинов присутствует глутамин [11].

Следует отдельно отметить, что SPM-1, являющаяся представителем подкласса В1, имеет сходное строение петель с подклассом В2: для нее также отсутствует мобильная петля L3 [23]. Однако это не отражается на ее гидролитической активности [16, 24]. Данная особенность связана с различиями в аминокислотной последовательности в области дополнительного фрагмента вблизи активного центра (между спиралью α3 и β-листом β7), поскольку при замене данного фрагмента (24 аминокислотных остатка) на аналог, характерный для В2 (17 аминокислотных остатков), SPM-1 теряла активность в отношении пенициллинов и цефалоспоринов [25]. Также другой особенностью SPM-1 (наряду с GOB) является активность в одноцинковой форме, хотя В1 и В3 МβL являются двуцинковыми ферментами [7].

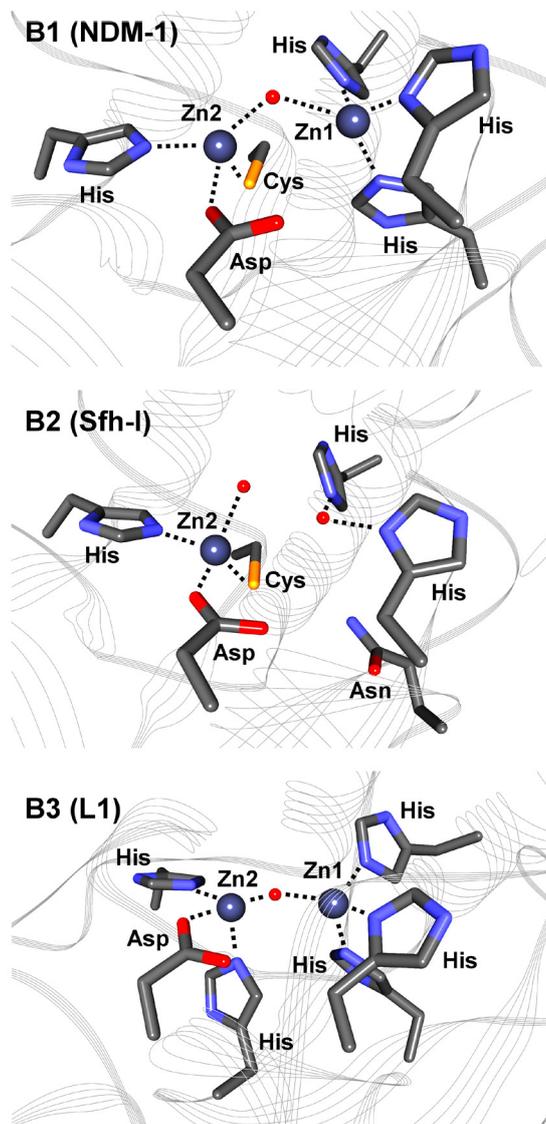


Рис. 2. Активные центры представителей различных подклассов MβL в активных формах (PDB 3SPU [26], 3SD9 [14], 1SML [27]).

Водородные и координационные связи отмечены пунктиром, красными сферами показаны атомы кислорода OH⁻ иона (B1, B3) и молекулы воды (B2), координированные катионами Zn²⁺ и формирующие водородные связи с аминокислотными остатками в активном центре.

III. МЕХАНИЗМЫ ГИДРОЛИЗА В-ЛАКТАМОВ

Все МβL инактивируют β-лактамы за счет нуклеофильной атаки ОН⁻ иона или молекулы воды, находящихся в активном центре фермента, что приводит к разрыву С–N связи β-лактамного кольца. Источник нуклеофильной атаки подтверждается различными исследованиями, в том числе анализом структур ферментов без антибиотика в активном центре, полученных методом рентгеноструктурного анализа [14, 26, 27, 30–34]. Наличие именно гидроксид-иона, координированного двумя катионами Zn²⁺, в случае ферментов подклассов В1 или В3, обусловлено понижением рK_a связанной воды. На основе данных о расстоянии между ОН⁻ ионом и Zn1/Zn2 (1.9–2.0 Å и 2.5–3.0 Å, соответственно, для ферментов подкласса В1), предполагается, что именно Zn1 ответственен за понижение рK_a [5]. После разрыва С–N связи стабилизация полученного анионного интермедиата происходит преимущественно за счет Zn2, присутствующего у представителей всех подклассов. Это подтверждается инактивацией МβL при удалении Zn2 из активного центра [5]. Данная особенность объясняет гидролитическую активность ферментов с различным количеством катионов цинка в активном центре. Однако в зависимости от рассматриваемого подкласса и группы гидролизуемых β-лактамов существует ряд особенностей протекания реакции.

Поскольку для установления механизма биохимической реакции экспериментальные техники во многих случаях дополняются моделированием данных процессов, далее значительное внимание будет уделено исследованию реакций гидролиза β-лактамов комбинированным методом квантовой механики и молекулярной механики (КМ/ММ) [35, 36]. Он широко используется для описания трехмерной структуры макромолекулярных комплексов и установления энергетического профиля ферментативной реакции.

МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА β-ЛАКТАМОВ В1 МβL

Нуклеофильная атака

Для двуциковых МβL гидроксид-ион, находящийся в активном центре фермента, является нуклеофилом, атакующим С=О группу β-лактамного кольца и приводящего к разрыву С–N связи [5] (рис. 3). Данная стадия является общей для пенициллинов, цефалоспоринов и карбапенемов. В следующих этапах реакции значительную роль играет остаток аспарагиновой кислоты, координирующий катион Zn2 (см. табл. 2). При КМ/ММ моделировании (SCC-DFTB/ММ) первого этапа гидролиза ампицилина в активном центре NDM-1, протон ОН⁻ группы переносился на Asp124. Это подтверждается

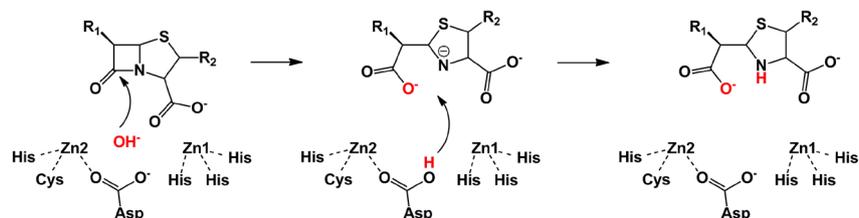


Рис. 3. Схема механизма гидролиза пеницилинов MβL B1.

исследованиями активности VcII MβL при низких значениях pH [37]. Действительно, протонирование остатка аспартата, координирующего Zn2 и OH⁻ в активном центре фермента, приводит к деактивации VcII. Исследования кристаллизованных структур MβL *Bacillus cereus* явно указывают на удаление Asp120 от Zn2 и отсутствие OH⁻ в активном центре при pH = 4.5 [38]. Изучение мутантных форм VcII (D120N, D120E, D120Q, D120S) также подтверждают значительную роль Asp120 в стабилизации положения катиона цинка [39].

Моделирование раскрытия β-лактамного кольца ампицилина под действием MβL NDM-1 (SCC-SFTB/CHARMM22) явным образом демонстрирует перенос протона на Asp124 [40]. Энергетический барьер рассматриваемой стадии составил 19.4 ккал/моль, согласно данным, полученным после пересчета волновой функции стационарных точек реакционного пути в приближении B3LYP/MM. Также авторы указывают на особую роль остатков Asn220 и Lys211, дополнительно стабилизирующих связывание субстрата в активном центре NDM-1. Поскольку данные остатки формируют водородные связи с карбоксильными группами гидролизованного субстрата, теоретические работы, посвященные гидролизу карбапенемов NDM-1, демонстрируют схожие выводы [41, 42]. Анализ кристаллических структур интермедиатов гидролиза карбапенемов (имипенема и меропенема) NDM-1, полученных в 2017 г., подтверждают формирование водородных связей между Asn220 и карбоксильной группой антибиотиков, образовавшейся в ходе гидролиза [43]. Также данные структуры демонстрируют межатомные расстояния, характерные для водородной связи между Lys211 и карбоксильной группой 5-членного кольца.

Подводящее большинство экспериментальных и теоретических исследований гидролиза β-лактамов указывают на прямое взаимодействие карбоксильных групп гидролизованных субстратов с катионами Zn²⁺ [40, 41, 43–46]. Однако для гидролиза антибиотика цефалоспоринового ряда (цефотаксима) MβL CstA в работе [47] был

предложен одностадийный механизм в котором взаимодействие карбоксильной группы 6-членного кольца с Zn^{2+} происходит через дополнительную молекулу воды. Для этого проводилось КМ/ММ (BLYP/AMBER) молекулярно-динамическое моделирование (NVT ансамбль) с использованием молекулярной динамики Кара-Паринелло. В полученном механизме дополнительная молекула воды служит источником H^+ для протонирования азота 6-членного кольца. Барьер реакции на поверхности энергии Гельмгольца составил 18 ± 2 ккал/моль. Также проводилось моделирование (PM3/AMBER) гидролиза нитроцефина CsgA в котором карбоксильная группа субстрата взаимодействовала с соответствующим катионом цинка напрямую [48]. Однако для явного подтверждения/опровержения предложенного в [47] механизма требуется более детальное изучение гидролиза цефалоспоринов металло-β-лактамазами B1, включающее исследование кристаллических структур интермедиатов данной реакции.

Протонирование анионного интермедиата

Ряд исследований указывает, что стадия протонирования анионного интермедиата, образующегося после разрыва β-лактамного кольца, является лимитирующей стадией гидролиза MβL подкласса B1 [37, 39, 49–51]. Так, кинетический изотопный эффект растворителя для гидролиза цефотаксима и нитроцефина VcII и CsgA ($Pk_{cat} > 1$) демонстрирует, что именно этап протонирования гидролизованного субстрата, а не нуклеофильной атаки является лимитирующей стадией реакции [39, 50]. Это также подтверждается данными об изменении спектра поглощения в ходе реакции нитроцефина с BlaB [51]. Нитроцефин является хромогенным субстратом и демонстрирует красное смещение полосы интермедиата (665 нм) по сравнению с полосами субстрата и продукта реакции (390 и 485 нм) и позволяет получать спектры поглощения с временным разрешением в процессе гидролиза. Полученные данные [51] указывают на быстрое накопление интермедиата с его последующим медленным расходом и демонстрируют, что именно протонирование интермедиата является лимитирующей стадией гидролиза: константа скорости для этапа нуклеофильной атаки оказывалась выше в 7–12 раз. Последующие исследования [49] гидролиза нитроцефина BlaB методом остановленной струи также подтверждают данный факт.

Тем не менее, стадия протонирования частично гидролизованного интермедиата различается в зависимости от класса гидролизующих β-лактамов. Действительно, при гидролизе пенициллинов после раскрытия β-лактамного кольца отрицательный заряд оказывается

сконцентрирован на азоте 5-членного цикла, что приводит к его дальнейшему протонированию [18] (рис. 3). В случае цефалоспоринов и карбапенемов за счет делокализации отрицательного заряда вдоль N–C–C фрагмента существуют два основных варианта протекания реакции: протонирование атома азота или углерода 5- или 6-членного кольца.

^1H и ^{13}C ЯМР исследования гидролиза карбапенемов M β L NDM-1 [43, 52] указывают на протонирование атома атома C₂ в сопряженной системе N₄–C₃–C₂ интермедиата реакции (рис. 4а). В [43] авторы сообщают о наличии только β -диастериомера в продуктах гидролиза. В других работах наблюдалось присутствие α -диастериомера: соотношение α : β для гидролиза имипенема NDM-1 составило $\sim 1:5$ [52], для VcII $\sim 7:3$ [53]. Т.е. в последнем случае предполагаемый механизм реакции имеет два пути. Наличие α -диастериомера объясняется последующим переходом $\Delta 2$ таутомера в более стабильную $\Delta 1$ форму в растворе [52]. Возможным донором протона для образования β -диастериомера является вода, находящаяся в активном центре со стороны гидрофобной петли L10. Данное предположение подтверждается МД моделированием (силовое поле AMBER, NVT ансамбль) поведения воды в активном центре комплекса NDM-1 с меропенемом, демонстрирующим наличие некоторого количества молекул воды в данной области [52]. В работах N.N. Nair и коллег [42, 54] также было проведено КМ/ММ МД моделирование с использованием молекулярной динамики Кара-Паринелло (PBE/AMBER) процесса гидролиза имипенема и меропенема NDM-1. Протонирование атома азота происходило за счет молекулы воды, диффундирующей в активный центр, и оказывалось более выгодным, чем непосредственный перенос протона с Asp124 на атом N. Однако авторы отмечают, что несмотря на делокализацию заряда вдоль N₄–C₂–C₃ фрагмента, таутомеризация двойной связи в ходе моделирования не наблюдалась [42]. Лимитирующей стадией реакции было присоединение OH⁻, протекающее с энергетическим барьером 20 ккал/моль для двух рассмотренных антибиотиков.

При моделировании гидролиза цефалоспоринов кроме одностадийного механизма, предложенного в работе [47], С.К. Das и N.N. Nair [54] предложили многостадийный механизм гидролиза цефалексина NDM-1 в котором Lys211 выступал бы в качестве донора протона в ходе протонирования атома углерода в 6-членном кольце анионного интермедиата. Перенос протона происходил при помощи цепочки из двух молекул воды, которая формировалась после стадии раскрытия β -лактамного кольца. Барьер лимитирующей стадии гидролиза, как

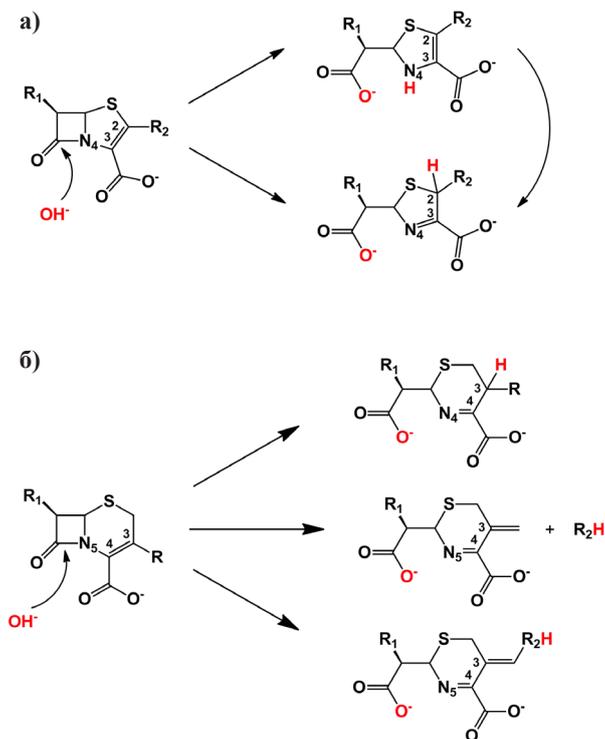


Рис. 4. Продукты гидролиза карбапенемов (а) и цефалоспоринов (б) МβL NDM-1 (подкласс B1).

и в случае с работами данных авторов по гидролизу карбапенемов [42, 54], составил 20 ккал/моль и относился к стадии нуклеофильной атаки OH^- иона. Как было отмечено выше, также был предложен двухстадийный механизм гидролиза нитроцефина [48] в котором после раскрытия β-лактамного кольца протонирование атома N происходило за счет молекулы воды, диффундирующей к катионам цинка.

Следует отметить, что, согласно экспериментальному исследованию гидролиза цефалоспоринов NDM-1 методами ^1H ЯМР и PCA [55], для цефалоспоринов существуют дополнительные варианты механизма гидролиза в зависимости от природы заместителя при атоме C_3 в фрагменте $\text{N}_5\text{-C}_4\text{-C}_3$ (рис. 4b). Протонирование атома C_3 , предложенное С.К. Das и N.N. Nair [54], происходит только в случае, если в заместителе отсутствует двойная связь, проводящая к дополнительному сопряжению с фрагментом $\text{N}_5\text{-C}_4\text{-C}_3$. Если двойная связь присутствует и R_2 является хорошо уходящей группой (как, например,

в цефуроксиме), образуется продукт с отщеплением R_2 . В третьем случае наблюдается смещение двойной связи в заместителе.

Существуют также теоретические исследования механизма гидролиза В1 МβL с единственным катионом цинка в активном центре. Р. Carloni и соавторы [56] моделировали гидролиз цефотаксима одноцинковой ВсII МβL при помощи КМ/ММ МД (BLYP/AMBER). Активный центр фермента без субстрата содержал только катион Zn1. Zn2 отсутствовал, причем на его месте не находилась дополнительная молекула воды, которая обычно характерна для одноциновых ферментов (см. раздел посвященный подклассу В2). После нуклеофильной атаки OH^- иона источником протонирования атома N становилась молекула воды, которая мигрировала в реакционную область на первой стадии гидролиза. Барьеры свободной энергии на первой и второй стадиях реакции составили 18.5 ± 2.0 и 21.0 ± 2.0 ккал/моль, соответственно. Несмотря на то, что для ферментов подкласса В1 существуют гидролитически активные одноциновые варианты [28], на сегодняшний день в литературе отсутствуют данные по активным одноциновым формам ВсII. Существующие данные изучения активности ВсII предполагают, что данный фермент *in vivo* активен именно в двуциновой форме [57].

МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА β-ЛАКТАМОВ В3 МβL

Подкласс В3 МβL наряду с подклассом В1 представлен в основном двуциновыми ферментами, однако их спектр активности в основном включает антибиотики пенициллинового и цефалоспоринового рядов. Более узкий набор гидролизуемых субстратов связывают с особенностями строения петли L8 (см. рис. 1), которая имеет схожую роль с петлей L3 в В1 МβL [7, 58]. Примечательно, что в случае МβL AIM-1 конформация данной петли значительно отличается от характерной для большинства представителей данного подкласса [59]. L8 также оказывается короче на два или три аминокислотных остатка по сравнению с FEZ-1, VJP-1 и L1 и содержит в себе Gln157, который отсутствует у остальных МβL кроме SMB-1. Согласно исследованиям кристаллических структур AIM-1 и SMB-1 [59–61] Gln157 участвует в процессе распознавания субстрата за счет формирования с ним водородной связи. Структуры, полученные в КМ/ММ моделировании гидролиза цефалоспорина AIM-1 (B3LYP/OPLS-2005), указывают на взаимодействие Gln157 с карбоксильной группой цефокситина [59]. Связывание Gln157 именно с остовом β-лактамов также подтверждается в кристаллической структуре интермедиата гидролиза дорипенема SMB-1 [61]. Тем не менее, при экспериментальном исследовании кинетики гидролиза Q157A

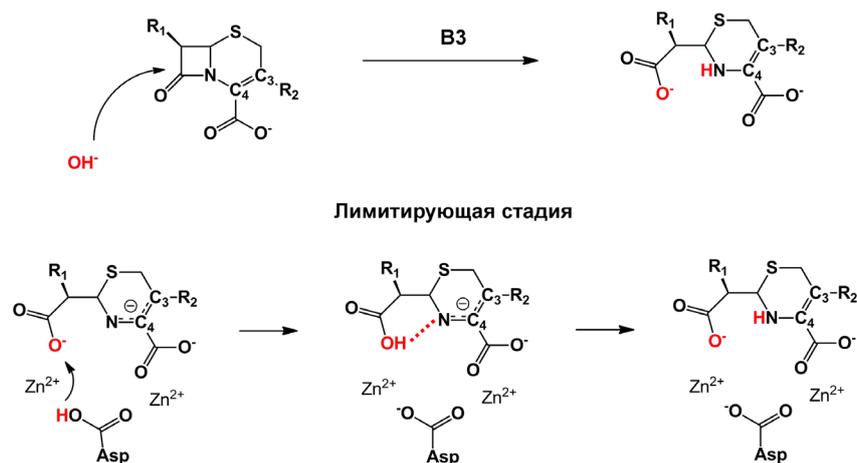


Рис. 5. Схема гидролиза цефалоспоринов L1 MβL (подкласс B3). Водородная связь O–H...N в переходном состоянии обозначена красной пунктирной линией.

мутантной формы не наблюдалось значительных отличий от нативной формы [62]. Данный факт может объясняться тем, что лимитирующей стадией реакции является открытие β-лактамного кольца [59].

Исследование кинетики гидролиза L1 MβL [63] проводилось методом остановленной струи в условиях полного связывания субстрата ферментом ($[E] \gg [S]$). Стадия перехода от анионного интермедиата к продуктам реакции являлась лимитирующей и характеризовалась значением k_{cat} в 5 раз более низким по сравнению со стадией нуклеофильной атаки OH^- . КМ/ММ моделирование [64] данной реакции (PBE0-D3/AMBER) позволило установить детальный механизм ее протекания, а расчет энергий S_0-S_1 переходов методом нестационарной теории функционала плотности, дополненный анализом теоретически полученных кинетических кривых, явным образом соотносит интермедиат, поглощающей в области 665 нм [63], с одним из наблюдавшихся в расчете. Для L1 MβL после нуклеофильной атаки OH^- иона, координированного катионами цинка, и расщепления β-лактамного кольца, происходит протонирование атома азота 6-членного цикла нитроцефина, с переносом протона от протонированного после первой стадии гидролиза остатка Asp120 через кислород карбоксильной группы нитроцефина, образовавшейся в ходе нуклеофильной атаки (рис. 5). Стадия переноса протона происходила с барьером в 16.8 ккал/моль и являлась лимитирующей, а предшествующий ей интермедиат являлся детектируемым в эксперименте.

В ходе исследований особенностей гидролиза антибиотиков цефалоспоринового ряда L1 MβL нами также использовалась комбинация методов КМ/ММ и квантово-топологического анализа электронной плотности, дополненного анализом других дескрипторов, характеризующих химическое связывание [65–68]. Необходимость использования такого комбинированного подхода связана с ошибкой метода КМ/ММ, не позволяющей сопоставлять гидролитическую активность одного фермента в отношении родственных субстратов [65]. В ходе исследований было выявлено, что особенности водородной связи O–H···N в переходном состоянии лимитирующей стадии гидролиза (рис. 5) определяют скорость реакции в активном центре L1 [65]. В частности, низкая делокализация электронной пары атома азота во фрагменте O–H···N–C₄–C₃ способствует высокой скорости гидролиза цефалоспоринов [68].

Моделирование гидролиза оксацефалоспоринов (моксалактам) – антибиотиков родственных цефалоспорином, L1 MβL проводилось как для стадии раскрытия β-лактамного кольца [69, 70], так и для полного механизма гидролиза [71].

В первом случае SCC-DFTB/ММ расчеты [69] указывают на значительную роль Asp120 в ориентации нуклеофила и на протонирование данного остатка только после разрыва C–N связи β-лактамного кольца. Также авторами отмечается особая роль Ser221 в связывании субстрата в активном центре и стабилизация интермедиата в активном центре посредством непосредственного взаимодействия сформированной из C=O β-лактамного кольца карбоксовой группы и атома N 6-членного кольца с катионами цинка. Энергетический барьер данной стадии был оценен в 23.5 ккал/моль. Исследование полного механизма гидролиза [71] (PBE0-D3/AMBER) указывает, что на финальной стадии происходит отделение отрицательно заряженного фрагмента заместителя R₂, что приводит к его укорочению и смещению двойной связи в шестичленном кольце гидролизованного антибиотика в позицию N–C₄ (аналогично представленному на рис. 4б). Энергетический барьер первой стадии составил 14.3 ккал/моль. Однако наибольшие энергетические барьеры (>20 ккал/моль) были получены при попытках описать процесс после отщепления 1-метил-тетразолил-5-тиолята, в том числе диссоциацию комплекса L1 с гидролизованным моксалактамом. Это объясняет устойчивость полученного комплекса, фиксируемого в эксперименте [10] и, как следствие, ингибирующие свойства моксалактама.

МЕХАНИЗМ ГИДРОЛИЗА β -ЛАКТАМОВ В2 М β L

М β L подкласса В2 в активной форме содержат один катион цинка [5–7]. Исследования кристаллической структуры Sfh-I без субстрата [14] указывают, что в координационной сфере Zn1 находятся Asp120, Cys221, His263 и молекула воды. Другая молекула воды находится в положении Zn2 и формирует водородные связи с окружающими ее остатками, причем расстояние между атомами кислорода воды и азота His118 оказывается кратчайшим ($\sim 3.5 \text{ \AA}$). Этот факт позволяет предполагать, что His118 может участвовать в активации данной молекулы воды для нуклеофильной атаки. При исследовании кристаллических структур М β L SphA с биапепепом O. Dieberg и коллегами [72] было высказано предположение, что Asp120 также может участвовать в процессе активации нуклеофила. Исследования гидролиза биапепепа мутантными формами SphA также подтверждают ключевую роль остатков Asp120, His118 и His263 в гидролитической активности данного фермента [73].

При КМ/ММ моделировании гидролиза биапепепа М β L SphA были предложены механизмы, включающие [74] и не включающие [75] в себя образование бициклического интермедиата. В первом случае [74] (SCC-DFTB/CHARMM) нуклеофильная атака происходит за счет единственной молекулы воды, находящейся в активном центре фермента, активируемой Asp120. После миграции второй молекулы воды в активный центр предполагаются два пути протекания реакции: (i) непосредственное протонирование атома N 5-членного цикла антибиотика; (ii) формирование промежуточного бициклического интермедиата за счет вращения вокруг связи C–C бывшего β -лактаманного кольца с последующим протонированием атома N молекулой воды (рис. 6). В случае реализации пути (i) наибольший энергетический барьер имеет стадия раскрытия β -лактаманного кольца (14 ккал/моль), тогда как для побочной ветви реакции максимальный барьер наблюдался при переходе к комплексу фермент-продукт (41 ккал/моль). Авторы также сообщают о наличии кристаллической структуры интермедиата второго пути реакции, который согласуется с данными [72]. D.L. Gatti [76] на основании КМ/ММ моделирования (B3LYP/OPLS-AA) и использования метода метадинамики установил, что бициклическое соединение является продуктом гидролиза SphA, но оно формируется не в активном центре, а в растворе, если гидролизованный биапепеп выходит из активного центра фермента в подходящей конформации (с гидроксильной группой расположенной над плоскостью кольца, см. рис. 6). Также бициклическое соединение обладает высоким сродством к SphA, что объясняет его повторное

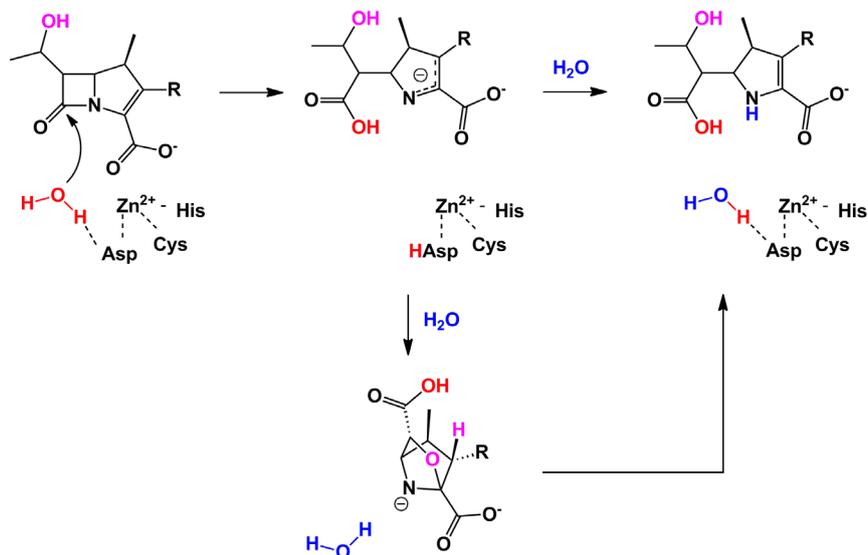
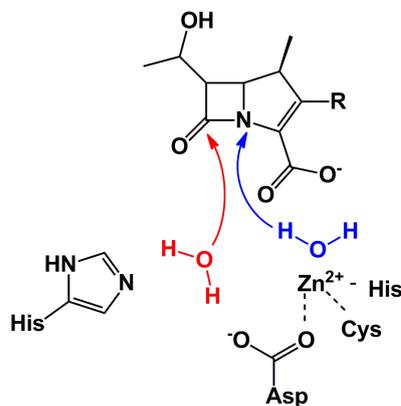


Рис. 6. Схема основной и побочной ветвей механизма гидролиза биапенема MβL CphA (подкласс B2).

связывание в активном центре. Максимальный энергетический барьер предложенного механизма реакции составил 14.3 ккал/моль. Следует также отметить, что J. Bertrán и коллеги [77] отмечают неоднозначность интерпретации кристаллических структур бициклических соединений как интермедиатов [72, 74], поскольку распределение электронной плотности не дает возможности провести явное различие между биапенемом и гидролизованным биапенемом.

Другой предложенный механизм [75], не включающий в себя образование бициклического соединения, предполагает взаимодействие карбоксильной группы 5-членного кольца с катионом цинка не напрямую, а через вторую молекулу воды, связанную с His118 и Asp120 (рис. 7). Моделирование КМ/ММ МД (BLYP/AMBER) демонстрирует одностадийный механизм в котором раскрытие β-лактамного кольца идет одновременно с протонированием атома азота за счет молекулы воды, взаимодействующей с Zn^{2+} . Барьер свободной энергии данного процесса составил 15 ± 2 ккал/моль. Моделирование проведенное S.H. Ackerman и D.L.Gatti [78] также указывает, что нуклеофилом не является молекула воды, связанная с катионом цинка, однако, конфигурация фермент-субстратного комплекса в [78] различается по сравнению с полученной P. Carloni и коллегами в [75]: карбоксильная группа негидролизованного би-

Рис. 7. Схема активного центра МβL CphA (подкласс B2) при моделировании механизма гидролиза биапенема, включавшего в себя не прямое взаимодействие между карбоксильной группой и катионом Zn^{2+} (через молекулу воды).



пенема напрямую взаимодействует с катионом цинка. Также в [77] был предсказан одностадийный механизм гидролиза имипенема CphA (PM3/OPLS-AA) с энергетическим барьером 32.6 ккал/моль. Авторы отмечают, что любые попытки моделирования ступенчатого гидролиза были безуспешны.

III. МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ МЕТАЛЛО-β-ЛАКТАМАЗ

Одной из стратегий для преодоления антибиотикорезистентности является применение ингибиторов β-лактамаз совместно с β-лактамами. Такие комбинированные препараты (содержащие клавулановую кислоту, сульбактам, тазобактам) находят широкое применение в клинической практике [79]. Ключевым недостатком существующих лекарственных форм является распространение микроорганизмов, продуцирующих β-лактамазы невосприимчивые к действию таких ингибиторов. В том числе, к данным организмам относятся бактерии, резистентность которых обусловлена наличием МβL. Особенной сложностью при разработке потенциальных ингибиторов МβL является сочетание необходимости их эффективного ингибирования широкого набора ферментов (в том числе представителей различных подклассов МβL) и низкой токсичности.

По механизму действия соединения, способные деактивировать МβL, в большинстве случаев можно отнести к одной из двух групп: координирующие катионы цинка и связывающие аминокислотные остатки в активном центре фермента [80]. Также в качестве отдельной группы можно выделить аллостерические ингибиторы МβL [81].

Однако данные соединения могут обладать более узким спектром действия по сравнению со связывающимися в активном центре, т.к. различные МβL имеют значительные различия в аминокислотной последовательности [7, 8]. Следует также отметить, что существует ряд ингибиторов МβL с еще не установленным механизмом действия [81].

Ингибиторы, активность которых связана с координацией катионов цинка, делятся на образующие комплексы в активном центре и способствующие удалению катионов цинка из активного центра. Первым обнаруженным ингибитором второй группы была ЭДТА [82, 83]. Несмотря на то, что высокая токсичность делает данное соединение неприменимым в клинической практике, были предложены структурно схожие соединения: ЭДТА-Са(II) [84], АМА [85]; или другие комплексообразователи: NOTA, DOTA [86], TPEN, DPA [87] и их производные [88]. Так, АМА показал эффективность в отношении NDM-1 (в том числе *in vivo*) и VIM-2, восстанавливая чувствительность бактерий к меропенему [85]. Исследования методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индукционно-связанной плазмой показали, что два эквивалента АМА способствует удалению одного эквивалента Zn^{2+} в NDM-1, VIM-2 и IMP-7 при микромолярных концентрациях ферментов [89].

Среди ингибиторов, формирующих координационные связи с катионами цинка непосредственно в активном центре фермента, находятся, например, производные дикарбоновых кислот [90–93], тиола [94–97] и борсодержащих соединений [98, 99]. Некоторые из них проявляют ингибирующую активность и в отношении других ферментов. Так, производные бороновой кислоты, разрабатываемые для ингибирования сериновых металло-β-лактамаз, показали активность в отношении NDM-1 и VIM-2 [98]. Данные РСА для комплекса одного из таких соединений с VIM-2 указывают на то, что в активном центре связывание происходит с двумя катионами цинка: за счет гидроксильных групп атома бора и атома кислорода 6-членного борсодержащего кольца (рис. 8а) [100]. Также примечательно, что пространственное расположение бициклических фенил-боронатных колец и боковой цепи ингибитора подобно положению цефалоспоринов в активном центре МβL. Другим примером потенциальных ингибиторов МβL, проявляющих активность в отношении других ферментов, является каптоприл – производное тиола, применяющийся в клинической практике как ингибитор ангиотензинпревращающего фермента, и обладающее низкой токсичностью [101]. Кристаллические структуры L- и D-каптоприла с МβL В1 и В3 (IMP-1, ВcII, VIM-2 [102], BlaB [103], NDM-1 [46]

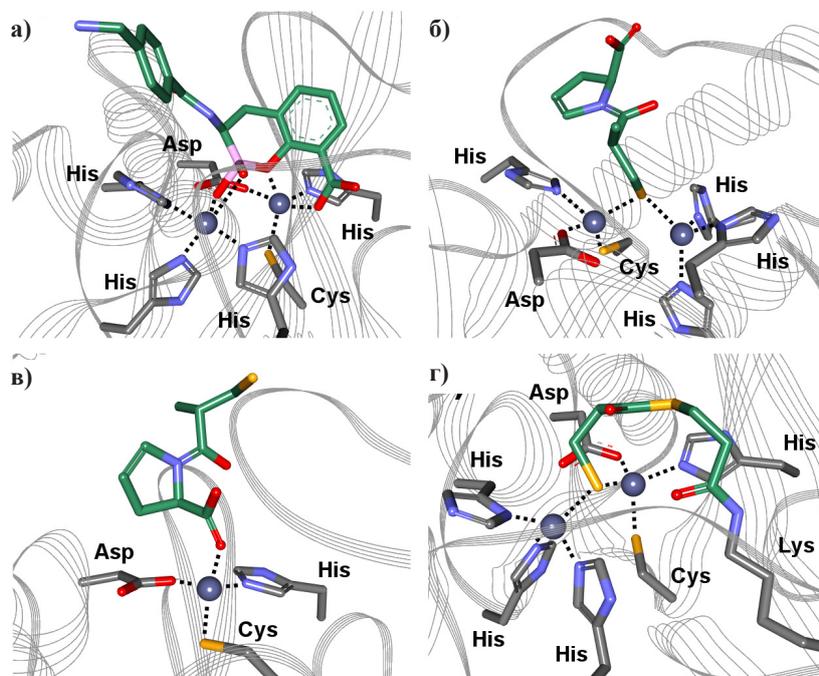


Рис. 8. Комплексы ингибиторов в активных центрах М β Л по данным рентгеноструктурного анализа: (а) борсодержащий ингибитор с VIM-2 (PDB 5FQC [100]), (б) L-каптоприл с NDM-1 (PDB 4EXS [46]), (в) D-каптоприл с SphA (PDB 2QDS [95]), (г) ингибитор, ковалентно связывающийся с остатком лизина IMP-1 (PDB 1VGN [106]). Водородные и координационные связи отмечены пунктиром; атомы углерода ингибитора – зеленым, кислорода – красным, азота – голубым, серы – желтым, бора – розовым. Атомы цинка представлены серыми сферами.

L1 [104] и FEZ-1 [105]) демонстрируют, что катионы цинка координируют тио-группу данных изомеров. Таким образом, OH^- ион, задействованный в нуклеофильной атаке в ходе гидролиза β -лактамов, оказывается замещен атомом серы ингибитора (рис. 8б). Следует также отметить, что именно L- и D-каптоприл из четырех возможных изомеров данного соединения показали наилучшую активность в отношении М β Л подкласса В1 (IMP-1, VIM-2, SPM-1 и NDM-1) [102]. Примечательно, что D-каптоприл демонстрирует пониженную ингибирующую способность в отношении подкласса В2 [95]. Согласно данным о кристаллической структуре с SphA, каптоприл координирует единственный катион цинка при помощи карбоксильной группы (рис. 8в). В работе [95] помимо каптоприла

также были исследованы другие тиолсодержащие соединения методом масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией. Некоторыми рассмотренными производными была продемонстрирована способность ингибировать ферменты всех трех подклассов.

Ингибиторы, ковалентно связывающиеся с аминокислотными остатками в активном центре МβL, имеют ряд очевидных преимуществ, таких как необратимость и значительная длительность действия [81]. Основными мишенями для атаки необратимо связывающихся ингибиторов являются остатки цистеина, координирующего Zn²⁺ (табл. 2) или лизина, присутствующего в активном центре. Так, согласно данным РСА, ингибиторы содержащие эфирную и тио-группы ковалентно связываются с Lys, находящимся в активном центре, за счет первой, в то время как тио-группа координирует катионы цинка IMP-1 (рис. 8г) [106]. Примерами соединений, ковалентно связывающихся с цистеином, являются β-лактамы цефалотин и моксалактам. Следует отметить, что моксалактам также может проявлять ингибирующие свойства за счет устойчивого связывания гидролизованного субстрата в активном центре МβL, не содержащих Cys (подкласс В3). Однако основным недостатком данных β-лактамов является необходимость использования достаточно высоких концентраций для ингибирования некоторых ферментов [107]. Другим примером ингибитора, ковалентно модифицирующего цистеин, является селенсодержащее соединение, эбселен. Формирование связи Se-S было подтверждено исследованием процесса ингибирования NDM-1 с помощью масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией [108]. Следует отметить, что несмотря на успешное формирование ковалентных аддуктов, несомненным минусом данных ингибиторов является чувствительность к различиям в координационных сферах катионов цинка (табл. 2) и аминокислотных остатков в их активных центрах представителей различных подклассов МβL.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Металло-β-лактамазы (МβL) являются структурно разнообразным классом ферментов, используемым бактериями для инактивации широко применяемых в клинической практике антибиотиков – β-лактамов. Особенности строения представителей различных подклассов МβL обуславливают различные пути протекания реакции и широкий спектр гидролизуемых соединений. Так, для двуцинковых ферментов (подклассы В1, В3) источником нуклеофильной атаки, приводящей к раскрытию β-лактамного кольца, является OH⁻ ион,

координированный катионами Zn^{2+} , тогда как для одноцинковых МβЛ (B2) эту роль выполняет молекула воды. Катион Zn^{2+} участвует в стабилизации отрицательного заряда в частично гидролизованном антибиотике, однако особенности электронной делокализации в сохранившемся кольце субстрата, приводят к различным продуктам реакции и скорости протекания гидролиза.

Вариативность в строении активных центров представителей разных подклассов МβЛ также затрудняет создание эффективных ингибиторов МβЛ широкого спектра действия. Необратимо связывающиеся ингибиторы, имеющие значительную длительность действия и формирующие ковалентно-связанный аддукт в активном центре фермента, требуют наличия сохраняющегося у различных МβЛ аминокислотного остатка в активном центре, способствующего процессу гидролиза. Ингибиторы, действующие непосредственно на катионы Zn^{2+} и удаляющие их из активного центра, часто обладают высокой токсичностью. Сопутствующей сложностью является потенциальная способность некоторых МβЛ восстанавливать активность заново связывая цинк. В случае соединений, координирующих катионы Zn^{2+} , одной из ключевых проблем является устойчивость полученного комплекса, которая может значительно различаться для тех или иных представителей МβЛ. Тем не менее, существует ряд ингибиторов МβЛ, которые демонстрируют значительную активность в отношении наиболее клинически значимых ферментов, что позволяет рассматривать их в качестве потенциальных лекарственных средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330420/9789240000193-eng.pdf>
2. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/04-Jun-2019-RRA-Carbapenems%2C%20Enterobacteriaceae-Italy.pdf>
3. Logan, L.K., Weinstein, R.A. (2017) The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace, *The Journal of infectious diseases*, **215**, S28–S36.
4. Pleiss, J. <http://www.mbled.uni-stuttgart.de/>
5. Meini, M.R., Llarrull, L.I., Vila, A.J. (2015) Overcoming differences: the catalytic mechanism of metallo-β-lactamases, *FEBS Letters*, **589**, 3419–3432.
6. Palzkill, T. (2013) Metallo-β-lactamase structure and function, *Annals of the*

- New York Academy of Sciences*, **1277**, 91–104.
7. Karsisiotis, A.I., Damblon, C.F., Roberts, G.C. (2014) A variety of roles for versatile zinc in metallo- β -lactamases, *Metallomics*, **6**, 1181–1197.
 8. Meini, M.R., Llarrull, L.I., Vila, A.J. (2014) Evolution of metallo- β -lactamases: trends revealed by natural diversity and in vitro evolution. *Antibiotics*, **3**, 285–316.
 9. F Mojica, M., A Bonomo, R., Fast, W. (2016) B1-metallo- β -lactamases: where do we stand?, *Current Drug Targets*, **17**, 1029–1050.
 10. Spencer, J., Read, J., Sessions, R.B., Howell, S., Blackburn, G.M., Gamblin, S.J. (2005) Antibiotic recognition by binuclear metallo- β -lactamases revealed by X-ray crystallography, *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 14439–14444.
 11. Morán-Barrio, J., Lisa, M.N., Larrieux, N., Drusin, S.I., Viale, A.M., Moreno, D.M., Buschiazzo, A., Vila, A.J. (2016) Crystal structure of the metallo- β -lactamase GOB in the periplasmic dizinc form reveals an unusual metal site, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**, 6013–6022.
 12. Hou, C.F.D., Liu, J.W., Collyer, C., Mitić, N., Pedroso, M.M., Schenk, G., Ollis, D.L. (2017) Insights into an evolutionary strategy leading to antibiotic resistance, *Scientific Reports*, **7**, 1–13.
 13. Rodríguez, M.M., Herman, R., Ghiglione, B., Kerff, F., D'Amico González, G., Bouillette, F., Galleni, M., Handelsman, J., Charlier, P., Gutkind, G., Sauvage, E., Power P. (2017) Crystal structure and kinetic analysis of the class B3 di-zinc metallo- β -lactamase LRA-12 from an Alaskan soil metagenome, *PLOS One*, **12**, e0182043 (1–18).
 14. Fonseca, F., Bromley, E.H., Saavedra, M.J., Correia, A., Spencer, J. (2011) Crystal structure of *Serratia fonticola* Sfh-I: activation of the nucleophile in mono-zinc metallo- β -lactamases, *Journal of Molecular Biology*, **411**, 951–959.
 15. Huntley, J.J., Fast, W., Benkovic, S.J., Wright, P.E., Dyson, H.J. (2003) Role of a solvent-exposed tryptophan in the recognition and binding of antibiotic substrates for a metallo- β -lactamase, *Protein Science*, **12**, 1368–1375.
 16. Brem, J., Struwe, W.B., Rydzik, A.M., Tarhonskaya, H., Pfeffer, I., Flashman, E., van Berkel, S.S., Spencer, J., Claridge, T.D.W., McDonough, M.A., Benesch, J.L. Schofield, C.J. (2015) Studying the active-site loop movement of the São Paulo metallo- β -lactamase-1, *Chemical Science*, **6**, 956–963.
 17. Karsisiotis, A.I., Damblon, C.F., Roberts, G.C. (2013) Solution structures of the *Bacillus cereus* metallo- β -lactamase BcII and its complex with the broad spectrum inhibitor R-thiomandelic acid, *Biochemical Journal*, **456**, 397–407.
 18. King, D.T., Strynadka, N.C. (2013) Targeting metallo- β -lactamase enzymes in antibiotic resistance, *Future Medicinal Chemistry*, **5**, 1243–1263.
 19. Marcoccia, F., Leiros, H.K.S., Aschi, M., Amicosante, G., Perilli, M. (2018) Exploring the role of L209 residue in the active site of NDM-1 a metallo- β -lactamase, *PLOS One*, **13**, e0189686 (1–12).
 20. Wachino, J.I., Yamaguchi, Y., Mori, S., Kurosaki, H., Arakawa, Y., Shibayama, K. (2013) Structural insights into the subclass B3 metallo-

- β-lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo-β-lactamase inhibitor mercaptoacetate, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 101–109.
21. Palacios, A.R., Rossi, M.A., Mahler, G.S., Vila, A.J. (2020) Metallo-β-Lactamase Inhibitors Inspired on Snapshots from the Catalytic Mechanism, *Biomolecules*, **10**, 854 (1–34).
 22. Carenbauer, A.L., Garrity, J.D., Periyannan, G., Yates, R.B., Crowder, M.W. (2002) Probing substrate binding to metallo-β-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia* by using site-directed mutagenesis, *BMC Biochemistry*, **3**, 4 (1–13).
 23. Murphy, T.A., Catto, L.E., Halford, S.E., Hadfield, A.T., Minor, W., Walsh, T.R., Spencer, J. (2006) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* SPM-1 provides insights into variable zinc affinity of metallo-β-lactamases, *Journal of Molecular Biology*, **357**, 890–903.
 24. Abboud, M.I., Hinchliffe, P., Brem, J., Macsics, R., Pfeffer, I., Makena, A., Umland, K.-D., Rydzik, A.M., Li, G.-B., Spencer, J., Claridge, T.D., Schofield, C.J. (2017) ¹⁹F-NMR Reveals the Role of Mobile Loops in Product and Inhibitor Binding by the São Paulo Metallo-β-Lactamase, *Angewandte Chemie*, **129**, 3920–3924.
 25. González, L.J., Stival, C., Puzolo, J.L., Moreno, D.M., Vila, A.J. (2018) Shaping substrate selectivity in a broad-spectrum metallo-β-lactamase, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **62**, e02079 (1–17).
 26. King, D., Strynadka, N. (2011) Crystal structure of New Delhi metallo-β-lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein Science*, **20**, 1484–1491.
 27. Ullah, J.H., Walsh, T.R., Taylor, I.A., Emery, D.C., Verma, C.S., Gamblin, S.J., Spencer, J. (1998) The crystal structure of the L1 metallo-β-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7 Å resolution, *Journal of Molecular Biology*, **284**, 125–136.
 28. Hawk, M.J., Breece, R.M., Hajdin, C.E., Bender, K.M., Hu, Z., Costello, A.L., Bennett, B., Tierney, D.L., Crowder, M.W. (2009) Differential binding of Co(II) and Zn(II) to metallo-β-lactamase Bla2 from *Bacillus anthracis*, *Journal of the American Chemical Society*, **131**, 10753–10762.
 29. Hu, Z., Periyannan, G., Bennett, B., Crowder, M.W. (2008) Role of the Zn1 and Zn2 sites in metallo-β-lactamase L1, *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 14207–14216.
 30. Yamaguchi, Y., Takashio, N., Wachino, J.I., Yamagata, Y., Arakawa, Y., Matsuda, K., Kurosaki, H. (2010) Structure of metallo-β-lactamase IND-7 from a *Chryseobacterium indologenes* clinical isolate at 1.65-Å resolution, *The Journal of Biochemistry*, **147**, 905–915.
 31. Borra, P.S., Samuelsen, Ø., Spencer, J., Walsh, T.R., Lorentzen, M.S., Leiros, H.K.S. (2013) Crystal structures of *Pseudomonas aeruginosa* GIM-1: active-site plasticity in metallo-β-lactamases, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 848–854.
 32. Salimraj, R., Hinchliffe, P., Kosmopoulou, M., Tyrrell, J.M., Brem, J., van Berkel, S.S., Verma, A., Owens, R.J., McDonough, M.A., Walsh, T.R., Schofield, C.J., Spencer, J. (2019) Crystal structures of VIM-1 complexes explain active site heterogeneity in VIM-class metallo-β-lactamases. *The FEBS Journal*, **286**, 169–183.

33. García-Sáez, I., Mercuri, P.S., Pampicael, C., Kahn, R., Frère, J.M., Galleni, M., G., Rossolini, M., Dideberg, O. (2003) Three-dimensional structure of FEZ-1, a monomeric subclass B3 metallo- β -lactamase from *Fluoribacter gormanii*, in native form and in complex with D-captopril. *Journal of Molecular Biology*, **325**, 651–660.
34. Wachino, J.I., Yamaguchi, Y., Mori, S., Kurosaki, H., Arakawa, Y., Shibayama, K. (2013) Structural insights into the subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- β -lactamase inhibitor mercaptoacetate, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 101–109.
35. Senn, H.M., Thiel, W. (2009) QM/MM methods for biomolecular systems, *Angewandte Chemie International Edition*, **48**, 1198–1229.
36. Levitt, M., Warshel, A. (1976) Theoretical Studies of Enzymic Reactions: Dielectric, Electrostatic and Steric Stabilization of the Carbonium Ion in the Reaction of Lysozyme, *Journal of Molecular Biology*, **103**, 227–492.
37. Bounaga, S., Laws, A.P., Galleni, M., Page, M.I. (1998) The mechanism of catalysis and the inhibition of the *Bacillus cereus* zinc-dependent β -lactamase, *Biochemical Journal*, **331**, 703–711.
38. Davies, A.M., Rasia, R.M., Vila, A.J., Sutton, B.J., Fabiane, S.M. (2005) Effect of pH on the active site of an Arg121Cys mutant of the metallo- β -lactamase from *Bacillus cereus*: implications for the enzyme mechanism, *Biochemistry*, **44**, 4841–4849.
39. Llarrull, L.I., Fabiane, S. M., Kowalski, J.M., Bennett, B., Sutton, B.J., Vila, A.J. (2007) Asp-120 locates Zn²⁺ for optimal metallo- β -lactamase activity, *Journal of Biological Chemistry*, **282**, 18276–18285.
40. Zheng, M., Xu, D. (2013) New Delhi metallo- β -lactamase I: Substrate binding and catalytic mechanism, *The Journal of Physical Chemistry B*, **117**, 11596–11607.
41. Zhu, K., Lu, J., Liang, Z., Kong, X., Ye, F., Jin, L., Heji Geng, Chen, Y., Zheng, M., Jiang, H., Li, J.-Q. (2013) A quantum mechanics/molecular mechanics study on the hydrolysis mechanism of New Delhi metallo- β -lactamase-1, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **27**, 247–256.
42. Tripathi, R., Nair, N.N. (2015) Mechanism of meropenem hydrolysis by New Delhi metallo β -lactamase, *ACS Catalysis*, **5**, 2577–2586.
43. Feng, H., Liu, X., Wang, S., Fleming, J., Wang, D.-C., Liu, W. (2017) The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis, *Nature Communications*, **8**, 2242 (1–11).
44. Kim, Y., Cunningham, M. A., Mire, J., Tesar, C., Sacchettini, J., Joachimiak, A. (2013) NDM-1, the ultimate promiscuous enzyme: substrate recognition and catalytic mechanism, *The FASEB Journal*, **27**, 1917–1927.
45. Zhang, G., Hao, Q. (2011) Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism, *The FASEB Journal*, **25**, 2574–2582.
46. King, D.T., Worrall, L.J., Gruninger, R., Strynadka, N.C. (2012). New Delhi metallo- β -lactamase: structural insights into β -lactam recognition and inhibition. *Journal of the American Chemical Society*, **134**(28), 11362–11365.

47. Dal Peraro, M., Vila, A.J., Carloni, P., Klein, M.L. (2007) Role of zinc content on the catalytic efficiency of B1 metallo β -lactamases, *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 2808–2816.
48. Park, H., Brothers, E.N., Merz, K.M. (2005) Hybrid QM/MM and DFT investigations of the catalytic mechanism and inhibition of the dinuclear zinc metallo- β -lactamase CcrA from *Bacteroides fragilis*, *Journal of the American Chemical Society*, **127**, 4232–4241.
49. Wang, Z., Fast, W., Benkovic, S.J. (1999) On the mechanism of the metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry*, **38**, 10013–10023.
50. Wang, Z., Benkovic, S. J. (1998) Purification, characterization, and kinetic studies of a soluble *Bacteroides fragilis* metallo- β -lactamase that provides multiple antibiotic resistance, *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 22402–22408.
51. Wang, Z., Fast, W., Benkovic, S.J. (1998) Direct observation of an enzyme-bound intermediate in the catalytic cycle of the metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis*, *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 10788–10789.
52. Lisa, M.N., Palacios, A.R., Aitha, M., González, M.M., Moreno, D.M., Crowder, M.W., Bonomo, R.A., Spencer, J., Tierney, D.L., Llarrull, L.I., Vila, A.J. (2017) A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases, *Nature Communications*, **8**, 1–11.
53. Tioni, M.F., Llarrull, L.I., Poeylout-Palena, A.A., Martí, M.A., Saggi, M., Periyannan, G.R., Mata, E.G., Bennett, B., Murgida, D.H., Vila, A.J. (2008) Trapping and characterization of a reaction intermediate in carbapenem hydrolysis by *B. cereus* metallo- β -lactamase, *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 15852–15863.
54. Das, C.K., Nair, N.N. (2017) Hydrolysis of cephalexin and meropenem by New Delhi metallo- β -lactamase: the substrate protonation mechanism is drug dependent, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **19**, 13111–13121.
55. Feng, H., Ding, J., Zhu, D., Liu, X., Xu, X., Zhang, Y., Zang, S., Wang, D.-C., Liu, W. (2014) Structural and mechanistic insights into NDM-1 catalyzed hydrolysis of cephalosporins, *Journal of the American Chemical Society*, **136**, 14694–14697.
56. Dal Peraro, M., Llarrull, L.I., Rothlisberger, U., Vila, A.J., Carloni, P. (2004) Water-assisted reaction mechanism of monozinc β -lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, **126**, 12661–12668.
57. González, J.M., Meini, M.R., Tomatis, P.E., Martín, F.J.M., Cricco, J.A., Vila, A.J. (2012) Metallo- β -lactamases withstand low Zn(II) conditions by tuning metal-ligand interactions. *Nature Chemical Biology*, **8**, 698–700.
58. Moali, C., Anne, C., Lamotte-Brasseur, J., Gros Lambert, S., Devreese, B., Van Beeumen, J., Galleni, M., Frère, J.M. (2003) Analysis of the importance of the metallo- β -lactamase active site loop in substrate binding and catalysis, *Chemistry & Biology*, **10**, 319–329.
59. Leiros, H.K.S., Borra, P.S., Brandsdal, B.O., Edvardsen, K.S.W., Spencer, J., Walsh, T.R., Samuelsen, Ø. (2012) Crystal structure of the

- mobile metallo- β -lactamase AIM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*: insights into antibiotic binding and the role of Gln157, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **56**, 4341–4353.
60. Wachino, J.I., Yamaguchi, Y., Mori, S., Kurosaki, H., Arakawa, Y., Shibayama, K. (2013) Structural insights into the subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- β -lactamase inhibitor mercaptoacetate, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **57**, 101–109.
61. Wachino, J.I., Yamaguchi, Y., Mori, S., Jin, W., Kimura, K., Kurosaki, H., Arakawa, Y. (2016) Structural insights into recognition of hydrolyzed carbapenems and inhibitors by subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**, 4274–4282.
62. Mu, X., Xu, D. (2020) QM/MM investigation of substrate binding of subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1 from *Serratia marcescens*: insights into catalytic mechanism, *Journal of Molecular Modeling*, **26**, 1–11.
63. McManus-Munoz, S., Crowder, M.W. (1999) Kinetic mechanism of metallo- β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*, *Biochemistry*, **38**, 1547–1553.
64. Khrenova, M.G., Nemukhin, A.V. (2018) Modeling the transient kinetics of the L1 metallo- β -lactamase, *The Journal of Physical Chemistry B*, **122**, 1378–1386.
65. Khrenova, M.G., Krivitskaya, A.V., Tsirelson, V.G. (2019) The QM/MM-QTAIM approach reveals the nature of the different reactivity of cephalosporins in the active site of L1 metallo- β -lactamase, *New Journal of Chemistry*, **43**, 7329–7338.
66. Khrenova, M.G., Tomilko, A.V., Tsirelson, V.G. (2019) Electronic steric factors in the active site of metallo- β -lactamase and reactivity of cephalosporin antibiotics, *Moscow University Chemistry Bulletin*, **74**, 106–110.
67. Khrenova, M.G., Tsirelson, V.G. (2019) The N \cdots H hydrogen bond strength in the transition state at the limiting step determines the reactivity of cephalosporins in the active site of L1 metallo- β -lactamase, *Mendeleeev Commun*, **29**, 492.
68. Levina, E.O., Khrenova, M.G., Astakhov, A.A., Tsirelson, V.G. (2020) Revealing electronic features governing hydrolysis of cephalosporins in the active site of the L1 metallo- β -lactamase, *RSC Advances*, **10**, 8664–8676.
69. Xu, D., Guo, H., Cui, Q. (2007) Antibiotic deactivation by a dizinc β -lactamase: mechanistic insights from QM/MM and DFT studies, *Journal of the American Chemical Society*, **129**, 10814–10822.
70. Xu, D., Guo, H., Cui, Q. (2007) Antibiotic binding to dizinc β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*: SCC-DFTB/CHARMM and DFT studies, *The Journal of Physical Chemistry A*, **111**, 5630–5636.
71. Хренова М.Г., Кулакова А.М., Григоренко Б.Л., Немухин А.В. (2018) Механизм ингибирования металло- β -лактамазы оксацефалоспориновыми антибиотиками, *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*, **59**, 261–264.
72. Garau, G., Bebrone, C., Anne, C., Galleni, M., Frère, J.M., Dideberg, O. (2005) A metallo- β -lactamase

- enzyme in action: crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem, *Journal of Molecular Biology*, **345**, 785–795.
73. Bebrone C., Anne C., Kerff F., Garau G., De Vriendt K., Lantin R., Devreese B., Van Beeumen J., Dideberg O., Frère J.-M., Galleni M. (2008) Mutational analysis of the zinc- and substrate-binding sites in the CphA metallo-β-lactamase from *Aeromonas hydrophila*, *Biochemical Journal*, **414**, 151–159.
74. Wu, S., Xu, D., Guo, H. (2010) QM/MM studies of monozinc β-lactamase CphA suggest that the crystal structure of an enzyme-intermediate complex represents a minor pathway. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 17986–17988.
75. Simona, F., Magistrato, A., Dal Peraro, M., Cavalli, A., Vila, A.J., Carloni, P. (2009) Common Mechanistic Features among Metallo-β-lactamases. A computational study of *Aeromonas hydrophila* CphA enzyme, *Journal of Biological Chemistry*, **284**, 28164–28171.
76. Gatti, D.L. (2012) Biapenem inactivation by B2 metallo β-lactamases: energy landscape of the post-hydrolysis reactions, *PLOS One*, **7**, e30079 (1–17).
77. Meliá, C., Ferrer, S., Moliner, V., Bertran, J. (2015) Theoretical studies of the hydrolysis of antibiotics catalyzed by a metallo-β-lactamase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **582**, 116–126.
78. Ackerman, S.H., Gatti, D.L. (2013) Biapenem inactivation by B2 metallo β-lactamases: energy landscape of the hydrolysis reaction, *PLoS One*, **8**, e55136 (1–11).
79. Drawz, S.M., Bonomo, R.A. (2010) Three decades of β-lactamase inhibitors, *Clinical Microbiology Reviews*, **23**, 160–201.
80. Shi, C., Chen, J., Kang, X., Shen, X., Lao, X., Zheng, H. (2019) Approaches for the discovery of metallo-β-lactamase inhibitors: A review, *Chemical Biology & Drug Design*, **94**, 1427–1440.
81. Ju, L.C., Cheng, Z., Fast, W., Bonomo, R.A., Crowder, M.W. (2018) The continuing challenge of metallo-β-lactamase inhibition: mechanism matters, *Trends in pharmacological sciences*, **39**, 635–647.
82. Nordmann, P., Poirel, L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes, *Clinical Microbiology and Infection*, **8**, 321–331.
83. Walsh, T.R., Toleman, M.A., Poirel, L., Nordmann, P. (2005) Metallo-β-lactamases: the quiet before the storm?, *Clinical Microbiology Reviews*, **18**, 306–325.
84. Yoshizumi, A., Ishii, Y., Livermore, D.M., Woodford, N., Kimura, S., Saga, T., Harada, S., Yamaguchi, K., Tateda, K. (2013) Efficacies of calcium-EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by *Escherichia coli* with NDM-1 β-lactamase, *Journal of Infection and Chemotherapy*, **19**, 992–995.
85. King, A.M., Reid-Yu, S.A., Wang, W., King, D.T., De Pascale, G., Strynadka, N.C., Walsh, T.R., Coombes, B.K., Wright, G. D. (2014) AMA overcomes antibiotic resistance by NDM and VIM metallo-β-lactamases, *Nature*, **510**, 503–506.
86. Somboro, A.M., Tiwari, D., Bester, L.A., Parboosing, R., Chonco, L., Kruger, H.G., Arvidsson, P.I., Go-

- vender, T., Naicker, T., Essack, S.Y. (2015) NOTA: a potent metallo- β -lactamase inhibitor, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **70**, 1594–1596.
87. Azumah, R., Dutta, J., Somboro, A.M., Ramtahal, M., Chonco, L., Parboosing, R., Bester L.A., Kruger, H.G., Naicker, T., Essack, S.Y., Govender, T. (2016) *In vitro* evaluation of metal chelators as potential metallo- β -lactamase inhibitors, *Journal of Applied Microbiology*, **120**, 860–867.
88. Zhang, E., Wang, M.M., Huang, S.C., Xu, S.M., Cui, D.Y., Bo, Y.L., Bai, P.-Y., Hua, Y.-G., Xiao, C.-L., Qin, S. (2018) NOTA analogue: A first dithiocarbamate inhibitor of metallo- β -lactamases, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **28**, 214–221.
89. Bergstrom, A., Katko, A., Adkins, Z., Hill, J., Cheng, Z., Burnett, M., Yang, H., Aitha, M., Mehaffey, M.R., Brodbelt, J.S., Tehrani, K.H.M.E., Martin, N.I., Bonomo, R.A., Page, R.C., Tierney, D.L. Fast, W., Wright, G.D., Crowder M.W. (2018) Probing the interaction of aspergillomarasmine A with metallo- β -lactamases NDM-1, VIM-2, and IMP-7, *ACS Infectious Diseases*, **4**, 135–145.
90. Ishii, Y., Eto, M., Mano, Y., Tateda, K., Yamaguchi, K. (2010) *In vitro* potentiation of carbapenems with ME1071, a novel metallo- β -lactamase inhibitor, against metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **54**, 3625–3629.
91. Moloughney, J.G., D. Thomas, J., Toney, J.H. (2005) Novel IMP-1 metallo- β -lactamase inhibitors can reverse meropenem resistance in *Escherichia coli* expressing IMP-1, *FEMS Microbiology Letters*, **243**, 65–71.
92. Olsen, L., Jost, S., Adolph, H.W., Pettersson, I., Hemmingsen, L., Jørgensen, F.S. (2006) New leads of metallo- β -lactamase inhibitors from structure-based pharmacophore design, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **14**, 2627–2635.
93. Feng, L., Yang, K.W., Zhou, L.S., Xiao, J.M., Yang, X., Zhai, L., Zhang, Y.-L., Crowder, M.W. (2012) N-heterocyclic dicarboxylic acids: broad-spectrum inhibitors of metallo- β -lactamases with co-antibacterial effect against antibiotic-resistant bacteria, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **22**, 5185–5189.
94. Klingler, F.M., Wichelhaus, T.A., Frank, D., Cuesta-Bernal, J., El-Delik, J., Müller, H.F., Sjuts, H., Göttig, S., Koenigs, A., Pos, K.M., Pogoryelov, D., Proschak, E. (2015) Approved drugs containing thiols as inhibitors of metallo- β -lactamases: strategy to combat multidrug-resistant bacteria, *Journal of Medicinal Chemistry*, **58**, 3626–3630.
95. Liénard, B.M., Garau, G., Horsfall, L., Karsisiotis, A.I., Damblon, C., Lassaux, P., Papamichael, C., Roberts, G.C.K., Galleni, M., Dideberg, O., Frère, J.M., Schofield, C. J. (2008) Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo- β -lactamases by thiols, *Organic & Biomolecular Chemistry*, **6**, 2282–2294.
96. Mollard, C., Moali, C., Papamichael, C., Damblon, C., Vessilier, S., Amicosante, G., Schofield, C.J., Galleni, M., Frère, J.-M., Roberts, G.C.K. (2001) Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of Zinc β -Lactamases kinetic and spectro

- scopic studies, *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 45015–45023.
97. Lassaux, P., Hamel, M., Gulea, M., Delbrück, H., Mercuri, P.S., Horsfall, L., Dehareng, D., Kupper, M., Frère, J.-M., Hoffmann, K., Galleni, M., Galleni, M. (2010) Mercaptophosphonate compounds as broad-spectrum inhibitors of the metallo-β-lactamases, *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**, 4862–4876.
98. Hecker, S.J., Reddy, K.R., Totrov, M., Hirst, G.C., Lomovskaya, O., Griffith, D.C., King, P., Tsvikovski, R., Sun, D., Sabet, M., Tarazi, Z., Clifton, M.C., Atkins, K., Raymond, A., Potts, K.T., Abendroth, J., Boyer, S.H., Loutit, J.S., Morgan, E.E., Durso, S., Dudley, M.N. (2015) Discovery of a cyclic boronic acid β-lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases, *Journal of Medicinal Chemistry*, **58**, 3682–3692.
99. Reddy, N., Shungube, M., Arvidsson, P.I., Bajjnath, S., Kruger, H.G., Govender, T., Naicker, T. (2020) A 2018-2019 patent review of metallo beta-lactamase inhibitors, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **30**, 541–555
100. Brem, J., Cain, R., Cahill, S., McDonough, M.A., Clifton, I.J., Jiménez-Castellanos, J.C., Avison, M.B., Spencer, J., Fishwick, C.W.G., Schofield, C.J. (2016) Structural basis of metallo-β-lactamase, serine-β-lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates, *Nature Communications*, **7**, 12406 (1–8).
101. Vlasses P.H., Pharm, D., Ferguson, R.K., Chatterjee, K. Captopril: clinical pharmacology and benefit-to-risk ratio in hypertension and congestive heart failure, *Pharmacotherapy*, 1982, **2**, 1–17.
102. Brem, J., van Berkel, S.S., Zollman, D., Lee, S.Y., Gileadi, O., McHugh, P.J., Walsh, T.R., McDonough, M.A., Schofield, C.J. (2016) Structural basis of metallo-β-lactamase inhibition by captopril stereoisomers, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **60**, 142–150.
103. García-Sáez, I., Hopkins, J., Papamichael, C., Franceschini, N., Amicosante, G., Rossolini, G. M., Galleni, M., Frère, J.-M., Dideberg, O. (2003) The 1.5-Å structure of *Chryseobacterium meningosepticum* zinc β-lactamase in complex with the inhibitor, D-captopril, *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 23868–23873.
104. Nauton, L., Kahn, R., Garau, G., Hernandez, J.F., Dideberg, O. (2008) Structural insights into the design of inhibitors for the L1 metallo-β-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*, *Journal of Molecular Biology*, **375**, 257–269.
105. García-Sáez, I., Mercuri, P.S., Papamichael, C., Kahn, R., Frère, J.M., Galleni, M., Rossolini, M., Dideberg, O. (2003) Three-dimensional structure of FEZ-1, a monomeric subclass B3 metallo-β-lactamase from *Fluoribacter gormanii*, in native form and in complex with D-captopril, *Journal of Molecular Biology*, **325**, 651–660.
106. Kurosaki, H., Yamaguchi, Y., Higashi, T., Soga, K., Matsueda, S., Yumoto, H., Misumi, S., Yamagata, Y., Arakawa, Y., Goto, M. (2005) Irreversible inhibition of metallo-β-lactamase (IMP-1) by 3-(3-mercaptopropionylsulfanyl) propionic acid pentafluorophenyl ester, *Angewandte Chemie*, **117**, 3929–3932.

-
107. González, M.M., Vila, A.J. (2016) An elusive task: a clinically useful inhibitor of metallo- β -lactamases. In *Zinc Enzyme Inhibitors* Springer International Publishing: Switzerland, pp. 1–34.
108. Chiou, J., Wan, S., Chan, K.-F., So, P.-K., He, D., Chan E., W.-c., Chan, T.-h., Wong, K.-y., Tao, J. Chen, S. Ebselen as a potent covalent inhibitor of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1), *Chemical Communications*, **51**, 9543–9546.