

УДК 577.151;577.181.5

ИНГИБИТОРЫ β -ЛАКТАМАЗ. НОВАЯ ЖИЗНЬ β -ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ

Обзор

© 2020 А.М. Егоров, М.М. Уляшова, М.Ю. Рубцова*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: mrubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 09.07.2020

После доработки 14.08.2020

Принята к публикации 15.08.2020

β -Лактамные антибиотики составляют около 60% от всех выпускаемых антибиотиков и благодаря своей высокой активности и минимальным побочным эффектам широко используются для лечения различных инфекционных заболеваний человека и животных, включающих тяжелые госпитальные инфекции. Однако глобальное распространение бактерий, резистентных к β -лактамам, привело к их клинической неэффективности. Поиск эффективных способов преодоления устойчивости бактерий к β -лактамам антибиотикам, преимущественным механизмом которой является синтез разнообразных β -лактамаз, разрушающих β -лактаманное кольцо антибиотиков, является важнейшей задачей. Данный обзор посвящен анализу специфических ингибиторов сериновых и металло- β -лактамаз и подходов к созданию новых ингибиторов, которые позволят продлить «жизнь» β -лактамов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антибиотикорезистентность бактерий, β -лактамазы, ингибиторы, β -лактаманые антибиотики.

DOI: 10.31857/S0320972520110020

ЭРА АНТИБИОТИКОВ И РОЛЬ β -ЛАКТАМОВ

Инфекционные заболевания на протяжении многих веков оставались постоянной угрозой здравоохранению, до начала 1900-х гг. на их долю приходилось до 25% смертности [1]. Открытие в 1929 г. британским микробиологом А. Флемингом антимикробных свойств плесени *Penicillium notatum* завершилось созданием первого β -лактаманного антибиотика – пенициллина и ознаменовало появление нового класса лекарственных средств.

β -Лактамные антибиотики, продуцируемые различными бактериями и грибами, существуют в природе более 2 млрд лет. Мишенью их действия являются пенициллин-связывающие белки (ПСБ), катализирующие различные реакции синтеза пептидогликана, – основного элемента клеточной стенки бактерий [2]. Антибактериальная активность основана на структур-

ном сходстве β -лактаманного кольца антибиотика с концевым D-Ala-D-Ala-фрагментом пентапептидов, входящих в состав пептидогликана. β -Лактамы образуют ковалентный комплекс с серином транспептидазного домена ПСБ и, таким образом, являются необратимыми ингибиторами синтеза пептидогликана, вызывая лизис клеток бактерий и потерю ими жизнеспособности.

Высокая эффективность действия пенициллина и его природных аналогов, относительно низкие токсичность и стоимость промышленного синтеза послужили толчком к созданию новых β -лактаманых антибиотиков [3]. Целью химической модификации β -лактамов являлось расширение спектра действия, улучшение фармакокинетических свойств, а также противодействие механизмам резистентности. В настоящее время к этому классу относятся четыре группы соединений, содержащих четырехчленное β -лактаманное кольцо: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы (рис. 1).

Открытие пенициллина явилось одним из наиболее значимых открытий XX века. Успехи в химической модификации пенициллинов, цефалоспоринов и карбапенемов позволили соз-

Принятые сокращения: АМА – аспергилломаразмин А; БЛ – β -лактамазы; БЛРС – β -лактамазы расширенного спектра; ДБО – диазабициклооктан; МБЛ – металло- β -лактамазы; ПСБ – пенициллин-связывающие белки.

* Адресат для корреспонденции.

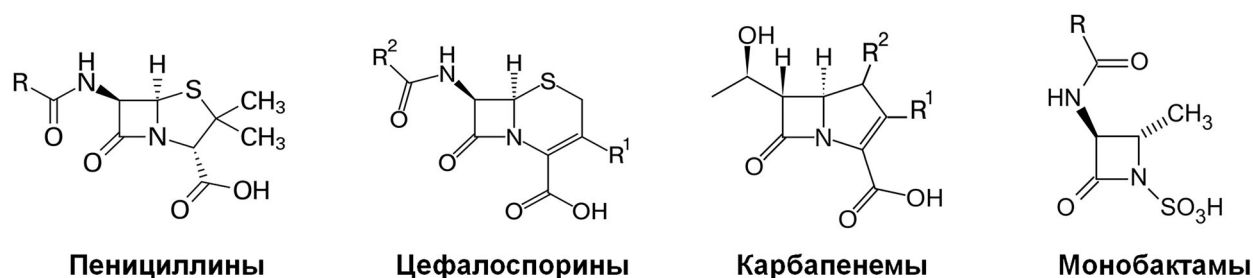


Рис. 1. Структуры основных групп β -лактамных антибиотиков

дать несколько десятков лекарственных препаратов для подавления огромного количества бактериальных инфекций, включая их тяжелые внутрибольничные формы. Отсутствие в организме человека мишени действия β -лактамов обуславливает низкую токсичность этого класса антибиотиков. Благодаря своим свойствам β -лактамные антибиотики уже более 70 лет после начала их клинического применения остаются наиболее часто используемыми антибактериальными препаратами. Они составляют около 60% от всех антибиотиков, применяемых в медицине и сельском хозяйстве для лечения и профилактики инфекционных заболеваний человека и животных [4]. Некоторые антибиотики этого класса относятся к так называемой «группе резерва».

Основным фактором, ограничивающим клиническую эффективность β -лактамных антибиотиков, является эволюция микроорганизмов, приводящая к развитию резистентности. Согласно отчету Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), устойчивость к антимикробным препаратам была названа в 2019 г. одной из десяти основных угроз здоровью населения во всем мире [5]. В результате «жизненный цикл» в практической медицине многих β -лактамов оказался ограниченным, а создание новых соединений этого класса антибактериальных препаратов фатально сократилось.

«ТРАГЕДИЯ» β -ЛАКТАМНЫХ АНТИБИОТИКОВ, β -ЛАКТАМАЗЫ И МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

Практически одновременно с открытием пенициллина появились первые сообщения о выделении штаммов микроорганизмов, обладающих природной резистентностью к этому антибиотику. Это явление представляет собой защитный механизм бактерий, созданный в процессе их эволюционного развития и конкурентной борьбы с другими микроорганизмами. Се-

лективное давление антибиотиков на микроорганизмы в результате интенсивного использования в клинической медицине, и особенно в ветеринарии и сельском хозяйстве, часто неконтролируемое, привело к развитию различных механизмов устойчивости, к которым относятся эффлюкс (вывод антибиотика из клетки), модификация поринов – мембранных транспортных белков, модификация структуры антибиотика или мишени его действия [6].

Бактериальные ферменты участвуют в реализации всех механизмов резистентности микроорганизмов к антибиотикам [7]. Наиболее распространенным механизмом устойчивости к β -лактамам является экспрессия специфических гидролаз – β -лактамаз (БЛ, ЕС 3.5.2.6), которые катализируют гидролиз β -лактамного кольца антибиотика. Одним из первых был описан гидролиз пенициллинов у грамположительных бактерий. Позднее у этих бактерий основным стал механизм устойчивости, обусловленный приобретением новых генов, например *tesA* у метициллин-резистентного стафилококка (MRSA), которые кодируют дополнительные ПСБ с пониженным сродством к β -лактамам [8]. У грамотрицательных бактерий наиболее распространенным механизмом устойчивости остается синтез БЛ, они образуют суперсемейство ферментов из ~2800 представителей [9]. Постоянно обновляемая информация о БЛ размещается на сайте National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources>).

Общим свойством этих ферментов является катализ гидролиза амидной связи β -лактамного кольца – главного структурного элемента, обеспечивающего антибактериальную активность. Особенностью БЛ является высокая скорость мутирования. Кодированные БЛ гены, как правило, локализованы на мобильных генетических элементах (плазмидах, транспозонах и интегронах), что способствует их быстрому распространению среди бактерий, вызывающих инфекци-

онные заболевания, а также находящихся в окружающей среде (воде, почве) [10]. Сочетание в бактериальных клетках генов различных БЛ вместе с другими генами устойчивости приводит к появлению «множественной лекарственной резистентности» (MDR), «экстремальной лекарственной резистентности» (XDR) и «панрезистентности» (PDR) [11]. В результате многие возбудители инфекций становятся смертельно опасными и представляют глобальную угрозу.

БЛ имеют общий с ПСБ белок-предшественник, поэтому оба семейства характеризуются общими структурными элементами. ПСБ и сериновые БЛ образуют ковалентный комплекс серина активного центра с молекулой антибиотика (ацил-фермент), при этом происходит разрыв амидной связи в β -лактамом кольце. Образование комплекса антибиотика с ПСБ является необратимым, что приводит к его ингибированию.

На основании гомологии первичных последовательностей выделяют четыре молекулярных класса БЛ: А, В, С и D. Ферменты классов А, С и D являются сериновыми гидролазами, представители класса В являются металло-ферментами и содержат в активном центре один или два иона Zn^{2+} в качестве кофактора. БЛ каждого класса делятся на типы ферментов, различающихся по субстратной специфичности и чувствительности к действию различных ингибиторов. У устойчивых к β -лактамам бактерий – возбудителей инфекционных заболеваний чело-

века – наиболее распространенными являются БЛ класса А, относящиеся в первую очередь к типам TEM, CTX-M и SHV; в последние годы отмечается экспоненциальный рост карбапенемаз классов В, D и А [9].

Все сериновые БЛ имеют компактную белковую глобулу, образованную одной полипептидной цепью, вторичная структура которой включает 11 α -спиралей, 5 β -листов и петли нерегулярной структуры (рис. 2, а). Структура сериновых БЛ относится к типу сэндвич и состоит из трех $\alpha/\beta/\alpha$ доменов, соединенных сетью ионных и водородных связей [12]. Сериновые БЛ имеют компактное ядро-скэффолд, состоящее из сближенных в пространстве α -спирали и β -листа, включающих консервативные участки из 3–4 аминокислот, в том числе каталитический серин. Хотя в целом структура белковой глобулы является достаточно жесткой, ее гибкость обусловлена движением петель, в которых чаще всего происходят мутации [13, 14]. Важным консервативным структурным элементом является Ω -петля, расположенная в нижней части входа в карман активного центра и содержащая каталитически важный консервативный остаток Glu (рис. 2, б). Данный остаток играет ключевую роль в процессе деацилирования ацил-ферментного комплекса, в результате чего разрушенная молекула антибиотика выводится из активного центра БЛ [15].

Механизм гидролиза β -лактамов сериновыми БЛ разных классов достаточно общий и

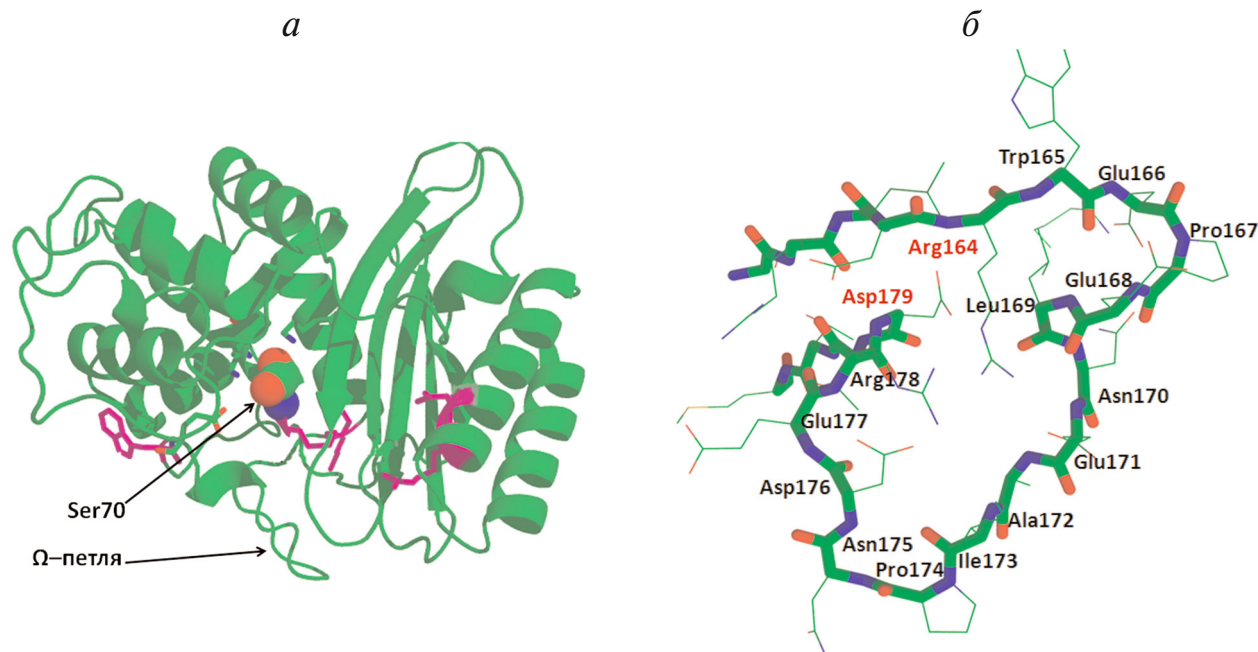


Рис. 2. а – Структура β -лактамазы TEM-1 класса А, каталитический Ser70 представлен в виде шара, б – структура Ω -петли β -лактамаз TEM-типа

включает три основные стадии (рис. 3, *a*). Общим для всех ферментов является образование ковалентного ацил-ферментного комплекса с остатком серина, в стабилизации которого принимают участие различные а.о. в зависимости от структуры активного центра. На первом этапе происходит ориентация и связывание молекулы антибиотика в активном центре фермента и активация гидроксильной группы каталитического серина. Для БЛ TEM-типа класса А установлено, что для активации серина необходимо депротонирование остатка Lys73. Этот путь депротонирования включает образование цепочки водородных связей с участием остатков Glu166 и Asn170 Ω -петли и молекулы воды (рис. 3, *б*) [16]. Альтернативный путь депротонирования остатка Lys73 происходит с участием Ser130, расположенного на SDN-петле (остатки Ser130-Asn132). Далее гидроксильная группа серина действует как нуклеофил и атакует карбонильную группу β -лактамного кольца антибиотика с образованием высокорекреакционного тетраэдрического ацилированного интермедиата, превращающегося в низкоэнергетический ацил-ферментный комплекс, в котором серин активного центра ковалентно связан с молекулой антибиотика. На третьей стадии молекула воды, координированная в активном центре фермента с участием остатка Glu166 и других заряженных остатков Ω -петли, атакует ковалентный ацил-ферментный комплекс. В результате деацилирования амидной связи β -лактамное кольцо молекулы антибиотика разрушается, он выходит из активного центра, и молекула фермента высвобождается для следующего каталитического акта [17].

Причиной модификации структуры β -лактамаз являются мутации в кодирующих генах, которые затрагивают как аминокислоты активного центра БЛ, так и периферийные области белковой глобулы. Некоторые мутации, называемые ключевыми, приводят к изменениям структурных элементов, образующих активный центр. В результате у мутантных ферментов изменяются каталитическая активность и субстратная специфичность. Например, мутации остатков Ω -петли (Arg164, расположенного на *N*-конце петли у БЛ TEM-типа, и Asp179, расположенного на *C*-конце петли у БЛ SHV-типа) приводят к изменению конформации петли и увеличению объема активного центра, в результате образуются стабильные комплексы фермента с оксимино-цефалоспоринами, имеющими объемные боковые группы [18]. Таким образом появились БЛ расширенного спектра (БЛРС), которые эффективно гидролизуют цефалоспорины II–IV поколений [9]. Другим направлением эволюции БЛ является появление новых типов фер-

ментов с расширенной субстратной специфичностью, например карбапенемаз КРС-типа класса А и ОХА-типа класса D.

Наиболее распространенными в настоящее время являются сериновые БЛ класса А, относящиеся к типам TEM, SHV, CTX-M и KPC. Каждый тип представляет собой большое семейство от нескольких десятков до нескольких сотен ферментов, имеющих родоначальника, например TEM-1 или SHV-1. Остальные ферменты каждого типа представляют собой мутантные формы, содержащие от одной до нескольких аминокислотных замен. Ферменты типов TEM и SHV разделяются на БЛ широкого спектра, гидролизующие только пенициллины и цефалоспорины I поколения, и БЛРС с мутациями ключевых остатков, гидролизующие пенициллины и цефалоспорины I–IV поколений. Особенностью БЛ SHV-типа является наличие вставок в аминокислотную последовательность, в частности у БЛ SHV-16 имеется повтор участка Ω -петли от остатка Asp163 до остатка Thr168, включающего каталитически важный остаток Glu166 [19]. Этот фермент характеризуется увеличенной конформационной подвижностью каталитических участков, что улучшает доступ в активный центр цефалоспоринов III поколения, но при этом термостабильность фермента понижается. По-видимому, это связано с перераспределением внутренних контактов между а.о. петли и их контактов с другими а.о. белковой глобулы, которые изменяют стабильность белковой глобулы [20].

Субстратами БЛ типа CTX-M являются цефалоспорины III–IV поколений. Все ферменты этого типа являются БЛРС, и их распространение среди клинических возбудителей приняло глобальный характер [21]. На основании гомологии первичных последовательностей БЛ этого типа разделяются на пять субкластеров, они характеризуются более низкой гомологией по сравнению с ферментами типов TEM и SHV [22]. Различия в субстратной специфичности ферментов типа CTX-M состоят в изменениях каталитической активности в отношении различных цефалоспоринов III поколения (цефотаксима, цефтазидима и цефепима). Особенностью данных ферментов является появление гибридных ферментов, имеющих фрагменты структуры БЛ из разных субкластеров, например БЛ CTX-M-116, -123 и -132 являются гибридами БЛ CTX-M-15 и CTX-M-14 [23–25]. Ключевые замены у этих ферментов способствуют улучшению эффективности гидролиза цефтазидима, наиболее распространенными из них являются Asp240Gly и замена в Ω -петле Pro167Ser/Thr.

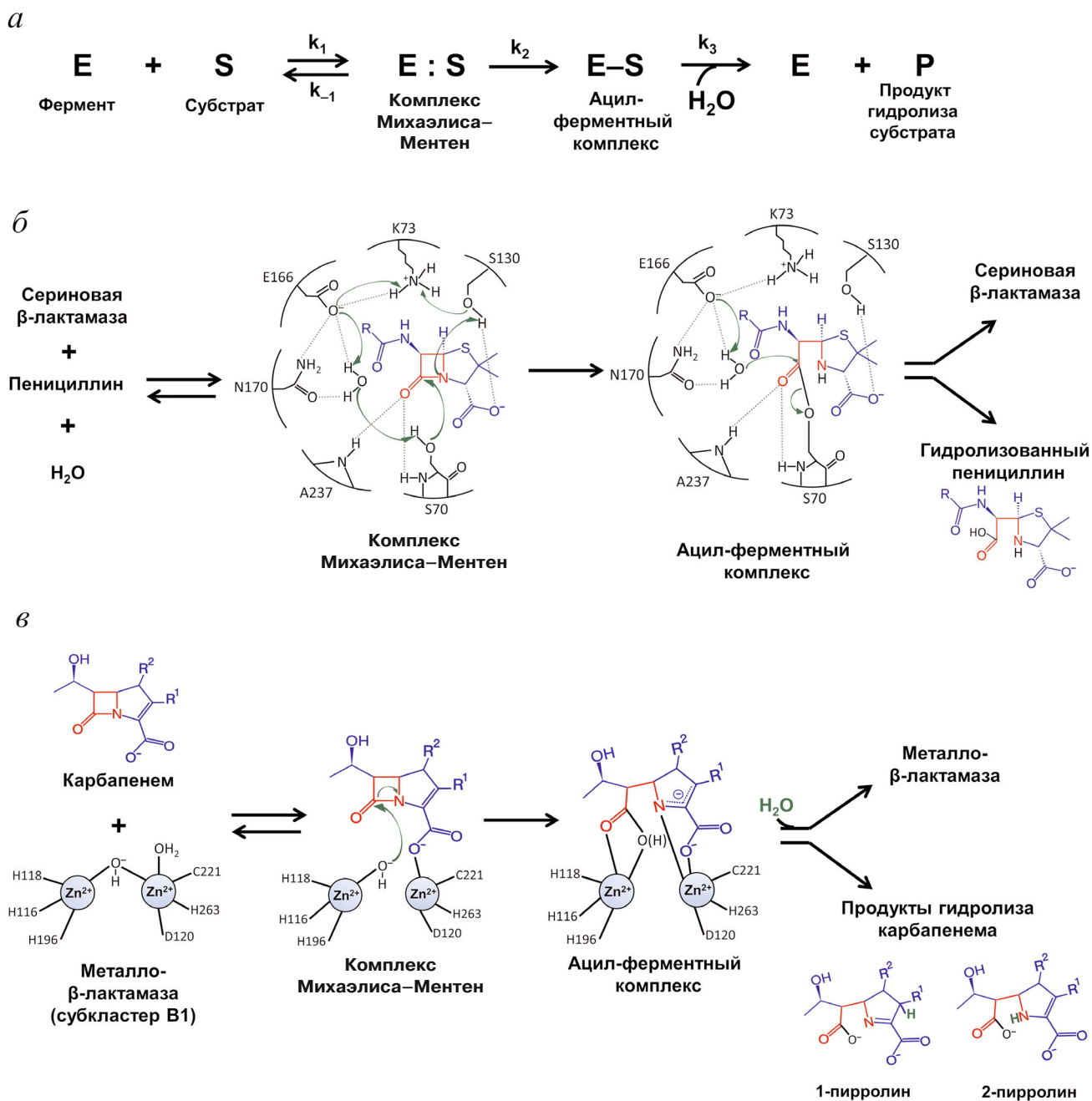


Рис. 3. а – Общая схема гидролиза β -лактамных антибиотиков β -лактамазами, б – механизм гидролиза пенициллина β -лактамазами класса А, в – механизм гидролиза карбапенемов металло- β -лактамазами

У БЛ класса С каталитическим является Ser64, в роли общего основания выступает Tyr150, важную роль в правильной фиксации молекулы субстрата играет остаток Asn152 (аналог Asn132 у БЛ класса А). У БЛ класса D каталитическим является Ser67, однако механизм его активации для последующей нуклеофильной атаки β -лактамного кольца остаётся неясным. По-видимому, роль общего основания у этих ферментов выполняет остаток Lys70, кото-

рый занимает оптимальное положение в структуре фермента для активации молекулы воды, аналогичное Lys73 у ферментов класса А.

Молекулярный класс В объединяет большое семейство металло-БЛ (МБЛ), содержащих в качестве кофактора один или два иона Zn^{2+} и гидролизующих три группы β -лактамов (пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы) (рис. 3, в) [16, 17]. Эволюционно они отделились от предшественников ПСБ раньше других БЛ и яв-

ляются членами огромного суперсемейства металло-гидролаз. На основании гомологии первичной структуры, субстратного профиля и количества ионов Zn^{2+} МБЛ делятся на три субкластера: В1, В2 и В3. Ферменты субкластеров В1 и В3 являются бицинковыми, субкластера В2 — моноцинковыми. Особенностью МБЛ является низкая степень гомологии (не более 20% внутри субкластеров), даже остатки, участвующие в координации ионов металла, не являются консервативными у ферментов разных субкластеров. К наиболее клинически значимым типам МБЛ относятся ферменты субкластера В1: VIM, IMP, и NDM.

Активный центр МБЛ располагается на дне широкой неглубокой впадины между двумя β -листами. У ферментов субкластера В1 ион Zn^{2+} в первом Zn -связывающем центре имеет тетраэдрическое окружение с участием остатков His116, His118, His196, во втором — является пента-координированным с участием остатков His263, Cys221 и Asp120 (рис. 3, в) [16, 26]. В координации ионов Zn^{2+} принимают участие две молекулы воды, одна из которых (соединительная) соединяет два иона металла, другая (апикальная) связана со вторым ионом Zn^{2+} . Ионы металла субкластера В3 сохраняют координацию с теми же остатками в первом центре связывания, во втором — цистеин заменен на гистидин. Отличительной особенностью МБЛ субкластеров В1 и В3 является подвижная L3-петля, расположенная у входа в активный центр между $\alpha 3$ -спиралью и $\beta 7$ -листом. Конформация петли изменяется при связывании субстрата, что приводит к изменениям эффективных значений диэлектрической проницаемости и стабилизирует промежуточные формы фермент-субстратных комплексов [26, 27].

При связывании антибиотика бицинковыми МБЛ происходит координация второго иона Zn^{2+} с карбоксильной группой субстрата, высвобождая гидроксид-ион (рис. 3, в) [16]. Ион металла оттягивает электронную плотность с карбонильного атома кислорода, повышая и стабилизируя положительный заряд на нем. Координированный с ионом Zn^{2+} гидроксид-ион является лучшим нуклеофилом, чем молекула воды, он атакует карбонильный атом углерода молекулы антибиотика. Образуется промежуточный продукт с отрицательным зарядом, локализованным в пирролидиновом кольце. Далее происходит протонирование с участием молекулы воды, либо атома С2 с образованием 1-пирролина, либо атома N4 с образованием 2-пирролина.

Моноцинковые МБЛ субкластера В2 являются исключительно карбапенемазами: они эффек-

тивно гидролизуют только карбапенемы и проявляют низкую активность в отношении пенициллинов и цефаллоспоринов. Это может быть связано с тем, что у данных ферментов остаток His116, консервативный у МБЛ субкластеров В1 и В3, заменен на аспарагин.

Процесс эволюции БЛ способствовал развитию защитных механизмов бактерий и потере эффективности β -лактамов антибиотиков. Согласно прогнозам ВОЗ, смертность от инфекций, вызванных резистентными к антимикробным препаратам микроорганизмами, к середине XXI века может превысить смертность от рака, и человечество может вернуться в доантибиотическую эру [28]. Учитывая тот факт, что последний новый класс антибактериальных препаратов был открыт более 30 лет назад, разработка подходов возвращения активности β -лактамов антибиотиков является первоочередной задачей для практического здравоохранения всего мира.

Далее будут рассмотрены подходы к преодолению резистентности к β -лактамам антибиотикам на основе ингибирования действия БЛ.

ИНГИБИТОРЫ β -ЛАКТАМАЗ

Несмотря на различия в первичной структуре сериновых БЛ, механизм их действия консервативен, поэтому первоначально для поиска ингибиторов был использован принцип конкурентного ингибирования с использованием низкомолекулярных соединений, имеющих в структуре β -лактамное кольцо. Выбор ингибиторов состоял в поиске соединений, образующих более стабильный ацил-ферментный комплекс, не подверженный деацилированию.

Ингибиторы сериновых β -лактамаз I поколения. К ингибиторам БЛ I поколения относятся соединения на основе сульфонов и оксапенемов, имеющих в своей структуре β -лактамное кольцо (рис. 4, а). Основными представителями этой группы ингибиторов являются клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам.

Первым ингибитором сериновых БЛ является клавулановая кислота, обнаруженная в 1980-х гг. при скрининге природных соединений, выделенных из *Streptomyces clavuligerus* [29]. В своей структуре она имеет β -лактамное кольцо, конденсированное с 5-членным кольцом, содержащим атом кислорода и имеющим карбоксильную группу в качестве заместителя (рис. 4, а). Клавулановая кислота проявляет небольшую собственную антимикробную активность, однако при использовании ее в комбинации с амоксициллином минимальная подавляющая кон-

центрация (МПК) антибиотика уменьшается в отношении различных грамотрицательных бактерий, продуцирующих БЛ класса А [30]. Позже были синтезированы другие соединения этой группы – сульбактам и тазобактам [31, 32]. Эти два ингибитора являются сульфонами пенициллановой кислоты и имеют β -лактамное кольцо, конденсированное с 5-членным кольцом, содержащим карбоксильную группу (рис. 4, а). Они отличаются по заместителю в положении С2, который у сульбактама представляет собой метильную группу, а у тазобактама – триазолил-содержащий фрагмент.

Все три соединения являются ингибиторами сериновых БЛ класса А и обладают различной ингибирующей способностью: клавулановая кислота и тазобактам обладают сравнимой ингибирующей активностью в отношении ферментов типов TEM, SHV и CTX-M и более эффективны, чем сульбактам [33]. Однако сульбактам имеет более высокую собственную антибактериальную активность, т.е. взаимодействует с ПСБ. Сульбактам и клавулановая кислота обладают низкой ингибирующей активностью в отношении КРС и других сериновых карбапенемаз класса А.

Новым представителем класса β -лактамных ингибиторов является производное тазобактама – энметазобактам, представляющий собой метилированный сульфен пенициллановой кислоты (рис. 4, а). Он характеризуется улучшенными свойствами проникновения в бактериальную клетку и обладает активностью против многих сериновых БЛ класса А, особенно БЛРС [34].

Все представители ингибиторов I поколения имеют общий механизм ингибирования сериновых БЛ класса А (рис. 4, б) [17]. Связывание молекул β -лактамных ингибиторов в активном центре фермента происходит аналогично β -лактамным антибиотикам. На начальном этапе образуется нековалентный комплекс (E : I), карбоксильный фрагмент молекулы ингибитора располагается в консервативной области активного центра, он связывается водородными связями с остатками Thr235 и Ser130 и находится в пределах расстояний электростатического взаимодействия от остатков Arg244 и Lys234 [35]. Карбонильный кислород располагается в оксианионном кармане, образованном атомами азота пептидного остова остатков Ser70 и Ala237, тем самым ориентируя карбонильный углерод для нуклеофильной атаки каталитическим Ser70 и образования ацил-фермента E-I [36]. Существует три возможных пути дальнейших превращений ацил-ферментного комплекса: необратимая инактивация (E-I*), обратимая инактивация с образованием таутомера E-T и медленное деацилирование с регенерацией активного фермента E. Идеальным является ингибитор, у которого преимущественной является необратимая инактивация.

В качестве примера (рис. 4, в) представлен механизм ингибирования сериновых БЛ класса А клавулановой кислотой. Образование ацил-ферментного комплекса происходит аналогично взаимодействию β -лактамных антибиотиков: активация гидроксильной группы серина протекает с участием остатков Lys73, Ser130 и Glu166 [22]. После ацилирования молекула ингибитора подвергается β -элиминации, что приводит к раскрытию 5-членного оксазольного кольца с образованием переходного промежуточного имин-ацил-фермента. Этот комплекс может подвергаться таутомеризации с образованием промежуточных енаминов в *транс*- или *цис*-конформации. *Транс*- и *цис*-енамины имеют сопряженную систему двойных связей с карбонильной связью, что затрудняет нуклеофильную атаку молекулой воды карбонильного углерода и препятствует быстрому деацилированию [37].

В зависимости от строения активного центра БЛ и свойств ингибитора промежуточный имин/енаминовый комплекс может претерпевать ряд перегруппировок с образованием в результате неактивных форм фермента или подвергаться медленному деацилированию с регенерацией активной БЛ. Существует несколько возможностей необратимой инактивации: образование комплексов фермента с фрагментами ингибитора с молекулярной массой 70 или 88 Да, присоединенными к Ser70; декарбоксилирование енаминной формы и последующий медленный гидролиз образовавшихся сложных эфиров; нуклеофильная атака Ser130 линейного имин-ацильного комплекса фермента, в результате чего происходит фрагментация ингибитора и образуется комплекс фермента с фрагментом ингибитора с молекулярной массой 52 Да. Этот комплекс подвергается дальнейшей деградации, что приводит к нескольким формам инактивированного фермента.

Ингибиторы I поколения эффективны в отношении сериновых БЛ класса А, но мало эффективны в отношении сериновых БЛ классов С и D. Только тазобактам обладает невысокой активностью в отношении БЛ класса С [38], а его производное – энметазобактам – может ингибировать некоторые БЛ ОХА-типа [34]. Поскольку строение активного центра МБЛ кардинально отличается от сериновых БЛ, ингибиторы этой группы неактивны в отношении этих ферментов и, более того, являются субстратами для МБЛ, т.е. гидролизуются ими [39].

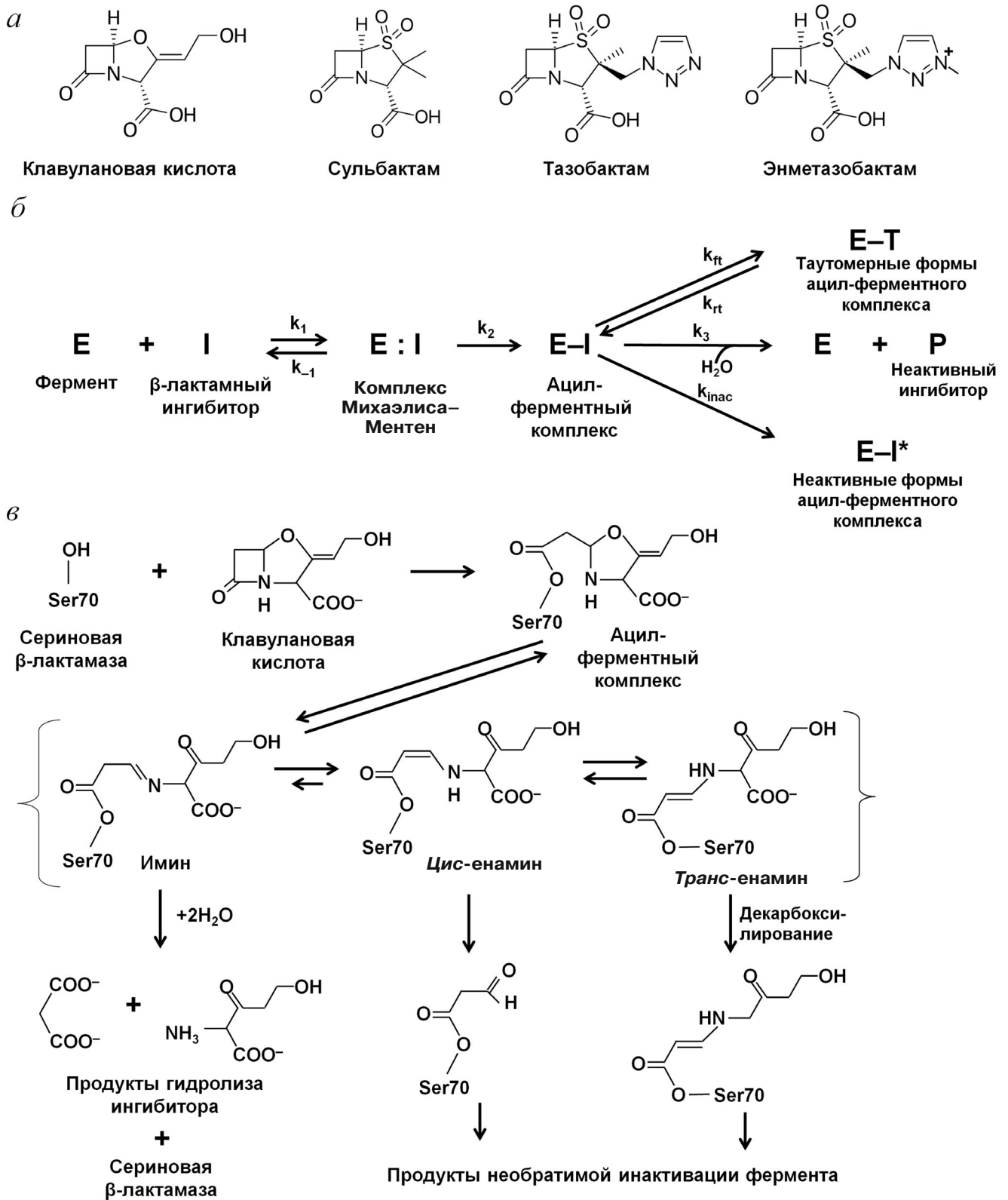


Рис. 4. *a* – Структурные формулы β-лактамных ингибиторов I поколения, *б* – схема ингибирования сериновых β-лактамаз класса A β-лактамными ингибиторами, *в* – механизм ингибирования β-лактамаз класса A клавулановой кислотой и пути превращений ацил-ферментного комплекса

Ингибирующее действие фармацевтических комбинаций ингибиторов I поколения с β -лактамами. Все описанные выше β -лактамы ингибиторы применяются в клинической практике в фармацевтических комбинациях с антибиотиками. Принцип выбора сочетаний антибиотик/ингибитор основан на подборе соединений, обладающих сходными фармакокинетическими свойствами, т.е. они действуют либо одновременно, либо ингибитор связывается с ферментом раньше субстрата. В настоящее время широко используются следующие фармацевтические комбинации: амоксициллин/клавулановая кислота, тикарциллин/клавулановая кислота, ампициллин/сульбактам и пиперациллин/тазобактам [40, 41]. Недавно была одобрена новая комбинация с новым антибиотиком группы цефалоспоринов (цефтолозан/тазобактам), показавшая свою эффективность для лечения осложненных инфекций [42]. Ее преимуществами являются высокая активность против БЛРС-продуцирующих бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonas aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью [43, 44]. На третьей фазе клинических исследований находится комбинация с новым β -лактамым ингибитором (цефепим/энметазобактам), показавшая активность *in vitro* при подавлении устойчивости штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, продуцирующих карбапенемазы КРС-типа [45].

Несмотря на положительный опыт использования в клинической практике комбинаций пенициллинов и цефалоспоринов с β -лактамами ингибиторами I поколения против сериновых БЛ класса А, которые остаются самыми распространенными, в последние годы стало очевидно, что данный подход имеет серьезные ограничения. Для всех ингибиторов β -лактамы природы были обнаружены медленные стадии деацилирования ацил-ферментных комплексов, т.е. ни один из них не является необратимым. Эволюция механизмов резистентности у сериновых БЛ привела к появлению мутаций некоторых периферийных остатков (например, остатков 69, 130, 244, 275 и 276 у БЛ ТЕМ-типа), которые приводят к устойчивости к ингибиторам β -лактамы природы [13]. Мутации некоторых остатков БЛ разрушают сеть водородных связей, участвующих в депротонировании Ser70 и таким образом затрудняют образование ацил-ферментного комплекса. Другие мутации БЛ изменяют распределение заряженных групп, что приводит к смещениям положения молекулы воды и снижению сродства к ингибиторам.

Подход к поиску конкурентных ингибиторов на основе аналогов субстратов, действующих

по такому же механизму, оказался принципиально ограниченным: ацил-ферментные комплексы с данными ингибиторами могут разрушаться по другим механизмам, и широкое использование ингибиторов в составе фармацевтических комбинаций стимулировало развитие резистентности к ним. Кроме этого, существуют трудности поиска подходящих комбинаций антибиотик/ингибитор, выбор пар является ограниченным из-за различий в фармакокинетических свойствах.

Огромным вызовом для клинической медицины явилось появление мультирезистентных возбудителей инфекционных заболеваний, устойчивых одновременно к разным классам антибиотиков. Как правило, эти бактерии являются продуцентами нескольких БЛ, относящихся к разным классам, и поэтому использование для их подавления ингибиторов β -лактамы природы ограничено из-за узкой специфичности, отсутствия активности в отношении БЛ классов В, С и D, а также способности МБЛ разрушать данные ингибиторы. Для подавления мультирезистентных патогенов была разработана новая группа β -лактамы препаратов – карбапенемы (рис. 1), и для лечения тяжелых инфекций было предложено использовать их комбинации. Первой была комбинация эртапенема и высоких концентраций дорипенема или меропенема, использованная для подавления мультирезистентных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [46]. Предполагаемый механизм действия данного сочетания препаратов заключается в том, что эртапенем, характеризующийся высоким сродством к карбапенемазам КРС-типа, образует с ними стабильный комплекс и ингибирует их, в то время как меропенем или дорипенем действуют как антибактериальные препараты на ПСБ и подавляют рост бактерий. На модельных клетках *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано, что данные двойные комбинации снижают бактериальный рост клеток на три и один порядок величины соответственно. Клинические исследования подтвердили эффективность данной комбинированной терапии в сравнении с другими антибактериальными препаратами, однако только в отношении патогенов, продуцирующих БЛ КРС-типа [47].

Новое поколение ингибиторов. Появление новой группы β -лактамы антибиотиков – карбапенемов для лечения тяжелых внутрибольничных инфекций привело к появлению новых БЛ – карбапенемаз, способных их гидролизовать. По своему строению данные ферменты очень разнообразны и относятся к разным молекулярным классам. В связи с ростом продуцирующих карбапенемазы бактерий-возбудителей

инфекционных заболеваний требовалось создание новых ингибиторов с более широкой ингибирующей специфичностью по сравнению с β -лактамами ингибиторами I поколения.

Ингибиторы группы диазобициклооктанов.

Первые не β -лактамы ингибиторы сериновых БЛ, относящиеся к классу мостиковых диазобициклооктанов (ДБО), были предложены в середине 1990-х гг. [48]. К настоящему времени эта группа включает авибактам, релебактам, накубактам, зидебактам и дурлобактам (рис. 5, а), их общим структурным элементом является 5-членное бициклическое ядро ДБО. Различия между ингибиторами определяются типом заместителей у атома С2, у дурлобактама в ядре ДБО имеется двойная связь. В отличие от карбоксильной группы в β -лактамах ингибиторах, у данных ингибиторов имеется отрицательно заряженная сульфатная группа.

Механизм ингибирования БЛ обусловлен взаимодействием серина активного центра с амидной группой кольца ДБО (рис. 5, б). Правильная ориентация молекулы ингибитора в активном центре фермента обеспечивается сохранением расстояния между карбонильным кислородом и отрицательно заряженным атомом кислорода сульфатной группы, которое аналогично расстоянию между эквивалентными атомами (карбонильным кислородом и кислородом карбоксильной группы) в ингибиторах β -лактамы природы. Карбоксамидная боковая цепь взаимодействует с заряженными остатками Asn/Gln, входящими в состав триады консервативных остатков с участием каталитического серина (Ser-X-Asn) и Ω -петли. В результате образования ацил-ферментного комплекса с каталитическим серином происходит разрыв связи С7-N6 и раскрытие 5-ти членного кольца ДБО [49].

Существует несколько отличий в строении ацил-ферментных комплексов БЛ с ингибиторами ДБО по сравнению с комплексами с β -лактамами ингибиторами: сульфатная группа взаимодействует с консервативной триадой остатков Lys-Thr-Gly, атом N6 взаимодействует с консервативными остатками Ser130 сериновых БЛ класса А или Tyr150 сериновых БЛ класса С. Образование дополнительных связей молекулы ингибитора в активном центре фермента обуславливает их более широкую специфичность в отношении БЛ разных классов.

У ингибиторов данного типа наблюдается изменение механизмов модификации ацил-ферментного комплекса: в БЛ класса А атом азота молекулы ингибитора образует водородную связь с молекулой воды, в результате чего остаток Glu166 Ω -петли находится в протониро-

ванном состоянии, что делает невозможным дальнейшее деацилирование с участием остатков петли [50]. Гидролиз молекулы ингибитора также затруднен вследствие наличия в ароматической системе атома азота, связанного с атомом углерода карбонильной группы. Для этих ингибиторов возможны два других пути разрушения ацил-ферментного комплекса (рис. 5, в): рециклизация кольца ДБО с высвобождением нативной молекулы ингибитора, которая дальше может опять взаимодействовать с ферментом; и медленное десульфатирование, в результате которого молекула ингибитора гидролизуется и не может больше участвовать в подавлении активности БЛ. Рециклизация наблюдается у БЛ классов С и А, за исключением ферментов КРС-типа, у ферментов класса D этот процесс протекает существенно медленнее [50]. У ферментов КРС-типа преимущественно происходит десульфатирование.

Авибактам. Преимуществами авибактама перед β -лактамами ингибиторами I поколения являются высокая активность против клинически значимых БЛ СТХ-М-15 класса А и БЛ AmpC класса С, а также длительный период полувыведения [51]. Использование авибактама в комбинации с цефтазидимом было эффективно против мультирезистентных бактерий семейства Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa* [52]. В то же время авибактам не способен инактивировать МБЛ и большинство ферментов класса D (кроме OXA-48), поэтому данная комбинация не может быть использована против карбапенем-резистентных штаммов *Acinetobacter* spp. и *P. aeruginosa*, а также против МБЛ-продуцирующих штаммов Enterobacteriaceae [53].

В настоящее время проводятся испытания фармацевтической комбинации азтреонам/авибактам в отношении мультирезистентных штаммов Enterobacteriaceae, продуцирующих сериновые БЛ совместно с МБЛ [54]. Этот выбор обусловлен тем, что МБЛ не гидролизуют монобактамы, а авибактам добавляется для ингибирования БЛРС и сериновых карбапенемаз.

Релебактам. Релебактам отличается от авибактама наличием пиперидинового кольца. Он используется в комбинации с имипенемом для лечения осложненных инфекций мочевыводящих путей и интраабдоминальных инфекций, вызванных устойчивыми к карбапенемам штаммами Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa*, продуцирующими БЛ КРС-типа класса А и БЛ класса С [55]. Комбинация имипенем/релебактам показала хорошую активность в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter* spp., устойчивых к имипенему вследствие экспрессии БЛРС или БЛ AmpC класса С и нарушения про-

бактериальную активность и связывается с некоторыми ПСБ у *Acinetobacter* spp., *Neisseria gonorrhoeae* и *Haemophilus influenza* [60]. Показано, что комбинация этих двух ингибиторов обеспечивает хорошую активность против множественной лекарственной устойчивости у *A. baumannii*.

Ингибиторы – производные бороновых кислот.

Новой группой ингибиторов БЛ являются соединения бороновых кислот, обладающие способностью ингибировать сериновые протеазы микроорганизмов [61], однако у первых ингибиторов этой группы наблюдались побочные эффекты, связанные с ингибированием сериновых протеаз млекопитающих. Для улучшения специфичности действия в отношении БЛ были изучены циклические боронаты (рис. 6, а). Первым соединением, показавшим активность против сериновых БЛ класса А (типов СТХ-М, SHV, TEM и КРС), БЛ класса С, но не ингибирующим сериновые протеазы млекопитающих, был ваборбактам [62].

При связывании ингибитора группы производных бороновых кислот в активном центре фермента его карбоксильный фрагмент располагается в карбоксил-связывающем кармане, атомы ароматической системы формируют гидрофобные контакты с боковыми группами остатков Trp/Trp, амидная группа взаимодействует с остатками Ser237, Asn132 и Asn102 аналогично амидной группе пенициллинов [61]. Известно, что борная кислота может образовывать ковалентные связи со спиртами, поэтому атом бора ингибитора имитирует карбонильный углерод в β -лактамах и является мишенью нуклеофильной атаки гидроксильной группы каталитического серина. В результате образуется тетраэдрический комплекс, в котором серин ковалентно связан с атомом бора – аналог переходного состояния ацил-ферментного комплекса БЛ с β -лактамами (рис. 6, б). По принципу действия данные соединения являются ингибиторами переходного состояния, поскольку их комплекс с ферментом имеет тетраэдрическую конформацию, имитирующую переходное состояние тетраэдрического оксианиона в реакциях ацилирования и деацилирования [63].

В результате скрининга циклических боронатов были выявлены ингибиторы всех четырех классов БЛ, включая МБЛ [64, 65]. К преимуществам этих ингибиторов относится также их способность ингибировать ПСБ5 [61]. Ингибитор таниборбактам (VNRX-5133) проявляет активность в отношении сериновых БЛ классов А и С, отдельных карбапенемаз класса D (ОХА-48) и МБЛ типов VIM и NDM, продуцируемых карбапенем-резистентными бактериями семейства

Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa* [66]. Этот ингибитор показал в 50–50 000 раз более высокую эффективность в отношении клинически значимых МБЛ по сравнению с ваборбактамом.

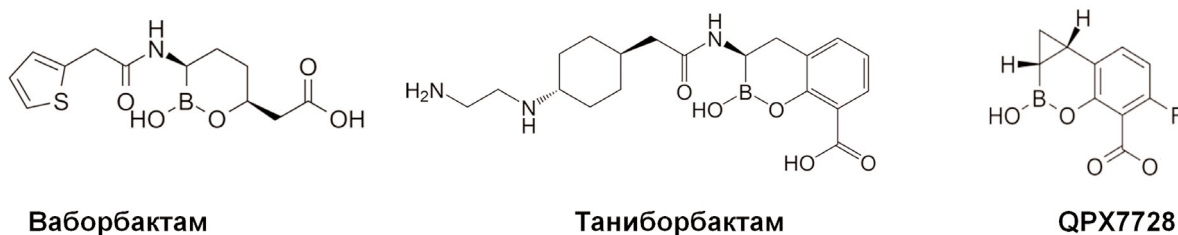
Рентгеноструктурный анализ комплексов двух клинически значимых БЛ (сериновой БЛ СТХ-М-15 и МБЛ VIM-2) с таниборбактамом показал, что при образовании тетраэдрических интермедиатов с участием атома бора и каталитического серина БЛ СТХ-М-15 или иона Zn^{2+} в МБЛ VIM-2 наблюдаются дополнительные стабилизирующие взаимодействия, например N-(2-аминоэтил)циклогексиламиновой части ингибитора с отрицательно заряженными а.о. (Glu149 в МБЛ VIM-2 и NDM-1) [67]. Комбинация цефепим/таниборбактам показала активность как *in vitro*, так и *in vivo* против БЛРС и карбапенемазо-продуцирующих штаммов Enterobacteriaceae и *P. aeruginosa* [66].

Новым ингибитором группы циклических боронатов является QPX7728, проявляющий широкую ингибирующую специфичность против БЛРС и карбапенемаз класса А и БЛ класса С с эффективностью сопоставимой или превышающей эффективность ингибиторов группы ДБО (авибактама, релебактама и ваборбактама) [68]. В отличие от других ингибиторов, QPX7728 также является эффективным ингибитором карбапенемаз класса D, в частности ОХА-48 бактерий семейства Enterobacteriaceae и ОХА-23/24/58 *A. baumannii*, а также МБЛ (NDM, VIM, IMP и других). Расширение спектра ингибирования QPX7728 может быть обусловлено его более компактной структурой и отсутствием объемных заместителей, что позволяет молекуле полностью входить в активный центр фермента.

Обобщающая информация о специфичности действия ингибиторов сериновых БЛ приведена в таблице. Ингибиторы I поколения активны в основном против БЛ класса А, за исключением карбапенемаз. Новый ингибитор этой группы – энметазабактам – активен в отношении карбапенемаз класса А КРС-типа и некоторых БЛ класса D ОХА-типа. Отличием ингибиторов нового поколения групп ДБО и производных бороновых кислот является более широкая специфичность: они активны против сериновых БЛ и карбапенемаз класса А, БЛ класса С, ряда БЛ и карбапенемаз класса D, а также МБЛ.

Ингибиторы металло- β -лактамаз. Особенностью последних десятилетий является растущее распространение мульти- и пан-резистентных грамотрицательных патогенных бактерий, которые синтезируют несколько БЛ. Среди них особую роль играют высокоактивные МБЛ с широкой субстратной специфичностью в отношении практически всех групп β -лактамов. Ин-

а



б

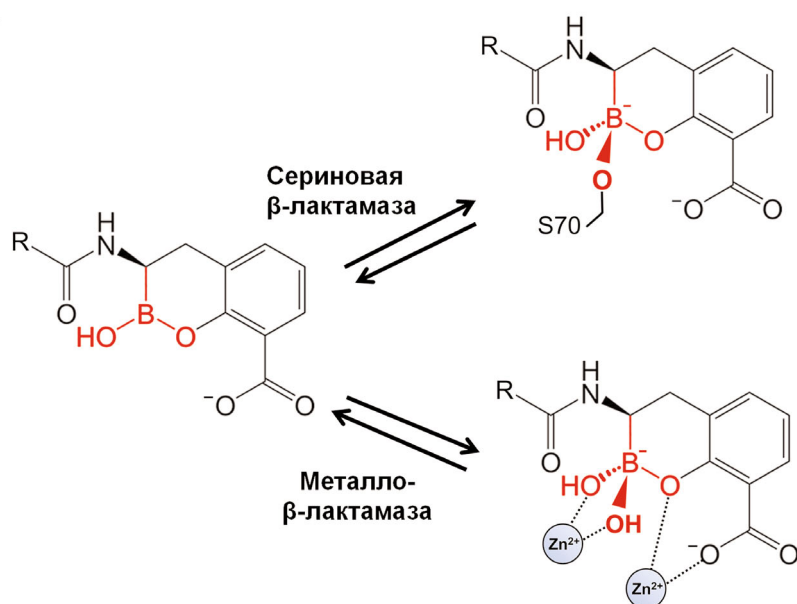


Рис. 6. а – Структуры циклических производных борновых кислот – ингибиторов β -лактамаз. б – Образование тетраэдрического ацил-ферментного комплекса атома бора производных борновых кислот с серином активного центра β -лактамазы и ионом Zn^{2+} металло- β -лактамазы

гибиторы сериновых БЛ I поколения практически неактивны в отношении МБЛ класса В, в связи с чем особо актуальным является поиск ингибиторов данных ферментов [69, 70]. К настоящему времени описаны уже несколько сотен химических соединений – ингибиторов МБЛ, однако ни одно из них не зарегистрировано для клинического применения [16]. Сложность разработки связана со структурным разнообразием ферментов и различиями в механизмах гидролиза. Существуют две основные стратегии поиска потенциальных ингибиторов МБЛ: связывание с ионами Zn^{2+} и Zn^{2+} -независимое связывание с белком, каждая имеет свои ограничения. Zn -зависимые ингибиторы чаще проявляют неспецифические эффекты, поскольку металло-зависимые ферменты очень распространены в биохимических процессах человека. Поиск Zn -независимых ингибиторов с широкой специфичностью затруднен в связи с ограниченным количеством консервативных аминокислот у МБЛ разных типов и формой активного центра в виде

широкого кармана. Кроме того, двухвалентные катионы (Ca^{2+} , Mg^{2+}), циркулирующие в высоких концентрациях (порядка мМ) в плазме крови и тканях, могут конкурировать за связывание с Zn -зависимыми ингибиторами.

Zn-зависимые ингибиторы. Zn -зависимые ингибиторы МБЛ разделяются на группы по механизму действия на фермент: 1) хелатирующие агенты, экстрагирующие ионы металлов из активного центра, 2) ингибиторы, конкурирующие с антибиотиками за связывание с ионами металла и а.о. активного центра.

Хелатирующие агенты. Распространенным способом ингибирования МБЛ является удаление ионов Zn^{2+} из активного центра хелатирующими агентами. Наиболее известный хелат – ЭДТА – из-за высокой токсичности непригоден для терапевтического применения и используется только для идентификации МБЛ при диагностике резистентных бактерий [71]. Другим примером подобных ингибиторов являются цинк-селективные аналоги спиродингидроиндо-

Активность ингибиторов сериновых β -лактамаз и МБЛ					
Ингибитор	β -Лактамазы, классы/типы				
	Сериновые БЛ				МБЛ
	А		С	D	
	БЛРС	КРС	AmpC	ОХА	В
<i>Сульфон-замещенные β-лактамы</i>					
Клавулановая кислота	+	-	-	-	-
Сулбактам	+	-	-	-	-
Тазобактам	+	-	-	-	-
Энмезобактам	+	+	-	+/-	-
<i>Ингибиторы группы diazобциклооктанов</i>					
Авибактам	+	+	-	+/- ¹	-
	+	+	-	+/- ¹	-
Релебактам	+	+	-	-	-
Накубактам	+	+	+	+/- ¹	+
Зидебактам	+	+	-	+/- ¹	-
Дурлобактам	+	+	-	+	-
<i>Производные бороновых кислот</i>					
Ваборбактам	+	+	-	-	-
Таниборбактам	+	+	+	+/- ¹	+
QPX7728	+	+	+	+	+

¹ БЛ ОХА-48 (БЛ ОХА-23, ОХА-24/40 и ОХА-58 не ингибируются)

ла-тиадиазола, эффективность которых показана на мышинных моделях [72].

Одним из многообещающих хелатирующих агентов является природное соединение аспергилломазармин А (АМА), которое может эффективно ингибировать МБЛ типов NDM, VIM и IMP [73, 74]. Действие АМА состоит в экстракции Zn^{2+} из активного центра ферментов, при этом 2 эквивалента АМА могут эффективно удалять 1 эквивалент Zn^{2+} (рис. 7, а).

Известны другие хелатирующие агенты, такие как 1,4,7,10-тетрааза-циклододекан-1,4,7,10-тетрауксусная кислота (ДОТА) и 1,4,7-триаза-циклононан-1,4,7-триуксусная кислота (НОТА) [75] и их производные [76], которые в комбинации с меропенемом проявляют активность в отношении различных патогенных бактерий, продуцирующих МБЛ. Все эти соединения характе-

ризуются низкой токсичностью в отношении клеток млекопитающих.

Zn-связывающие соединения. Наиболее перспективными ингибиторами МБЛ являются подробно описанные в предыдущем разделе производные циклических бороновых кислот, ингибирующие как сериновые БЛ, так и МБЛ [64]. Широкая специфичность ингибирования показана для их аналогов, циклобутанов [77].

Еще одной группой Zn-связывающих ингибиторов с высокой константой комплексообразования являются соединения, содержащие тиоловые группы [78, 79]. К ним относится известный лекарственный препарат L-каптоприл – ингибитор ангиотензин-превращающего фермента [80]. Наиболее эффективным в отношении МБЛ среди четырех диастереомеров каптоприла оказался D-каптоприл, который ингибирует *in vitro* МБЛ субкластеров В1 и В3, но не В2 [81]. Это объясняется различиями в механизме действия (рис. 7, б): в комплексе с бивалентной МБЛ NDM-1 (субкластер В1) тиоловая группа D-каптоприла связывает два иона Zn^{2+} и, таким образом, замещает нуклеофильный гидроксид [82], в комплексе с моноцинковой БЛ SphA (субкластер В2) тиоловая группа D-каптоприла взаимодействует с гидрофобными остатками активного центра фермента, а ион Zn^{2+} очень слабо координируется его карбоксильной группой [83].

В качестве потенциальных ингибиторов МБЛ широкого спектра действия рассматриваются некоторые азотсодержащие гетероциклические соединения, в частности имеющие азол-тиоацетамидный каркас [84]. Ингибирующая активность этих соединений была показана в отношении МБЛ NDM-1 и VIM-2.

Высокую связывающую способность в отношении ионов Zn^{2+} продемонстрировали фосфонатсодержащие соединения (6-фосфонометил-пиримидин-2-карбоксилаты): значения констант ингибирования МБЛ *in vitro* находятся в наномолярном диапазоне [85]. Аналогичными значениями констант связывания ионов Zn^{2+} характеризуются производные карбоновых кислот (нитрилтриуксусная кислота и N-(фосфонометил)иминодиуксусная кислота), активные *in vitro* в отношении ферментов типов NDM, VIM и IMP. Однако маловероятно, что такие сильные Zn-связывающие низкомолекулярные карбоксилаты будут использоваться в качестве лекарственных препаратов, скорее всего они станут основой пролекарств, активирующихся при проникновении в бактериальную клетку.

Zn-независимые ингибиторы. К Zn-независимым ингибиторам относятся активированные эфиры 3-меркаптопропионовой кислоты, взаимодействующие с консервативным остатком

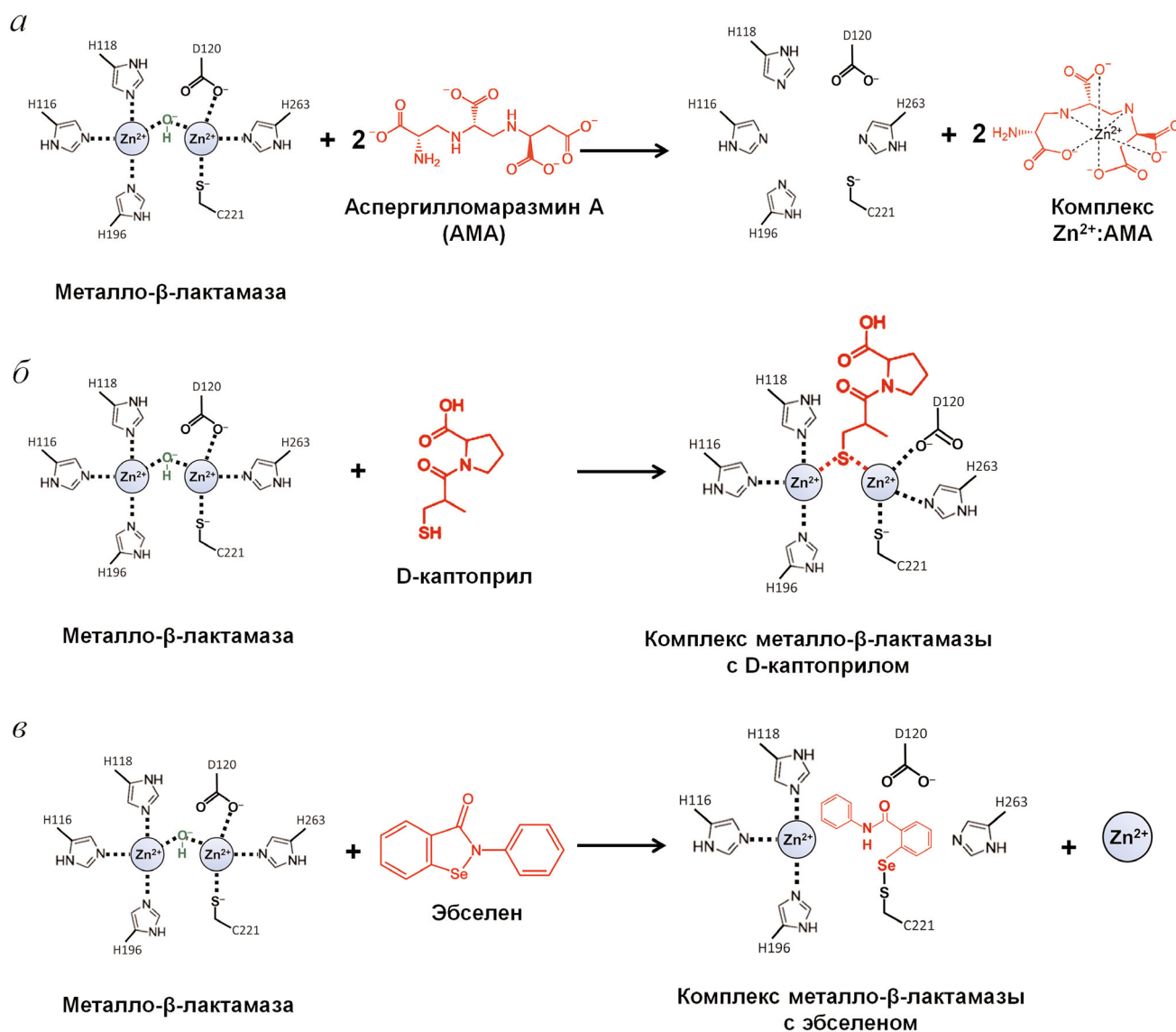


Рис. 7. Схема ингибирующего действия аспергилломаразмина А (а), D-капторила (б) и эбселена (в) в отношении металло- β -лактамаз

Lys224 в активном центре МБЛ субкластера В1 [86]. Селен-содержащий ингибитор эбселен эффективно ингибирует БЛ NDM-1, образуя ковалентную связь Se–S с остатком активного центра Cys221 (рис. 7, в) [87]. Найдены ингибиторы МБЛ субкластеров В1 и В2, взаимодействующие одновременно с Lys224 и Cys221 [88].

В качестве ингибитора МБЛ предложено использовать коллоидный раствор сульфата висмута, принцип действия которого основан на вытеснении Zn^{2+} из активного центра NDM-1 с образованием неактивного комплекса Bi^{3+} [89]. Важно отметить, что эбселен и коллоидный сульфат висмута используются в клинических целях для терапии других патологий, что упро-

щает процесс клинических исследований при регистрации препаратов на их основе.

Главным преимуществом новых ингибиторов не β -лактамой природы является их широкая ингибирующая специфичность в отношении БЛ разных молекулярных классов (таблица). Некоторые из них имеют собственную антибактериальную активность и действуют синергетически в комбинации с β -лактамами антибиотиками, что позволяет дать им «вторую жизнь» при лечении тяжелых инфекций, вызванных мультирезистентными микроорганизмами [90].

Несмотря на достигнутый прогресс, создание препаратов для ингибирования МБЛ *in vivo*

всё еще остается сложной задачей, в том числе из-за необходимости снижения их сродства к другим Zn-содержащим металло-ферментам, например ангиотензин-превращающему ферменту.

НОВЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОЗДАНИЯ ИНГИБИТОРОВ β -ЛАКТАМАЗ

Начало эпохи применения антибиотиков в клинической практике было чрезвычайно успешным: для борьбы с бактериями, вызывающими инфекционные заболевания, было синтезировано несколько десятков тысяч различных антибиотиков, многие из которых стали производиться в промышленных масштабах. Однако спустя 50 лет активного применения антибактериальных препаратов произошло катастрофическое изменение бактерий и появление форм, устойчивых к антибиотикам и обладающих более выраженной патогенностью и вирулентностью при действии на организм человека и животных. К этому привело недостаточное знание и непонимание биохимических и генетических механизмов экологической адаптации бактерий к токсическим веществам, в том числе к антибиотикам. Несмотря на дальнейшие поиски новых антибиотиков, резистентность бактерий остается непреодолимой, и ее главными механизмами являются ферментативный гидролиз и модификация антибиотиков, а также модификация мишеней, на которые воздействуют антибиотики [7]. Подход для преодоления устойчивости грамотрицательных бактерий к β -лактамам, основанный на использовании ингибиторов ферментов БЛ, был предложен около 50 лет назад. Несмотря на успешное применение ингибиторов I поколения, их использование стало ограниченным из-за узкой специфичности и развития к ним резистентности. Новое поколение ингибиторов оказалось более успешным и позволило вернуть β -лактамы в практическое использование при комбинировании их с ингибиторами. Однако и первое, и второе поколение ингибиторов были направлены против активных центров БЛ, и поэтому они, также как и антибиотики, оказались под давлением механизмов резистентности.

Новыми перспективными подходами в поиске новых ингибиторов БЛ не β -лактамой природы являются использование методов компьютерного моделирования и виртуальный скрининг для поиска новых мишеней и эффективных лигандов для них. Виртуальный скрининг на основе изменения структурного остова лигандов с использованием набора дескрипто-

ров для описания характеристик молекул позволил найти структурные аналоги известных аллостерических ингибиторов БЛ класса А [91]. Были найдены два новых ингибитора не β -лактамой природы, относящиеся по структуре к другим химическим классам, но проявляющие сходную биологическую активность в отношении тех же мишеней и показавшие более высокую эффективность в отношении БЛ ТЕМ-типа по сравнению со стартовыми молекулами [92, 93].

Активное изучение структурных и функциональных особенностей БЛ с использованием новейших методов структурной биологии, физико-химической биологии и молекулярного моделирования позволяет выявить новые поверхностные «горячие точки» белковой глобулы БЛ и использовать их в качестве новых мишеней для воздействия на активность и стабильность. В качестве таких мишеней интерес представляют подвижные петли, мутации в которых могут способствовать изменению каталитических функций и появлению новых свойств ферментов. У сериновых БЛ такой мишенью может являться Ω -петля, форма которой обеспечивается фиксацией концевых аминокислот на сближенном расстоянии друг от друга. Петли подобной формы описаны у 60 белков, для некоторых из них установлены функции аллостерического регулирования [94]. Ω -Петля сериновых БЛ расположена у входа в активный центр фермента и включает каталитически важный консервативный остаток Glu166, мутации которого приводят к практически полной потере активности фермента. Ω -Петля принимает участие во всех стадиях каталитического цикла гидролиза, при этом ее роль особенно критична на стадии деацилирования и высвобождения гидролизованной молекулы антибиотика [95]. Несмотря на различия в аминокислотной последовательности БЛ разных типов, пространственная укладка их Ω -петли одинакова. Исходя из структуры и функций Ω -петли, ее можно рассматривать как «мозаичную» модель мишеней для действия аллостерических ингибиторов.

Поиск аллостерических ингибиторов ведется и для МБЛ, хотя на данный момент пока точно не установлены мишени для воздействия на это семейство ферментов [96]. Показано, что ряд трициклических природных соединений из экстракта грибов *Chaetomium funicola* могут быть ингибиторами некоторых МБЛ (IMP-1 из *Bacillus cereus* II и *P. aeruginosa*, CfiA из *Bacteroides fragilis*) с достаточно низкими константами ингибирования (порядок нескольких мкМ) [97]. Одно соединение имело сродство к петле, расположенной около активного центра

фермента. В качестве аллостерических ингибиторов также исследуются макромолекулы (пептиды, наноантитела, аптамеры), направленные на участки, удаленные от активного центра. Методом фагового дисплея было найдено наноантитело, эпитопом которого являются фрагменты петли L6 и α 2-спирали, способное ингибировать активность МБЛ VIM-4 со значением K_i в микромолярном диапазоне [98]. Новым подходом к ингибированию является использование конструкций на основе самоорганизации ДНК, которые ингибировали МБЛ разных классов, включая NDM-1, со значениями $IC_{50} \sim 10$ нМ [99].

Ожидаемое мировое расширение производства промышленных β -лактамных антибиотиков неизбежно приведет к появлению не только новых БЛ, но и к дальнейшей мутационной изменчивости существующих ферментов. Уже сейчас наблюдается расширение разнообразия МБЛ класса B [9], образование гибридных молекул из различных БЛ [23–25]. Возможны другие варианты эволюции данного суперсемейства ферментов, их направления трудно предсказать. Выходом из этого положения должно стать изучение генетических механизмов синтеза и регуляции новых ферментов. Индукция синтеза БЛ представляет собой сложный процесс с участием самих антибиотиков, продуктов гидролиза самой бактериальной стенки, ферментов, принимающих участие в сигнальных путях и регулирующих процессы в бактериальных генах. Анализ этих процессов позволит выявить новые белки-мишени, ингибирование которых влияет на синтез БЛ. В связи с расширением генетических исследований механизмов регуляции биосинтеза бактериальных клеток это направление может оказаться весьма эффективным в создании новых антибактериальных препаратов, мишенью которых могут быть бел-

ки и нуклеиновые кислоты абсолютно специфические для микроорганизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Объем промышленного производства β -лактамных антибиотиков увеличивается, несмотря на рост резистентности бактерий к ним. Потребление β -лактамов, согласно мировым прогнозам, может удвоиться к 2030 г., что делает проблему создания ингибиторов БЛ на основе новых принципов и химических структур особенно актуальной. Перспективным для расширения специфичности ингибиторов в отношении разных БЛ является поиск новых мишеней, в том числе аллостерических, удаленных от активного центра фермента. Создание новых аллостерических ингибиторов и их совместное использование с антибиотиками позволит продлить «жизненный цикл» β -лактамов, терапевтическое действие которых хорошо изучено и характеризуется преимуществами в широкой специфичности действия, низкой токсичности и аллергенности по сравнению с другими антибиотиками.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российским научным фондом (грант № 15-14-00014-П, анализ ингибиторов сериновых β -лактамаз) и госзаказанием МГУ имени М.В. Ломоносова (АААА-А16-116052010081-5, анализ ингибиторов металло- β -лактамаз).

Конфликт интересов. Авторы обзора заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Smith, P. W., Watkins, K., and Hewlett, A. (2012) Infection control through the ages, *Am. J. Infect. Control*, **40**, 35–42, doi: 10.1016/j.ajic.2011.02.019.
- Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance, *FEMS Microbiol. Rev.*, **32**, 361–385, doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00095.x.
- Bush, K., and Bradford, P. A. (2016) β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview, *Cold Spring Harb. Perspect. Medici.*, **6**, a025247, doi: 10.1101/cshperspect.a025247.
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., and Laxminarayan, R. (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, E3463–E3470, doi: 10.1073/pnas.1717295115.
- URL: <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
- King, D. T., Sobhanifar, S., and Strynadka, N. C. J. (2017) The Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics, in *Handbook of Antimicrobial Resistance A* (Berghuis, A., Matlashewski, G., Wainberg, M. A., and Sheppard, D., eds.), Springer New York, pp. 177–201, doi: 10.1007/978-1-4939-0694-9_10.
- Egorov, A. M., Ulyashova, M. M., and Rubtsova, M. Y. (2018) Bacterial enzymes and antibiotic resistance, *Acta Naturae*, **10**, 33–48.
- Fishovitz, J., Hermoso, J. A., Chang, M., and Mobashery, S. (2014) Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resis-

- tant *Staphylococcus aureus*, *IUBMB Life*, **66**, 572-577, doi: 10.1002/iub.1289.
9. Bush, K. (2018) Past and present perspectives on β -lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **62**, e01076-18, doi: 10.1128/AAC.01076-18.
 10. Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., and Hordijk, J. (2018) Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae, *J. Antimicrob. Chemother.*, **73**, 1121-1137, doi: 10.1093/jac/dkx488.
 11. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., and Monnet, D. L. (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, *Clin. Microbiol. Infect.*, **18**, 268-281, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
 12. Stec, B., Holtz, K. M., Wojciechowski, C. L., and Kantrowitz, E. R. (2005) Structure of the wild-type TEM-1 β -lactamase at 1.55 Å and the mutant enzyme Ser70Ala at 2.1 Å suggest the mode of noncovalent catalysis for the mutant enzyme, *Acta Cryst.*, **61**, 1072-1079, doi: 10.1107/S0907444905014356.
 13. Egorov, A., Ulyashova, M., and Rubtsova, M. (2020) Impact of key and secondary drug resistance mutations on structure and activity of β -lactamases, in *Antibiotic Drug Resistance* (Martinez, J. C., and G. Igrejas, G., eds.), *Antibiotic Drug Resistance*, John Wiley and Sons, Inc., pp. 121-140.
 14. Abriata, L. A., Salverda, M. L. M., and Tomatis, P. E. (2012) Sequence-function-stability relationships in proteins from datasets of functionally annotated variants: the case of TEM β -lactamases, *FEBS Lett.*, **586**, 3330-3335, doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.010.
 15. Bush, K. (2013) The ABCD's of β -lactamase nomenclature, *J. Infect. Chemother.*, **19**, 549-559, doi: 10.1007/s10156-013-0640-7.
 16. Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., and Spencer, J. (2019) β -Lactamases and β -lactamase inhibitors in the 21st century, *J. Mol. Biol.*, **431**, 3472-3500, doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.
 17. Drawz, S. M., and Bonomo, R. A. (2010) Three decades of β -lactamase inhibitors, *Clin. Microbiol. Rev.*, **23**, 160-201, doi: 10.1128/CMR.00037-09.
 18. Liakopoulos, A., Mevius, D., and Ceccarelli, D. (2016) A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous, *Front. Microbiol.*, **7**, 1374, doi: 10.3389/fmicb.2016.01374.
 19. Arpin, C., Labia, R., Andre, C., Frigo, C., El Harrif, Z., and Quentin, C. (2001) SHV-16, a β -lactamase with a pentapeptide duplication in the omega loop, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **45**, 2480-2485, doi: 10.1128/AAC.45.9.2480-2485.2001.
 20. Shcherbinin, D., Veselovsky, A., Rubtsova, M., Grigorenko, V., and Egorov, A. (2020) The impact of long-distance mutations on the Ω -loop conformation in TEM type β -lactamases, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **38**, 2369-2376, doi: 10.1080/07391102.2019.1634642.
 21. D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., and Rossolini, G. M. (2013) CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance, *Int. J. Med. Microbiol.*, **303**, 305-317, doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.008.
 22. Bonnet, R. (2004) Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1-14, doi: 10.1128/aac.48.1.1-14.2004.
 23. Cantón, R., González-Alba, J. M., and Galán, J. C. (2012) CTX-M enzymes: origin and diffusion, *Front. Microbiol.*, **3**, 110, doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.
 24. Zhao, W. H., and Hu, Z. Q. (2013) Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria, *Crit. Rev. Microbiol.*, **39**, 79-101, doi: 10.3109/1040841X.2012.691460.
 25. Fursova, N., Pryamchuk, S., Kruglov, A., Abaev, I., Pecherskikh, E., Kartsev, N., Svetoich, E., and Dyatlov, I. (2013) The novel CTX-M-116 β -lactamase gene discovered in *Proteus mirabilis* is composed of parts of the CTX-M-22 and CTX-M-23 genes, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **57**, 1552-1555, doi: 10.1128/AAC.01471-12.
 26. Palzkill, T. (2013) Metallo- β -lactamase structure and function, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1277**, 91-104, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x.
 27. Malabanan, M. M., Amyes, T. L., and Richard, J. P. (2010) A role for flexible loops in enzyme catalysis, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **20**, 702-710, doi: 10.1016/j.sbi.2010.09.005.
 28. Boucher, H. W., Talbot, G. H., Bradley, J. S., Edwards, J. E., Gilbert, D., Rice, L. B., Scheld, M., Spellberg, B., and Bartlett, J. (2009) Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the infectious diseases society of America, *Clin. Infect. Dis.*, **48**, 1-12, doi: 10.1086/595011.
 29. Reading, C., and Cole, M. (1977) Clavulanic acid: a beta-lactamase inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **11**, 852-857, doi: 10.1128/AAC.11.5.852.
 30. Brown, A. G. (1986) Clavulanic acid, a novel beta-lactamase inhibitor – a case study in drug discovery and development, *Drug Des. Deliv.*, **1**, 1-21.
 31. English, A. R., Retsema, J. A., Girard, A. E., Lynch, J. E., and Barth, W. E. (1978) CP-45,899, a beta-lactamase inhibitor that extends the antibacterial spectrum of beta-lactams: initial bacteriological characterization, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **14**, 414-419, doi: 10.1128/AAC.14.3.414.
 32. Fisher, J., Belasco, J. G., Charnas, R. L., Khosla, S., and Knowles, J. R. (1980) Beta-lactamase inactivation by mechanism-based reagents, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **289**, 309-319, doi: 10.1098/rstb.1980.0048.
 33. Payne, D. J., Cramp, R., Winstanley, D. J., and Knowles, D. J. C. (1994) Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important β -lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 767-772, doi: 10.1128/AAC.38.4.767.
 34. Papp-Wallace, K. M., Bethel, C. R., Barnes, M. D., Rutter, J. D., Taracila, M. A., Bajaksouzian, S., Jacobs, M. R., and Bonomo, R. A. (2017) AAI101, a novel β -lactamase inhibitor: microbiological and enzymatic profiling, *Open Forum Infect. Dis.*, **4**, S375.
 35. Manageiro, V., Ferreira, E., Cougnoux, A., Albuquerque, L., Caniça, M., and Bonnet, R. (2012) Characterization of the inhibitor-resistant SHV β -lactamase SHV-107 in a clinical *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing GES-7 enzyme, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 1042-1046, doi: 10.1128/AAC.01444-10.
 36. Rodkey, E. A., Drawz, S. M., Sampson, J. M., Bethel, C. R., Bonomo, R. A., and Van Den Akker, F. (2012) Crystal structure of a preacylation complex of the β -lactamase inhibitor sulbactam bound to a sulfenamide bond-containing thiol- β -lactamase, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 16798-16804, doi: 10.1021/ja3073676.
 37. Van den Akker, F., and Bonomo, R. A. (2018) Exploring additional dimensions of complexity in inhibitor design for serine β -lactamases: mechanistic and intra- and inter-molecular chemistry approaches, *Front. Microbiol.*, **9**, 1-10, doi: 10.3389/fmicb.2018.00622.
 38. Grace, M. E., Fu, K. P., Gregory, F. J., and Hung, P. P. (1987) Interaction of clavulanic acid, sulbactam and

- cephamycin antibiotics with beta-lactamases, *Drugs Exp. Clin. Res.*, **13**, 145-148.
39. Docquier, J.-D., and Mangani, S. (2018) An update on β-lactamase inhibitor discovery and development, *Drug Resist. Updat.*, **36**, 13-29, doi: 10.1016/j.drug.2017.11.002.
 40. Horita, N., Shibata, Y., Watanabe, H., Namkoong, H., and Kaneko, T. (2017) Comparison of antipseudomonal β-lactams for febrile neutropenia empiric therapy: systematic review and network meta-analysis, *Clin. Microbiol. Infect.*, **23**, 723-729, doi: 10.1016/j.cmi.2017.03.024.
 41. Nimmich, E. B., Bookstaver, P. B., Kohn, J., Justo, J. A., Hammer, K. L., Albrecht, H., and Al-Hasan, M. N. (2017) Development of institutional guidelines for management of gram-negative bloodstream infections: incorporating local evidence, *Hosp. Pharm.*, **52**, 691-697, doi: 10.1177/0018578717720506.
 42. Zhanel, G. G., Chung, P., Adam, H., Zelenitsky, S., Denisuik, A., Schweizer, F., Lagacé-Wiens, P. R. S., Rubinstein, E., Gin, A. S., Walkty, A., Hoban, D. J., Lynch, J. P., and Karlowky, J. A. (2014) Ceftolozane/Tazobactam: a novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli, *Drugs*, **74**, 31-51, doi: 10.1007/s40265-013-0168-2.
 43. Shortridge, D., Duncan, L. R., Pfaller, M. A., and Flamm, R. K. (2019) Activity of ceftolozane-tazobactam and comparators when tested against gram-negative isolates collected from paediatric patients in the USA and Europe between 2012 and 2016 as part of a global surveillance programme, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **53**, 637-643, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2019.01.015.
 44. Walkty, A., Adam, H., Baxter, M., Lagacé-Wiens, P., Karlowky, J. A., Hoban, D. J., and Zhanel, G. G. (2018) *In vitro* activity of ceftolozane/tazobactam versus antimicrobial non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates including MDR and XDR isolates obtained from across Canada as part of the CANWARD study, 2008-16, *J. Antimicrob. Chemother.*, **73**, 703-708, doi: 10.1093/jac/dkx468.
 45. Tselepis, L., Langley, G. W., Aboklaish, A. F., Widlake, E., Jackson, D. E., Walsh, T. R., Schofield, C. J., Brem, J., and Tyrrell, J. M. (2020) *In vitro* efficacy of imipenem-relebactam and cefepime-AAI101 against a global collection of ESBL-positive and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **56**, 105925, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105925.
 46. Bulik, C. C., and Nicolau, D. P. (2011) Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 3002-3004, doi: 10.1128/AAC.01420-10.
 47. De Pascale, G., Martucci, G., Montini, L., Panarello, G., Cutuli, S. L., Di Carlo, D., Di Gravio, V., Di Stefano, R., Capitanio, G., Vallecocchia, M. S., Polidori, P., Spanu, T., Arcadipane, A., and Antonelli, M. (2017) Double carbapenem as a rescue strategy for the treatment of severe carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a two-center, matched case-control study, *Crit. Care*, **21**, 1-10, doi: 10.1186/s13054-017-1769-z.
 48. Coleman, K. (2011) Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non-β-lactam β-lactamase inhibitors, *Curr. Opin. Microbiol.*, **14**, 550-555, doi: 10.1016/j.mib.2011.07.026.
 49. King, D. T., King, A. M., Lal, S. M., Wright, G. D., and Strynadka, N. C. J. (2016) Molecular mechanism of avibactam-mediated β-lactamase inhibition, *ACS Infect. Dis.*, **1**, 175-184, doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00007.
 50. Lahiri, S. D., Mangani, S., Jahić, H., Benvenuti, M., Durand-Reville, T. F., De Luca, F., Ehmann, D. E., Rossolini, G. M., Alm, R. A., and Docquier, J. D. (2015) Molecular basis of selective inhibition and slow reversibility of avibactam against class D carbapenemases: a structure-guided study of OXA-24 and OXA-48, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 591-600, doi: 10.1021/cb500703p.
 51. Livermore, D. M., Mushtaq, S., Warner, M., Zhang, J., Maharjan, S., Doumith, M., and Woodford, N. (2011) Activities of NXL104 combinations with ceftazidime and aztreonam against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **55**, 390-394, doi: 10.1128/AAC.00756-10.
 52. Levasseur, P., Girard, A. M., Miossec, C., Pace, J., and Coleman, K. (2015) *In vitro* antibacterial activity of the ceftazidime-avibactam combination against Enterobacteriaceae, including strains with well-characterized β-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 1931-1934, doi: 10.1128/AAC.04218-14.
 53. Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Lagacé-Wiens, P. R. S., Denisuik, A., Rubinstein, E., Gin, A. S., Hoban, D. J., Lynch, J. P., and Karlowky, J. A. (2013) Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/β-lactamase inhibitor combination, *Drugs*, **73**, 159-177, doi: 10.1007/s40265-013-0013-7.
 54. Biedenbach, D. J., Kazmierczak, K., Bouchillon, S. K., Sahm, D. F., and Bradford, P. A. (2015) *In vitro* activity of aztreonam-avibactam against a global collection of gram-negative pathogens from 2012 and 2013, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 4239-4248, doi: 10.1128/AAC.00206-15.
 55. Livermore, D. M., Warner, M., and Mushtaq, S. (2013) Activity of MK-7655 combined with imipenem against Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Antimicrob. Chemother.*, **68**, 2286-2290, doi: 10.1093/jac/dkt178.
 56. Lapuebla, A., Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Landman, D., and Quale, J. (2015) Activity of imipenem with relebactam against gram-negative pathogens from New York City, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **59**, 5029-5031, doi: 10.1128/AAC.00830-15.
 57. Morinaka, A., Tsutsumi, Y., Yamada, M., Suzuki, K., Watanabe, T., Abe, T., Furuuchi, T., Inamura, S., Sakamaki, Y., Mitsuhashi, N., Ida, T., and Livermore, D. M. (2015) OP0595, a new diazabicyclooctane: mode of action as a serine β-lactamase inhibitor, antibiotic and β-lactam "enhancer", *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 2779-2786, doi: 10.1093/jac/dkv166.
 58. Livermore, D. M., Mushtaq, S., Warner, M., Vickers, A., and Woodford, N. (2017) *In vitro* activity of cefepime/zidebactam (WCK 5222) against gram-negative bacteria, *J. Antimicrob. Chemother.*, **72**, 1373-1385, doi: 10.1093/jac/dkx593.
 59. Durand-Réville, T. F., Guler, S., Comita-Prevoir, J., Chen, B., et al. (2017) ETX2514 is a broad-spectrum β-lactamase inhibitor for the treatment of drug-resistant gram-negative bacteria including *Acinetobacter baumannii*, *Nat. Microbiol.*, **2**, 17104, doi: 10.1038/nmicrobiol.2017.104.
 60. Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Stefanik, D., and Seifert, H. (2004) *In vitro* activities of the β-lactamase inhibitors clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam alone or in combination with β-lactams against epidemiologically characterized multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 1586-1592, doi: 10.1128/AAC.48.5.1586-1592.2004.
 61. Hecker, S. J., Reddy, K. R., Totrov, M., Hirst, G. C., Lomovskaya, O., Griffith, D. C., et al. (2015) Discovery of a cyclic boronic acid β-lactamase inhibitor (RPX7009) with utility vs class A serine carbapenemases, *J. Med. Chem.*, **58**, 3682-3692, doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00127.
 62. Lomovskaya, O., Sun, D., Rubio-Aparicio, D., Nelson, K., Tsivkovski, R., Griffith, D. C., and Dudley, M. N. (2017)

- Vaborbactam: spectrum of beta-lactamase inhibition and impact of resistance mechanisms on activity in Enterobacteriaceae, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, 1-15, doi: 10.1128/AAC.01443-17.
63. Rojas, L. J., Taracila, M. A., Papp-Wallace, K. M., Bethel, C. R., Caselli, E., Romagnoli, C., Winkler, M. L., Spellberg, B., Prati, F., and Bonomo, R. A. (2016) Boronic acid transition state inhibitors active against KPC and other Class A β -lactamases: structure-activity relationships as a guide to inhibitor design, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 1751-1759, doi: 10.1128/AAC.02641-15.
 64. 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., and Schofield, C. J. (2016) Structural basis of metallo- β -lactamase, serine- β -lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates, *Nat. Commun.*, **7**, 1-8, doi: 10.1038/ncomms12406.
 65. Cahill, S. T., Cain, R., Wang, D. Y., Lohans, C. T., Wareham, D. W., Oswin, H. P., Mohammed, J., Spencer, J., Fishwick, C. W. G., McDonough, M. A., Schofield, C. J., and Brema, J. (2017) Cyclic boronates inhibit all classes of β -lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, doi: 10.1128/AAC.02260-16.
 66. Hamrick, J. C., Docquier, J. D., Uehara, T., Myers, C. L., Six, D. A., et al. (2020) VNRX-5133 (Taniborbactam), a broad-spectrum inhibitor of serine- and metallo- β -lactamases, restores activity of cefepime in enterobacteriales and *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, doi: 10.1128/AAC.01963-19.
 67. Liu, B., Trout, R. E. L., Chu, G. H., McGarry, D., Jackson, R. W., et al. (2020) Discovery of taniborbactam (VNRX-5133): a broad-spectrum serine- and metallo- β -lactamase inhibitor for carbapenem-resistant bacterial infections, *J. Med. Chem.*, **63**, 2789-2801, doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01518.
 68. Tsvikovski, R., Totrov, M., and Lomovskaya, O. (2020) Biochemical characterization of QPX7728, a new ultra-broad-spectrum beta-lactamase inhibitor of serine and metallo-beta-lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e00130-20, doi: 10.1128/aac.00130-20.
 69. Cheng, Z., Thomas, C. A., Joyner, A. R., Kimble, R. L., Sturgill, A. M., et al. (2020) MBlinhibitors.com, a website resource offering information and expertise for the continued development of metallo- β -lactamase inhibitors, *Biomolecules*, **10**, doi: 10.3390/biom10030459.
 70. Ju, L.-C., Cheng, Z., Fast, W., Bonomo, R. A., and Crowder, M. W. (2018) The continuing challenge of metallo- β -lactamase inhibition: mechanism matters, *Trends Pharmacol. Sci.*, **39**, 635-647, doi: 10.1016/j.tips.2018.03.007.
 71. Ma, J., McLeod, S., MacCormack, K., Sriram, S., Gao, N., Breeze, A. L., and Hu, J. (2014) Real-time monitoring of New Delhi metallo- β -lactamase activity in living bacterial cells by ¹H NMR spectroscopy, *Angew. Chem. Int. En Engl.*, **53**, 2130-2133, doi: 10.1002/anie.201308636.
 72. Falconer, S. B., Reid-Yu, S. A., King, A. M., Gehrke, S. S., Wang, W., Britten, J. F., Coombes, B. K., Wright, G. D., and Brown, E. D. (2015) Zinc chelation by a small-molecule adjuvant potentiates meropenem activity *in vivo* against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, *ACS Infect. Dis.*, **1**, 533-543, doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00033.
 73. King, A. M., Reid-Yu, S. A., Wang, W., King, D. T., De Pascale, G., Strynadka, N. C., Walsh, T. R., Coombes, B. K., and Wright, G. D. (2014) Aspergillomarasmine A overcomes metallo-beta-lactamase antibiotic resistance, *Nature*, **510**, 503-506, doi: 10.1038/nature13445.
 74. Bergstrom, A., Katko, A., Adkins, Z., Hill, J., Cheng, Z., et al. (2018) Probing the interaction of aspergillomaras- mine A with metallo- β -lactamases NDM-1, VIM-2, and IMP-7, *ACS Infect. Dis.*, **4**, 135-145, doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00106.
 75. Somboro, A. M., Tiwari, D., Bester, L. A., Parboosing, R., Chonco, L., Kruger, H. G., Arvidsson, P. I., Govender, T., Naicker, T., and Essack, S. Y. (2015) NOTA: a potent metallo- β -lactamase inhibitor, *J. Antimicrob. Chemother.*, **70**, 1594-1596, doi: 10.1093/jac/dku538.
 76. 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., and Qin, S. (2018) NOTA analogue: A first dithiocarbamate inhibitor of metallo- β -lactamases, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **28**, 214-221, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.10.074.
 77. Abboud, M. I., Kosmopoulou, M., Krismanich, A. P., Johnson, J. W., Hinchliffe, P., Brem, J., Claridge, T. D. W., Spencer, J., Schofield, C. J., and Dmitrienko, G. I. (2018) Cyclobutanone mimics of intermediates in metallo- β -lactamase catalysis, *Chemistry*, **24**, 5734-5737, doi: 10.1002/chem.201705886.
 78. Büttner, D., Kramer, J. S., Klingler, F. M., Wittmann, S. K., Hartmann, M. R., et al. (2018) Challenges in the development of a thiol-based broad-spectrum inhibitor for metallo- β -lactamases, *ACS Infect. Dis.*, **4**, 360-372, doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00129.
 79. Liu, S., Jing, L., Yu, Z.-J., Wu, C., Zheng, Y., Zhang, E., Chen, Q., Yu, Y., Guo, L., Wu, Y., and Li, G.-B. (2018) ((S)-3-Mercapto-2-methylpropanamido)acetic acid derivatives as metallo- β -lactamase inhibitors: synthesis, kinetic and crystallographic studies, *Eur. J. Med. Chem.*, **145**, 649-660, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.01.032.
 80. Klingler, F. M., Wichelhaus, T. A., Frank, D., Cuesta-Bernal, J., El-Delik, J., Müller, H. F., et al. (2015) Approved drugs containing thiols as inhibitors of metallo- β -lactamases: Strategy to combat multidrug-resistant bacteria, *J. Med. Chem.*, **58**, 3626-3630, doi: 10.1021/jm501844d.
 81. Brem, J., van Berkel, S. S., Zollman, D., Lee, S. Y., Gileadi, O., McHugh, P. J., Walsh, T. R., McDonough, M. A., and Schofield, C. J. (2016) Structural basis of metallo- β -lactamase inhibition by captopril stereoisomers, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **60**, 142-150, doi: 10.1128/AAC.01335-15.
 82. King, D. T., Worrall, L. J., Gruninger, R., and Strynadka, N. C. J. (2012) New delhi metallo- β -lactamase: structural insights into β -lactam recognition and inhibition, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 11362-11365, doi: 10.1021/ja303579d.
 83. Liénard, B. M. R., Garau, G., Horsfall, L., Karsisiotis, A. I., Dambon, C., Lassaux, P., et al. (2008) Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo- β -lactamases by thiols, *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 2282-2294, doi: 10.1039/b802311e.
 84. Xiang, Y., Chang, Y.-N., Ge, Y., Kang, J.S., Zhang, Y.-L., Liu, X.-L., Oelschlaeger, P., and Yang, K.-W. (2017) Azolylthioacetamides as a potent scaffold for the development of metallo- β -lactamase inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 5225-5229, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.10.038.
 85. Hinchliffe, P., Tanner, C. A., Krismanich, A. P., Labbé, G., Goodfellow, V. J., et al. (2018) Structural and kinetic studies of the potent inhibition of metallo- β -lactamases by 6-phosphonomethylpyridine-2-carboxylates, *Biochemistry*, **57**, 1880-1892, doi: 10.1021/acs.biochem.7b01299.
 86. Kurosaki, H., Yamaguchi, Y., Higashi, T., Soga, K., Matsueda, S., Yumoto, H., Misumi, S., Yamagata, Y., Arakawa, Y., and Goto, M. (2005) Irreversible inhibition of metallo- β -lactamase (IMP-1) by 3-(3-mercaptopropionylsulfanyl)-propionic acid pentafluorophenyl ester, *Angewandte Chemie*, **44**, 3861-3864, doi: 10.1002/anie.200500835.
 87. Chiou, J., Wan, S., Chan, K. F., So, P. K., He, D., Chan, E. W. C., Chan, T. H., Wong, K. Y., Tao, J., and Chen, S.

- (2015) Ebselen as a potent covalent inhibitor of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1), *Chem. Commun.*, **51**, 9543-9546, doi: 10.1039/c5cc02594j.
88. Chen, C., Xiang, Y., Yang, K. W., Zhang, Y., Wang, W. M., Su, J. P., Ge, Y., and Liu, Y. (2018) A protein structure-guided covalent scaffold selectively targets the B1 and B2 subclass metallo- β -lactamases, *Chem. Commun.*, **54**, 4802-4805, doi: 10.1039/c8cc01067f.
 89. Wang, R., Lai, T. P., Gao, P., Zhang, H., Ho, P. L., Woo, P. C. Y., Ma, G., Kao, R. Y. T., Li, H., and Sun, H. (2018) Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo- β -lactamase inhibitors, *Nat. Commun.*, **9**, 1-12, doi: 10.1038/s41467-018-02828-6.
 90. Papp-Wallace, K. M., Nguyen, N. Q., Jacobs, M. R., Bethel, C. R., Barnes, M. D., et al. (2018) Strategic approaches to overcome resistance against gram-negative pathogens using β -lactamase inhibitors and β -lactam enhancers: activity of three novel diazabicyclooctanes WCK 5153, Zidebactam (WCK 5107), and WCK 4234, *J. Med. Chem.*, **61**, 4067-4086, doi: 10.1021/acs.jmedchem.8b00091.
 91. Beshnova, D. A., Carolan, C., Grigorenko, V. G., Rubtsova, M. Y., Gbekor, E., Lewis, J., Lamzin, V. S., and Egorov, A. M. (2019) Scaffold hopping computational approach for searching novel β -lactamase inhibitors, *Biomed. Khim.*, **65**, 468-476, doi: 10.18097/pbmc20196506468.
 92. Grigorenko, V. G., Andreeva, I. P., Rubtsova, M. Y., Deygen, I. M., Antipin, R. L., et al. (2017) Novel non- β -lactam inhibitor of β -lactamase TEM-171 based on acylated phenoxylaniline, *Biochimie*, **132**, 45-53, doi: 10.1016/j.biochi.2016.10.011.
 93. Antipin, R. L., Beshnova, D. A., Petrov, R. A., Shiryayeva, A. S., Andreeva, I. P., et al. (2017) Synthesis, SAR and molecular docking study of novel non- β -lactam inhibitors of TEM type β -lactamase, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 1588-1592, doi: 10.1016/j.bmcl.2017.02.025.
 94. Papaleo, E., Saladino, G., Lambrugh, M., Lindorff-Larsen, K., Gervasio, F. L., and Nussinov, R. (2016) The role of protein loops and linkers in conformational dynamics and allostery, *Chem. Rev.*, **116**, 6391-6423, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00623.
 95. Egorov, A., Rubtsova, M., Grigorenko, V., Uporov, I., and Veselovsky, A. (2019) The role of the Ω -loop in regulation of the catalytic activity of TEM-type β -lactamases, *Biomolecules*, **9**, doi: 10.3390/biom9120854.
 96. Fast, W., and Sutton, L. D. (2013) Metallo- β -lactamase: inhibitors and reporter substrates, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 1648-1659, doi: 10.1016/j.bbapap.2013.04.024.
 97. Payne, D. J., Hueso-Rodríguez, J. A., Boyd, H., Concha, N. O., Janson, C. A., et al. (2002) Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo- β -lactamases, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 1880-1886, doi: 10.1128/AAC.46.6.1880-1886.2002.
 98. Sohler, J. S., Laurent, C., Chevigné, A., Pardon, E., Srinivasan, V., et al. (2013) Allosteric inhibition of VIM metallo- β -lactamases by a camelid nanobody, *Biochem. J.*, **450**, 477-486, doi: 10.1042/BJ20121305.
 99. Ouyang, X., Chang, Y. N., Yang, K. W., Wang, W. M., Bai, J. J., et al. (2017) A DNA nanoribbon as a potent inhibitor of metallo- β -lactamases, *Chem. Commun.*, **53**, 8878-8881, doi: 10.1039/c7cc04483f.

INHIBITORS OF β -LACTAMASES. NEW LIFE OF β -LACTAM ANTIBIOTICS

Review

A. M. Egorov, M. M. Ulyashova, and M. Yu. Rubtsova*

Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: mrubtsova@gmail.com

Received July 9, 2020
Revised August 14, 2020
Accepted August 15, 2020

β -Lactam antibiotics account for about 60% of all produced antibiotics. Due to a high activity and minimal side effects, they are the most commonly used class of antibacterial drugs for the treatment of various infectious diseases of humans and animals, including severe hospital infections. However, the emergence of bacteria resistant to β -lactams has led to the clinical inefficiency of these antibiotics, and as a result, their use in medicine has been limited. The search for new effective ways for overcoming the resistance to β -lactam antibiotics is an essential task. The major mechanism of bacterial resistance is the synthesis of β -lactamases (BLs) that break the antibiotic β -lactam ring. Here, we review specific inhibitors of serine β -lactamases and metallo- β -lactamases and discuss approaches for creating new inhibitors that would prolong the "life" of β -lactams.

Keywords: antibiotic resistance of bacteria, β -lactamases, inhibitors, β -lactam antibiotics