

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН)

На правах рукописи

Кривицкая Александра Вячеславовна

**Молекулярное моделирование механизмов ферментативных
реакций, связанных с бактериальной резистентностью к
 β -лактамным антибиотикам**

1.5.8. Математическая биология, биоинформатика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук
профессор РАН Хренова М.Г.

Москва – 2024

Оглавление

Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	12
1.1. Механизм действия β -лактамных антибиотиков	12
1.2. Классификация β -лактамных антибиотиков	16
<i>Пенициллины</i>	17
<i>Цефалоспорины</i>	18
<i>Карбапенемы</i>	21
<i>Монобактамы</i>	23
1.3. Резистентность к β -лактамным антибиотикам	23
1.4. Классификация β -лактамаз	31
<i>β-лактамазы класса A</i>	35
<i>β-лактамазы класса B</i>	36
<i>β-лактамазы класса C</i>	41
<i>β-лактамазы класса D</i>	42
1.5. Ингибиторы β -лактамаз	43
Глава 2. Материалы и методы	46
2.1. Метод молекулярной механики	46
2.2. Методы квантовой химии	48
2.3. Метод квантовой механики/молекулярной механики	52
2.4. Анализ поверхности потенциальной энергии	54
2.5. Молекулярная динамика	56
<i>Детали реализации расчетов МД и КМ/ММ</i>	61
2.6. Направленная молекулярная динамика	62
2.7. Метод зонтичной выборки	63
<i>Детали реализации расчетов направленной МД и метода зонтичной выборки</i>	64
2.8. Динамический сетевой анализ	65
2.9. Анализ электронной плотности	66
Глава 3. Результаты и их обсуждение	72
3.1. Выбор оптимального метода расчета механизма реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1	73
3.1.1. Анализ активации субстрата ферментом	73

3.1.2. Расчет механизма реакции гидролиза	76
3.2. Расчет механизма реакции гидролиза антибиотика имипенема металло- β - лактамазами L1 и NDM-1	79
3.2.1. Анализ активации субстрата ферментом	79
3.2.2. Расчет механизма реакции гидролиза	83
3.3. Молекулярное моделирование ингибирования PBP2 из <i>Neisseria Gonorrhoeae</i> и его мутантов антибиотиком цефтриаксоном	92
3.3.1. Анализ активации субстрата ферментом	92
3.3.2. Расчет механизма реакции гидролиза	96
3.3.3. Анализ связывания цефтриаксона с PBP2	98
3.4. Определение электронных факторов, влияющих на скорость гидролиза ряда цефалоспориновых антибиотиков металло- β -лактамазой L1	101
3.4.1 Анализ электронной плотности в структуре переходного состояния	101
3.4.2 Прогнозирование новых антибиотиков	106
3.5. Определение электронных факторов, влияющих на эффективность ингибиторов NDM-1 на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот	107
3.5.1. Анализ связывания бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот с NDM-1	107
3.5.2 Прогнозирование новых ингибиторов	110
Заключение	113
Выводы	115
Список сокращений	116
Список литературы	118

Введение

Актуальность работы

На сегодняшний день устойчивость бактерий к противомикробным препаратам является одной из самых актуальных проблем человечества. Согласно последним оценкам Всемирной Организации Здравоохранения бактериальная резистентность потенциально несет как биологическую, так и экономическую угрозу для всех стран. Устойчивость к противомикробным препаратам является причиной более 700 тысяч смертельных случаев в мире ежегодно и к 2050 году число смертей может вырасти до 10 миллионов. С экономической точки зрения только к 2030 году потери мирового ВВП составят до 3,4 триллиона долларов США (O'Neill, 2016). Мировое сообщество реагирует на проблему и во многих странах введены специальные программы для предупреждения распространения антимикробной резистентности. В том числе Правительством Российской Федерации утверждена Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 года (Правительство Российской Федерации, 2017). Данная программа включает в себя как пункты касающиеся совершенствования уже имеющихся мер по предупреждению и ограничению распространения патогенов с антимикробной резистентностью, так и пункты о фундаментальном изучении механизмов возникновения антимикробной резистентности и разработке новых противомикробных препаратов.

Больше половины врачебных назначений антибиотиков приходится на β -лактамы. β -лактамные антибиотики встраиваются в активный центр пенициллин-связывающих белков. Время жизни образующегося устойчивого комплекса достаточно для того, чтобы прекратить рост бактериальной стенки. Таким образом, β -лактамы препятствуют образованию пептидных мостиков и объединению пептидогликанов в единую структуру, вследствие чего бактерия погибает. Однако со временем бактерии выработали механизмы устойчивости к β -лактамным антибиотикам. Основными причинами возникновения бактериальной резистентности к антибиотикам в том числе и к β -лактамным, являются их широкая распространенность в продуктах питания, особенно мясных, и нерациональное использование антибиотиков при лечении.

К механизмам резистентности к β -лактамным антибиотикам можно отнести четыре следующих процесса: продукция ферментов β -лактамаз, изменение мишеней β -лактамных антибиотиков, изменение работы эффлюксных насосов и поринов. Различают сериновые и металло- β -лактамазы в зависимости от состава активного центра. Эти ферменты расщепляют β -лактамное кольцо в антибиотике, делая молекулу неактивной и неспособной ингибировать синтез клеточной стенки. Модификации пенициллин-связывающих белков могут быть направлены на ухудшение связывания с антибиотиками или, если связывание произошло, на ускорение реакции гидролиза антибиотика, уменьшая тем самым время существования устойчивого ацил-фермента, что приводит к восстановлению функции пенициллин-связывающих белков. Эффлюксные насосы выводят антибиотики изнутри клетки, снижая их концентрацию и соответственно эффективность, а порины отвечают за проницаемость β -лактамов в клетку. Резистентность к антибиотикам чаще комплексная и может комбинироваться из всех или нескольких механизмов резистентности одновременно. Однако наибольший вклад в резистентность к β -лактамным антибиотикам вносят продукция β -лактамаз и модификации пенициллин-связывающих белков.

Современный поиск новых лекарственных препаратов компьютерными методами это многоэтапный процесс, состоящий из идентификации цели, обнаружения потенциальных молекул и их оптимизации, а также доклинических тестов. В поиске потенциальных молекул задействованы такие методы как докинг, моделирование и картирование фармакофоров, дизайн *de novo*, построение взаимосвязи структура-свойство или структура-активность, виртуальный скрининг на основе последовательностей и так далее. Наилучшим примером успешного использования структурно-ориентированного дизайна лекарств является разработка ингибиторов протеазы ВИЧ, которые произвели революцию в лечении ВИЧ (Wlodawer, 1998). Однако до настоящего времени успеха такого уровня в применении компьютерных методов для поиска лекарств больше не наблюдалось. Эффективность компьютерных подходов сложно оценить, так как большая часть экспериментальных данных, подходящих для сравнительного анализа в прогнозах связывания *in silico*, генерируется в фармацевтической промышленности и сохраняется конфиденциальной, а не публикуется для общего использования. Информация из академических источников зачастую ограничивается прогнозом лекарственного соединения без его проверки на практике.

Однако в 2022 году был организован публичный проект под названием «Критическая оценка компьютерных экспериментов по поиску совпадений» (Critical Assessment of Computational Hit-finding Experiments, CACHE) для сравнения вычислительных подходов к идентификации небольшой молекулы, которая связывает целевой белок с достаточно высоким средством и подходящими физико-химическими свойствами, которую можно считать надежной отправной точкой для открытия лекарств (Ackloo, 2022). Показатель результативности первой задачи, посвященной поиску низкомолекулярных соединений, связывающихся с еще не изученным доменом фермента, связанного с болезнью Паркинсона, оказался менее 1%. В другой задаче область связывания домена была ранее однозначно определена и существовали уже известные соединения, связывающиеся с ним. Эффективность в данной задаче оказалась 28% (по предварительным данным, конечные результаты на февраль 2024 года не опубликованы). Это отчасти может быть связано с тем, что в большинстве методов для оценки связывания используются оценочные функции, основанные на классических силовых полях молекулярной механики. Точность прогноза оценки связывания можно увеличить с помощью проведения квантово-химических расчетов, то есть перейти от рассмотрения молекулярной системы на уровне атомов до совокупности электронов и ядер. Анализ электронной плотности, полученной из квантово-химических расчетов, позволяет более детально охарактеризовать исследуемую систему. Однако квантово-химические расчеты очень трудоемки. Здесь исследователи сталкиваются с дилеммой: возможен либо анализ сотни тысяч соединений с зачастую неэффективными прогнозами, либо наиболее точные оценки взаимодействий для очень небольшого набора молекул. Найти баланс между этими направлениями на уровне современного развития компьютерных систем крайне сложно.

Также известно, что больше половины выводимых на рынок лекарственных средств FDA (Food and Drug Administration, USA) и NMPA (National Medical Products Administration, China) на 2023 год это аналоги уже известных и используемых лекарств (CDER, 2024; Zhi, 2024). Такие аналоги называют «следующий в классе», их поиск не обязательно подразумевает анализ сотен тысяч соединений, для него достаточно произвести определенное количество модификаций основной молекулы. Для поиска «следующих в классе» используется небольшой набор молекул, в связи с чем возможно применение альтернативного метода, основанного на анализе электронной плотности,

полученной из квантово-химических расчетов. В данном подходе строится уравнение, связывающее макросвойства системы, взятые из эксперимента, и микросвойства системы, описывающие особенности распределения электронной плотности.

В данной работе рассматриваются два механизма устойчивости к β -лактамным антибиотикам, определяющиеся гидролизом β -лактамных антибиотиков металло- β -лактамазами и появлением аминокислотных замен в пенициллин-связывающем белке 2 из *Neisseria Gonorrhoeae*, влияющих на ингибирование антибиотиком цефтриаксоном. Также в работе обсуждается поиск новых антибактериальных препаратов, основанный на анализе электронной плотности активного центра фермента.

Степень разработанности проблемы

Механизмы инактивации β -лактамных антибиотиков активно изучаются структурными, кинетическими и спектральными методами, однако их детализация недостаточна для определения последовательности всех элементарных стадий и их энергетических характеристик. Среди вопросов, требующих дополнительных исследований методами молекулярного моделирования можно выделить следующие. Для реакции гидролиза карбапенемов считается, что состав продуктов зависит от конкретной структуры карбапенема и типа металло- β -лактамазы. При этом состав продуктов, определенный методами ЯМР и РСА, для реакции инактивации имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 различается. Известно, что рост резистентности в ряду пенициллин-связывающих белков 2 из *Neisseria Gonorrhoeae* связан с появлением определенных аминокислотных замен, но нет точных данных, указывающих как именно эти мутации влияют на механизм реакции в активном центре фермента. В литературе представлены единичные работы по поиску новых антибактериальных средств на основе квантово-химического анализа электронной плотности активных центров ферментов.

Цели и задачи

Целью работы является определение молекулярных механизмов инактивации β -лактамных антибиотиков в активных центрах пенициллин-связывающих белков и металло- β -лактамаз и поиск новых антибактериальных препаратов методами квантовой химии и молекулярного моделирования.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

1. Расчет профиля энергии Гиббса реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 методом молекулярной динамики с потенциалами квантовой

механики/молекулярной механики с описанием квантовой подсистемы различными гибридными функционалами теории функционала электронной плотности.

2. Сравнение механизмов реакции гидролиза антибиотика имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1.
3. Определение влияния аминокислотных замен на механизм реакции ингибирования цефтриаксоном пенициллин-связывающих белков 2 из разных штаммов *Neisseria Gonorrhoeae*.
4. Определение взаимосвязи между электронно-плотностными характеристиками активного центра и скоростью реакции гидролиза цефалоспориновых антибиотиков металло- β -лактамазой L1.
5. Определение взаимосвязи между электронно-плотностными характеристиками активного центра и значениями IC50 ингибиторов NDM-1 на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот.

Объект и предмет исследования

Объектами исследования являются молекулярные модели ферментов металло- β -лактамаз NDM-1 и L1, пенициллин-связывающих белков 2 из *Neisseria Gonorrhoeae*, построенные на основе кристаллических структур из базы данных PDB (Protein Data Bank), а также субстраты: ряд цефалоспориновых антибиотиков (цефокситин, цефсулодин, цефепим, нитроцефин, цефалоридин, цефалоридин С, цефотаксим, цефуроксим, CGP-31523A, CGP-17520), имипенем и набор борсодержащих ингибиторов на основе бензо[b]тиофена. Предметом исследования являются молекулярные взаимодействия в активных центрах выбранных ферментов и конформационные изменения белков.

Научная новизна

В данной работе методом молекулярной динамики с комбинированными потенциалами квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) установлены молекулярные механизмы антибиотикорезистентности ферментов, критически важных для формирования бактериальной стенки. Определены механизмы инактивации антибиотиков ферментами, действие которых является превалирующим механизмом бактериальной резистентности. Дескрипторы электронной плотности позволили оценить особенности формирования фермент-субстратных комплексов и выделить факторы, влияющие на эффективность рассмотренных лекарственных препаратов. Уравнения,

связывающие экспериментальные макросвойства системы и микросвойства системы из расчета можно использовать для поиска новых антибактериальных препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы

В работе установлены механизмы инактивации карбапенемов металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 и молекулярные механизмы связанные с ростом резистентности в ряду пенициллин-связывающих белков 2 из *Neisseria Gonorrhoeae*, теоретические знания о которых ранее не были представлены. Предложены уравнения, определяющие взаимосвязь рассчитываемых микроскопических параметров и экспериментально наблюдаемых свойств системы, для прогнозирования новых соединений: медленно гидролизующихся β -лактамных антибиотиков и более эффективных ингибиторов класса органических бороновых кислот металло- β -лактамазы NDM-1. Полученные уравнения можно использовать для поиска новых антибактериальных препаратов.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием методов молекулярного моделирования, включая метод молекулярной динамики, метод направленной молекулярной динамики, гибридный метод КМ/ММ. Энергические профили химических реакций описывались методом КМ/ММ с описанием квантово-механической подсистемы методом функционала электронной плотности, а также нестационарным вариантом теории функционала электронной плотности для описания энергии вертикальных электронных переходов. Для построения профилей энергии Гиббса использовался метод зонтичной выборки, для конформационного анализа – динамический сетевой анализ. Анализ электронной плотности проводился в рамках квантово-топологической теории атомов в молекулах.

Личный вклад автора заключается в создании молекулярных моделей исследуемых объектов, расчете механизмов реакций и молекулярно-динамических траекторий с классическими и КМ/ММ потенциалами, анализ молекулярно-динамических траекторий, анализ электронной плотности активных центров ферментов, интерпретация результатов, подготовка публикаций и докладов по теме диссертационного исследования.

Положения, выносимые на защиту:

1. При сравнении гибридных функционалов с различными долями точного обмена Хартри-Фока для описания механизма реакции гидролиза субстрата нитроцефина металло- β -лактамазой L1 методом молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ

показано, что только функционал PBE0-D3 правильно определяет лимитирующую стадию и описывает накопление интермедиата реакции.

2. Петля L10 в металло- β -лактамазах NDM-1 и L1 определяет жесткость активного центра, как следствие, эффективность нуклеофильной атаки и состав продуктов ферментативной реакции: в L1 единственный продукт реакции енамин, в NDM-1 основной продукт реакции енамин, но ввиду более гибкого активного центра возможно образование (S)-имина. Для обеих систем (R)-имин образуется после выхода продуктов в раствор в результате таутомеризации.
3. Аминокислотная замена Gly545Ser в пенициллин-связывающих белках 2 мутантных штаммов изменяет положение цефтриаксона в активном центре, в связи с чем наблюдаемое уменьшение эффективного каталитического параметра k_2/K_S определяется не только увеличением константы диссоциации K_S , но и уменьшением константы скорости ацилирования k_2 .
4. Взаимосвязь между параметрами электронной плотности водородной связи $N_{S...H}$ в структуре переходного состояния лимитирующей стадии реакции гидролиза субстрата нитроцефина металло- β -лактамазой L1 и наблюдаемым макроскопическим параметром k_{cat} можно использовать для прогнозирования скорости реакции гидролиза новых соединений цефалоспоринового ряда.
5. Реакция нуклеофильной атаки ингибиторов на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот каталитическим гидроксид анионом происходит безбарьерно в результате связывания в активном центре фермента, однако IC50, согласно установленной взаимосвязи, обладают величинами не ниже 30 мкМ.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается современными методами исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам. Сформулированные в тексте работы научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на расчетах с использованием современных методов описания электронной структуры и молекулярного моделирования, результаты продемонстрированы в приведенных таблицах и рисунках.

Материалы работы были представлены на семинарах лаборатории квантовой химии и молекулярного моделирования химического факультета МГУ и следующих российских и международных конференциях: международная конференция

«Математика. Компьютер. Образование», Россия, 2018-2023 гг.; ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ «Биохимическая физика» Москва, Россия, 2018, 2022 гг.; всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике, Мытищи, Россия, 2019 г.; всероссийская научная конференция МФТИ, Долгопрудный, Россия, 2023 гг.; ежегодная отчетная конференция аспирантов Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Москва, Россия, 2020-2023 гг.; симпозиум «Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств» Москва, Россия, 2021 г.; всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции», Москва, Россия, 2022 г.; зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, Россия, 2023, 2024 гг.; школа-конференция для молодых ученых «Суперпатогены - новый цивилизационный вызов», Сочи, Россия, 2022 г.; VII Съезд биофизиков России, Краснодар, Россия, 2023 г.; саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.БИОТЕХ», Сочи, Россия, 2023 г.; международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения», Суздаль, Россия, 2023 г.; I Междисциплинарная всероссийская молодежная научная школа-конференция с международным участием «Молекулярный дизайн биологически активных веществ: биохимические и медицинские аспекты», Казань, Россия, 2023 г.

По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах и сборниках, индексируемых в базах данных Web of Science и RSCI.

Структура и объем

Диссертация изложена на 135 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературных источников, состоящий из 225 наименований. Работа содержит 39 рисунков и 4 таблицы.

Благодарности

Автор выражает благодарность администрации Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова за предоставленное машинное время. Работа выполнена при поддержке РФФ, проект № 18-74-10056.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Механизм действия β -лактамных антибиотиков

Механизм действия β -лактамных антибиотиков заключается в прерывании формирования бактериальной клеточной стенки, они препятствуют образованию пептидных мостиков и объединению пептидогликанов в единую структуру. Это достигается за счет ковалентного связывания β -лактамов с пенициллин-связывающими белками (Penicillin-Binding Proteins, PBP), которые участвуют в терминальных стадиях перекрестного связывания пептидогликана как у грамотрицательных, так и у грамположительных бактерий.

Бактерии различаются в строении клеточной стенки: существуют грамположительные и грамотрицательные бактерии. У грамположительных бактерий слой пептидогликана значительно толще, чем у грамотрицательных бактерий, и составляет до 90 % массы всей клеточной стенки. На поверхности пептидогликана также находятся ковалентно связанные с ним молекулы - тейхоевые и липотейхоевые кислоты. Эти молекулы служат регуляторами проницаемости клеточной мембраны, облегчают прикрепление к поверхностям и обладают иммуногенными функциями. Такой слой пептидогликана делает грамположительные бактерии более устойчивыми к определённым типам антибиотиков.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий имеет более сложное строение, она состоит не только из слоя пептидогликана. Внешний слой – это наружная мембрана, которая состоит из липополисахаридов и фосфолипидов. Липополисахаридный слой в свою очередь состоит из трёх слоёв: слоя липида А, который скрепляет липополисахаридный слой и наружную мембрану, слоя ядер полисахарида и слоя О-антигена, который представляет собой повторяющуюся молекулу сахара, различающуюся у разных бактериальных штаммов и используемую для их классификации по разным серотипам. Под этим внешним слоем находится слой пептидогликана, который у грамотрицательных бактерий тоже отличается – он намного тоньше и не имеет на своей поверхности тейхоевых и липотейхоевых кислот или

соединений с аналогичными функциями. Пептидогликановый слой грамотрицательных бактерий составляет лишь около 10 % массы клеточной стенки. Пространство между наружной мембраной и слоем пептидогликана грамотрицательных бактерий называется периплазматическим пространством, которое содержит множество ферментов и транспортных систем, участвующих в различных клеточных процессах (Verbeke, 2017; Ruhal, 2021).

Пептидогликан клеточной стенки большинства бактерий представляет собой с химической точки зрения – муреин. Муреин – это гетерополимер, построенный из цепочек, в которых чередуются остатки N-ацетилглюкозамина и N-ацетилмурамовой кислоты, соединенные между собой β -1,4-гликозидными связями. Остатки N-ацетилмурамовой кислоты через лактатные группы соединены пептидной связью с аминокислотами. К типичным аминокислотам, обнаруженным в составе муреина, относятся L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезо-диаминопимелиновая кислота и D-аланин. Мезо-диаминопимелиновая кислота не является постоянным компонентом пептидогликана, у некоторых бактерий вместо нее встречаются L-лизин, L- или D-орнитин, 2,4-диаминомасляная кислота, гомосерин или гидроксизин (Vollmer, 2008).

Общим слоем клеточной стенки как для грамотрицательных, так и для грамположительных бактерий является цитоплазматическая мембрана. Цитоплазматическая мембрана несет в себе барьерную функцию между внутренним содержимым бактериальной клетки и внешней средой. Химический состав ее представлен белково-липидным комплексом, в котором на долю белков приходится 50-75 %, на долю липидов – 15-50 % (Singer, 1972). Главным липидным компонентом мембраны являются фосфолипиды. Белковый состав мембраны очень разнообразен для всех бактерий и его подразделяют на интегральные, полуинтегральные и периферические. Интегральные белки или трансмембранные – это белки, пронизывающие мембрану насквозь и контактирующие при этом и с наружной, и с внутренней средой клетки. К интегральным белкам относятся поры, ионные каналы, переносчики, насосы, некоторые рецепторные белки. Полуинтегральные белки погружены в цитоплазматическую мембрану на определенную глубину, но не пронизывают ее насквозь. К периферическим белкам относятся ферменты, которые находятся вне липидного бислоя и непрочны связаны с поверхностью мембраны. К ним относятся: белки адгезии, некоторые рецепторные белки, белки цитоскелета,

окислительно-восстановительные ферменты, пермеазы, белки, участвующие в биосинтезе различных компонентов клеточной стенки, который происходит на поверхности цитоплазматической мембраны. Разные виды бактерий отличаются друг от друга по липидному составу своих мембран.

К белкам, участвующим в биосинтезе компонентов клеточной стенки, относятся и РВР. Существует большое число различных РВР, которые или связаны с мембраной, или находятся в свободном виде в цитоплазме. Набор РВР у бактерий многообразен, число РВР у каждого вида бактерий может варьироваться в довольно широких диапазонах. Например, у бактерии *N. gonorrhoeae* известно всего 4 РВР (Barbour, 1981; Stefanova, 2004), в то время как у *Bacillus subtilis* 16 (Scheffers, 2004). Классифицируются они по молекулярной массе на низко- и высокомолекулярные РВР и по функциональности на классы. Низкой молекулярной массой обладают РВР класса С, которые представляют собой в первую очередь карбоксипептидазы конца фрагмента пептидной цепи пептидогликана D-Ala-D-Ala и контролируют популяцию стеблей, способных к «сшиванию». Высокомолекулярные РВР подразделяются на два подкласса в зависимости от структуры и каталитической активности N-концевого домена. С-концевой пенициллин-связывающий домен обоих классов обладает транспептидазной активностью, катализирует перекрестное сшивание пептидов между двумя соседними гликановыми цепями. В классе А N-концевой домен отвечает за гликозилтрансферазную активность, катализируя удлинение несшитых гликановых цепей. А в классе В N-концевой домен играет роль в морфогенезе клеток, взаимодействуя с другими белками, участвующими в клеточном цикле (Höltje, 1998; Den Blaauwen, 2008).

Реакции, осуществляемые РВР, происходят по трехстадийному механизму. К первой стадии относят быстрое, обратимое образование нековалентного комплекса между ферментом и пентапептидом стебля пептидогликана. Вторая стадия – это реакция ацилирования, заключающаяся в атаке депротонированного серина на карбонильный атом углерода С-концевой пептидной связи D-Ala-D-Ala, что приводит к образованию промежуточного продукта ацил-фермента. Заключительный этап – реакция деацилирования, возможен в двух вариантах. Происходит либо гидролиз ацил-фермента с высвобождением укороченного пептида – карбоксипептидирование, либо образование поперечной связи со вторым пептидом стволового пептидогликана – транспептидация.

PBP также обладает DD-эндопептидазной активностью, которая заключается в гидролизе поперечного мостика, возникающего в результате DD-транспептидазной активности.

Именно транспептидазный домен PBP является мишенью для β -лактамных антибиотиков. β -лактамные антибиотики, обладающие пространственным сходством с субстратом реакции D-Ala-D-Ala, образуют ковалентную ацильную связь с активным центром транспептидазы и необратимо ингибируют ее (рисунок 1.1.1). Активный центр транспептидазного домена содержит несколько строго консервативных мотивов: SerxxLys – где Ser и Lys каталитические остатки, SerxAsn – где Ser участвует в финальной передаче протона на субстрат, а Asn находится на верхней петле каталитического кармана, LysThrGly(Thr/Ser) – отвечают за расположение пептидной цепи пептидогликана во время реакции (Goffin, 2002). Первая реакция – это активация серина передачей протона на лизин и нуклеофильная атака серина на карбонильный углерод пептида D-Ala-D-Ala или β -лактамного кольца в случае реакции с β -лактамным антибиотиком. Исследователи сходятся во мнении, что каталитический лизин в данном случае должен быть депротонирован, чтобы принять протон серина (Gordon, 2000; Lim, 2002; Nicola, 2005; Macheboeuf, 2006; Sauvage, 2008; Sauvage, 2007). Однако механизм депротонирования данного лизина неизвестен. Вблизи активного центра нет аминокислотных остатков с боковыми цепями, способных протонироваться. Единственная акцепторная группа для протона находится на самом пептидогликане/антибиотике. Лизин третьего мотива, наоборот, находится в протонированном состоянии, чтобы лучше фиксировать C-конец пептида D-Ala-D-Ala или консервативную карбоксильную группу β -лактама (Paetzel, 1997; Lee, 2007).

Как уже отмечалось, ингибирование ферментов транспептидаз PBP β -лактамными антибиотиками приводит к нарушению формирования клеточной стенки бактерий и их гибели. Однако после разрушения клеточной стенки бактерия может не умереть. В таком случае из патогенных бактерий образуются L-формы (Kawai, 2019).

L-формы – это бактерии, частично или полностью лишённые клеточной стенки, но сохранившие способность к развитию. Они могут возникать спонтанно или индуцированно под действием препаратов, разрушающих бактериальную клеточную стенку, в том числе β -лактамных антибиотиков, а также под воздействием ультрафиолетовых и рентгеновских лучей (Errington, 2013). L-формы не способны к

полноценному клеточному делению и обладают пониженным уровнем метаболической активности по сравнению с исходными бактериями.

Разделяют стабильные и нестабильные L-формы в зависимости от полного отсутствия или существования каких-либо следов клеточной стенки. Если у бактерии L-формы не наблюдаются следы бывшей клеточной стенки, то она считается стабильной, так как не может восстановить первоначальную форму бактерии. Если у бактерии L-формы наблюдаются фрагменты клеточной стенки бактерии, то она имеет возможность восстановить свой исходный вид, снова стать вирулентной и вызвать, соответственно, рецидив заболевания (Mickiewicz, 2019; Emami, 2023). Такой эффект может наблюдаться при нерациональном использовании антибиотиков. Например, при первичном приеме препарата может наступить кажущееся улучшение состояния больного, в связи с чем пациент прекращает назначенный прием препаратов и таким образом дает возможность нестабильной L-форме вернуться в исходное состояние (Petrovic, 2022). Можно сказать, что переход патогенной бактерии в L-форму – это способ переживания бактериями неблагоприятных условий и проявление резистентности к β -лактамным антибиотикам.

1.2. Классификация β -лактамных антибиотиков

В настоящее время β -лактамные антибиотики являются наиболее используемым классом антибактериальных средств в борьбе с инфекционными заболеваниями по всему миру. В российских больницах также большинство назначаемых антибактериальных препаратов содержали β -лактамы – 73,2%, 65,4% и 55,1% в 2015, 2017 и 2018 годах соответственно. Лидерами среди всех групп β -лактамов являлись цефалоспорины 3-го поколения (Rachina, 2020). Из статистики по потреблению антибактериальных средств в стационарах в России известно, что в период с 2017 по 2021 год наибольшую долю составляли цефалоспорины, хинолоны и пенициллины. Также отмечался рост потребления карбапенемов и снижение использования пенициллинов, тетрациклинов и амфениколов (Zakharenkov, 2022).

Структурно β -лактамные антибиотики имеют общую особенность – β -лактамное кольцо, обладающее высокой реакционной способностью. Данные препараты

подразделяют на четыре основных класса: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы и монобактамы (рисунок 1.1.1). Иногда выделяют пятый класс – пенемы, производные карбапенемов. Классификация основывается на химическом строении кольца, примыкающего к β -лактамному кольцу. В пенициллиновых антибиотиках β -лактамное кольцо соединено с пятичленным серосодержащим кольцом, в цефалоспориновых с шестичленным серосодержащим кольцом. В карбапенеме β -лактамное кольцо стыкуется с циклопентеновым кольцом, а в пенеме с 2,3-дигидротиофеновым фрагментом. У монобактамных антибиотиков ни одно кольцо не «сшито» с β -лактамной системой.

Считается, что липофильность β -лактамных антибиотиков благоприятствует действию на грамположительные бактерии, тогда как гидрофильность благоприятствует действию на грамотрицательные бактерии (Kheirloom, 1999; Tsuji, 1981).

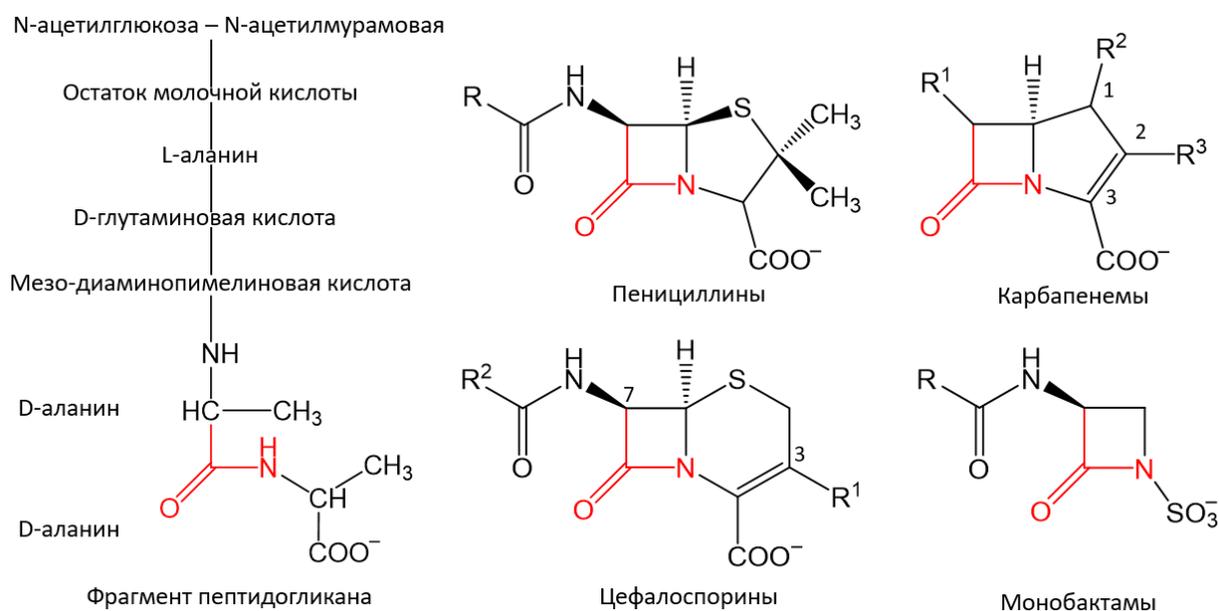


Рисунок 1.1.1. С-конец пептидогликана D-Ala-D-Ala и общие формулы классов β -лактамных антибиотиков: пенициллинов, цефалоспоринов, карбапенемов, монобактамов

Пенициллины

В первичной медико-санитарной помощи семейство пенициллинов является одной из наиболее ценных групп антибиотиков. Пенициллины первоначально получены из плесневых грибов *Penicillium*, в своей структуре содержат ядро из кольца

6-анинимопенициллановой кислоты. В данную группу входят природные пенициллины (в клинической практике используются только два очищенных соединения: пенициллин G и пенициллин V), аминопенициллины, карбоксипенициллины и уреидопенициллины.

Пенициллин G активен в отношении грамположительных бактерий (стафилококков, стрептококков и пневмококков) и *Bacillus anthracis*, тогда как грамотрицательные бактерии к нему устойчивы (Apriliana, 2023). Разработка синтетических пенициллинов в период после Второй мировой войны привела к открытию новых групп пенициллинов. Первый полусинтетический пенициллин – это активный против стафилококка метициллин. Он содержит объемный липофильный заместитель, обеспечивающий хорошую стабильность по отношению к пенициллиназам. В настоящее время для клинических целей метициллин не используется ввиду появления метициллин-резистентности к *Staphylococcus aureus* (Lakhundi, 2018). Аминопенициллины (амоксициллин или ампициллин) содержат аминогруппу в заместителе, что обеспечивает активность против грамотрицательных бактерий. Они являются пенициллинами расширенного спектра действия (Reeves, 1979). Уреидопенициллины являются производными ампициллина и пенициллинов, имеющих карбокси- или сульфоксигруппы в заместителе (Bush, 2000).

В последние годы появление устойчивых штаммов бактерий ограничило полезность монотерапии полусинтетических пенициллинов. Однако пенициллины активно назначаются в комбинации с ингибиторами β -лактамаз при локализованных инфекциях мягких тканей, инфекциях мочевыводящих путей и инфекциях дыхательных путей. Например, амоксициллин/клавулановая кислота при инфекции дыхательных путей или пиперациллин/тазобактам при грамотрицательных инфекциях. В качестве монотерапии ампициллин, амоксициллин, пенициллин G и пенициллин V активны против стрептококков, которые не продуцируют β -лактамазы (Schaar, 2014).

Цефалоспорины

Цефалоспорины содержат β -лактамное кольцо, которое соединено с 6-членным дигидротиазинным кольцом. Первые цефалоспорины были выделены в культурах

Cephalosporium acremonium (Newton, 1955). Прототипом этого класса является природный антибиотик цефалоспорин С, который проявляет некоторую активность в отношении устойчивых к пенициллину культур. На основе цефалоспориана С были созданы сотни новых цефалоспоринов (Newton, 1956), десятки из них были внедрены в клиническую практику (Abraham, 1987). Цефалоспорины часто подразделяют на пять поколений. В целом каждое новое поколение обладает более сильными грамтрицательными антимикробными свойствами, чем предыдущее поколение. Зачастую повышение антимикробных свойств к грамтрицательным микроорганизмам сопровождается снижением активности в отношении грамположительных бактерий. Однако классификация цефалоспоринов по поколениям не является универсальной для всего мира: например, антибиотик цефаклор считается препаратом первого поколения в Японии и второго поколения в США.

Цефалоспориновые антибиотики первого поколения (цефалоспорины I) более эффективны против грамположительных бактерий, однако они также действуют и против некоторых грамтрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis*). Цефалоспорины I в основном разработаны до 1980 года (Bryskier, 1994). На сегодняшний момент они подвергаются гидролизу многими β -лактамазами, появившимися после их внедрения в клиническую практику. Поэтому немногие из ранних цефалоспоринов продолжают использоваться. К ним относятся цефазолин, цефалотин, цефрадин, цефапирин, цефалексин и цефадроксил. Цефалоспорины I сохраняют высокую активность против стрептококков и метициллин-чувствительного *Staphylococcus aureus* (Giordano, 2006). Также они используются при лечении заболеваний костей, дыхательных путей, мочеполовых путей, желчевыводящих путей, инфекций кровотока, среднего отита и хирургической профилактики.

Основное различие между цефалоспориновыми антибиотиками первого и второго поколений заключается в природе группы атома C₃ (рисунок 1.1.1). Цефалоспорины второго поколения обладают зачастую более полярными заместителями. Благодаря этому они более эффективны против грамтрицательных бактерий, но менее эффективны против стафилококков по сравнению с цефалоспорином I. Цефалоспорины второго поколения часто назначают для лечения бронхоолита и пневмонии. Другие показания к назначению цефалоспоринов второго поколения аналогичны показаниям первого. В дополнение к грамтрицательным бактериям, на которые распространяются

цефалоспорины первого поколения, цефалоспорины II также действуют против *Haemophilus influenzae*, *Enterobacter aerogenes*, видов *Neisseria* и *Serratia marcescens*. К цефалоспоринам II относятся цефуроксим, цефпрозил, подгруппа цефамицинов (цефокситин, цефметазол и цефотетан). Наиболее популярным цефалоспорином II является цефуроксим, так как он эффективен против широкого спектра инфекций, вызванных грамположительными или грамотрицательными бактериями, хотя и его эффективность снизилась в ряде случаев ввиду появления β -лактамаз (Jacoby, 1990).

Цефалоспорины третьего поколения характеризуются более широким спектром действия к грамотрицательным бактериям, меньшей эффективностью по отношению к грамположительным патогенам и повышенной устойчивостью к β -лактамазам по сравнению с цефалоспоридами I и II (Klein, 1995). Однако количество сообщений о резистентности к цефалоспоридам III растет изо дня в день из-за их постоянного применения. За повышенную устойчивость к гидролизу β -лактамазами и за повышенную способность проникать через внешнюю клеточную оболочку грамотрицательных микроорганизмов в структуре цефалоспоринов III ответственен алкоксиимино-аминотиазолильный фрагмент в заместителе от атома C₇. Заместитель в положении C₃ больше отвечает за реакционную способность β -лактамного кольца и, следовательно, фармакокинетические свойства этих антибиотиков (рисунок 1.1.1) (Jacoby, 1991). К цефалоспоридам третьего поколения относятся цефдинир, цефотаксим, цефподоксим, цефоперазон, цефиксим, цефтазидим и цефтриаксон. Их применяют при абдоминальном сепсисе, остеомиелите, неонатальном сепсисе, гонорее, диссеминированной болезни Лайма и для лечения инфекций у пациентов с нейтропенией (Klein, 1995; Sileshi, 2016). Наиболее часто назначаемые препараты среди цефалоспоринов третьего поколения: цефотаксим, цефтриаксон и цефтазидим. Цефтазидим активен против высокоустойчивого микроорганизма *Pseudomonas aeruginosa*. Цефтриаксон и цефотаксим имеют интересную особенность – они могут проникать через гематоэнцефалический барьер и поражать бактерии в спинномозговой жидкости. Таким образом, цефтриаксон назначают для лечения менингита, вызванного *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* или *Streptococcus pneumoniae* (Durham, 2017; Ibrahim, 2020).

Цефалоспорины четвертого поколения в сравнении с цефалоспоридами третьего поколения обладают тем же спектром активности в отношении грамотрицательных бактерий, являются менее чувствительными к гидролизу β -лактамазами и имеют более

высокую активность в отношении грамположительных патогенов. Структурное различие между цефалоспоридами III и IV заключается в наличии четвертичной аммониевой группы в качестве заместителя при атоме C₃ (рисунок 1.1.1), что увеличивает полярность молекулы и обеспечивает ее более быструю диффузию через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий (Garau, 1997). Наиболее известными представителями этого класса являются полусинтетические антибиотики цефепим и цефпиром. Они, как и цефалоспорины III, способны преодолевать гематоэнцефалический барьер. Цефепим проявляет зависящий от концентрации антагонизм к β-аминомасляной кислоте, в связи с чем он был описан как нейротоксический агент (Payne, 2017). Также цефепим и цефпиром хорошо защищают от метициллин-чувствительного *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* и кишечных грамотрицательных палочек (Yahav, 2007; Barradell, 1994). Цефалоспорины IV в основном используются для лечения тяжелого внутрибольничного сепсиса, в котором известно или предполагается участие резистентных грамотрицательных возбудителей. Цефепим является антибиотиком широкого спектра действия – он высоко эффективен как против грамположительных, так и против грамотрицательных бактерий, его чаще применяют для лечения тяжелых внутрибольничных инфекций у пациентов, у которых могут быть микроорганизмы с множественной резистентностью (Pais, 2022; Zhu, 2018).

Цефалоспорины пятого поколения создавались как анти метициллин-резистентные к *Staphylococcus aureus*. Это поколение представлено цефтаролином и цефтобипролом, они хорошо защищают от грамположительных кокков и кишечных грамотрицательных палочек, за исключением продуцентов β-лактамаз расширенного спектра действия *Acinetobacter baumannii* и *Stenotrophomonas maltophilia* (Rosanova, 2019).

Карбапенемы

Карбапенемы структурно напоминают пенициллины с двойной связью между атомами C₂ и C₃ и замещением серы на углерод в тиазолидиновом кольце (рисунок 1.1.1). Наличие двойной связи в тиазолидиновом кольце обеспечивает большую химическую реактивность карбапенема по сравнению с пенициллинами и цефалоспоридами

(Dalhoff, 2003). Заместитель в положении R^1 здесь гидроксипропиловый остаток в стереоположении (S). Карбапенемы являются одним из наиболее важных классов β -лактамовых антибиотиков, так как карбапенемы могут выступать как медленные субстраты или ингибиторы β -лактамаз. Карбапенемы обладают широким спектром антибактериальной активности в отношении различных грамотрицательных и грамположительных патогенов (Papp-Wallace, 2011). Устойчивость к карбапенемам в основном встречается среди грамотрицательных бактерий и является серьезной проблемой здравоохранения.

Первым противомикробным препаратом в классе карбапенемов считается имипенем, который был получен как производное ингибитора β -лактамаз тиенамицина, выделенного из *Streptomyces tleya* (Dalhoff, 2003). Вторым карбапенемом, применяемым в клинической практике, был, конформационно ограниченный аналог имипенема, панипенем. И тиенамицин, и имипенем, и панипенем быстро метаболизируются под действием почечной дегидропептидазы-1, что повышает их нефротоксичность (Ню, 2019). Меропенем был первым устойчивым к гидролизу почечной дегидропептидазы-1 карбапенемом (Blumer, 1997). Структурно он отличается от предшественников наличием метильной группы при C_1 , которая, как считается, ответственна за метаболическую стабильность к дегидропептидазе-1. Меропенем является хорошо переносимым антибактериальным препаратом широкого спектра действия. Считается, что нейротоксичность карбапенемов зависит прежде всего от природы заместителя R^3 (Sunagawa, 1995; Norrby, 2000). Чем выше основность боковой цепи заместителя R^3 , тем выше тенденция к развитию нейротоксичности.

Иногда выделяют еще один класс β -лактамовых антибиотиков – пенемы. В отличие от карбапенемов, пенемы не встречаются в природе, они являются полностью синтезированными препаратами (Sammes, 1982). Структурно они представляют собой карбапенемы с замененным атомом углерода в тиазолиновом кольце на серу, как в пенициллинах. Заместитель в положении R^1 аналогичен карбапенемам. Основное различие между пенемами и карбапенемами заключается в природе боковой цепи R^3 , которая часто содержит циклопентаны с одним гетероатомом. Наиболее известными примерами являются фаропенем и сулопенем, они не подвергаются гидролизу β -лактамазами и обладают примерно одинаковой активностью (Hamilton-Miller, 2003).

Монобактамы

Монобактамы структурно состоят только из β -лактамного кольца (без какого-либо конденсированного), заместителей в положении R и у атома азота β -лактамного кольца (рисунок 1.1.1). Первые монобактамы были найдены в почвенных бактериях (Sykes, 1982), однако они обладали низкой антимикробной активностью. Первый монобактам, поступивший на фармацевтический рынок – азтреонам, является синтетическим соединением. Азтреонам имеет заместитель сульфогруппы на азоте β -лактамного кольца, а также метильный заместитель у углерода над азотом β -лактамного кольца. Азтреонам устойчив к β -лактамазам, обладает активностью против грамотрицательных бактерий и не обладает практически никакой активностью против грамположительных бактерий (Han, 2010; Kuriyama, 2014). Это является общей особенностью для монобактамов и их главным недостатком. В клинической практике азтреонам в основном назначают при серьезных инфекциях, вызванных грамотрицательными бактериями (Tiddens, 2004).

1.3. Резистентность к β -лактамным антибиотикам

В начале двадцатого века инфекционные заболевания были основной причиной смертности во всем мире. С внедрением пенициллина в клиническую практику стало возможным излечение от таких смертельных инфекционных заболеваний, как менингит, пневмония, туберкулез и т. д. Однако с самого начала антибиотикотерапии стала проявляться устойчивость к пенициллину у некоторых бактерий, что было признано потенциальной проблемой (Kong, 2010). Эдвард Абрахам и Эрнст Чейн в 1940 году обнаружили фермент пенициллиназу у устойчивых к пенициллину грамотрицательных палочек *E. coli*, но не обнаружили такой активности у чувствительного к пенициллину грамположительного *Staphylococcus aureus* (Abraham, 1940). В течение первого года после начала широкого применения пенициллина при лечении инфекционных заболеваний были выделены четыре штамма пенициллин-резистентных стафилококков

(Rammelkamp, 1942). Первоначальное увеличение резистентности к пенициллину было компенсировано повышением его дозировки. Однако всего через пять лет использования пенициллина в клинической практике большинство больничных изолятов *Staphylococcus aureus* стали устойчивы к пенициллину G и шести другим распространенным антибактериальным агентам, включая стрептомицин, тетрациклин и эритромицин (Finland, 1950). Вскоре появились сообщения о резистентности *Staphylococcus aureus* из многих больниц и лабораторий из разных стран мира, что вызвало волну обеспокоенности.

Резистентность к пенициллину заставила исследователей искать альтернативные пути лечения инфекционных заболеваний и привела к появлению β -лактамовых антибиотиков. Синтез полусинтетических метициллина и ампициллина, которые не подвергались гидролизу β -лактамазами, временно заменил неэффективный пенициллин, в частности против наиболее опасных грамотрицательных патогенов. Химики вносили небольшие изменения в структуру β -лактамовых антибиотиков и в итоге получили более ста антибактериальных препаратов. Однако в течение следующих 40 лет на рынке не появилось ни одного нового класса антибиотиков. Дело в том, что такой прорыв в разработке β -лактамовых антибиотиков казался окончательным решением вопроса антибактериальной резистентности. В связи с чем многие фармацевтические компании в 1980-х годах перевели фокус внимания с разработки новых антибиотиков на разработку лекарств от хронических заболеваний (Cohen, 2000) – из семнадцати компаний, производящих антибиотики, к концу XX века осталось только пять. Поэтому научному сообществу в дальнейшем пришлось вновь привлекать внимание к проблеме бактериальной резистентности. В последние годы во всех странах заметно вырос интерес к изучению антибиотиков и резистентности к ним. Во многом это произошло благодаря отчету об антимикробной резистентности экономиста Джима О'Неила 2016 года, в котором приводился прогноз экономических потерь к 2050 году при условии роста антибиотикорезистентности на уровне современных темпов. Утверждается, что глобальные потери мирового ВВП составят 8% или более 100 трлн. долларов, а количество преждевременно погибших людей достигнет 300 млн (O'Neill, 2016).

Одной из основных причин развития резистентности бактерий к антибиотикам является применение этих препаратов в ветеринарии и сельском хозяйстве. В частности, американские животноводы используют эти препараты в 10 раз чаще, чем врачи при

лечении людей (Sneeringer, 2015). Анализ мяса из обычных супермаркетов, контаминированного сальмонеллами, выявил устойчивость каждой четвертой бактерии к шести и более антимикробным препаратам.

Также на рост антибиотикорезистентности влияет активное применение дженерических препаратов. Дженерики не являются полностью идентичными оригинальным препаратам, а содержат те же концентрации активного вещества, однако вспомогательные вещества отличаются. В связи с этим усваиваемость активного вещества в дженериках зачастую оказывается ниже, чем в оригинальных. Низких доз лекарства бывает недостаточно для полного излечения от заболевания, не все патогенные бактерии погибают, некоторые бактерии повреждаются и могут переходить в нестабильные L-формы, которые восстанавливаются до полноценных вирулентных микроорганизмов после окончания применения антибиотика. Низкая концентрация антибиотика при лечении является одной из главных причин развития бактериальной устойчивости. Таким образом, несмотря на то, что на фармацевтическом рынке присутствует около 200 антибиотиков, медицина крайне нуждается в новых препаратах.

Современная устойчивость к антибиотикам с точки зрения микробиологии обладает несколькими особенностями. Во-первых, сейчас главными источниками инфекций являются именно грамотрицательные патогены, тогда как в 1950-1960-е годы основными возбудителями инфекционных болезней являлись грамположительные микроорганизмы. Во-вторых, эволюция устойчивости микроорганизмов к лекарственным препаратам приводит к тому, что бактерии проявляют множественную устойчивость, а не к одному классу антибиотиков, как это было раньше. В результате получают супербактерии, которые устойчивы ко всему имеющемуся в клинической практике арсеналу антибиотиков.

Бактериальная устойчивость к антибиотикам β -лактамной группы является серьезной проблемой в области антимикробной терапии. β -лактамы, включая пенициллины и цефалоспорины, являются широко используемыми антибиотиками, направленными на бактериальные инфекции путем нарушения синтеза клеточной стенки. Тем не менее бактерии разработали различные механизмы, чтобы противостоять действию β -лактамов, делая эти антибиотики менее эффективными или совсем бесполезными. Основными механизмами бактериальной резистентности к β -лактамам являются (рисунок 1.3.1):

1. Продукция ферментов β -лактамаз. Эти ферменты расщепляют β -лактамное кольцо в антибиотике, делая его неактивным и неспособным ингибировать синтез клеточной стенки. Некоторые бактерии производят β -лактамазы расширенного спектра (Extended-Spectrum Beta-Lactamase, ESBL), которые являются ферментами, способными инактивировать широкий спектр антибиотиков β -лактамной группы, включая пенициллины и цефалоспорины.
2. Изменение мишеней β -лактамных антибиотиков – мутации в РВР. Бактерии могут модифицировать РВР или приобретать измененные РВР. Эти измененные РВР могут хуже связываться с антибиотиками или быстро гидролизовать антибиотик при связывании и высвободиться от него, сводя тем самым время существования устойчивого ацил-фермента к минимальному. РВР, таким образом, приобретают признаки β -лактамаз. Это мешает антибиотикам эффективно ингибировать синтез клеточной стенки бактерий.
3. Сверхэксперсия или мутации эффлюксных насосов, которые активно выводят антибиотики изнутри клетки, снижая их концентрацию и эффективность (Fernández, 2012).
4. Снижение экспрессии генов, кодирующих порины. β -лактамы, а также тетрациклины, фторхинолоны и хлорамфеникол проникают во внутреннее пространство клетки через порины (Rice, 2012).

Возникновение мутаций в генах, кодирующих эффлюксные насосы, часто делает насос более эффективным при вытеснении антибиотиков из клетки. Например, известно, что замена Phe1018Leu в транспортере RND *Pseudomonas aeruginosa* повышала устойчивость опосредованную эффлюксным насосом MexXY к аминогликозидам, фторхинолонам и β -лактамному цефепиму (Vettoretti, 2009). Однако, так как сверхэксперсия эффлюксных насосов выгодна в присутствии антибиотиков, но при этом снижает приспособленность бактерий к окружающей среде (Sánchez, 2002), микроорганизмам необходимо, чтобы гены, кодирующие эффлюксные насосы, экспрессировались только при необходимости. Поэтому подавляющее большинство мутаций, влияющих на экспорт антибиотиков через системы оттока, происходит в генах, кодирующих белки с регуляторной функцией, а не кодирующих сами эффлюксные насосы.

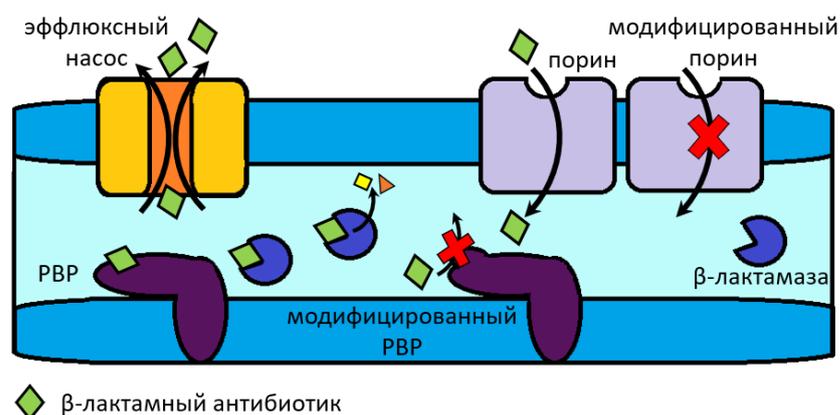


Рисунок 1.3.1. Схематичное представление четырех механизмов устойчивости к β-лактамам

Так как β-лактамы попадают в клетку через порины, то существует также вид устойчивости, контролируемый поринами. Регулируя экспрессию поринов, клетки в некоторой степени способны контролировать проницаемость своей мембраны для растворенных веществ. Так изменения экспрессии генов, кодирующих порины, способны привести к колоссальному повышению минимальных ингибирующих концентраций по отношению к таким β-лактамам как цефотаксим и цефокситин (Delcour, 2010). Также порины способны создавать избирательные по размеру молекулы и ее заряду каналы для диффузии. Таким образом, из-за специфичности каналов они имеют тенденцию ограничивать скорость диффузии определенных молекул, способствуя внутренней резистентности бактерии. Несмотря на то, что порины в бактериальной клетке не только участвуют во введении вещества, но также несут функции рецепторов для бактериоцинов, бактериофагов и элементов иммунной системы. Известны случаи исчезновения поринов с наружной мембраны бактериальной клетки. На сегодняшний день резистентность к антибиотикам в виде потери поринов идентифицирована для многих видов бактерий. В некоторых случаях устойчивые к антибиотикам штаммы демонстрируют полную потерю одного или нескольких поринов (Sanbongi, 2009).

Как уже отмечалось выше, резистентность к β-лактамам возникает по четырем механизмам: экспрессия ферментов β-лактамаз, модификация мишени, снижение клеточной проницаемости за счет мутаций поринов, избыточная экспрессия эффлюксных насосов. В бактериальной клетке работает несколько механизмов резистентности одновременно, и, таким образом, резистентность микроорганизма к определенному антибиотику является многофакторной и всегда определяется

комбинациями механизмов. Однако известно, что для β -лактамных антибиотиков устойчивость преимущественно возникает за счет продукции β -лактамаз, которая является наиболее распространенным механизмом резистентности у грамотрицательных бактерий, и продукции мутированного РВР с более низким сродством к β -лактамным антибиотикам, которая чаще возникает у грамположительных бактерий.

Первоначальное использование пенициллина было направлено против грамположительных патогенов. Однако пеницилиназы были обнаружены в грамотрицательной бактерии *E. coli* еще до первого применения пенициллина у человека. В дальнейшем β -лактамазы быстро приобрели клиническое значение, так как резистентность *Staphylococcus aureus*, возникающая в результате экспрессии пеницилиназы PC1 (Kirby, 1944), быстро снижала эффективность пенициллина. Несмотря на первоначальную важность PC1-опосредованной резистентности к пенициллину у грамположительных бактерий, со временем этот механизм был вытеснен. Через двадцать лет использования пенициллина были зарегистрированы первые клинические изоляты устойчивого к пенициллину *Streptococcus pneumoniae* (Dowson, 1989) и устойчивого к пенициллину/метициллину *Staphylococcus aureus*, которые проявляли резистентность, опосредованную низким сродством РВР (Hemmer, 1979). И сейчас основным механизмом резистентности у грамположительных патогенов является появление штаммов, несущих изменения в РВР (Fisher, 2016).

У грамотрицательных бактерий продукция β -лактамаз является основным механизмом устойчивости к β -лактамным антибиотикам. Первый фермент с β -лактамазной активностью был из *Bacillus coli* (Abraham, 1940), который теперь считается хромосомной цефалоспориной класса C, AmpC. Большую роль в распространении β -лактамаз играет плазмидный перенос. У грамположительных бактерий гены, кодирующие пеницилиназы, не были легко перенесены в другие виды бактерий. За исключением нескольких штаммов энтерококков, несущих ген стафилококковой пеницилиназы. У грамотрицательных бактерий, напротив, передача генетических элементов, кодирующих широкий спектр β -лактамаз, стал наиболее распространенным механизмом, приводящим к возникновению резистентности. Передача генов, кодирующих β -лактамазы, может осуществляться за счет транспозонов, генных кассет, интегронов, инсерционных последовательностей, но преимущественно за счет приобретения плазмид (Pfeifer, 2010; Mathers, 2016). Впервые перенесенные

β -лактамазы на плаزمидах были описаны в 1965 году (Datta, 1965): β -лактамазы были связаны либо с переносимой пенициллиназой – β -лактамазой класса А, TEM-1, либо с β -лактамазой, гидролизующей клоксациллин – β -лактамазой класса D, OXA.

Повышенная передача плазмид, кодирующих TEM, множеству грамотрицательных патогенов связана с запуском одного из наиболее продуктивных периодов разработки β -лактамов. В 1974 году сообщения о резистентности к ампициллину у пациентов с менингитом, инфицированных *Haemophilus influenzae*, привели к открытию, что эти штаммы продуцируют приобретенную β -лактамазу TEM-типа (Medeiros, 1975). В середине 1970-х годов ингибиторы и предполагаемые антибиотики против TEM оценивались на предмет антимикробной активности против нескольких известных на тот момент β -лактамаз и штаммов, продуцирующих β -лактамазы. Тесты проводились на TEM-1, AmpC и ферменте K1 класса А из *Klebsiella pneumoniae*. K1 является самой ранней β -лактамазой расширенного спектра действия. В результате в 1980-х годах FDA одобрило двадцать четыре новых β -лактамных препарата, пятнадцать из которых являлись цефалоспоридами (Powers, 2004). Помимо одобренных цефалоспоринов (цефотаксима, цефуроксима, цефтриаксона и цефтазидима), монобактама (азтреонама) и карбапенема (имипенема), были допущены к использованию в комбинации с антимикробными препаратами ингибиторы: клавулановая кислота и сульбактам (Bush, 2016).

В середине 1980-х произошли вспышки энтеробактерий ESBL, устойчивых к цефотаксиму или цефтазидиму (Sirot, 1988). Эти изоляты были способны гидролизовать цефалоспорины третьего поколения и β -лактамы расширенного спектра действия. Первоначально ESBL были получены из обычных β -лактамаз SHV-1, TEM-1 и отличались от родительских ферментов не более чем двумя-тремя аминокислотами (Bradford, 2001; Kliebe, 1985). Ранние изоляты с ESBL были устойчивы к пенициллинам и большинству цефалоспоринов, но чувствительны к известным комбинациям ингибиторов β -лактамаз, таким как амоксициллин/клавулановая кислота и пиперациллин/тазобактам. В результате избирательного использования этих ингибиторов появились резистентные к ним ферменты TEM (Xiang, 1994), за которыми последовали устойчивые к ингибиторам ферменты семейства SHV (Prinarakis, 1997).

За последнее десятилетие число распространенных вариантов TEM и SHV уменьшилось, однако появились их замены, например, ESBL CTX-M и GES. Появление ферментов CTX-M тесно связано с хромосомными β -лактамазами из *Kluyvera*

cryocrescens, в отличие от TEM и SHV, которые возникли из пенициллиназ, кодируемых плазмидами (Humeniuk, 2002; Poirel, 2002). Ферменты CTX-M проявляют резистентность к β -лактамному ингибитору тазобактаму, однако ингибируются клавулановой кислотой (Shen, 2017). Новые ферменты SHV ESBL все еще идентифицируются, в то время как новые варианты TEM практически не обнаруживаются. Впервые ферменты GES были описаны в 1998 году в изоляте *K. pneumoniae* во Французской Гвиане. Ферменты GES отличаются своей способностью приобретать одинарные или двойные аминокислотные замены, которые приводят к серьезным изменениям в функциональности. Например, такие единичные мутации расширяют спектр GES до карбапенемов, а замена Gly170Ser (GES-5) была связана как с усилением гидролиза антибиотика цефтолозана, так и со снижением ингибирования клавулановой кислотой и тазобактамом, хотя авибактам сохраняет свою активность (Poirel, 2019). β -лактамазы класса C также играют роль в устойчивости к цефалоспоринам и в меньшей степени к карбапенемам (Вou, 2000). Ферменты класса C даже с низкой скоростью гидролиза β -лактамов могут инактивировать достаточное количество антибиотика, чтобы вызвать резистентность, особенно у штаммов со сниженной проницаемостью или повышенным оттоком (Vu, 1985). К 1990 году на плазмидах начали появляться ферменты типа AmpC, которые могли свободно передаваться между разными видами, что способствовало развитию устойчивости к карбапенемам (Сао, 2000).

Ввиду роста резистентности к цефалоспоринам в клинической практике все чаще стали применять карбапенемы. Устойчивость к карбапенемам или альтернативным β -лактамсодержащим препаратам возникла вследствие множества факторов: изменение РВР у *Acinetobacter spp.* (Urban, 1995), появление β -лактамаз класса C, кодируемых плазмидами, вместе с дефицитом поринов у *Enterobacteriaceae* (Dahmen, 2012), а также продукцию хромосомных и плазмидно-кодируемых карбапенемаз (Bush, 2013). Карбапенемазы остаются основным механизмом устойчивости к карбапенемам у грамотрицательных бактерий. Первоначально они рассматривались как нетрадиционные, клинически незначимые цинксодержащие β -лактамазы, встречающиеся лишь в редких клинических изолятах *Stenotropomonas Maltophilia* (Cullmann, 1990) и в изолятах *Bacillus spp.*, которые нечасто вызывают нежелудочно-кишечные инфекции человека (Bottone, 2010). Плазмидно-кодируемые металло- β -лактамазы появились из семейств ферментов IMP (Watanabe, 1991) и VIM (Lauretти, 1999). Вспышки, связанные с этими

ферментами, были небольшими, ограниченными во времени и локализованными в определенных географических регионах (Chouchani, 2011; Breathnach, 2012). Однако ситуация изменилась, после идентификации цинксодержащей карбапенемазы NDM-1 (Yong, 2009). Металло- β -лактамаза NDM-1 быстро распространилась по всему миру. Особенную обеспокоенность вызывает широкое распространение гена blaNDM, который был идентифицирован в пробах воды из окружающей среды в Индии (Walsh, 2011).

Ферменты группы КРС являются сериновыми карбапенемазами. Они могут появиться практически у любого грамотрицательного возбудителя (Logan, 2017), хотя преимущественно они идентифицируются у *K. pneumoniae*. Появление КРС, кодируемых плазмидой, вскоре привело к крупным эпидемиям, вызванным продуцирующими карбапенемазы *Enterobacteriaceae* (Bradford, 2004). Микроорганизмы продуцирующие ферменты КРС связаны с высокими показателями смертности, достигающими 51% у пациентов с инфекциями, вызванными устойчивыми к колистину штаммами *K. pneumoniae* (Giacobbe, 2015). Фермент ОХА-48 первоначально идентифицирован как оксациллиназа класса D в Турции в 2001 году (Poirel, 2004). ОХА-48 медленно гидролизует карбапенемы и цефалоспорины расширенного спектра действия и плохо ингибируется большинством ингибиторов β -лактамаз, за исключением авибактама (Sader, 2018). Оксациллиназы класса D также часто обнаруживаются у *Acinetobacter spp.* и являются основной причиной устойчивости этих организмов к карбапенемам.

1.4. Классификация β -лактамаз

Довольно долго считалось, что β -лактамазы появились в качестве ответа бактерий на использование антибиотиков в клинической практике, однако на самом деле β -лактамазы являются древними ферментами, существовавшими даже в отсутствие терапевтических антибиотиков. Современные филогенетические анализы оценили возраст сериновых β -лактамаз более чем в 2 миллиарда лет (Hall, 2004), причем кодируемые плазмидами β -лактамазы появились миллионы лет назад (Barlow, 2002). Известен ряд исследований труднодоступных или ранее изолированных областей окружающей среды на наличие β -лактамаз или ферментов с похожими функциями. Во

время исследования пещеры Лечугилла в США, изолированной более 4 миллионов лет, было идентифицировано 93 штамма бактерий, 62% из которых способны гидролизовать β -лактамы (Bhullar, 2012). Однако не было идентифицировано никаких последовательностей известных β -лактамаз. В исследовании метагеномной ДНК из отложений вечной мерзлоты возрастом 30 000 лет в Канаде установлены аминокислотные последовательности с 53-84% идентичностью β -лактамаз группы TEM (Dcosta, 2011).

Названия β -лактамаз изначально присваивались практически случайным образом: на основе географического расположения изолятов (MGH – Massachusetts General Hospital, ОНЮ – Ohio), в честь людей (TEM – в честь пациента, предоставившего первый образец, Temoneira, PER – инициалы исследователей Patrice, Esthel и Roger), предпочтительные субстраты (IMI – имипенем, ОХА – оксациллин или FOX – цефокситин), генетическое расположение гена (СерА – хромосомная цефалоспориноаза *Bacteroides fragilis*, относящаяся к классу А; IBC – интегрон-переносимая цефалоспориноаза), род бактерий (SME – *Serratia marcescens enzymes*, КРС – *Klebsiella pneumoniae carbarpenemase*) или специфические биохимические свойства (L1 – лабильный фермент *Stenotropomonas maltophilia* и SHV – переменный сульфгидрильный реагент).

В настоящее время существует более 300 различных ферментов β -лактамаз, для многих из них существует большое количество близкородственных вариантов (www.bldb.eu (Naas, 2017)). Существует несколько вариантов классификации β -лактамаз, однако на данный момент наиболее полной и удобной является классификация на основе специфических мотивов аминокислотной последовательности или классификация по Амблеру (Ambler, 1980). Согласно этой классификации, β -лактамазы подразделяются на четыре класса А, В, С и D. Классы А, С и D являются сериновыми лактамазами, то есть они используют серин-опосредованный механизм гидролиза. Металло- β -лактамазы относятся к классу В и содержат в активном центре один или два катиона цинка, необходимых для осуществления гидролитической реакции.

Несмотря на гомологию последовательностей менее 20% среди различных сериновых β -лактамаз, некоторые структурные мотивы являются строго консервативными в пределах классов А, С, и D. К таким структурным мотивам относятся SerxxLys – где Ser и Lys каталитические остатки, Ser(y)xAsn – серин участвующий в реакции и аспарагин верхней петли каталитического кармана, и LysThr(Ser)Gly, который помогает располагать субстрат в активном центре. Эти консервативные мотивы очень

близки к аналогичным в РВР, так как β -лактамазы эволюционно связаны с РВР (Massova, 1998). Механизм гидролиза β -лактамом протекает до некоторой степени одинаково в РВР и сериновых β -лактамазах. Обе группы имеют каталитические остатки серина и лизина, в ходе реакции серин активизируется и совершает нуклеофильную атаку на карбонильный фрагмент β -лактамного кольца, в результате чего образуется комплекс ацил-фермента. В случае реакции антибиотика с РВР образующийся ацил-фермент является долгоживущим комплексом особенно в сравнении с временем жизни клетки. Показано, что время полураспада ацил-ферментов варьируется от 9 минут для *Pseudomonas aeruginosa* РВР2 с азтреонамом (Shapiro, 2014) до суток для нитроцефина с РВР2а из *Staphylococcus aureus* (Lemaire, 2008). В случае реакции антибиотика с сериновой β -лактамазой полученный ацил-фермент быстро деацилируется, что приводит к регенерации фермента и полной инактивации антибиотика.

Разница в протекании стадии деацилирования в ацил-ферментах РВР и β -лактамаз является определяющей их функциональные возможности в реакциях с β -лактамными антибиотиками. Эволюционный процесс для ряда РВР позволяет сократить эту разницу. Некоторые РВР смогли эволюционировать так, чтобы приблизить свою функциональность к сериновым β -лактамазам (Scothorne, 1985). Например, скорость деацилирования цефотаксима в 70-80 раз выше для мутантов РВР2 из *Streptococcus pneumoniae*, чем для фермента дикого типа (Lu, 2001). Эволюция РВР не всегда связана с изменением стадии деацилирования. В ряде случаев РВР изменяют свою структуру так, чтобы понизить сродство к антибиотикам или увеличить скорость реакции в целом. Например, в *N. gonorrhoeae* фермент РВР2, ответственный за реакцию транспептидации, является основной мишенью для цефалоспоринов (Barbour, 1981). Известны дикий тип РВР2 из штамма FA19 и мутантные РВР2 из штаммов 35/02 и H041. РВР2 из штамма 35/02 (РВР2^{35/02}) содержит 57 аминокислотных замен по сравнению с РВР2 из штамма FA19 (РВР2^{FA19}). Согласно экспериментальным данным по мутагенезу три из этих замен Ile312Met, Val316Thr и Gly545Ser в основном ответственны за устойчивость к цефалоспорином расширенного спектра действия (Tomberg, 2010). РВР2 из штамма H041 (РВР2^{H041}) содержит 61 аминокислотную мутацию по сравнению с диким типом (Ohnishi, 2011), 13 из них отличаются от мутаций в ранее известном РВР2^{35/02}. Три из мутаций в РВР2^{H041} Ala311Val, Val316Pro и Thr483Ser в основном ответственны за устойчивость к цефтриаксону и цефиксиму (Tomberg, 2013). Цефтриаксон на данный момент является

единственным препаратом против гонореи, во многих странах он используется уже в виде монотерапии, так как резистентность к цеффиксиму сильно возросла в последние годы. Константа эффективности (k_2/K_S) PBP2^{35/02} и PBP2^{H041} в реакции с цефтриаксоном уменьшается в 150 и 2300 раз по сравнению с PBP2^{FA19} (Singh, 2020). Константа эффективности, k_2/K_S , представляет собой отношение константы скорости, k_2 , образования ковалентного комплекса PBP2-цефтриаксон и термодинамической константы его диссоциации, K_S . Индивидуальный вклад этих двух констант был косвенно определен только для PBP2 дикого штамма с мутацией каталитического остатка Ser на Ala методом изотермической титрационной калориметрии. Для PBP2 из мутантных штаммов не удалось определить K_S из-за слабого связывания цефтриаксона (Singh, 2020). Недавние ЯМР-исследования показали, что увеличения значения K_S и, следовательно, уменьшение сродства к антибиотикам, связано с изменением конформации петли β_3 - β_4 (Fenton, 2021). Таким образом, остается неясным, обусловлены ли изменения k_2/K_S PBP2 из штаммов FA19 и мутантов изменениями константы скорости ацилирования или только константы диссоциации. Эта задача рассматривается в данной работе с помощью методов молекулярного моделирования.

Совершенствование процесса деацилирования в эволюционном пути от PBP к сериновым β -лактамазам достигалось не только за счет введение точечных мутаций, но и за счет добавления новых структурных элементов. Так, класс А β -лактамаз со временем приобрел такой структурный элемент как Ω -петля, который содержит строго консервативный остаток Glu166, непосредственно участвующий в активации молекулы воды на стадии деацилирования. А в классе С β -лактамаз реакции деацилирования способствует азот инактивированного β -лактамного кольца и Tyr150.

Помимо усовершенствования стадии деацилирования новые β -лактамазы должны были функционально отделиться от своих родительских PBP, чтобы наиболее эффективно выполнять свою функцию инактивации антибиотиков и, следовательно, не связываться с пептидогликаном. Таким образом, эволюция и отбор включили в структуры β -лактамаз новые элементы, препятствующие взаимодействию с пептидогликаном. Например, при сравнении структуры комплекса DD-пептидазы-транспептидазы из *Streptomyces sp.*, отвечающей за сшивание нитей пептидогликана на последнем этапе сборки клеточной стенки, со структурами β -лактамаз класса А и С оказалось, что в β -лактамазах в место связывания второй цепи пептидогликана в DD-пептидазы-

транспептидазы вставлена петля H10 (Lobkovsky, 1993). Анализ эволюции β -лактамаз показал, что непосредственные предшественники РВР, которые дали начало каждому из классов β -лактамаз, были отдельными белками (Massova, 1998).

Металло- β -лактамазы, составляющие класс В, эволюционно не связаны с РВР. Они являются членами древнего и широко распространенного суперсемейства металлогидролаз. Эти ферменты преимущественно обнаружены у прокариот и действуют на широкий ряд субстратов: от низкомолекулярных структур по типу фосфонатов до нуклеиновых кислот (Vebrone, 2007; Baier, 2014). Также эти ферменты обнаружены и у высших эукариот, где они участвуют в путях репарации ДНК и процессинга РНК (Pettinati, 2016). Металло- β -лактамазы различаются мотивом, образующим центр связывания с ионами цинка. Этот центр расположен на границе двух β -листов. Предполагается, что складка этих двух β -листов первоначально возникла в результате дупликации предкового домена (Palzkill, 2013).

В механизмах инактивации β -лактамных антибиотиков для всех классов β -лактамаз отсутствует единая симметрия. То есть каталитические механизмы этих ферментов на стадиях ацилирования и деацилирования различны (в отличие, например, от сериновых протеаз). Два каталитических этапа развились в ответ на различное давление отбора в разные моменты эволюции.

β -лактамазы класса А

Ферменты класса А включают наиболее широко распространенные и интенсивно изучаемые из всех β -лактамаз. На данный момент известно о 151 представителе данного класса. Наиболее яркими представителями являются – лактамаза PC1, ответственная за резистентность у грамположительных микроорганизмов; TEM, первая плазмидная β -лактамаза, идентифицированная у грамотрицательных бактерий; SHV, сульфгидрильный вариант TEM; CTX-M, широко распространенные ESBL у *Enterobacteriaceae*; KPC, карбапенемаза из *Klebsiella pneumoniae*; GES, наиболее распространенная на сегодняшний день группа ESBL и др. Выделяются высоко консервативные элементы: тетрада Ser70xxLys73, триада Ser130Asp131Asn132 и триада Lys234(Thr/Ser235)Gly236.

Большинство остатков активного центра сохраняются во всех ферментах: Ser70, Lys73, Glu166, Asn170 и триада Ser130Asp131Asn132. Структура активных сайтов также была высоко консервативной, – сохраняются Ω - и SDN-петли, однако их объем значительно различался (Pereira, 2018).

Несмотря на большое количество экспериментальных и расчетных исследований механизма реакции в активном центре β -лактамаз класса А, единого мнения об активации каталитического серина на данный момент нет. Существуют две гипотезы активации нуклеофильного серина: согласно первой гипотезе, активирует серин лизин, который предварительно передает протон на имеющуюся рядом карбоксильную группу Glu166; согласно второй, активация серина происходит через молекулу воды, которая предварительно отдает свой протон Glu166.

β -лактамазы класса В

Все металло- β -лактамазы относятся к классу В и в их гидролитическом механизме участвуют один или два двухвалентных иона цинка. Класс В подразделяется на три подкласса В1, В2, В3 на основании различий в аминокислотной последовательности в координационных сферах ионов цинка (Palzkill, 2013). Между подклассами идентичность последовательностей составляет менее 20% (Garau, 2004). К подклассу В1 относятся металло- β -лактамазы BcII, CcrA, BlaB, SPM, IMP, NDM, VIM и др. Они содержат в активном центре два катиона цинка. Координационная сфера Zn1 состоит из аминокислотных остатков His116, His118 и His196, а Zn2 – Asp120, Cys221 и His263. Состав координационных сфер является строго консервативным внутри подкласса. К подклассу В2 относятся CphA, Sfh-1, ImiS, и они имеют следующую последовательности в областях связывания с цинком: Asn116, His118, His196 и Asp120, Cys221 и His263 (Garau, 2005). Здесь в области связывания Zn1 произошла замена аминокислотного остатка 116, что привело к тому, что для реакции ион цинка не может связываться в этой области – связывание второго цинка в ферментах В2 ингибирует катализ. Ферменты подкласса В3 имеют следующую последовательность в областях связывания с цинками:

Zn1 – His/Gly116, His118, His196 и Zn2 – Asp120, His121, His262. К данному подклассу относятся L1, FEZ, BJP, AIM, GOB, SMB, CRB, CAU и др. (Boyd, 2020).

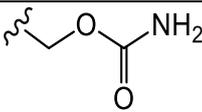
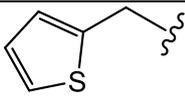
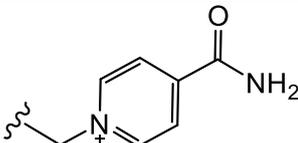
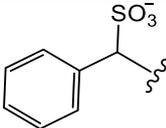
Подклассы металло- β -лактамаз различаются в своих каталитических свойствах. В реакциях ферментов B1 и B3 участвуют два иона цинка и эти ферменты являются наиболее активными и имеют широкий субстратный профиль, в то время как β -лактамазы подкласса B2 содержат один цинк в активном центре и характеризуются узким спектром субстратов, направленным на гидролиз карбапенемов (Wommer, 2002). Говоря о металло- β -лактамазах в целом, можно сказать, что они гидролизуют все доступные β -лактамные антибиотики, за исключением монобактамов (Marshall, 2017). И вне зависимости от подкласса они не ингибируются клавулановой кислотой, сульбактамом, тазобактамом, авибактамом и сульфонами пенициллановой кислоты.

Механизм реакции металло- β -лактамазы L1 с цефалоспоринами является решенной задачей благодаря экспериментальным исследованиям с детектированием интермедиатов реакции УФ-видимой спектроскопией с временным разрешением в методе остановленной струи, в сочетании с работами по молекулярному моделированию в этой области. В бидинковых металло- β -лактамазах между ионами цинка находится мостиковый лиганд – гидроксид-анион (Wang, 1999). Он же является нуклеофильной частицей, совершающей атаку на карбонильный углерод β -лактамного кольца цефалоспоринов. На второй стадии реакции происходит разрыв ковалентной связи углерод-азот β -лактамного кольца и перенос протона от бывшего гидроксид-аниона на каталитический остаток аспарагиновой кислоты. Последняя стадия включает в себя перенос протона с каталитического остатка аспарагиновой кислоты на атом азота субстрата с сопутствующим разрывом координационной связи между азотом и цинком.

Известно, что *Stenotropomonas maltophilia* является патогеном с множественной лекарственной устойчивостью у людей с ослабленным иммунитетом (Brooke, 2012), она содержит металло- β -лактамазу L1. Фермент L1 отличается от остальных металло- β -лактамаз тем, что имеет четыре идентичные субъединицы и является устойчивым почти ко всем β -лактамам (Denton, 1998). Для того чтобы изучить механизм реакции на атомном уровне, нужно как можно больше экспериментальных данных о кинетике реакции. Фермент L1 является одним из немногих ферментов, для которых механизм реакции был изучен с помощью УФ-видимой спектроскопией с временным разрешением в методе остановленной струи, который позволяет делать выводы о скоростях реакций отдельных

стадий (McManus-Munoz, 1999; Wang, 1998). Экспериментально и с применением методов молекулярного моделирования (Khrenova, 2018) был изучен механизм реакции в активном центре металло- β -лактамазы L1 с окрашенным субстратом цефалоспоринового ряда, нитроцефином. Поэтому данная система была выбрана для подбора расчетного метода. В эксперименте образование продукта (гидролизированный нитроцефин) и истощение субстрата (нитроцефин) контролировали при длине волны 485 и 390 нм соответственно. Наблюдалось накапливание второго интермедиата реакции при 665 нм. В результате константа скорости образования продукта равна $38 \pm 2 \text{ с}^{-1}$, а константа скорости образования второго интермедиата равна $190 \pm 3 \text{ с}^{-1}$. В пересчете на энергии: энергия активации лимитирующей стадии процесса равна 15,3 ккал/моль, а образования интермедиата реакции 14,3 ккал/моль. Соответственно, выбор метода расчета реакции происходил путем сопоставления расчётных профилей реакции с экспериментальными данными. Известно, что, согласно установленному механизму реакции методами молекулярного моделирования, механизм состоит из вышеизложенных трех элементарных стадий. Последняя стадия включает в себя перенос протона с каталитического остатка аспарагиновой кислоты на атом азота субстрата, сопровождающийся разрывом координационной связи между азотом субстрата и ионом цинка. Данная стадия является лимитирующей, и ее константу скорости можно сравнивать с величиной k_{cat} стационарной кинетики Михаэлиса-Ментен. Поэтому ее детальный анализ позволит выявить электронно-плотностные факторы, влияющие на каталитическую активность фермента. В работе рассматривался набор цефалоспориновых антибиотиков в активном центре лимитирующей стадии их гидролиза металло- β -лактамазой L1 представленный в таблице 1.4.1.

Таблица 1.4.1. Исследуемые антибиотики и значения каталитических констант гидролиза в активном центре L1 металло- β -лактамазы (Crowder, 1998; Denton, 1998).

Название	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	R ¹	R ²
Цефокситин	1,1		 (-OCH ₃ у C7)
Цефсулодин	7,5		

CGP-17520	8,5		
Цефепим	15		
Нитроцефин	20		
Цефалоридин	28		
CGP-31523A	38		
Цефалоспорин С	62		
Цефотаксим	66		
Цефуроксим	80		

В течение многих лет после идентификации металло- β -лактамазы рассматривались как представляющие в первую очередь биохимический, а не клинический интерес. Однако ситуация изменилась после появления фермента подкласса В1 – NDM-1. Проблема в появлении NDM-1 заключается не только в его карбапенемазной активности и не ингибировании на тот момент известными ингибиторами β -лактамаз, но и в степени распространения на различных генетических мобильных элементах. Что привело к признанию гена blaNDM как «эпидемического гена» (Nordmann, 2011).

Механизм инактивации карбапенемов металло- β -лактамазами остается до конца не ясным по тем же причинам, по которым не ясны механизмы инактивации карбапенемов всеми остальными β -лактамазами – это способность пирролиновой кольцевой системы карбапенемов к таутомеризации (Tioni, 2008). Недавние исследования УФ-видимой спектроскопии (с использованием Zn(II) и Co(II)-замещенных ферментов), ЯМР и рентгеновской спектроскопии вместе с методами молекулярного моделирования продемонстрировали, что металло- β -лактамазы всех трех подклассов используют общий разветвленный механизм гидролиза карбапенемов. Он заключается в нуклеофильной атаке гидроксид-аниона на карбонильный фрагмент β -лактамного кольца с последующим его расщеплением и образованием делокализационного фрагмента C₂-C₃-N⁻, что приводит в дальнейшем к разветвлению механизма. Протонирование этого делокализационного фрагмента возможно либо на атом азота по типу реакции с цефалоспоринами, либо на атом C₂ из объемного растворителя (Lisa, 2017). Однако вопрос о приоритетности атома для протонирования в делокализованном фрагменте в ходе реакции остается открытым.

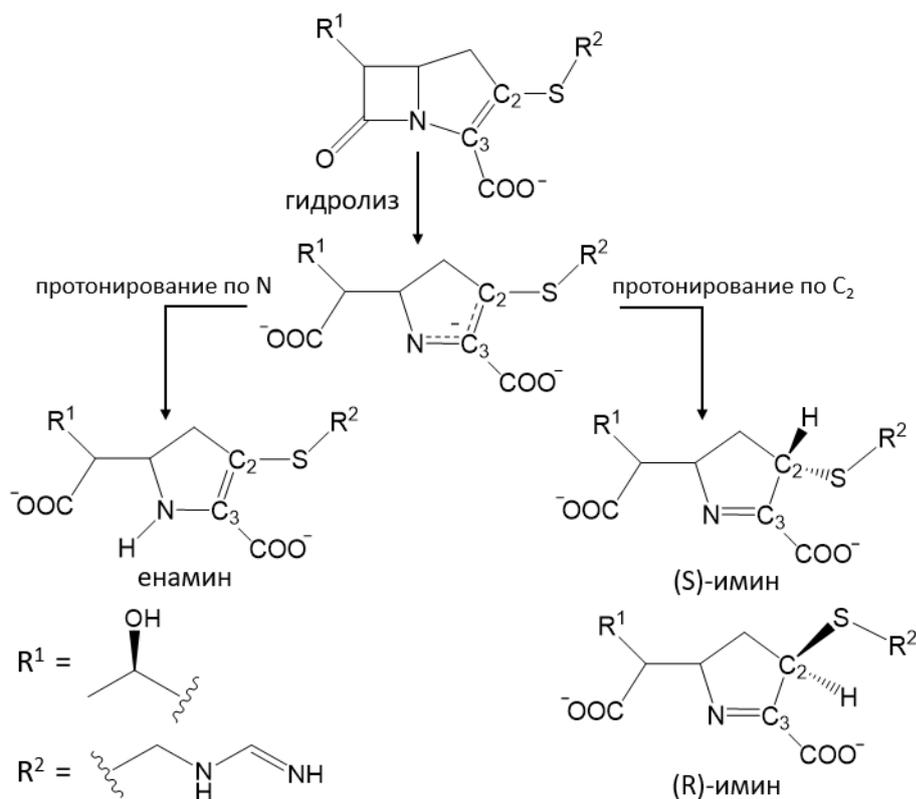


Рисунок 1.4.1. Схема механизма реакции гидролиза имипенема металло- β -лактамазами NDM-1 и L1

Согласно как экспериментальным, так и теоретическим данным, состав продукта зависит от конкретной структуры карбапенема и типа металло- β -лактамазы. Существует

ряд исследований, утверждающий, что в ряду металло- β -лактамаз, включая NDM-1 и L1, в результате реакции наблюдается продукт протонированный по углероду (Feng, 2017). Однако к единому мнению о наблюдаемых стереоизомерах исследователи не пришли. Ряд исследовательских групп основываясь на экспериментах ЯМР наблюдали преимущественно S стереоизомер (Feng, 2014; Lisa, 2017). Другие исследователи утверждают, что в время разрешенном ЯМР наблюдается образование R стереоизомера. При этом исследователи отмечают, что остается не ясным, как этот продукт образовывается: сразу в активном центре или же в результате быстрой таутомеризации из N-продукта в C-продукт при диффузии из активного центра (Lohans, 2019). Схема механизма реакции гидролиза имипенема металло- β -лактамазами NDM-1 и L1 из литературных данных представлена на рисунке 1.4.1. В данной работе исследованы механизмы реакции гидролиза антибиотика имипенема двумя металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 с последующим конформационным анализом гидролизованного имипенема в растворе.

β -лактамазы класса C

β -лактамазы класса C составляют обширную группу ферментов и обнаруживаются исключительно у грамотрицательных бактерий, особенно у *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter* (Chen, 1993). Наиболее известными являются: ACC-1 – устойчивый к оксиминоцефалоспорином фермент; ACT-1 – это первая плазмидно-опосредованная β -лактамаза типа AmpC; CMY – проявляет не характерную для всего класса C карбапенемазную активность. В классе C имеются три консервативных каталитических мотива – тетрада SerXSerLys и две триады TyrXAsn и LysThrGly (Bush, 2013).

Механизм реакции ферментов класса C остается не ясным до сегодняшнего дня. Причем нет определенности как с реакцией ацилирования, так и с реакцией деацилирования. Наиболее обоснованной гипотезой о процессе ацилирования в активном центре данных ферментов является утверждение, что лизин является основанием, активизирующим серин. Каким образом лизин депротонируется в активном центре не

ясно, но можно сделать предположение о передаче протона по цепочке аминокислотных остатков (Chen, 2009). Предлагается два варианта процесса деацилирования: активация воды на стадии деацилирования происходит за счет азота или за счет скоординированного переноса протонов между Lys67, Tyr150 и деацилирующей водой без прямого участия субстрата. На данный момент считается, что оба эти варианта возможны в зависимости от комбинации фермента и субстрата (Tripathi, 2016).

β-лактамазы класса D

Ферменты ОХА от названия их способности гидролизовать оксациллин составляют класс D β-лактамаз. В последнее время клиническое значение ферментов ОХА увеличилось, замечено распространение плазмидных цефалоспориназ и карбапенемаз. Известно о пяти группах карбапенемаз ферментов ОХА, четыре из них ОХА-23, ОХА-24/40, ОХА-51 и ОХА-58 связаны с резистентностью *Acinetobacter baumannii*.

В активном центре ОХА, как и в других классах сериновых β-лактамаз, находятся каталитические пары лизина и серина. Однако было показано, что лизин активного центра находится в карбоксилированном состоянии. Карбоксилирование лизина происходит в результате обратимой реакции с атмосферным углекислым газом (Golemi, 2001). Это весьма неожиданное открытие (до этого открытия карбоксилированные остатки лизина были известны только как компоненты белковых центров связывания металлов) предложило карбоксилированный лизин в качестве основания как для половин реакции ацилирования, так и для деацилирования.

Ферменты семейства ОХА характеризуются высоким разнообразием, поэтому неудивительно, что выделить единый механизм для реакции с карбапенемами вряд ли возможно. Анализ первой кристаллической структуры карбапенемазы группы ОХА (ОХА-24) показал наличие туннеля внутри активного центра между аминокислотными остатками Tyr112 и Met223 на разных сторонах каталитического кармана (Santillana, 2007). Эти остатки помогают ориентировать субстрат во время реакции между дорипенемом и ОХА-24 так, чтобы таутомерный фрагмент протонировался по атому азота.

1.5. Ингибиторы β -лактамаз

Первые ингибиторы β -лактамаз, ингибиторы первого поколения, имели β -лактамную природу – клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам. Клавулановая кислота – это ингибитор β -лактамаз широкого спектра действия, обладает активностью против β -лактамаз как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий (рисунок 1.5.1). Клавулановая кислота является молекулой природного происхождения, выделена из *Streptomyces clavuligerus* (Finlay, 2003). Поиск синтетических ингибиторов β -лактамов привел к появлению сульбактама и тазобактама. Оба соединения структурно являются пенициллиновыми сульфонами (рисунок 1.5.1). Все три вышеперечисленных ингибитора являются необратимыми ковалентными ингибиторами, более эффективными против β -лактамаз класса А, чем против β -лактамаз классов В, С и D (Drawz, 2010).

Следующее поколение ингибиторов имело не- β -лактамную природу. Из наиболее важных последних достижений в области поиска новых ингибиторов является введение диазабициклооктанонов (ДБО) (рисунок 1.5.1). Ингибитор авибактам является предшественником данной группы и первым попал в клинику в виде комбинации с цефтазидимом (Zhanel, 2013). Механизм ингибирования отличается от β -лактамных ингибиторов: первые ингибируют фермент необратимо, за ацилированием следует перегруппировка и фрагментация, а авибактам ацилирует активный центр сериновых β -лактамаз обратимо, деацилирование комплекса приводит к регенерации соединения, а не к гидролизу (Ehmann, 2012). Авибактам является мощным ингибитором β -лактамаз классов А и С. На основе авибактама был разработан ряд альтернативных ДБО, таких как релебактам (Blizzard, 2014), зидебактам (Livermore, 2017) и накубактам (Mallalieu, 2020). Релебактам, как и его предшественник авибактам, не подвергался деградации, в клинической практике его комбинируют с имипенемом и циластатином. Зидебактам ингибитор двойного действия, обладающий уникально высокой аффинностью связывания с грамотрицательным RBP2 и ингибирования β -лактамаз. Первая фаза клинических испытаний зидебактама завершена на данный момент. Накубактам, как и зидебактам, является ингибитором двойного действия: ингибитором сериновых β -лактамаз классов А и С и некоторых ферментов класса D, а также ингибитор RBP2 у *Enterobacteriaceae* (Mallalieu, 2020). Данный ингибитор рассматривается как отдельный

препарат для одновременного применения с цефепимом или азтреонамом, на данный момент находится на стадии клинических испытаний.

Соединения, содержащие в своей структуре атом бора, представляют собой перспективное направление для разработки ингибиторов β -лактамаз. Интерес к этим лекарственным средствам связан с их природой как кислот Льюиса, которые способны реагировать с рядом биологических нуклеофилов через их вакантную р-орбиталь. Таким образом, во время реакции в активном центре ферментов, нуклеофил взаимодействует с бором и образуется тетраэдрический интермедиат. Разработка циклических боронатов в качестве ингибиторов сериновых β -лактамаз широкого спектра действия (Hecker, 2015) привела к внедрению в клинику комбинации меропенема с циклическим боронатным ваборбактамом. Ваборбактам является сильным ингибитором β -лактамаз класса А, но не ингибирует ферменты ОХА или металло- β -лактамазы (Lomovskaya, 2017; Carcione, 2021).

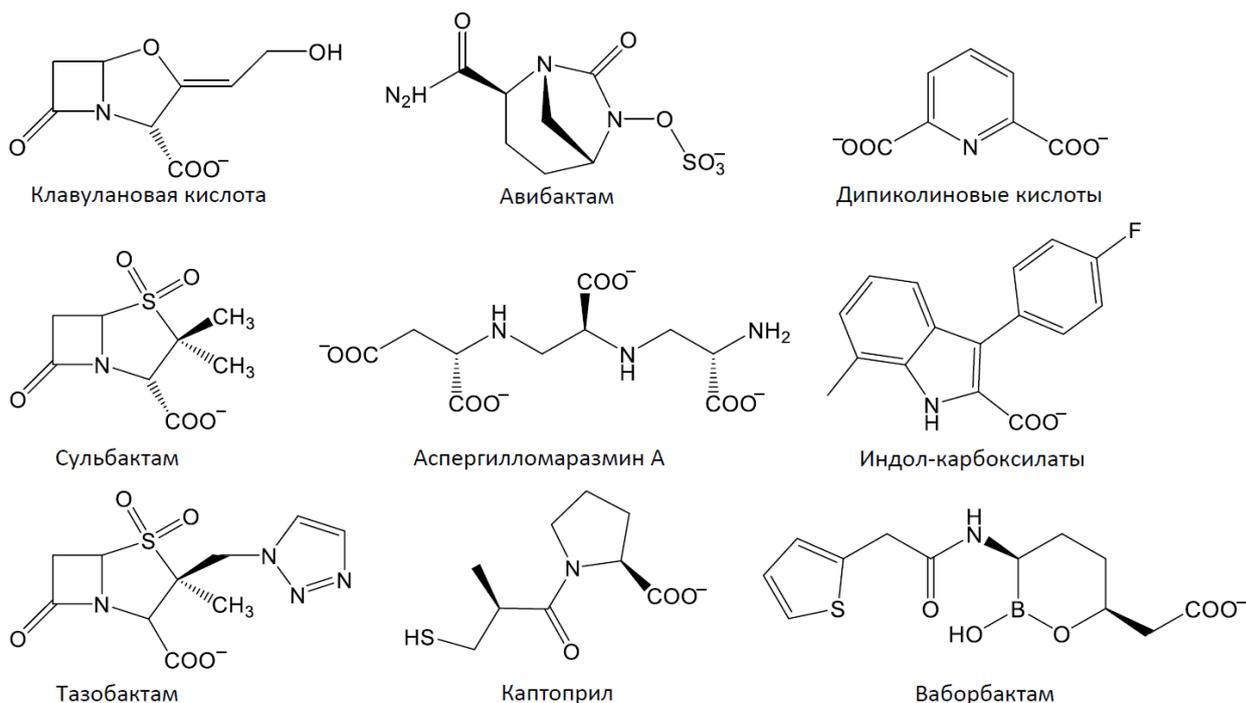


Рисунок 1.5.1. Известные ингибиторы β -лактамаз

Внедрение в клинику производных ДБО и боронового ингибитора ваборбактама расширило возможности лечения тяжелых инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями. Однако данные ингибиторы неэффективны против металло- β -лактамаз. Первые поиски ингибиторов металло- β -лактамаз были направлены на связывание или хелатирование ионов цинка (Ju, 2018). Природное соединение аспергилломаразмин А ингибирует металло- β -лактамазы семейств NDM-1 и VIM-2 путем удаления ионов цинка из активного центра. Ингибиторы, связывающиеся с ионами цинка в активном центре, по

химической природе чаще всего представляют собой тиолы или фосфонаты (Hinchliffe, 2018). Например, каптоприл – классический ингибитор ангиотензинпревращающего фермента (King, 2012). Производные дипиколиновой кислоты проявляют склонность к хелатированию ионов металлов и могут использоваться в качестве ингибитора NDM-1 (Chen, 2017). Индол-2-карбоксилаты являются сильными ингибиторами для металло- β -лактамаз. В активном центре индол-2-карбоксилаты имитируют β -лактамы (Brem, 2022). На сегодняшний день многообещающими ингибиторами металло- β -лактамаз являются боронаты. Бициклические боронаты являются перспективными соединениями для ингибирования всех классов β -лактамаз. Благодаря природе бора, ингибиторы на основе бора способны образовывать устойчивый тетраэдрический комплекс в активном центре β -лактамаз (Brem, 2016). На данный момент бициклический боронат ксеруборбактам (QPX7728) прошел клинические испытания. Однако недавно было продемонстрировано, что бициклические боронаты неэффективны против металло- β -лактамазы L1 (Calvoříña, 2017). Альтернативными могут оказаться бороновые ингибиторы, в которых атом бора не находится в цикле, а представляет собой бороновую кислоту. Например, соединения на основе бензо[b]тиофен-2-бороновой кислоты, которые показывают ингибирующую способность против карбапенемаз OXA, цефалоспоринов AmpC и металло- β -лактамаз, включая NDM-1 (рисунок 1.5.2) (Santucci, 2017; Linciano, 2019).

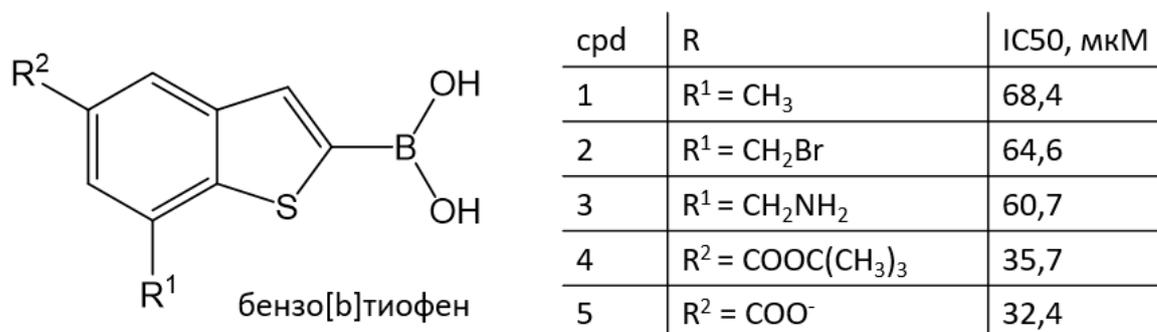


Рисунок 1.5.2. Общая схема ингибиторов на основе бороновой кислоты бензо[b]тиофена

Разработка и внедрение ингибиторов β -лактамаз представляют собой ключевое направление в борьбе с антибиотикорезистентностью. Для разработки новых ингибиторов и антибиотиков необходимо понимание механизмов реакции на молекулярном уровне.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Метод молекулярной механики

В процессе молекулярного моделирования молекулярные системы можно описывать с помощью классических методов – используя уравнения классической физики, или квантовых методов – используя уравнения квантовой механики. Подходы молекулярного моделирования варьируются в зависимости от конкретных целей и размеров объекта исследования. В представлениях классической физики молекулярная система рассматривается как совокупность материальных точек. В качестве материальных точек наименьшим элементом систем могут являться молекула или ее фрагмент в крупнозернистом моделировании или атом в атомистическом моделировании.

Полная энергия системы представляет собой сумму энергий отдельных взаимодействий. Под отдельными взаимодействиями подразумевается отдельное описание энергии для растяжений всех связей, изменений валентных углов, изменений значений торсионных углов, электростатических взаимодействий, Ван-дер-Ваальсовых и так далее. Набор таких уравнений, связывающих энергию системы с ее геометрией, называют силовым полем (Frenkel, 2002). В общем виде уравнение для энергии системы можно записать:

$$E_{total} = E_{stretch} + E_{bend} + E_{torsion} + E_{improper} + E_{vdW} + E_{electrostatic} + E_{other} \quad (2.1.1)$$

Здесь $E_{stretch}$ – это энергия растяжения всех связей системы, E_{bend} – энергия деформации валентных углов, $E_{torsion}$ – энергия деформации двугранных углов и $E_{improper}$ – энергия выведения атома из плоскости. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса, E_{vdW} , описываются согласно потенциалу Леннард-Джонса. Электростатические взаимодействия, $E_{electrostatic}$, законом Кулона. К последнему члену уравнения, E_{other} , относятся специфические, иногда учитываемые параметры, например, энергия водородных связей или поправка к энергии, которая отражает зависимость состояния одной связи или угла от состояния соседней связи. Более развернутое выражение для энергии системы в общем случае может быть записано так:

$$\begin{aligned}
E = & \sum_{stretch} k_d(d - d_0)^2 + \sum_{bend} k_\theta(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{torsion} k_\phi(1 + \cos(n\phi - \delta)) + \\
& + \sum_{improper} k_\chi(\chi - \chi_0)^2 + \sum_{vdW} \varepsilon_{AB} \left[\left(\frac{R_{min\ AB}}{R_{AB}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{R_{min\ AB}}{R_{AB}} \right)^6 \right] + \sum_{electrostatic} \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \frac{q_A q_B}{R_{AB}} + \\
& + E_{other}
\end{aligned} \tag{2.1.2}$$

Здесь d – длина связи, θ – величина валентного угла, ϕ – двугранного угла и χ – угла между связью с выходящим из плоскости атомом и плоскостью. Данные символы без нулевого индекса обозначают текущие параметры во время расчета, а с нулевым индексом обозначают равновесные значения. Равновесное значение угла между связью с выходящим из плоскости атомом и плоскостью для плоской структуры равно нулю. Силовые константы обозначены k с соответствующими индексами. В описании энергии изменения двугранного угла n и δ – кратность двугранного угла и его фаза. q_A и q_B – частичные заряды на атомах А и В, ε_0 – диэлектрическая проницаемость в законе Кулона. И в уравнении потенциала Леннард-Джонса ε_{AB} – параметр, означающий глубину потенциальной ямы, R_{AB} – расстояние между несвязанными атомами А и В, а R_{min} – расстояние между атомами А и В при минимальной потенциальной энергии (-ε).

На данный момент разработан широкий набор силовых полей. Силовые поля CHARMM (Best, 2012), AMBER (Maier, 2016), GROMOS (Oostenbrink, 2004) и OPLS (Kaminski, 2001) часто используются для описания белковых систем или нуклеиновых кислот. DREIDING находит свое применение в прогнозировании структур и динамики органических, биологических и неорганических молекул (Mayo, 1990). UFF – универсальное силовое поле, в котором параметры силового поля оцениваются с использованием общих правил, основанных только на элементе, его гибридизации и его связности (Rappé, 1992). Метод молекулярной механики часто используется для больших систем, таких как биомолекулы, так как является наименее вычислительно затратным.

2.2. Методы квантовой химии

Молекулярная система в квантовой химии уже представляет собой не совокупность материальных точек, связанных законами классической физики, а устойчивую систему ядер и электронов. В данных методах применяются уравнения квантовой механики, и энергия системы определяется из решения стационарного уравнения Шредингера:

$$\hat{H}\psi = E\psi \quad (2.2.1)$$

Где полная энергия молекулярной системы состоит из суммы кинетической энергии ядер, кинетической энергии электронов, потенциальной энергии межъядерных взаимодействий, потенциальной энергии взаимодействий ядер и электронов и потенциальной энергии электрон-электронного взаимодействия. Методы решения уравнения Шредингера в целом можно разделить на полуэмпирические и неэмпирические. Неэмпирические методы часто обозначаются как *ab initio* от латинского «с самого начала/из первых принципов», что означает расчеты без применения каких-либо экспериментальных данных. Одним из наиболее распространенных методов *ab initio* является метод Хартри Фока (HF). В данном методе представляется, что взаимодействие каждого электрона в атоме со всеми остальными электронами заменяется взаимодействием с неким усредненным самосогласованным полем, которое создается ядром и остальными электронами.

Наиболее часто применяется одно электронное приближение для описания электронной волновой функции. Волновая функция представляет собой определитель Слейтера, элементами которого являются молекулярные спин-орбитали. Каждая молекулярная орбиталь является линейной комбинацией базисных функций, в качестве которых, чаще всего, используются функции гауссова типа, центрированные на ядрах.

Большинство существующих методов начинаются с вычислений расчета HF, за которым следуют дальнейшие поправки на электрон-электронное отталкивание. К таким методам относятся: метод валентной связи, метод конфигурационного взаимодействия, метод связанных кластеров и др. Методы *ab initio* требуют огромного количества процессорного времени и памяти компьютера. Расчеты *ab initio* дают очень точные и качественные результаты, но их применение ограничено размером системы.

В полуэмпирических методах расчета выражения, описывающие электрон-электронное взаимодействие либо упрощаются, либо вообще полностью опускаются. Такая операция вызывает ошибки в расчете, чтобы их избежать, метод параметризуется путем подгонки по нескольким параметрам или числам, чтобы обеспечить наилучшее согласие с экспериментальными данными. Полуэмпирические расчеты намного быстрее расчетов *ab initio*, однако и намного менее точны. Точность результатов в полуэмпирических методах зависит от того есть ли похожая молекула в базе данных, используемой для параметризации метода, или нет.

Альтернативным квантовым методом описания системы является теория функционала плотности (Density Functional Theory, DFT), в которой полная энергия выражается через полную электронную плотность, а не через волновую функцию. В этом типе расчета имеется приближенный гамильтониан и приближенное выражение для полной электронной плотности. Согласно теореме Хоэнберга-Кона энергия электронной системы является функционалом ее электронной плотности и имеет минимум относящийся к основному состоянию системы (Hohenberg, 1964). В настоящее время при использовании метода DFT чаще используется вариант Кона-Шэма (Kohn, 1965), предполагающий применение молекулярных орбиталей и определителя Слейтера в качестве волновой функции, что подразумевает наличие $4N$ переменных для N -электронной системы. А электронная плотность определяется как квадрат волновой функции. Функционал электронной энергии системы можно записать так:

$$E_{\text{K-Ш}}[\rho] = T_{\text{K-Ш}}[\rho] + \int V_{\text{я}}(r)\rho(r)dr + \frac{1}{2} \int \int \frac{\rho(r)\rho(r')}{|r-r'|} drdr' + E_{xc}[\rho] \quad (2.2.2)$$

Первое слагаемое описывает часть кинетической энергии для орбиталей, описывающих невзаимодействующие электроны; второе – притяжения электронов к ядрам системы; третье – кулоновское межэлектронное отталкивание. Обменно-корреляционная энергия электронов $E_{xc}(\rho)$ определена как сумма поправок на кинетическую энергию и энергию взаимодействия электронов. Выражение для $E_{xc}(\rho)$ теоретически не определено явным образом, дальнейшие приближения метода Кона-Шэма связаны с различными способами аппроксимации обменно-корреляционного потенциала для разных задач.

Функционалы в методе DFT делятся на разные типы в зависимости от сложности описания обменно-корреляционной составляющей. Первым и наиболее простым подходом является приближение локальной плотности (Local Density Approximation,

LDA), в котором реализуется локальное применение модели однородного невырожденного газа невзаимодействующих электронов, находящихся во внешнем поле ядер. Идея метода заключается в том, что в формулы для однородного электронного газа подставляются значения электронной плотности реальной системы для соответствующих точек. Способ приближения, когда спиновые плотности не равны, называют приближением локальной спиновой плотности (Local Spin Density Approximation, LSDA). В данных методах обменно-корреляционный потенциал разделяется и отдельно рассматриваются корреляционный и обменный потенциалы. В приближении LSDA плотность корреляционной энергии на один электрон определяют численным квантовым методом Монте-Карло с последующей аппроксимацией полученного результата аналитической формулой. Плотность обменной энергии определяется следующим образом:

$$\varepsilon_x^{LSDA}[\rho] = -\frac{1}{2} C_x \rho^{\frac{1}{3}} \left[(1 + \zeta)^{\frac{4}{3}} + (1 - \zeta)^{\frac{4}{3}} \right], \quad (2.2.3)$$

где ζ – параметр спиновой поляризации, $C_x = \frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{1/3}$.

Однако электронная плотность в реальных молекулах не является однородной, поэтому модель однородного электронного газа не учитывает важные особенности электронной плотности молекулярных систем. В моделировании функционалами LDA происходит переоценивание силы связей вблизи равновесия. В связи с чем были разработаны функционалы обобщенного градиентного разложения плотности (Generalized Gradient Approximation, GGA) (Becke, 1988). Они основаны на LDA и зависят как от плотности, так и от того, насколько быстро плотность меняется локально. Таким образом, GGA учитывают тот факт, что электронная плотность молекулы не является пространственно однородной, что обычно приводит к более точному описанию связей. GGA функционалы были усовершенствованы – введен дополнительный учёт локальной плотности кинетической энергии. Такое приближение получило название мета-GGA (ТАО, 2003). Они более точно описывают ковалентные, металлические и слабые химические связи.

Другой более точный класс функционалов называется гибридным (Becke, 1993). В гибридных функционалах построение обменно-корреляционного функционала происходит с использованием концепции адиабатического включения межэлектронного взаимодействия:

$$E_{xc}(\lambda) = \int_0^1 \langle \psi_\lambda | V_{xc}(\lambda) | \psi_\lambda \rangle d\lambda, \quad (2.2.4)$$

где $V_{xc}(\lambda)$ описывает обмен и корреляцию в многоэлектронном гамильтониане. При $\lambda = 0$ взаимодействие между электронами отсутствует, следовательно, проявляется только обмен, который можно выразить обменным интегралом Хартри-Фока. Когда параметр λ принимает значение 1 происходит переход к реальной системе. Неизвестную часть обменно-корреляционной энергии взаимодействующих электронов, то есть при $\lambda = 1$, можно записать в приближении локальной плотности:

$$E_{xc} \approx \frac{1}{2} E_x^{X\Phi} + \frac{1}{2} (E_x^{LSDA} + E_c^{LSDA}) \quad (2.2.5)$$

В подобных функционалах эмпирически «смешиваются» различные способы для описания обмена и корреляции.

Показано, что для расчета механизмов ферментативных реакций функционалы GGA показывают недостоверные результаты с завышенными барьерами энергии. Для расчетов ферментативных реакций наилучшие результаты показывают двойные гибридные функционалы (Benighaus, 2008), однако их адекватное применение ограничено величиной активного центра, входящего в квантово-механическую часть системы. Для описания реакций в активном центре фермента часто используются именно гибридные функционалы. В целом, гибридные функционалы с дисперсионной поправкой в сочетании с базисом с поляризационными функциями на всех атомах 6-31G** показывают сопоставимые с экспериментальными данными результаты (Mardirossian, 2017; Kamp, 2020). Метод B3LYP и PBE0 зачастую применяются для описания реакций в активных центрах металло-ферментов. Однако существует ряд работ, показывающих ненадежность метода B3LYP для ферментативных реакций (Wappett, 2023).

Часть данной работы посвящена выбору наилучшего гибридного функционала для расчета реакции гидролиза хромогенного субстрата нитроцефина металло- β -лактамазой L1. Как отмечалось выше, для данной реакции есть достаточное количество экспериментальных данных, позволяющих проводить анализ расчетных методов. В данной работе рассматривались гибридные функционалы типа GGA, содержащие различный вклад точного хартри-фоковского обмена:

- Функционал PBE0 содержит 25% точной обменной энергии Хартри-Фока. Функционал обеспечивает хорошую точность вычислений и в настоящее время

является популярным функционалом, особенно для решения задач с макробиологическими молекулами (Adamo, 1999):

$$E_{xc}^{PBE0} = 0,25E_x^{X\Phi} + 0,75E_x^{PBE} + E_c^{mPW91} \quad (2.2.6)$$

- B3LYP, включающий 20% хартри-фоковского обмена, является наиболее популярным функционалом DFT для решения разного рода задач, в том числе касающихся ферментативных реакций (Becke, 1998):

$$E_{xc}^{B3LYP} = 0,2E_x^{X\Phi} + 0,8E_x^{LSDA} + 0,72E_x^{B88} + 0,81E_c^{LYP} + 0,19E_c^{VWN} \quad (2.2.7)$$

- BHHLYP – функционал, содержащий наибольший вклад точного хартри-фоковского обмена, 50% (Nakata, 2006):

$$E_{xc}^{BHHLYP} = 0,5E_x^{X\Phi} + 0,5E_x^{PBE} + E_c^{LYP} \quad (2.2.8)$$

2.3. Метод квантовой механики/молекулярной механики

При молекулярном моделировании таких крупных биологических молекул, как ферменты, всегда встает вопрос о наиболее корректном соотношении вычислительных затрат и точности воспроизводимых результатов. Ввиду ограниченности компьютерных ресурсов исследования таких крупных молекулярных систем неэмпирическими квантово-химическими методами на сегодняшний день невозможны. В таких случаях применяют гибридные методы, так называемые комбинированные методы квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) (Senn, 2009).

Идея метода состоит в разделении большой исследуемой системы на части. Одна часть как правило содержит до 200 атомов и описывается методами квантовой химии. Обычно в эту подсистему включают непосредственных участников химической реакции и влияющее на них ближайшее окружение. В ферментах в такую подсистему входит активный центр со всеми каталитическими остатками и их ближайшим окружением. Остальная часть системы, остаточная глобула фермента и сольватная оболочка, описывается методами молекулярной механики.

Полная энергия системы в методе КМ/ММ определяется следующим образом:

$$E = E_{\text{КМ}} + E_{\text{ММ}} + E_{\text{КМ/ММ}}, \quad (2.3.1)$$

где E_{KM} и E_{MM} – энергии квантово-механической и молекулярно-механической подсистем соответственно, $E_{\text{KM/MM}}$ – энергия взаимодействия КМ и ММ подсистем. Чаще всего для описания систем выбирается схема сложения энергий КМ и ММ частей и энергии, описывающей взаимодействие этих частей. Энергия взаимодействия подсистем может описываться несколькими методами в зависимости от используемой схемы внедрения. Существует метод механического внедрения, в данном случае электростатический вклад ММ атомов не рассматривается для расчета сил и энергии КМ части системы, для этого используется информация только об атомах в КМ части. Второй метод учитывает электростатическое поле, создаваемое ММ атомами на КМ часть системы, и называется схемой электростатического внедрения.

При использовании схемы электростатического внедрения задается определенное расстояние от КМ подсистемы, в пределах которого учитываются заряды ММ подсистемы. Также можно использовать или не использовать функцию сглаживания, которая применяется для того, чтобы избежать резкого спада электростатической силы. При использовании функции сглаживания учет электростатической силы будет уменьшаться постепенно. Обычно для расчетов в биологических системах используется именно схема электростатического внедрения, так как для исследования реакции в активном центре белка важно учитывать электростатическое поле, создаваемое белковой глобулой.

Так как граница между КМ и ММ подсистемами часто проходит по ковалентной связи, то эта связь для КМ части как бы разрывается и образуется свободная валентность на атоме из КМ части. Существуют различные методы для утилизации влияния этой свободной валентности. Часто используют метод связующих атомов – вдоль линии разорванной связи КМ и ММ помещается связующий атом, который учитывается только в КМ части и никак не влияет на расчет взаимодействий в ММ части системы. В качестве связующих атомов могут быть применены разные атомы, в том числе галогены и водород, чаще всего используется водород, так как он небольшой и не создает дополнительной поляризации связи. Как указано выше, связующие атомы располагаются близко или вдоль линии разорванной связи, а значит они всегда очень близко находятся к классическому атому, участвующему в КМ/ММ связи. В связи с чем учет частичных зарядов классических атомов, участвующих в связи КМ/ММ, требует дополнительной регулировки.

Ряд методов направлен на полное игнорирование частичного заряда ММ атома, связанного с КМ атомом, или игнорирования частичных зарядов не только ММ атома, непосредственного связывающегося с КМ атомом (MM^1), но и ММ атомов второго и третьего порядков связывания (атомы, связанные с ММ атомом, участвующим в связи (MM^2), и атомы, связанные с MM^2 атомами (MM^3)).

Другая часть методов связана с перераспределением частичного заряда. В методе перераспределения заряда и диполя (Redistributed Charge and Dipole, RCD) перераспределяется частичный заряд и дипольный момент атома MM^1 . Это делается путем создания «виртуальных» точечных зарядов в середине всех связей между атомами MM^1 и MM^2 , таким образом, что общий заряд области остается постоянным при аппроксимации дипольного момента связей. Аналогичный подход используется в методе сдвига заряда (Charge Shifting, CS). В этом случае частичный заряд MM^1 равномерно распределяется по атомам MM^2 , а вдоль направления связи MM^1 - MM^2 размещаются два виртуальных точечных заряда с разными знаками, один перед атомом MM^2 и один после. Этот метод также позволяет сохранить постоянный общий заряд области, пытаясь сохранить локальные диполи, образованные всеми связями MM^1 - MM^2 .

2.4. Анализ поверхности потенциальной энергии

Поверхность потенциальной энергии (ППЭ) – это многомерная поверхность, которая представляет собой зависимость энергии системы от координат. В классической механике ППЭ задается формулой 2.1.2. В квантовой механике применяется приближение Борна-Оппенгеймера, согласно которому считается, что так как ядра движутся медленнее электронов и имеют массу в тысячу раз большую, чем электроны, распределение электронов зависит от расположения ядер. Определенным координатам ядер системы соответствует определенная точка на поверхности потенциальной энергии этой системы. Значение потенциальной энергии системы складывается из значений кинетической энергии электронов, потенциальной энергии межъядерных, межэлектронных и электронно-ядерных взаимодействий.

Структура поверхности определяет характер и скорость перестройки конфигурации ядер – то есть химическую реакцию. На ППЭ есть минимумы и седловые точки между этими минимумами. Данные точки называются стационарными точками, их первые производные энергии по координатам равны нулю. Чем ниже минимум на ППЭ, тем более устойчива данная конфигурация ядер. Всегда есть один глобальный минимум, который отвечает самой устойчивой конфигурации ядер системы. Помимо глобального минимума на ППЭ может находиться некоторое количество локальных минимумов, которые также отвечают стабильным конфигурациям ядер, но с более высокими энергиями, чем в глобальном минимуме. Другой вид стационарных точек – седловые точки, соединяющие два минимума и являющиеся минимумами по всем направлениям, кроме одного, и максимумами по координате реакции. Разница в энергиях между седловой точкой и минимумом составляет высоту энергетического барьера перехода, то есть то, сколько понадобится затратить энергии системе, чтобы совершить этот переход. В седловой точке переходного состояния первые производные энергии по координатам равны нулю, вторые производные энергии положительны кроме одной. Эта одна отрицательная производная соответствует мнимой колебательной частоте, которая определяет координату реакции в седловой точке.

Известны различные подходы для поиска стационарных точек на ППЭ. Метод градиентного спуска (Steepest Descent) часто используется для предварительного уравнивания начальных координаты системы перед проведением моделирования. В данном методе используется только значение градиента в заданной точке. Метод сопряженных градиентов (Conjugate Gradients) комбинирует итерационные методы и метод градиентного спуска. В данном подходе используются данные о градиентах и предыдущих шагов. Он обладает лучшей сходимостью и используется для эффективного нахождения стационарных точек, недостатком метода считается необходимость хранить значение градиента предыдущего шага (Frenkel, 2002). Ньютоновские методы используют информацию не только градиентов, но и гессиана. Однако применение таких методов сопровождается высокими вычислительными затратами. Поэтому чаще всего для квантовых расчетов на практике используют квазиньютоновские методы, где гессиан оценивают не напрямую и не на каждом шаге. Наиболее часто в программах для квантово-химических расчетов реализован метод L-BFGS (Limited-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno) (Liu, 1989). L-BFGS использует оценку обратной матрицы гессиана для

управления поиском в пространстве переменных, L-BFGS хранит только несколько векторов, которые неявно представляют аппроксимацию.

2.5. Молекулярная динамика

В методе молекулярной динамики (МД) вводится понятие температуры, что позволяет описывать конформационное пространство по поверхности свободной энергии, то есть энергии Гиббса или Гельмгольца (Frenkel, 2002).

Метод МД основывается на интегрировании классического уравнения движения Ньютона. Из начальной геометрии и скорости рассчитываются силы, а сила это производная энергии по координатам (2.5.1), из чего высчитываются ускорения и скорости каждого атома, затем высчитываются новые координаты системы.

$$\frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2} = \frac{F_i}{m_i} ; F(x) = - \frac{\partial U}{\partial x} \quad (2.5.1)$$

В результате расчета молекулярной динамики происходит запись координат каждого шага интегрирования, что называется молекулярно-динамической траекторией. Интегрирование уравнения движения происходит численно: через определенный промежуток времени, называемый шагом интегрирования. Выбор шага интегрирования в моделировании является важным пунктом, так как слишком малый шаг дает анализ небольшого конформационного пространства, в котором невозможно изучить интересующий процесс. Слишком большой шаг может привести к неустойчивости моделирования. Шаг интегрирования следует выбирать на порядок меньше, чем самое быстрое движение в системе, которое будет наблюдаться. Некоторые процессы занимают следующее время: колебание связи – 1 фс, конформационные переходы – от 1 пс, ферментативный катализ – мкс-мс, связывание с лигандом – мкс-мс, сворачивание белка – мс-с. Для моделирования химических используется шаг интегрирования в 1 фс.

Дискретизацию дифференциальных уравнений можно осуществить путем разложения в ряды Тейлора, что позволяет описывать поведение молекулярной системы на каждом моменте времени. Наиболее популярным алгоритмом интегрирования уравнений движения является алгоритм Верле (Verlet 1967):

$$\begin{cases} \vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t) \cdot \Delta t + \frac{\vec{a}(t)}{2} \cdot \Delta t^2 + \frac{\vec{\ddot{r}}(t)}{3!} \cdot \Delta t^3 + O(\Delta t^4) \\ \vec{r}(t - \Delta t) = \vec{r}(t) - \vec{v}(t) \cdot \Delta t + \frac{\vec{a}(t)}{2} \cdot \Delta t^2 - \frac{\vec{\ddot{r}}(t)}{3!} \cdot \Delta t^3 + O(\Delta t^4) \\ m \cdot \vec{a}(t) = -\nabla U(t) \end{cases} \quad (2.5.2)$$

$$\vec{r}(t + \Delta t) = 2\vec{r}(t) - \vec{r}(t - \Delta t) + \vec{a}(t) \cdot \Delta t^2 + O(\Delta t^4) \quad (2.5.3)$$

$$\vec{v}(t) = \frac{\vec{r}(t+\Delta t) - \vec{r}(t-\Delta t)}{2 \cdot \Delta t} \quad (2.5.4)$$

В данном алгоритме вычисление следующих координат требует знание текущих и предыдущих координат и ускорения (2.5.3). Скорость в момент времени t вычисляется согласно 2.5.4, соответственно вычисление скорости отстает на шаг по сравнению с вычислением положений частиц. К достоинствам метода следует отнести то, что интегрирование алгоритмом Верле не требует знания о скоростях, расчет сил происходит один раз за интеграционный цикл, поддерживается обратимость во времени. К недостаткам метода можно отнести накопление ошибки в расчете скорости, которая имеет второй порядок, а также необходимость записывать координаты предыдущего шага для расчета следующего. Помимо основного алгоритма Верле есть его аналоги такие, как алгоритм Эйлера, алгоритм Leap Frog, скоростной алгоритм Верле и др. (Frenkel, 2002). Однако основной алгоритм Верле прост в реализации, и воспроизводит один цикл расчета за более короткое время, чем другие методы. Поэтому его часто выбирают для молекулярной динамики. В данной работе применяется алгоритм интегрирования Верле.

Существуют методы более высокого порядка, они основаны на схеме предиктор-корректор. Сначала рассчитываются координаты, скорости и ускорения в момент времени $t + \Delta t$, используя текущие значения этих величин. Затем оцениваются силы и ускорения для новых координат. После чего происходит корректировка предсказанных координат, скорости, ускорения и т. д., используя новые ускорения. Затем можно рассчитать любые интересные переменные.

Для расчета молекулярной динамики необходимо знать начальные координаты и скорости. Геометрические параметры обычно берутся из данных по рентгеноструктурному анализу или ЯМР спектроскопии. А начальные скорости задаются в соответствии с теоремой о равномерном распределении кинетической энергии по степеням свободы при термическом равновесии:

$$\langle E_{kin} \rangle = \frac{1}{2} (3N) k_B T \quad (2.5.5)$$

Из гауссова распределения скорость определяется: $\langle v_i^2 \rangle = \frac{k_B T}{m_i}$

Наборы конфигураций, получаемые в ходе расчетов методом молекулярной динамики, распределены в соответствии с некоторой статистической функцией распределения. Эргодическая гипотеза связывает средние по времени значения физических величин, характеризующих систему, с их средним статистическим значением. Макроскопические свойства всегда представляют собой средние по ансамблю в представительном статистическом ансамбле молекулярных систем. Статистический подход заключается в возможности определить вероятность нахождения системы в возможных микросостояниях, отвечающих данному ее макросостоянию. Статистический ансамбль характеризуется функцией распределения. Физический смысл функции распределения заключается в плотности вероятности распределения систем по микросостояниям в фазовом пространстве. Существуют разные ансамбли, которые представляют собой системы с разной степенью отделенности от окружающей среды: от полностью изолированных систем (микроканонического ансамбля, NVE) до полностью открытых (большого канонического ансамбля, μVT). Выбор ансамбля зависит от конкретной задачи, которую исследователь пытается решить, и условий, в которых рассматривается система.

В данной работе используется канонический ансамбль NPT, в котором постоянными остаются количество вещества, давление и температура. Ансамбль NPT хорошо подходит для моделирования химических реакций, которые обычно проводятся в лаборатории при постоянном давлении. Для поддержания постоянной температуры и давления используются термостаты и баростаты.

Целью термостатирования является поддержание скорости моделируемых частиц в приблизительном соответствии с температурой. Это имеет значение для моделирования терморегулируемого ансамбля, подразумевающего взаимодействие моделируемых частиц не только друг с другом, но и с «ванной». «Ванна» представляет собой виртуальный объект, физически не присутствующий в объеме моделирования, может оказывать некоторые силы, ускоряющие частицы, и поглощать некоторую энергию, замедляющую частицы. Термостаты различаются тем, как реализована «ванна» и взаимодействие системы с ней, и эти реализации по-разному влияют на систему.

В статистической механике температура системы связана со средней по времени кинетической энергией. Для сохранения температуры системы необходимо, чтобы

средняя кинетическая энергия была фиксирована, в то время как мгновенная может колебаться. Один из возможных способов изменить температуру системы так, чтобы она оставалась постоянной, – это масштабировать скорости. Это условие получается умножением скорости на масштабирующий коэффициент λ . Этот коэффициент высчитывается как квадратный корень из частного желаемой и реальной температуры. Если на временном шаге атомы движутся слишком быстро, то скорость умножается на $\lambda < 1$. Напротив, если скорость слишком мала, то умножается на число больше единицы, $\lambda > 1$. Это общая идея метода изменения масштаба скорости для основного алгоритма термостата. Однако масштабирование скоростей не воспроизводит правильный канонический ансамбль и такой алгоритм редко используется в молекулярной динамике.

Поэтому были разработаны другие термостаты, часть из которых основаны на том же принципе, но используют более сложные уравнения для масштабирующего коэффициента. Например, термостат Берендсена, принцип работы которого похож на масштабирование скоростей, но использует более сложный коэффициент. Термостат Андерсена основан на моделировании случайных столкновений, действующих на частицы системы, в конечном итоге изменяющих температуру системы. Термостат Нозе-Гувера принадлежит к другому классу методов, называемому расширенной системой. Этот термостат рассматривает ванну как дополнительную степень свободы. Фактически в моделировании присутствует дополнительная (виртуальная) частица или цепочка частиц. Конкретные уравнения движения для этой степени свободы могут различаться. Когда частицы моделирования толкают термостат слишком далеко, термостат отталкивает их назад и замедляет. Термостат Бюсси-Донадио-Парринелло, также известный как стохастическое изменение масштаба скорости, является расширением термостата Берендсена. Основная идея не заставлять кинетическую энергию точно равняться желаемому значению, а сделать масштабирование до значения кинетической энергии, которое стохастически выбирается из канонического равновесного распределения кинетической энергии. Идея термостата Ланжевена аналогична уравнению движения Ланжевена. Термостат ускоряет частицы случайной силой и вызывает трение скорости частиц: чем больше сила, тем больше трение. Случайная сила передает кинетическую энергию модели, а трение забирает кинетическую энергию из модели. В данной работе используется термостат Ланжевена, который хорошо воспроизводит канонический ансамбль (Hünenberger, 2005).

Идею аналогичную масштабированию скоростей в термостатировании применяют для реализации баростата, но для настройки давления масштабируется объем, а не скорости. Уменьшение размеров ячейки моделирования приводит к тому, что атомы сжимаются сильнее, и, следовательно, общее давление системы увеличивается и наоборот. Данная идея реализована в баростате Берендсена. Система представляется слабо связанной с баней высокого давления, объем которой масштабируется на определенный масштабирующий коэффициент. Данный баростат обычно используется только на этапе уравнивания системы. В отличие от баростата Берендсена, баростат Андерсена не ведет себя как аналогичный термостат. Баростат Андерсена представляет собой расширенный системный метод, такой же, как термостат Нозе-Гувера. Также в этом случае система соединена с ванной высокого давления, и связь достигается за счет включения дополнительной степени свободы в уравнения движения. Идея баростата Андерсена была далее развита Парринелло и Раманом, которые разработали аналогичный баростат. Основное отличие от предыдущего алгоритма состоит в том, что в данном случае изменяется не только размер, но и форма моделируемой ячейки. Баростат Парринелло-Рамана обычно связан с термостатом Нозе-Гувера для правильного воспроизведения статистического ансамбля. Используя эти два метода, можно проводить моделирование в рамках ансамбля NPT. Однако, как оказалось, уравнения движения Нозе-Гувера верны только в пределе больших систем. Чтобы решить эту проблему, Мартина-Такерман-Тобиас-Кляйн (МТТК) ввели уравнения движения, которые являются естественным продолжением цепного термостата Нозе-Гувера. Баростат Ланжевена создан на основе термостата Ланжевена. Уравнения движения напоминают уравнения МТТК, но вводятся дополнительная сила трения и стохастическая сила. В данной работе используется баростат Ланжевена.

Метод МД основывается на интегрировании классического уравнения движения Ньютона, выбор методов расчета сил в рамках МД зависит от конкретной задачи. Расчет сил можно проводить с помощью методов классической механики, методов квантовой химии или комбинированного подхода КМ/ММ (КМ/ММ МД).

Детали реализации расчетов МД и КМ/ММ

В данной работе проведен анализ гибридных функционалов B3LYP, PBE0 и BHHLYP с дисперсионной поправкой D3 в сочетании с базисным набором 6-31G** для описания динамики активного центра и расчета механизма реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 методом КМ/ММ МД. Для описания молекулярно-механической части молекулярно-динамических траекторий использовалось силовое поле CHARMM ввиду доступной реализации в программном пакете NAMD (Phillips, 2020) в сочетании с комплексом TeraChem, интегрированным для квантово-химических расчетов (Ufimtsev, 2009; Titov, 2013). Длина КМ/ММ МД траектории фермент-субстратных комплексов (ES) составляла 5 пс.

Изучение механизма реакции гидролиза антибиотика имипенама металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 и третьей стадии реакции гидролиза ряда цефалоспоринов металло- β -лактамазой L1 проводилось с помощью поиска стационарных точек, соответствующих минимумам и переходным состояниям на поверхности потенциальной энергии. Для поиска равновесных геометрий использовался метод сопряженных градиентов. Процедура оптимизация геометрий проводится в программном пакете NWChem (Valiev, 2010). Для поиска седловых точек проводился расчет гессиана энергии с последующим расчетом колебательных частот. Для мнимых частот проводился анализ форм колебаний и выбиралась мода, соответствующая координате реакции на изучаемой стадии. Следующим шагом проводился поиск переходного состояния вдоль выбранной мнимой колебательной моды. Полученные переходные состояния подтверждались колебательным анализом, и проводился спуск в обе стороны: к реагентам и продуктам лимитирующей стадии. Барьеры лимитирующих стадий рассчитывались как разница между энергиями переходного состояния и предшествующего реагента. Описание квантовой части проводилось методом PBE0-D3 с базисом 6-31G** для всех элементов. Энергии вертикальных электронных переходов рассчитывались в рамках нестационарного варианта теории функционала электронной плотности TDDFT в варианте CAM-B3LYP и ω B97X-D3 с 6-31G** (Petersilka, 1996). Для описания молекулярно-механической части системы использовалось силовое поле AMBER.

Изучение реакции в активном центре РВР2 проводилось методом КМ/ММ МД. Для описания квантовой части при анализе фермент-субстратных комплексов и расчетов механизмов реакций использовался метод PBE0-D3 с базисом 6-31G** для всех элементов кроме цинка. Для атомов цинка использовался псевдопотенциал LANL2DZ (Los Alamos National Laboratory 2 Double ζ) (Zhou, 2012). Псевдопотенциалы или эффективные потенциалы ядра (Effective Core Potentials, ECP) используются для исключения неактивных электронов ядра атома из явного учета в квантово-химических расчетах. В целом подход ECP основан на псевдоорбитальном преобразовании, радиальные узлы валентных орбиталей в основной области удаляются, и, следовательно, нет необходимости в базисных функциях для моделирования этих узлов, как в полноэлектронных расчетах.

Во всех системах использовалась схема электростатического внедрения. Расстояние, на котором учитывался вклад точечных зарядов ММ-подсистемы в гамильтониан КМ части, равно 12 Å, функция сглаживания использовалась с 10 Å. Учет перераспределения зарядов ММ атомов CS.

Молекулярная динамика проводилась в NPT ансамбле, при $T = 300$ К и $p = 1$ атм, шаг интегрирования 1 фс, алгоритм интегрирования Верле. Для описания молекул воды использовалось силовое поле TIP3P, для молекул субстрата CGenFF и для белка CHARMM. Для поддержания постоянства температуры и давления использовались термостат и баростат Ланжевена.

2.6. Направленная молекулярная динамика

Для исследования процессов связывания лигандов с белками используется метод направленной молекулярной динамики (Steered Molecular Dynamics, SMD) (Izrailev, 1999). Метод состоит в том, что к выбранному атому или группе атомов прикладывается заданный гармонический потенциал. Гармонический потенциал может быть приложен либо при постоянной силе, либо при постоянной скорости с изменяющейся силой. За счет этого в ходе молекулярной динамики изменяется расстояние между конкретными атомами в выбранном направлении. Для моделирования диссоциации лиганда от белка один из

атомов (фиксированный атом) выбирается среди атомов белка, а второй – среди атомов лиганда (SMD атом). Так, на выходе получается молекулярно-динамическая траектория выхода лиганда из активного центра белка. В данной работе метод применялся в качестве подготовительного этапа для анализа связывания антибиотика цефтриаксона с белками RBP2. Далее полученная траектория разбивается на кадры с определенными расстояниями между выбранными атомами для расчета профиля связывания методом зонтичной выборки.

2.7. Метод зонтичной выборки

Метод зонтичной выборки (Umbrella Sampling, US) (Kästner, 2011) позволяет сканировать конформационное пространство в области изучаемой координаты реакции. Для улучшения эффективности обхода конформационного пространства в уравнение, описывающее энергию системы, вводится дополнительный член, который позволяет искусственно понизить энергетические барьеры между состояниями системы. В методе зонтичной выборки в качестве внешнего потенциала используется гармонический потенциал, приложенный к выбранной координате реакции ξ . Исследуемый интервал (ξ_a ; ξ_b) разбивается на N окон с центрами ξ_0 в каждом, который удерживает системы вблизи центра окна. Для каждого окна проводится молекулярно-динамический расчет системы с дополнительным гармоническим потенциалом $U(\xi) = \frac{1}{2} k (\xi - \xi_0)$. В ходе моделирования значения фактической координаты реакции системы записываются через равный временной интервал. В результате расчета получается набор распределений значений координаты реакции, которые должны перекрываться между собой, для построения профиля. Для анализа полученного набора траекторий используют метод взвешенных гистограмм (Weighted Histogram Analysis Method, WHAM) (Kumar, 1992) и обобщенного интегрирования (Umbrella Integration, UI) (Kästner, 2006), которые считают дискретное количество состояний системы и разбивает их на ячейки, которые отвечают относительной вероятности наблюдения конкретного состояния системы. Исходя из этих вероятностей вычисляется энергетический профиль реакции.

Детали реализации расчетов направленной МД и метода зонтичной выборки

В данной работе метод применялся для анализа связывания антибиотика цефтриаксона с белками RBP2. Для расчета энергии образования фермент-субстратного комплекса модель сольватировалась так, чтобы расстояние от белка до границы в направлении движения атома SMD составляло 20 Å, по всем остальным сторонам 5 Å. В штамме FA19 в качестве фиксированного атома был выбран C α атом Tyr383, а атом углерода цефтриаксона, соединяющий тиазольное и β -лактамное кольца, в качестве SMD атома. Для H041 и 35/02 были выбраны пять различных направлений, фиксированным атомом был C α атом Phe315, Gln360, Ser362, Ser476 и Thr367. Вектор направления рассчитывался по разнице координат SMD-атома и неподвижного атома. SMD осуществляли при постоянной скорости увеличения межатомного расстояния, равной 0,00005 Å/фс, константа жесткости 20 ккал/моль/Å², длина траектории 1 нс. Субстрат вытягивался на 20-25 Å до полного освобождения от фермента. По полученной координате реакции рассчитывали профиль энергии связи методом зонтичной выборки. Силую константу гармонического потенциала $\frac{1}{2} \cdot K \cdot (\xi - \xi_0)^2$ обычно принимали равной 2 ккал/моль/Å², серию расчетов по 10 нс выполняли с гармоническими потенциалами, центрированными на каждом участке длиной 1-2 Å вдоль координаты реакции.

Для расчетов профилей энергии Гиббса механизмов реакции ингибирования RBP2 цефтриаксоном и реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 также использовался метод зонтичной выборки. Серии расчетов длительностью 5-10 пс выполнялись с гармоническими потенциалами, центрированными при разных значениях координат реакции. Силу константа гармонического потенциала $\frac{1}{2} \cdot K \cdot (\xi - \xi_0)^2$ обычно принималась равной 40 ккал/моль/Å², в областях переходных состояний могли принимать значения 80-180 ккал/моль/Å². Гармонические потенциалы центрировались через каждые 0,2 Å по координатам реакции в областях, близких к минимумам, и через каждые 0,1 Å в областях переходного состояния. Статистический анализ распределения координат реакций проводили с использованием WHAM и UI.

2.8. Динамический сетевой анализ

Для анализа скоррелированности движений между различными частями белковых молекул вдоль молекулярно-динамических траекторий может применяться динамический сетевой анализ (Dynamical Network Analysis, DNA) (Melo, 2020). Молекулярная система представляется в виде графа, состоящего из узлов, соединенных ребрами. Анализ графов методом DNA позволяет разделить имеющийся массив данных на отдельные группы, а также найти наиболее оптимальные пути, связывающие любые два элемента графа.

Узлы графа обычно определяют как C α атомы аминокислотных остатков белка, а ребра проводятся между теми узлами, два остатка которых находятся на расстоянии, меньшем 4,5 Å, на не менее, чем 75% всей длины траектории. Динамический сетевой анализ фокусируется исключительно на корреляции движения узлов в непосредственной близости. Явно рассчитываются только прямые взаимодействия ближнего действия, а взаимодействия дальнего действия определяются посредством анализа самой сети.

Каждое ребро графа имеет определенный вес d_{ij} , рассчитываемый как $d_{ij} = -\log(|C_{ij}|)$ и связанный с вероятностью передачи информации через данное ребро. Значение корреляции C_{ij} рассчитывается для каждой пары C α атомов (узлов), как:

$$C_{ij} = \frac{\langle \Delta \vec{r}_i(t) \cdot \Delta \vec{r}_j(t) \rangle}{(\langle \Delta \vec{r}_i(t)^2 \rangle \langle \Delta \vec{r}_j(t)^2 \rangle)^{1/2}}, \quad (2.8.1)$$

где $\Delta \vec{r}_i(t) = \vec{r}_i(t) - \langle \vec{r}_i(t) \rangle$, а $\vec{r}_i(t)$ – это положение C α атома i -го узла.

В полученном графе могут быть выделены отдельные сообщества, характеризующиеся повышенной скоррелированностью движения и близким расположением входящих в них вершин. Разделение на сообщества происходит по алгоритму Гирмана-Ньюмана (Girvan, 2002). Этот алгоритм обнаруживает сообщества путём последовательного удаления рёбер, которые имеют наибольшую степень «посредничества» между узлами, из исходной сети. Оставшиеся связные компоненты сети являются сообществами или «семействами».

2.9. Анализ электронной плотности

В данной работе практически в каждой задаче проводится сравнение структур интермедиатов реакции, сравнение положения одного и того же субстрата в родственных ферментах или же сравнение разных субстратов в одном и том же ферменте. Для этого используется анализ электронной плотности. Рассмотрение непосредственно функции электронной плотности часто не дает различить детали распределения электронной плотности в интересующей части пространства. Поэтому для анализа таких областей электронной плотности используют вспомогательные функции, которые называются дескрипторами электронной плотности. При использовании дескрипторов электронной плотности важно понимать область их применимости, какие из них можно использовать для характеристики молекулярных структур в динамике, то есть анализировать электронную плотность в динамической траектории, а какие только в стационарной точке.

Взаимодействия субстрата с оксианионным центром приводят к поляризации карбонильной группы антибиотика и ее активации в качестве электрофила. В данной работе проводится исследование формирования оксианионного центра в активном центре фермент-субстратных комплексов металло- β -лактамаз L1, NDM-1 и ряда PBP2. Для этого в динамике фермент-субстратного комплекса рассматривались в первую очередь взаимодействия, формирующие оксианионный центр и расстояние нуклеофильной атаки. Рассчитывались молекулярно-динамические траектории фермент-субстратных комплексов длиной 5.5 пс методом КМ/ММ МД, записывался каждый 5 кадр траектории. Для анализа предварительно исключались данные для первых 500 кадров, которых было достаточно для релаксации системы.

В PBP2 оксианионный центр формируется за счет образования водородных связей между карбонильным кислородом антибиотика и атомами водорода NH групп основных цепей Ser310 и Thr500 (рисунок 2.9.1 А). В металло- β -лактамазах оксианионный центр фермента сформирован двумя координационными связями между одним катионом цинка и кислородом карбонильного фрагмента β -лактамного кольца, вторым катионом цинка и азотом β -лактамного кольца. Эти взаимодействия поляризуют карбонильную группу C=O и связь C-N β -лактамного кольца соответственно. Вследствие чего электрофильность карбонильного углерода возрастает, что и подготавливает субстрат к реакции, так как

первый шаг реакции – это нуклеофильная атака гидроксид-аниона на карбонильный углерод β -лактамного кольца субстрата (рисунок 2.9.1 Б). И чем большей электрофильностью обладает карбонильный углерод, тем легче должна произойти нуклеофильная атака. Также проводится оценка реакционности частиц в фермент-субстратном комплексе электронно-плотными дескрипторами – лапласианом электронной плотности. Для этого вдоль траекторий через равные промежутки времени отбирались 500 кадров, для которых рассчитывалась электронная плотность основного состояния для последующего расчета карт лапласиана электронной плотности.

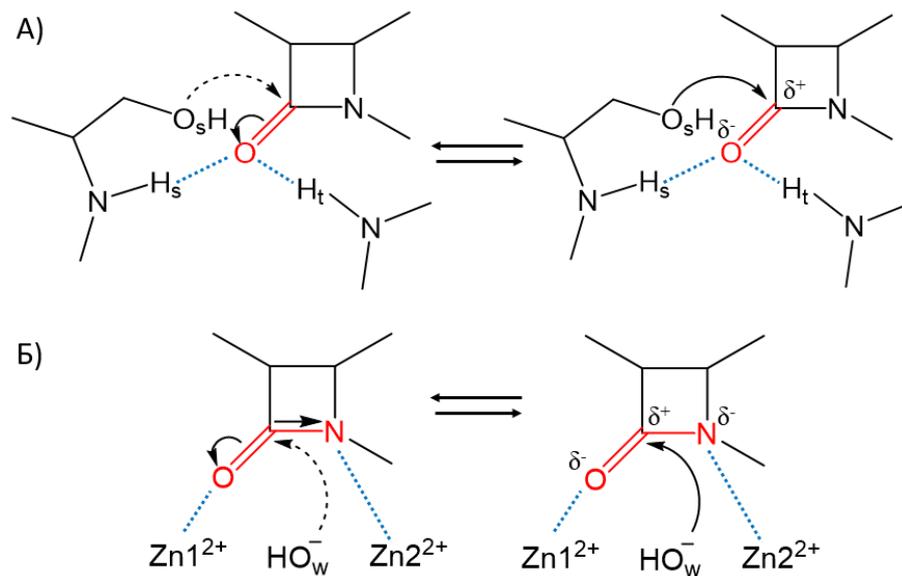


Рисунок 2.9.1. Схема активации субстрата ферментом в активных центрах RBP2 (А) и металло- β -лактамаз (Б)

Известно, что отрицательный лапласиан электронной плотности указывает на концентрацию электронного заряда и, следовательно, нуклеофильную природу рассматриваемой области, а положительный лапласиан электронной плотности отвечает истощению электронного заряда и наличию электрофильной области (рисунок 2.9.2) (Porelier, 2000). В данной работе во всех системах рассматривается так или иначе гидролитическая реакция – нуклеофильная атака кислорода на карбонильный углерод. Таким образом, анализируя 2D-карты лапласиана электронной плотности на атоме углерода на линии нуклеофильной атаки наблюдается зазор, когда частица является реакционной. И, наоборот, если этого зазора на линии атаки нет, то структура считается неактивной.

Анализ реакционной способности структур также производился с помощью оценки индекса электрофильности Фукуи карбонильного атома углерода. Электрофильный

индекс Фукуи определяется как разница зарядов Хиршфельда систем в основном электронном состоянии и в состоянии с добавочным электроном (Langenaeker, 1991).

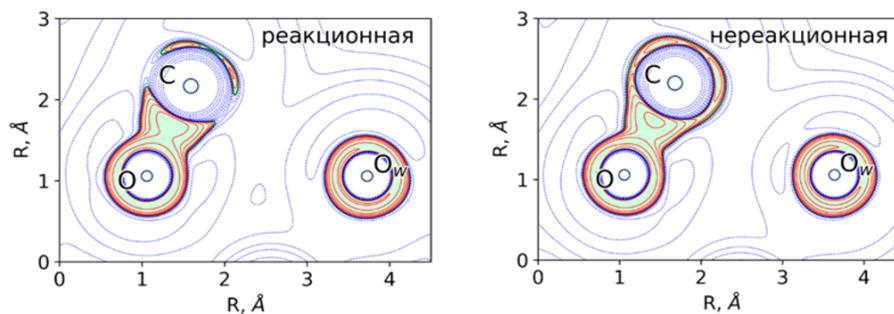


Рисунок 2.9.2. Карты лапласиана электронной плотности: красные сплошные линии $\nabla^2 \rho(r) < 0$ – область концентрации электронной плотности, пунктирные синие линии $\nabla^2 \rho(r) > 0$ – область деконцентрации электронной плотности

Как отмечалось выше, CASNE показали, что современный поиск новых лекарственных препаратов компьютерными методами на данный момент является не результативным. По крайней мере, если анализировать результативность в академических группах, так как информация из фармацевтических компаний является конфиденциальной. Такая низкая результативность от части может быть связана с тем, что в большинстве методов для оценки связывания используются оценочные функции, основанные на физике силовых полей, используемых в молекулярной механике. Точность прогноза оценки связывания можно увеличить с помощью проведения квантово-химических расчетов. То есть перейти от рассмотрения системы на атомном уровне до электронно-ядерной системы. В таком случае, перед исследователем образуется своеобразная дилемма: анализ сотни тысяч соединений с зачастую неэффективными прогнозами или наиболее точные оценки взаимодействий для очень небольшой области исследования.

С другой стороны, так же известно, что больше половины выводимых на рынок низкомолекулярных соединений – это аналоги уже известных и используемых лекарств. Такие аналоги называются «следующий в классе», их поиск не обязательно подразумевает анализ сотен тысяч соединений, для него достаточно произвести определенное количество модификаций основной молекулы. Для поиска «следующих в классе» подходит альтернативный метод поиска, основанный на анализе электронной плотности, полученной из квантово-химических расчетов. В данном подходе строится уравнение, связывающее макросвойства системы, взятые из эксперимента, и

микросвойства системы, описывающие особенности распределения электронной плотности. В данной работе для поиска новых антибиотиков цефалоспоринового ряда и бороновых ингибиторов использовался именно такой подход.

Для анализа электронной плотности применялась квантово-топологическая теория атомов в молекулах и кристаллах (Quantum Theory of Atoms In Molecules, QTAIM) (Bader, 1985). Данная теория выделяет критические точки на поверхности электронной плотности. В этих точках значение градиента электронной плотности обращается в ноль. Идентификация точек происходит в зависимости от значений гессиана электронной плотности, который представляет собой матрицу вторых производных электронной плотности размером 3×3 . Ранг и признак матрицы равны числу ненулевых собственных значений гессиана электронной плотности ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$) и алгебраической сумме их знаков, соответственно. Таким образом, ранг всегда равен 3, а признак может принимать следующие значения: -3, -1, +1, +3. Так, на каждом ядре системы множество градиентных линий сходятся и наблюдается максимум электронной плотности. В этой точке все три собственных значения гессиана электронной плотности имеют отрицательный знак. Таким образом, точки (3; -3) отвечают положениям ядер. Аналогичным образом определяется, что критические точки (3; +3), отвечают клеточным критическим точкам, которые заключены в пространстве, ограниченном несколькими циклами. А критические точки (3; +1) являются циклическими. В циклических молекулах в таких точках электронная плотность принимает минимальное значение в некоторой плоскости, для них два собственных значения гессиана электронной плотности положительны. Критическая точка типа (3; -1) называется критической точкой связи (КТС). В этой точке два первых собственных значения гессиана электронной плотности имеют отрицательное значение. При образовании молекулы между некоторыми атомами наблюдаются мостики электронной плотности. Им отвечают две градиентные линии, начинающиеся в КТС и заканчивающиеся на ядрах, они образуют линии связи. В стабильной равновесной системе существование линий связи является необходимым условием образования связи. Свойства КТС позволяют идентифицировать химическую связь.

Для описания химических взаимодействий в активном центре исследуемых ферментов применялась QTAIM с последующим анализом электронной плотности в исследуемых КТС. В первую очередь в КТС рассматривается значение самой электронной плотности. Лапласиан электронной плотности несет ценную информацию о химическом

взаимодействии. Значение лапласиана электронной плотности в КТС определяется соотношением между отрицательными и положительными компонентами кривизны. Следовательно, значение лапласиана электронной плотности зависит от характера химической связи: отрицательному значению соответствует более ковалентный тип связывания, положительному значению соответствует взаимодействие по типу замкнуты оболочек. На практике существует множество разновидностей связей. Важно отметить, что чем выше кратность связи, тем больше сжатие электронной плотности к линии связи и лапласиан электронной плотности принимает более отрицательные значения. Так же в КТС рассматривалась полная плотность электронной энергии, которая является суммой плотностей кинетической и потенциальной энергий. Знак полной плотности электронной энергии показывает потенциальная или кинетическая энергия доминирует в межъядерном пространстве. Отрицательное значение в КТС говорит о доминировании потенциальной энергии, следовательно, взаимодействие является стабилизирующим. Из положительного значения в КТС следует доминирование кинетической энергии, что говорит о взаимодействии, дестабилизирующем систему.

В задаче по поиску новых антибиотиков рассматривается КТС водородной связи. Водородные связи играют большую роль в химических и биологических реакциях. Водородными связями называются взаимодействия для водорода из группы Х-Н и атомом или группой атомов Y, в той же или другой молекуле или молекулах. Водородные связи охватывают широкий диапазон взаимодействий: от очень сильного, имеющего ковалентный характер взаимодействия, до слабого взаимодействия, энергии которого слегка превышают энергию Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. Водородные связи, в целом, можно классифицировать относительно расстояния Н...Y в диапазоне $2,2 < R_{xy} < 3,5$ Å, сильной связи соответствует значение длины до 2,45 Å, средней диапазон 2,45 – 2,80 Å, и слабой связи расстояния более 2,80 Å. Водородные связи на порядок слабее обычных химических связей. Напрямую количественно измерить энергию водородной связи не представляется возможным. В данной работе предлагается оценить энергию водородной связи используя локальную электронную потенциальную плотность энергии и локальную электронную кинетическую плотность энергии в КТС по соответствующим формулам (Espinosa, 1998):

$$E(HB)_V = -\frac{1}{2}V(r_{\text{КТС}}), \quad E(HB)_G = 0,429 * G(r_{\text{КТС}}), \quad (2.9.1)$$

где $V(r_{\text{КТС}})$ – потенциальная плотность энергии в КТС, а $G(r_{\text{КТС}})$ – положительная кинетическая энергия в КТС.

Также был рассчитан дескриптор электронной плотности известный как функция влияния или функция источника. Данный дескриптор описывает вклады в электронную плотность любой точки пространства от источников, действующих во всех других точках пространства. Суммируя эти локальные источники по атомным бассейнам системы, можем считать, что электронная плотность в любом месте системы определяется меньшими или большими вкладами всех атомов или группы рассматриваемых атомов. Иными словами, функция источника отвечает количественной мере относительной важности вклада атома или группы атомов в электронную плотность в любой точке системы и определяется следующим уравнением (Gatti, 2003):

$$\rho(r) = -\frac{1}{4\pi} \sum_i \int_{\Omega_i} \frac{\nabla^2 \rho(r')}{|r-r'|} dr' = \sum_i SF(r, \Omega_i), \quad (2.9.2)$$

где $SF(r, \Omega_i)$ — вклад атомных бассейнов Бейдера Ω_i в электронную плотность в точке r . В терминах функции источника атом, который вносит положительный вклад в электронную плотность в точке r , называется «источником», атом, вклад которого в электронную плотность точки r отрицателен называется «приемником/стоком». Так, для водородных связей функция источника позволяет классифицировать эти взаимодействия с точки зрения донора и акцептора связи, учитывая характерные вклады источника в электронную плотность в критической точке Н-связи.

Значение электронной плотности в критической точке водородной связи коррелирует с кратностью связи, подчиняясь следующей формуле (Bartashevich, 2011):

$$n_{\text{topo}} = a_0 + a_1(\lambda_1 + \lambda_2) + a_2\lambda_3 + a_3\rho(r_{\text{КТС}}), \quad (2.9.3)$$

где $\rho(r_{\text{КТС}})$ – значение электронной плотности в КТС, $\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$ – собственные значения гессиана электронной плотности, a_0, a_1, a_2, a_3 – рассчитываемые коэффициенты. В литературе известно исследование наборов систем X—Н/Н...О, где X=O, N, C, для которых рассчитывались значения порядка связи по формуле Циолковского-Миксона. Далее полученные значения приравнялись к (2.9.3) и методом линейного регрессионного анализа были вычислены коэффициенты a_0, a_1, a_2, a_3 . Таким образом, для исследуемой системы $a_1 = 0,36$, $a_2 = -0,25$, а $a_3 = 5,29$. По физическому смыслу величина $\rho(r_{\text{КТС}})$ измеряет силу ковалентной связи, в то время как параметры кривизны электронной плотности перпендикулярно линии связи λ_1 и λ_2 отражают ее π -характер.

Помимо анализа электронной плотности в КТС для характеристики химической связи можно использовать вычисления порядков связей различными способами или анализ электронной плотности вдоль линии связи с помощью функции локализации электронов (Electron Localization Function, ELF) или эллиптичности (Savin, 1997; Knowles, 1975). Эллиптичность электронной плотности вычисляется:

$$\varepsilon(r) = \frac{\lambda_1(r)}{\lambda_2(r)} - 1, \quad (2.9.4)$$

где λ_1, λ_2 – параметры кривизны электронной плотности в двух ортогональных направлениях, перпендикулярных связи. Куполообразная форма эллиптичности электронной плотности вдоль исследуемой связи может указать на ее π -характер, а максимум на атоме – концентрации заряда на нем. ELF позволяет отображать информацию о пространственной локализации электронов, скрытую в плотности электронной кинетической энергии. ELF может дать полезную информацию о химической связи, как при анализе вдоль линии связи, так и анализе 2D-карт.

Квантово-топологическая теория атомов в молекулах и анализ электронной плотности в КТС проводился в программном пакете Multiwfn (Lu, 2012).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

3.1. Выбор оптимального метода расчета механизма реакции гидролиза нитроцефина металло-β-лактамазой L1

3.1.1. Анализ активации субстрата ферментом

Модель металло-β-лактамазы L1 в комплексе с субстратом нитроцефином строилась на основе кристаллической структуры комплекса L1 с гидролизированным моксалактамом PDB ID: 2AIO с разрешением 1.70 Å. Из кристаллической структуры исключались 1-30 аминокислотные остатки, ввиду их удаленности от белковой глобулы. В активном центре фермента производилась замена субстрата на нитроцефин, путем наложения структур. N-конец белка находится близко к активному центру, в связи с чем он был ацилирован для нейтрализации заряда. Протонированные формы аминокислот с ионогенными группами были выбраны в соответствии нейтральному pH. Полученная полноатомная модель фермент-субстратного комплекса сольватировалась молекулами воды до образования ячейки в виде прямоугольного параллелепипеда, таким образом, чтобы расстояние от любого атома белка до границ ячейки составляло не менее 12 Å. Затем в систему добавляются катионы натрия для нейтрализации общего заряда ячейки. Модель построена с помощью программного пакета VMD (Humphrey, 1996). После чего проводится процедура минимизации системы методом градиентного спуска в программном пакете NAMD в течение 1000 шагов.

Квантовая подсистема состоит из молекулы нитроцефина, гидроксид аниона, каталитического остатка Asp120, Tyr32 образующего связь с Asp120, катионов цинка с их координационными сферами: Zn1 связан с His118, His116, His196, Zn2 связан с His121, His263, Asp120; Ser221 и молекулы воды, образующие связи с антибиотиком (рисунок 3.1.1.1). В молекулярно-динамических траекториях измерялись геометрические характеристики взаимодействий, формирующих оксианионный центр (рисунок 2.9.1 Б): расстояния нуклеофильной атаки $d(C...O_w)$, длины координационных связей, $d(Zn^{2+}...O)$

и $d(\text{Zn}^{2+} \dots \text{N})$. Расстояние нуклеофильной атаки в динамике для фермент-субстратного комплекса L1 с нитроцефином, рассчитанное функционалами B3LYP-D3 и PBE0-D3, имеют форму нормального распределения со средними значениями и стандартными отклонениями $2,74 \pm 0,14 \text{ \AA}$ и $2,75 \pm 0,17 \text{ \AA}$ соответственно. Для функционала BHHLYP-D3 эти значения $3,03 \pm 0,22 \text{ \AA}$. Расстояние нуклеофильной атаки в подобных ферментах не должно превышать $3,0 - 3,2 \text{ \AA}$. Для всех функционалов кроме BHHLYP-D3 небольшая доля структур имеет значения нуклеофильной атаки в этом диапазоне. Для BHHLYP-D3 больше половины всех структур имеют значения нуклеофильной атаки в диапазоне $3,0 - 3,6 \text{ \AA}$. На таких расстояниях нуклеофильная атака маловероятна.

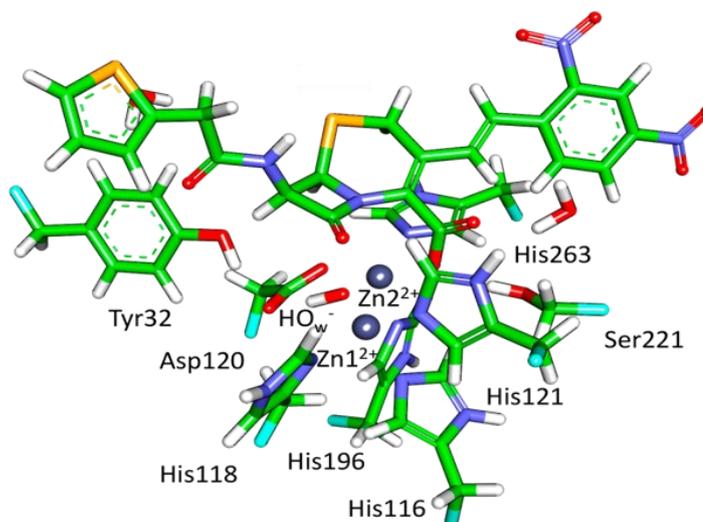


Рисунок 3.1.1.1. Квантовая часть комплекса L1 металло- β -лактамазы с нитроцефином, бирюзовым выделены связевые атомы водорода

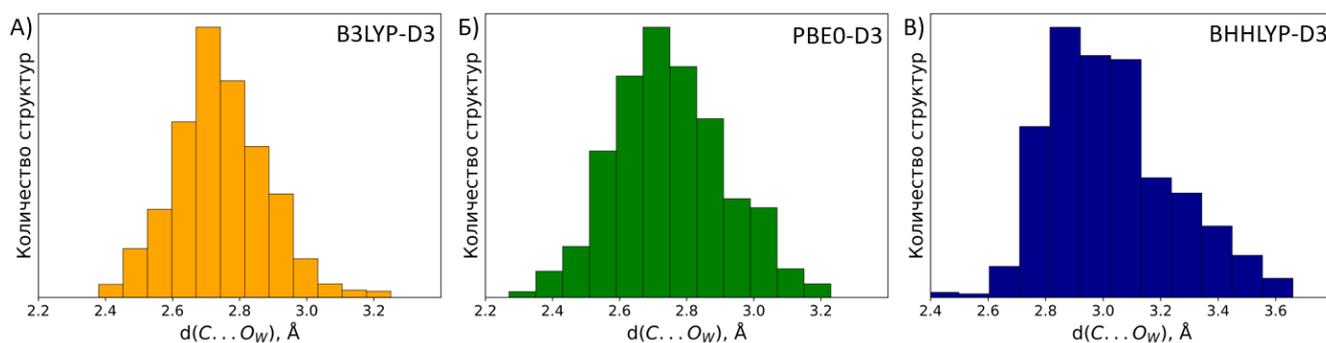


Рисунок 3.1.1.2. Распределение расстояний нуклеофильной атаки в активном центре фермент-субстратного комплекса L1 металло- β -лактамазы с нитроцефином из КМ/ММ МД рассчитанных функционалами B3LYP-D3 (А), PBE0-D3 (Б), BHHLYP-D3 (В)

Распределения длины координационных связей $d(\text{Zn}^{12+} \dots \text{O})$ и $d(\text{Zn}^{22+} \dots \text{N})$ с проекциями значений на единый график изображены на рисунке 3.1.1.3. Координационная связь $d(\text{Zn}^{12+} \dots \text{O})$ поляризует карбонильную группу $\text{C}=\text{O}$, а

$d(\text{Zn}^{2+} \dots \text{N})$ поляризует связь C-N β -лактамного кольца. Наибольший эффект активации достигается, когда обе координационные связи имеют достаточную длину – до 3,0 Å. Желтым квадратом выделена область структур, активированных обеими координационными связями. Чаще наблюдается активация субстрата только одной координационной связью, в то время как вторая способствует поляризации связи только за счет электростатического действия атома цинка. Активация субстрата обеими координационными связями достигается чаще в расчетах PBE0-D3. Однако в оставшейся части молекулярно-динамической траектории активация достигается за счет координационной связи $d(\text{Zn}^{1+} \dots \text{O})$, длина которой не превышает 3,0 Å практически все время моделирования.

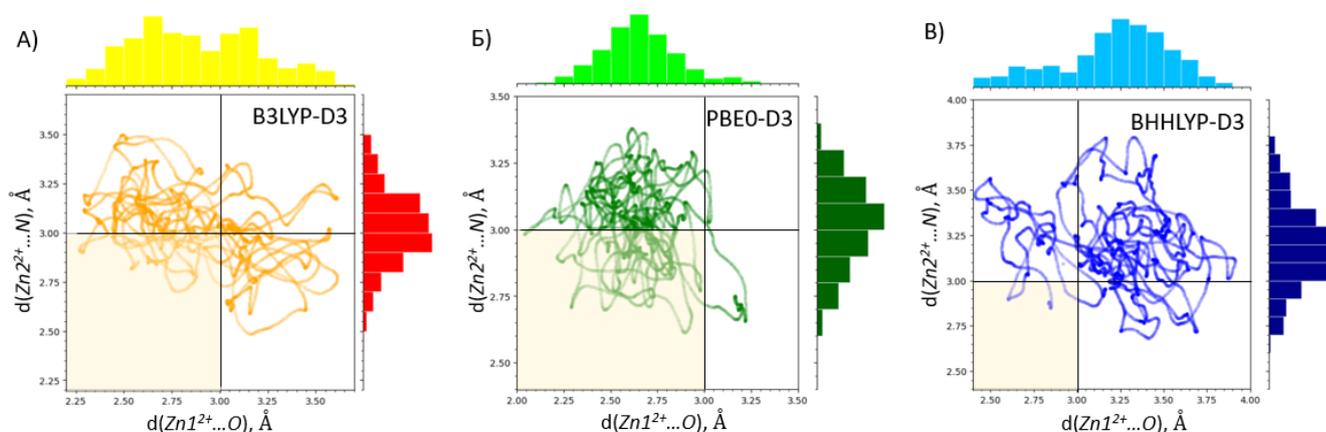


Рисунок 3.1.1.3. Распределение длин координационных связей $d(\text{Zn}^{1+} \dots \text{O})$ и $d(\text{Zn}^{2+} \dots \text{N})$ в активном центре фермент-субстратного комплекса L1 металло- β -лактамазы с нитроцефином из КМ/ММ МД рассчитанных функционалами V3LYP (А), PBE0 (Б), BHHLYP (В). Желтым квадратом выделена область структур, активированных обеими координационными связями

Для V3LYP-D3 небольшая часть структур активируется обеими координационными связями. Слабая координационная связь для $d(\text{Zn}^{2+} \dots \text{N})$ вдоль всей траектории, среднее значения $3,02 \pm 0,18$ Å. Распределение длины координационной связи $d(\text{Zn}^{1+} \dots \text{O})$ имеет несколько фракций, одна из которых способствует активации субстрата, длина связи менее 3,0 Å, однако в чуть меньше половины структур Zn^{1+} находится дальше от карбонильного кислорода. В BHHLYP-D3 крайне малое количество структур, в которых активация субстрата осуществляется за счет обеих координационных связей. Доля достаточно коротких координационных связей для активации субстрата мала как для $d(\text{Zn}^{2+} \dots \text{N})$, так и для $d(\text{Zn}^{1+} \dots \text{O})$. В данной динамике преимущественно наблюдается отсутствие активации субстрата ферментом.

Далее вдоль молекулярно-динамических траекторий отбирается 500 структур, в которых происходит активация субстрата с помощью электронно-плотностного дескриптора - лапласиана электронной плотности. 2D-карты лапласиана электронной плотности строились в плоскости карбонильной группы субстрата (атомы С и О) и нуклеофильного атома кислорода от гидроксид-аниона. При описании фермент-субстратного комплекса разными методами в каждой системе обнаружены реакционные структуры, но их доля существенно различается. Для PBE0-D3 доля реакционных структур составляет 70,4%, что согласуется с наблюдениями о геометрических характеристиках оксианионного центра – достаточно короткие длины координационных связей и расстояние нуклеофильной атаки. Для B3LYP-D3 доля реакционных структур существенно меньше – 28,6%, что тоже согласуется с вышеизложенными наблюдениями. Совершенно не соответствуют результаты VHNLYP-D3. Анализ карт лапласиана электронной плотности показал, что в 100% всех структур наблюдается активация субстрата.

Сопоставляя результаты, можно заключить, что гибридный функционал VHNLYP-D3, содержащий 50% вклада точного хартри-фоковского обмена, не позволяет дискриминировать активированные и неактивированные состояния. На данном этапе анализа предпочтительными являются результаты, полученные при описании активации фермент-субстратного комплекса методами B3LYP-D3 и PBE0-D3.

3.1.2. Расчет механизма реакции гидролиза

Рассчитанные профили энергии Гиббса первой стадии реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 представлены на рисунке 3.1.2.1. Координатой реакции, ξ , для первой стадии, было выбрано расстояние между карбонильным атомом углерода β -лактамного кольца и кислородом гидроксид-аниона, $d(C...O_w)$. Значение энергетических барьеров первой стадии реакции составляет 13,6 ккал/моль для B3LYP-D3, 10,9 ккал/моль PBE0-D3, 13,7 ккал/моль VHNLYP-D3.

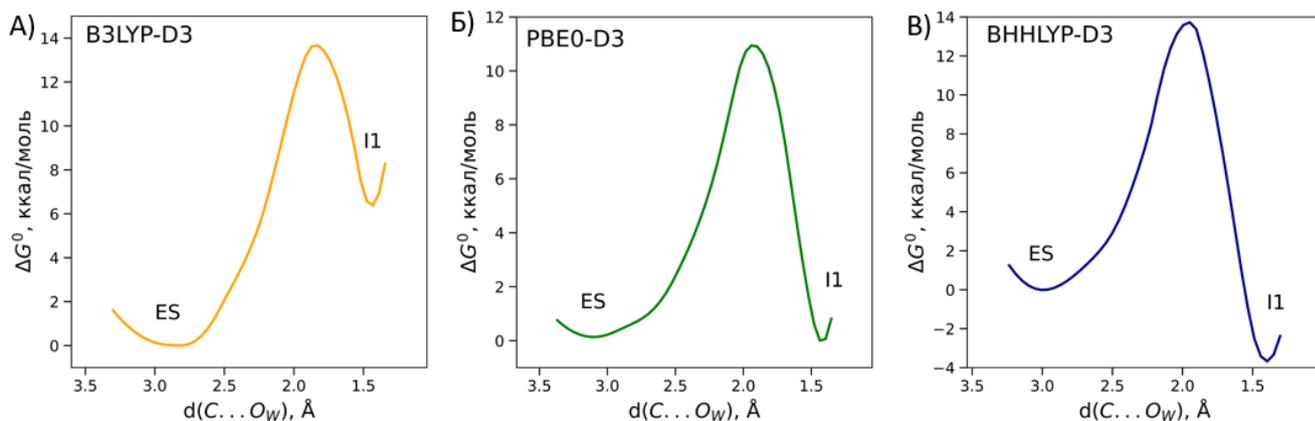


Рисунок 3.1.2.1. Энергетические профили стадии нуклеофильной атаки реакции гидролиза нитроцефина металло-β-лактамазой L1, полученные методами PBE0-D3, B3LYP-D3, BHHLYP-D3; ES – фермент-субстратный комплекс, I1 – интермедиат первой стадии реакции

Так как на второй стадии реакции гидролиза происходит разрыв C-N связи β-лактамного кольца, который сопровождается переходом атома водорода с гидроксид-аниона на атом кислорода остатка аспарагиновой кислоты 120, в качестве координаты реакции для второй стадии была выбрана разница расстояний между парами соответствующих атомов, $d(H...O_{Asp})-d(C...N)$. Полученные в результате зонтичной обработки энергетические профили второй стадии представлены на рисунке 3.1.2.2.

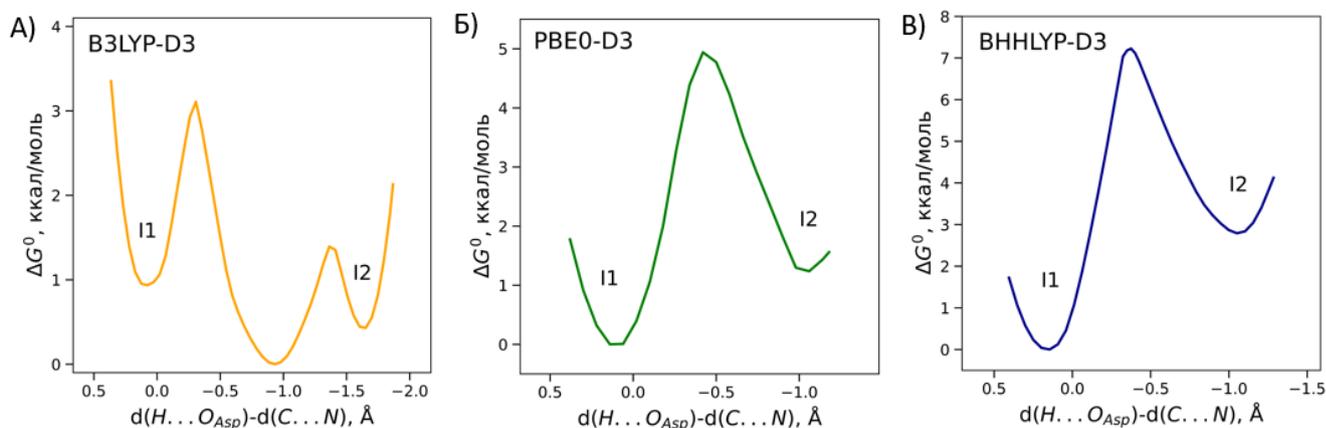


Рисунок 3.1.2.2. Энергетические профили второй стадии реакции гидролиза нитроцефина металло-β-лактамазой L1, полученные методами PBE0-D3, B3LYP-D3, BHHLYP-D3

Согласно спектроскопическому исследованию, в ходе реакции накапливается второй интермедиат, следовательно он должен быть стабилизирован относительно ES и I1. Энергетический барьер, вычисленный из экспериментальных данных, составляет 14,3 ккал/моль. Все рассчитанные профили не превышают это значение. В B3LYP-D3 ни первый, ни второй интермедиаты не стабилизированы относительно ES. Энергетический

профиль V3LYP-D3 имеет отличающуюся форму, так как перенос протона и разрыв β -лактамного кольца происходят поэтапно при данном расчете. В PBE0-D3 первый интермедиат имеет такие же энергетические показатели, как и ES, а второй дестабилизирован на 1 ккал/моль. Такие значения укладываются в диапазон погрешности метода КМ/ММ МД. В BHHLYP-D3 I2 стабилизирован на 0,8 ккал/моль относительно ES.

На третьей стадии реакции гидролиза происходит перенос атома водорода с атома кислорода остатка аспарагиновой кислоты на атом азота β -лактамного кольца. Координатой реакции для третьей стадии была выбрана разница расстояний между соответствующими атомами, $d(H...O_{Asp})-d(H...N)$. Третья стадия реакции является лимитирующей для рассматриваемого механизма инактивации антибиотика. Результаты представлены на рисунке 3.1.2.3.

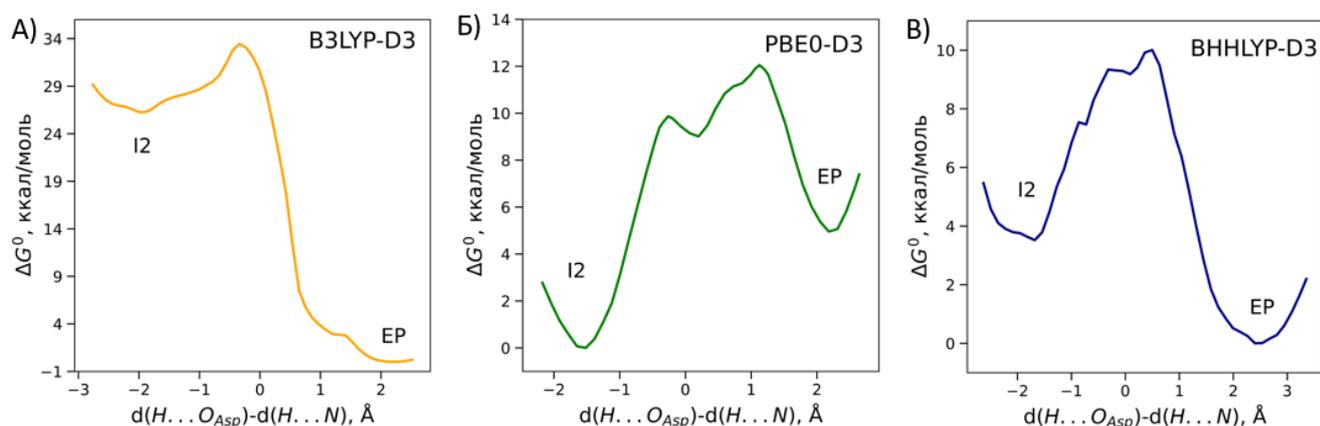


Рисунок 3.1.2.3. Энергетические профили третьей стадии реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1, полученные методами PBE0-D3, V3LYP-D3, BHHLYP-D3; EP – продукт реакции

Из экспериментальных данных известно, что третья стадия реакции является лимитирующей стадией. Следовательно, ее рассчитанный энергетический барьер должен быть выше энергетических барьеров первой и второй стадии. Из экспериментальной константы скорости лимитирующей стадии реакции гидролиза хромогенного субстрата металло- β -лактамазой L1 было получено максимально допустимое значение энергетического барьера – 15,3 ккал/моль

Для метода V3LYP-D3 величина барьера составляет 8 ккал/моль. Однако величина барьера первой стадии реакции для данного метода составляет 13,6 ккал/моль. Следовательно, при произведении расчетов данным методом лимитирующей стадией является первая стадия реакции, что противоречит экспериментальным данным.

Аналогичная ситуация наблюдается и для расчетов, произведённых методом ВННLYP-D3. Только в расчетах PBE0 лимитирующей стадией реакции является третья стадия, энергетический барьер третьей стадии реакции равен 12,5 ккал/моль. Следовательно, метод PBE0-D3 является наиболее предпочтительными для расчета механизма ферментативной реакции.

3.2. Расчет механизма реакции гидролиза антибиотика имипенема металло- β - лактамазами L1 и NDM-1

3.2.1. Анализ активации субстрата ферментом

Обе металло- β -лактамазы L1 и NDM-1 в активном центре содержат два катиона цинка, каталитическую аспарагиновую кислоту и каталитический гидроксид анион. Различается состав активных центров тем, что в L1 катионы цинка координируют только аминокислотные остатки гистидина (остатки 116, 118, 196, 121, 263) и каталитическую аспарагиновую кислоты, а в NDM-1 вместо His121 находится остаток Cys208. Также консервативная карбоксильная группа антибиотика в L1 образует водородные связи с Ser221 и Ser223, а в NDM-1 с Lys221. Значимой структурной особенностью является разный аминокислотный состав петли L10, накрывающей активный центр в обоих ферментах. В L1 над активным центром находится гидрофобный жесткий аминокислотный остаток Pro226, в NDM-1 над субстратом находится гибкий Gly219 (рисунок 3.2.1.1). Такая разница в аминокислотном составе петли влияет на подвижность активного центра и ход реакции. В NDM-1 петля L10 больше отодвинута от имипенема и пирролиновое кольцо в большей степени обращено в раствор, – к нему может подходить вода, что обуславливает возможность протонирования атома C₃ в ходе ферментативной реакции. Для того, чтобы исследовать подвижность активного центра были рассчитаны молекулярно-динамические траектории с квантово-механическими потенциалами фермент-субстратных комплексов L1 и NDM-1 с имипенемом.

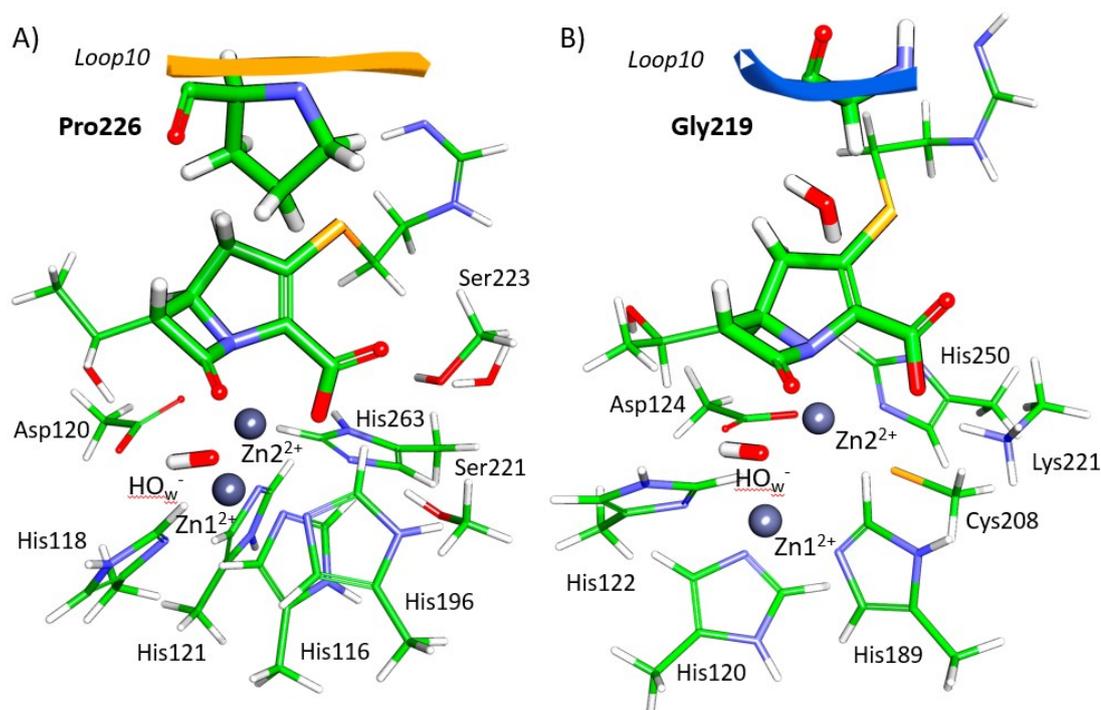


Рисунок 3.2.1.1. Квантовая часть активных центров L1 (А) и NDM-1 (Б) с имипенемом. Фрагмент петли L10 показан оранжевым для L1 и синим для NDM-1

Фермент-субстратный комплекс L1 и имипенема получен из кристаллической структуры PDB ID: 2AIO, а фермент-субстратный комплекс NDM-1 и имипенема – из кристаллической структуры PDB ID: 5YPK. Структура имипенема была восстановлена до негидролизованного состояния. КМ подсистема включала в себя имипенем, два катиона Zn^{2+} и боковые цепи аминокислотных остатков, образующих с ними координационные связи, каталитический гидроксид-анион, молекулы воды и остатки, образующие водородные связи с имипенемом (Ser221, Ser223 в L1 и Lys211, Leu218-Asn220 в NDM-1), также в NDM-1 помещалась дополнительная молекула воды, которая является донором протона для протонирования по атому C₃.

Анализ фермент-субстратных комплексов в первую очередь включал в себя рассмотрение ключевых геометрических характеристик вдоль молекулярно-динамических траекторий. Ключевыми геометрическими характеристиками в данной случае являются расстояние нуклеофильной атаки и координационные связи, образующие оксианионный центр (рисунок 2.9.1 Б).

В L1 распределения связей $d(Zn1^{2+} \dots O)$ и $d(Zn2^{2+} \dots N)$ узкие, расстояния варьируют в пределах 0,21 и 0,14 Å соответственно. Средние значения близки и составляют $2,39 \pm 0,04$ Å для расстояния $Zn1^{2+} \dots O$ и $2,36 \pm 0,02$ Å для расстояния $Zn2^{2+} \dots N$. Эти значения соответствуют координационным связям. В NDM-1 распределения значительно

шире, длины связей варьируют в пределах 1,32 Å и 0,9 Å $d(\text{Zn}^{2+}\dots\text{O})$ и $d(\text{Zn}^{2+}\dots\text{N})$ соответственно, причем расстояния $\text{Zn}^{2+}\dots\text{O}$ достигают значений 4 Å. Координационная связь между катионом цинка и атомом кислорода субстрата практически отсутствует, а влияние на субстрат осуществляется только за счет большого положительного заряда катиона металла, то есть поляризация связи $\text{C}=\text{O}$ происходит за счет электростатического поля Zn^{2+} . Расстояния $\text{Zn}^{2+}\dots\text{N}$ короче расстояний $\text{Zn}^{2+}\dots\text{O}$, их средние значения равны $2,52 \pm 0,18$ Å и $3,18 \pm 0,26$ Å соответственно. Судя по всему, координационная связь $\text{Zn}^{2+}\dots\text{N}$ может частично компенсировать отсутствие координационной связи $\text{Zn}^{2+}\dots\text{O}$. Поляризация связи $\text{C}-\text{N}$ также должна увеличивать степень деконцентрации заряда на карбонильном атоме углерода в NDM-1, что делает его электрофилом, подготовленным для реакции.

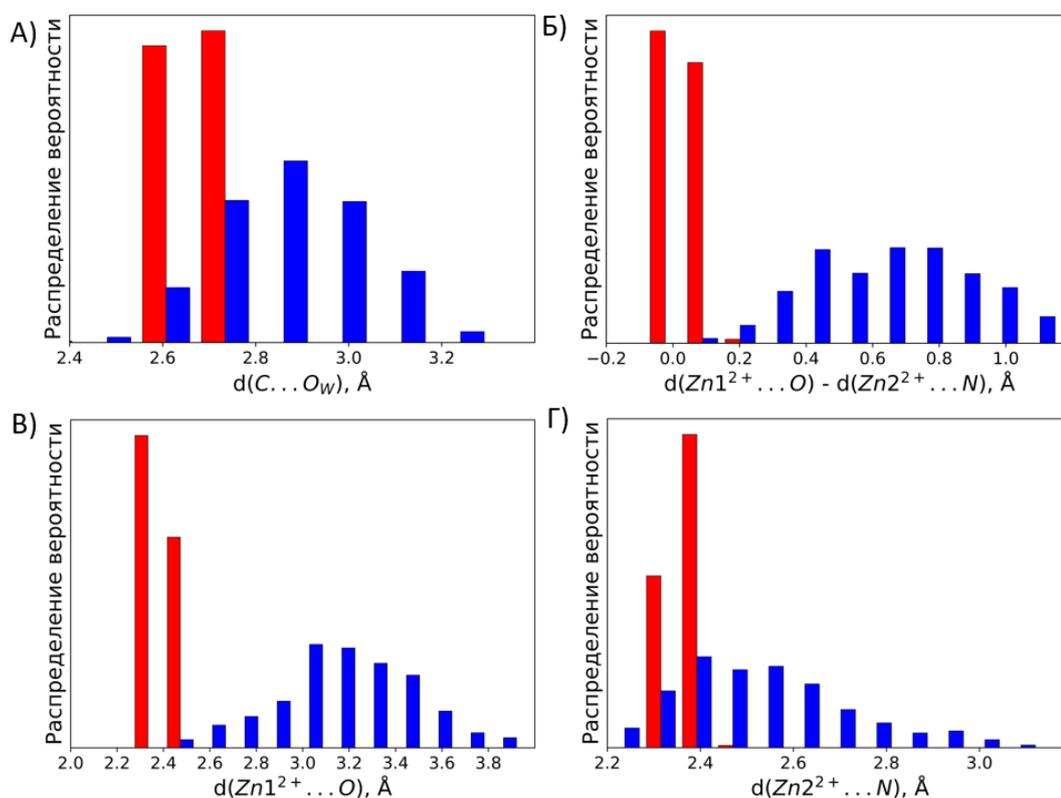


Рисунок 3.2.1.2. Распределения межатомных расстояний в L1 (красный) и NDM-1 (синий): (А) расстояние нуклеофильной атаки, $d(\text{C}\dots\text{O}_w)$, (Б) координационная связь между катионом цинка и атомом кислорода карбонильной группы субстрата, $d(\text{Zn}^{2+}\dots\text{O})$, (В) длина координационной связи между катионом цинка и атомом азота β -лактамного кольца, $d(\text{Zn}^{2+}\dots\text{N})$, (Г) Разница длин координационных связей $d(\text{Zn}^{2+}\dots\text{O})$ и $d(\text{Zn}^{2+}\dots\text{N})$

Еще одной важной особенностью фермент-субстратного комплекса является расстояние нуклеофильной атаки между карбонильным атомом углерода субстрата и

каталитическим HO_w^- . В L1 среднее значение расстояния нуклеофильной атаки составляет $2,67 \pm 0,03 \text{ \AA}$, распределение узкое, значения колеблются в диапазоне $2,62 - 2,76 \text{ \AA}$. Для NDM-1 распределение значительно шире, диапазон составляет $2,57 - 3,30 \text{ \AA}$, среднее значение и стандартное отклонение составляют $2,85 \pm 0,15 \text{ \AA}$. Средние значения для обоих ферментов близки, но форма распределения значительно отличается. В L1 расстояние нуклеофильной атаки колеблется в пределах всего $0,14 \text{ \AA}$; для NDM-1 она увеличивается до $0,73 \text{ \AA}$. Подобно распределениям расстояний, соответствующих нековалентному взаимодействию, наблюдаются узкие распределения для L1 и широкие распределения для NDM-1 для связей C=O и C-N (рисунок 3.2.1.3 Б, В).

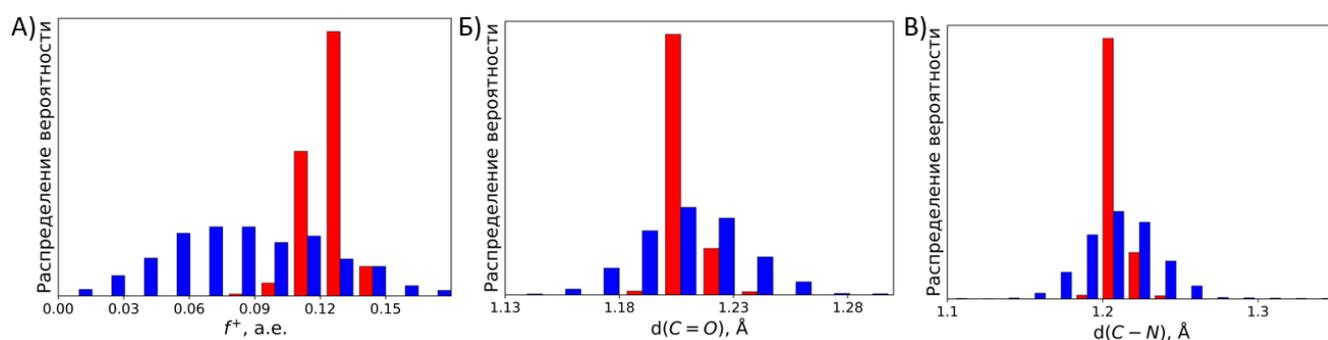


Рисунок 3.2.1.3. (А) Распределение индексов электрофильности Фукуи, f^+ , на карбонильном атоме углерода имипенема в фермент-субстратных комплексах с L1 (красный) и NDM-1 (синий), (Б) длина связи C=O в карбонильном фрагменте β -лактамного кольца, $d(\text{C}=\text{O})$, (В) длина связи C-N β -лактамного кольца, $d(\text{C}-\text{N})$

Несмотря на различную форму распределения длин карбонильной связи, средние значения одинаковы для обоих ферментов. Это $1,212 \pm 0,003 \text{ \AA}$ и $1,210 \pm 0,021 \text{ \AA}$ для L1 и NDM-1 соответственно. Максимум распределения длин связей C-N смещен в сторону больших значений в NDM-1 по сравнению с L1. Средние значения здесь составляют $1,402 \pm 0,007 \text{ \AA}$ и $1,418 \pm 0,036 \text{ \AA}$ для L1 и NDM-1 соответственно. Разница в $0,16 \text{ \AA}$ в средних значениях существенна для ковалентной связи в циклическом фрагменте молекулы. Причина этого различия может заключаться в совместном действии координационных связей с катионами цинка. Если разница координационных связей близка к нулю, обе координационные связи имеют одинаковую длину и, таким образом, вносят одинаковый вклад в поляризацию связей C-N и C=O. В NDM-1 распределение разности длин координационных связей значительно сдвинуто от нуля (рисунок 3.2.1.3 А). Таким образом, в NDM-1 влияние координационной связи $\text{Zn}^{2+} \dots \text{N}$

более выражено по сравнению с L1. И, как следствие, распределение связи C-N шире и смещено в сторону больших значений.

Реакционность структур фермент-субстратного комплекса анализировалась с помощью электронно-плотностных дескрипторов: 2D-карты лапласиана электронной плотности и атомные индексы электрофильности Фукуи. Были выбраны 500 структур вдоль молекулярно-динамических траекторий, в которых была рассчитана электронная плотность. Было показано, что доля реакционных структур в 2D-картах лапласиана электронной плотности в L1 составляет 100%, в то время как для NDM-1 – 90%. Индексы электрофильности Фукуи представляют собой разницу зарядов Хиршфельда систем в основном электронном состоянии и с добавочным электроном. Среднее значение величины атомных индексов электрофильности Фукуи на карбонильном атоме углерода имипенема также выше для L1. Распределение индексов электрофильности для L1 также является узким и имеет форму нормального распределения. Распределение индексов электрофильности карбонильного атома углерода для NDM-1 наоборот имеет более широкую форму, и в распределении можно выделить несколько фракций. Фракция, обладающая такими же по величине значениями индексов электрофильности атома углерода как в L1, содержит меньше трети всех структур NDM-1-имипенем. Таким образом, разный аминокислотный состав петли L10 влияет на формирование более жесткого активного центра в L1, что приводит к более эффективной активации субстрата ферментом и, как следствие, более низкому энергетическому барьеру и большей стабилизации интермедиата первой стадии реакции.

3.2.2. Расчет механизма реакции гидролиза

Методом КМ/ММ моделирования установлен энергетический профиль каждой элементарной стадии реакции гидролиза имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 (рисунок 3.2.2.1). Установленный механизм реакции гидролиза имипенема металло- β -лактамазами NDM-1 и L1 позволяет сделать выводы о конечных продуктах реакции в активном центре ферментов. Механизм состоит из трех элементарных стадий. Первая реакция заключается в нуклеофильной атаке гидроксид-аниона на карбонильный углерод

β -лактамного кольца, в результате чего образуется тетраэдрический интермедиат I1. Второй этап – разрыв связи C-N, сопровождающийся переносом протона от атома O_w к карбоксильной группе Asp124 в NDM-1 или Asp120 в L1. В состоянии I2 образуется новая карбоксильная группа $C_7O_1O_w$. Последний этап различается для этих ферментов. В L1 протон переносится от Asp120 к атому азота имипенема. В NDM-1 существует два конкурирующих пути: один – это перенос протона на атом азота имипенема, аналогичный реакции в L1, другой – перенос протона от молекулы воды к атому C_3 имипенема.

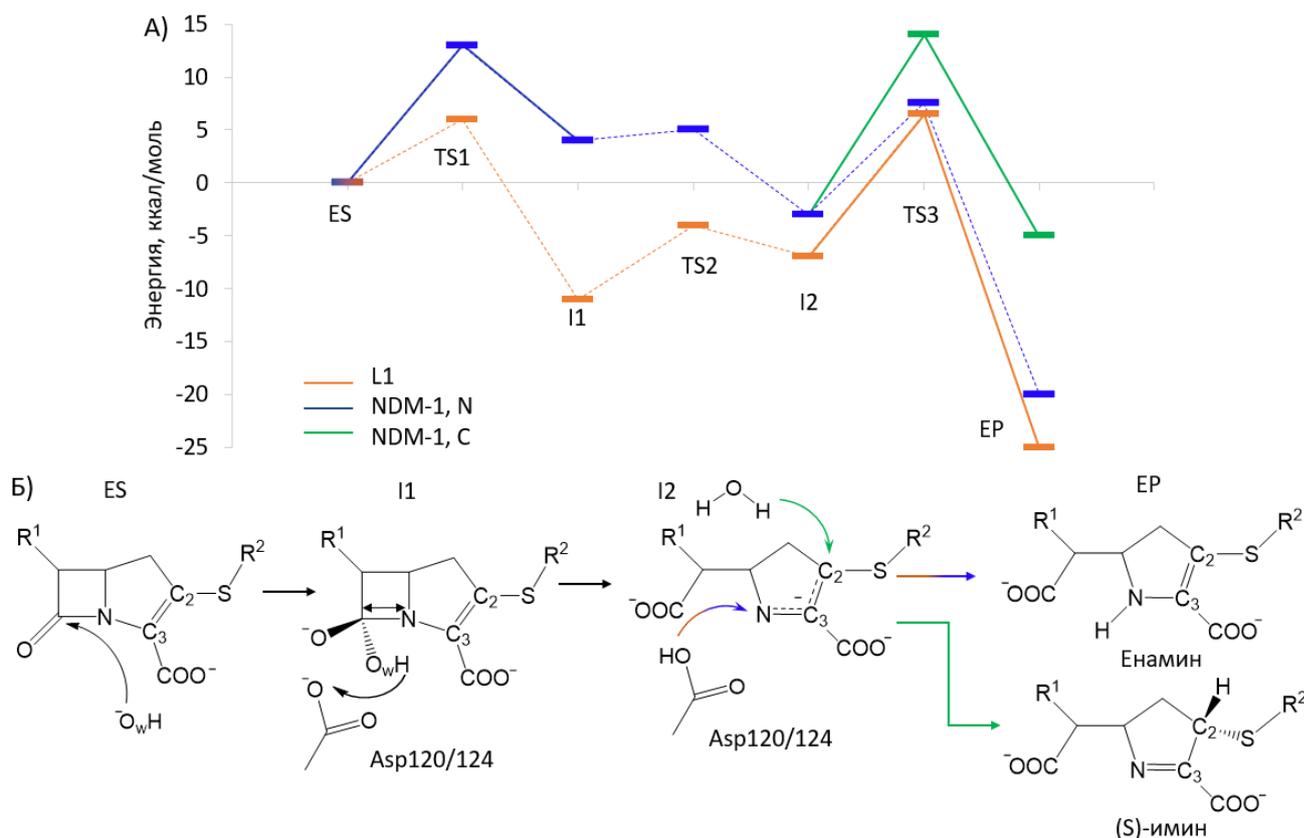


Рисунок 3.2.2.1. Энергетические профили реакции гидролиза имипенема металло- β -лактамазами: в активном центре NDM-1 с образованием N-продукта – синяя линия, в активном центре NDM-1 с образованием C-продукта – зеленая линия, в активном центре L1 – оранжевая линия

Показано, что енаминная форма имипенема (N-продукт) образуется как основной продукт в активном центре NDM-1 и как единственный продукт в активном центре L1. Лимитирующей стадией для NDM-1 является первая стадия реакции – нуклеофильная атака, тогда как для L1 это третья элементарная стадия реакции – протонирование интермедиата. В NDM-1 ввиду строения фермента в активный центр попадает вода, что обуславливает существование альтернативного пути реакции, который приводит к образованию (S)-имина (третья стадия реакции – протонирование не по атому азота

фрагмента (C_2-C_3-N), а по атому C_3). Этот процесс происходит с более высокими энергетическими барьерами. Ниже приводится подробный анализ и сравнение механизмов реакции.

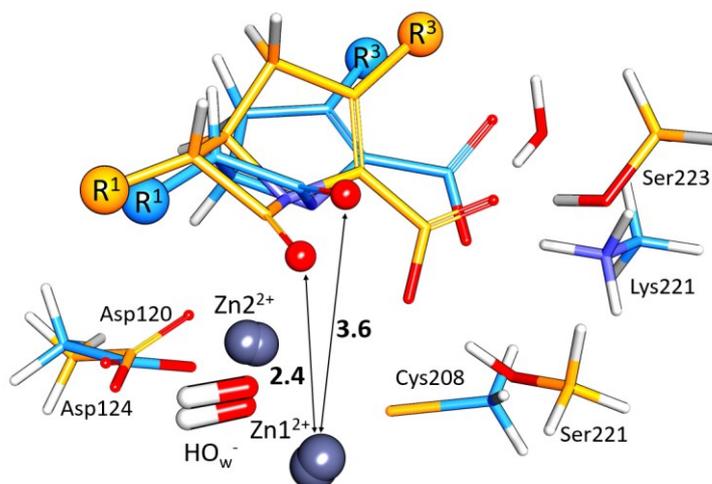


Рисунок 3.2.2.2. Наложение структур фрагментов активного центра фермент-субстратного комплекса L1 (оранжевым) и NDM-1 (голубым). Наложение структур по атомам O_w каталитического гидроксид-аниона, углерода карбоксильной группы аспарагиновой кислоты и ионам цинка. Расстояния в Å

Барьер первой элементарной стадии реакции для NDM-1 существенно выше, чем для L1. Это связано с особенностями строения активного центра ферментов. Как отмечалось выше, ввиду более жесткого активного центра в L1, активация субстрата в L1 эффективнее, чем в NDM-1. Были исследованы структуры фермент-субстратных комплексов на ППЭ. Так как первая стадия реакции – это нуклеофильная атака HO_w^- карбонильного углерода, то были рассмотрены индексы электрофильности Фукуи для этого атома. Обнаружено, что для L1 этот индекс в два раза больше, чем для NDM-1, что связано с разной эффективностью активации субстрата. Взаимодействие Zn^{2+} с карбонильным кислородом играет важную роль в формировании оксианионного центра в фермент-субстратном комплексе. В L1 катион цинка координирует карбонильный кислород, и расстояние между ними равно 2,4 Å, в то время как в NDM-1 это 3,6 Å (рисунок 3.2.2.2). В результате чего поляризуется карбонильная связь и углерод карбонильного фрагмента становится более электрофилен в L1.

У первого интермедиата II образуется ковалентная связь C_7-O_w , а группа HO_w^- образует водородную связь с боковой цепью аспартатного остатка. В NDM-1-II молекула воды, расположенная над имипенемом, образует водородные связи с атомом кислорода O_1 и карбоксильной группой имипенема. Это приводит к более выраженному искажению

плоскостности β -лактамного кольца в NDM-1, при этом соответствующий двугранный угол C_7CCN составляет -14° , а в L1 -6° . Связь C_7-O_w удлинена на $0,1 \text{ \AA}$ в NDM-1 по сравнению с L1. Более короткая ковалентная связь указывает на лучшую стабилизацию тетраэдрического интермедиата, что проявляется в более низкой относительной энергии I1 в L1 по сравнению с NDM-1. Связь C_7-N удлинена на $0,2 \text{ \AA}$ в I1 по сравнению с ES в NDM-1 (рисунок 3.2.2.3 А,Б). Второе переходное состояние не сильно отличается от первого переходного состояния для NDM-1, тогда как в L1 связь C_7-N полностью разрывается и протон переносится на Asp120 (рисунок 3.2.2.3 В).

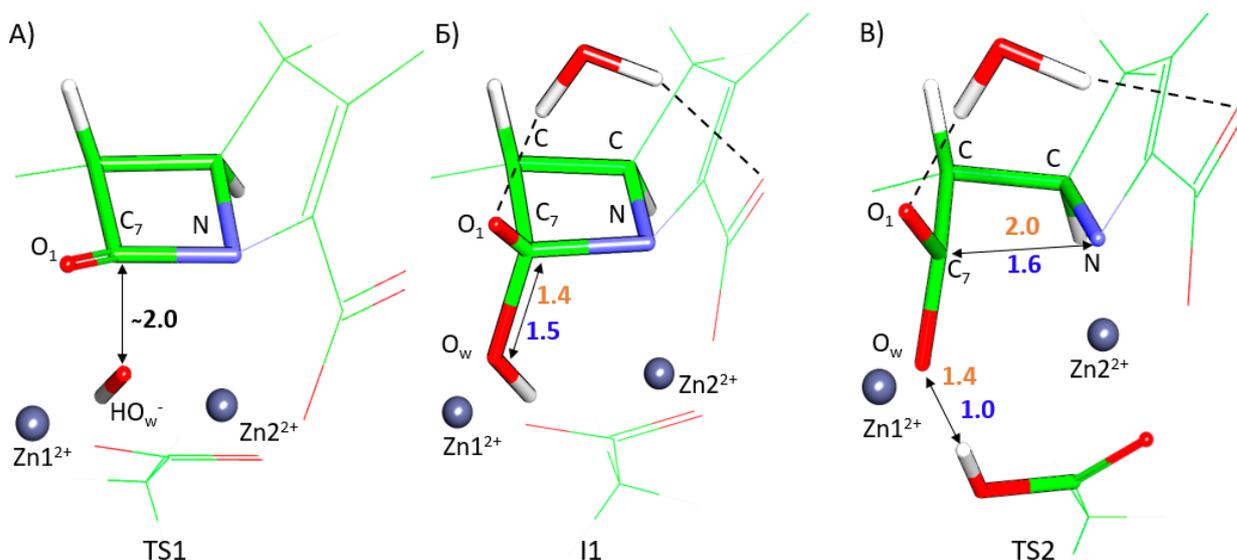


Рисунок 3.2.2.3. Структуры фрагментов активного центра в стационарных точках TS1 (А), I1 (Б) и TS2 (В). Здесь и далее в данном параграфе водородные связи изображены черными пунктирными линиями, а черные стрелки указывают межатомные расстояния в \AA для L1 оранжевым и NDM-1 синим. Молекула воды есть только в активном центре NDM-1

Второй интермедиат реакции является точкой разветвления для дальнейшего пути реакции в NDM-1. β -лактамное кольцо разрывается и двугранный угол C_7CCN становится -35° в NDM-1 и -20° в L1. Молекула воды в NDM-1 меняет партнера по водородной связи с карбоксильной группы имипенема на атом C_2 . Эта реорганизация способствует появлению пути реакции, приводящего к образованию (S)-энантиомера C_2 -протонированного продукта. Другой путь реакции – протонирование по атому N, в результате чего образуется енамин, сходен для обоих ферментов. Расстояния между протоном H_w и атомом азота имипенема составляют $3,0$ и $3,4 \text{ \AA}$ для L1 и NDM-1 соответственно (рисунок 3.2.2.4 А). В NDM-1 расстояние $C_2 \dots N$ на пути протонирования C_2 составляет $2,5 \text{ \AA}$, что длиннее расстояния сильной водородной связи. Профили

эллиптичности по связям N-C₃ и C₃-C₂ отрицательно заряженного фрагмента (C₂-C₃-N)⁻, который представляет собой сопряженную π-систему, может показать, какая резонансная структура доминирует в состоянии I2. Профили эллиптичности оказались практически одинаковы. Связь N-C₃ имеет преимущественно одинарный характер связи с отрицательным зарядом, локализованным в области атома азота (рисунок 3.2.2.4 Б). Для связи C₃-C₂ наблюдается колоколообразный профиль, что указывает на более выраженный характер двойной связи. Более высокие энергетические значения эллиптичности в области C₂ отражают поляризацию связи C₃-C₂ (рисунок 3.2.2.4 В). Таким образом, второй интермедиат реакции для обеих металло-β-лактамаз характеризуется доминирующей резонансной структурой C₂=C₃-N⁻, что объясняет преимущественный путь протонирования азота. C₂-протонирование в активном центре NDM-1 является побочным процессом из-за близкого расположения молекулы воды, образующей слабую водородную связь с атомом C₂.

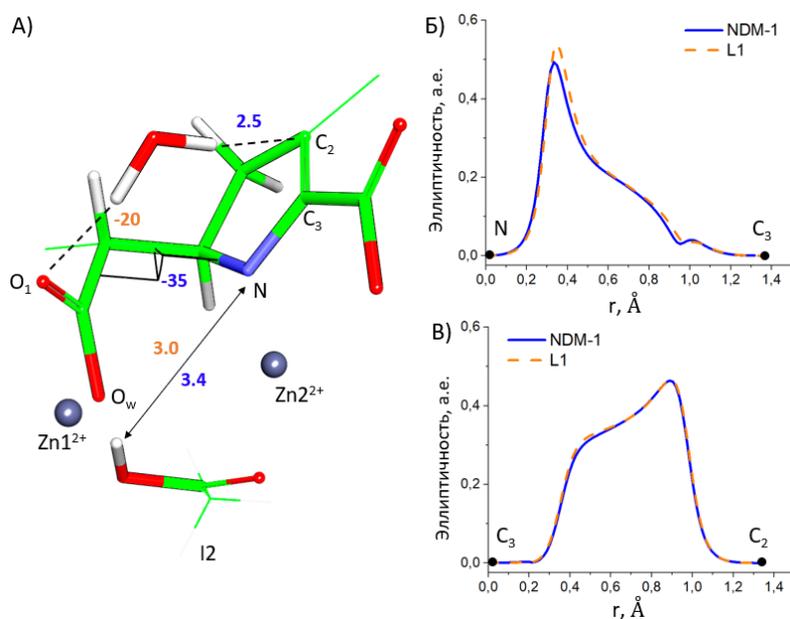


Рисунок 3.2.2.4. (А) Структура I2 (молекула воды только в активном центре NDM-1). Профили эллиптичности по связям N-C₃ (Б) и C₃-C₂ (В) L1 (оранжевый) и NDM-1 (синий)

Структуры активного центра в переходном состоянии третьей реакции предшествующие N-протонированному продукту одинаковы для обоих ферментов. Протон H_w временно связан с атомом O_w и повернут к атому азота имипенема (рисунок 3.2.2.5 А). Длина связей N-C₃ и C₃-C₂ для NDM-1 составляет 1,37 Å. В L1 небольшая асимметрия: связь N-C₃ 1,39 Å, а связь C₃-C₂ 1,36 Å. Это геометрический показатель того, что резонансная структура C₂=C₃-N⁻ более выражена в L1, чем в NDM-1. Это согласуется с анализом эллиптичности электронной плотности по связям N-C₃ и C₃-C₂

(рисунок 3.2.2.5 Б,В): концентрация отрицательного заряда на азоте L1 выше, а на C₂ наоборот, выше в NDM-1. Причиной более высокой локализации отрицательного заряда на атоме C₂ в NDM-1 является близкое расположение молекулы воды, образующей слабую водородную связь с C₂. В структуре NDM-1-C длины связей N-C₃ и C₃-C₂ составляют 1,30 и 1,45 Å соответственно. Протон воды находится на расстоянии 1,30 Å от C₂, в связи с чем C₂ выходит из плоскости кольца. Атом H_w по-прежнему ковалентно связан с карбоксильной группой боковой цепи Asp124. Согласно профилям эллиптичности электронной плотности вдоль связей N-C₃ и C₃-C₂, наблюдается резонансная структура C₂⁻-C₃=N. Отрицательный заряд на C₂ значительно ниже, чем при протонировании по N.

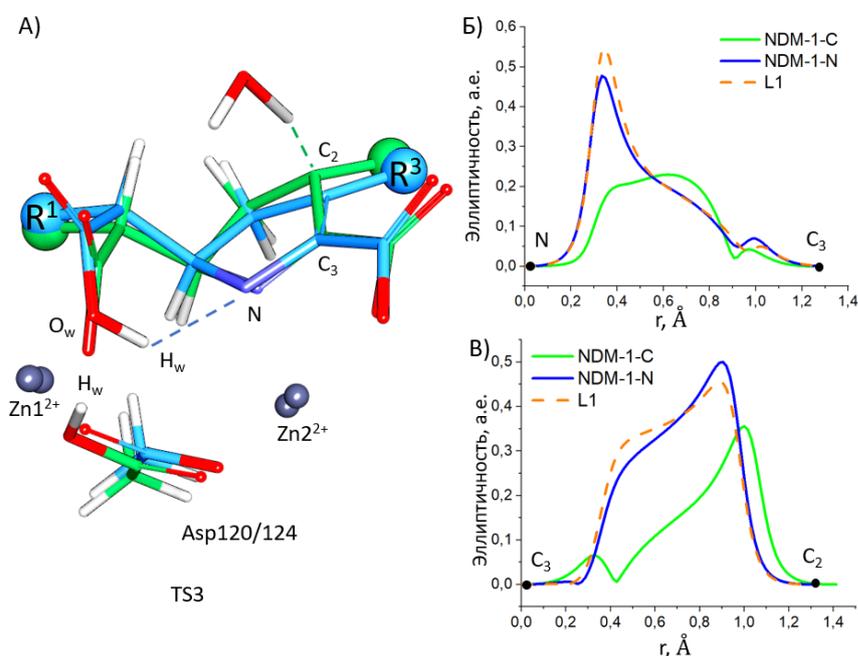


Рисунок 3.2.2.5. (А) Структура TS3 (молекула воды только в активном центре NDM-1). Профили эллиптичности по связям N-C₃ (Б) и C₃-C₂ (В) L1 (оранжевый), NDM-1-N (синий) и NDM-1-C (зеленый)

Интермедиаты I1 и I2 в L1 и интермедиат I2 в NDM-1 стабилизированы относительно комплекса ES. Поэтому они могут накапливаться в ходе реакции. Аналогичный механизм реакции наблюдается при гидролизе нитроцефина в активном центре L1, где ES-комплекс быстро исчезает и наблюдается накопление интермедиата реакции со смещенной в красную сторону полосой поглощения. В спектроскопических исследованиях для гидролиза имипенема NDM-1 показано, что комплекс ES быстро исчезает и что интермедиат накапливается.

Затем появляется и постепенно затухает интермедиат с полосой поглощения, близкой к ES. Чтобы интерпретировать эти спектральные данные и отнести спектральные

полосы к определенным состояниям, были проведены оценки энергий вертикального перехода $S_{0,\min}-S_1$ для всех минимумов на пути реакции имипенема в активном центре NDM-1 на уровне TDDFT. Расчеты показали, что интермедиат I2 имеет энергетическую щель $S_{0,\min}-S_1$ на 1,2 эВ меньшую, чем комплекс ES. Комплекс EP с енамином (N-продуктом) имеет промежуточное расчетное значение энергии вертикального перехода $S_{0,\min}-S_1$ между состояниями ES и I2.

Таким образом, быстрое накопление при смещении в красную полосу поглощения можно отнести к состоянию I2. Состояние, которое образуется позже и постепенно распадается с промежуточным положением максимума полосы поглощения, вероятно, является енамином. В имине сопряженная π -система N-C₃-C₂ восстанавливается до двойной связи N=C₃, которая поглощает в более высокоэнергетической части УФ-спектра и поэтому не наблюдается в проведенных экспериментах (Lisa, 2017). В связи с чем исчезновение спектральной полосы, вероятно относится к енамину, возможно, из-за его таутомеризации в имин после высвобождения из активного центра.

Для изучения механизма таутомеризации в растворе проведены расчёты методом классической молекулярной динамики гидролизованного имипенема в анионном состоянии и протонированного по атому азота в растворе. Каждая молекулярно-динамическая траектория имела длину 250 нс. Оказалось, что заместитель у атома C₂ является крайне подвижным и для него наблюдаются конформации, препятствующие протонированию атома C₂ с одной из двух сторон и открытые конформации, из которых возможно протонирование с образованием обоих энантиомеров. Критериями распознавания конформаций и отнесения их к одному из трех типов служили торсионный угол, показывающий положение заместителя при атоме C₂ имипенема относительно плоскости пирролинового кольца, - C₄C₂SC₁₀, и расстояние между атомом, принимающим протон, C₂, и концевыми атомами заместителя – N₂, C₁₁, N₃ (рисунок 3.2.2.6). Расстояние между атомом C₂ и одним из атомов N₂, C₁₁ или N₃ менее 5 Å соответствует закрытым конформациям, в которых заблокировано одно из направлений протонирования. Положительное значение торсионного угла (заместитель находится над пирролиновым кольцом) определяет конформации, предпочтительные для таутомеризации в (R)-имин ((R)-путь) (рисунок 3.2.2.6 В). Отрицательное значение торсионного угла (заместитель находится под пирролиновым кольцом) соответствует конформациям предпочтительным для таутомеризации в (S)-имин ((S)-путь) (рисунок 3.2.2.6 А). Анализ молекулярно-

динамических траекторий показал, что 61,6% конформаций являются предпочтительными для таутомеризации в (R)-имин, 28,1% в (S)-имин и 10,3% соответствуют открытым конформациям, из которых возможна таутомеризация в оба энантиомера (рисунок 3.2.2.6 Б).

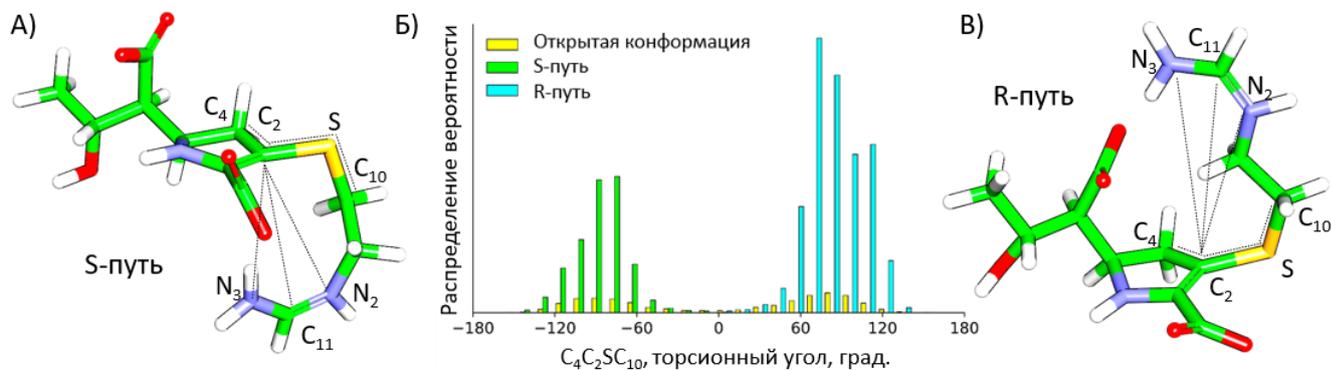


Рисунок 3.2.2.6. Енамин в конформации, предпочтительной для таутомеризации в (S)-имин (А) и в (R)-имин (В). Пунктирными черными линиями показаны расстояния и двугранный угол, выбранные в качестве критериев для отнесения к одному из трех типов конформаций. (Б) Распределение вероятности структур предпочтительных для протонирования в S положение (зеленым), R положение (бирюзовым), открытые конформации (желтым)

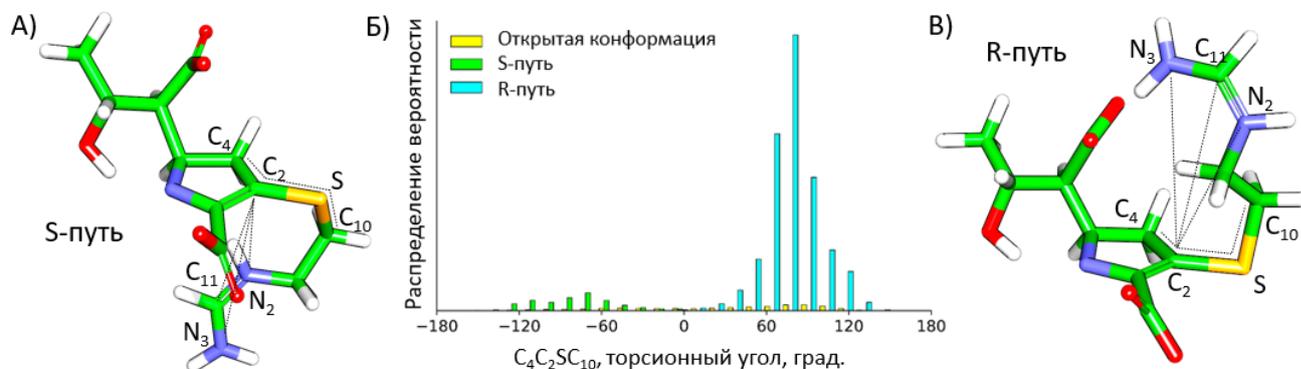


Рисунок 3.2.2.7. Интермедиат (C₂-C₃-N)⁻ в конформации, предпочтительной для таутомеризации в (S)-имин (А) и в (R)-имин (В). Пунктирными черными линиями показаны расстояния и двугранный угол, выбранные в качестве критериев для отнесения к одному из трех типов конформаций. (Б) Распределение вероятности структур предпочтительных для протонирования в S положение (зеленым), R положение (бирюзовым), открытые конформации (желтым)

В литературе отсутствует определенность об одновременной или поэтапной таутомеризации в молекулах типа имипенема. В случае реализации поэтапного механизма таутомеризации подразумевается, что в растворе находится отрицательно

заряженный интермедиат реакции (C_2-C_3-N)⁻. Аналогичный анализ для динамики интермедиата (C_2-C_3-N)⁻ показал, что 85,7% конформаций являются предпочтительными для таутомеризации в (R)-имин, 8,7% в (S)-имин и 5,6% соответствуют открытым конформациям (рисунок 3.2.2.7). Однако в данном случае продукт реакции определяется во многом локализацией отрицательного заряда во фрагменте (C_2-C_3-N)⁻: в структуре енаминной формы протонирование на N и иминной формы на атом C_2 . Для определения изомерной формы в растворе было проведено моделирование молекулярной динамики с квантово-механическими потенциалами, затем для 50 кадров из траектории рассчитывались порядки связи по Лапласиану. Было показано, что для структур R- и S-пути наблюдается исключительно иминная форма. Для открытых конформаций характерны обе резонансные формы (рисунок 3.2.2.8).

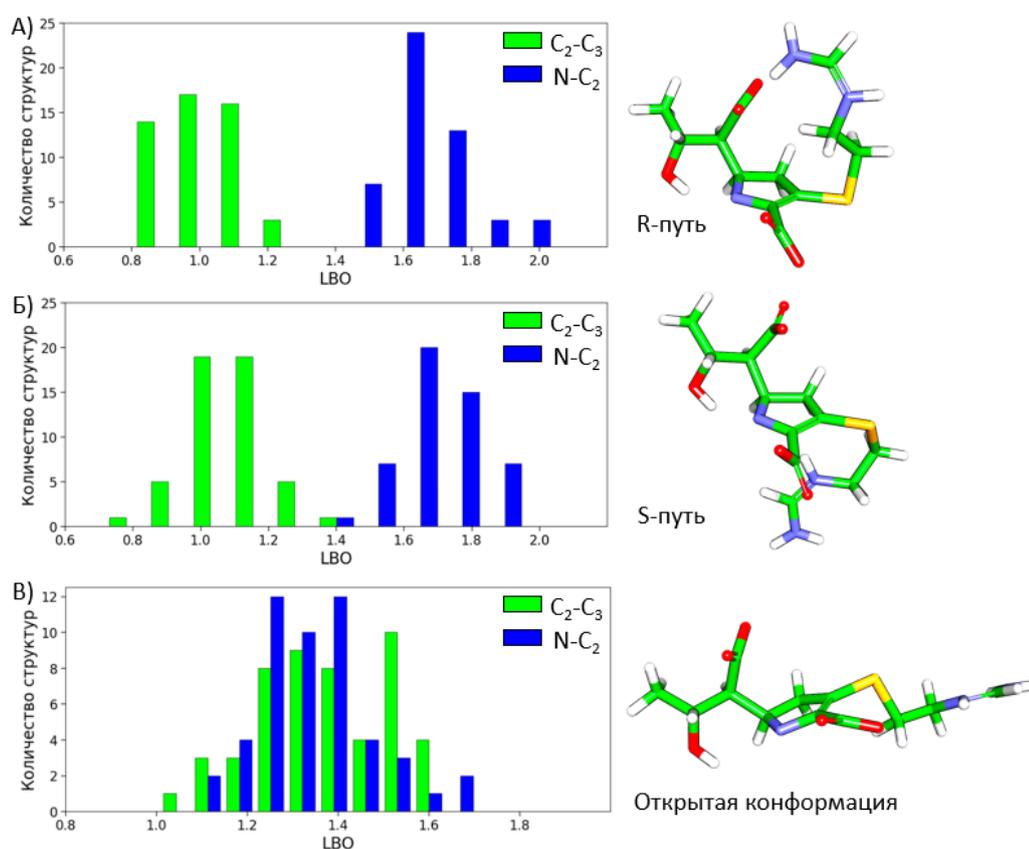


Рисунок 3.2.2.8. Распределения порядков связей по Лапласиану C_3-C_2 (зеленый) и $N-C_2$ (синий), рассчитанные для гидролизованного иминопепемида с отрицательно заряженным фрагментом (C_2-C_3-N)⁻ в водном растворе в конформациях, способствующих образованию (R)-имины (А) и (S)-имины (Б), а также для открытых конформаций (В)

Таким образом, в результате исследования показано, что аминокислотный состав петли L10 определяет ход реакции. В ферментативной реакции в активном центре

металло- β -лактамаз L1 и NDM-1 преимущественно происходит образование продукта гидролиза имипенема, протонированного по атому азота. Таутомеризация в (R)-имин происходит уже после выхода продукта в раствор. Данные расчётов согласуются с результатами экспериментальных исследований по время-разрешенной УФ-видимой и ЯМР спектроскопии, доступными из литературных источников.

3.3. Молекулярное моделирование ингибирования PBP2 из *Neisseria Gonorrhoeae* и его мутантов антибиотиком цефтриаксоном

3.3.1. Анализ активации субстрата ферментом

В работе рассматривается реакция PBP2 из штаммов FA19, 35/02 и H041 *N. gonorrhoeae* с цефтриаксоном, который на сегодняшний день является единственным эффективным лекарственным средством для лечения гонореи. Как отмечалось ранее, за рост резистентности в 35/02 ответственны три мутации, – Ile312Met, Val316Thr и Gly545Ser; в H041, – Ala311Val, Val316Pro, Thr483Ser. Мутации в 311, 312 и 316 остатках связаны с изменением положения каталитической пары Ser310 и Lys313. Мутация Gly545Ser изменяет положение субстрата в активном центре (рисунок 3.3.1.1). В ходе выполнения этой задачи проведен анализ фермент-субстратных комплексов и установлены механизмы реакции ацилирования для PBP2 из штаммов FA19, 35/02 и H041. В качестве начального приближения для координат атомов системы использовались кристаллические структуры ацил-ферментного комплекса дикого штамма PBP2^{FA19} с цефтриаксоном (PDB ID 6P54), аро-формы PBP2^{35/02} (PDB ID 6VBL) и ацил-ферментного комплекса PBP2^{H041} с цефтриаксоном (PDB ID 6VBD). При построении модели была выбрана депротонированная форма Lys313, так как это необходимо для совершения нуклеофильной атаки. В ближайшем окружении активного центра нет аминокислотных остатков способных принять на себя протон Lys313. Скорее всего он переходит на карбоксильную группу антибиотика. Неясно переносится ли протон с этой карбоксильной группы куда-то до реакции ацилирования или он так и остается на

карбоксовой группе. Однако переноса протона относится к стадии преацилирования – подготовке к нуклеофильной атаке, тогда как ацилирование по-прежнему происходит по известному пути: нуклеофильная атака, разрыв β -лактамного кольца и протонирование азота. И так как задачей является определения изменений в механизме и активации субстрата ферментом с появлением мутаций, то мы сознательно пренебрегли протонированным состоянием Lys313.

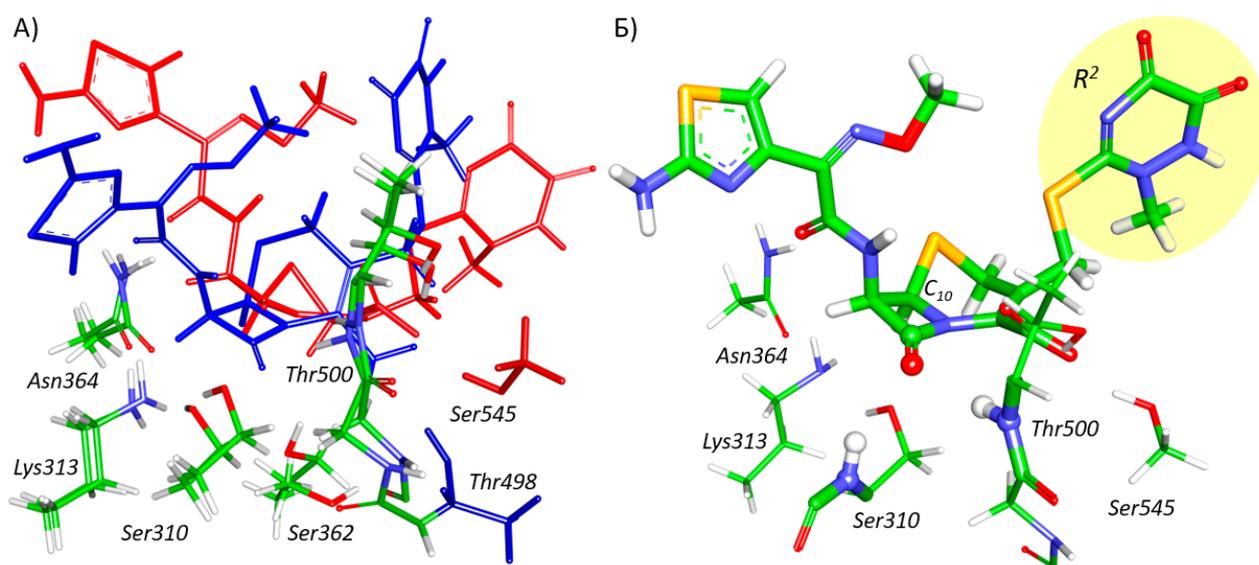


Рисунок 3.3.1.1. А) Наложение структур связанных с цефтриаксоном активных центров $RBP2^{FA19}$ (синим) и $RBP2^{H041}$ (красным). Выравнивание по атомам азота и углерода основных цепей Ser310, Lys313 и Thr500. Б) Квантовая часть фермент-субстратного комплекса $RBP2^{FA19}$. Сферами выделен оксианионный центр

Активный центр $RBP2$ из мутантных штаммов существенно отличается от такового в $FA19$. В $FA19$ субстрат находится глубоко в каталитическом кармане, взаимодействует посредством водородных связей с остатками Ser362 и Lys497, а карбоксовая группа субстрата взаимодействует с остатками Thr500 и Thr498. В мутантных штаммах субстрат не заходит так глубоко в каталитический карман из-за замены Gly545Ser. Ser545 связывается с консервативной карбоксовой группой цефтриаксона. Рисунок 3.3.1.1 иллюстрирует разницу положения субстрата в активном центре $FA19$ (синим) и $H041$ (красным). Данное изменение положения субстрата отражается в формировании оксианионного центра и механизме реакции.

Квантовая часть для $RBP2^{FA19}$ включала в себя молекулу субстрата, каталитические остатки Lys313 и Ser310, боковые цепи аминокислотных остатков, образующих водородные связи с субстратом, – Lys497, Ser362, Thr500 и Thr498. Квантовая часть

PBP2^{35/02} и PBP2^{H041} отличается от PBP2^{FA19} ввиду наличия мутации Gly545Ser, которая изменяет положение субстрата в активном центре. Таким образом, в КМ часть для мутантных форм включались: субстрат, каталитические остатки Lys313 и Ser310, Thr500 и Ser545, образующие водородные связи с карбоксильной группой цефтриаксона.

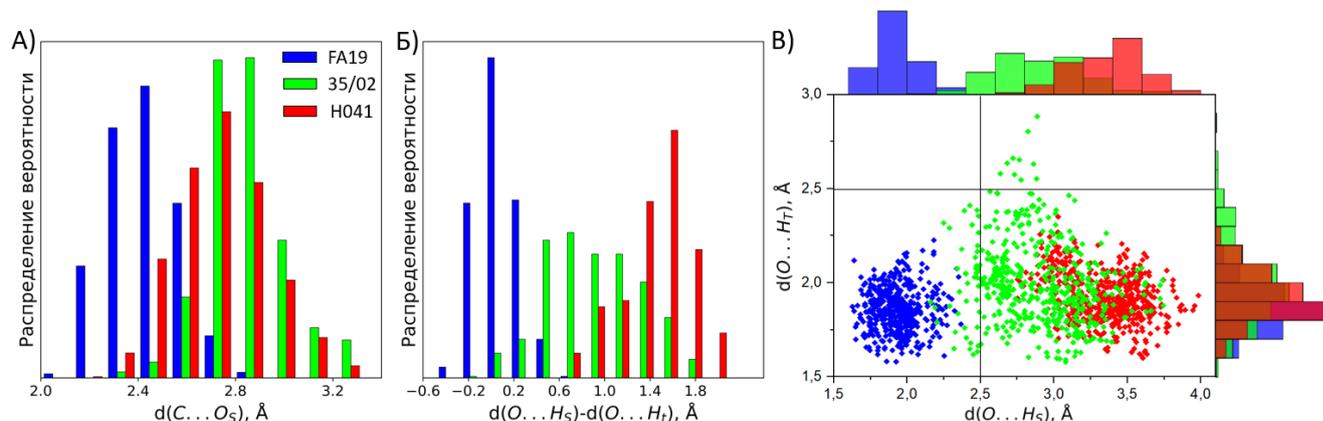


Рисунок 3.3.1.2. (А) Распределение расстояний нуклеофильной атаки $d(C...O_S)$; (Б) распределение разниц длин водородных связей, формирующих оксианионный центр $d(O...H_S) - d(O...H_T)$ и (В) совместное распределение водородных связей $d(O...H_S)$ и $d(O...H_T)$ для PBP2^{FA19} (синим), мутантов PBP2^{35/02} (зеленым), PBP2^{H041} (красным)

На рисунке 3.3.1.2 А представлено распределение расстояний нуклеофильной атаки. Все значения нуклеофильной атаки не превышают 3,4 Å. Среднее значение расстояний нуклеофильной атаки для PBP2^{FA19} составляет $2,43 \pm 0,14$ Å, для PBP2^{35/02} $2,83 \pm 0,16$ Å и для PBP2^{H041} $2,73 \pm 0,19$ Å. Расстояния нуклеофильной атаки для дикого типа значительно короче. В исследуемых фермент-субстратных комплексах оксианионный центр формируется за счет образования водородных связей между карбонильным кислородом антибиотика и атомами водорода NH групп основных цепей Ser310 и Thr500 (рисунок 2.9.1 А).

Распределение водородной связи между NH группой основной цепи Thr500, $d(O...H_T)$, и карбонильным кислородом остается практически одинаковым для всех рассматриваемых систем. Распределение водородной связи между NH группой основной цепи Ser310, $d(O...H_S)$, и карбонильным кислородом смещается в сторону больших значений с ростом резистентности (рисунок 3.3.1.2 В). Для PBP2^{FA19} обе связи укладываются в значения до 2,4 Å. Для PBP2^{35/02} и PBP2^{H041} $d(O...H_S)$ укладывается в диапазон от 2,4 – 4,0 Å. Для PBP2^{H041} связи $d(O...H_S)$ практически нет. Была рассчитана разница длин водородных связей, $d(O...H_S) - d(O...H_T)$ для наглядной иллюстрации вклада каждой из связей (рисунок 3.3.1.2 Б). В PBP2^{FA19} наблюдается более узкое

распределение, вершина, которого приходится на значение 0 \AA , что говорит о том, что длины водородных связей, формирующих оксианионный центр, приблизительно равны друг другу в каждом кадре траектории. В RBP2 из штаммов 35/02 и H041 средние значения сдвинуты на 0.8 и 1.6 \AA соответственно, что говорит о том, что $d(\text{O}\dots\text{H}_S)$ значительно больше в каждом кадре траектории и вносит меньший вклад в формирование оксианионного центра. Таким образом, в диком типе оксианионный центр формируется двумя водородными связями (между карбонильным кислородом и NH фрагментами основных цепей Ser310 и Thr500), но с ростом резистентности оксианионный центр начинает формироваться только одной водородной связью (между карбонильным кислородом и NH фрагментом основной цепи Thr500).

Анализ эффекта активации цефтриаксона RBP2 лапласианом электронной плотности показал, что с ростом резистентности данных RBP2 доля реакционных структур снижается. В RBP2 из штамма дикого типа обнаружено 30% реакционных структур фермент-субстратных комплексов. В мутантных формах доля реакционноспособных частиц снижается до 16% для RBP2^{35/02} и 12% для RBP2^{H041}, что говорит о худшей активации субстрата в RBP2.

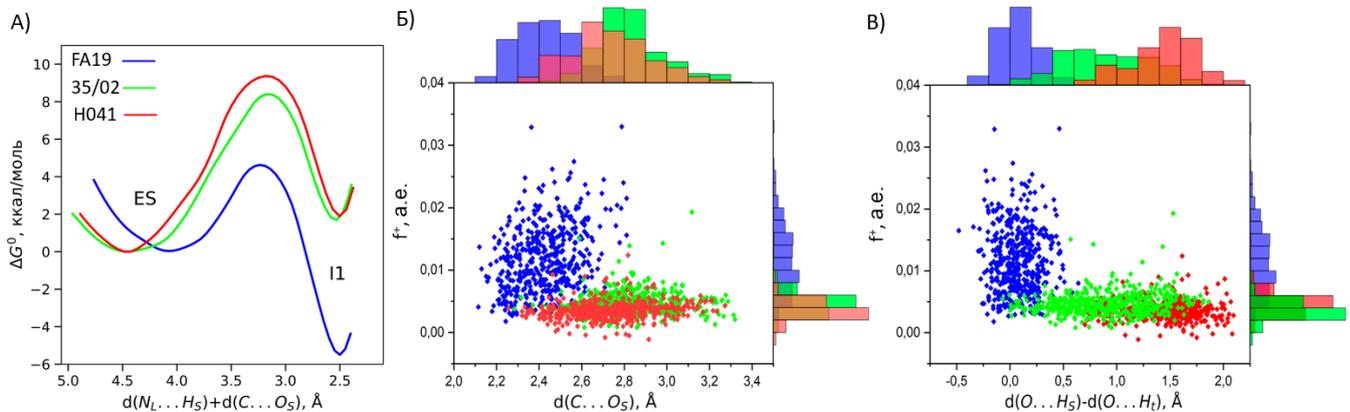


Рисунок 3.3.1.3. (А) Энергетические профили первой стадии реакции, нуклеофильной атаки ацилирования RBP2 цефтриаксоном. (Б) Распределение расстояний нуклеофильной атаки $d(\text{C}\dots\text{O}_S)$ и (В) распределение разницы длин водородных связей, формирующих оксианионный центр $d(\text{O}\dots\text{H}_S) - d(\text{O}\dots\text{H}_T)$ для дикого типа RBP2^{FA19} (синим), мутантов RBP2^{35/02} (зеленым), RBP2^{H041} (красным)

На рисунке 3.3.1.3 Б,В показаны распределения индексов электрофильности Фуки для карбонильного атома углерода цефтриаксона в зависимости от распределений расстояния нуклеофильной атаки и разницы длин водородных связей. RBP2^{FA19} имеет более широкое распределение с большим средним значением по сравнению с двумя

другими RBP2, $0,0117 \pm 0,0053$ а.е., тогда как для RBP2^{35/02} и RBP2^{H041} эти значения составляют $0,0047 \pm 0,0018$ и $0,0035 \pm 0,0014$ а.е. соответственно. Высокие значения индекса электрофильности Фукуи, по-видимому, в большей степени определяются комбинированным действием водородных связей, а не расстоянием нуклеофильной атаки. Так как для всех соединений большая доля структур демонстрирует расстояние нуклеофильной атаки меньше $3,0 \text{ \AA}$. В то же время высокие индексы электрофильности Фукуи наблюдаются у значений $0,0 \text{ \AA}$ разницы водородных связей. Более высокие атомные индексы электрофильности Фукуи соответствуют атомам с более выраженными электрофильными свойствами. Таким образом, можно заключить, что в субстрате RBP2^{FA19} активация ферментом выражена значительно сильнее. На рисунке 3.3.1.3 А изображен энергетический барьер реакции нуклеофильной атаки для сравнения на одном графике для трех изучаемых систем. Величина энергетического барьера реакции для RBP2^{FA19} составляет $4,6$ ккал/моль, для RBP2^{35/02} $8,4$ ккал/моль и для RBP2^{H041} $9,4$ ккал/моль. Интермедиат реакции стабилизирован относительно фермент-субстратного комплекса в RBP2 из штамма дикого типа, в то время как в RBP2 из мутантных штаммов тетраэдрический интермедиат дестабилизирован на 5 ккал/моль. Полученные энергетические барьеры возрастают с уменьшением активации субстрата и ростом резистентности согласно экспериментальным значениям k_2/K_S .

3.3.2. Расчет механизма реакции гидролиза

Механизм реакции от фермент-субстратного комплекса к ацил-ферменту состоит из трех элементарных стадий для RBP2^{FA19} (рисунок 3.3.2.1). Первая стадия представляет собой согласованный процесс переноса протона с атома кислорода боковой цепи остатка Ser310 на аминогруппу боковой цепи остатка Lys313 и образование ковалентной связи между карбонильным атомом углерода цефтриаксона и атомом кислорода остатка Ser310. Как отмечалось выше барьер первой стадии реакции составляет $4,6$ ккал/моль. II стабилизирован относительно ES на $5,5$ ккал/моль. Второй стадией реакции является расщепление β -лактамного кольца и протонирование атома азота β -лактамного кольца. Здесь координата реакции также является комплексной и представляет собой сумму трех

расстояний: $d(C...N)$ соответствует разрыву цикла, $d(H_L...N_L)$ – перенос протона от атома азота Lys313 и $d(H_{S362}...O_{S362})$ — перенос протона от атома кислорода Ser362. Энергетический барьер второй элементарной стадии составляет 2,3 ккал/моль, а I2 стабилизирован на 20 ккал/моль по отношению к I1. Третий элементарный шаг – отрыв уходящей группы цефтриаксона, R^2 , и протонные перегруппировки: протон Ser362 возвращается к аминогруппе Lys313, а протон азота цефтриаксона возвращается к Ser362. Удаление уходящей группы вызывает перераспределение двойных связей в π -сопряженном фрагменте субстрата: образуется двойная связь между азотом и углеродом тиазольного кольца. Величина энергетического барьера третьей стадии составляет 17 ккал/моль.

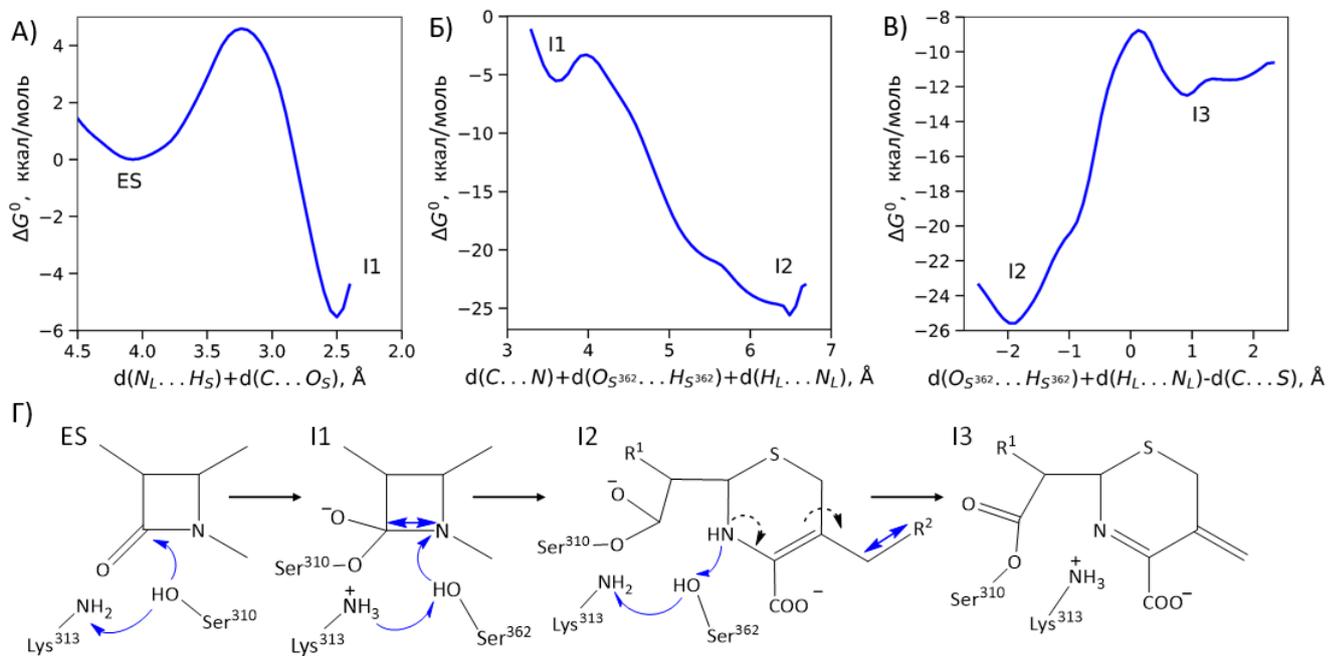


Рисунок 3.3.2.1. Профили энергии Гиббса (А-В) элементарных стадий реакции ацилирования в комплексе RBP2^{FA19}-цефтриаксон. (Г) Молекулярный механизм реакции; синие стрелки – координаты реакции; пунктирные черные стрелки показывают перераспределение электронных пар

Как показано выше, цефтриаксон иным образом связывается с RBP2 из мутантных штаммов, что отражается на механизме реакции. Общая реакция ацилирования протекает в две элементарные стадии в RBP2 из мутантных штаммов по сравнению с тремя стадиями в RBP2^{FA19}. Второй этап заключается в одновременном расщеплении связи C-N β -лактамного кольца и отщепление уходящей группы R^2 антибиотика. Этот процесс описывает координата реакции равная сумме расстояний $d(C...N)$ и $d(C...S)$. Энергетический барьер второй элементарной стадии реакции составляет 2,8 и 6,7

ккал/моль для PBP2^{35/02} и PBP2^{H041} соответственно. Реакция ацилирования приводит к стабилизации состояния I2 на 12 и 4 ккал/моль для PBP2^{35/02} и PBP2^{H041} соответственно (рисунок 3.3.2.2).

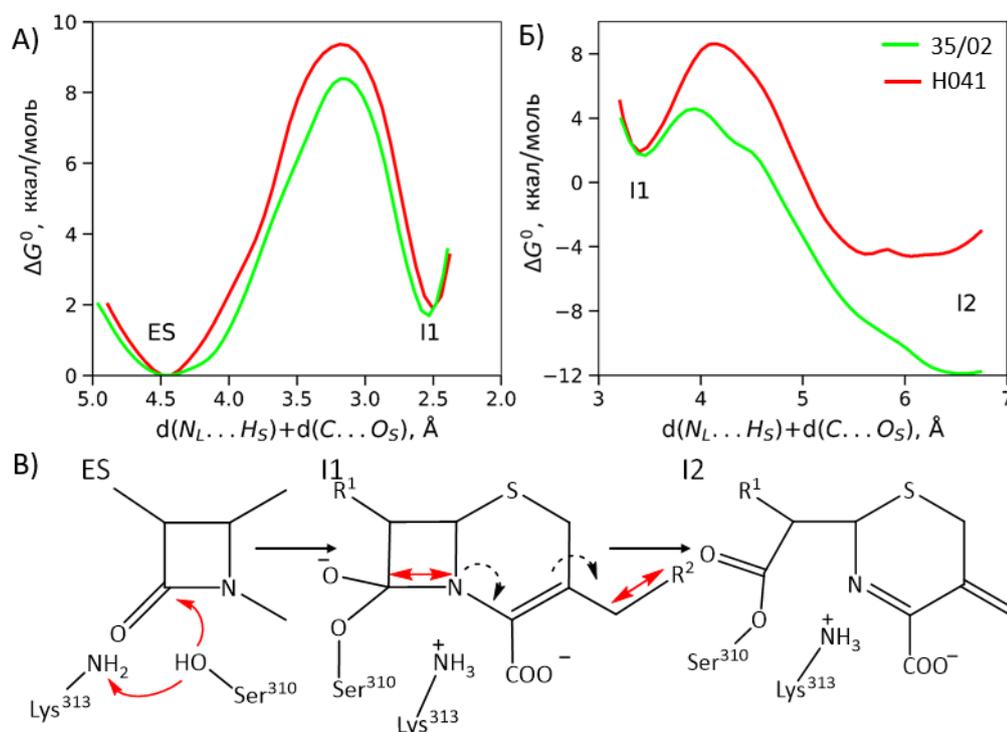


Рисунок 3.3.2.2. Профили энергии Гиббса (А-Б) элементарных стадий реакции ацилирования цефтриаксоном PBP2^{35/02} и PBP2^{H041}. (В) Молекулярный механизм реакции; красные стрелки – координаты реакции; пунктирные черные стрелки показывают перераспределение электронных пар

3.3.3. Анализ связывания цефтриаксона с PBP2

Новое положение субстрата в каталитическом кармане также влечет за собой изменения сродства к антибиотику. Известно, что группа экспериментаторов напрямую пыталась определить константу связывания методом изотермической титрационной калориметрии для данных ферментов. Определить таким образом константу связывания для мутантных форм не удалось ввиду слишком слабого сродства к антибиотикам. Однако для PBP2^{FA19} удалось установить значение K_S .

Методом SMD субстрат вытягивался из активного центра фермента и затем методом зонтичной выборки был рассчитан профиль энергии связывания PBP2^{35/02} с

цефтриаксоном по координате реакции $d(C10_{Cro}...CA_{Ser476})$ (рисунок 3.3.3.1 А). Однако количественное определение константы связывания расчетными методами не дало надежных результатов. Так как расчетная константа связывания отличалась от известной для RVP2^{FA19} экспериментальной на пять порядков. Ниже приведен график распределений вероятностей координат реакции по каждому окну, центрированному по ξ_0 (рисунок 3.3.3.1 Б), на котором видно, что все распределения имеют гауссовскую форму и перекрываются между собой. На графике нет неописанных областей вдоль координаты реакции, что показывает, что подобная форма профиля энергии Гиббса не связана с проблемами обработки профиля.

Известно, что сродство к субстрату в ряду данных RVP2 связано с конформационными состояниями петли β_3 - β_4 в RVP2. Первое конформационное состояние характеризуется более вытянутой петлей β_3 - β_4 , которая ближе придвинута к белку, и сопряжено с низкой аффинностью RVP2, во втором же состоянии петля β_3 - β_4 более скручена, отодвинута от белка, – такое состояние способствует связыванию.

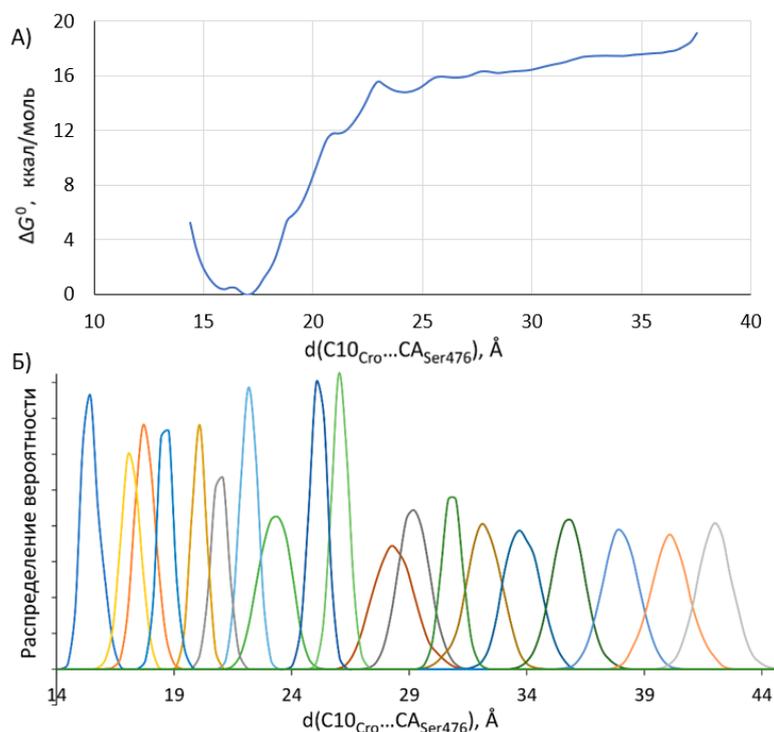


Рисунок 3.3.3.1. А) Энергетический профиль связывания RVP2^{FA19} с цефтриаксоном; Б) распределения вероятностей координат реакции в каждом окне вдоль координаты реакции вытягивания цефтриаксона из каталитического кармана RVP2^{FA19}

Для конформационного анализа петли β_3 - β_4 были рассчитаны молекулярно-динамические траектории общей длиной 1 мкс для каждой системы. Динамический

сетевой анализ был проведен для идентификации сообществ, то есть структурных областей белка, характеризующихся скоррелированным движением. Метод выявил 17 сообществ в RBP2^{FA19}, 11 сообществ в RBP2^{35/02} и 14 сообществ в RBP2^{H041}. В RBP2^{FA19} динамический сетевой анализ показывает, что петля β_3 - β_4 движется независимо от остального белка и демонстрирует большой набор конформаций в отличие от RBP2 из мутантных штаммов. Петля выделена в отдельное семейство с 502 по 513 остатка за исключением 506, который представляет собой отдельное семейство из одного аминокислотного остатка (рисунок 3.3.3.2 А, желтый и красный). Остатки 514 и 500 входят в другое семейство, объединенное с остальной частью белка (рисунок 3.3.3.2 А, темно-серый). 501 остаток относится к другому семейству с обратной стороны от темно-серого (рисунок 3.3.3.2 А, оловянный). На петле присутствует множество длинных тонких ребер, соединяющих аминокислотные остатки петли, которые в плоском состоянии находятся далеко друг от друга. Например, 510 с 505 и 507 с 504. В RBP2^{35/02} результат сильно отличается: петля практически полностью, с 498 по 518 остаток входит в единое сообщество с малоподвижным участком белка (рисунок 3.3.3.2 Б, желтый). Этот участок в RBP2^{FA19} выделен темно-серым. Единственный остаток, не входящий в данное сообщество – 502, он входит в другое сообщество, по аналогии с 501 в RBP2^{FA19} (рисунок 3.3.3.2 Б, оловянный). Кончик петли менее подвижен, чем в RBP2^{FA19}, не имеет ребра между 507 и 504 остатками, однако есть между 506 и 513, что говорит об изгибах кончика петли. В RBP2^{H041} петля с 502 по 513 остатка входит в общее сообщество с малоподвижной частью белка (рисунок 3.3.3.2 В, желтый). 501 и 514 входят в сообщество, изображенное темно-серым, тоже объединение, что и в RBP2^{FA19}. Единственный остаток с кончика петли не в желтом сообществе – это 508, он входит в сообщество, расположенное под β_3 - β_4 (рисунок 3.3.3.2 В, оранжевый). В самой петле находится множество коротких утолщенных ребер, соединяющих близко расположенные друг к другу аминокислотные остатки. Например, нет общих ребер между 507 и 504 остатками как в варианте RBP2^{FA19} или между 506 и 513 как в варианте RBP2^{35/02}, так как, чтобы этим остаткам оказаться рядом, петле нужно изогнуться, а она практически всю динамику находится в плоском положении. Объединив эти данные с экспериментальными исследованиями, можно заключить, что просматривается градация в подвижности петли: с ростом резистентности петля становится менее подвижной и плоской.

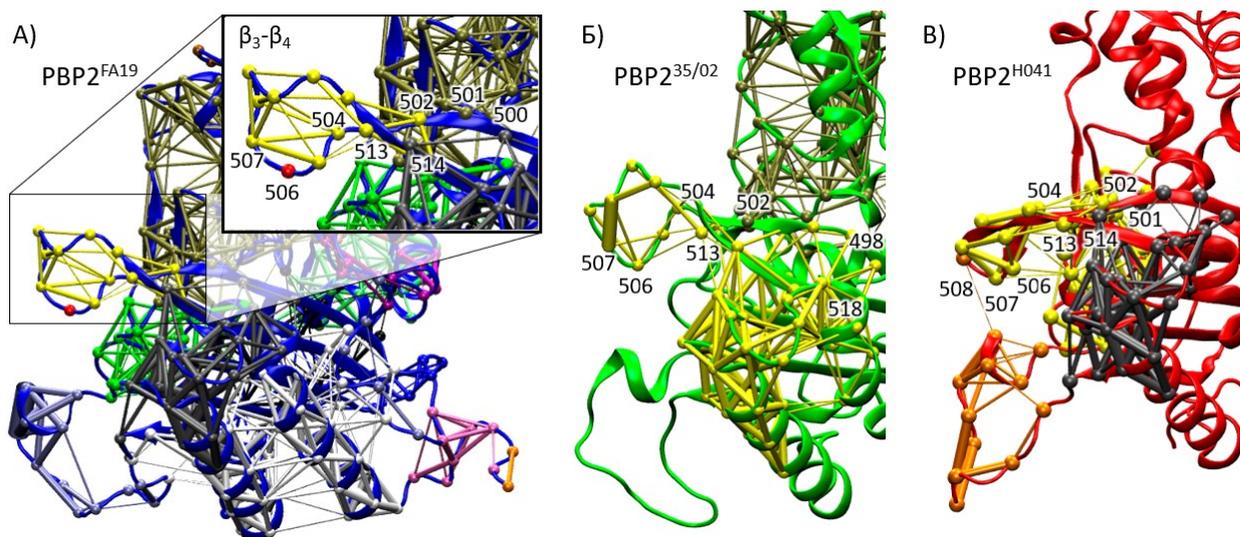


Рисунок 3.3.3.2. Сообщества, полученные при динамическом сетевом анализе 1 мкс траекторий А) PBP2^{FA19} (синий), Б) PBP2^{35/02} (зеленый) и В) PBP2^{H041} (красный); петля β_3 - β_4 выделена. Ребра сообществ показаны палочками, а узлы – сферами

3.4. Определение электронных факторов, влияющих на скорость гидролиза ряда цефалоспориновых антибиотиков металло- β -лактамазой L1

3.4.1 Анализ электронной плотности в структуре переходного состояния

При моделировании реакции гидролиза окрашенного субстрата цефалоспоринового ряда нитроцефина в качестве начального приближения использовались координаты тяжелых атомов из кристаллической структуры комплекса металло- β -лактамазы L1 из *Stenotrophomonas maltophilia* с гидролизованным моксалактамом (PDB ID: 2AIO). KM часть системы включала в себя субстрат, катионы цинка с координационными сферами, каталитический гидроксид анион, остатки активного центра, образующие водородные связи. Полученная ранее равновесная геометрическая конфигурация переходного состояния лимитирующей стадии реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 использовалась в качестве начальной структуры для исследуемых антибиотиков цефалоспоринового ряда (Khrenova, 2018). В структуре I2 нитроцефина проводилась замена заместителей (R^1 и R^2) и производился

поиск стационарных точек на ППЭ. Данная стадия реакции заключается в переносе протона от аспарагиновой кислоты к атому N_S субстрата, который сопровождается разрывом координационной связи $N_S \dots Zn^{2+}$. Однако расстояние переноса протона превышает длину водородной связи. Переходное состояние стабилизируется за счет образования временной ковалентной связи между переносимым атомом водорода и атомом O_S субстрата (рисунок 3.4.1.1 Б).

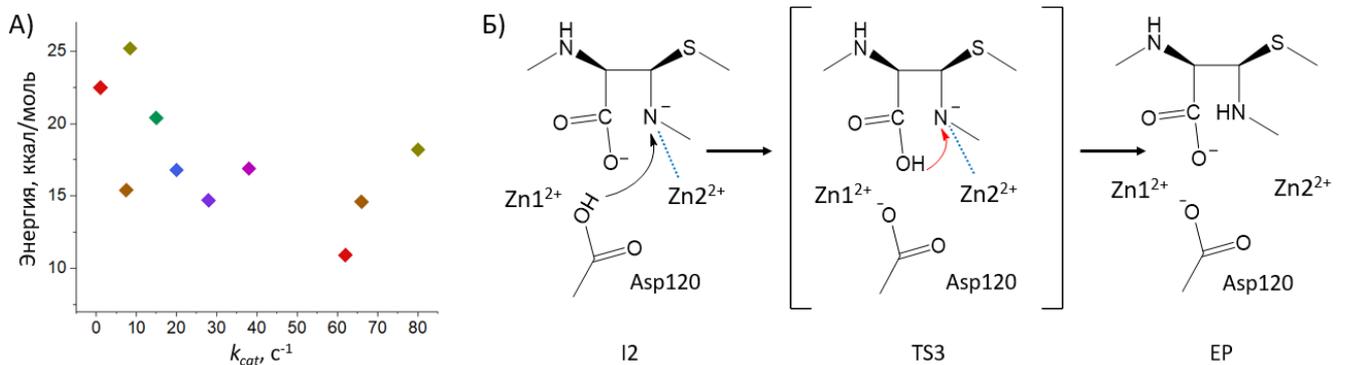


Рисунок 3.4.1.1. А) График зависимости величины энергетического барьера, полученного методом КМ/ММ, от экспериментальных значений k_{cat} ; Б) схема реакции

В целях получить уравнение, связывающее экспериментальные константы скорости реакции и расчетные квантово-механические величины в первую очередь были рассмотрены расчетные энергетические барьеры реакции (рисунок 3.4.1.1 А). Вычисленные энергетические барьеры лимитирующей стадии и значения экспериментальных каталитических констант не коррелируют друг с другом. Это связано с тем, что полная энергия системы содержит заметные погрешности расчета квантово-механической и молекулярно-механической подсистем. Например, для субстрата нитроцефина расчетная константа скорости $3 s^{-1}$, а наблюдаемая $20 s^{-1}$. В переводе на энергии ошибка составляет всего 1,1 ккал/моль. С вычислительной точки зрения это является хорошей оценкой для подхода КМ/ММ. Однако с экспериментальной точки зрения ошибка в 6,7 раз является непозволительно высокой. Таким образом, полная энергия системы не позволяет описать наблюдаемые параметры k_{cat} стационарной кинетики Михаэлиса-Ментен для гидролиза субстратов цефалоспоринового ряда L1. Для подробного анализа активного центра фермента и поиска ключевых взаимодействий применен подход QTAIM для состояний второго интермедиата реакции (в контексте полной реакции) и переходного состояния реакции для десяти исследуемых антибиотиков. Из полученных критических точек необходимую информацию несут только критические точки связи. Поэтому далее были выбраны критические точки связи,

находящиеся в области активного центра, где происходят акты разрыва и образования ковалентных, координационных и водородных связей на лимитирующей стадии реакции (рисунок 3.4.1.2). В структуре интермедиата выделены две КТС, одна на линии водородной связи $H...O_s$, вторая на линии координационной связи $N_s...Zn^{2+}$. В структуре переходного состояния КТС-1 находится на линии связи $N_s...H$, КТС-2 на линии координационной связи $N_s...Zn^{2+}$, а КТС-3 на линии водородной связи $H...O_{Asp120}$.

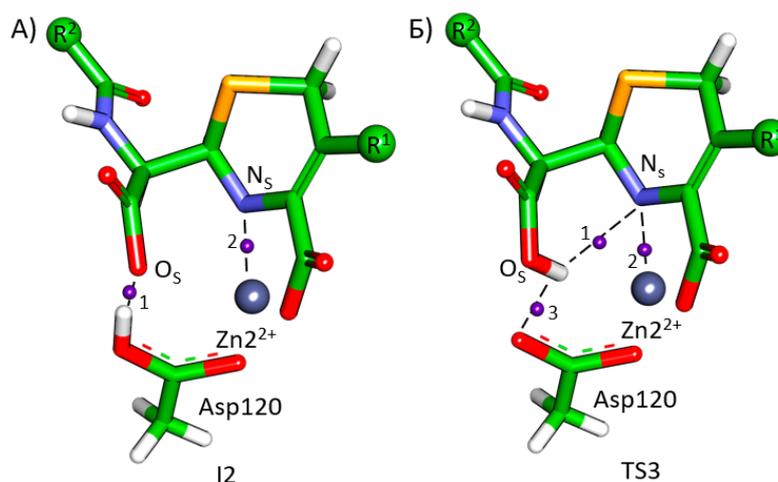


Рисунок 3.4.1.2. Структура второго интермедиата реакции и переходного состояния реакции с КТС в области реакционного центра

В каждой КТС рассчитаны дескрипторы электронной плотности: лапласиан электронной плотности и параметры кривизны. В результате получены монотонные зависимости между дескрипторами электронной плотности в КТС-1 на линии связи $N_s...H$ структуры переходного состояния и каталитическими константами реакции гидролиза. Для всех остальных рассматриваемых КТС в обеих структурах не было обнаружено никаких зависимостей от экспериментальных значений k_{cat} . Таким образом, взаимодействие $N_s...H$ является ключевым взаимодействием лимитирующей стадии реакции гидролиза цефалоспоринов металло- β -лактамазой L1 и для него был рассмотрен более широкий набор дескрипторов, включая энергии водородной связи, порядок связи и функцию влияния. Результаты представлены в таблице 3.4.1.1.

Помимо характеристик электронной плотности оценивались расстояния $d(N_s...H)$. Расстояния $d(N_s...H)$ равновесных геометрических конфигураций достаточно хорошо коррелируют с наблюдаемым k_{cat} , $R^2 = 0,862$ (рисунок 3.4.1.4 А). Основным недостатком этого дескриптора является большая погрешность, которая более чем в два раза превышает разницу между наибольшим и наименьшим значениями k_{cat} . Электронная плотность, собственные значения гессиана, индекс порядка водородной связи, энергии

водородных связей имеют большие значения R^2 и меньшие ошибки по сравнению с результатами $d(N_S...H)$. Однако погрешности оценок k_{cat} для этих зависимостей все равно довольно высоки. Наименьший диапазон ошибок среди этих зависимостей составляет $35 - 45 \text{ с}^{-1}$ для λ_1 , что по-прежнему не является надежным параметром для прогнозирования. Худшим дескриптором оказался лапласиан электронной плотности. Данная зависимость характеризуется самой высокой, после расстояний, погрешностью и низким значением R^2 . Однако для всех зависимостей прослеживается закономерность, что k_{cat} увеличивается с ослаблением водородной связи $d(N_S...H)$. На атоме N_S находятся неподеленные электронные пары, которые влияют на взаимодействие $N_S...H$ и могут наглядно показать разницу в электронном строении быстро и медленно гидролизующихся антибиотиков.

Таблица 3.4.1.1. Характеристики линейных зависимостей между дескрипторами электронной плотности в КТС-1 на линии связи $N_S...H$ в геометрической конфигурации переходного состояния и экспериментальными значениями k_{cat} .

Дескриптор	Диапазон	R^2	Коэффициент наклона	Свободный коэффициент	Ошибка, с^{-1}
$d(N_S...H), \text{Å}$	1,86 – 2,07	0,862	373 ± 53	-700 ± 103	202 – 213
$\rho(r), \text{а.е.}$	0,028 – 0,037	0,861	-6291 ± 892	245 ± 30	55 – 63
$\nabla^2 \rho(r), \text{а.е.}$	0,081 – 0,096	0,675	-2891 ± 710	291 ± 64	122 – 132
$\lambda_1, \text{а.е.}$	-0,055 – (-0,032)	0,879	3524 ± 461	186 ± 20	35 – 45
$\lambda_2, \text{а.е.}$	-0,025 – (-0,048)	0,795	3408 ± 613	154 ± 22	37 – 51
$\lambda_3, \text{а.е.}$	0,140 – 0,190	0,835	-1166 ± 183	229 ± 31	57 – 66
$E(\text{HB})_g,$ ккал/моль	5,6 – 7,8	0,788	$-34,7 \pm 6,4$	260 ± 42	78 – 92
$E(\text{HB})_v,$ ккал/моль	6,8 – 10,0	0,831	$-24 \pm 3,8$	231 ± 32	58 – 70
n_{topo}	0,09 – 0,12	0,873	-2349 ± 317	287 ± 34	63 – 72
$S_{(\text{КТС-1}, O_S)}, \text{а.е.}$	0,0075 – 0,0140	0,741	-12370 ± 2583	169 ± 29	48 – 65
$S_{(\text{КТС-1}, N_S)}, \text{а.е.}$	-0,0045 – +0,0003	0,939	-15282 ± 1377	$7,9 \pm 3,2$	3,2 – 9,4
$S_{(\text{КТС-1}, N_S)}, \%$	-18,6 – +0,9	0,933	$-3,8 \pm 0,4$	$9,2 \pm 3,3$	3,7 – 10,7
$S_{(\text{КТС-1}, O_{SH})}, \text{а.е.}$	0,0040 – 0,0096	0,821	-14257 ± 2354	128 ± 16	25 – 39
$S_{(\text{КТС-1}, O_{SH})}, \%$	16,6 – 26,7	0,779	$-7,6 \pm 1,4$	201 ± 32	55 – 60

На рисунке 3.4.3 представлены 2D-карты функции локализации электронов, которые демонстрируют, что неподеленные электронные пары атома N_S симметричны для субстратов с меньшими константами скорости и более асимметричны для субстратов с более высокими константами скорости. Усиленная локализация электронов неподеленной пары по направлению к атому водорода характерна для субстратов с высокими константами скорости.

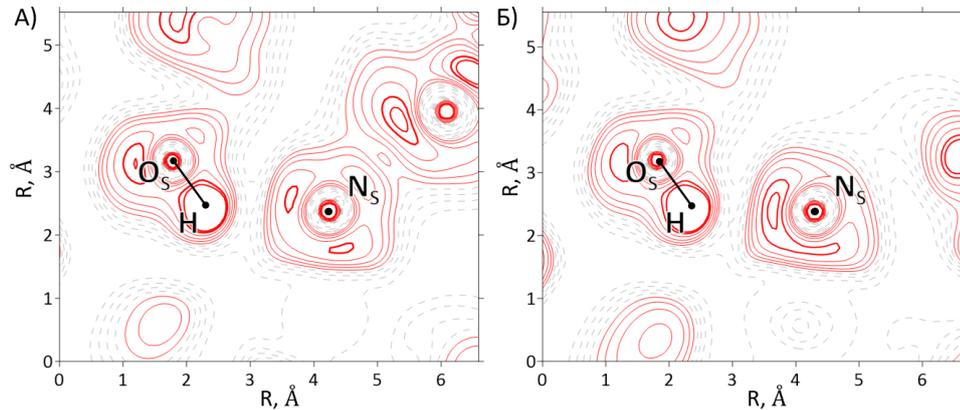


Рисунок 3.4.1.3. Карты функции локализации электронов в плоскости атомов O_S , H и N_S для цефсулодина (А) и цефуроксима (Б), контурные линии 0.87 – красная линия, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 – красные тонкие линии, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 – пунктирные серые линии

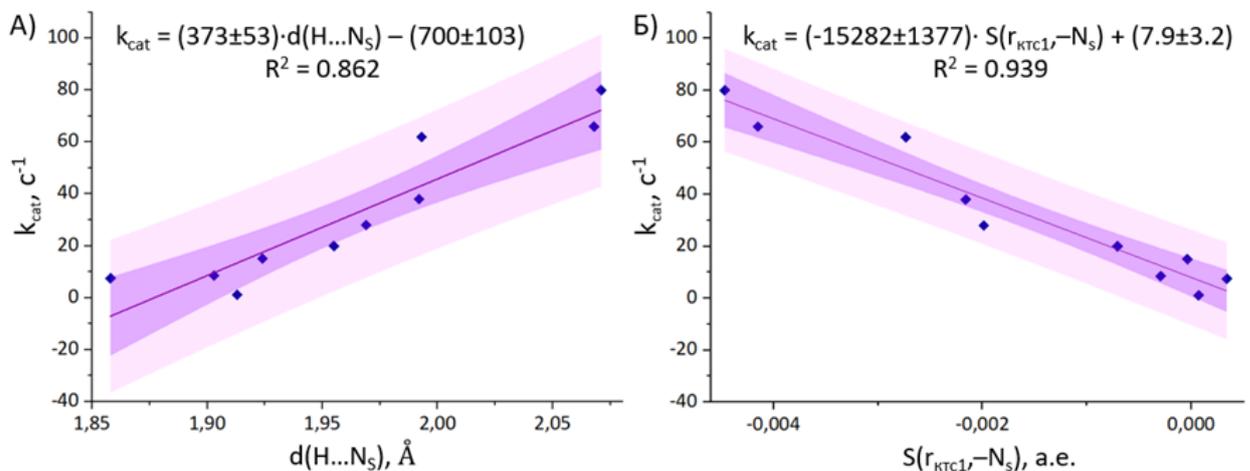


Рисунок 3.4.1.4. Линейные корреляции между каталитическими константами скорости k_{cat} и длиной водородной связи $N_S \dots H$ (А), абсолютным вкладом N_S в электронную плотность КТС-1 (Б)

Функция влияния учитывает характерные вклады атомов O_S , H и N_S в электронную плотность в КТС-1. Для атома O_S корреляция наблюдалась только для абсолютных значений атомных вкладов, а для водорода корреляций не обнаружено. Однако как абсолютный, так и относительный вклад группы донора водородной связи (O_S-H) в КТС-1 демонстрируют корреляцию с каталитическими константами, но параметры этих

корреляция не лучше вышеизложенных. Как абсолютные, так и относительные значения атомных вкладов N_S в электронную плотность КТС-1 демонстрируют высокую корреляцию с каталитическими константами скорости реакции, $R^2 = 0,939$ (рисунок 3.4.1.4 Б). Данные зависимости имеют наименьшие погрешности из всех рассматриваемых дескрипторов $3,2 - 9,4 \text{ с}^{-1}$ и $3,7 - 10,7 \text{ с}^{-1}$ соответственно. Абсолютный вклад N_S в КТС-1 был выбран для прогнозирования значений k_{cat} .

3.4.2 Прогнозирование новых антибиотиков

Перед непосредственным прогнозированием новых антибиотиков, полученная зависимость (рисунок 3.4.1.4 Б) была проверена на воспроизводимость уже известного результата. Антибиотик цефалоспоринового ряда цефтазидим обладает экспериментальной $k_{\text{cat}} 15,4 \text{ с}^{-1}$. Расчетная константа скорости составила $15,7 \pm 3,9 \text{ с}^{-1}$.

В медицинской химии стандартной практикой считается введение атома фтора в фармакофор, поскольку оно модулирует липофильность, электроотрицательность и мембранную проницаемость соединений. Также известно, что добавление метильной группы может изменить свойства лекарственного соединения, повышая селективность. В связи с чем соответствующим образом был модифицирован цефокситин – самый медленно гидролизующийся антибиотик из рассматриваемых. Группа CH_2 рядом с шестичленным кольцом ядра субстрата была выбрана для фторирования и метилирования (рисунок 3.4.2.1). Результаты представлены в таблице 3.4.2.1.

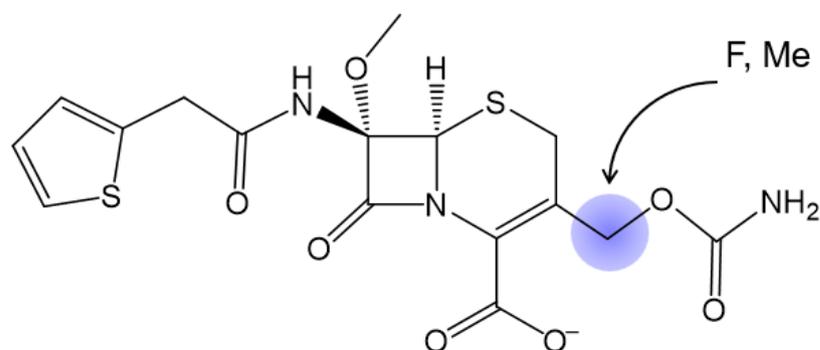


Рисунок 3.4.2.1. Структура цефокситина, выделена группа, подверженная модификациям

Таблица 3.4.2.1. Характеристики линейных зависимостей между дескрипторами электронной плотности в КТС-1 на линии связи N_s...N в геометрической конфигурации переходного состояния и экспериментальными значениями k_{cat}.

Соединение	k _{cat} , с ⁻¹
Цефокситин-F ₂	-0,3 ± 3,9
Цефокситин-F	5,8 ± 3,4
Цефокситин	6,9 ± 3,3
Цефокситин -Me	16,1 ± 3,9
Цефокситин -Me ₂	78,6 ± 9,6

Однократное фторирование и метилирование существенно не изменили значения k_{cat} цефокситина, тогда как введение либо двух атомов фтора, либо двух метильных групп сильно изменило значения k_{cat}. Согласно предложенной в работе зависимости, значение k_{cat} для цефокситина-F₂ составляет -0,3 ± 3,9 с⁻¹. Конечно, константа скорости должна быть положительной величиной, однако указанная величина в коридоре погрешностей попадает в положительную область. Это значение меньше и статистически отличается от k_{cat} цефокситина.

3.5. Определение электронных факторов, влияющих на эффективность ингибиторов NDM-1 на основе бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот

3.5.1. Анализ связывания бензо[b]тиофен-2-бороновых кислот с NDM-1

Фермент-субстратный комплекс NDM-1 и имипенема был получен из кристаллической структуры PDB ID: 5YPK с гидролизованным имипенемом, связанным с NDM-1. Структура имипенема была восстановлена до негидролизованного состояния.

Для построения комплексов NDM-1-ингибитор использовались кристаллические структуры PDB ID: 6Q30, 6IBV, 6Q2Y. КМ часть включала в себя субстрат или ингибитор, два катиона Zn^{2+} и боковые цепи аминокислотных остатков, образующих с ними координационные связи (His120, His122, His189, Cys208, His250), каталитический гидроксид-анион и боковые цепи Asp124 и Asn220, образующие водородные связи с субстратом или ингибитором.

Были проанализированы молекулярно-динамические траектории имипенема и ингибитора в явном водном растворе и комплексов фермент-имипенем и фермент-ингибитор для сравнительного анализа связывания с NDM-1. В качестве ингибитора было выбрано соединение *cpd5* (рисунок 3.5.2.1 Б). Среднее значение индекса Фукуи для карбонильного углерода имипенема увеличивается более чем в два раза по сравнению с водным раствором и составляет 0,084 а.е. (рисунок 3.5.1.1). Данное распределение значительно шире, стандартное отклонение составляет 0,031 а.е., что в два раза больше, чем в растворе. Это иллюстрирует эффект активации субстрата ферментом. В растворе имипенем находится в неактивированном состоянии, однако при связывании с ферментом, последний активирует имипенем двумя координационными связями, что обсуждалось ранее. Распределение индексов Фукуи для имипенема в активном центре имеет несколько фракций. Фракция с большими значениями f^+ демонстрирует максимальную активацию субстрата в активном центре фермента. Энергетический профиль Гиббса для стадии нуклеофильной атаки приведен на рисунке 3.5.1.1 В. Минимум, соответствующий комплексу ES, расположен при значении координаты реакции 2,79 Å. Это немного короче, чем среднее расстояние C...O_w вдоль траектории, которое составляет $2,89 \pm 0,15$ Å. Энергетический барьер на этой стадии составляет около 14 ккал/моль, а П1 почти на 4 ккал/моль выше по энергии, чем комплекс ES.

Получить стабильный предреакционный комплекс *cpd5*-NDM-1 не удалось. В связи с чем было проведено моделирование молекулярной динамики геометрической конфигурации комплекса, аналогичной комплексу ES. Для этого использовались ограничивающие потенциалы $K = 40$ ккал/(моль Å²) на связь В...O_w. Данное расстояние варьировалось в диапазоне $2,97 \pm 0,13$ Å. Индекс электрофильности Фукуи на атоме бора оказался меньше, чем в растворе, и аналогичен атому углерода имипенема в растворе. Среднее значение составляет $0,040 \pm 0,012$ а.е. (рисунок 3.5.1.1. А, Б).

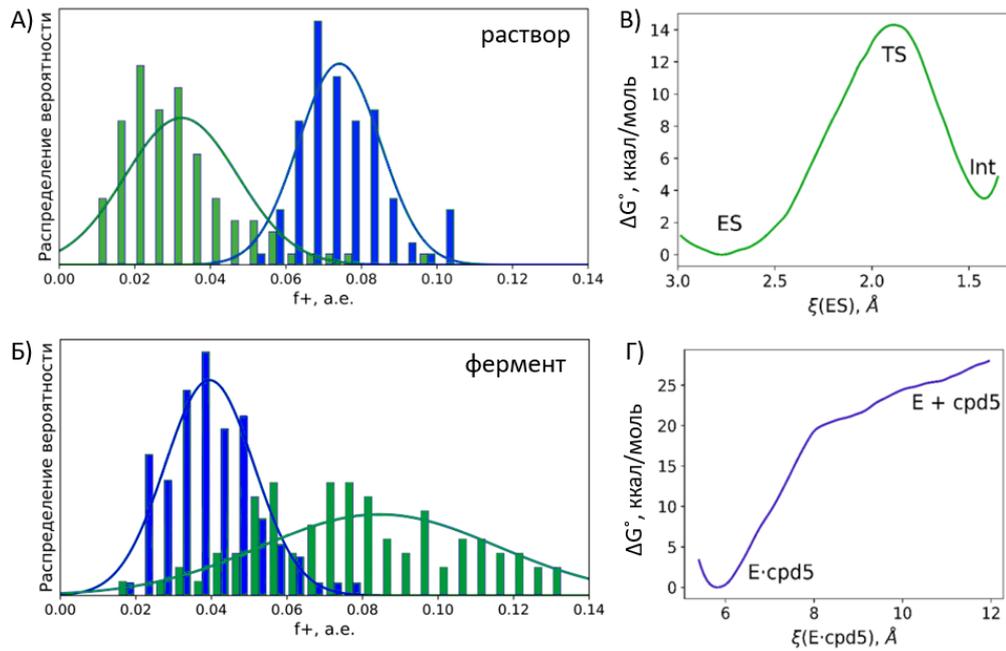


Рисунок 3.5.1.1. Распределение индексов электрофильности Фукуи, f^+ , имипенема и ингибитора cpd5 в водном растворе (А) в активном центре NDM-1 (Б); профили энергии Гиббса для нуклеофильной атаки на имипенем (В) и на cpd5 (Г)

Анализ лапласиана электронной области вдоль расстояний $d(B...O_w)$ и $d(C...O_w)$ показал наличие минимумов и максимумов для $d(C...O_w)$, пунктирная линия соответствует структуре имипенема неактивированного ферментом, а сплошная активированному имипенему. Минимум в активированной структуре становится менее глубоким. В то время как для ингибитора ни минимумов, ни максимумов не наблюдается, ингибитор будто уже активирован (рисунок 3.5.1.2).

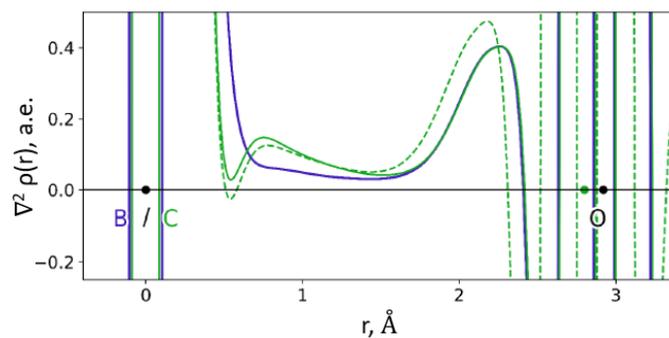


Рисунок 3.5.1.2 Лапласиан электронной плотности вдоль расстояний $B...O_w$ и $C...O_w$. Кривые соответствуют комплексам имипенем-NDM-1 (зеленый) и cpd5-NDM-1 (синий)

Подобное anomalous поведение атома бора обсуждается в работе (Jin, 2013) и это объясняется сильными р-электронными взаимодействиями. Пустая р-орбиталь бора частично заполнена электронами соседнего атома. В данном случае партнером этого взаимодействия является нуклеофильный HO_w^- , который частично «отдает» свою

неподеленную электронную пару пустой р-орбитали бора. По-видимому, эти взаимодействия вместе с дальнедействующими электростатическими взаимодействиями между партнерами по координационным связям могут быть причиной невозможности локализации минимума, соответствующего предреакционному комплексу.

Для построения профиля энергии Гиббса образования ковалентной комплекса cpd5-NDM-1 сначала была получена структура комплекса, затем постепенно увеличивалась координата реакции. Координата реакции состоит из сумм длин координационных связей $d(\text{Zn}1^{2+} \dots \text{O}_1)$ и $(\text{Zn}2^{2+} \dots \text{O}_2)$ и длины ковалентной связи $d(\text{B}-\text{O}_w)$. Энергетический профиль диссоциации имеет две области. В состоянии комплекса фермент-ингибитор координата реакции равна 5,8 Å. К 8 Å наблюдается резкий рост энергии, который связан с разрывом ковалентной связи cpd5 с HO_w^- . После чего энергия растет гораздо медленнее, так как ковалентная связь уже разорвана, и процесс диссоциации преимущественно связан с полным разрывом координационных связей. Моделирование проводилось до 12 Å, при этой координате реакции комплекс NDM-1 и cpd5 еще не полностью продиссоциировал: координационные связи между cpd5 и катионами цинка расщепляются, но компоненты этого комплекса сольватируются не полностью.

3.5.2 Прогнозирование новых ингибиторов

Все комплексы NDM-1 с ингибиторами cpd1-cpd5 демонстрируют схожие геометрические особенности. Длина образующейся ковалентной связи между атомом бора ингибитора и бывшим нуклеофильным гидроксид-анионом $d(\text{B}-\text{O}_w)$ составляет 1,45 – 1,49 Å. Длины ковалентных связей $d(\text{B}-\text{O}_1)$ и $d(\text{B}-\text{O}_2)$ укладываются в этот же диапазон значений. Длины координационных связей, $d(\text{Zn}1^{2+} \dots \text{O}_w)$, $d(\text{Zn}1^{2+} \dots \text{O}_1)$ и $d(\text{Zn}2^{2+} \dots \text{O}_2)$ равны соответственно 1,94 – 1,96 Å, 2,32 – 2,51 Å и 1,95 – 2,03 Å. Как и для задачи с цефалоспориновыми антибиотиками зависимости между IC50 и расстояниями $d(\text{Zn}1^{2+} \dots \text{O}_1)$ и $d(\text{Zn}2^{2+} \dots \text{O}_2)$ имеют высокие коэффициенты детерминации, но очень высокие погрешности. Расстоянию $d(\text{Zn}1^{2+} \dots \text{O}_w)$ соответствует худшая корреляция среди геометрических показателей с самыми большими погрешностями.

Для данной задачи также применялся метод QТАИМ по аналогии с анализом ряда цефалоспориновых антибиотиков в активном центре металло- β -лактамазой L1 лимитирующей стадии реакции гидролиза. Дескрипторы электронной плотности в критических точках координационных связей между гидроксидборонатом и катионами цинка коррелируют со значениями IC50 (таблица 3.5.2.1). На связях $d(\text{Zn}^{1^{2+}} \dots \text{O}_w)$, $d(\text{Zn}^{1^{2+}} \dots \text{O}_1)$ и $d(\text{Zn}^{2^{2+}} \dots \text{O}_2)$ существуют соответствующие КТС-1, КТС-2 и КТС-3 (рисунок 3.5.2.1 Б). В качестве дескрипторов взаимодействия были выбраны электронная плотность, лапласиан электронной плотности и функция влияния, описывающая вклады атомов O_w , O_1 и O_2 в электронную плотность соответствующих КТС. Для КТС-3 на линии связи $d(\text{Zn}^{1^{2+}} \dots \text{O}_w)$ наблюдаются наихудшие корреляции, для электронной плотности в КТС-3 корреляции не обнаружено. Также были исследованы суммы соответствующих значений дескрипторов в трех КТС.

Наилучшие корреляции были получены для зависимости IC50 от атомных вкладов в КТС и сумм дескрипторов, рассчитанных в трех КТС. Хотя погрешности определения IC50 у данных зависимостей меньше, чем у всех остальных, они по-прежнему велики, самая низкая погрешность всего в два раза меньше, чем самое большое значение IC50 из выборки. Эти уравнения в дальнейшем использовались для прогнозирования значений IC50 новых соединений.

Таблица 3.5.2.1. Характеристики линейных зависимостей между дескрипторами электронной плотности в КТС-1, КТС-2, КТС-3 и их сумме на линиях координационных связей $d(\text{Zn}^{1^{2+}} \dots \text{O}_1)$, $d(\text{Zn}^{2^{2+}} \dots \text{O}_2)$, $d(\text{Zn}^{1^{2+}} \dots \text{O}_w)$ и значениями IC50.

Дескриптор	Диапазон	R ²	Коэффициент наклона	Свободный коэффициент	Ошибка, мкМ
$d(\text{Zn}^{1^{2+}} \dots \text{O}_1)$, Å	2,32 – 2,51	0,827	184 ± 41	-397 ± 100	195 – 203
$\rho(r_{\text{КТС-1}})$, а.е.	0,025 – 0,038	0,815	-2667 ± 618	131 ± 19	34 – 42
$\nabla^2 \rho(r_{\text{КТС-1}})$, а.е.	0,11 – 0,17	0,793	-644 ± 159	137 ± 21	39 – 48
$S(r_{\text{КТС-1}}, \text{O}_1)$, а.е.	0,0018 – 0,0081	0,823	-5489 ± 1238	74 ± 6	8 – 16
$d(\text{Zn}^{2^{2+}} \dots \text{O}_2)$, Å	1,95 – 2,03	0,942	415 ± 51	-778 ± 102	202 – 206
$\rho(r_{\text{КТС-2}})$, а.е.	0,072 – 0,094	0,908	-1643 ± 259	183 ± 21	39 – 45
$\nabla^2 \rho(r_{\text{КТС-2}})$, а.е.	0,28 – 0,34	0,894	-602 ± 102	234 ± 31	60 – 66
$S(r_{\text{КТС-2}}, \text{O}_2)$, а.е.	0,026 – 0,036	0,939	-3413 ± 432	152 ± 13	24 – 28

$d(\text{Zn1}^{2+} \dots \text{O}_w), \text{ \AA}$	1,94 – 1,96	0,325	1094 ± 640	-2088 ± 1251	2490 – 2507
$\rho(r_{\text{KTC-3}}), \text{ a.e.}$	0,088 – 0,094	-	-3348 ± 3930	354 ± 354	700 – 723
$\nabla^2 \rho(r_{\text{KTC-3}}), \text{ a.e.}$	0,33 – 0,36	0,467	-1207 ± 569	458 ± 191	378 – 393
$S(r_{\text{KTC-3}}, \text{O}_w), \text{ a.e.}$	0,033 – 0,036	0,311	-8964 ± 5351	352 ± 179	353 – 370
$\rho_{\Sigma}, \text{ a.e.}$	0,19 – 0,22	0,952	-1017 ± 114	255 ± 23	44 – 48
$\nabla^2 \rho_{\Sigma}, \text{ a.e.}$	0,72 – 0,84	0,968	-292 ± 26	277 ± 20	39 – 43
$S_{\Sigma}, \text{ a.e.}$	0,060 – 0,078	0,964	-1979 ± 192	184 ± 13	24 – 28

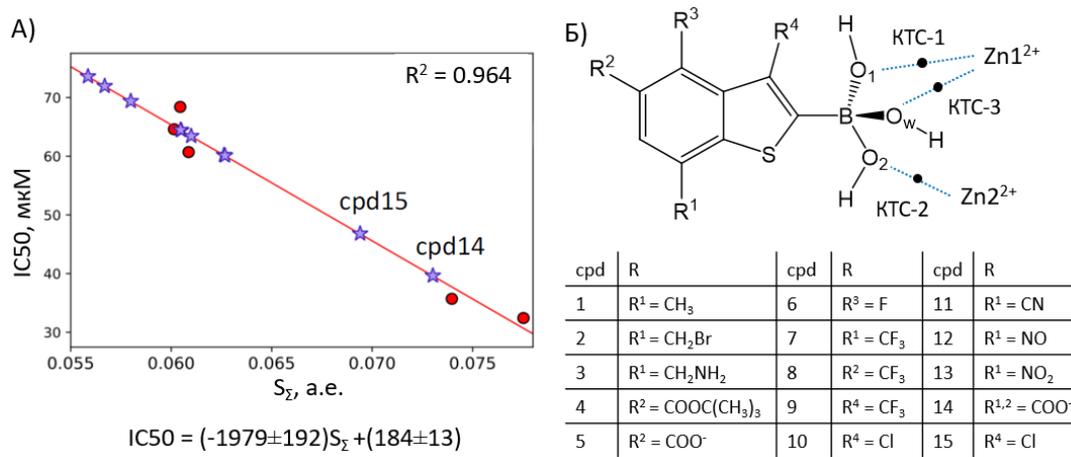


Рисунок 3.5.2.1. А) Зависимость между экспериментальными значениями IC₅₀ и расчетными значениями суммы атомных вкладов кислорода в КТС-1,2,3; Б) общая схема комплекса NDM-1 с ингибиторами на основе бензо[*b*]тиофен-бороновых кислот

Ингибиторы cpd1-cpd5 взяты из экспериментальных данных, cpd6-cpd10 из базы данных PubChem. Однако предсказанные значения IC₅₀ с данным набором оказались выше 60 мкМ. Поэтому далее в качестве ведущего соединения для разработки новых ингибиторов был взят ингибитор cpd5, который имеет самое низкое значение IC₅₀ среди исследованных экспериментально. Было предположено, что электроноакцепторные группы ответственны за значение IC₅₀. В связи с чем модифицировали cpd5 и получили набор соединений cpd11-cpd15. Все они продемонстрировали значения IC₅₀ в одном диапазоне. Среди них наиболее перспективными являются cpd14 и cpd15, которые предсказали значения IC₅₀ 40 мкМ и 47 мкМ соответственно. Однако и эти значения являются большими, чем уже известные экспериментально. Из чего можно сделать вывод, что дальнейшего снижения значения IC₅₀ можно добиться, изменив ядро данных соединений бороновой кислоты.

Заключение

При описании фермент-субстратного комплекса разными гибридными функционалами было показано, что гибридный функционал ВННLYP-D3, содержащий 50% вклада точного хартри-фоковского обмена, не позволяет дискриминировать активированные и неактивированные состояния. Сравнительный анализ гибридных функционалов для описания реакции гидролиза в активном центре металло- β -лактамазы L1 показал, что из рассматриваемых функционалов, наилучшим методом является PBE0-D3. Остальные функционалы (B3LYP-D3 и ВННLYP-D3) указали первую стадию реакции в качестве лимитирующей, что противоречит экспериментальным данным. Однако, стоит отметить, что согласно спектроскопическим исследованиям, в ходе реакции накапливается I2, чего при расчетах PBE0-D3 не отражается. Однако I1 и I2 реакции различаются на энергетической шкале относительно ES в пределах 1 ккал/моль, что входит в диапазон погрешности метода КМ/ММ МД. В связи с чем, далее в работе для описания КМ частей исследуемых комплексов использовался протокол расчета PBE0-D3/6-31G**.

Исследование механизма инактивации антибиотика имипенема в активных центрах металло- β -лактамаз L1 и NDM-1 показало, что наблюдаемый в экспериментальных исследованиях продукт гидролиза имипенема (R)-имин образуется не в активных центрах ферментов, а в результате таутомеризации из енамина в растворе. В активном центре L1 в ходе реакции гидролиза имипенема образуется енамин, в NDM-1 преобладающим продуктом является енамин, однако может происходить конкурирующая реакция, продуктом которой является (S)-имин. Данный процесс более энергозатратный. Также показано, что особенности протекания реакции в активных центрах данных ферментов определяются аминокислотным составом петли L10.

Молекулярное моделирование механизма реакции ингибирования PBP2 из штаммов FA19, 35/02, H041 цефтриаксоном показало, что изменение положение субстрата в активном центре фермента ввиду мутации Gly545Ser отражается на формировании оксианионного центра и, как следствие, на механизме реакции. Высота энергетических барьеров первой стадии реакции повышается с ростом резистентности, вследствие ухудшения активации цефтриаксона. Механизм реакции в мутантных PBP2 и

из штамма дикого типа отличаются: разрыв связи C–N и отрыв фрагмента антибиотика происходит последовательно в белке из штамма дикого типа и одновременно в мутантных белках. Новое положение субстрата в каталитическом кармане также влечет за собой изменения сродства к антибиотику. Анализ конформационных изменений петли β_3 - β_4 , показал, с ростом резистентности петля становится менее подвижной и плоской.

При анализе ряда цефалоспориновых антибиотиков в активном центре металло- β -лактамазы L1 в стационарной точке соответствующей переходному состоянию лимитирующей стадии реакции было определено ключевое взаимодействие, $N_{S\dots H}$, связанное со скоростью реакции гидролиза. Анализ электронной плотности в критических точках связей показал наличие монотонных зависимостей между значениями дескрипторов, описывающих силу водородной связи $N_{S\dots H}$ и макроскопическим параметром стационарной кинетики k_{cat} . Установленная взаимосвязь между макроскопическим параметром, наблюдаемым в эксперименте, и параметрами электронной плотности взаимодействия $N_{S\dots H}$ может использоваться для предсказания константы скорости реакции гидролиза новых соединений цефалоспоринового ряда металло- β -лактамазой L1 при поиске новых негидролизующих или медленно гидролизующих антибиотиков. В работе предложены модификации антибиотика цефокситина, способствующие снижению скорости его гидролиза.

Анализ связывания бороновых ингибиторов на основе бензо[b]тиофена с NDM-1 показал, что реакция нуклеофильной атаки гидроксид-аниона на атом бора бензо[b]тиофенового ингибитора происходит самопроизвольно в результате связывания в активном центре фермента. Построено уравнение, связывающее экспериментальные параметры IC_{50} и параметры электронной плотности в критических точках связи, расположенных на линиях координационных связей атомов кислорода тетраэдрического бороната с ионами цинка в активном центре NDM-1. На основе полученного уравнения были предложены десять структур бороновых ингибиторов на основе бензо[b]тиофена. Среди них наиболее перспективными являются *cpd14* и *cpd15*, для которых рассчитанные значения составляют IC_{50} 40 мкМ и 47 мкМ соответственно. Однако и эти значения являются большими, чем уже известные экспериментально. Из чего можно сделать вывод, что дальнейшего снижения значения IC_{50} можно добиться, изменив ядро данных соединений бороновой кислоты.

Выводы

1. При моделировании механизма реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1 методом молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ наилучшее согласие с экспериментальными кинетическими данными наблюдается при описании квантовой подсистемы гибридным функционалом PBE0-D3.
2. В реакции гидролиза имипенема металло- β -лактамазами L1 и NDM-1 образуется енамин, который после выхода в раствор таутомеризуется в (R)-имин, наблюдаемый в эксперименте. В активном центре NDM-1 в качестве побочного продукта образуется (S)-имин, что обусловлено разным аминокислотным составом петли L10 металло- β -лактамаз L1 и NDM-1.
3. Аминокислотная замена Gly545Ser в PBP2 мутантных штаммов ухудшает связывание цефтриаксона, увеличивая константу диссоциации K_S , и ослабляет активацию субстрата, понижая константу скорости ацилирования k_2 , что объясняет наблюдаемое уменьшение эффективного каталитического параметра k_2/K_S .
4. Определена взаимосвязь между наблюдаемым параметром k_{cat} и рассчитываемыми дескрипторами электронной плотности, характеризующими водородную связь $N_S...H$ в структурах переходного состояния лимитирующей стадии реакции гидролиза цефалоспоринов металло- β -лактамазой L1, что можно использовать для оценки константы скорости реакции гидролиза новых соединений.
5. Устойчивые бензо[b]тиофен-2-боронаты формируются безбарьерно в активном центре NDM-1 в результате образования ковалентной связи с каталитическим гидроксид-анионом. Все рассмотренные ингибиторы этого ряда характеризуются величинами IC_{50} не ниже 30 μM .

Список сокращений

ВВП – внутренний валовый продукт

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ДБО – диазобициклооктаны

КТС – критические точки связи

КМ подсистема – квантово-механическая подсистема в методе КМ/ММ

КМ/ММ – комбинированный метод квантовой механики / молекулярной механики

КМ/ММ МД – метод молекулярной динамики с использованием КМ/ММ потенциалов

МД – молекулярная динамика

ММ подсистема – молекулярно-механическая подсистема в методе КМ/ММ

МТТК – уравнение Мартина-Такерман-Тобиас-Кляйн

ППЭ – поверхность потенциальной энергии

УФ – ультрафиолет

ЯМР – метод ядерного магнитного резонанса

CACHE – Critical Assessment of Computational Hit-finding Experiments – Критическая оценка компьютерных экспериментов по поиску совпадений

Spd – compound – соединение

CS – Charge Shifting – метод сдвига заряда

DFT – Density Functional Theory – теория функционала электронной плотности

DNA – Dynamical Network Analysis – динамический сетевой анализ

ECP – Effective Core Potentials – эффективные потенциалы ядра

ELF – Electron Localization Function – функция локализации электронов

ESBL – Extended-Spectrum Beta-Lactamase – β -лактамазы расширенного спектра действия

ES – enzyme-substrate complex – фермент-субстратный комплекс

EP – enzyme-product complex – комплекс фермент-продукт

FDA – Food and Drug Administration, USA Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

GGA функционалы – Generalized Gradient Approximation – функционалы обобщенного градиентного приближения

HF – Hartree-Fock method – метод Хартри-Фока

- I1, I2 – Intermediate – первый и второй интермедиаты реакции
- IC50 – half maximal inhibitory concentration – концентрация полумаксимального ингибирования
- L-BFGS – Limited-memory Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno – алгоритм Бройдена-Флетчера-Гольдфарба-Шенно с использованием ограниченного объема компьютерной памяти
- LDA – Local Density Approximation – приближение локальной плотности
- LSDA – Local Spin Density Approximation – приближения локальной спиновой плотности
- NMPA – National Medical Products Administration, China – Национальное управление медицинской продукции Китая
- PBP – Penicillin-Binding Proteins – пенициллин-связывающие белки
- PDB – Protein Data Bank – банк данных трехмерных структур белков
- PDB ID – идентификационный номер структуры в банке данных PDB
- QTAIM – Quantum Theory of Atoms In Molecules – квантово-топологическая теория атомов в молекулах
- RCD – Redistributed Charge and Dipole – метод перераспределения заряда и диполя
- SMD – Steered Molecular Dynamics – ускоренная молекулярная динамика
- TDDFT – Time Dependent Density Functional Theory – нестационарная теория функционала электронной плотности
- $S_{0,\min}$ – основное электронное состояние системы
- S_1 – первый возбужденный электронный уровень
- TS – Transition State – переходное состояние
- UI – Umbrella Integration – это метод анализа моделирования зонтичной выборки
- US – Umbrella Sampling – метод зонтичной выборки
- WHAM – Weighted Histogram Analysis Method – метод анализа взвешенных гистограмм

Список литературы

1. Abraham E. P. Cephalosporins 1945–1986 / E. P. Abraham // *Drugs*. – 1987. – Vol. 34. – № 2. – P. 1-14.
2. Abraham E. P. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin / E. P. Abraham, E. Chain // *Nature*. – 1940. – Vol. 146. – № 3713. – P. 837-837.
3. Ackloo S. CACHE (Critical Assessment of Computational Hit-finding Experiments): A public–private partnership benchmarking initiative to enable the development of computational methods for hit-finding / S. Ackloo, R. Al-awar, R. E. Amaro // *Nature Reviews Chemistry*. – 2022. – Vol. 6. – № 4. – P. 287-295.
4. Adamo C. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model / C. Adamo, V. Barone // *Journal of Chemical Physics*. – 1999. – Vol. 110. – № 13. – P. 6158-6170.
5. Ambler R. P. The structure of β -lactamases / R. P. Ambler // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*. – 1980. – Vol. 289. – № 1036. – P. 321-331.
6. Apriliana U. I. Resistance finding of *Bacillus anthracis* towards penicillin in East Java, Central Java, and Yogyakarta Provinces, Indonesia / U. I. Apriliana, E. Ruhiat, Mariyono // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2023. – Vol. 1174. – № 1.
7. Bader R. F. W. Atoms in molecules / R. F. W. Bader // *Accounts of Chemical Research*. – 1985. – Vol. 18. – № 1. – P. 9-15.
8. Baier F. Connectivity between catalytic landscapes of the metallo- β -lactamase superfamily / F. Baier, N. Tokuriki // *Journal of Molecular Biology*. – 2014. – Vol. 426. – № 13. – P. 2442-2456.
9. Barbour A. G. Properties of penicillin-binding proteins in *Neisseria gonorrhoeae* / A. G. Barbour // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1981. – Vol. 19. – № 2. – P. 316-322.
10. Barlow M. Phylogenetic analysis shows that the OXA β -lactamase genes have been on plasmids for millions of years / M. Barlow, B. G. Hall // *Journal of Molecular Evolution*. – 2002. – Vol. 55. – № 3. – P. 314-321.
11. Barradell L. B. Cefepime: A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use / L. B. Barradell, H. M. Bryson // *Drugs*. – 1994. – Vol. 47. – № 3. – P. 471-505.
12. Bartashevich E. V. QTAIMC study of the X-H/H...O bond order indices (X=O, N, C) in molecular systems / E. V. Bartashevich, D. K. Nikulov, M. V. Vener, V. G. Tsirelson // *Computational and Theoretical Chemistry*. – 2011. – Vol. 973. – № 1-3. – P. 33-39.

13. Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily / C. Bebrone // *Biochemical Pharmacology*. – 2007. – Vol. 74. – № 12. – P. 1686-1701.
14. Becke A. D. A new inhomogeneity parameter in density-functional theory / A. D. Becke // *Journal of Chemical Physics*. – 1998. – Vol. 109. – № 6. – P. 2092-2098.
15. Becke A. D. A new mixing of Hartree-Fock and local density-functional theories / A. D. Becke // *The Journal of Chemical Physics*. – 1993. – Vol. 98. – № 2. – P. 1372-1377.
16. Becke A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior / A. D. Becke // *Physical Review A*. – 1988. – Vol. 38. – № 6. – P. 3098-3100.
17. Benighaus T. Semiempirical Double-Hybrid Density Functional with Improved Description of Long-Range Correlation / T. Benighaus, R. A. Distasio, R. C. Lochan – 2008. – P. 2702-2712.
18. Best R. B. Optimization of the assitive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of backbone dihedral angles / R. B. Best, X. Zhu, J. Shim // *J. Chem Theory Comput*. – 2012. – Vol. 8. – № 9. – P. 3257-3273.
19. Bhullar K. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome / K. Bhullar, N. Waglechner, A. Pawlowski // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7. – № 4. – P. 1-11.
20. Blizzard T. A. Discovery of MK-7655, a β -lactamase inhibitor for combination with Primaxin / T. A. Blizzard, H. Chen, S. Kim // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. – 2014. – Vol. 24. – № 3. – P. 780-785.
21. Blumer J. L. Meropenem: Evaluation of a new generation carbapenem / J. L. Blumer // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 1997. – Vol. 8. – № 2. – P. 73-92.
22. Bottone E. J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen / E. J. Bottone // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2010. – Vol. 23. – № 2. – P. 382-398.
23. Bou G. Cloning, Nucleotide Sequencing, and Analysis of the Gene Encoding an AmpC β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii* / G. Bou, J. Martínez-Beltrán // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2000. – Vol. 44. – № 2. – P. 428-432.
24. Boyd S. E. Metallo- β -lactamases: Structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline / S. E. Boyd, D. M. Livermore, D. C. Hooper, W. W. Hope // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2020. – Vol. 64. – № 10.
25. Bradford P. A. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City / P. A. Bradford, S. Bratu, C. Urban // *Clinical Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 39. – № 1. – P. 55-60.
26. Bradford P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat / P. A. Bradford // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2001. – Vol. 14. – № 4. – P. 933-951.

27. Breathnach A. S. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in two hospitals: Association with contaminated hospital waste-water systems / A. S. Breathnach, M. D. Cubbon, R. N. Karunaharan // *Journal of Hospital Infection*. – 2012. – Vol. 82. – № 1. – P. 19-24.
28. Brem J. Imitation of β -lactam binding enables broad-spectrum metallo- β -lactamase inhibitors / J. Brem, T. Panduwawala, J. U. Hansen // *Nature Chemistry*. – 2022. – Vol. 14. – № 1. – P. 15-24.
29. Brem J. Structural basis of metallo- β -lactamase, serine- β -lactamase and penicillin-binding protein inhibition by cyclic boronates / J. Brem, R. Cain, S. Cahill // *Nature Communications*. – 2016. – Vol. 7. – P. 1-8.
30. Brolund A. Characterization of ESBL disseminating plasmids / A. Brolund, L. Sandegren // *Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 48. – № 1. – P. 18-25.
31. Brooke J. S. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen / J. S. Brooke // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2012. – Vol. 25. – № 1. – P. 2-41.
32. Bryskier A. Parenteral cephalosporin classification / A. Bryskier, J. Aszodi, J. F. Chantot // *Expert Opinion on Investigational Drugs*. – 1994. – Vol. 3. – № 2. – P. 145-171.
33. Bush K. Carbapenemases: Partners in crime / K. Bush // *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. – 2013. – Vol. 1. – № 1. – P. 7-16.
34. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature / K. Bush // *Journal of Infection and Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 19. – № 4. – P. 549-559.
35. Bush K. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview / K. Bush, P. A. Bradford // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2016. – Vol. 6. – № 8. – P. a025247.
36. Bush L. M. Ureidopenicillins and beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations / L. M. Bush, C. C. Johnson // *Infectious Disease Clinics of North America*. – 2000. – Vol. 14. – № 2. – P. 409-433.
37. Cai J. Genetic and functional characterization of blaCTX-M-199, a novel tazobactam and sulbactam resistance-encoding gene located in a conjugative mcr-1-bearing IncI2 plasmid / J. Cai, Q. Cheng, Y. Shen // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 61. – № 7. – P. 1-14.
38. Calvopiña K. Structural/mechanistic insights into the efficacy of nonclassical β -lactamase inhibitors against extensively drug resistant *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates / K. Calvopiña, P. Hinchliffe, J. Brem // *Molecular Microbiology*. – 2017. – Vol. 106. – № 3. – P. 492-504.
39. Cao V. T. B. Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration / V. T. B. Cao, G. Arlet, B. M. Ericsson // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2000. – Vol. 46. – № 6. – P. 895-900.
40. Center for drug evaluation and research (CDER): New Drug Therapy Approvals 2023. – 2024.

41. Chen A. Y. Dipicolinic Acid Derivatives as Inhibitors of New Delhi Metallo- β -lactamase-1 / A. Y. Chen, P. W. Thomas, A. C. Stewart, A. Bergstrom, Z. Cheng, C. Miller, C. R. Bethel, S. H. Marshall, C. V. Credille, C. L. Riley // HHS Public Access. – 2017. – Vol. 60. – № 17. – P. 7267-7283
42. Chen Y. Activity of cefepime and other β -lactam antibiotics against permeability mutants of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* / Y. Chen, D. M. Livermore // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 1993. – Vol. 32. – P. 63-74.
43. Chen Y. Re-examining the role of Lys67 in class C β -lactamase catalysis / Y. Chen, A. McReynolds, B. K. Shoichet // Protein Science. – 2009. – Vol. 18. – № 3. – P. 662-669.
44. Chiodo S. LANL2DZ basis sets recontracted in the framework of density functional theory / S. Chiodo, N. Russo, E. Sicilia // The Journal of Chemical Physics. – 2006. – Vol. 125. – P. 104107.
45. Chouchani C. VIM and IMP metallo- β -lactamases and other extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from environmental samples in a Tunisian hospital / C. Chouchani, R. Marrakchi, L. Ferchichi // Apmis. – 2011. – Vol. 119. – № 10. – P. 725-732.
46. Cohen M. L. Changing patterns of infectious disease / M. L. Cohen // Nature. – 2000. – Vol. 406. – № 6797. – P. 762-767.
47. Scothorne R. J. Leading article / R. J. Scothorne // Histopathology. – 1985. – Vol. 9. – № 6. – P. 663-669.
48. Crowder M. W. Overexpression, Purification, and Characterization of the Cloned Metallo- β -Lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia* / M. W. Crowder, T. R. Walsh, L. Banovic // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1998. – Vol. 42. – № 4. – P. 921-926.
49. Cullmann W. Heterogeneity of beta-lactamase production of *Pseudomonas maltophilia*, a nosocomial pathogen / W. Cullmann, W. Dick // Chemotherapy. – 1990. – Vol. 36. – № 2. – P. 117-126.
50. Dahmen S. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated to the combination of plasmid-mediated CMY-4 AmpC β -Lactamase and loss of an outer membrane protein / S. Dahmen, W. Mansour, K. Charfi // Microbial Drug Resistance. – 2012. – Vol. 18. – № 5. – P. 479-483.
51. Dalhoff A. The art of fusion: From penams and cepems to penems / A. Dalhoff, C. J. Thomson // Chemotherapy. – 2003. – Vol. 49. – № 3. – P. 105-120.
52. Datta N. Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae / N. Datta, P. Kontomichalou // Nature. – 1965. – Vol. 208. – № 5007. – P. 239-241.
53. Dcosta V. M. Antibiotic resistance is ancient / V. M. Dcosta, C. E. King, L. Kalan // Nature. – 2011. – Vol. 477. – № 7365. – P. 457-461.
54. Delcour A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance / Delcour, A. H. // NIH Public Access. – 2010. – Vol. 1794. – № 5. – P. 808-816.
55. Den Blaauwen T. Morphogenesis of rod-shaped sacculi / T. Den Blaauwen, M. A. De Pedro, M. Nguyen-Distèche, J. A. Ayala // FEMS Microbiology Reviews. – 2008. – Vol. 32. – № 2. – P. 321-344.

56. Denton M. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia* / M. Denton, K. G. Kerr // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1998. – Vol. 11. – № 1. – P. 57-80.
57. Dowson C. G. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* / C. G. Dowson, A. Hutchison, J. A. Brannigan // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1989. – Vol. 86. – № 22. – P. 8842-8846.
58. Drawz S. M. Three decades of β -lactamase inhibitors / S. M. Drawz, R. A. Bonomo // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2010. – Vol. 23. – № 1. – P. 160-201.
59. Durham S. H. Appropriate Use of Ceftriaxone in the Emergency Department of a Veteran's Health Care System / S. H. Durham, M. J. Wingler, L. S. Eiland // *Journal of Pharmacy Technology*. – 2017. – Vol. 33. – № 6. – P. 215-218.
60. Ehmam D. E. Avibactam is a covalent, reversible, non- β -lactam β -lactamase inhibitor / D. E. Ehmam, H. Jahić, P. L. Ross // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Vol. 109. – № 29. – P. 11663-11668.
61. Emami K. Repurposing drugs with specific activity against L-form bacteria / K. Emami, P. Banks, L. J. Wu, J. Errington // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol. 14. – № April. – P. 1-13.
62. Errington J. L-form bacteria, cell walls and the origins of life / J. Errington // *Open Biology*. – 2013. – Vol. 3. – № JAN.
63. Espinosa E. Hydrogen bond strengths revealed by topological analyses of experimentally observed electron densities / E. Espinosa, E. Molins, C. Lecomte // *Chemical Physics Letters*. – 1998. – Vol. 285. – № 3-4. – P. 170-173.
64. Feng H. Structural and mechanistic insights into NDM-1 catalyzed hydrolysis of cephalosporins / H. Feng, J. Ding, D. Zhu // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Vol. 136. – № 42. – P. 14694-14697.
65. Feng H. The mechanism of NDM-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis / H. Feng, X. Liu, S. Wang // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1.
66. Fenton B. A. Mutations in PBP2 from ceftriaxone-resistant *Neisseria gonorrhoeae* alter the dynamics of the β 3– β 4 loop to favor a low-affinity drug-binding state / B. A. Fenton, J. Tomberg, C. A. Sciandra // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – Vol. 279. – № 4. – P. 101188.
67. Fernández L. Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance / L. Fernández, R. E. W. Hancock // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2012. – Vol. 25. – № 4. – P. 661-681.

68. Finland M. In vitro susceptibility of pathogenic staphylococci to seven antibiotics. / M. Finland, P. F. Frank, C. Wilcox // *American journal of clinical pathology*. – 1950. – Vol. 20. – № 4. – P. 325-334.
69. Finlay J. A review of the antimicrobial activity of clavulanate / J. Finlay, L. Miller, J. A. Poupard // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2003. – Vol. 52. – № 1. – P. 18-23.
70. Fisher J. F. β -Lactam resistance mechanisms: Gram-positive bacteria and mycobacterium tuberculosis / J. F. Fisher, S. Mobashery // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2016. – Vol. 6. – № 5. – P. 1-20.
71. Frenkel D. *Understanding Molecular Simulations* / D. Frenkel, M. Klein, M. Parrinello, B. Smit. – Academic press, 2002. – P. 638.
72. Garau G. A metallo- β -lactamase enzyme in action: Crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem / G. Garau, C. Bebrone, C. Anne // *Journal of Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 345. – № 4. – P. 785-795.
73. Garau G. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases / G. Garau, I. García-Sáez, C. Bebrone // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – № 7. – P. 2347-2349.
74. Garau J. Fourth-generation cephalosporins: A review of in vitro activity, pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical utility / J. Garau, W. Wilson, M. Wood, J. Carlet // *Clinical Microbiology and Infection*. – 1997. – Vol. 3. – № SUPPL. 1. – P. s87-s101.
75. Garrity J. D. Metal Binding Asp-120 in Metallo- β -lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia* Plays a Crucial Role in Catalysis / J. D. Garrity, A. L. Carenbauer, L. R. Herron, M. W. Crowder // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – № 2. – P. 920-927.
76. Gatti C. Chemical information from the source function / C. Gatti, F. Cargnoni, L. Bertini // *Journal of Computational Chemistry*. – 2003. – Vol. 24. – № 4. – P. 422-436.
77. Giacobbe D. R. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Results from a multicenter case-control-control study / D. R. Giacobbe, V. Del Bono, E. M. Treccarichi // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2015. – Vol. 21. – № 12. – P. 1106.e1-1106.e8.
78. Giordano P. A. Cefdinir vs. cephalexin for mild to moderate uncomplicated skin and skin structure infections in adolescents and adults / P. A. Giordano, D. Elston, B. K. Akinlade // *Current Medical Research and Opinion*. – 2006. – Vol. 22. – № 12. – P. 2419-2428.
79. Girvan M. Community structure in social and biological networks / M. Girvan, M. E. J. Newman // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2002. – Vol. 99. – № 12. – P. 7821-7826.
80. Goffin C. Biochemistry and Comparative Genomics of SxxK Superfamily Acyltransferases Offer a Clue to the Mycobacterial Paradox: Presence of Penicillin-Susceptible Target Proteins versus Lack of

Efficiency of Penicillin as Therapeutic Agent / C. Goffin, J.-M. Ghuysen // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2002. – Vol. 66. – № 4. – P. 702-738.

81. Golemi D. Critical involvement of a carbamylated lysine in catalytic function of class D β -lactamases / D. Golemi, L. Maveyraud, S. Vakulenko // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2001. – Vol. 98. – № 25. – P. 14280-14285.

82. Gordon E. The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: Implication in drug resistance / E. Gordon, N. Mouz, E. Duée, O. Dideberg // *Journal of Molecular Biology*. – 2000. – Vol. 299. – № 2. – P. 477-485.

83. Hall B. G. Evolution of the serine β -lactamases: Past, present and future / B. G. Hall, M. Barlow // *Drug Resistance Updates*. – 2004. – Vol. 7. – № 2. – P. 111-123.

84. Hamilton-Miller J. M. T. Chemical and Microbiologic Aspects of Penems, a Distinct Class of β -Lactams: Focus on Faropenem / J. M. T. Hamilton-Miller // *Pharmacotherapy*. – 2003. – Vol. 23. – № 11. – P. 1497-1507.

85. Han S. Structural basis for effectiveness of siderophore- conjugated monocarbams against clinically relevant strains of *Pseudomonas aeruginosa* / S. Han, R. P. Zaniewski, E. S. Marr // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107. – № 51. – P. 22002-22007.

86. Hemmer R. J. P. Methicillin potentiates the effect of gentamicin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / R. J. P. Hemmer, P. Vaudaux, F. A. Waldvogel // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1979. – Vol. 15. – № 1. – P. 34-41.

87. Hinchliffe P. Structural and Kinetic Studies of the Potent Inhibition of Metallo- β -lactamases by 6-Phosphonomethylpyridine-2-carboxylates / P. Hinchliffe, C. A. Tanner, A. P. Krismanich // *Biochemistry*. – 2018. – Vol. 57. – № 12. – P. 1880-1892.

88. Hohenberg P. Inhomogeneous Electron Gas / P. Hohenberg, W. Kohn // *Physical Review*. – 1964. – Vol. 136. – № 3B. – P. B864-B871.

89. Höltje J.-V. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli* / J.-V. Höltje // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 1998. – Vol. 62. – № 1. – P. 181-203.

90. Humeniuk C. β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types / C. Humeniuk, G. Arlet, V. Gautier // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2002. – Vol. 46. – № 9. – P. 3045-3049.

91. Humphrey W. VMD: Visual molecular dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // *Journal of Molecular Graphics*. – 1996. – Vol. 14. – № 1. – P. 33-38.

92. Hünenberger P. H. Thermostat algorithms for molecular dynamics simulations / P. H. Hünenberger // *Advances in Polymer Science*. – 2005. – Vol. 173. – P. 105-147.

93. Huo X. Cilastatin protects against imipenem-induced nephrotoxicity via inhibition of renal organic anion transporters (OATs) / X. Huo, Q. Meng, C. Wang // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. – 2019. – Vol. 9. – № 5. – P. 986-996.
94. Ibrahim A. An observational prospective study on the appropriateness of ceftriaxone use in medical wards of PPUKM / A. Ibrahim, I. N. Mohamed, C. L. Lau // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 101. – P. 104.
95. Izrailev S. Steered Molecular Dynamics / S. Izrailev, S. Stepaniants, B. Isralewitz. – 1999. – P. 39-65.
96. Jacoby G. a. More extended-spectrum beta-lactamases / G. a Jacoby, A. a Medeiros // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1991. – Vol. 35. – № 9. – P. 1697-1704.
97. Jacoby G. A. Activities of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases / G. A. Jacoby, I. Carreras // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1990. – Vol. 34. – № 5. – P. 858-862.
98. Jin J. Density functional studies on photophysical properties and chemical reactivities of the triarylboranes : effect of the constraint of planarity / J. Jin, H. Li, T. Lu, Y. Duan. – 2013. – P. 3437-3446.
99. Ju L. C. The Continuing Challenge of Metallo- β -Lactamase Inhibition: Mechanism Matters / L. C. Ju, Z. Cheng, W. Fast // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2018. – Vol. 39. – № 7. – P. 635-647.
100. Kaminski G. A. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides / G. A. Kaminski, R. A. Friesner, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2001. – Vol. 105. – № 28. – P. 6474-6487.
101. Kästner J. Analysis of the statistical error in umbrella sampling simulations by umbrella integration / J. Kästner, W. Thiel // *Journal of Chemical Physics*. – 2006. – Vol. 124. – № 23.
102. Kästner J. Umbrella sampling / J. Kästner // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. – 2011. – Vol. 1. – № 6. – P. 932-942.
103. Kawai Y. Crucial role for central carbon metabolism in the bacterial L-form switch and killing by β -lactam antibiotics / Y. Kawai, R. Mercier, K. Mickiewicz // *Nature Microbiology*. – 2019. – Vol. 4. – № 10. – P. 1716-1726.
104. Kheirloomoom A. The combined effects of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling / A. Kheirloomoom, A. Kazemi-Vaysari, M. Ardjmand, A. Baradar-Khoshfetrat // *Process Biochemistry*. – 1999. – Vol. 35. – № 1-2. – P. 205-211.
105. Khrenova M. G. Modeling the Transient Kinetics of the L1 Metallo- β -Lactamase / M. G. Khrenova, A. V. Nemukhin // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2018. – Vol. 122. – № 4. – P. 1378-1386.

106. King D. T. New delhi metallo- β -lactamase: Structural insights into β -lactam recognition and inhibition / D. T. King, L. J. Worrall, R. Gruninger, N. C. J. Strynadka // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134. – № 28. – P. 11362-11365.
107. Kirby M. W. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci / Kirby M. W. // *Science*. – 1944. – Vol. 99. – № 2579. – P. 452-453.
108. Klein N. C. Third-generation cephalosporins / N. C. Klein, B. A. Cunha // *Medical Clinics of North America*. – 1995. – Vol. 79. – № 4. – P. 705-719.
109. Kliebe C. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins / C. Kliebe, B. A. Nies, J. F. Meyer // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1985. – Vol. 28. – № 2. – P. 302-307.
110. Knowles J. K. On the ellipticity of the equations of nonlinear elastostatics for a special material / J. K. Knowles, E. Sternberg // *Journal of Elasticity*. – 1975. – Vol. 5. – № 3-4. – P. 341-361.
111. Kohn W. Self-consistent equations including exchange and correlation effects / W. Kohn, L. J. Sham // *Physical Review*. – 1965. – Vol. 140. – № 4A.
112. Kong K. F. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology / K. F. Kong, L. Schneper, K. Mathee // *Apmis*. – 2010. – Vol. 118. – № 1. – P. 1-36.
113. Kumar S. The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method / S. Kumar, J. M. Rosenberg, D. Bouzida // *Journal of Computational Chemistry*. – 1992. – Vol. 13. – № 8. – P. 1011-1021.
114. Kuriyama T. Antimicrobial Chemotherapy: Significance to Healthcare / T. Kuriyama, T. Karasawa, D. W. Williams. – Elsevier Inc., 2014. – 209-244 p.
115. Lakhundi S. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology / S. Lakhundi, K. Zhang // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2018. – Vol. 31. – № 4. – P. 1-103.
116. Langenaeker W. Quantum-chemical study of the Fukui function as a reactivity index / W. Langenaeker, K. Demel, P. Geerlings // *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*. – 1991. – Vol. 234. – P. 329-342.
117. Lauretti L. Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate / L. Lauretti, M. L. Riccio, A. Mazzariol // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1999. – Vol. 43. – № 7. – P. 1584-1590.
118. Lee J. Crystal structure of the VP4 protease from infectious pancreatic necrosis virus reveals the acyl-enzyme complex for an intermolecular self-cleavage reaction / J. Lee, A. R. Feldman, B. Delmas, M. Paetzel // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282. – № 34. – P. 24928-24937.

119. Lemaire S. Restoration of susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics by acidic pH: Role of penicillin-binding protein PBP / S. Lemaire, C. Fuda, F. Van Bambeke // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 19. – P. 12769-12776.
120. Lim D. Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / D. Lim, N. C. J. Strynadka // *Nature Structural Biology*. – 2002. – Vol. 9. – № 11. – P. 870-876.
121. Linciano P. Ten Years with New Delhi Metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): From Structural Insights to Inhibitor Design / P. Linciano, L. Cendron, E. Gianquinto // *ACS Infectious Diseases*. – 2019. – Vol. 5. – № 1. – P. 9-34.
122. Lisa M. N. A general reaction mechanism for carbapenem hydrolysis by mononuclear and binuclear metallo- β -lactamases / M. N. Lisa, A. R. Palacios, M. Aitha // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-11.
123. Liu D. C. On the limited memory BFGS method for large scale optimization / D. C. Liu, J. Nocedal // *Mathematical Programming*. – 1989. – Vol. 45. – № 1-3. – P. 503-528.
124. Livermore D. M. In vitro activity of cefepime/zidebactam (WCK 5222) against Gram-negative bacteria / D. M. Livermore, S. Mushtaq, M. Warner // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 72. – № 5. – P. 1373-1385.
125. Lobkovsky E. Evolution of an enzyme activity: Crystallographic structure at 2-Å resolution of cephalosporinase from the ampC gene of *Enterobacter cloacae* P99 and comparison with a class A penicillinase / E. Lobkovsky, P. C. Moews, H. Liu // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1993. – Vol. 90. – № 23. – P. 11257-11261.
126. Logan L. K. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace / L. K. Logan, R. A. Weinstein // *Journal of Infectious Diseases*. – 2017. – Vol. 215. – № Suppl 1. – P. S28-S36.
127. Lohans C. T. Mechanistic Insights into β -Lactamase-Catalysed Carbapenem Degradation Through Product Characterisation / C. T. Lohans, E. I. Freeman, E. van Groesen // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-9.
128. Lu T. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer / T. Lu, F. Chen // *Journal of Computational Chemistry*. – 2012. – Vol. 33. – № 5. – P. 580-592.
129. Lu W. P. Kinetics of β -lactam interactions with penicillin-susceptible and -resistant penicillin-binding protein 2x proteins from *Streptococcus pneumoniae*. Involvement of acylation and deacylation β -lactam resistance / W. P. Lu, E. Kincaid, Y. Sun, M. D. Bauer // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – № 34. – P. 31494-31501.

130. Macheboeuf P. Penicillin binding proteins: Key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes / P. Macheboeuf, C. Contreras-Martel, V. Job // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2006. – Vol. 30. – № 5. – P. 673-691.
131. Mallalieu N. L. Safety and Pharmacokinetic Characterization of Nacubactam, a Novel β -Lactamase Inhibitor, Alone and in Combination with Meropenem, in Healthy Volunteers / N. L. Mallalieu, E. Winter, S. Fettner // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2020. – Vol. 64. – № 5. – P. 1-12.
132. Mardirossian N. Thirty years of density functional theory in computational chemistry: an overview and extensive assessment of 200 density functionals / N. Mardirossian, M. Head-Gordon // *Molecular Physics*. – 2017. – Vol. 115. – № 9. – P. 2315-2372.
133. Marshall S. Can ceftazidime-avibactam and aztreonam overcome β -lactam resistance conferred by metallo- β -lactamases in Enterobacteriaceae? / S. Marshall, A. M. Hujer, L. J. Rojas // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 61. – № 4.
134. Massova I. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases / I. Massova, S. Mobashery // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1998. – Vol. 42. – № 1. – P. 1-17.
135. Mathers A. Mobilization of carbapenemase-mediated resistance in enterobacteriaceae / A. Mathers // *Emerging Infections* 10. – 2016. – P. 201-212.
136. Mayo S. L. DREIDING: A generic force field for molecular simulations / S. L. Mayo, B. D. Olafson, W. A. Goddard // *Journal of Physical Chemistry*. – 1990. – Vol. 94. – № 26. – P. 8897-8909.
137. McManus-Munoz, S. Kinetic mechanism of metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia* / S. McManus-Munoz, M. W. Crowder // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – № 5. – P. 1547-53.
138. Medeiros A. A. Ampicillin-Resistant *Hæmophilus Influenzæ* Type B Possessing a Tem-Type B-Lactamase But Little Permeability Barrier To Ampicillin / A. A. Medeiros, T. F. O'Brien // *The Lancet*. – 1975. – Vol. 305. – № 7909. – P. 716-719.
139. Melo M. C. R. Generalized correlation-based dynamical network analysis: A new high-performance approach for identifying allosteric communications in molecular dynamics trajectories / M. C. R. Melo, R. C. Bernardi, C. De La Fuente-Nunez, Z. Luthey-Schulten // *Journal of Chemical Physics*. – 2020. – Vol. 153. – № 13.
140. Mickiewicz K. M. Possible role of L-form switching in recurrent urinary tract infection / K. M. Mickiewicz, Y. Kawai, L. Drage // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-9.
141. Naas T. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function / T. Naas, S. Oueslati, R. A. Bonnin // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2017. – Vol. 32. – № 1. – P. 917-919.

142. Nakata A. Time-dependent density functional theory calculations for core-excited states: Assessment of standard exchange-correlation functionals and development of a novel hybrid functional / A. Nakata, Y. Imamura, T. Otsuka, H. Nakai // *Journal of Chemical Physics*. – 2006. – Vol. 124. – № 9.
143. Newton G. G. F. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- α -aminoadipic acid / G. G. F. Newton, E. P. Abraham // *Nature*. – 1955. – Vol. 175. – № 4456. – P. 548.
144. Newton, G. G. Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D- α -aminoadipic acid. / G. G. Newton, E. P. Abraham // *The Biochemical journal*. – 1956. – Vol. 62. – № 4. – P. 651-658.
145. Nicola G. Crystal structure of Escherichia coli penicillin-binding protein 5 bound to a tripeptide boronic acid inhibitor: A role for Ser-110 in deacylation / G. Nicola, S. Peddi, M. Stefanova // *Biochemistry*. – 2005. – Vol. 44. – № 23. – P. 8207-8217.
146. Nordmann P. The emerging NDM carbapenemases / P. Nordmann, L. Poirel, T. R. Walsh, D. M. Livermore // *Trends in Microbiology*. – 2011. – Vol. 19. – № 12. – P. 588-595.
147. Norrby, S. R. Neurotoxicity of carbapenem antibiotics: Consequences for their use in bacterial meningitis / S. R. Norrby // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2000. – Vol. 45. – № 1. – P. 5-7.
148. O'Neill, J. An audience with / J. O'Neill // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2016. – Vol. 15. – № 8. – P. 526.
149. Ohnishi M. Is Neisseria gonorrhoeae initiating a future era of untreatable gonorrhea? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone / M. Ohnishi, D. Golparian, K. Shimuta // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55. – № 7. – P. 3538-3545.
150. Oostenbrink C. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6 / C. Oostenbrink, A. Villa, A. E. Mark, W. F. Van Gunsteren // *Journal of Computational Chemistry*. – 2004. – Vol. 25. – № 13. – P. 1656-1676.
151. Powers J. H. Antimicrobial drug development - The past, the present, and the future / J. H. Powers // *Clinical Microbiology and Infection, Supplement*. – 2004. – Vol. 10. – № 4. – P. 23-31.
152. Paetzel M. Catalytic hydroxyl/amine dyads within serine proteases / M. Paetzel, R. E. Dalbey // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1997. – Vol. 22. – № 1. – P. 28-31.
153. Pais G. M. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cefepime / G. M. Pais, J. Chang, E. F. Barreto // *Clinical Pharmacokinetics*. – 2022. – Vol. 61. – № 7. – P. 929-953.
154. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function / T. Palzkill // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2013. – Vol. 1277. – № 1. – P. 91-104.
155. Papp-Wallace K. M. Carbapenems: Past, present, and future / K. M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M. A. Taracila, R. A. Bonomo // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55. – № 11. – P. 4943-4960.

156. Payne L. E. Cefepime-induced neurotoxicity: A systematic review / L. E. Payne, D. J. Gagnon, R. R. Riker // *Critical Care*. – 2017. – Vol. 21. – № 1. – P. 1-8.
157. Pereira R. Class A β -lactamases and inhibitors: In silico analysis of the binding mode and the relationship with resistance / R. Pereira, V. W. H. Rabelo, A. Sibajev // *Journal of Biotechnology*. – 2018. – Vol. 279. – № December 2017. – P. 37-46.
158. Petersilka M. Excitation Energies from Time-Dependent Density-Functional Theory / M. Petersilka, U. J. Gossmann, E. K. U. Gross. – 1996. – № 4. – P. 0-3.
159. Petrovic Fabijan A. L-Form Switching in *Escherichia coli* as a Common β -Lactam Resistance Mechanism / A. Petrovic Fabijan, D. Martinez-Martin, C. Venturini // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – Vol. 10. – № 5. – P. 1-8.
160. Pettinati I. The Chemical Biology of Human Metallo- β -Lactamase Fold Proteins / I. Pettinati, J. Brem, S. Y. Lee // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2016. – Vol. 41. – № 4. – P. 338-355.
161. Pfeifer Y. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens / Y. Pfeifer, A. Cullik, W. Witte // *International Journal of Medical Microbiology*. – 2010. – Vol. 300. – № 6. – P. 371-379.
162. Poirel L. Acquisition of extended-spectrum β -lactamase *ges-6* leading to resistance to ceftolozane-tazobactam combination in *Pseudomonas Aeruginosa* / L. Poirel, J. M. O. De La Rosa, N. Kieffer // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2019. – Vol. 63. – № 1.
163. Poirel L. Chromosome-encoded ambler class a β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases / L. Poirel, P. Kämpfer, P. Nordmann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2002. – Vol. 46. – № 12. – P. 4038-4040.
164. Poirel L. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae* / L. Poirel, C. Héritier, V. Tolün, P. Nordmann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – № 1. – P. 15-22.
165. Popelier P. L. A. On the full topology of the Laplacian of the electron density / P. L. A. Popelier // *Coordination Chemistry Reviews*. – 2000. – Vol. 197. – № 1. – P. 169-189.
166. Prinarakis E. E. Emergence of an inhibitor-resistant β -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant / E. E. Prinarakis, V. Miriagou, E. Tzelepi // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1997. – Vol. 41. – № 4. – P. 838-840.
167. Rachina S. Longitudinal point prevalence survey of antimicrobial consumption in Russian hospitals: Results of the global-PPS project / S. Rachina, Y. Belkova, R. Kozlov // *Antibiotics*. – 2020. – Vol. 9. – № 8. – P. 1-12.
168. Rammelkamp C. H. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the Action of Penicillin / C. H. Rammelkamp, T. Maxon // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1942. – Vol. 51. – № 3. – P. 386-389.

169. Rappé A. K. K. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations / A. K. K. Rappé, C. J. J. Casewit, K. S. S. Colwell // *J. Am. Chem. Soc.* – 1992. – Vol. 114. – № 25. – P. 10024-10035.
170. Reeves D. S. The aminopenicillins: Development and comparative properties / D. S. Reeves, D. W. Bullock // *Infection.* – 1979. – Vol. 7. – № 5 Supplement.
171. Rice L. B. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones / L. B. Rice // *Mayo Clinic Proceedings.* – 2012. – Vol. 87. – № 2. – P. 198-208.
172. Rosanova M. T. Efficacy and safety of ceftaroline: systematic review and meta-analysis / M. T. Rosanova, P. S. Aguilar, N. Sberna, R. Lede // *Therapeutic Advances in Infectious Disease.* – 2019. – Vol. 6. – P. 1-16.
173. Ruhal R. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria / R. Ruhal, R. Kataria // *Microbiological Research.* – 2021. – Vol. 251. – № March. – P. 126829.
174. Sader H. S. Antimicrobial activity of murepavadin tested against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the United States, Europe, and China / H. S. Sader, G. E. Dale, P. R. Rhomberg, R. K. Flamm // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2018. – Vol. 62. – № 7. – P. 1-14.
175. Sammes P. Recent Advances in the Chemistry of β -lactam Antibiotics: Second International Symposium / P. Sammes // *Biochemical Education.* – 1982. – Vol. 10. – № 1. – P. 44.
176. Sanbongi Y. Classification of OprD sequence and correlation with antimicrobial activity of carbapenem agents in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates collected in Japan / Y. Sanbongi, A. Shimizu, T. Suzuki // *Microbiology and Immunology.* – 2009. – Vol. 53. – № 7. – P. 361-367.
177. Sánchez P. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants / P. Sánchez, J. F. Linares, B. Ruiz-Díez // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* – 2002. – Vol. 50. – № 5. – P. 657-664.
178. Santillana E. Crystal structure of the carbapenemase OXA-24 reveals insights into the mechanism of carbapenem hydrolysis / E. Santillana, A. Beceiro, G. Bou, A. Romero // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2007. – Vol. 104. – № 13. – P. 5354-5359.
179. Santucci M. Computational and biological profile of boronic acids for the detection of bacterial serine- and metallo- β -lactamases / M. Santucci, F. Spyraakis, S. Cross // *Scientific Reports.* – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-15.
180. Sauvage E. Crystal Structure of the *Bacillus subtilis* Penicillin-binding Protein 4a, and its Complex with a Peptidoglycan Mimetic Peptide / E. Sauvage, C. Duez, R. Herman // *Journal of Molecular Biology.* – 2007. – Vol. 371. – № 2. – P. 528-539.

181. Sauvage E. The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis / E. Sauvage, F. Kerff, M. Terrak // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2008. – Vol. 32. – № 2. – P. 234-258.
182. Savin A. ELF: The Electron Localization Function / A. Savin, R. Nesper, S. Wengert, T. F. Fässler // *Angewandte Chemie International Edition in English*. – 1997. – Vol. 36. – № 17. – P. 1808-1832.
183. Schaar V. Group A streptococci are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing β -lactamase derived from *Haemophilus influenzae* / V. Schaar, I. Uddbäck, T. Nordström, K. Riesbeck // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2014. – Vol. 69. – № 1. – P. 117-120.
184. Scheffers D. J. PBP1 is a component of the *Bacillus subtilis* cell division machinery / D. J. Scheffers, J. Errington // *Journal of Bacteriology*. – 2004. – Vol. 186. – № 15. – P. 5153-5156.
185. Senn H. M. QM/MM methods for biomolecular systems / H. M. Senn, W. Thiel // *Angewandte Chemie - International Edition*. – 2009. – Vol. 48. – № 7. – P. 1198-1229.
186. Shapiro A. B. Fluorescence anisotropy-based measurement of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 2 transpeptidase inhibitor acylation rate constants / A. B. Shapiro, N. Gao, R. F. Gu, J. Thresher // *Analytical Biochemistry*. – 2014. – Vol. 463. – P. 15-22.
187. Shen Z. CTX-M-190, a novel β -lactamase resistant to tazobactam and sulbactam, identified in an *Escherichia coli* clinical isolate / Z. Shen, B. Ding, Y. Bi // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 61. – № 1.
188. Sileshi A. Evaluation of ceftriaxone utilization in medical and emergency wards of Tikur Anbessa specialized hospital: A prospective cross-sectional study / A. Sileshi, A. Tenna, M. Feyissa, W. Shibeshi // *BMC Pharmacology and Toxicology*. – 2016. – Vol. 17. – № 1. – P. 1-10.
189. Singer S. J. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes / S. J. Singer, G. L. Nicolson // *Science*. – 1972. – Vol. 175. – № 4023. – P. 720-731.
190. Singh A. Mutations in penicillin-binding protein 2 from cephalosporin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* hinder ceftriaxone acylation by restricting protein dynamics / A. Singh, J. M. Turner, J. Tomberg // *Journal of Biological Chemistry*. – 2020. – Vol. 295. – № 21. – P. 7529-7543.
191. Sirirak J. Benchmarking quantum mechanical methods for calculating reaction energies of reactions catalyzed by enzymes / J. Sirirak, N. Lawan, M. W. Van der Kamp, J. N. Harvey, A.J. Mulholland // *PeerJ Physical Chemistry*. – 2020. – P. 2:e8.
192. Sirot J. *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae producing novel plasmid-mediated p-lactamases markedly active against third-generation cephalosporins: Epidemiologic studies / J. Sirot, C. Chanal, A. Petit // *Clinical Infectious Diseases*. – 1988. – Vol. 10. – № 4. – P. 850-859.
193. Stefanova M. E. Overexpression and enzymatic characterization of *Neisseria gonorrhoeae* penicillin-binding protein / M. E. Stefanova, J. Tomberg, C. Davies // *European Journal of Biochemistry*. – 2004. – Vol. 271. – № 1. – P. 23-32.

194. Sunagawa M. Structural Features Resulting in Convulsive Activity of Carbapenem Compounds: Effect of C-2 Side Chain / M. Sunagawa, H. Matsumura, Y. Sumita, H. Nouda // *The Journal of Antibiotics*. – 1995. – Vol. 48. – № 5. – P. 408-416.
195. Sykes R. B. Azthreonam (SQ 26,776), a synthetic monobactam specifically active against aerobic gram-negative bacteria / R. B. Sykes, D. P. Bonner, K. Bush, N. H. Georgopapadaku // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1982. – Vol. 21. – № 1. – P. 85-92.
196. Taccetti G. Cystic fibrosis: Recent insights into inhaled antibiotic treatment and future perspectives / G. Taccetti, M. Francalanci, G. Pizzamiglio // *Antibiotics*. – 2021. – Vol. 10. – № 3.
197. Tao J. Climbing the density functional ladder: Nonempirical meta-generalized gradient approximation designed for molecules and solids / J. Tao, J. P. Perdew, V. N. Staroverov, G. E. Scuseria // *Physical Review Letters*. – 2003. – Vol. 91. – № 14.
198. Tiddens H. Inhaled Antibiotics / H. Tiddens // *Pediatric Pulmonology*. – 2004. – Vol. 37. – № SUPPL. 26. – P. 92-94.
199. Tioni M. F. Trapping and characterization of a reaction intermediate in carbapenem hydrolysis by *B. cereus* metallo- β -lactamase / M. F. Tioni, L. I. Llarrull, A. A. Poeylout-Palena // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 47. – P. 15852-15863.
200. Tomberg J. Identification of amino acids conferring high-level resistance to expanded-spectrum cephalosporins in the penA gene from *Neisseria gonorrhoeae* strain H041 / J. Tomberg, M. Unemo, M. Ohnishi // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 57. – № 7. – P. 3029-3036.
201. Tomberg J. Molecular and structural analysis of mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*: Role of epistatic mutations / J. Tomberg, M. Unemo, C. Davies, R. A. Nicholas // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49. – № 37. – P. 8062-8070.
202. Tripathi R. Deacylation Mechanism and Kinetics of Acyl-Enzyme Complex of Class C β -Lactamase and Cephalothin / R. Tripathi, N. N. Nair // *Journal of Physical Chemistry B*. – 2016. – Vol. 120. – № 10. – P. 2681-2690.
203. Tsuji A. Degradation kinetics and mechanism of aminocephalosporins in aqueous solution: Cefadroxil / A. Tsuji, E. Nakashima, Y. Deguchi // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 1981. – Vol. 70. – № 10. – P. 1120-1128.
204. Urban C. Interaction of sulbactam, clavulanic acid and tazobactam with penicillin-binding proteins of imipenem-resistant and -susceptible *Acinetobacter baumannii* / C. Urban, E. Go, N. Mariano, J. J. Rahal // *FEMS Microbiology Letters*. – 1995. – Vol. 125. – № 2-3. – P. 193-197.
205. Verbeke F. Peptides as quorum sensing molecules: Measurement techniques and obtained levels in vitro and in vivo / F. Verbeke, S. De Craemer, N. Debunne // *Frontiers in Neuroscience*. – 2017. – Vol. 11. – № APR. – P. 1-18.

206. Verlet L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules / L. Verlet // *Physical Review*. – 1967. – Vol. 159. – № 1. – P. 98-103.
207. Vettoretti L. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients / L. Vettoretti, P. Plésiat, C. Muller // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – Vol. 53. – № 5. – P. 1987-1997.
208. Vollmer W. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli* / W. Vollmer, U. Bertsche // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. – 2008. – Vol. 1778. – № 9. – P. 1714-1734.
209. Vu H. Role of β -lactam hydrolysis in the mechanism of resistance of a β -lactamase-constitutive *Enterobacter cloacae* strain to expanded-spectrum β -lactams / H. Vu, H. Nikaido // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1985. – Vol. 27. – № 3. – P. 393-398.
210. Walsh T. R. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study / T. R. Walsh, J. Weeks, D. M. Livermore, M. A. Toleman // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2011. – Vol. 11. – № 5. – P. 355-362.
211. Wang J. Development and testing of a general amber force field / J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell // *Journal of Computational Chemistry*. – 2004. – Vol. 25. – № 9. – P. 1157-1174.
212. Wang Z. Direct observation of an enzyme-bound intermediate in the catalytic cycle of the metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis* / Z. Wang, W. Fast, S. J. Benkovic // *Journal of the American Chemical Society*. – 1998. – Vol. 120. – № 41. – P. 10788-10789.
213. Wang Z. On the mechanism of the metallo- β -lactamase from *Bacteroides fragilis* / Z. Wang, W. Fast, S. J. Benkovic // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38. – № 31. – P. 10013-10023.
214. Wappett D. A. Benchmarking Density Functional Theory Methods for Metalloenzyme Reactions: The Introduction of the MME55 Set / D. A. Wappett, L. Goerigk. – 2023.
215. Watanabe M. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* / M. Watanabe, S. Iyobe, M. Inoue, S. Mitsuhashi // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1991. – Vol. 35. – № 1. – P. 147-151.
216. Wlodawer A. Inhibitors of hiv-1 protease: A Major Success of Structure-Assisted Drug Design / A. Wlodawer, J. Vondrasek // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 1998. – Vol. 27. – № 1. – P. 249-284.
217. Wommer S. Substrate-activated zinc binding of metallo- β -lactamases: Physiological importance of the mononuclear enzymes / S. Wommer, S. Rival, U. Heinz // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277. – № 27. – P. 24142-24147.
218. Yahav D. Efficacy and safety of cefepime: a systematic review and meta-analysis / D. Yahav, M. Paul, A. Fraser // *Lancet Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 7. – № 5. – P. 338-348.

219. Yong D. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India / D. Yong, M. A. Toleman, C. G. Giske // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2009. – Vol. 53. – № 12. – P. 5046-5054.
220. Zakharenkov I. A. Consumption of systemic antibiotics in the Russian Federation in 2017–2021 / I. A. Zakharenkov, S. A. Rachina, R. S. Kozlov, Y. A. Belkova // *Klinicheskaa Mikrobiologia i Antimikrobnaa Himioterapia*. – 2022. – Vol. 24. – № 3. – P. 220-225.
221. Zhanel G. G. Ceftazidime-avibactam: A novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination / G. G. Zhanel, C. D. Lawson, H. Adam // *Drugs*. – 2013. – Vol. 73. – № 2. – P. 159-177.
222. Zhi X. Approvals by the China NMPA in 2023 / X. Zhi, Q. Li, L. Shao // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2024. – Vol. 23. – № 3. – P. 164-165.
223. Zhou X. Y. Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 β -lactamase conferring resistance to β -lactamase inhibitors / X. Y. Zhou, F. Bordon, D. Sirot // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1994. – Vol. 38. – № 5. – P. 1085-1089.
224. Zhu L. L. Optimal infusion rate in antimicrobial therapy: Explosion of evidence in the last five years / L. L. Zhu, Q. Zhou // *Infection and Drug Resistance*. – 2018. – Vol. 11. – P. 1105-1117.
225. Правительство Российской Федерации. Распоряжение От 25 Сентября 2017 Г. № 2045-Р Об Утверждении Стратегии Предупреждения Распространения Антимикробной Резистентности В Российской Федерации На Период До 2030 Г. / Правительство Российской Федерации. – 2017.