



NDM-1 结构功能及抑制剂的抑制机理

崔灿¹, 杨海涛², 王泽方^{1*}

¹天津大学生命科学学院, 结构生物学实验中心, 天津 300072

²上海科技大学生命科学与技术学院, 上海免疫化学研究所, 上海 201210

摘要: 在过去的 10 年中, 以新德里金属 β -内酰胺酶-1(NDM-1)为代表的金属 β -内酰胺酶在全球范围内广泛传播, 对公共卫生安全产生了较大的威胁。尤其是近些年这些酶的突变体的出现使得耐药菌给人类健康造成了更加复杂和困难的挑战。目前, 临床上仍然缺乏有效的治疗药物和手段。研发有效广谱的抑制剂成为解决此问题的重点。因此本文将针对 NDM-1 及其相关抑制剂复合物的三维结构解析工作进行综述, 希望从生物学机制研究的角度带给相关研究人员一点启发和帮助。

关键词: 新德里 β 内酰胺酶-1, 金属 β -内酰胺酶, 抑制剂, 抑制机制, 复合物晶体结构

在过去的 10 年中, 新德里金属 β -内酰胺酶-1 (NDM-1)成为“超级细菌”的代言人, 并在全球范围内广泛传播。2008 年, NDM-1 首次在印度新德里的一名瑞典病人身上被发现; 2010 年 8 月, 全世界开始大规模暴发“超级细菌”传染病疫情, 短短两个月便已传播至南亚、东亚地区, 欧洲地区以及北美地区并引发公众恐慌。由于 NDM-1 拥有比其他金属内酰胺酶更加广谱的底物范围, 甚至可以水解抗生素的最后一道防线——碳青霉烯类抗生素, 导致人类在对抗 NDM-1“超级细菌”时缺乏合适的抗生素, 从而造成了许多人的死亡。这次疫情的暴发, 经过了 Kumarasamy 等的报道^[1], 才

真正引起国际性的关注。科学家们从世界各地检测出许多携带 NDM-1 的菌株以及 NDM-1 的亚型, 至今为止, 已经有 29 种 NDM 亚型 (NDM-1–NDM-29)被发现, 这些突变体的出现使得耐药菌给人类健康造成了更加复杂和困难的挑战^[2], 极可能对公共卫生安全构成越来越严重的威胁^[3]。目前, 针对 NDM-1 的研究已经不少, 但在临床上仍然缺乏有效的治疗药物和手段。利用 X 射线衍射技术, 对蛋白质晶体进行结构解析, 可以提供直观、精确的结构生物学证据, 并在此基础上为新型药物或抑制剂的研发提供严谨的结构模型, 在生物学和医药学上具有重要的研究价值。

基金项目: 国家自然科学基金(31970048, 81601593)

*通信作者。E-mail: zefangwang@tju.edu.cn

收稿日期: 2020-03-09; 修回日期: 2020-05-16; 网络出版日期: 2020-07-08

因此, 针对 NDM-1 及其相关复合物的三维结构进行解析工作, 可以从生物学机制的角度带给相关研究人员一点启发和帮助。

1 NDM 的特点

1.1 遗传特点

NDM-1 是一种分子量约为 27.5 kDa 的单链金属 β-内酰胺酶, 由 270 个氨基酸组成, 其 N 端有一个约 2.85 kDa 大小的信号肽, 可以水解几乎所有种类的 β-内酰胺类抗生素。甚至还可以水解令多数细菌敏感的碳青霉烯类抗生素。最初发现该蛋白由储存于肺炎克雷伯杆菌质粒上的 blaNDM-1 基因编码^[4], 通过对抗性菌株的分离发现其基因既可以通过质粒进行无性繁殖, 也十分容易因为质粒的接合转移、重排等作用变得更加多样。而 Walsh 等^[5]发现, 这种基因不仅可以在肠杆菌中传播, 甚至可以传播至其他菌种, 但其基

因稳定性和耐药性在不同菌种中有较大差异。此外, 当温度在 30 °C 时, 该基因的结合和转移都更容易发生, Pfeifer 等^[6]发现鲍曼不动杆菌中的 blaNDM-1 能够借助 IS26、IS930 和转座酶等可移动元件整合到染色体上以提高基因的稳定性。以上研究揭示了其传播速度较其他耐药基因更加迅速的种种原因。因此我们可以得出结论, 该基因可以利用质粒快速进行跨菌种传播, 还能够在转座因子和转座酶的帮助下整合到细菌的染色体上, 使遗传和耐药性更加稳定。

1.2 结构特点

在结构上, NDM-1 属于金属 β-内酰胺酶(MBLs) 3 个亚类(B1, B2, B3)中与临床关系特别紧密的 B1 类, 且被囊括在由 Neuwald 等在 1997 年提出并定义的金属依赖型水解酶家族(MBL super family)中^[7-9]。

NDM-1 的氨基酸序列与许多其他 B1-MBLs 亚类的氨基酸序列差异非常明显(图 1), 但是他们

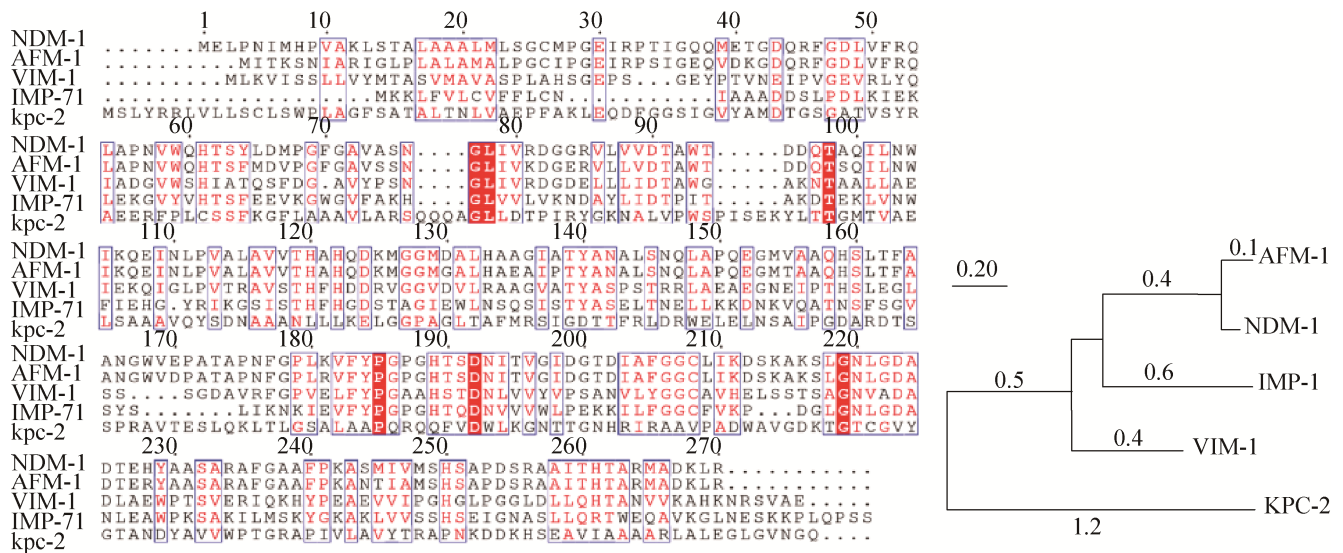


图 1. NDM-1 与其他 MBLs 的序列比对及最大似然法进化树

Figure 1. Sequence alignment and molecular phylogenetic analysis by maximum likelihood method between NDM-1 and other MBLs. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 5 amino acid sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 192 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7.

之间的三维结构非常相似, 呈现明显的独特而保守的 $\alpha\beta/\beta\alpha$ 汉堡夹心结构。相较于丝氨酸 β -内酰胺酶(SBLs), 以 NDM-1 为代表的 MBLs, 其底物更加混杂, 水解能力更强。Guo 等解析的 NDM-1 的高分辨率晶体结构(图 2, 1.91Å, PDB: 3S0Z) 显示, NDM-1 晶体属于空间群 *I422*, 每个不对称单元含有 1 个分子^[10]。一般从 N 端起将其二级结构分别命名为 $\alpha 1$ - $\alpha 7$ 、 $\beta 1$ - $\beta 12$ 。3 段 loop 区 L3(P67-F70)、L7 和 L10 构成了 NDM-1 活性口袋的主体, 可将其分为左右 2 个结构域, 活性中心的 2 个 Zn(II) 处于口袋底部。为了方便分析, 一般将由 His120、His122、His189 所组成的组氨酸结合位点配位的(II)编号为 Zn1, 与 Cys208 和 His250 所组成的半胱氨酸结合位点配位的(II)编号为 Zn2, 这 2 个 Zn(II) 距离为 3.2 Å, 通过 Asp124 侧链相互连接^[11]。

相较于丝氨酸 β -内酰胺酶(SBLs), NDM-1 活性位点比较深。参与底物结合识别的发夹 L3 环的特征在于存在与底物疏水取代基相互作用的疏水

残基(Leu65、Met67、Phe70 和 Val73), 而 L10 环包括配位 Zn2 的残基(Cys208)以及与底物羧基相互作用的残基(Lys211 和 Asn220)^[12]。这说明, 不同于 SBLs 由四联体 $S^{70}XXK^{73}$ 、三联体 $S^{130}DN^{132}$ 、 $K^{234}TG^{236}$ 以及 Ω 环组成的较为固定而保守的结合口袋^[13](图 3), NDM-1 的结合口袋虽然被多个环路包围, 使活性位点处于口袋“底部”较深的位置, 但其位置仍然处于蛋白的表层, 且口袋大而灵活, 其活性中心的 Zn(II), 也可与环境溶剂直接接触。

1.2.1 特殊氨基酸残基序列: 通过结构比对可以看出(图 4), 相较于其他 MBLs, NDM-1 具有一些特殊的氨基酸链。

其一是 Phe163-Asn166。这个区域位于 NDM-1 的左右 2 个结构域之间, 在其他 MBLs 中是从没有过的。从序列比对的结果也同样可以得到这个结论。虽然从结构分析来看, 这段氨基酸链距活性中心较远, 参与直接催化的可能性十分低。但在 Yong 等^[4]的研究中认为, 这段氨基酸链

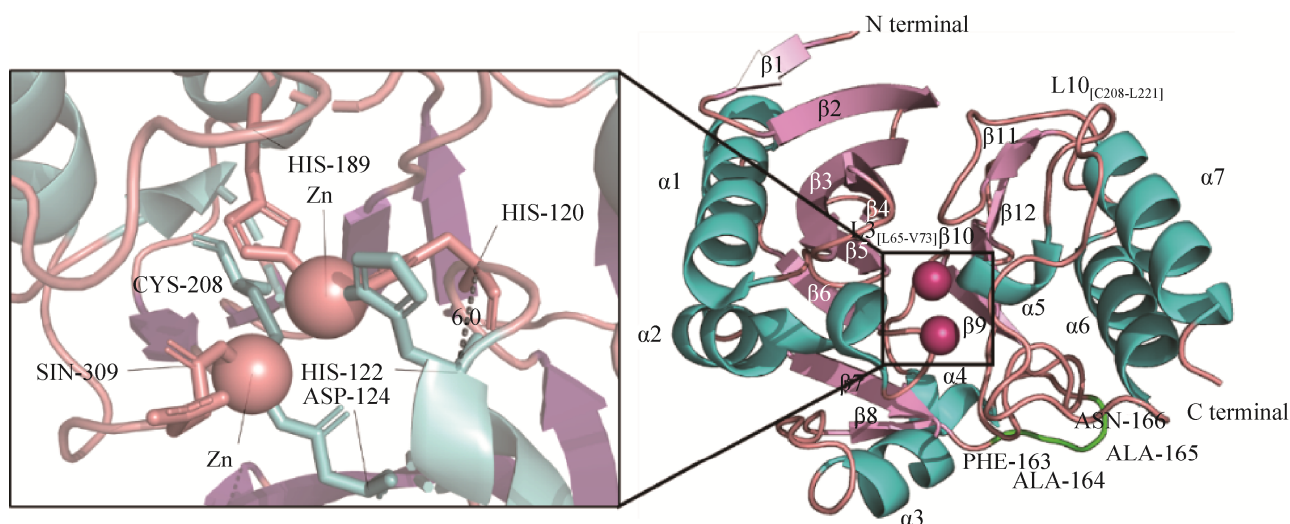


图 2. NDM-1 二级结构顺序及离子结合位点

Figure 2. Number of NDM-1 secondary structure and ions binding site.

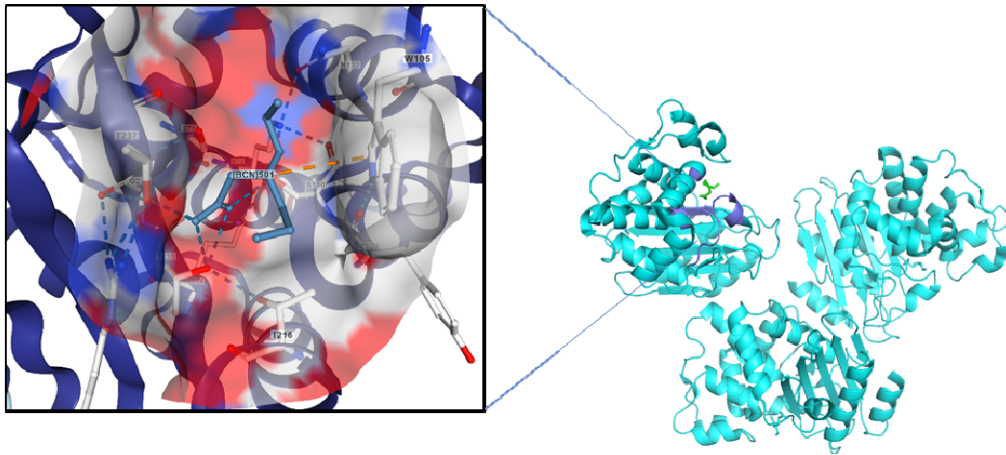


图 3. kpc-2(SBLs)活性口袋示意图

Figure 3. Schematic diagram of kpc-2 (SBLs) active pocket.

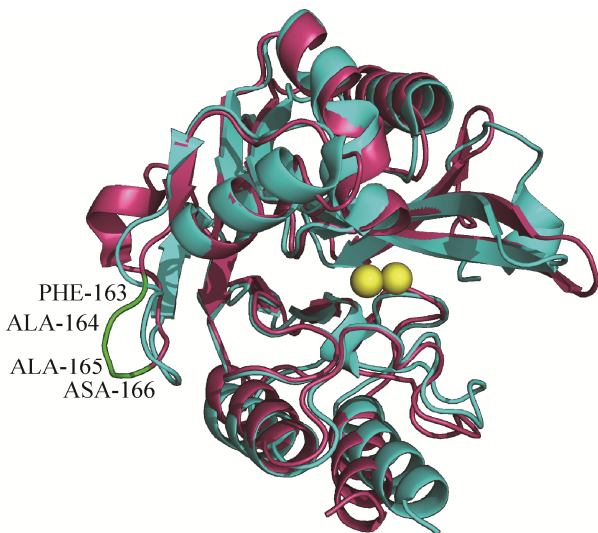


图 4. NDM-1 与 VIM-1 结构比对

Figure 4. Comparison of NDM-1 and VIM-1 structures.

存在于将蛋白左右两部分相连的 Loop 环上,使得 NDM-1 结构更松散灵活,却没有影响其结构的稳定。因此很可能是 NDM-1 比其他 MBLs 具有更广泛耐药性的原因之一。

其二是 NDM-1 特有的是 Tyr229 残基(图 5)。这个残基是被酶活性位点的底部覆盖的,因此有人推断这个残基因为被覆盖隔离导致在酶活反应

中没有起直接的作用,后来此推断从 Y229W 突变活性测试中已得到证明^[14]。但是, Tyr229、Leu209 和 Gly188 在酶活位点附近形成的氢键表明, Tyr229 在维持酶活位点构象稳定中起到了重要的作用。与活性口袋柔性大的特点可能有比较重要的关系。

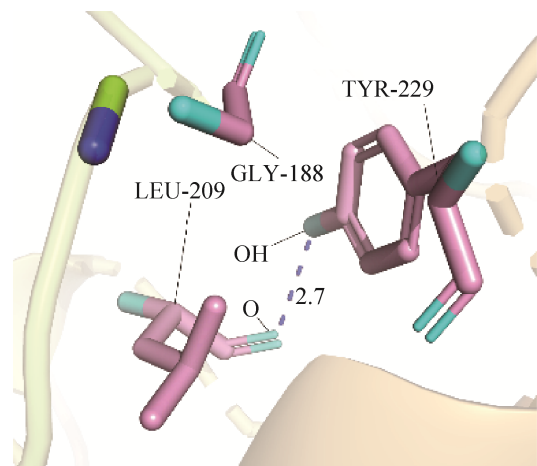


图 5. Tyr229、Leu209 和 Gly188 在酶活位点附近形成的氢键

Figure 5. Hydrogen bond formed near the active site of tyr229, leu209 and gly188.

其三是 L1 Loop 区的特殊构象(图 6)。相较于其他 MBLs, NDM-1 结构中唯一比较特殊的是其 L1 Loop 区具有一个灵活的弯曲构象。在 B1 亚群, 例如 *Bc II* 中, L1 Loop 区是由 N-末端的 61–65 位氨基酸所组成的 Loop 环区域^[15]。这个 Loop 环能够与带有疏水性侧链的抑制剂和底物连接, 在酶活口袋中组成一个隧道形的狭窄裂口, 将位于活性位点的底物“锁住”。而在 NDM-1 中, 通过蛋白结构图我们可以清楚地看到, 对应 L1 区的 Met67-Gly71 区域, 相较于其他 MBLs 伸展的状态, NDM-1 这段弯曲构象的 Loop 区域可以使其在与底物结合过程中更加灵活。因此推断, 这个特殊构象是允许 NDM-1 与底物结合时不受底物 R 基团大小影响的原因之一^[16]。

1.2.2 独特的二聚体结构: 其他临床上重要的 MBLs 是可溶性周质酶, 而 NDM-1 是锚定在革兰氏阴性细菌外膜中的脂蛋白。这种独特的细胞定位使 NDM-1 在感染部位免疫系统反应引起的 Zn(II)匮乏时具有更强的稳定性, 使得酶活性不被抑制。一些研究表明, 当 NDM-1 在嵌入细胞膜状态和均一状态下的时候, 其晶体由于疏水作用和分子间作用力便会呈现二聚体的结构形式(图 7)^[17-18]。因此推测, NDM-1 这种二聚体的形式亦是导致其耐药性更加广谱、水解能力更强的原因之一。

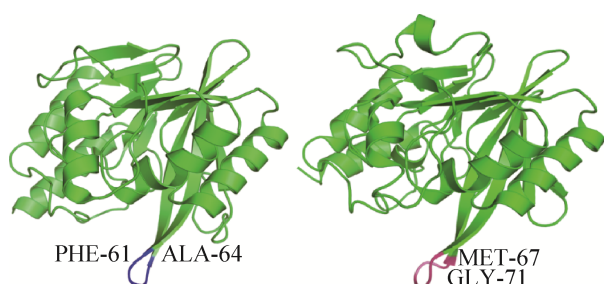


图 6. BC II 酶 L1 区域(蓝色), NDM-1 酶 L1 区域(红色)
Figure 6. BC II enzyme L1 region (blue), NDM-1 enzyme L1 region (red).

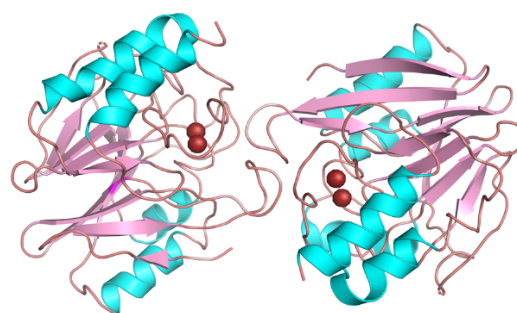


图 7. NDM-1 的二聚体结构^[17-18]
Figure 7. Dimer structure of NDM-1^[17-18].

2 NDM-1 的水解机制的特点

NDM-1 拥有广泛的水解底物, 且催化效率极高, 因此其活性位点的关键残基如何发挥功能及水解的实际过程都是研究的重点^[19]。目前蛋白质数据库 (Protein Data Bank) 中已经公布的 NDM-1 相关晶体有 83 种, 包括数十种 NDM-1 与水解底物、抑制剂的复合物及个别的突变体。这些复合物晶体都为阐明 NDM-1 的水解机制提供了重要证据, 随着对 NDM-1 基础研究的逐渐深入, 其实际水解过程也逐渐被揭开。

2.1 特殊的水解过程

NDM-1 的活性口袋包含 2 个对于酶活性不可或缺 Zn(II)(图 2)^[20-21], 研究中多将 Zn(II) 作为 NDM-1 等金属 β -内酰胺酶的催化中心来进行研究^[22]。根据 1999 年提出的双锌金属 β -内酰胺酶的作用机制^[23-24], 结合 X 射线晶体学研究中 NDM-1 与氨苄青霉素水解产物^[25]、美罗培南水解产物等复合物晶体结构的直接证据^[26], 现在普遍认为其水解过程主要分为两步, 亲核攻击和质子转移。

首先由 2 个 Zn(II) 结合的水或者氢氧根作为亲核试剂攻击 β -内酰胺环的羰基碳, 使环断裂,

同时形成短暂的四面体构象^[27]。此处晶体中观察到的 Zn(II)结合的水或者氢氧根后被证实主要与 pH 值有关(图 8); 然后, Zn2 通过金属配位键与中间体结合, 起到稳定作用, 最后质子经过转移和内酰胺环上的 N 结合, 形成稳定开环的代谢产物。在水解过程中, Zn1 与 Zn2 在酶进行底物识别时发挥的核心作用不同^[20], 一般认为 Zn1 主要保持其四面体配体的羟基对内酰胺环上羰基碳的亲核攻击的正确方向, 而 Zn2 更多的是给 β -内酰胺环的氮原子上的孤电子对提供轨道^[12,28]。

2.2 活性位点的关键残基

然而由于 NDM-1 的底物众多^[19], 参与水解过程的活性位点关键残基在不同 NDM-1 与水解底物的复合物晶体中呈现不同构象, 导致研究者对于 NDM-1 水解不同底物的实际过程产生了不同的猜想。主要在于 NDM-1 对这些不同底物水解的高催化效率是否反映在催化的类似顺序和结构要求上, 即是否使用相同的催化机制来实现每一类的水解。

为了验证活性位点残基对 β -内酰胺类抗生素

水解的重要性, Sun 等构建了随机单密码子文库^[29], 以 NDM-1 活性位点及其附近的 31 个残基为目标, 通过对筛选出的抗代表性抗生素的随机单密码子突变文库进行深度测序, 发现 NDM-1 对青霉素或头孢菌素的水解有严格的序列要求。其中, 必需锌配体残基包括组氨酸位点(His116、His118 和 His196)和半胱氨酸位点(Asp120、Cys221 和 His263)(图 9)。而残基 Asp84、Asp199 和 Lys121 在 NDM-1 中的功能虽然尚不清楚, 但也被认定为对 NDM-1 水解所有被测抗生素的功能是必需的。对 NDM-1 结构的分析表明, 这些氨基酸残基的侧链和主链基团与多个残基形成氢键, 并在活性部位起到连接环结构的作用(图 10)。Asp84 与 His55、Val113、Thr115 和 Lys121 形成氢键, Asp199 与 Ala117、Ser141 和 Thr197 相互作用, 而 Lys121 与 His118 和 Ser262 形成氢键。分析可知, MBLs 的金属结合位点完全建立在 Loop 和连接二级结构的弯(turn)上, 由 Asp84、Asp199 和 Lys121 残基介导的环间相互作用可能在维持 NDM-1 环的位置和稳定性方面发挥关键作用。

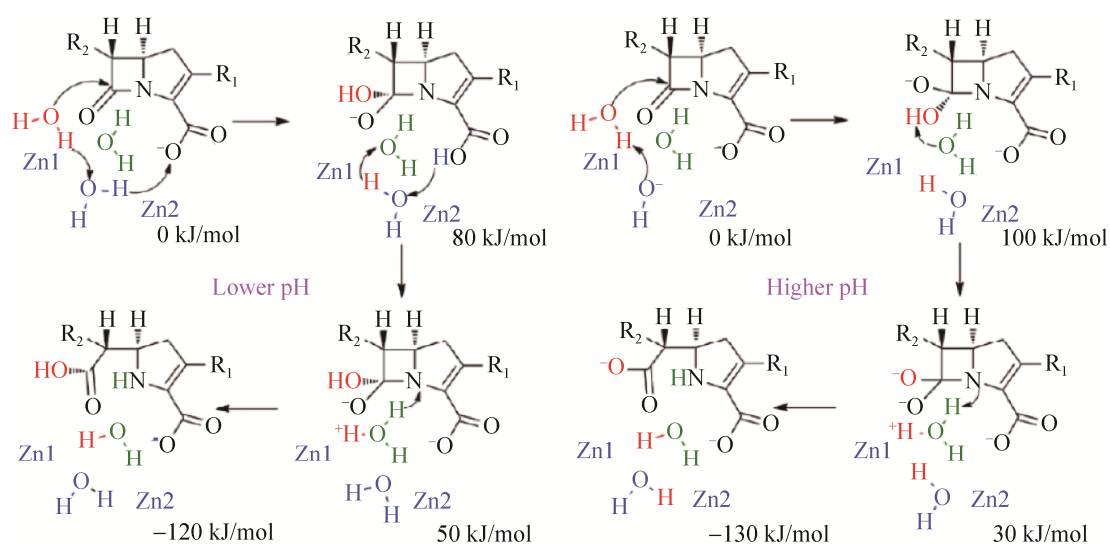


图 8. NDM-1 水解机制

Figure 8. Hydrolysis mechanism of NDM-1.

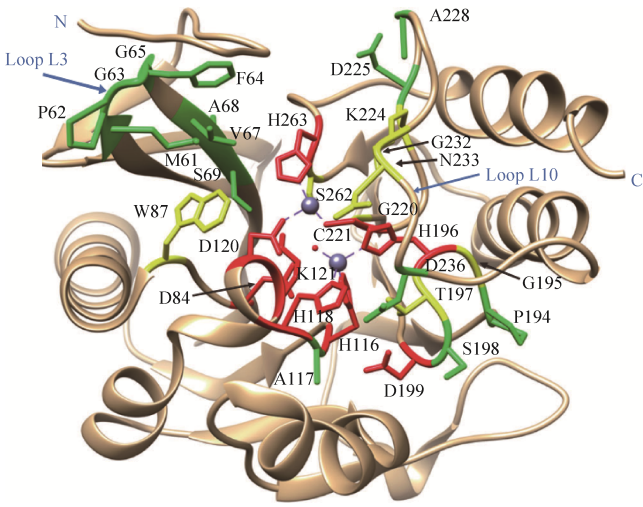


图 9. NDM-1-β-内酰胺酶结构图

Figure 9. Structural diagram of NDM-1-β-lactamase. Showing the positions of essential residues, substrate specific residues and nonessential residues. The essential, substrate specific and nonessential residues are labeled red, yellow and green, respectively, while the zinc atoms are represented as gray spheres.

结果显示，青霉素和头孢菌素水解所需的残基位置是碳青霉烯水解所需残基位置的子集。这说明，虽然所有底物的催化作用都使用一个共同的残基核心，但水解碳青霉烯需要一组额外的残基来达到与青霉素和头孢菌素相当的催化效率。此外，他们通过这个实验还发现了一些非必需氨基酸残基，但这些氨基酸残基主要位于活性位点的外围，不与锌离子或结合底物相互作用(图 11)。这说明 NDM-1 的水解功能可以耐受多种氨基酸替换，而不会损害其水解任何被测 β-内酰胺抗生素的功能。这也说明了 NDM-1 广泛的底物分布，可能完全是由碳青霉烯类化合物的选择性压力演变而来的。因此根据 NDM-1 水解碳青霉烯的严格序列限制去设计抑制剂，可能在恢复碳青霉烯抗生素效用方面会有很好的效果。

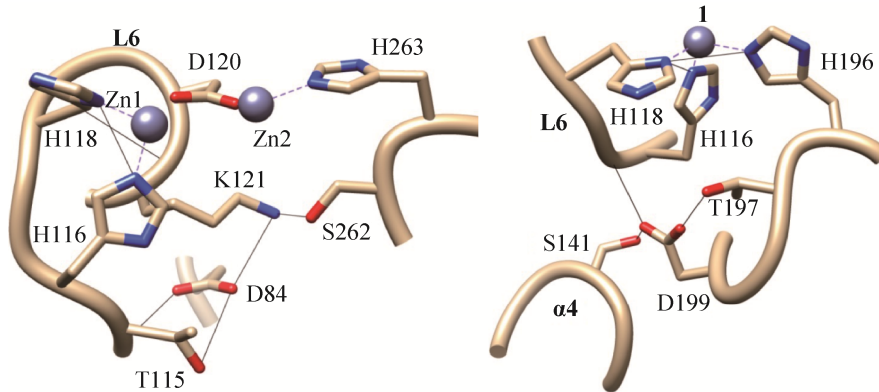


图 10. NDM-1 活性位点上连接 Loop 的氢键网络

Figure 10. Hydrogen bonding network connecting loop on NDM-1 active site.

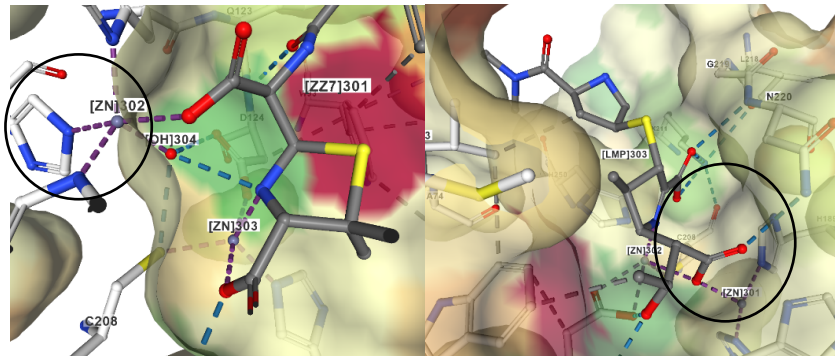


图 11. NDM-1 与水解产物氨苄青霉素、美罗培复合物结构

Figure 11. Structure of NDM-1, ampicillin and meropenem.

2.3 特殊的底物结合模式

近年来, 各种 β -内酰胺抗生素与 NDM-1 酶活性位点的分子对接(molecular docking)研究获得了一些有意思的成果^[19]。对接底物的构象揭示了两种主要的底物结合方式, 即“S”和“T”构象。“S”型中, β -内酰胺环的羰基氧与 Zn1 配位, 稠环羧酸酯与 Zn2 配位, 桥联水/羟基定位亲核攻击, 因此该构象是利于催化的构象。“T”模式中, 稠合环的羧酸与 Zn1 和 Zn2 配位, 取代水/羟基, 并使 β -内酰胺酰胺基团远离金属离子, 从而产生抑制结合模式。有趣的是, 对于适配性良好的底物, “S”构型相较于“T”构型有巨大的优势; 而对于适配性较差的底物, 如单 β -内酰胺环的底物氨曲南, 几乎所有对接结构均取代了质子供体水/羟基, 而处于“T”模式。该结果表明, 单 β -内酰胺环的底物不会被 NDM-1 水解, 因为它们与桥接在 Zn1 和 Zn2 之间的磺酸酯基结合并置换作为质子供体的水, 使得反应无法进行。这说明, NDM-1 的结合机制十分灵活, 也是其底物如此广泛的可能原因之一。同时, 基于其两种结合模式的研究, 可以针对性地进行抑制剂先导物的筛选, 加快寻找有效抑制剂的进程。

3 NDM-1 抑制剂复合物

从 NDM-1 横空出世到如今的 10 年时间里, 人们作出了许多努力来获得有关 NDM-1 的清晰结构^[30], 以阐明其作用机理, 并确定与底物相互作用的残基, 这些残基为药物设计提供了明确的目标。

针对当下的困境, 寻找广谱的有效抑制剂, 是最经济、最快速的方法。其中从上市药物和成分明确的天然产物中筛选的思路是如今最常用的^[31-32]。对于 SBLs, 现在已经发现了几种基于明

确抑制机理的抑制剂, 并已经用于临床治疗, 但临床上仍缺少对 NDM-1 有特异性的高效抑制剂^[33-34]。有效的 MBLs 抑制剂的缺乏可能主要归因于 3 个原因: 不同 MBLs 类之间的活性位点的结构多样性, 活性位点入口处环结构的灵活可变性, 以及多种 NDM-1 变体的存在。在近几年中, NDM-1 通过在不同位置进行单突变或双突变已经进化出了 20 多个新变体^[35], 这些变体通常会增强自身在 Zn(II)匮乏状态下的水解性能^[36]。但是, 考虑到大多数底物-蛋白质相互作用涉及 2 个锌离子, 以及 MBLs 结合位点的特殊性质可能会部分干扰有效特异性抑制剂的设计。因此, 要成功地指导临床上有效抑制剂的合理设计, 完全了解催化机理及底物结合位点的可变性是非常必要的。现在, 尽管已经公开了许多分子作为 NDM-1 的抑制剂, 但只得到了少数的复合物晶体, 因此限制了我们对已报道的抑制剂的结合方式与作用机理的了解。据统计, 到目前为止, 虽然文献中已经报道了 525 种 NDM-1 抑制剂, 然而有明确复合物结构的抑制剂只有很少一部分, 且主要为卡托普利衍生物复合物(2016)、Bi(III)化合物复合物(2019)、异芳基膦酸盐衍生物复合物(2019)和四唑类化合物复合物(2019)。因此对 NDM-1 的抑制机制的讨论将主要围绕以上 4 种复合物结构展开。

3.1 L-卡托普利

卡托普利是一种被广泛作为血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂使用的上市药物, 可以用于高血压的治疗。Guo 等^[10]观察到 D-卡托普利(图 12)对 NDM-1 具有很强的抑制能力, 其 IC_{50} 为 $7.9 \mu\text{mol/L}$, 而 L 型对映异构体的效价低了 25 倍^[37]。但由于他们未能取得复合物结构, 因此无法直接说明卡托普利的抑制机制。

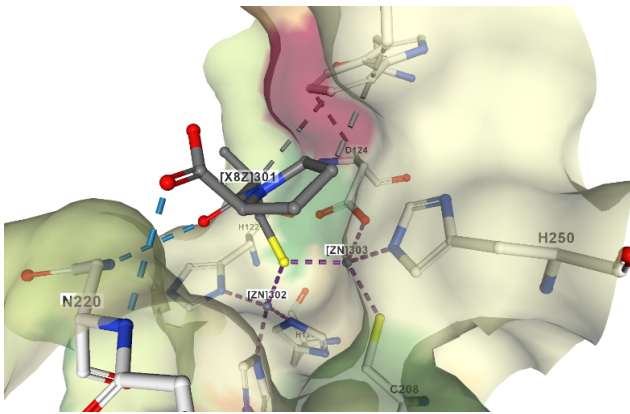


图 12. D-卡托普利及其与 NDM-1 复合物晶体
Figure 12. Crystal of D-captopril and its complex with NDM-1.

King 等^[38]通过质谱及 X 射线晶体学分析解析了 L-卡托普利与 NDM-1 结合的第一个晶体结构。在 X 射线结构中, L-卡托普利的巯基部分插入 2 个 Zn(II)之间, 取代了水分子, 并作为 NDM-1 的竞争性抑制剂起到了抑制作用。此外, Asn220 是对底物结合和中间产物稳定至关重要的残基(图 13), 该分子的疏水部分与 L3 环相互作用, 亲水部分与 Asn220 形成氢键, 因此推断其与 Asn220 的结合间接参与了对 NDM-1 活性的抑制, 且这种结合方式类似于 NDM-1 水解青霉素时的结合机

		61	62	63	64	65	67	68	69	84	87	116	117	118	120	121	194	195	196	197	198	199	220	221	224	225	228	232	233	236	262	263
B1	NDM-1	M	P	G	F	G	V	A	S	D	W	H	A	H	D	K	P	G	H	T	S	D	G	C	K	D	A	G	N	D	S	H
	BCII	F	N	G	-	E	V	P	S	D	W	H	A	H	D	R	K	G	H	T	E	D	G	C	K	S	A	G	N	D	G	H
	IMP-1	V	N	G	W	G	V	P	K	D	F	H	F	H	D	S	P	G	H	T	P	D	G	C	K	P	G	G	N	D	S	H
	CcrA	I	E	G	W	G	V	P	S	D	I	H	W	H	D	C	G	G	H	A	T	D	G	C	K	D	A	G	N	D	G	H
	VIM-2	F	D	G	-	A	Y	P	S	D	W	H	F	H	D	R	A	A	H	S	T	D	G	C	Y	E	R	G	N	D	G	H
B2	CphA	-	-	-	-	V	Q	E	G	W	N	Y	H	D	R	P	A	H	T	P	D	N	C	K	E	-	G	N	F	G	H	
	ImiS	-	-	-	-	V	Q	E	G	W	N	Y	H	D	R	P	A	H	S	P	D	N	C	K	E	-	G	N	F	G	H	
	Sfh-1	-	-	-	-	V	Q	E	G	W	N	Y	H	D	R	E	A	H	T	K	D	N	C	K	E	-	G	N	F	G	H	
B3	FEZ-1	-	-	-	-	E	D	L	D	M	H	A	H	D	H	A	G	H	T	P	G	D	S	-	S	G	Q	G	R	P	H	
	LI	-	-	-	-	D	D	L	N	L	H	A	H	D	H	P	G	H	T	R	G	G	S	G	V	G	V	D	T	S	H	

图 13. NDM-1 与 B1、B2 和 B3 亚类金属 β-内酰胺酶的序列比对
Figure 13. Sequence alignment of NDM-1 with B1, B2 and B3 metalloid β-lactamases.

制(PDB 编码 4HL2), 具有较好的特异性。所以, 巯基衍生物为寻找 NDM-1 抑制剂提供了理想的方向。

后来, 虽然 Brem 等^[39]对 4 种卡托普利立体异构体以及卡托普利衍生物 1 的 D 和 L 对映体, 抑制 NDM-1 及其他 MBLs (IMP-1, VIM-2 和 SPM-1) 的研究证实了立体异构体对于提高针对 MBLs 的效能和选择性的重要性, 但 D-卡托普利仍然是最活跃的 NDM-1 立体异构体。但是, 长期使用卡托普利的副作用较大^[40], 对肾脏负担较重, 所以在临床用药上存在很大制约, 将其在临床上作为抑制剂进行广泛使用也就无从谈起。因此, 研究人员不得不继续寻找潜在的 NDM-1 抑制剂。

3.2 Bi(III)化合物

Wang 等^[41]筛选出了第一个非常可能成为广谱抑制剂的 Bi(III)化合物, 这是一种原本用于治疗由幽门螺旋杆菌导致的慢性胃炎的药物, 名称为胶体次硝酸铋(CBS)^[42]。该化合物在体外试验中恢复了美罗培南(MER)对 NDM-1 阳性大肠杆菌(NDM-HK)的杀菌活性。结果分析发现, 这种化合物可以与不同类型的 MBLs 不可逆结合, 从而起到抑制作用。

X 射线证实了 Bi(III)与蛋白质的结合, 且表明在晶格中存在 Bi(III)而不存在 Zn(II)。通过反常信号对结构进行精细化修饰, Bi(III)取代 2 个 Zn(II)在活性位点的结合表现出 2 个可供选择的

构象。一种是 Bi(III) 位于 2 个 Zn(II) 之间(图 14-A), 稍微类似天然 NDM-1 结构的 Zn1 位点, 这种主要构象的占有率为 0.5。另一种则是除了与 Zn1 配位的残基(His120 和 His189)外, Cys208 以及最初与 Zn2 结合的 Asp124 也参与和 Bi(III) 配位, 并与水分子形成了三角棱柱形几何结构(图 14-B)。这种次要构象中, Bi(III) 位于天然 NDM-1 结构的 Zn2 位点附近, 且趋势较小(仅占 0.1), Bi(III) 与 His250、Cys208、Asp124 和水分子形成扭曲的四面体几何形状。

对结构分析发现, Bi(III) 与氨基酸侧链的键长总体上比 Zn(II) 长(图 14-D), 这与 Bi(III) 的较大离子半径一致[比 Zn(II)(0.74 Å)高 1.03 Å]。晶体学数据结果与他们的生物物理特征相符, 即 1 个

Bi(III) 离子取代了 2 个 Zn(II), 同时他们通过对晶体结构的分析认为 Cys208 对于 Bi(III) 与 NDM-1 的结合至关重要。

在对幽门螺杆菌相关疾病的临床应用治疗中发现, 铋类药物如 CBS 和 RBC, 即使在长期使用后也不会产生耐药性, 且与抗生素的联合应用显著提高了耐药幽门螺杆菌的根除率^[43-44]。这种独特的性质可能赋予 Bi(III) 化合物处理细菌耐药性问题的能力。目前, 欧洲数据显示, CBS 在治疗消化性溃疡疾病的推荐剂量下, 每日接受 CBS 治疗剂量约为 480 mg 当量的氧化铋(Bi_2O_3), 最多可持续 8 周, 无中毒记录, 也没有与 CBS 相关的其他严重不良反应^[44]。此外, 由于大多数有机 MBLs 抑制剂是通过与 MBLs 的活性中心的 Zn(II) 结合

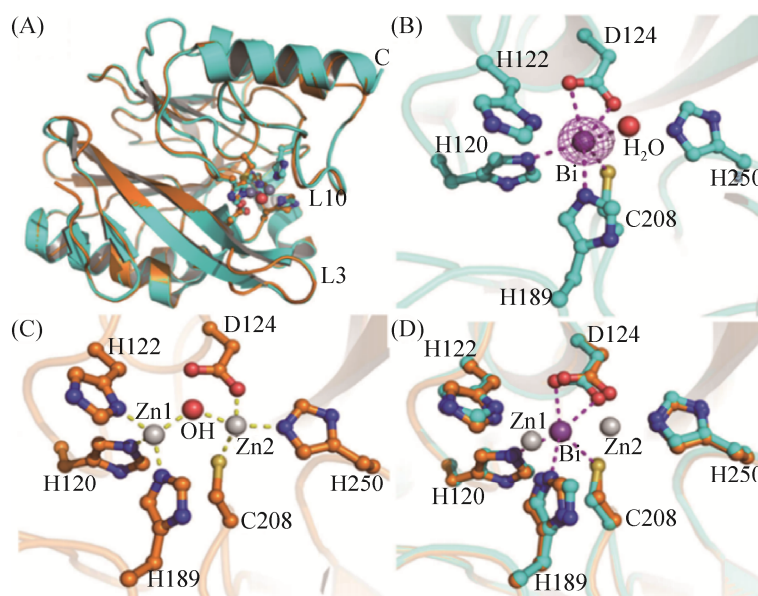


图 14. Bi(III) 化合物与 NDM-1 的复合物及其抑制机制

Figure 14. Compounds of Bi(III) and NDM-1 and their inhibition mechanism. A: Superimposition of Bi-bound NDM-1 (cyan) with native Zn-bound NDM-1 (orange). Structural alignment was done over C α residues using SSM algorithm in Coot and the images were generated using PyMOL. The two structures can be superimposed well with a rmsd value of 0.18 Å. B: The active site of Bi-bound NDM-1 with the anomalous density peak of Bi shown in purple mesh contoured at 15.0 σ . C: The active site of native Zn-bound NDM-1 with two Zn(II) ions shown as gray spheres and the bridging hydroxyl nucleophile as a red sphere. D: An overlay image comparing the relative position of Bi(III) (purple sphere) with the two Zn(II) ions (gray spheres). Bi(III) is located in between the two Zn(II) ions slightly closer to Zn1.

使酶失活, 使得这种抑制剂存在一定临床风险, 因此难以发展成为 MBLs 的广谱抑制剂。相比之下, Bi(III)化合物通过以 Bi(III)离子取代 Zn(II)与活性部位半胱氨酸的临界残基结合使酶失活的独特抑制机制, 与以往报道的基于有机分子的抑制剂全然不同。作为一种被批准的上市药物, 这种广谱 MBLs 抑制剂与抗生素联合治疗, 无疑将为 MBLs 阳性菌感染的治疗开辟了新的视野。

3.3 香豆素的商业类似物

Pemberton 等^[45]为了寻找对内酰胺酶具有广谱抗性的抑制剂, 先对 SBLs (KPC-2)进行抑制剂筛选并得到了结构, 发现香豆素(coumarin)、紫杉叶素(二氢槲皮素, DHQ)和喹啉类似物(quinoline analogs)等几种杂芳基膦酸盐, 其中香豆素的几种商业类似物具有很好的抑制效果。

这些类似物中, 几乎所有的化合物都被证实具有针对 KPC-2、NDM-1 的抑制效果, 但不同取代位点和不同取代基会造成抑制效果的明显差

异。研究发现, NDM-1 结构中揭示了一个十分有意思且出乎意料的现象, 即 NDM-1 结合不同底物时有不同的姿态: 一种指向远离 V73 的环羰基(形态 1, 化合物 1, 图 15-A), 另一个朝向它(形态 2, 化合物 6, 图 15-B)。两种姿态相比较, 形态 2 对于具有 C5 取代基的化合物更具亲和力, 因为它允许与 H122 进行其他相互作用[例如, 与化合物 6 中的 -Me 进行 π - σ 相互作用(距离 3.67 Å), 图 15-B]。NDM-1 中靠近 H122 的小口袋类似于 KPC-2 中与 W105 相邻的缝, 类似地容纳 C5 取代基。还要注意, NDM-1 中 F70 的侧链显示出显著的构象迁移性, 从而实现了与 C7-Me 1 形成有利的 CH- π 相互作用(图 15-A)。总体而言, NDM-1 活性位点的相对开放性和 M67-F70 环的柔韧性适应不同的结合方向, 具体取决于配体取代模式。此外, 新的复合物结构揭示了几个疏水残基对配体结合的贡献, 其中 NDM-1 中的特定残基 F70, 其构象的灵活性为小分子识别提供了重要的适应性。

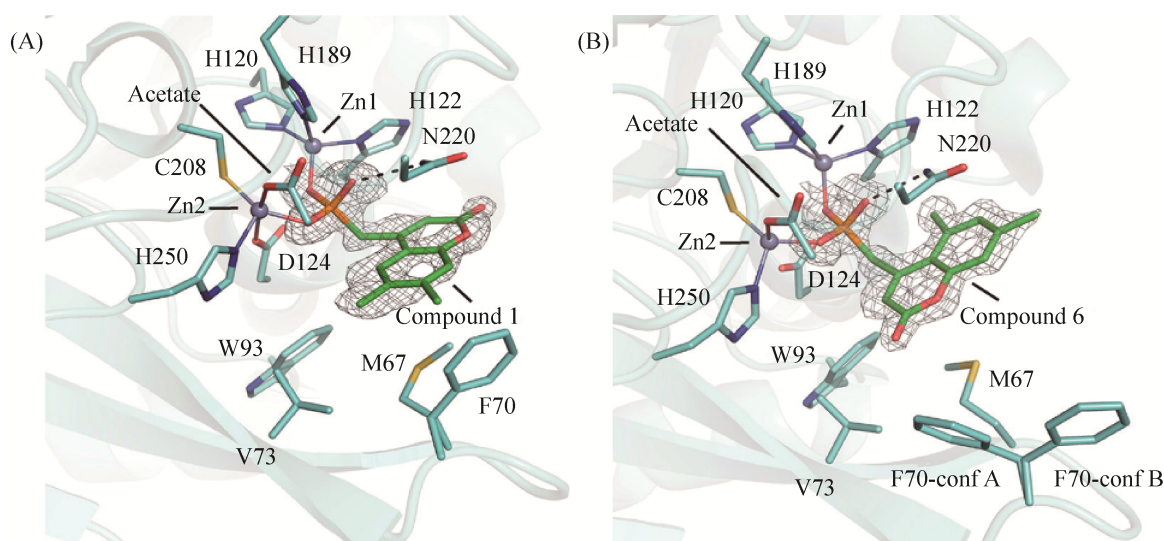


图 15. NDM-1 和化合物 1、化合物 6 的复合结构

Figure 15. Complex structure of NDM-1 with compound 1 & compound 6. A: NDM-1 and compound 1 (PDB No. 6d1a); B: NDM-1 and compound 6 (PDB No. 6d1d).

此外, 通过对先导化合物的优化及与 β -内酰胺酶的结合研究^[33,46]可以得出结论, 随着抑制剂疏水表面积的增加, 抑制剂与活性口袋的结合会更紧密, KPC-2、NDM1 和 VIM-2 的活性之间的相关性突显了配体结合特征的这种相似性。同时, 抑制剂对 NDM-1 的抑制效力始终比 KPC-2 或 VIM-2 弱 10 倍以上, 这表明, 随着这些化合物朝着更高级的先导化合物优化, 进一步了解和开发化合物结合/抑制机制是需要继续重点研究的。且由于这些酶识别的底物是相似的, 因此杂芳基膦酸盐支架被设计成针对碳青霉烯酶广谱抑制剂是非常有前景的。

3.4 四唑类双活性化合物

四唑类双活性化合物(CN₄H₂)的广谱抑制性是 Torelli 等^[47]发现的, 四唑(tetrazoles)是一种杂环化合物(图 16-C), 含有一个四氮的五元环, 可以作为羧酸酯基的生物电子等排体, 用作血管紧张素 II 受体(Angiotensin type 2 receptor, AT2 receptor)

的拮抗剂以治疗高血压、糖尿病肾病和充血性心力衰竭等疾病。他们利用 β 内酰胺类抗生素的水解底物、筛选出的 6 种四唑类化合物以及合成的其中两种小分子的外消旋体, 通过 X-ray 晶体衍射手段解析了他们抑制 CTX-M-14、KPC-2 和 NDM-1 的机制。

他们比较了碳青霉烯酶 KPC-2、NDM-1 和非碳青霉烯酶 CTX-M-14 与配体的结合特性。值得注意的是, 与 CTX-M-14 相比, KPC-2 被 β -内酰胺抗生素水解产物(产物抑制)以及从 CTX-M-14 的分子对接中选择的一系列新的四唑类抑制剂更为强烈地抑制。

结合复合物晶体结构来看, 这些数据表明由于其疏水性的增强, KPC-2 活性位点与底物和小分子配体形成良好相互作用的能力也增强了。这种性质在金属碳青霉烯酶中更为明显, 例如 NDM-1 也被一些新的四唑化合物所抑制, 包括一种对 KPC-2 和 NDM-1 都表现出类似的高亲和力的化合物(图 16)。

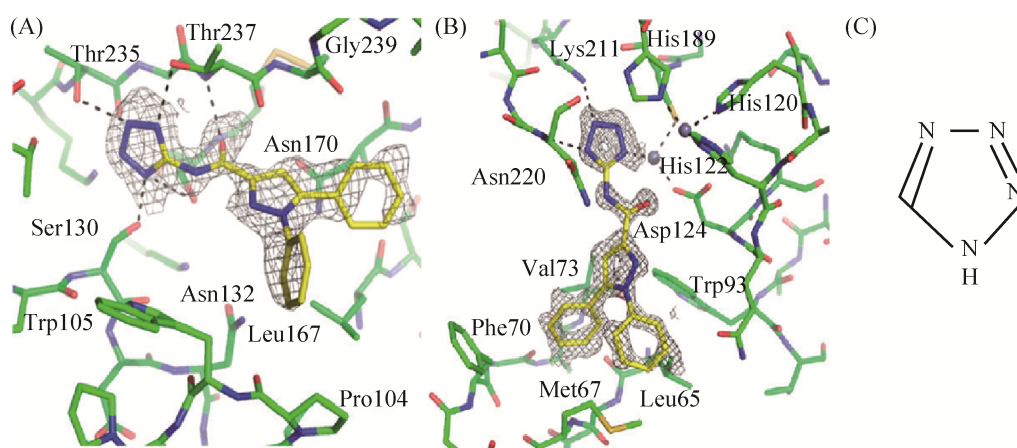


图 16. 化合物 7 与 KPC-2 和 NDM-1 的复合晶体结构

Figure 16. Composite crystal structure of compound 7 with kpc-2 and NDM-1. A: KPC-2; B: NDM-1, black dotted line indicates hydrogen bond or coordination bond with metal ion; C: tetrazoles structure.

以上共同结果表明, 抑制剂疏水表面的大小与疏水性的强弱对其本身与活性位点的结合十分重要。此外, 碳青霉烯酶的活性通过广泛的 β -内酰胺底物范围赋予生产者进化优势, 但同时这也造成了碳青霉烯酶机制上的致命弱点。即这种特性可用于寻找和设计新型抑制剂。这些复合物结构, 首次证明了非共价抑制剂是如何被设计来同时靶向抑制 SBLs 和 MBLs。尽管目前化合物的活性相对较低, 但这些研究仍然表明, 通过寻找先导物, β -内酰胺抗生素水解产物作为碳青霉烯酶广谱抑制剂具有十分重要的参考价值。

4 结论

寻找到一种能够恢复现有 β -内酰胺类抗生素对 NDM-1 表达菌株活性的广谱抑制剂, 对人类健康、社会资源的持续使用及其经济效应的影响是十分重大的^[48]。可惜的是, 尽管多年来世界各地的研究人员都投入了巨大的努力, 但新公开的 NDM-1 抑制剂还是没有达到临床使用阶段。困难主要在于, 一是 NDM-1 水解机制的灵活多变; 二是已发现抑制剂的特异性及毒性问题^[49]; 三则是 NDM-1 越来越多的变体加重了耐药菌感染的威胁, 使得实际上针对 NDM-1 相对开放的活性口袋进行分子设计与开发变得相当困难。鉴于 NDM-1 活性位点的特殊性 & 附近 Loop 区的灵活多变, 在采用基于结构的药物设计方法时往往没有效果。同时, 一些结构和研究表明, 某些 NDM 变异体已经进化出具有高催化效率的单锌酶功能(例如 NDM-15)^[36]。这些发现揭示了 NDM 为克服 β -内酰胺抗生素的选择性压力和锌缺乏时对酶活的影响,

逐渐通过突变变异体来优化水解机制, 给临床特效药的研发带来更多更频繁的困难。因此, 针对 NDM-1 抑制剂缺乏的现状, 除了利用荧光底物对天然产物、上市药物进行高通量筛选以寻找可能抑制剂的常规思路, 其实在最近几年中, 根据蛋白晶体结构, 通过计算机辅助进行药物虚拟筛选的方法也成为越来越常用的手段, 在研发速度及效率方面提供了很强的助力^[50-51]。所以, 当我们越多获得分辨率越高的 NDM-1 及复合物的晶体结构, 越有利于我们找到 NDM-1 与底物结合机制的正确方向。这种研究手段上的进步对于其他许多面临药物缺乏困境的疾病也具有重要的意义。但是, 从先导化合物的发现到新发药物的筛选体系的建立, 到临床致病菌抑制效果的评价, 再到临床实验的转化等许多问题还有待解决, 只有新发药物从实验室到临床的路径越快被打通, 才能真正尽早帮助到深受耐药菌感染威胁的人们。

所以, 研究、解析 NDM-1 类金属 β -内酰胺酶活性位点中现有抑制剂的 3D 结构及机制, 加深对受体灵活结构与广谱水解能力的关系的理解, 开发新的抑制剂, 对解决现阶段面临的问题至关重要。同时, NDM 所属的金属依赖型水解酶在结构上的高度保守性和活性口袋的灵活性, 以及广泛的水解底物, 为寻找 NDM 及其突变体的抑制剂提供了新的思路。最后值得注意的是, 细菌耐药性的广泛产生源于抗生素的滥用, 例如肺炎克雷伯菌对于 NDM-1 耐药菌检出率较高及持续增加的地区, 临床应该给予更多的关注, 抗生素应用的管理及加强医院感染的防控手段应当更加严格。

参考文献

- [1] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in india, pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(9): 597–602.
- [2] Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the ndm-type carbapenemases in gram-negative bacteria. *Biomed Research International*, 2014, 2014: 249856.
- [3] Bahr G, Vitor-Horen L, Bethel CR, Bonomo RA, González LJ, Vila AJ. Clinical evolution of new delhi metallo- β -lactamase (NDM) optimizes resistance under Zn(II) deprivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(1): e01849–17.
- [4] Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(12): 5046–5054.
- [5] Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of ndm-1 positive bacteria in the new delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11(5): 355–362.
- [6] Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, Seifert H, Witte W, Higgins PG. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in germany in 2007. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011, 66(9): 1998–2001.
- [7] Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *The Lancet Infectious Diseases*, 2011, 11(5): 381–393.
- [8] Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16(12): 1699–1701.
- [9] Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology*, 2007, 74(12): 1686–1701.
- [10] Guo Y, Wang J, Niu GJ, Shui WQ, Sun Y, Zhou HG, Zhang YZ, Yang C, Lou ZY, Rao ZH. A structural view of the antibiotic degradation enzyme NDM-1 from a superbug. *Protein & Cell*, 2011, 2(5): 384–394.
- [11] Jacquin O, Balbeur D, Damblon C, Marchot P, De Pauw E, Roberts GCK, Frère JM, Matagne A. Positively cooperative binding of zinc ions to *Bacillus cereus* 569/H/9 β -lactamase II suggests that the binuclear enzyme is the only relevant form for catalysis. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 392(5): 1278–1291.
- [12] Zhang HM, Hao Q. Crystal structure of NDM-1 reveals a common β -lactam hydrolysis mechanism. *FASEB Journal*, 2011, 25(8): 2574–2582.
- [13] Matagne A, Frère J M. Contribution of mutant analysis to the understanding of enzyme catalysis: the case of class A β -lactamases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1995, 1246(2): 109–127.
- [14] 王静. 超级细菌新德里金属 β -内酰胺酶 NDM-1 的结构与功能研究. 南开大学硕士学位论文, 2012.
- [15] Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1994, 1218(2): 199–201.
- [16] Malabanan MM, Amyes TL, Richard JP. A role for flexible loops in enzyme catalysis. *Current Opinion in Structural Biology*, 2010, 20(6): 702–710.

- [17] King D, Strynadka N. Crystal structure of new delhi metallo- β -lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein Science*, 2011, 20(9): 1484–1491.
- [18] González LJ, Bahr G, Nakashige TG, Nolan EM, Bonomo RA, Vila AJ. Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of new delhi metallo- β -lactamase. *Nature Chemical Biology*, 2016, 12(7): 516–522.
- [19] Yuan QH, He L, Ke HM. A potential substrate binding conformation of β -lactams and insight into the broad spectrum of NDM-1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(10): 5157–5163.
- [20] Wang ZG, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ. Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3(5): 614–622.
- [21] Wommer S, Rival S, Heinz U, Galleni M, Frere JM, Franceschini N, Amicosante G, Rasmussen B, Bauer R, Adolph HW. Substrate-activated zinc binding of metallo- β -lactamases: physiological importance of the mononuclear enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(27): 24142–24147.
- [22] Dal Peraro M, Vila AJ, Carloni P, Klein ML. Role of zinc content on the catalytic efficiency of B1 metallo β -lactamases. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129(10): 2808–2816.
- [23] Bounaga S, Laws AP, Galleni M, Page MI. The mechanism of catalysis and the inhibition of the bacillus cereus zinc-dependent β -lactamase. *Biochemical Journal*, 1998, 331(3): 703–711.
- [24] Tioni MF, Llarrull LI, Poeylout-Palena AA, Marti MA, Saggiu M, Periyannan GR, Mata EG, Bennett B, Murgida DH, Vila AJ. Trapping and characterization of a reaction intermediate in carbapenem hydrolysis by *B. cereus* metallo- β -lactamase. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(47): 15852–15863.
- [25] Zhang HM, Ma GX, Zhu YF, Zeng LX, Ahmad A, Wang CZ, Pang B, Fang HY, Zhao LQ, Hao Q. Active-site conformational fluctuations promote the enzymatic activity of NDM-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(11): e01579–18.
- [26] Feng H, Liu XH, Wang S, Fleming J, Wang DC, Liu W. The mechanism of ndm-1-catalyzed carbapenem hydrolysis is distinct from that of penicillin or cephalosporin hydrolysis. *Nature Communications*, 2017, 8: 2242.
- [27] Page MI, Badarau A. The mechanisms of catalysis by metallo β -lactamases. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2008, 2008: 576297.
- [28] Thomas PW, Zheng M, Wu SS, Guo H, Liu DL, Xu DG, Fast W. Characterization of purified new delhi metallo- β -lactamase-1. *Biochemistry*, 2011, 50(46): 10102–10113.
- [29] Sun ZZ, Hu LY, Sankaran B, Prasad BVV, Palzkill T. Differential active site requirements for ndm-1 β -lactamase hydrolysis of carbapenem versus penicillin and cephalosporin antibiotics. *Nature Communications*, 2018, 9: 4524.
- [30] Khan AU, Maryam L, Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of new delhi metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiology*, 2017, 17: 101.
- [31] Klingler FM, Wichelhaus TA, Frank D, Cuesta-Bernal J, El-Delik J, Muller HF, Sjuts H, Gottig S, Koenigs A, Pos KM, Pogoryelov D, Proschak E. Approved drugs containing thiols as inhibitors of metallo- β -lactamases: strategy to combat multidrug-resistant bacteria. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58(8): 3626–3630.
- [32] Ejim L, Farha MA, Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, Brown ED, Wright GD. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7(6): 348–350.
- [33] Bush K, Bradford PA. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(5): 295–306.
- [34] Rotondo CM, Wright GD. Inhibitors of metallo- β -lactamases. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 39: 96–105.
- [35] Mitra S, Mukherjee S, Naha S, Chattopadhyay P, Dutta S, Basu S. Evaluation of co-transfer of plasmid-mediated

- fluoroquinolone resistance genes and *bla_{NDM}* gene in *enterobacteriaceae* causing neonatal septicaemia. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2019, 8: 46.
- [36] Cheng ZS, Thomas PW, Ju LC, Bergstrom A, Mason K, Clayton D, Miller C, Bethel CR, VanPelt J, Tierney DL, Page RC, Bonomo RA, Fast W, Crowder MW. Evolution of new delhi metallo- β -lactamase (NDM) in the clinic: effects of NDM mutations on stability, zinc affinity, and mono-zinc activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(32): 12606–12618.
- [37] Li NN, Xu YT, Xia Q, Bai CG, Wang TY, Wang L, He DD, Xie NN, Li LX, Wang J, Zhou HG, Xu F, Yang C, Zhang Q, Yin Z, Guo Y, Chen Y. Simplified captopril analogues as ndm-1 inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24(1): 386–389.
- [38] King DT, Worrall LJ, Gruninger R, Strynadka NCJ. New delhi metallo- β -lactamase: structural insights into β -lactam recognition and inhibition. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(28): 11362–11365.
- [39] Brem J, van Berkel SS, Zollman D, Lee SY, Gileadi O, McHugh PJ, Walsh TR, McDonough MA, Schofield CJ. Structural basis of metallo- β -lactamase inhibition by captopril stereoisomers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(1): 142–150.
- [40] Hahn J, Nordmann-Kleiner M, Bönner C, Kojda G, Hoffmann TK, Greve J. The influence of ACE inhibition on C1-inhibitor: a biomarker for ACE inhibitor-induced angioedema? *Biomedicine Hub*, 2019, 4(2): 1–9.
- [41] Wang RM, Lai TP, Gao P, Zhang HM, Ho PL, Woo PCY, Ma GX, Kao RYT, Li HY, Sun HZ. Bismuth antimicrobial drugs serve as broad-spectrum metallo- β -lactamase inhibitors. *Nature Communications*, 2018, 9: 439.
- [42] Gisbert JP. *Helicobacter pylori* eradication: a new, single-capsule bismuth-containing quadruple therapy. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2011, 8(6): 307–309.
- [43] Barry NPE, Sadler PJ. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. *Chemical Communications*, 2013, 49(45): 5106–5131.
- [44] Li HY, Sun HZ. Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2012, 16(1/2): 74–83.
- [45] Pemberton OA, Jaishankar P, Akhtar A, Adams JL, Shaw LN, Renslo AR, Chen Y. Heteroaryl phosphonates as noncovalent inhibitors of both serine- and metallo-carbapenemases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 62(18): 8480–8496.
- [46] Tehrani KHMET, Martin NI. β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: an update. *MedChemComm*, 2018, 9(9): 1439–1456.
- [47] Torelli NJ, Akhtar A, DeFrees K, Jaishankar P, Pemberton OA, Zhang XJ, Johnson C, Renslo AR, Chen Y. Active-site druggability of carbapenemases and broad-spectrum inhibitor discovery. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(6): 1013–1021.
- [48] Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013, 1277(1): 91–104.
- [49] Linciano P, Cendron L, Gianquinto E, Spyrakis F, Tondi D. Ten years with new delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): from structural insights to inhibitor design. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(1): 9–34.
- [50] Spyrakis F, Celenza G, Marcoccia F, Santucci M, Cross S, Bellio P, Cendron L, Perilli M, Tondi D. Structure-based virtual screening for the discovery of novel inhibitors of new delhi metallo- β -lactamase-1. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2018, 9(1): 45–50.
- [51] Erlanson DA, Fesik SW, Hubbard RE, Jahnke W, Jhoti H. Twenty years on: the impact of fragments on drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016, 15(9): 605–619.

Research progress in structure, function and inhibition mechanism of NDM-1

Can Cui¹, Haitao Yang², Zefang Wang^{1*}

¹ Experimental Center of Structural Biology, School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China

² Shanghai Institute for Advanced Immunochemical Studies, School of Life Science and Technology, Shanghai Tech University, Shanghai 201210, China

Abstract: In the past decade, metallo- β -lactamases, represented by New Delhi metallo- β -lactamases (NDM-1), have been widely spread around the world, threatening public health and safety. Especially in recent years, the emergence of mutants of these enzymes has caused more complex and difficult challenges to human health. At present, there is still a lack of effective treatment drugs and means. The key to solve this problem is to develop effective broad-spectrum inhibitors of the enzyme. Therefore, we review the three-dimensional structure analysis of NDM-1 and its related inhibitor complexes, to give some inspiration and to help relevant researchers from the perspective of biological mechanism research.

Keywords: NDM-1, metallo- β -lactamases, inhibitors, inhibition mechanism, crystal structure of protein

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31970048, 81601593)

*Corresponding author. E-mail: zefangwang@tju.edu.cn

Received: 9 March 2020; Revised: 16 May 2020; Published online: 8 July 2020