

# 螯合剂类金属 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的研究进展

朱致熹, 张洁琳\*, 陈依军\*\*

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 211198)

**摘要** 革兰氏阴性菌对 $\beta$ -内酰胺类抗生素产生耐药的主要机制为表达 $\beta$ -内酰胺酶。金属 $\beta$ -内酰胺酶(metallo- $\beta$ -lactamases, MBL)可以水解包括碳青霉烯类在内的几乎全部 $\beta$ -内酰胺类抗生素, 成为全球公共健康挑战。开发MBL的抑制剂是应对产MBL耐药菌感染的重要手段。螯合剂构成一类重要的MBL抑制剂, 通过螯合、剥离、结合MBL活性中心的Zn<sup>2+</sup>以发挥对MBL的抑制作用。本文综述了螯合剂类MBL抑制剂的研究进展, 介绍包括EDTA及其相关化合物、aspergillomarasmine A(AMA)及其衍生物、NOTA及相关化合物、吡啶羧酸类及吡啶甲基胺类化合物在内的几类重要螯合剂类MBL抑制剂的化学结构、抑制活性、与抗生素的协同作用、选择性和作用机制, 为后续开发高活性、高选择性和低毒性的MBL抑制剂提供参考。

**关键词** 细菌耐药性; 金属 $\beta$ -内酰胺酶; 抑制剂; 融合剂; 进展

中图分类号 R914 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)04-0410-13

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20220404

引用本文 朱致熹, 张洁琳, 陈依军. 融合剂类金属 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2022, 53(4): 410–422.

Cite this article as: ZHU Zhixi, ZHANG Jielin, CHEN Yijun. Recent advances in research on chelators as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(4): 410–422.

## Recent advances in research on chelators as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors

ZHU Zhixi, ZHANG Jielin\*, CHEN Yijun\*\*

School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

**Abstract** The major reason for the resistance of Gram-negative bacteria to  $\beta$ -lactam antibiotics is the expression of  $\beta$ -lactamases. Metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) hydrolyze almost all types of  $\beta$ -lactam antibiotics including carbapenems, posing a challenge to global public health. Developing MBL inhibitors is an important method to treat the infections caused by resistant bacteria. As an important type of MBL inhibitors, chelating agents can inhibit MBL by chelating, stripping, and binding Zn<sup>2+</sup> in the active center of MBL. This review summarizes recent publications on chelators as MBL inhibitors, discussing their chemical structures, inhibitory potency, synergistic effects with antibiotics, selectivity and mechanism of action, including EDTA and related compounds, aspergillo-marasmine A (AMA) and its derivatives, NOTA and related compounds, pyridine carboxylic acid and pyridine methylamine compounds, aiming to provide reference for future development of potent, selective and safe clinical MBL inhibitors.

**Key words** bacterial resistance; metallo- $\beta$ -lactamase; inhibitor; chelating agent; advances

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82003627) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK20200565)

$\beta$ -内酰胺类抗生素是临床使用最为广泛的抗生素<sup>[1]</sup>。由于抗生素的滥用, 细菌耐药性已经严重

影响 $\beta$ -内酰胺类抗生素的临床使用。特别是耐碳青霉烯类肠杆菌(carbapenem-resistant Enterobacte-

收稿日期 2022-01-28 通信作者 \*Tel: 18251984095 E-mail: jlzhang@cpu.edu.cn

\*\*Tel: 025-86185919 E-mail: yjchen@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 82003627); 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20200565)

riaceae, CRE), 对用于临床治疗的大多数 $\beta$ -内酰胺类抗生素具有多重耐药性, 其引发的感染性疾病治疗困难, 并伴随高病死率<sup>[2]</sup>。依据美国疾病预防控制中心(CDC)数据报道, 2017年美国感染CRE的病例为13 100例, 造成1 100例死亡, 投入治疗经费超过1.3亿美金<sup>[3]</sup>。 $\beta$ -内酰胺类抗生素耐药性(特别是革兰氏阴性致病菌)已经成为威胁人类健康及造成社会经济损失的全球性挑战。

革兰氏阴性菌对 $\beta$ -内酰胺类抗生素产生耐药性主要原因是细菌 $\beta$ -内酰胺酶的表达。 $\beta$ -内酰胺酶可以水解该类抗生素的 $\beta$ -内酰胺环, 造成抗生素效力下降甚至丧失, 引发耐药性。 $\beta$ -内酰胺酶依据作用机制分为丝氨酸 $\beta$ -内酰胺酶(seine  $\beta$ -lactamases, SBL)与金属 $\beta$ -内酰胺酶(metallo- $\beta$ -lactamases, MBL)。SBL依赖酶活性中心的丝氨酸残基, 亲核进攻 $\beta$ -内酰胺类抗生素的 $\beta$ -内酰胺环使其失去活性<sup>[4]</sup>。MBL依赖其活性中心的Zn<sup>2+</sup>, 通过活化1分子水分子产生的氢氧根离子, 对 $\beta$ -内酰胺环进行破坏<sup>[5]</sup>。MBL分为B1、B2和B3 3个亚类。B1和B3亚类活性中心有两个Zn<sup>2+</sup>结合位点(Zn<sub>1</sub>和Zn<sub>2</sub>), B2亚类只有1个Zn<sup>2+</sup>结合位点<sup>[6]</sup>。临床相关的MBL主要属于B1亚类, 如亚胺培南酶(imipenemase, IMP)<sup>[7]</sup>、维罗那亚胺培南酶(verona imipenemase, VIM)<sup>[8]</sup>和新德里金属 $\beta$ -内酰胺酶(New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase, NDM)<sup>[9]</sup>。B1亚类MBL广泛存在于革兰氏阴性条件致病菌中, 包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌与鲍曼不动杆菌等。

包括NDM-1在内的MBL在多重耐药菌中的表达, 已成为威胁人类健康的重要问题。MBL具有广泛的底物谱, 可水解包括青霉素类、头孢菌素类以及被誉为抗生素“最后一道防线”的碳青霉烯类在内的几乎所有 $\beta$ -内酰胺类抗生素<sup>[10]</sup>。编码MBL的基因具有高传播性, 可通过质粒以及其他可移动遗传元件(如转座子)在菌株间快速传播, 使原本不具有抗性的菌株获得抗性<sup>[11]</sup>。此外, MBL易变异, 活性更强、稳定性更高的新突变体不断出现。临床急需针对表达MBL的多重耐药菌的有效治疗策略。

$\beta$ -内酰胺类抗生素与 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的复方制剂, 是治疗耐药菌感染的有效方法。 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂抑制细菌 $\beta$ -内酰胺酶活性, 可使细菌重

新对 $\beta$ -内酰胺类抗生素敏感<sup>[12]</sup>。代表性药物有阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦和头孢他啶/阿维巴坦等, 但它们均用于治疗表达SBL耐药菌引起的感染, 对MBL引发的耐药性感染无效。相较于SBL抑制剂的开发与临床应用, MBL抑制剂的开发起步较晚。自1990年起, 文献中报道的MBL抑制剂已有上千种, 但目前没有成功批准上市的化合物。

依据对MBL抑制机制的不同, 目前报道MBL抑制剂主要包括变构抑制剂、共价抑制剂、金属配体类抑制剂、融合剂类抑制剂等<sup>[13]</sup>。其中融合剂类MBL抑制剂是最早进行开发的一类MBL抑制剂<sup>[14]</sup>, 已有多个结构类型的化合物, 可对临床常见的MBL具有低至微摩尔浓度甚至纳摩尔浓度级别的半数抑制浓度( $IC_{50}$ )或抑制常数( $K_i$ )。部分化合物在体外与体内实验中可以有效恢复碳青霉烯类抗生素对产MBL耐药菌的抗菌效力, 展现出与抗生素协同抗菌作用。融合剂类MBL抑制剂对MBL抑制机制主要有两种:(1)通过融合作用剥离或隔绝MBL活性中心Zn<sup>2+</sup>, 使MBL失活或降解<sup>[15]</sup>;(2)进入MBL活性中心, 形成稳定的MBL:Zn(II):抑制剂三元复合体, 抑制MBL活性<sup>[16]</sup>。

融合剂作为MBL抑制剂参与临床MBL耐药菌治疗的选择性与使用安全性一直受到关注。经典融合剂乙二胺四乙酸(EDTA)虽然为强效的金属融合剂, 但其对金属离子的融合不具备选择性, 进入体内会使大量生理金属依赖的酶类(如Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>依赖的酶)失活, 引发严重不良反应<sup>[17]</sup>。近年来有多篇文章报道了一系列包括aspergillomarasmine A(AMA)和吡啶-2,6-二羧酸(DPA)在内的新型融合剂类MBL抑制剂。这些化合物除具备对MBL的抑制活性, 还具备对MBL的选择性, 安全性好。部分化合物表现出良好的药物开发潜力, 其构效关系与机制研究为同类药物设计与开发提供了重要信息。

本文就融合剂类MBL抑制剂的研究进展进行综述, 讨论其化学结构、抑制活性、与抗生素的协同作用、选择性和作用机制(本文讨论的化合物结构以及活性相关信息见表1), 为后续开发高选择性、高活性和低毒性的MBL抑制剂提供参考。

## 1 EDTA 及其相关化合物

EDTA(1,图1)是使用最为广泛的合成类强效金属螯合剂。EDTA具备螯合 $Zn^{2+}$ 能力,但因对其他生理金属酶的选择性差、毒性强,不能作为MBL抑制剂临床应用。EDTA的钙复合物(Ca-EDTA)是唯一获得临床批准的EDTA类似物,主要用于治疗铅中毒。研究显示Ca-EDTA可恢复亚胺培南对产IMP-1、IMP-2、IMP-7、IMP-10及VIM-2的铜绿假单胞菌的抗菌活性,对IMP-1的 $IC_{50}$ 为55  $\mu\text{mol/L}$ <sup>[18]</sup>。此外Ca-EDTA还可提高亚胺培南和美罗培南对表达NDM-1的肺炎克雷伯菌的抗菌活性(MIC下降至小于2和小于4  $\mu\text{g/mL}$ )<sup>[19]</sup>。

乙二胺-N,N'-二丁二酸(ethylenediamine-N,N'-disuccinic acid, EDDS, 2,图1)是一种细菌来源的天然金属螯合剂,具有与EDTA相似的螯合性质,可生物降解<sup>[20]</sup>。Proschak等<sup>[21]</sup>报道了EDDS对B1亚类MBL具有抑制作用,其对NDM-1抑制活性最强( $IC_{50}$ 为0.18  $\mu\text{mol/L}$ ),对VIM-1和SIM-1较弱( $IC_{50}$ 均为8  $\mu\text{mol/L}$ ),对IMP-1无效。EDDS与亚胺培南协同,可恢复多种携带MBL的临床分离革兰氏阴性菌菌株对亚胺培南的敏感性。近期Tehrani等<sup>[22]</sup>报道酶法合成多种EDDS衍生物,体外实验显示6种衍生物具有NDM-1抑制活性( $IC_{50}$ 均为微摩尔级),其中一种甲基取代衍生物表现出较高的美罗培南协同抗菌作用。

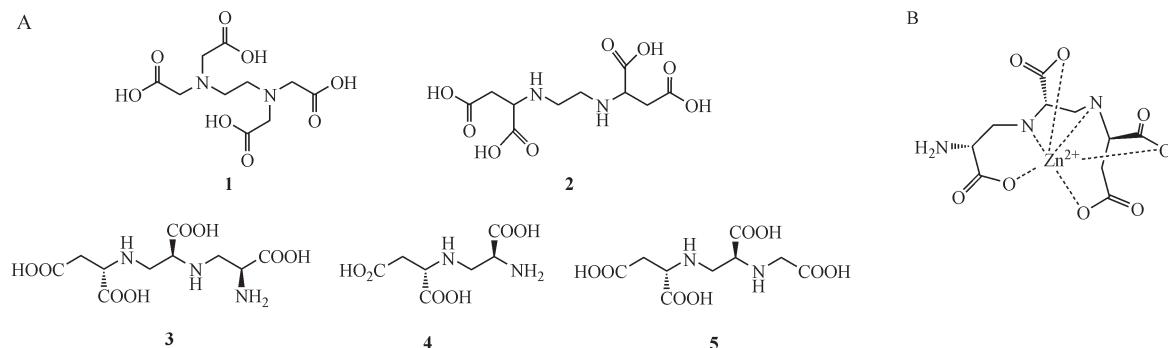


图1 EDTA及其相关化合物、AMA及其衍生物化学结构(A);AMA螯合 $Zn^{2+}$ 示意图(B)<sup>[27]</sup>

## 2 AMA 及其衍生物

AMA(3,图1)及相关化合物是近几年受到关注的新型螯合剂类MBL抑制剂。作为一种真菌天然产物,1965年AMA首次从米黄曲霉菌中分离与鉴定,其具有使植物叶片枯萎、斑变等毒素活性<sup>[23]</sup>。在20世纪80年代,AMA被报道为血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂<sup>[24]</sup>。2014年,King等<sup>[25]</sup>在Nature上报道,AMA被重新鉴定为一种选择性金属 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂,其对NDM-1和VIM-2具有低至微摩级的抑制活性(对NDM-1的 $IC_{50}$ 为4  $\mu\text{mol/L}$ ,对VIM-2的 $IC_{50}$ 为9.6  $\mu\text{mol/L}$ )。通过对229种临床分离的MBL阳性致病菌的抑菌实验,发现AMA可有效恢复美罗培南对携带NDM-1和VIM-2的多种革兰氏阴性菌(肠杆菌、不动杆菌、假单胞菌)的抗菌活性。体内实验显示,在注射致死剂量的NDM-1阳性肺炎克雷伯菌的小鼠模型中,单次联合注射美罗培南(10 mg/kg)与

AMA(30 mg/kg)5 d存活率达95%,而单独给药美罗培南或AMA均对致死性感染无效。

在后续的一项研究中,King同一课题组继续考察AMA与6种 $\beta$ -内酰胺类抗生素联用对19种B1、B2和B3亚类MBL的抑制活性<sup>[26]</sup>。相较于其他 $\beta$ -内酰胺类抗生素,碳青霉烯类抗生素尤其是美培罗南、多尼培南和亚胺培南与AMA的协同抗菌活性最佳。AMA对B1亚类的NDM-1和VIM-2表现出最强抑制活性,对NDM-4、IMP-1、IMP-7等B1亚类MBL具有中等抑制活性,对B2亚类CphA和B3亚类AIM-1的抑制活性低,对所有SBL没有抑制活性。值得注意的是,AMA活性与MBL的 $Zn_2$ 位点的 $Zn^{2+}$ 亲和力表现出相关性,对亲和力低的MBL抑制活性更高。

对AMA作用机制的研究表明,AMA通过选择性螯合 $Zn^{2+}$ ,导致MBL活性中心低亲和力 $Zn_2$ 位点 $Zn^{2+}$ 的丢失,抑制MBL活性(图1-B)。电感耦合质谱实验发现AMA从1分子NDM-1中仅移除1个

$Zn^{2+}$ 。Bergstrom 等<sup>[27]</sup>利用平衡透析和电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES),发现AMA可以在体外有效移除NDM-1、VIM-2或IMP-7活性中心的 $Zn^{2+}$ ,在微摩尔浓度条件下,2当量的AMA可以移除1当量的 $Zn^{2+}$ 。近期研究发现,包括NDM-1在内的许多MBL中 $Zn_2$ 位点较 $Zn_1$ 位点对 $Zn^{2+}$ 亲和力更弱,因此研究者推测AMA可能主要通过移除 $Zn_2$ 位点的 $Zn^{2+}$ 发挥抑制作用。此外,顺磁核磁分析显示,NDM-1活性中心并没有形成AMA:Zn(II):NDM-1三元复合体,表明AMA可能并不直接进入活性中心。2021年的最新研究进一步支持了这一推测,AMA不结合于NDM-1的活性中心,而是通过螯合游离的 $Zn^{2+}$ ,增强了动态发生的 $Zn_2$ 位点 $Zn^{2+}$ 的解离,导致 $Zn^{2+}$ 丢失并诱发蛋白质降解,从而导致NDM-1失活<sup>[15]</sup>。AMA具有金属离子选择性,对 $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 和 $Co^{2+}$ 具有螯合作用,而对其他生理重要的 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 等作用微弱,这可能是AMA具有较低动物毒性(小鼠静脉注射给药的 $LD_{50}$ 为159.8 mg/kg,EDTA的 $LD_{50}$ 为28.5 mg/kg)的原因之一<sup>[15, 25]</sup>。

自2016年起,一系列文章报道了AMA及结构类似物的合成方法。AMA结构较为复杂,具有3个手性中心及多个游离的氨基和羧基基团,化学全合成较为困难。至今共有6种主要的AMA合成策略,包括4种全化学合成、1种化学酶偶联合成及1种全生物合成方法<sup>[28-33]</sup>。在早期合成研究中,Liao等<sup>[28]</sup>和Koteva等<sup>[29]</sup>全化学合成4种AMA的立体异构体,验证了真菌合成的天然AMA为(S,S,S)-AMA。2018年,本课题组成员参与研究并报道AMA及其衍生物的化学酶偶联合成方法,通过引入一种高立体、区域与化学选择性的生物催化剂EDDS裂解酶,缩短合成路线,获得了AMA及一系列相关化合物<sup>[32]</sup>。2021年,Guo等<sup>[33]</sup>首次从米曲霉菌中鉴定并表征了AMA合成酶。该酶催化以L-天冬氨酸和O-磷酸丝氨酸(或O-乙酰丝氨酸)为底物连续两步反应合成AMA,为AMA及其衍生物提供了一种酶催化合成方法。

在对约30种AMA衍生物的MBL抑制活性考察中,部分衍生物(toxin A, 4; AMB, 5)(图1)具有NDM-1的抑制活性,抑制效力达AMA同一数量级<sup>[22, 34]</sup>。值得注意的是,AMA结构中的羧基对其发挥抑制作用非常重要,在对羧基进行修饰后观察到其对NDM-1活性丧失<sup>[31, 34]</sup>。AMA的3个手性

中心的绝对构型对NDM-1的抑制活性影响较小,(S,S,S)-AMA的 $IC_{50}$ 在所有衍生物中最低<sup>[34]</sup>。AMA衍生物的合成与活性考察促进该类化合物对MBL抑制机制的研究,将为开发新的选择性MBL抑制剂提供重要参考。

### 3 NOTA 及相关化合物

1,4,7-三氮杂环壬烷-1,4,7-三乙酸(NOTA, 6, 图2-A)与1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA, 7, 图2-A)是胺类金属螯合剂。2015年,Somboro等<sup>[35]</sup>首次报道NOTA和DOTA可协同美罗培南或亚胺培南,恢复其对表达NDM、VIM或IMP的耐碳青霉烯类抗生素的耐药菌的活性。其中,NOTA效果略优于DOTA,4 μg/mL质量浓度下的NOTA可使美罗培南对多重耐药菌的MIC降至0.06 μg/mL。细胞毒性实验显示,NOTA和DOTA在使用剂量下不会诱发溶血。

Zhang等<sup>[36]</sup>报道一种NOTA的二硫代氨基甲酸酯衍生物(化合物8, 图2-A)为MBL抑制剂。体外实验显示,化合物8可以恢复美罗培南对多种携带bla<sub>NDM-1</sub>基因的临床分离菌株的活性,但活性低于NOTA。对NOTA及化合物8的抑制机制考察显示,向携带NDM-1的大肠埃希菌同时加入美罗培南与化合物8可引起细菌生长率大幅下降(由100%下降至2.55%),体系中补加ZnCl<sub>2</sub>后耐药菌生长率由2.55%恢复至90.30%。相应的NOTA实验中也表现出相同现象,显示出NOTA与化合物8对NDM-1的抑制活性可以通过补加Zn<sup>2+</sup>得到逆转,作用机制可能与基于螯合作用的Zn<sup>2+</sup>剥离有关。动力学研究显示NOTA和化合物8对NDM-1的抑制符合非竞争性抑制的特征。分子对接结果显示NOTA和化合物8均可能不结合于NDM-1的活性中心,因此作者推测该类化合物可能通过螯合从活性中心动态解离的Zn<sup>2+</sup>发挥抑制NDM-1活性。

Li等<sup>[37]</sup>利用NOTA对NDM-1抑制活性,开发了一种复合纳米材料IPM@AgNPs-PEG-NOTA(图2-B)。该纳米材料将SH-PEG<sub>2000</sub>-NOTA包裹于载有亚胺培南的银纳米颗粒外层,利用NOTA逆转细菌对亚胺培南的耐药性,发挥银纳米颗粒与亚胺培南的双重抑菌作用。该纳米复合材料在体内与体外实验中表现出有效灭杀产NDM-1的耐碳青霉烯类抗生素的鲍曼不动杆菌的活性,相较于单独

使用亚胺培南或银纳米颗粒的抗菌活性均得到增强。IPM@AgNPs-PEG-NOTA具有良好的生物相容

性,毒性低,为多功能抗耐药菌药物的开发提供了新思路。

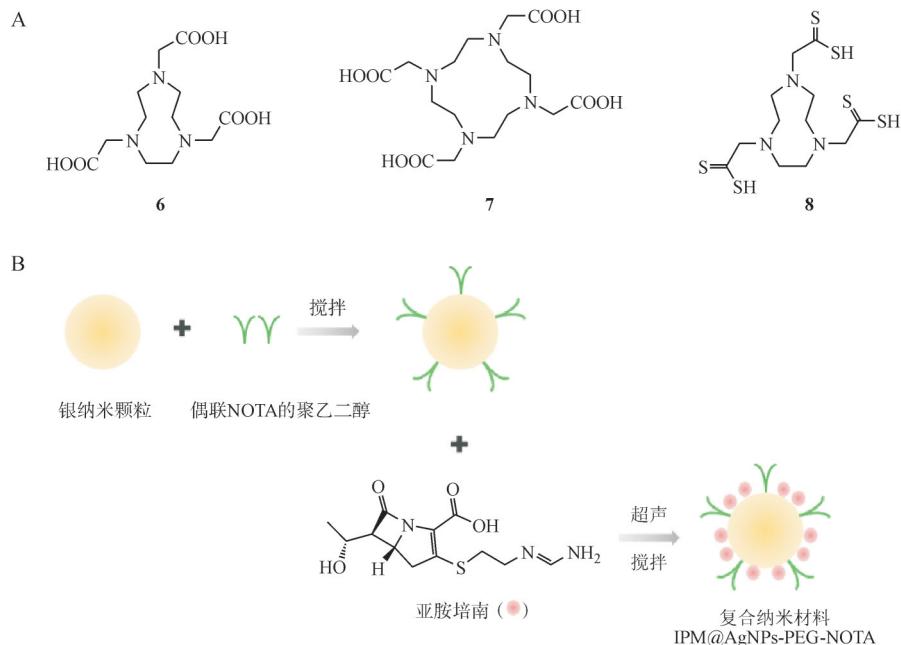


图2 NOTA相关MBL抑制剂化学结构(A);IPM@AgNPs-PEG-NOTA复合纳米材料制备示意图(B)<sup>[37]</sup>

#### 4 吡啶羧酸类与吡啶甲基胺类化合物

2-吡啶甲酸(2-PDCA, **9**,图3)是一种人体产生的天然Zn<sup>2+</sup>螯合剂,可帮助锌的吸收<sup>[38]</sup>。2007年,Horsfall等<sup>[39]</sup>首次报道2-PDCA和吡啶-2,4-二羧酸(2,4-PDCA, **10**,图3)是B2亚类CphA的竞争性抑制剂。X射线与晶体分析结果显示,2,4-PDCA通过在活性中心形成CphA:Zn(II):2,4-PDCA复合体的方式螯合Zn<sup>2+</sup>,使酶失活。值得一提的是,2-PDCA对B1亚类NDM-1、VIM-2、IMP-1和B3亚类L1没有抑制活性( $IC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$ )。

2017年,Chen等<sup>[16]</sup>报道了吡啶-2,6-二羧酸(DPA, **11**,图3)是一种具有NDM-1及其他相关MBL(VIM和IMP)抑制潜力的化学结构。该课题组通过使用基于片段的药物发现(fragment-based drug discovery, FBDD)策略,设计、合成并评估了3组共47个DPA衍生物,发现衍生物(**12**)是一种有潜力的MBL抑制剂。衍生物**12**对NDM-1的 $IC_{50}$ 低至80 nmol/L(DPA的 $IC_{50}$ 为0.41  $\mu\text{mol/L}$ ),并对B1亚类的VIM-2和IMP-1同样有较强的抑制活性(对VIM-2的 $IC_{50}$ 为0.21  $\mu\text{mol/L}$ ,对IMP的 $IC_{50}$ 为0.24  $\mu\text{mol/L}$ )。体外实验中,衍生物**12**(100 mg/L)可使

亚胺培南对临床分离的携带bla<sub>NDM-1</sub>大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的MIC由4~16 mg/L降低至0.5~1 mg/L,与亚胺培南具有协同抗菌作用。衍生物**12**(10  $\mu\text{mol/L}$ 以下)对Zn<sup>2+</sup>依赖金属酶HDAC-1、HDAC-6和hCAII没有明显抑制活性,表现出对B1亚类MBL的高选择性,并且对人源HEK293细胞没有细胞毒性<sup>[16]</sup>。机制研究结果显示,DPA类似于EDTA,通过无选择性的螯合NDM-1活性中心的两个Zn<sup>2+</sup>发挥抑制作用,但衍生物**12**则通过结合于NDM-1活性中心,形成稳定的NDM-1:Zn(II):衍生物**12**三元复合物发挥抑制作用。随后一项研究表明,衍生物**12**在NDM-1活性中心的结合主要源于苯胺的氨基与NDM-1的211位赖氨酸残基的相互作用<sup>[40]</sup>。

Hinchliffe等<sup>[41]</sup>报道将DPA的一个羧基置换为磷酰甲基基团,合成了一系列DPA衍生物并考察对MBL抑制活性。化合物**13**(图3)及另外两种衍生物对NDM-1、VIM-2、IMP-1和L1具有竞争性抑制活性( $IC_{50}$ 为0.3~7.2  $\mu\text{mol/L}$ , $K_i$ 为0.03~1.5  $\mu\text{mol/L}$ ),在对真核细胞不产生毒性的浓度下,可有效恢复美罗培南对临床分离的携带VIM-2、NDM-1的肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希

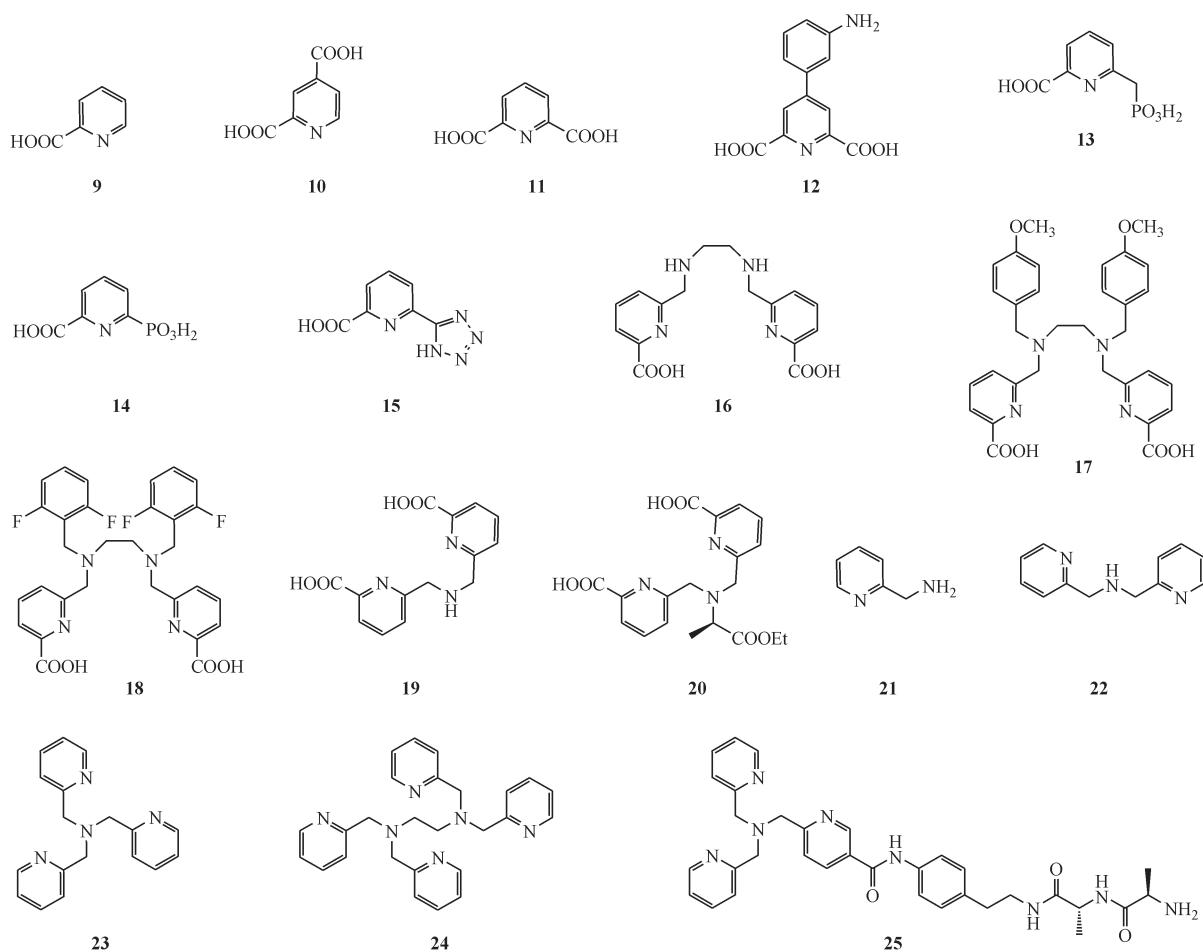
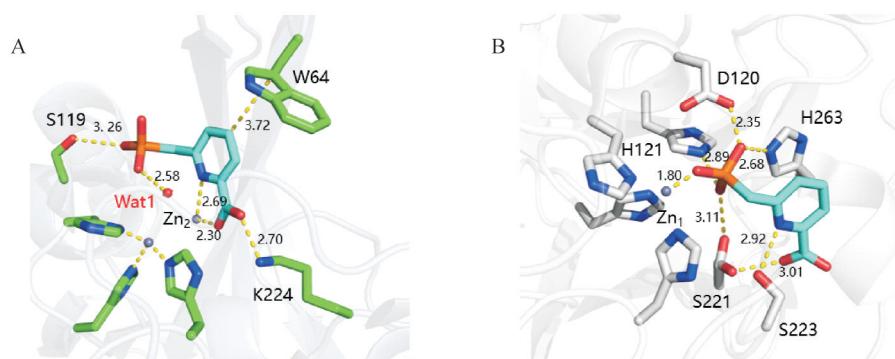


图3 吡啶羧酸类与吡啶甲基胺类 MBL 抑制剂

菌等耐药菌的活性。共晶结构显示化合物 13 与 IMP-1 及 L1 的结合方式不同(图 4-A 和图 4-B)。在 IMP-1 活性中心中, 化合物 13 的吡啶 N 原子、羧基与 Zn<sub>2</sub> 位点 Zn<sup>2+</sup> 形成配位键, 而磷酸基团与桥联的

水分子相互作用, 形成稳定的三元复合体。但在 L1 的活性中心中, 化合物 13 的磷酸基团置换 Zn<sub>2</sub> 位点的 Zn<sup>2+</sup> 及氢氧根离子, 形成单 Zn<sup>2+</sup> 形式酶以发挥对 L1 的抑制作用。

图4 化合物 13 与 IMP-1 共晶结构(PDB 号: 5HH4)(A)<sup>[41]</sup>; 化合物 13 与 L1 共晶结构(PDB 号: 5HH5)(B)<sup>[41]</sup>

依据生物电子等排体置换思路, Chen 等<sup>[42]</sup>将 DPA 其中一个羧基置换成其他电子等排体, 合成一系列 DPA 衍生物。结合抑制活性与平衡透析实

验结果发现, 当 DPA 中羧基替换成其他电子等排体时, 会导致化合物对 NDM-1 抑制机制发生改变。羧基替换成磷酸基团(14)时, 其抑制机制仍为 Zn<sup>2+</sup>

的剥离,对NDM-1的 $IC_{50}$ 下降至0.31 μmol/L。但当羧基替换为四氮唑(**15**)时,抑制机制改变为三元复合体的形成,对NDM-1的 $IC_{50}$ 提高至7 μmol/L。该研究显示电子等排体置换策略是改变化合物对MBL作用机制的有效方案,可为后续MBL抑制剂的开发提供参考。

**6,6'-[亚乙基双(亚胺亚甲基)]双(2-吡啶甲酸)**(H<sub>2</sub>dedpa,**16**,图3)同属于吡啶羧酸的衍生物,可用作<sup>68</sup>Ga正电子发射断层显像剂的无环螯合剂,用于疾病诊疗<sup>[43]</sup>。Shi等<sup>[44-45]</sup>鉴定H<sub>2</sub>dedpa为强效的MBL抑制剂(对NDM-1的 $IC_{50}$ 为0.17 μmol/L),并以该结构为母体合成一系列衍生物,并从中找寻到活性更强的化合物**17**(对NDM-1的 $IC_{50}$ 为0.04 μmol/L)和化合物**18**(对NDM-1的 $IC_{50}$ 为0.11 μmol/L)。此类化合物可在体外恢复美罗培南对临床表达NDM、IMP菌株的活性,对NDM-1的 $IC_{50}$ 均小于1 μmol/L。为研究此类化合物抑制MBL机制,作者进行了Zn<sup>2+</sup>敏感性实验。在实验组耐药菌培养中同时添加美罗培南与化合物**18**,观察到细菌生长率大幅下降(由100%下降至2.69%)。对实验组额外加入与化合物**18**等摩尔量的ZnCl<sub>2</sub>,耐药菌生长率回复到正常生长的对照组相似水平。结果显示此类化合物对NDM-1的抑制活性受到Zn<sup>2+</sup>存在而发生逆转,以此判断此类化合物通过螯合Zn<sup>2+</sup>发挥抑制作用。分子对接结果显示此类化合物可结合于NDM-1活性中心。

Chen等<sup>[46]</sup>报道6-{[(6-羧基吡啶-2-基)甲基氨基]甲基}吡啶-2-羧酸(H<sub>2</sub>dpa,**19**)衍生物为强效MBL抑制剂,并通过Zn<sup>2+</sup>螯合机制对MBL产生抑制作用。其中化合物**20**对B1亚类的NDM-1的 $K_i$ 为1.59 μmol/L,对IMP-1的 $K_i$ 为1.57 μmol/L,对VIM-2的 $K_i$ 为6.16 μmol/L。体内外实验均显示**20**可恢复美罗培南对携带NDM-1肺炎克雷伯菌的活性,且在有效浓度内未显示出溶血活性与对胃上皮细胞(GES)的细胞毒性。

吡啶甲基胺类化合物2-吡啶甲胺(MPA,**21**,图3)、二-(2-吡啶甲基)胺(**22**,图3)、三-(2-吡啶甲基)胺(TPA,**23**,图3)和N,N,N',N'-四-(2-吡啶甲基)乙二胺(TPEN,**24**,图3)被鉴定为MBL抑制剂,可在体外恢复携带NDM、VIM的耐碳青霉烯类抗生素肠杆菌对美罗培南敏感性<sup>[47]</sup>。此类化合物抑制机制为Zn<sup>2+</sup>螯合,并发现此类化合物结构中吡啶

基团数目越多,其螯合Zn<sup>2+</sup>能力越强,对MBL抑制活性越强<sup>[48]</sup>。

TPA在后续研究中,用作螯合剂组件参与合成一系列全新的选择性Zn<sup>2+</sup>螯合剂。该螯合剂设计基于“Chelator+Linker+Modulator”思路,将TPA与一短肽片段偶联,调节亲脂性以降低毒性<sup>[49]</sup>。研究人员测定各化合物与美罗培南的协同抗菌活性,并考察各化合物对HepG2细胞的细胞毒性。在50 μmol/L浓度下,衍生物**25**与TPA均使美罗培南对携带NDM-1肺炎克雷伯菌MIC降至0.125 μg/mL。衍生物**25**的细胞毒性更低,其对HepG2细胞的 $IC_{50}$ >100 μmol/L(TPA的 $IC_{50}$ 为9.8 μmol/L),同时在128 mg/kg剂量下对小鼠单周给药两次未见不良反应。该设计策略保留TPA对MBL抑制活性,并降低了毒性。

## 5 其他

除上述几类化合物,还有一些难以归类的螯合剂类金属MBL抑制剂,如二硫代氨基甲酸酯类化合物<sup>[50]</sup>、吡唑类化合物<sup>[51]</sup>、支化聚乙烯亚胺(BPEI)及其衍生物<sup>[52]</sup>、喹啉类化合物<sup>[53]</sup>、螺二氢吲哚-噁二唑类似物<sup>[54]</sup>等。

Ishii等<sup>[55]</sup>报道ME1071(马来酸衍生物,**26**,图5)可以体外增强碳青霉烯类抗生素对产MBL铜绿假单胞菌的活性。体外实验测得ME1071对IMP-1的 $K_i$ 0.4 μmol/L,对VIM-2的 $K_i$ 120 μmol/L。体内实验结果显示,在注射携带MBL的铜绿假单胞菌引起的肺炎模型小鼠中,ME1071可协同比阿培南有效治疗肺炎,且未产生不良反应<sup>[56]</sup>。

Gavara等<sup>[57-59]</sup>报道通过修饰1,2,4-三唑-3-硫酮的4位及5位位点,合成了一系列衍生物。此类化合物在体外明显增强美罗培南对产VIM的临床分离肺炎克雷伯菌的活性。化合物**27**(图5)是VIM-2的竞争性抑制剂, $K_i$ 为0.83 μmol/L。化合物**27**与VIM-2的共晶结构(图5-B)显示,该化合物可同时螯合VIM-2活性中心两个Zn<sup>2+</sup>。其中化合物**27**的2位N原子螯合VIM-2的Zn<sub>1</sub>位点Zn<sup>2+</sup>,硫酮螯合Zn<sub>2</sub>位点Zn<sup>2+</sup>,4位和5位的修饰与活性中心其他氨基酸发生相互作用稳定该三元复合体结构。

基于芳基磺酰胺化合物与头孢菌素的相似性,Shaaban等<sup>[60]</sup>将其与吡唑类化合物偶联,理性设计NDM-1的抑制剂,以期获得能稳定结合于

NDM-1 的活性口袋、螯合 Zn<sup>2+</sup> 以实现抑制作用的化合物。获得的衍生物在体外实验中均显示出优秀的对 NDM-1、IMP-1、AIM-1 的抑制活性。衍生物 28(图 5)活性最强, 可使头孢氨苄和美罗培南的活性提高约 99.8%。体内实验中, 对感染肺炎克雷伯菌的模型小鼠进行给药实验, 相比于只给药美

罗培兰的小鼠在 5 d 内全部死亡, 治疗组(美罗培兰 + 衍生物 28)小鼠全部存活, 并且 6 d 内检测到体内所有细菌清除。衍生物 28 在 350 mg/kg 给药剂量下对小鼠无不良反应。分子对接结果与预期一致, 衍生物 28 结合于 NDM-1 和 IMP-1 活性中心, 通过磺基螯合 Zn<sup>2+</sup> 发挥抑制活性。

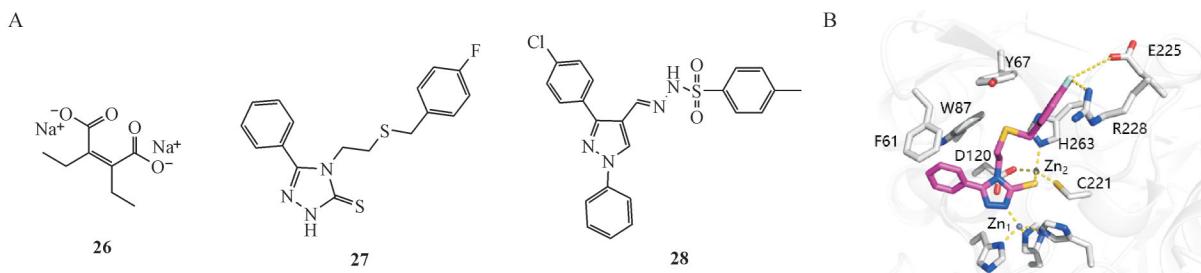


图 5 其他螯合剂类 MBL 抑制剂(A); 化合物 27 与 VIM-2 共晶结构(PDB 号: 7OVF)(B)<sup>[57]</sup>

## 6 总结与展望

本文综述了螯合剂类 MBL 抑制剂的研究进展, 介绍了几类重要化合物的化学结构、抑制活性、与抗生素的协同作用、选择性和作用机制。

螯合剂类 MBL 抑制剂主要对 B1 亚类的 MBL (NDM、VIM、IMP) 表现出有效的体外抑制活性 (IC<sub>50</sub> 或 K<sub>i</sub> 达微摩尔级)。其中吡啶羧酸类化合物的 IC<sub>50</sub> 或 K<sub>i</sub> 更低, 部分化合物达到纳摩尔级别。抑制剂可在体外协同碳青霉烯类抗生素, 恢复携带 MBL 的耐药菌对碳青霉烯类抗生素的敏感性。部分化合物在体内活性实验中展现出与碳青霉烯类抗生素的协同作用, 但大部分化合物缺乏对体内活性的考察。

氨基多羧酸类抑制剂的作用机制主要为 Zn<sup>2+</sup> 剥离。相比于广谱螯合剂 EDTA, 近期得到关注的 AMA 表现出更高的动物耐受性(小鼠静脉注射给药的 LD<sub>50</sub> 为 159.8 mg/kg)。原因可能为 AMA 是一种选择性金属螯合剂, 对 Zn<sup>2+</sup> 融合能力强于其他生理金属离子如 Mg<sup>2+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 等。由于 NDM-1 和 VIM-2 等 MBL 对 Zn<sup>2+</sup> 亲和力比许多生理 Zn<sup>2+</sup> 依赖酶弱, AMA 对 Zn<sup>2+</sup> 的纳摩尔级亲和力 (K<sub>d</sub> 为 0.2 nmol/L) 能够移除这些 MBL 的 Zn<sup>2+</sup>, 减少对高亲和力 Zn<sup>2+</sup> 依赖酶的脱靶效应。AMA 的作用机制为同类抑制剂的开发及结构改造提供了一定参考。吡啶羧酸类及吡啶甲基胺类抑制剂的作用机制包括 Zn<sup>2+</sup> 剥离

与形成稳定 MBL:Zn(II):抑制剂三元复合体。对 DPA 衍生物的研究显示结构修饰可以改变作用机制, 并且同一抑制剂可能对不同 MBL 具备不同的抑制机制(如化合物 13)。代表性衍生物 12 经改造由 Zn<sup>2+</sup> 剥离机制变为形成三元复合体机制, 抑制活性提高, 同时在有效浓度下对几种生理金属酶无抑制活性, 显示了靶向活性中心的设计改造可能是一种有效策略。目前许多报道集中于发现高活性抑制剂, 缺乏抑制剂对生理金属酶选择性、作用机制、构效关系、体内活性与毒性等研究。后续对这些方面的系统考察, 将为螯合剂类 MBL 抑制剂的开发提供重要参考。

对现有螯合剂进行理性设计, 提高螯合剂对 Zn<sup>2+</sup> 的选择性, 降低毒性可能是此类药物未来的发展方向。已有研究人员进行相关尝试, 通过对化合物 22 偶联靶向 MBL 的细菌二肽 D-Ala-D-Ala, 降低细胞毒性, 提高对 MBL 的抑制活性<sup>[61]</sup>。未来研究中也可能通过制剂手段提高螯合剂类 MBL 抑制剂的靶向性与成药性, 前文报道的 NOTA 的复合纳米材料不仅具有良好生物相容性, 还提高了 NOTA 的抑菌活性。随着更多螯合剂类 MBL 抑制剂的鉴定与开发、各类化合物 MBL 抑制机制的不断解析、理性设计与制剂方法的不断尝试, 相信不久后高选择性、高活性和低毒性的螯合剂类 MBL 抑制剂将与  $\beta$ -内酰胺抗生素联用, 解决临床表达 MBL 的耐药菌感染问题。

表1 融合剂类MBL抑制剂的化学结构与活性相关信息

No	药物名称	分子式	化学分类	抑制活性	与抗生素协同抗菌活性(MIC)	细胞毒性( $IC_{50}^c$ )	参考文献
1	EDTA	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	氨基多羧酸类 (EDTA-Ca)	IMP-1 $IC_{50}=55\ \mu mol/L$ EDTA-Ca=32 $\mu g/mL$ ; ≤4 $\mu g/mL$	MEM <sup>a</sup> ( <i>K. pneumoniae</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , EDTA-Ca=32 $\mu g/mL$ ); ≤2 $\mu g/mL$	A549(>8 $\mu g/mL$ )	[18-19]
2	EDDS	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	氨基多羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=0.18\ \mu mol/L$	IPM <sup>b</sup> ( <i>E. coli</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , $2=32\ \mu g/mL$ ); 0.25 $\mu g/mL$	-	[21]
3	AMA	$C_{10}H_{17}N_3O_8$	氨基多羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=4.0\ \mu mol/L$	MEM( <i>E. coli</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , $3=8\ \mu g/mL$ ); 2 $\mu g/mL$	-	[15, 25-27]
4	Toxin A	$C_7H_{12}N_2O_6$	氨基多羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=2.63\ \mu mol/L$	-	-	[22]
5	AMB	$C_9H_{14}N_2O_8$	氨基多羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=2.33\ \mu mol/L$	-	-	[22]
6	NOTA	$C_{12}H_{21}N_3O_6$	氨基多羧酸类	NDM-1 $K_i=5.11\ \mu mol/L$	MEM( <i>E. coli</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , $6=4\ \mu g/mL$ ); 0.125 $\mu g/mL$	RBC(>500 $\mu g/mL$ )	[35-36]
7	DOTA	$C_{16}H_{28}N_4O_8$	氨基多羧酸类	-	MEM( <i>E. coli</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , $7=64\ \mu g/mL$ ); 0.5 $\mu g/mL$	RBC(>500 $\mu g/mL$ )	[35]
8	2,2',2''(1,4,7-三唑烷-1,4,7-三基)三乙二硫代酸	$C_{12}H_{21}N_3S_6$	氨基多羧酸衍生物	NDM-1 $K_i=5.63\ \mu mol/L$	MEM( <i>E. coli</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , $8=8\ \mu g/mL$ ); <0.03125 $\mu g/mL$	HeLa(>1 024 $\mu g/mL$ )	[36]
9	2-吡啶甲酸	$C_6H_5NO_2$	吡啶羧酸类	CphA $K_i=5.70\ \mu mol/L$	-	-	[39]
10	吡啶-2,4-二羧酸	$C_7H_5NO_4$	吡啶羧酸类	CphA $K_i=4.50\ \mu mol/L$	-	-	[39]
11	吡啶-2,6-二羧酸	$C_7H_5NO_4$	吡啶羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=0.41\ \mu mol/L$	-	-	[16]
12	4-(3-氨基苯基)吡啶-2,6-二羧酸	$C_{13}H_{10}N_2O_4$	吡啶羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=0.08\ \mu mol/L$	IPM( <i>E. coli</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , $12=100\ \mu g/mL$ ); <0.5 $\mu g/mL$	HEK293(>100 $\mu g/mL$ )	[16, 40]
13	6-(膦酰基甲基)吡啶甲酸	$C_7H_8NO_5P$	吡啶羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=0.37\ \mu mol/L$	MEM( <i>K. pneumoniae</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , $13=100\ \mu g/mL$ ; 4 $\mu g/mL$ )	H4IE(>250 $\mu g/mL$ )	[41]
				IMP-1 $IC_{50}=3.88\ \mu mol/L$		Caco2(>250 $\mu g/mL$ )	
				L1 $IC_{50}=1.48\ \mu mol/L$		HepG2(>250 $\mu g/mL$ )	
14	6-膦酸吡啶甲酸	$C_6H_6NO_5P$	吡啶羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=0.31\ \mu mol/L$	-	-	[42]
15	6-(1 <i>H</i> -四唑-5-基)吡啶甲酸	$C_7H_5N_5O_2$	吡啶羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=7.0\ \mu mol/L$	-	-	[42]
16	H <sub>2</sub> dedpa	$C_{16}H_{18}N_4O_4$	吡啶羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=0.17\ \mu mol/L$	MEM( <i>E. coli</i> , <i>bla</i> <sup>+</sup> <sub>NDM-1</sub> , $16=32\ \mu g/mL$ ); 0.125 $\mu g/mL$	HeLa(>1 000 $\mu g/mL$ )	[44]

(续表)

No	药物名称	分子式	化学分类	抑制活性	与抗生素协同抗菌活性(MIC)	细胞毒性( $IC_{50}^c$ )	参考文献
17	6,6'-(乙烷-1,2-二基双((4-甲氧基苄基)氮杂二基))双(亚甲基)吡啶二甲酸	$C_{32}H_{34}N_4O_6$	吡啶羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=0.04 \mu\text{mol/L}$	MEM ( <i>E. coli</i> , $bla_{NDM-1}^+$ , <b>17</b> =32 $\mu\text{g/mL}$ ); 0.125 $\mu\text{g/mL}$	Hela(>1000 $\mu\text{g/mL}$ )	[44]
18	6,6'-(乙烷-1,2-二基双((2,6-二氟苄基)氮杂二基))双(亚甲基)吡啶二甲酸	$C_{30}H_{26}F_4N_4O_4$	吡啶羧酸类	NDM-1 $IC_{50}=0.11 \mu\text{mol/L}$	MEM ( <i>E. coli</i> , $bla_{NDM-1}^+$ , <b>18</b> =32 $\mu\text{g/mL}$ ); 0.25 $\mu\text{g/mL}$	Hela(>1000 $\mu\text{g/mL}$ )	[45]
19	$H_2dpa$	$C_{14}H_{13}N_3O_4$	吡啶羧酸类	-	-	-	[46]
20	(R)-6,6'-((((1-乙氧基-1-氧代丙烷-2-基)氮杂二基)双(亚甲基))吡啶二羧酸	$C_{19}H_{21}N_3O_6$	吡啶羧酸类	NDM-1 $K_i=5.63 \mu\text{mol/L}$ ; IMP-1 $K_i=1.57 \mu\text{mol/L}$	MEM ( <i>E. coli</i> , $bla_{NDM-1}^+$ , <b>20</b> =16 $\mu\text{g/mL}$ ); VIM-2 $K_i=6.16 \mu\text{mol/L}$	GES(32 $\mu\text{g/mL}$ )	[46]
21	2-吡啶甲胺	$C_6H_8N_2$	吡啶甲基胺类	-	-	-	[47]
22	二-(2-吡啶甲基)胺	$C_{12}H_{13}N_3$	吡啶甲基胺类	-	MEM ( <i>K. pneumoniae</i> , $bla_{NDM-1}^+$ , <b>22</b> =16 $\mu\text{g/mL}$ ); 0.125 $\mu\text{g/mL}$	Hela(62.5 $\mu\text{g/mL}$ )	[47-48]
23	三-(2-吡啶甲基)胺	$C_{18}H_{18}N_4$	吡啶甲基胺类	-	MEM ( <i>K. pneumoniae</i> , $bla_{NDM-1}^+$ , <b>23</b> =50 $\mu\text{mol/L}$ ); 0.125 $\mu\text{g/mL}$	HepG2(9.8 $\mu\text{mol/L}$ )	[47-49]
24	<i>N,N,N',N'</i> -四-(2-吡啶甲基)乙二胺	$C_{26}H_{28}N_6$	吡啶甲基胺类	-	MEM ( <i>K. pneumoniae</i> , $bla_{NDM-1}^+$ , <b>24</b> =50 $\mu\text{mol/L}$ ); <0.5 $\mu\text{g/mL}$	HepG2(7.1 $\mu\text{mol/L}$ )	[49]
25	<i>N</i> -(4-(2-((R)-2-((R)-2-氨基丙酰胺基)丙酰胺基)乙基)苯基)-6-((双(吡啶-2-基甲基)氨基)甲基)烟酰胺	$C_{33}H_{38}N_8O_3$	吡啶甲基胺衍生物	NDM-1 $K_i=0.81 \mu\text{mol/L}$	MEM ( <i>K. pneumoniae</i> , $bla_{NDM-1}^+$ , <b>25</b> =50 $\mu\text{mol/L}$ ); 0.125 $\mu\text{g/mL}$	HepG2(>100 $\mu\text{mol/L}$ )	[49]
26	2,3-乙基马来酸钠	$C_8H_{10}Na_2O_4$	其他类	IMP-1 $K_i=0.4 \mu\text{mol/L}$ ; VIM-2 $K_i=120 \mu\text{mol/L}$	Biapenem ( <i>K. pneumoniae</i> , $bla_{IMP-1}^+$ , <b>26</b> =16 $\mu\text{g/mL}$ ); 8 $\mu\text{g/mL}$	-	[55-56]
27	4-(2-(4-氟苄基)硫代)-5-苯基-2,4-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-硫酮	$C_{17}H_{16}FN_3S_2$	其他类	VIM-2 $K_i=0.83 \mu\text{mol/L}$	MEM ( <i>K. pneumoniae</i> , $bla_{VIM-1}^+$ , <b>27</b> =32 $\mu\text{g/mL}$ ); 8 $\mu\text{g/mL}$	-	[57]
28	(E)- <i>N'</i> -((3-(4-氯苯基)-1-苯基-1 <i>H</i> -吡唑-4-基)亚甲基)-4-甲基苯磺酰肼	$C_{23}H_{19}ClN_4O_2S$	其他类	NDM-1 $K_i=1.5 \mu\text{mol/L}$	MEM ( <i>K. pneumoniae</i> , $bla_{NDM-1}^+$ , <b>28</b> =3.28 $\mu\text{mol/L}$ ); 4 $\mu\text{g/mL}$	-	[60]

<sup>a</sup>MEM: 美罗培南与化合物联用时, 美罗培南对耐药菌的 MIC, 括号中注释为耐药菌的类别, 表达的 MBL 以及抑菌实验时化合物浓度; <sup>b</sup>IPM: 亚胺培南与化合物联用时, 美罗培南对耐药菌的 MIC; <sup>c</sup> $IC_{50}$ : 各底物抑制细胞生长率达到 50% 的底物浓度

## References

- [1] Bush K, Bradford PA.  $\beta$ -lactams and  $\beta$ -lactamase inhibitors: an overview [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, **6**(8): a025247.
- [2] Lutgring JD. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: an emerging bacterial threat [J]. *Semin Diagn Pathol*, 2019, **36**(3):182-186.
- [3] Kadri SS. Key takeaways from the US CDC's 2019 antibiotic resistance threats report for frontline providers [J]. *Crit Care Med*, 2020, **48**(7):939-945.
- [4] Salahuddin P, Kumar A, Khan AU. Structure, function of serine and metallo- $\beta$ -lactamases and their inhibitors [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2018, **19**(2):130-144.
- [5] von Nussbaum F, Schiffer G. Aspergillomarasmine A, an inhibitor of bacterial metallo- $\beta$ -lactamases conferring bla<sub>NDM</sub> and bla<sub>VIM</sub> resistance [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2014, **53**(44): 11696-11698.
- [6] Linciano P, Cendron L, Gianquinto E, et al. Ten years with New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1): from structural insights to inhibitor design [J]. *ACS Infect Dis*, 2019, **5**(1):9-34.
- [7] Yamaguchi Y, Kato K, Ichimaru Y, et al. Crystal structures of metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1) and its D120E mutant in complexes with citrate and the inhibitory effect of the benzyl group in citrate monobenzyl ester [J]. *J Med Chem*, 2021, **64**(14): 10019-10026.
- [8] Pemberton OA, Jaishankar P, Akhtar A, et al. Heteroaryl phosphonates as noncovalent inhibitors of both serine- and metallo-carbapenemases [J]. *J Med Chem*, 2019, **62**(18):8480-8496.
- [9] Rivière G, Oueslati S, Gayral M, et al. NMR characterization of the influence of zinc (II) ions on the structural and dynamic behavior of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 and on the binding with flavonols as inhibitors [J]. *ACS Omega*, 2020, **5**(18):10466-10480.
- [10] Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors in the 21st century [J]. *J Mol Biol*, 2019, **431**(18):3472-3500.
- [11] Bonomo RA.  $\beta$ -lactamases: a focus on current challenges [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, **7**(1):a025239.
- [12] Elder DP, Kuentz M, Holm R. Antibiotic resistance: the need for a global strategy [J]. *J Pharm Sci*, 2016, **105**(8): 2278-2287.
- [13] Bahr G, González LJ, Vila AJ. Metallo- $\beta$ -lactamases in the age of multidrug resistance: from structure and mechanism to evolution, dissemination, and inhibitor design [J]. *Chem Rev*, 2021, **121**(13):7957-8094.
- [14] Sabath LD, Abraham EP. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569 [J]. *Biochem J*, 1966, **98**(1): 11C-13C.
- [15] Sychantha D, Rotondo CM, Tehrani KHME, et al. Aspergillomarasmine A inhibits metallo- $\beta$ -lactamases by selectively sequestering Zn<sup>2+</sup> [J]. *J Biol Chem*, 2021, **297**(2):100918.
- [16] Chen AY, Thomas PW, Stewart AC, et al. Dipicolinic acid derivatives as inhibitors of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 [J]. *J Med Chem*, 2017, **60**(17):7267-7283.
- [17] Thomas DJ, Chisolm J Jr. Lead, zinc and copper decorporation during calcium disodium ethylenediamine tetraacetate treatment of lead-poisoned children [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1986, **239**(3):829-835.
- [18] Aoki N, Ishii Y, Tateda K, et al. Efficacy of calcium-EDTA as an inhibitor for metallo- $\beta$ -lactamase in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, **54**(11):4582-4588.
- [19] Yoshizumi A, Ishii Y, Livermore DM, et al. Efficacies of calcium-EDTA in combination with imipenem in a murine model of sepsis caused by *Escherichia coli* with NDM-1  $\beta$ -lactamase [J]. *J Infect Chemother*, 2013, **19**(5):992-995.
- [20] Spohn M, Wohlleben W, Stegmann E. Elucidation of the zinc-dependent regulation in *Amycolatopsis japonicum* enabled the identification of the ethylenediamine-disuccinate ([S, S]-EDDS) genes [J]. *Environ Microbiol*, 2016, **18**(4):1249-1263.
- [21] Proschak A, Kramer J, Proschak E, et al. Bacterial zincophore [S, S]-ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid is an effective inhibitor of MBLs [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, **73**(2): 425-430.
- [22] Tehrani KHME, Fu HG, Brüchle NC, et al. Aminocarboxylic acids related to aspergillomarasmine A (AMA) and ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid (EDDS) are strong zinc-binders and inhibitors of the metallo-beta-lactamase NDM-1 [J]. *Chem Commun*, 2020, **56**(20):3047-3049.
- [23] Haenni AL, Robert M, Vetter W, et al. Structure chimique des aspergillomarasmes A et B [J]. *Helv Chim Acta*, 1965, **48**(4): 729-750.
- [24] Mikami Y, Suzuki T. Novel microbial inhibitors of angiotensin-converting enzyme, aspergillomarasmes A and B [J]. *Agric Biol Chem*, 1983, **47**(11):2693-2695.
- [25] King AM, Reid-Yu SA, Wang WL, et al. Aspergillomarasmine A overcomes metallo- $\beta$ -lactamase antibiotic resistance [J]. *Nature*, 2014, **510**(7506):503-506.
- [26] Rotondo CM, Sychantha D, Koteva K, et al. Suppression of  $\beta$ -lactam resistance by aspergillomarasmine A is influenced by both the metallo- $\beta$ -lactamase target and the antibiotic partner [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, **64**(4): e01386-e01419.
- [27] Bergstrom A, Katko A, Adkins Z, et al. Probing the interaction of aspergillomarasmine A with metallo- $\beta$ -lactamases NDM-1, VIM-2, and IMP-7 [J]. *ACS Infect Dis*, 2018, **4**(2):135-145.
- [28] Liao DH, Yang SQ, Wang JY, et al. Total synthesis and structural reassignment of aspergillomarasmine A [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(13):4291-4295.

- [29] Koteva K, King AM, Capretta A, et al. Total synthesis and activity of the metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor aspergillomarasmine A [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(6):2210-2212.
- [30] Zhang J, Wang SS, Bai YJ, et al. Total syntheses of natural metallophores staphylopine and aspergillomarasmine A [J]. *J Org Chem*, 2017, **82**(24):13643-13648.
- [31] Albu SA, Koteva K, King AM, et al. Total synthesis of aspergillomarasmine A and related compounds: a sulfonamide approach enables exploration of structure-activity relationships [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, **55**(42):13259-13262.
- [32] Fu HG, Zhang JL, Saifuddin M, et al. Chemoenzymatic asymmetric synthesis of the metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor aspergillomarasmine A and related aminocarboxylic acids [J]. *Nat Catal*, 2018, **1**(3):186-191.
- [33] Guo QQ, Wu DS, Gao L, et al. Identification of the AMA synthase from the aspergillomarasmine A biosynthesis and evaluation of its biocatalytic potential [J]. *ACS Catal*, 2020, **10**(11): 6291-6298.
- [34] Zhang J, Wang SS, Wei Q, et al. Synthesis and biological evaluation of aspergillomarasmine A derivatives as novel NDM-1 inhibitor to overcome antibiotics resistance [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, **25**(19):5133-5141.
- [35] Somboro AM, Tiwari D, Bester LA, et al. NOTA: a potent metallo- $\beta$ -actamase inhibitor [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, **70**(5):1594-1596.
- [36] Zhang E, Wang MM, Huang SC, et al. NOTA analogue: a first dithiocarbamate inhibitor of metallo- $\beta$ -lactamases [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, **28**(2):214-221.
- [37] Li XS, Gui R, Li J, et al. Novel multifunctional silver nanocomposite serves as a resistance-reversal agent to synergistically combat carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, **13**(26):30434-30457.
- [38] Evans GW, Johnson PE. Characterization and quantitation of a zinc-binding ligand in human milk [J]. *Pediatr Res*, 1980, **14**(7):876-880.
- [39] Horsfall LE, Garau G, Liénard BMR, et al. Competitive inhibitors of the CphA metallo- $\beta$ -lactamase from *Aeromonas hydrophila* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, **51**(6):2136-2142.
- [40] Niu XD, Wang XY, Gao YW, et al. Insight into the inhibition mechanism and structure-activity relationship of 2,6-dipicolinic acid and its analogue to New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 [J]. *Mol Simulat*, 2019, **45**(6):525-531.
- [41] Hinchliffe P, Tanner CA, Krismanich AP, et al. Structural and kinetic studies of the potent inhibition of metallo- $\beta$ -lactamases by 6-phosphonomethylpyridine-2-carboxylates [J]. *Biochemistry*, 2018, **57**(12):1880-1892.
- [42] Chen AY, Thomas PW, Cheng ZS, et al. Investigation of dipicolinic acid isosteres for the inhibition of metallo- $\beta$ -lactamases [J]. *ChemMedChem*, 2019, **14**(13):1271-1282.
- [43] Boros E, Ferreira CL, Cawthray JF, et al. Acyclic chelate with ideal properties for  $^{68}\text{Ga}$  PET imaging agent elaboration [J]. *J Am Chem Soc*, 2010, **132**(44):15726-15733.
- [44] Shi XF, Wang MM, Huang SC, et al.  $\text{H}_2\text{depda}$ : an acyclic adjuvant potentiates meropenem activity *in vitro* against metallo- $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriales [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, **167**:367-376.
- [45] Cui DY, Yang Y, Bai MM, et al. Systematic research of  $\text{H}_2\text{dedpa}$  derivatives as potent inhibitors of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 [J]. *Bioorg Chem*, 2020, **101**:103965.
- [46] Chen FF, Bai MM, Liu WT, et al.  $\text{H}_2\text{dpa}$  derivatives containing pentadentate ligands: an acyclic adjuvant potentiates meropenem activity *in vitro* and *in vivo* against metallo- $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriales [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, **224**: 113702.
- [47] Azumah R, Dutta J, Somboro AM, et al. *In vitro* evaluation of metal chelators as potential metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors [J]. *J Appl Microbiol*, 2016, **120**(4):860-867.
- [48] Sosibo SC, Somboro AM, Amoako DG, et al. Impact of pyridyl moieties on the inhibitory properties of prominent acyclic metal chelators against metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: investigating the molecular basis of acyclic metal chelators' activity [J]. *Microb Drug Resist*, 2019, **25**(3):439-449.
- [49] Schnaars C, Kildahl-Andersen G, Prandina A, et al. Synthesis and preclinical evaluation of TPA-based zinc chelators as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors [J]. *ACS Infect Dis*, 2018, **4**(9): 1407-1422.
- [50] Wang MM, Chu WC, Yang Y, et al. Dithiocarbamates: efficient metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors with good antibacterial activity when combined with meropenem [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, **28**(21):3436-3440.
- [51] King DT, Strynadka NCJ. Targeting metallo- $\beta$ -lactamase enzymes in antibiotic resistance [J]. *Future Med Chem*, 2013, **5**(11):1243-1263.
- [52] Panlilio H, Lam AK, Heydarian N, et al. Dual-function potentiation by PEG-BPEI restores activity of carbapenems and penicillins against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae [J]. *ACS Infect Dis*, 2021, **7**(6):1657-1665.
- [53] Shin WS, Nguyen ME, Bergstrom A, et al. Fragment-based screening and hit-based substructure search: rapid discovery of 8-hydroxyquinoline-7-carboxylic acid as a low-cytotoxic, nanomolar metallo  $\beta$ -lactamase inhibitor [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2021, **98**(4):481-492.
- [54] Falconer SB, Reid-Yu SA, King AM, et al. Zinc chelation by a small-molecule adjuvant potentiates meropenem activity *in vivo* against NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* [J]. *ACS Infect Dis*, 2015, **1**(11):533-543.
- [55] Ishii Y, Eto M, Mano Y, et al. *In vitro* potentiation of carbapenems with ME1071, a novel metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor, against metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, **54**

- (9):3625-3629.
- [56] Livermore DM, Mushtaq S, Morinaka A, et al. Activity of carbapenems with ME1071 (disodium 2, 3-diethylmaleate) against Enterobacteriaceae and *Acinetobacter* spp. with carbapenemases, including NDM enzymes [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, **68** (1):153-158.
- [57] Legru A, Verdirosa F, Hernandez JF, et al. 1, 2, 4-Triazole-3-thione compounds with a 4-ethyl alkyl/aryl sulfide substituent are broad-spectrum metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors with re-sensitization activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, **226**:113873.
- [58] Gavara L, Verdirosa F, Legru A, et al. 4-(N-alkyl-and-acyl-amino)-1, 2, 4-triazole-3-thione analogs as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors: impact of 4-linker on potency and spectrum of inhibition [J]. *Biomolecules*, 2020, **10**(8):1094.
- [59] Gavara L, Legru A, Verdirosa F, et al. 4-Alkyl-1, 2, 4-triazole-3-thione analogues as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2021, **113**:105024.
- [60] Shaaban MM, Ragab HM, Akaji K, et al. Design, synthesis, biological evaluation and *in silico* studies of certain aryl sulfonyl hydrazones conjugated with 1, 3-diaryl pyrazoles as potent metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2020, **105**:104386.
- [61] Prandina A, Radix S, le Borgne M, et al. Synthesis and biological evaluation of new dipicolylamine zinc chelators as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors [J]. *Tetrahedron*, 2019, **75**(11):1525-1540.

### ·校园新闻·

## 孔令义教授团队受邀在*Natural Product Reports* 发表楝科柠檬苦素研究进展的综述

2022年5月24日,我校中药学院孔令义教授团队受邀在天然产物研究领域国际顶级综述期刊*Natural Product Reports*(IF: 13.423)在线发表了题为“Research Progress of Meliaceous Limonoids from 2011 to 2021”的综述论文。本文系统总结了近十年楝科柠檬苦素在新结构发现、生物活性以及合成方向的研究进展。罗俊教授为本文第一作者,博士生孙云鹏和硕士生李秋蓉也为本文作出了重要贡献,孔令义教授为本文的通讯作者,中国药科大学为本文唯一作者单位。

柠檬苦素(limonoids)是一类具有 $17\beta$ -呋喃环的四降三萜类化合物,是楝科和芸香科药用植物的主要化学成分。多样的骨架类型和显著的生物活性使其一直以来是天然药物研究领域的热点。近十年,包括30多种新颖骨架的1 600多个新柠檬苦素被发现,同时柠檬苦素的抗肿瘤、抗炎等药用生物活性以及化学和生物合成方面也取得了较多的研究进展。因此本文对楝科柠檬苦素近十年来在提取分离、结构鉴定、生物活性和化学及生物合成方面的研究进展进行了全面的综述,为从事该领域研究的科研人员提供了重要参考。

孔令义教授团队致力于中药和天然药物中结构新颖的活性化合物的发现和研究,已发现新化合物2 000余个,34个化合物被Nat. Prod. Rep. 杂志评为国际热点化合物“Hot off The Press”,其中楝科柠檬苦素是重要的研究方向之一。自2009年以来,本团队已经完成了楝科11属19种药用植物中柠檬苦素成分的研究工作,已在Org Lett, Acta Pharm Sin B, J Nat Prod, J Org Chem, Org Chem Front, Chin Chem Lett, Ind Crop Prod, Phytomedicine, Phytochemistry, Tetrahedron等天然产物研究领域国际权威和著名期刊发表包括12种新骨架在内的542个新柠檬苦素类化合物,约占同期全球发表新柠檬苦素分子总数的1/3。上述数据说明孔令义教授团队成为了楝科柠檬苦素研究领域国际上最活跃和知名的课题组之一,因此受Nat Prod Rep杂志主编Tobias Gulder教授的邀请,撰写楝科柠檬苦素研究进展的综述。

孔令义教授团队有关柠檬苦素的研究工作获得了国家自然科学基金项目(3项),江苏省自然科学基金(2项),以及学校“双一流”创新团队项目等的资助。

(科技处)